

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semir CANIMOĞLU

**GIDA TATLANDIRICISI OLARAK KULLANILAN MALTİTOL’UN
İNSAN LENFOSİTLERİNDE SİTOGENETİK ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA TATLANDIRICISI OLARAK KULLANILAN
MALTİTOL'UN İNSAN LENFOSİTLERİNDE SİTOGENETİK
ETKİLERİ**

Semir CANIMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez/...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Doç.Dr.Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof.Dr.Mehmet TOPAKTAŞ

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir. Proje No: FEF2004YL1**

☐ **Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GIDA TATLANDIRICISI OLARAK KULLANILAN MALTİTOL'UN İNSAN
LENFOSİTLERİNDE SİTOGENETİK ETKİLERİ**

Semir CANIMOĞLU
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Yıl : 2005, Sayfa: 87

Jüri : Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Bu çalışmada şeker alkoller (poliol) sınıfına giren düşük kalorili yapay tatlandırıcı maltitol'un insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Tüm dozlarda (1.25, 2.5 ve 5 mg/ml) ve muamele sürelerinde (24 ve 48 saat) maltitol, KKD sayısını istatistiksel olarak önemli derecede artırmamıştır. Aynı şekilde, tüm dozlarda maltitol KA sayısını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artırmış, fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Halbuki, maltitol 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli bir şekilde ($P<0.05$) artırmıştır, fakat bu artışın doza bağlı olmadığı saptanmıştır. Maltitol, tüm dozlarda ve muamele sürelerinde hem RI'ni hem de MI'i etkilememiştir. Ayrıca maltitol besiyerinin pH ve osmolitesini de değiştirmemiştir. Sonuç olarak maltitol'un in vitro insan lenfositlerinde zayıf genotoksik risk taşıyabileceğini fakat sitotoksik etkiye sahip olmadığını söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Maltitol, İnsan periferik lenfositleri, Kardeş kromatid değişimi, Kromozom anormallikleri, Mikronükleus

ABSTRACT

MSc THESIS

THE CYTOGENETIC EFFECTS OF FOOD SWEETENER MALTİTOL HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Semir CANİMOĞLU

DEPARTMENT OF BIOLOGY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Year : 2005, Pages: 87

Jury : Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

In the present study, the effects of the low caloric artificial sweetener maltitol, which is a member of sugar alcohol (polyol), on sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus formation (MN) were investigated in human peripheral lymphocytes.

Maltitol did not induce SCE in all concentrations (1.25, 2.5 and 5 mg/ml) and treatment periods (24 and 48 hours). Maltitol induced the CA when compared with control however, without statistically significant. Maltitol statistically significant ($P<0.05$) induced the frequency of MN for 24 and 48 hours treatment period, without dose-dependend manner. In addition maltitol did not decrease the RI and the MI in all concentrations and treatment periods. Also maltitol did not change the pH and osmolality of the chromosome medium. In conclusion, it can be concluded that maltitol has a weak genotoxic risk however it has not cytotoxic effect in human peripheral lymphocytes in vitro.

Key Words: Maltitol, Human peripheral lymphocytes, Sister chromatid exchange, Chromosome aberrations, Micronucleus

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam **Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Hocam **Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a**, Yrd. **Doç. Dr. Hasan Basri İLA**, Arş.Grv. **Ahmet KAYRALDIZ**, Arş.Grv. **Ayşe YAVUZ**, Arş.Grv. **Songül Budak DİLER**, Biyolog **Fatma Funda KAYA** ve Biyolog **Arzu YAVUZ'a** teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Tatlandırıcıların Genotoksik, Mutajenik ve Kanserojenik Etkileri.....	6
2.1.1. Asesulfam K (Acesulfam K).....	6
2.1.2. Alitam (Alitame).....	7
2.1.3. Aspartam (Aspartame).....	7
2.1.4. Siklamat (Cyclamate).....	9
2.1.5. Glisirhizin (Glycyrrhizin).....	10
2.1.6. Hernandulsin (Hernandulcin).....	11
2.1.7. Laktitol (Lactitol).....	11
2.1.8. Maltitol.....	12
2.1.9. Mannitol.....	12
2.1.10. Neohesperidin DC (Neohesperidin Dihydrochalcone).....	13
2.1.11. Neotam (Neotame).....	13
2.1.12. Sakkarin (Saccharin).....	14
2.1.13. Sellügin (Selligueain).....	16
2.1.14. Sorbitol.....	16
2.1.15. Stevia, Steviol ve Stevioside.....	17
2.1.16. Sukraloz (Sucralose).....	18
2.1.17. Tagatoz (Tagatose).....	19
2.2. Doğal Şekerlerin Genotoksik, Mutajenik ve Kanserojenik Etkileri.....	20
2.2.1. Fruktoz (Fructose).....	20
2.2.2. Glukoz (Glucose).....	20

2.2.3. Sukroz (Sucrose).....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.1.1. Maltitol.....	22
3.1.1.2. Kromozom Medyumu.....	25
3.1.1.3. Kolşisin (Kolkisin).....	25
3.1.1.4. Hipotonik Eriyik.....	25
3.1.1.5. Fiksatif.....	26
3.1.1.6. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd).....	26
3.1.1.7. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	26
3.1.1.8. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	27
3.1.1.9. Giemsa.....	27
3.1.1.10. Entellan.....	27
3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO ₃).....	27
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	28
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	28
3.1.2.2. Santrifüj.....	28
3.1.2.3. Mikroskop.....	28
3.1.2.4. İnkübatör.....	28
3.1.2.5. pH Metre.....	28
3.1.2.6. Osmometre.....	29
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	29
3.3. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	29
3.3.1. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve	

Preparatların Hazırlanması.....	29
3.3.2. Preparatların Boyanması.....	31
3.3.3. Mikroskopik İnceleme.....	32
3.3.3.1. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması.....	32
3.3.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması	32
3.3.3.1.(2). Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması.....	33
3.3.3.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	38
3.3.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	38
3.3.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	39
3.4.. Mikronukleus (MN) Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler...	39
3.4.1. Mikronukleus Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	39
3.4.2. Preparatların Boyanması.....	41
3.4.3. Mikroskopik İnceleme.....	41
3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	41
3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	42
4.BULGULAR.....	43
4.1. Maltitol'un KKD Üzerindeki Etkileri.....	43
4.2. Maltitol'un Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	45
4.3. Maltitol'un Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkileri.....	50
4.4. Maltitol'un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	54

5. TARTIŞMA.....	57
5.1. Maltitol'un KKD, KA ve MN Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	57
5.2. Maltitol'un DNA Replikasyonu (RI) ve Mitoz Bölünme (MI) Üzerindeki Etkileri.....	59
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde ortalama KKD sayısı.....	43
Çizelge.4.2. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı ve KA/hücre.....	45
Çizelge 4.3. Değişik dozlarda Maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde mikronükleus sayısı.....	51
Çizelge 4.4. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde RI ve MI.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Maltitol'un açık formülü.....	24
Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi.....	33
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	34
Şekil 3.4. BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.	36
Şekil 3.5. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000...	37
Şekil 3.6. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000.....	37
Şekil 3.7. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000...	38
Şekil 4.1. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre	43
Şekil 4.2. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde 8 KKD içeren hücre (2.5 mg/ml, 24 saat, ♂). x1000.....	44
Şekil 4.3. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde 66 KKD içeren hücre (0.25 µg/ml, 24 saat, ♀). x1000..	44
Şekil 4.4. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi.....	46
Şekil 4.5. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde KA/Hücre sayısı.....	46
Şekil 4.6. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde kromatid kırığı (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.....	47
Şekil 4.7. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde kromozom kırığı (2.5 mg/ml, 24 saat, ♂). x1000.....	47
Şekil 4.8. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid birleşmesi (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.....	48
Şekil 4.9. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde kromatid değişimi (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.....	48

Şekil 4.10. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde çoklu anormallik içeren metafaz plağı (0.25 µg/ml, 48 saat, ♂). x1000.....	49
Şekil 4.11. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromatid gap (5 mg/ml, 48 saat, ♀). x1000.....	50
Şekil 4.12. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde iki nükleuslu hücre başına düşen MN sayısı.....	51
Şekil 4.13. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde iki nükleuslu hücre/tek nükleuslu hücre.....	52
Şekil 4.14. Farklı dozlarda maltitol ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	52
Şekil 4.15. MMC ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde 4 mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (0.25 µg/ml, 48 saat, ♂). x2000.....	53
Şekil 4.16. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (5 mg/ml, 48 saat, ♀). x2000.....	53
Şekil 4.17. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde RI.....	55
Şekil 4.18. Farklı dozlarda maltitol ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde RI'nin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	55
Şekil 4.19. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde MI.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADI:	Günlük Kullanılabilir Miktar (Acceptable Daily Intake)
B':	Kromatid Kırığı
B'':	Kromozom Kırığı
BrdUrd:	5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA:	Chromosome Aberration
CHO:	Çin Hamster Ovaryum
CHL:	Çin Hamster Lenfosit
DS:	Disentrik Kromozom
dT:	Deoxytimidin
dU:	Deoxyuridine
DNA:	Deoksiribonukleik Asit
i.p.:	İntraperitoneal
KA:	Kromozomal Aberasyon
KCl:	Potasyum klorür
KD:	Kromatid Değişimi
KKD:	Kardeş Kromatid Değişimi
MMC:	Mitomycin C
MI:	Mitotik indeks
NaCl:	Sodyum klorür
P:	Poliploidi
RI:	Replikasyon indeksi
rpm:	Round (Rotor) Per Minute
SCD:	Kardeş kromatidlerin farklı boyanması
SCE:	Sister Chromatid Exchange
SSC:	Standart Saline Citrate
SU:	Sister Union
UV:	Ultraviole (Morötesi)
WHO:	Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organisation)
FAO:	Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation)

1.GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşsal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir (Altuğ, 1999).

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürelemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitratin etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve bozulmayı önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 50'li yıllarda baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. 19. yüzyıldaki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır (Altuğ, 1999).

Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde ciddi bir artış olduğu bilinmektedir. Örneğin sadece İngiltere'de bir yıl içinde kullanılan katkı maddelerinin toplam ağırlığının iki yüz bin tonu geçtiği sanılmaktadır. Çoğu aroma/lezzetlendirici olmak üzere toplam altı bin civarında katkı maddesi bulunmaktadır ve tatlandırıcı maddeler de gıdalarda kullanılan önemli bir grubu oluşturmaktadırlar.

Gıdaya tatlı tadı veren ve şeker olmayan maddeler olarak tanımlanan tatlandırıcılar, farklı kimyasal yapıları sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Tatlandırıcı etkisi bilinen en eski madde şeker grubundaki sukroz olup, glukoz, fruktoz, hidrolize nişasta şurupları ve yüksek fruktozlu mısır şurupları da tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır. Ancak, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (FAO)'nın oluşturdukları Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC) tarafından yukarıda sayılan ve şeker

özellği taşıyan bu maddeler gıda katkı maddesi olarak nitelendirilmemektedir (Altuğ ve Elmacı, 2001).

Şekerler dışında tatlandırıcı etkisi bulunan bitkilerin gıda ve içeceklerde kullanımı özellikle tropikal ülkelerde asırlar öncesine dayanmaktadır. Örneğin, *Thaumatococcus daniellii* bitkisinin su ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen tomatın seyreltik sukroz çözeltisinden 3500 kez daha fazla tatlıdır ve Batı Afrika'lılar tarafından asırlardır kullanılmaktadır (Altuğ ve Elmacı, 2001). 1878 yılında sakkarinin keşfi ile kuvvetli tatlandırma özelliği bulunan yapay tatlandırıcıların kullanılma devri başlatılmış oldu. Bu tarihten sonra tatlandırıcı özelliği bulunan bir çok madde bulunmuş, fakat toksikolojik özellikleri yüzünden ancak bunların bazılarının (asesulfam K, aspartam, alitam, sakkarin, siklamat, dulcin, neotam, gibi) kullanımına izin verilmiştir. I. ve II. Dünya savaşları sırasında oluşan şeker kıtlığı dolayısıyla ve şekerden daha ucuz olması nedeni ile sakkarin kullanımı yaygınlaşmıştır.

Yaklaşık son 50 yıldır şeker yerine tatlandırıcı kullanımı giderek artmaktadır. Yüksek oranda karbonhidrat, özellikle şeker tüketiminin insanlarda kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere obezite (şişmanlık), diyabetes mellitus (şeker hastalığı) ve diğer hastalıklara neden olduklarının belirlenmesi sonucu şekerler dışındaki tatlandırıcılara ilgi giderek artmıştır (Altuğ ve Elmacı, 2001). Sistemli diyet reçetelerinin düzenlenmesine olan gereksinim ve tatlandırıcı katılmış gıdaların geniş çapta üretimi ile piyasada bu tip katkı maddelerini içeren düşük kalorili ve diyet amaçlı gıda çeşitlerinde de artış gözlenmiştir. Günümüzde tatlandırıcıların katıldıkları gıdalar, diyabetik ve metabolik bozuklukları olan kişilerin yanında vücut ağırlığını dengelemek isteyen kişiler tarafından da yoğun bir şekilde tüketilmektedir.

Bu maddelerin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmaya başlamıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri; egzema, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, özellikle çocuklarda olmak üzere ishal, hiperaktiflik ve aşırı duyarlılık (hypersensitivity)'tır (Hill and Belsito, 2003; Breiteneder, 2004; Hegde ve Venkatesh, 2004; Koskela ve ark., 2004). Gıda katkı maddelerinden olan tatlandırıcıların muhtemel olan bu etkileri yanında çok daha ciddi olan ve gelecek nesillerin sağlıksız olmasına sebep olabilecek mutasyon

veya kanser oluşturma riskleridir. Bir kimyasal maddenin böyle bir genotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri ile mümkün olabilmektedir.

Bugün kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesinde kardeş kromatid değişimi (KKD)(sister chromatid exchange=SCE) testi, kromozom anormalliği (KA)(chromosome aberration=CA) testi ve mikronükleus (MN) testi kullanılmaktadır. Perry ve Evans (1975) *Chinese hamster ovary* (CHO) hücrelerinde çeşitli mutajen ve kanserojenlerin KKD ve KA sayısını artırdığını saptamışlardır. Daha sonra Carrano ve ark. (1978) mutajen ve kanserojenlerin toksik dozlarının altında meydana getirdikleri genetik hasarın süratle gösterilmesinin KKD ve KA analizleri ile mümkün olabileceğini, ayrıca bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunu artırması arasında doğrusal bir ilişkinin olduğunu da belirtmişlerdir.

Tatlandırıcıların genotoksik ve kanserojenik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda daha çok ilk yapay tatlandırıcı olan saakkarin üzerinde durulmuştur ve sakkarinin hem mutajenik hem de kanserojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Wolff ve Rodin, 1978; Moore ve Schmick, 1979; Renner, 1979; Taylor ve ark., 1980; Cohen ve ark., 1982; Mahon ve Dawson, 1982; Amstrong, 1985; Squire, 1985; Ashby ve Ishidate, 1986; Thomas ve ark., 1986; Suzuki ve Suzuki, 1998; Takayama ve ark., 1998; Takayama ve ark., 2000; Sasaki ve ark., 2002). Günümüzde yoğun olarak kullanılan diğer bir yapay tatlandırıcı olan aspartam'ın da genotoksik (Shephard ve ark., 1993; Rencüzoğulları ve ark., 2004) ve kanserojenik (Gurney ve ark., 1997; Schwartz, 1999) etkiye sahip olduğu bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bununla birlikte, yapay veya doğal bir çok tatlandırıcının mutajenik ya da kanserojenik etkiye sahip oldukları bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Jemison ve ark., 1984; Sheu ve ark., 1986; Compadre ve ark., 1988; Brusick ve ark., 1989; Kruger ve ark., 1999; Dragsted ve ark., 2002; Hansen ve ark., 2004).

Çalışmamızda kullandığımız maltitol (4-o- α -D-glukopiranozil-D-sorbitol) bir şeker alkolüdür (poliol) ve bir disakkarit olan maltozun hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır (Suzuki ve Tamura, 1988; Tsukamura

ve ark., 1998'den). Maltitol hacim verici olmasından yani su tutma özelliğinden dolayı gıdaların kalitesinin artırılmasında özellikle fırınlanmış ürünlerde, reçellerde ve marmelatların yapımında, ayrıca diyet türü tatlılarda, sakızlarda ve dondurma yapımında kullanılmaktadır. Tarım Bakanlığı tarafından maltitol'un gıdalardaki kullanım miktarına herhangi bir sınırlama getirilmemiş ve gıdalarda ihtiyaç duyulan miktarlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Tarım Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi, 1997). Takizawa ve Hachiya (1984), maltitol'un *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* suşlarında mutajen olmadığını ve fare kemik iliğinde de MN oluşumunu artırmadığını bildirilmişlerdir. Maltitol'un sıçan kalın barsağında dimethylhidrazin'in kanser oluşumunu inhibe ettiği (Tsukamura ve ark., 1998), dişlerde plak oluşumuna sebep olmadığı (Maguire ve ark., 2000), ayrıca genç ve yetişkin sıçanlarda ince bağırsaktan kalsiyum Emilimini artırdığı ve kemiğin kırılma direncini yükselttiği (Kishi ve ark., 1996; Fukahori ve ark., 1998; Goda ve ark., 1998) bildirilmiştir. Halbuki, 40 g olarak çikolataya enjekte edilen maltitol'un insanlarda sancı ve gaz oluşumuna sebep olduğu saptanmıştır (Koutsou ve ark., 1996; Storey ve ark., 1998). Maltitol, midede hidrolize olarak sorbitol ve glukoz dönüşmektedir (Altuğ ve Elmacı, 2001). Johannes ve ark. (1992), sorbitol'un CHO hücrelerinde DNA zararlarını indüklediğini, Tatewaki ve ark. (2002) da glukoz'un blastosit kültüründe KA oluşumunu artırdığını saptamışlardır. Sorbitol vücutta Emiliminden sonra dehidrogenaz enzimi ile okside olarak fruktoza dönüşmekte, oluşan fruktoz ise fruktojenaz enzimi ile fruktoz-1-fosfata dönüşmektedir. Bu metabolit de karaciğerde aldolaz B enzimi ile dihidroksiasetonfosfat ve gliseraldehite parçalanmakta, dihidroksiasetonfosfat ise piruvat veya glikoz ve glikojene metabolize olmaktadır. MacGregor ve ark. (1989), fruktoz/lisin karışımının oral olarak verildiğinde farelerde MN oluşumunu artırmadığını, halbuki CHO hücrelerinde şiddetli klastojenik etki gösterdiğini saptamışlardır. 1,5-Anhydro-D-fruktozun fare lenfoma L5178Y hücrelerinde ve Ames testinde mutajen olmadığı saptanmıştır (Yu ve ark., 2004).

Yukarıdaki çalışmalardan görüldüğü gibi maltitol'un in vitro genotoksik etkisi ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bir kimyasal maddenin mutajenik ya da kanserojenik etkiye sahip olup olmadığının belirlenebilmesi için kısa süreli

mutajenite ve kanserojenite testlerinden oluşan bir test grubu ile kimyasalın test edilmesi ve ona göre karar verilmesi gerekmektedir. İşte bu çalışmada amacımız, maltitol'ün insan periferik lenfositlerinde KKD, KA ve MN oluşumu, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi üzerindeki etkilerini araştırmak, dolayısıyla insanlar için genotoksik risk taşıyıp taşımadığını belirlemektir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tat veren maddeler tatlandırıcılar ve doğal şekerler olarak ayrılmış ve bu maddelerin in vivo deney hayvanları ya da in vitro insan veya deney hayvanlarının çeşitli dokuları kullanılarak saptanan genotoksik, mutajenik ve kanserojenik etkileri üzerinde daha önce yapılan çalışmalar alfabetik sıraya göre verilmiştir.

2.1. Tatlandırıcıların Genotoksik, Mutajenik ve Kanserojenik Etkileri**2.1.1. Asesulfam K (Acesulfam K)**

Asesulfam K (E950) 1967 yılında bulunmuş ve sukroz'dan 100-200 kat daha fazla tat veren, kalorisiz yapay bir tatlandırıcıdır. Sunnet ticari adıyla satışa sunulmaktadır.

Durnev ve ark. (1995), 5 gün boyunca oral yolla günlük 15 ve 150 mg/kg dozlarında asesulfam K verilen C57Bl/6 farelerinde KA'nin indüklenmediğini bildirmişlerdir. Jeffrey ve Williams (2000), 5×10^{-3} , 1×10^{-2} ve 4×10^{-2} M dozlarında asesulfam K'nın sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını, Sasaki ve ark. (2002) da fare organları (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay deneyinde 2000 mg/kg (3 ve 24 saat) dozunda asesulfam K'nın hiçbir organda DNA zararına sebep olmadığını bildirmişlerdir. Weihrauch ve ark. (2004), yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda asesulfam K'nın genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını söyleyebilmek için daha erken olduğunu, dolayısıyla bu yeni kuşak tatlandırıcının kesin etkisini belirleyebilmek için ise ilave çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir.

Halbuki, Mukherjee ve Chakrabarti (1997) toksik olmayan dozlarda ve gavaj yoluyla Swiss albino farelerine verilen asesulfam K'nın fare kemik iliğinde KA sayısını doza bağlı bir şekilde artırdığını saptamışlardır.

2.1.2. Alitam (Alitame)

Alitam 1980 yılında Aclame adı altında piyasaya sürülen yapay bir tatlandırıcıdır ve sukroz'dan yaklaşık olarak 2000 defa daha tatlıdır.

Weihrauch ve Diehl (2004), yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda alitam'ın genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını söyleyebilmek için daha erken olduğunu, dolayısıyla bu yeni kuşak tatlandırıcının kesin etkisini belirleyebilmek için ilave çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.3. Aspartam (Aspartame)

Aspartam (E951) şekerden 160 kat daha fazla tat veren düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır. 1965 yılında bulunmuş ve 1980 yılından itibaren NutraSweet, Equal veya Canderel gibi değişik ticari adlar altında piyasada satılmaktadır.

Ishii (1981), 104 hafta boyunca günlük 1, 2 ve 4 g/kg aspartam ile beslenmiş sıçanlarda beyin tümörünün gelişmediğini, Ito ve ark. (1984) da içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında aspartam katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde neoplastik gelişime rastlanmadığını saptamışlardır. Durnev ve ark. (1995), 40 ve 400 mg/kg dozlarında aspartam'ın C57Bl/6 farelerinin kemik iliğinde klastojenik etki göstermediğini, Mukhopadhyay ve ark. (2000) da Swiss albino farelerin kemik iliğinde 15 mg/kg dozunda asesulfam K ile 35 mg/kg dozunda aspartam'ın karışım halinde genotoksik olmadığını, halbuki 350 mg/kg aspartam ile 150 mg/kg asesulfam K'nın karışım halinde KA oluşumunu önemli derecede artırdıklarını bildirmişlerdir. Jeffrey ve Williams (2000), 5×10^{-3} ve 1×10^{-2} M dozlarında aspartam'ın F344 ve Sprague-Dawley sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını saptamışlardır. Sasaki ve ark. (2002), farelerin 8 farklı organı (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay çalışmasında 2000 mg/kg dozunda 3 ve 24 saat aspartam ile muamele edilen farelerin hiçbir organda DNA zararının oluşmadığını bildirmişlerdir. Weihrauch ve Diehl (2004), epidemiyolojik çalışmalarda aspartam'ın kanser oluşumuyla bir ilişkisinin kurulamadığı, çeşitli

kaynaklarda belirtilen aspartam'ın kanser yapıcı etkiye sahip olduğu şeklindeki bilgilerin ise ihmal edilebilir olduğunu bildirmişlerdir. Kulakova ve ark. (1999), aspartam'ın anti-mutajenik etkisini C57B1/6 farelerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar dioxydin ve cyclophosphan'ın farelere verilmesinden bir hafta sonra farelere 0.4-40 mg/kg dozlarında aspartam vermişler ve KA sayısını saptamışlardır. Bu çalışmaya göre aspartam'ın dioxydin ve cyclophosphan'ın mutajenik etkisini azaltmamış yani anti-mutajenik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Halbuki, Creppy ve ark. (1998), aspartam'ın mikotoksin olan ochratoxin A (OTA)'nın farelerde oluşturduğu toksik etkiyi engellediğini bildirmişlerdir. Ayrıca Butchko ve ark. (2002) yaptıkları derleme çalışmasının sonuçlarına göre aspartam'ın kanser yapıcı etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bununla birlikte, Rencüzoğulları ve ark. (2004), 500, 1000 ve 2000 µg/ml aspartam ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde aspartam'ın KKD oluşumunu indüklediğini, fakat hem KA hem de MN sayısını artırdığını ve sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar 50-2000 µg/petri dozlarında aspartam'ın *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Shephard ve ark. (1993), aspartam'ın nitrit ile muamele edilmesinden sonra oluşan nitroso-aspartam'ın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında kuvvetli mutajenik etki gösterdiği, bu mutajenik etkinin TA98 suşuna oranla TA100 suşunda daha fazla görüldüğünü saptamışlardır. Aynı araştırmacılar mide ve ince bağırsakta dipeptid bileşiklerinin aynı şekilde nitrozlandığını ve bundan dolayı da daha fazla mutajenik etki gösterebildiklerini de ifade etmişlerdir. Olney ve ark. (1996), aspartam'ın Sprague Dawley sıçanlarında kanserojenik etki yapabileceğini belirtmiş, FDA tarafından desteklenen ve besin yoluyla aspartam verilen 320 Sprague Dawley sıçanlarında beyin tümörünün oluştuğu bildirilmiş, yani Olney ve ark. (1996)'nın sonuçlarını desteklemişlerdir (Aspartam üzerinde yapılan E33-34 master çalışması FDA: Weihrauch ve ark., 2001'den). Halbuki Ishii ve ark. (1981), aspartam'ın sıçanlarda kansere sebep olmadığını açıklamıştır.

2.1.4. Siklamat (Cyclamate)

Siklamik asidin (E952) sodyum veya kalsiyum tuzları şeklinde üretilen siklamat 1937 yılında keşfedilmiş yapay bir tatlandırıcıdır. Enerji vermeyen ve şekerden yaklaşık olarak 30-50 kat daha fazla tat veren bir tatlandırıcıdır.

Kessler ve Clark (1978), 519 siklamat kullanıcısı ve aynı sayıda kontrol gruplarıyla yaptıkları epidemik çalışmada siklamat'ın insanlarda kanser oluşumunu artırmadığını bildirmişlerdir. Ito ve ark. (1984), içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında sodyum siklamat katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde neoplastik gelişime rastlanmadığını saptamışlardır. Aynı şekilde, Armstrong (1985) da epidemiyolojik çalışmalar sonucunda siklamat'ın insanlarda mesane kanseri oluşturmadığını fakat, sigara içmeyen ve siklamat kullanan bayanların yüksek risk altında olduklarını bildirmiştir. Herbold (1981) siklamat'ın *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA1537 ve TA98 suşlarında metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda mutajenik etki göstermediğini saptamıştır. Cain ve ark. (1988), 6 hafta boyunca kalsiyum siklamat'ın tolere edilebilecek maksimum dozunu oral olarak farelere vermişler ve fare germ hücrelerinde kalsiyum siklamat'ın dominant letal mutasyon ve translokasyonlar üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda her iki testin sonucunun negatif olduğunu bildirmişlerdir. Brusick ve ark. (1989), kalsiyum siklamat'ın mutajenik etkisini saptamak için in vitro memeli hücre testini, in vitro zamansız DNA sentezi deneyini ve *Drosophila* eşeme bağlı resesif letal gen testini kullanmışlardır. Araştırmacılar kalsiyum siklamat'ın tüm testlerde negatif sonuç verdiğini, sadece 1 mg/ml ve daha yüksek dozlarda kullanıldığında sıçan hepatositlerinde toksik etki oluşturduğunu saptamışlardır. Ahmed ve Thomas (1992), epidemiyolojik çalışmalar onucunda siklamat'ın tek başına kanserojenik olmadığını fakat, hayvanlarla yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda siklamat'ın kanserojenik aktiviteye sahip olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, aynı araştırmacılar siklamat'ın kanserojenik ve mutajenik etkisini belirleyebilmek için ilave çalışmalara gerek olduğunu özellikle siklamat'ın metabolitlerinin çalışılmasının gerekli olduğunu açıklamışlardır. Durnev ve ark. (1995), 5 gün boyunca oral yolla günlük 11 ve 110 mg/kg dozlarında siklamat

verilen C57Bl/6 farelerinde KA'nın indüklenmediğini bildirmişlerdir. Takayama ve ark. (2000), 24 yıl boyunca ve doğumdan hemen sonra yiyeceklerine günde 100-500 mg/kg sodyum siklamat katılan maymunların bazılarında metastatik kolon, karaciğer ve prostat kanserlerine rastlandığını fakat bununla birlikte sodyum siklamat ile kanser oluşumu arasında direkt bir ilişki kuramadıklarını belirtmişlerdir. Weihrauch ve Diehl (2004), epidemiyolojik çalışmalar sonucunda siklamat'ın insanlarda ve hayvanlarda kanser oluşumu ile bir bağlantısının kurulamadığını bildirmişlerdir. Jeffrey ve Williams (2000), 2×10^{-2} ve 4×10^{-2} M konsantrasyonlarında siklamat'ın sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını, halbuki Sasaki ve ark. (2002), fare organları (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay çalışmasında 100, 1000 ve 2000 mg/kg dozlarında sodyum siklamat ile 3 ve 24 saat muamele edilen farelerin gastrointestinal sistemlerinin hücre DNA'larında kırıklar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Halbuki, Jemison ve ark. (1984), insan periferik lenfositlerini 10^{-2} ve 10^{-3} molar konsantrasyonunda kalsiyum siklamat ile muamele etmişler ve kalsiyum siklamat'ın KA'ni indüklediğini, hücreleri mitoz bölünmeye teşvik ettiğini yani MI'ı arttırdığını bildirmişlerdir.

2.1.5. Glisirhizin (Glycyrrhizin)

Licorice ticari adıyla satılan glisirhizin, *Glycyrrhiza glabra* bitkisinden elde edilen ve şekerden 30-50 kat daha fazla olan bir tatlandırıcıdır. Tatlandırıcı olarak kullanılabildiği gibi bazı ilaç ve tütün ürünlerinde aroma verici olarak da kullanılabilmektedir.

Kobuke ve ark. (1985), B6C3F1 farelerinin içme sularına 96 boyunca % 0.15 olarak katılan disodyum glisirhizin'in toksik ve kanserojenik etkiye sahip olmadığını saptamışlardır. Sheu ve ark. (1986), 10 hafta boyunca sıçanların besinlerine ve 8 hafta boyunca farelerin besinlerine katılan glisirhizin'in dominant letal mutasyonunu istatistiksel olarak önemli derecede indüklediğini saptamışlardır. Tanaka ve ark. (1987), glisirhizin'in Ames Testinde antimutajenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (1991), glisirhizin'in beta ve alfa izomerlerinin

antimutajenik etkisini *S. typhimurium*'da, anti kanserojenik etkisini de SENCAR sıçanlarında çalışmışlardır. Araştırmacılar, glisirhizin izomerlerinin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında benzo[a]pyrene (B[a]P), 2-aminofluorene ve aflatoxin B1'in mutajenik etkisini inhibe ettiklerini, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate'ın kanserojenik etkisine karşı sıçanları koruduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten Kobayashi ve ark. (2002), 10 g/kg olarak metastatik kanserli fareye verilen glisirhizin'in kanser hücrelerinin metastaz etkisini yok ettiğini saptamışlardır. Zani ve ark. (1993), Salmonella/mikrozom test sisteminde glisirhizin'in ethyl methanesulfonate'ın mutajenik etkisini azalttığını, halbuki Ohtsuka ve ark. (1995), glisirhizin'in *S. typhimurium*'un TA100 suşuna mutajen bir madde olan 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) maddesinin mutajenik etkisini azaltmadığını yani antimutajenik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Sasaki ve ark. (2002), 8 fare organı (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay çalışmasında 2000 mg/kg dozunda glisirhizin ile 3 ve 24 saat muamele edilen farelerde DNA zararlarının oluşmadığını bildirmişlerdir.

2.1.6. Hernandulsin (Hernandulcin)

Hernandulsin, 19. yüzyılda Meksika'da keşfedilen, *Lippia dulcis* Trev. bitkisinden ekstraksiyonla elde edilen ve şekerden 1000 kat daha fazla tatlı olan bir tatlandırıcıdır.

Compadre ve ark.(1985), hernandulsin oral olarak verildiğinde farelerde toksik etki oluşturmadığını ve bakteri deneylerinde de mutajenik olmadığını saptamışlardır. Halbuki, aynı araştırmacılar (Compadre ve ark., 1988) hernandulsin'in 3-desmethyl türevinin *S. typhimurium* TM677 suşunda mutajenik olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.7. Laktitol (Lactitol)

Sukroz'a kıyasla daha düşük bir tatlılık şiddetine sahip olan laktitol, laktoz'un yüksek sıcaklık ve basınçta katalitik hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili bir tatlandırıcıdır.

Iwakura ve ark. (1994), laktitol'un mutajenik ve genotoksik etkisini *S. typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, ve TA98) ve *E. coli* (WP2uvrA) suşları, kültüre edilmiş *C. hamster* akciğer hücreleri ve fare polikromatik eritrositlerinde mikronükleus testi ile araştırmışlar ve laktitol'un hem in vivo hem de in vitro ortamda mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olmadığını saptamışlardır.

2.1.8. Maltitol

Maltitol (E965) bir şeker alkolüdür (poliol) ve bir disakkarit olan maltozun hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır.

Takizawa ve Hachiya (1984), *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 ve *Escherichia coli* WP2/Pkm101 ile yaptıkları çalışmalarda maltitol'un mutajeniteye sebep olmadığını ve fare kemik iliği ile yaptıkları çalışmada da MN oluşumunu indüklemeyi bildirmişlerdir. Tsukamura ve ark. (1998), %1 ve %5 dozlarında 27 hafta boyunca maltitol ile beslenen sıçanlarda maltitol'un sıçan çekum ve kalın bağırsağında kanser oluşturan 1,2 dimetilhidrazin'in kanser oluşturma etkisini azalttığını, yani oral olarak alınan maltitol'un anti-kanserojenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.9. Mannitol

Mannitol (E421) bir şeker alkolüdür (poliol) ve diyabetik hastalar tarafından kullanılabilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır.

Weitberg ve ark. (1985), uyarılmış insan fagosit hücrelerinin kültüre edilmiş memeli hücrelerinde KKD oluşumunu indüklediklerini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar mannitol'un anti oksidan gibi etki yaparak insan fagositlerine karşı hayvan hücrelerini koruduğunu bildirmişlerdir. Aliev ve ark. (1992), mannitol'un albino sıçanlarda iyonize radyasyon ve cyclophosphate'in mutajeniteleri üzerindeki etkisini çalışmışlar ve mannitol'un önemli bir anti-mutajenik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

2.1.10. Neohesperidin DC (Neohesperidin Dihydrochalcone)

Neohesperidin DC 1960 yılında narenciyeden üretilen yapay bir tatlandırıcıdır. Şekere nazaran 340 defa daha tatlı olan neohesperidin DC ilk defa 1994 yılında Avrupa ülkeleri tarafından tatlandırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Sahu ve ark. (1981), farelerde neohesperidin DC'nin mikronükleus oluşumunu indüklediğini halbuki, MacGregor ve ark. (1983), 100-1000 mg/kg dozlarında neohesperidin DC'nin farelerin periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumunu indükmediğini bildirmişlerdir. Lina ve ark. (1990), 91 gün boyunca diyetlerine %0, %0.2, %1.0 ve %5.0 dozlarında neohesperidin DC verilen Wistar sıçanlarında herhangi toksik etki görülmediğini saptamışlardır. Aynı şekilde, Waalkens-Berendsen ve ark. (2004), neohesperidin DC'nin embriyotoksik ve teratojenik etkisini Wistar Crl:(WI)WU BR sıçanlarında çalışmışlardır. Hamile sıçanlara hamilelik başlangıcından sonuna kadar (0-21 gün arası) yiyeceklerine 0.8-0.9 (düşük doz), 1.6-1.7 (orta doz) ve 3.1-3.4 (yüksek doz) g/kg konsantrasyonlarında neohesperidin DC verilmiştir. Hiçbir grupta neohesperidin DC'nin fetotoksik, embriyotoksik ve teratojenik etkisine rastlanmamıştır.

2.1.11. Neotam (Neotame)

FDA tarafından 2002 yılında onay alan yeni kuşak tatlandırıcılardan birisidir. Aspartam'a benzer yapıya sahip fakat fenilalanin oluşturmeyen yapay tatlandırıcıdır. Şekerden 7.000-13.000 kat daha tatlıdır.

Weihs ve Diehl (2004), yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda neotam'ın genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını söyleyebilmek için daha erken olduğunu dolayısıyla bu yeni kuşak tatlandırıcının kesin etkisini belirleyebilmek için ilave çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.12. Sakkarin (Saccharin)

1879 yılında keşfedilen sakkarin (E954), bilinen en eski tatlandırıcılardan birisidir. Şekere nazaran 300 kat daha tatlıdır ve enerji vermeyen yapay bir tatlandırıcı olarak birinci dünya savaşından beri kullanılmaktadır..

Wolff ve Rodin (1978), sodyum sakkarin'in insan lenfositleri ve *Chinese hamster ovary* (CHO) hücrelerinde kardeş kromatid değişimini (KKD) indüklediğini, farelerde mesane kanserine sebep olduğunu dolayısıyla hem kanserojenik hem de mutajenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Renner (1979), *Chinese hamster* kemik iliği hücrelerinde sakkarin'in KKD'yi indüklediğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde, Moore ve Schmick (1979), sakkarin'in *Saccharomyces cerevisiae*'da rekombinasyona sebep olduğunu (intergenik ve intragenik rekombinasyona) saptamışlardır. Ito ve ark. (1984), da içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında sodyum sakarin katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde hafif neoplastik gelişime rastlandığını saptamışlardır. Squire (1985), iki generasyon boyunca yiyeceklerine %1 sodyum sakkarin katılan IRDC sıçanlarında mesane kanserine rastlanmadığını, sadece %6.25 ve %7.5 dozları verilen sıçanlarda hiperplasia oluşumu yanı sıra transisyonel hücre karsinomunun oluştuğunu bildirmiştir. Ashby ve Ishidate (1986) *Chinese hamster* akciğer (CHL) fibroblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada sakkarin'in sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum tuzlarının KA'ni indüklediğini bildirmişlerdir. Thomas ve ark. (1986), tek doz sakarin verilen sağlıklı insanların idrarlarının mutajenik etkilerini Ames Test sistemi ile çalışmışlardır. Sakarin verilmesinden sonra alınan idrarların *S. typhimurium* TA98 ve TA38 suşlarında önemli düzeyde mutajenik etki oluşturduklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bu durumun idrar yoluyla atılan sakkarin'in mesane kanserine sebep olmasını açıklayabildiğini belirtmişlerdir. Suzuki ve Suzuki (1988), insan RSa hücreleri ile yaptıkları çalışmada sakkarin'in doza bağlı olarak mutajeniteyi arttırdığını bildirmişlerdir. Sasaki ve ark. (2002) farelerin 8 farklı organında (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) sakkarin'in DNA üzerindeki etkisini Comet Assay ile çalışmışlar 100, 1000 ve 2000 mg/kg dozlarında sakarin ve sodyum sakarin ile 3 ve

24 saat muamele edilen farelerin gastrointestinal sistemlerinde DNA zararlarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Weihrauch ve Diehl (2004), insanlarla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda sakkarin'in mesane kanserine sebep olmadığını, ancak yüksek dozlarda sakkarin'in sıçanlarda mesane kanserini indüklediğini bildirmişlerdir.

Halbuki, Kessler ve Clark (1978), 519 sakkarin kullanan kişi ve aynı sayıda kontrol gruplarıyla yaptıkları epidemik çalışmada sakkarin'in kanserojeniteye sebep olmadığını bildirmişlerdir. Leonard ve Leonard (1979), sakkarin'in in vivo genotoksik etkisini fare kemik iliği KA testi, polikromatik eritrositlerde (PCE) MN testi, spermatosit test ve dominant letal testi ile çalışmışlardır. Bunun için sakarin, farelere 1, 2 ve 4 g/kg dozlarında i.p.(karınzarı içine) olarak veya içme sularına 100 gün boyunca günde 20 g olarak verilmiştir. Araştırmacılar sakkarin'in tüm testlerde negatif sonuç verdiğini saptamışlardır. Aynı şekilde Eckhardt ve ark. (1980), sakkarin'in *S. typhimurium* ve *Drosophila*'da mutajen olmadığını, farelerde de mikronukleus oluşumunu artırmadığını açıklamışlardır. Herbold (1981), sakkarin'in *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA1537 ve TA98 suşlarında metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda mutajenik etki göstermediğini saptamıştır. Takayama ve ark. (1998), 25 yıl boyunca haftada 5 gün ve günde 25 mg/kg sakkarin verilen maymunlarda idrar yollarında herhangi bir hücre proliferasyonuna rastlanmadığını bildirmişlerdir. Pecevski ve ark. (1983), fare ve onların birinci kuşaklarında (F₁) sakkarin'in fertilite ve kromozomal translokasyonlar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. İki hafta boyunca 200-500 mg/kg sakkarin verilen farelerde fertilitenin etkilenmediği ve mayoz hücrelerinde herhangi kromozomal anormalliğin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Armstrong (1985), epidemiyolojik çalışmalar sonucunda sakkarin'in insanlarda mesane kanseri oluşturmadığını fakat, sigara içmeyen ve sakkarin kullanan bayanların yüksek risk altında olduklarını bildirmiştir. Dropkin ve ark. (1985), sakkarin'in teratojenik ve genotoksik etkilerini ICR albino farelerinde çalışmışlardır. Teratojenik etki için hamile farelere sakkarin 3 farklı yol ile verilmiştir: Hamileliğin 10. gününde i.p. olarak 500, 1000, 2000 mg/kg, hamileliğin 5-15 günleri arasında gavaj yoluyla 5, 10, 25 mg/kg ve hamileliğin başlangıcından 17. güne kadar içme suyu ile %5, %10, %20 dozları. Tüm muamele

şekillerinde teratojenik etkiye rastlanmadığı bildirilmiştir. Lamm ve ark. (1989), mayozda tamir sistemi bozuk (repair deficient) erkek *Drosophila melanogaster* ile yaptıkları çalışmada sakkarin'in genotoksik olmadığını bildirmişlerdir. Durnev ve ark. (1995), 5 gün boyunca oral yolla günlük 5 ve 50 mg/kg dozlarında sakkarin verilen C57Bl/6 farelerinde KA'nin indüklenmediğini saptamışlardır. Jeffrey ve Williams (2000), 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1×10^{-1} ve 2×10^{-1} M dozlarında sakkarin'in F344 ve Sprague-Dawley sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını saptamışlardır. Turner ve ark. (2001), diyetle verilen sodyum sakarin'in Big Blue sıçanlarında karaciğer ve mesane kanserine sebep olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.13. Sellügin (Selliguesin)

Sellügin, Endonezya'da yetişen *Selliguea feei* bitkisinin rizomlarından izole edilen ve şekerden 35 kez daha tatlı olan doğal bir tatlandırıcıdır.

Vasange ve ark. (1997), sellügin'in in vitro ortamda proteolitik enzim olan elastazı inhibe ettiğini saptamışlardır. Baek ve ark. (1993), *S. typhimurium* TM677 suşu ile yaptıkları mutajenite çalışmasında sellügin'in mutajenik etkiye sahip olmadığını, ayrıca farelerde de toksik etki oluşturmadığını bildirmişlerdir.

2.1.14. Sorbitol

Glucitol olarak da bilinen sorbitol (E420), bir şeker alkolüdür. Diyabetik hastalar tarafından tercih edilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır.

Johannes ve ark. (1992), CHO hücrelerini 0.9 M sorbitol varlığında restriksiyon endonükleaz enzimi olan AluI ile muamele etmişler, muamele edilen hücrelerde kromozomal anormalliklerin arttığını bildirmişlerdir.

2.1.15. Stevia, Steviol ve Stevioside

İlk defa 1931 yılında *Stevia rebaudiana* bitkisinden izole edilen ve kalori vermeyen stevia (steviol, stevioside) şekere nazaran 230-250 kat daha tatlıdır. 1970 yılından beri başta Japonya olmak üzere bir çok ülkede kullanılmaktadır.

Ito ve ark. (1984), içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında steviosid katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde neoplastik gelişime rastlanmadığını saptamışlardır. Matsui ve ark.(1989), steviol'un metabolik aktivatör varlığında sadece *S.typhimurium* TM677 mutajeniteye sebep olduğunu, halbuki *S.typhimurium*'un TA100, TA98, TA102 ve TA97 suşlarında mutajen olmadığını saptamışlardır. Suttajit ve ark.(1993), stevioside ve steviol'un mutajenik etkilerini *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında, KA üzerindeki etkilerini de kültüre edilmiş insan lenfositlerinde araştırmışlardır. 25 mg/petri konsantrasyonunda steviosidin mutajenik olmadığını fakat, 50mg/petri konsantrasyonunda TA98 suşunda mutajenik etki gösterdiğini, steviol'un ise her iki suş için mutajenik olmadığını saptamışlardır. Bununla birlikte, her iki test maddesinin insan periferik lenfositlerinde KA oluşumunu artırmadığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Klongpanichpak ve ark.(1997) da, stevioside ve steviol'un mutajenik etkisini metabolik aktivatör (S9 mix) varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarını kullanarak araştırmışlardır. Her iki test maddesinin 2 ve 50 mg/petri dozlarında mutajenik olmadıklarını, sadece en yüksek dozda hem stevioside hem de steviol'un toksik etkiye sebep olduklarını açıklamışlardır. Matsui ve ark.(1996), steviosid ve steviol'un genetik toksisitesini belirlemek için 6 farklı in vitro test sistemi ve 1 in vivo test sistemi kullanmışlardır. Stevioside tüm testlerde negatif sonuç verirken, steviol *S.typhimurium* TM677 suşunda ve CHL hücrelerinde gen mutasyonuna sebep olduğu, *C. hamster* akciğer (CHL) hücrelerinde KA'ni artırdığı, fakat farelerde MN oluşumunu artırmadığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, *S. typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535 ve TA1537 suşları ile ve *E.coli*'nin WP2 uvrA/Pkm101 suşlarında yapılan geri mutasyon çalışmaları sonucunda steviol'un mutajenik olmadığını bildirmişlerdir. Temcharoen ve ark. (2000), fare, hamster ve sıçan kemik iliği kullanarak yaptıkları çalışmada steviol'un

MN oluşumunu indüklediğini, fakat 48 ve 72 saatlik muamelelerden sonra PCE sayısının azaldığını (PCE/NCE oranının düştüğünü), bu durumun steviol'un metabolitlerinin hedef organa ulaşmasının zaman aldığını yani sitotoksik etkilerinin yavaş olduğu anlamına geldiğini bildirmişlerdir. Yasukawa ve ark. (2002), 1 ve 0.1 g/fare dozlarında 4 steviol glikosidinin karışım halinde 7,12-dimethylbenz[a]anthracene kimyasalının oluşturduğu deri kanserini engellediğini saptamışlardır. Sasaki ve ark. (2002), farenin 8 farklı organı (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay çalışmasında 2000 mg/kg dozunda stevia ile 3 ve 24 saat muamele edilen farelerin hiçbir organında DNA zararına rastlanmadığını bildirmişlerdir. Sekihashi ve ark.(2002), in vitro S9mix yöntemi ile yaptıkları çalışmada stevia'nın metaboliti olan steviol'un TK6 ve WTK1 hücrelerinin çekirdek DNA'larında anormalliklere sebep olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, farelerle yaptıkları in vivo çalışmada steviolün mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek ve testis DNA'larına zarar vermediğini, stevia'nın da fare mide, kalın bağırsak ve karaciğer hücrelerinin DNA'larında zarar oluşturmadığını bildirmişlerdir. Halbuki, Terai ve ark.(2002), 3.58×10^{-7} - 2.96×10^{-6} µg/petri dozlarında steviol ve metabolitlerinin *S. typhimurium*'un TM677 suşunda mutajeniteyi doza bağlı olarak indüklediklerini bildirmişlerdir. Buna rağmen Geuns (2003), yayınladığı derleme çalışmasında steviosid'in mutajenik ve kanserojenik etkiye sahip olmadığı sonucuna varmıştır.

2.1.16. Sukraloz (Sucralose)

Splenda ticari adıyla bilinen sukraloz, 1976 yılında keşfedilmiş ve ilk defa 1991 yılında Kanada'da kullanılmaya başlanmıştır. Kalorisiz ve şekerden 500-700 defa daha tatlı olan bir tatlandırıcıdır.

Durnev ve ark. (1995), 5 gün boyunca oral yolla günlük 15 ve 150 mg/kg dozlarında sukraloz verilen C57Bl/6 farelerinde KA'nin indüklenmediğini, Jeffrey ve Williams (2000) da F344 Sprague-Dawley sıçan hepatositleri ile yaptıkları çalışmada 1×10^{-2} ve 2×10^{-1} M dozlarında sukraloz'un DNA zararına sebep olmadığını bildirmişlerdir. Halbuki, Sasaki ve ark. (2002), 8 farklı fare organı (mide, kalın

bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet Assay çalışmasında 100, 1000 ve 2000 mg/kg dozlarında sukraloz ile 24 saat 2000 mg/kg dozunda 3 saat muamele edilen farelerin gastrointestinal sistemlerinde DNA zararlarına rastlandığını bildirmişlerdir. Weihrauch ve Diehl (2004), yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda yeni kuşak tatlandırıcılarından olan sukraloz'un genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını söyleyebilmek için daha erken olduğunu, dolayısıyla sukraloz'un etkisini kesin olarak belirleyebilmek için ilave çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.17. Tagatoz (Tagatose)

Doğal olarak monosakkaridlerden özellikle heksoz'dan sentez edilen fonksiyonel bir tatlandırıcı olan tagatoz, sukroz'a nazaran % 92 şeker tadı vermesine rağmen % 34 oranında enerji veren bir tatlandırıcıdır.

Kruger ve ark. (1999), D-tagatoz'un mutajenik etkisini Ames Testi, *Escherichia coli*/memeli mikrozom testi, *Chinese hamster* Ovary (CHO) hücrelerinde KA testi, fare lenfoma L5178Y hücrelerinde ileri mutasyon testi ve in vivo fare kemik iliği polikromatik eritrositlerinde MN testi ile saptamaya çalışmışlardır. D-tagatozun geri mutasyonu indüklediğini (revertant sayısını arttırmadığını), KA ve MN oluşumunu indüklediğini ve dolayısıyla genotoksik olmadığını bildirmişlerdir. Brands ve ark. (2000), disakkaritler (laktoz ve laktuloz), ketoz şekerleri (fruktoz ve tagatoz) ve aldoz izomerleri (glukoz ve galaktoz) ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, 120°C'de ısıtılmasından sonra sadece laktoz'un *S.typhimurium* TA100 suşunda mutajenik olmadığını halbuki diğer test maddelerinin mutajenik etki gösterdiklerini, fruktoz ve tagatoz'un diğer şekerlere nazaran *S.typhimurium* TA100 suşunda daha fazla mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır.

2.2. Doğal Şekerlerin Genotoksik, Mutajenik ve Kanserojenik Etkileri**2.2.1. Fruktoz (Fructose)**

Bir monosakkarit olan fruktoz, kanda glukoz ve galaktoz ile beraber bulunan önemli bir şeker alkolüdür. Kan glukoz seviyesine olan etkisi (glycemic index) az olduğu için şeker hastaları tarafından kullanılabilen doğal bir şekerdir.

MacGregor ve ark. (1989), kaynatılan fruktoz/lisin karışımının *S. typhimurium* TA100, TA2637, TA98 ve TA102 suşlarında mutajenik etki gösterdiğini, karışımın pH 7-10 arasında da CHO hücrelerinde yüksek oranda klastojenik etki yarattığını fakat, farelerde mikronükleuslu eritrositlerin sayısını artırmadığını bildirmişlerdir. Brands ve ark. (2000), disakkaritler (laktoz ve laktuloz), ketoz şekerleri (fruktoz ve tagatoz) ve aldoz izomerleri (glukoz ve galaktoz) ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, 120°C’de sadece laktoz hariç çalışılan diğer tatlandırıcıların *S. typhimurium* TA100 suşunda mutajenik olduklarını, fruktoz ve tagatoz’un diğer şekerlere nazaran *S. typhimurium* TA100 suşunda daha fazla mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır. Halbuki Wang ve ark. (2002), Fruktoz’un Ames testinde önemli bir anti mutajenik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Yu ve ark. (2004) da 1,5-anhidro-D-fruktoz’un *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1537 suşlarında ve fare lenfoma L5178Y hücrelerinde mutajen olmadığını bildirmişlerdir.

2.2.2. Glukoz (Glucose)

Glukoz, bitkilerde ve hayvanlarda en önemli enerji kaynağı olarak kullanılan basit şekerlerden biridir.

Brands ve ark. (2000), *Salmonella typhimurium* TA100 suşu kullanarak Ames testi ile yaptıkları çalışmada, glukoz’un mutajenik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Tatewaki ve ark. (2002) ICR farelerinin blastosit kültürlerinde glukoz’un özellikle sayısal kromozomal anormallikleri artırarak aneuplidi ve poliploidiye sebep olduğunu bildirmişlerdir. Buard ve ark. (2003) da, kan şekeri veya

genellikle glukoz olarak bilinen dekstroz'un toksik, mutajenik-antimutajenik ve alerjik etkilerini çalışmışlardır. Araştırmacılar dekstroz'un E.coli WP2uvrA ile S. typhimurium suşlarında mutajenik olmadığını ve toksik etki oluşturmadığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, 13 hafta boyunca diyetlerine günlük % 0.5, % 2.0 ve % 5.0 dekstroz katılan sıçanlarda histopatolojik herhangi bir anormallik görülmediğini, gavage yoluyla dekstroz verilen Guine domuzlarında herhangi bir alerjik reaksiyon gelişmediğini saptamışlardır.

2.2.3. Sukroz (Sucrose)

Glukoz ve fruktoz'dan oluşan bir disakkarittir. Sukroz, şeker pancarı ya da şeker kamışından üretilen ve çay şekeri olarak bilinen bir maddedir.

Dragsted ve ark. (2002), çay şekeri olarak bilinen sukroz'un genotoksik etkisini Fischer cinsi büyük mavi sıçanlarda (Big Blue Rats) incelemişlerdir. 3 hafta boyunca sıçanların yiyeceklerine çok yüksek dozlarda (%6.9, %13.8 ve %34.5) sukroz verilmesinden sonra kolon mukoza hücrelerinde yüksek oranda mutasyon meydana geldiğini ve sukroz'un genotoksik risk oluşturduğunu bildirmişlerdir. Risom ve ark. (2003), besinlerine 3 hafta boyunca 0.8 ppm dizel ekzoz parçaları ve %3.45 veya %6.85 dozlarında sukroz katılan Big Blue sıçanlarında sukrozun dizel ekzoz parçalarının kanser oluşturması üzerine etkisini çalışmışlardır. Sukroz'un kolon ve karaciğerde ekzoz parçacıklarının oluşturduğu DNA kırıklarını artırmadığını saptamışlardır. Halbuki, Moller ve ark. (2003), aynı deney protokolünde sukroz'un farelerin karaciğerinde 20 ppm dozundaki 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline'in genotoksik etkisini artırdığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde, Hansen ve ark. (2004), 3 hafta boyunca diyetlerine %0, %3.45 veya %13.4 sukroz verilen sıçan kolonunda sukroz'un mutasyon frekansını yükselttiğini saptamışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak sigara içmeyen yaşları bir birine yakın sağlıklı iki erkek (23 yaşlarında) ve iki bayandan (19 yaşlarında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları**3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler****3.1.1.1. Maltitol**

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan maltitol (E965) (4-o- α -D-glukopiranozil-D-sorbitol) gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan düşük kalorili yapay bir şeker alkolüdür (poliol). Maltitol, disakkarit olan maltozun hidrojenasyonu ile elde edilmektedir (Suzuki ve Tamura, 1988; Tsukamura ve ark., 1998'den). Hacim verici yani su tutma kapasitesi yüksek olmasından dolayı gıdaların kalitesinin artırılmasında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle fırınlanmış ürünlerde, reçellerde ve marmelatların yapımında, ayrıca diyet türü tatlılarda, sakızlarda ve dondurma yapımında tercih edilmektedir. Çünkü maltitol ince bağırsakta maltozdan çok daha yavaş bir şekilde hidrolize olmaktadır (Yoshizawa ve ark., 1975) ve bundan dolayı da kan şekeri seviyesinde bir artmaya (hiperglisemi) sebep olmamaktadır. Daha sonra maltitol kalın bağırsağa geçerek mikroflora tarafından fermente edilmektedir (Oku ve ark., 1991). Maltitol'un kullanım alanlarını aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (Tarım Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2002):

Enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz tatlılar ve benzeri ürünler

Su bazlı aromalandırılmış tatlılar

Süt ve süt türevi bazlı karışımlar

Meyve ve sebze bazlı tatlılar

Yumurta bazlı tatlılar
Tahıl bazlı tatlılar
Kahvaltılık tahıl ürünleri veya tahıl bazlı ürünler
Yağ bazlı tatlılar
Yenilebilir buzlar
Reçel, jöle, marmelatlar ve kristalize meyve
Meyveli karışımlar

Şekerlemeler ve diğerleri

Şeker ilavesiz şekerlemeler
Kuru meyve bazlı şekerlemeler
Nişasta bazlı şekerlemeler
Kakao bazlı şekerlemeler
Kakao, süt, kuru meyve veya yağ bazlı sürülebilir ürünler
Şeker ilavesiz sakız
Soslar
Hardal
Hafif fırıncılık ürünleri
Özel beslenme amaçlı ürünler
Katı gıda takviyeleri/diyet tamamlayıcılar

Görüldüğü gibi maltitol birçok gıda türünde kullanılabilmektedir ve diyabet hastaları tarafından da tercih edilmektedir. Bunun sebeplerini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

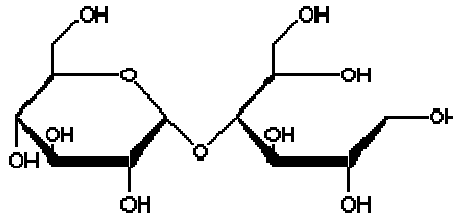
-Şekere oranla tatlılık derecesi daha az olup, meyvenin kendine özgü tat ve lezzetini öne çıkarır. Örneğin şekerin tatlılık derecesi (0.1 mol/lit sukroz) 1 ise maltitol'un tatlılık derecesi 0.6–0.9 arasında değişmektedir.

-Kalori değeri şekerin yarısı kadardır. 1 g şekerin kalori değeri 4 iken, bu değer maltitol'da 2.1' dir.

-Dişlere zarar vermemektedir. Diş plaklarındaki bakteriler şekeri parçalayarak (fermente) asit oluştururlar. Bu asit diş minelerindeki kalsiyumu etkiler ve zamana bağlı olarak diş çürümelerini başlatır. Maltitol ağızdaki bakteriler tarafından kolayca parçalanamamaktadır. Neticede diş minelerine zarar veren asit oluşmamakta ve diş çürümeleri meydana gelmemektedir (Maguire ve ark., 2000).

-İnce bağırsakta enzimlerle çok yavaş parçalandığı ve yavaş absorbe edildiği için, maltitol kan şekeri seviyesini çok fazla yükseltmemektedir (Yoshizawa ve ark., 1975).

Maltitol'un açık formülü (Şekil 3.1) ve diğer özellikleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.1. Maltitol'un açık formülü

Bilinen adları	:Maltitol şurubu, hidrojene edilmiş glikoz şurubu, 4-o- α -D-glukopiranozil-D-sorbitol, 4-o- α -D-glukopiranozil-D-glucitol (CAS registry number:585-88-6; Sigma katalog no: M8892)
Kapalı formülü	: $C_{12}H_{24}O_{11}$
Molekül ağırlığı	:344.31
Saflığı	:%98
Çözünürlüğü	:20°C'de 150 gr/100 ml
Fiziksel durumu	:Beyaz, kokusuz, şeker tadında toz
E Kodu	:E965
ADI veya GKM	:Sınır belirtilmemiş
Erime ısısı	:147-153°C
Stabilitesi	:Isı ve kimyasallara karşı yüksek oranda stabil

3.1.1.2. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (cat. no. F5023), hücre kültürü için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşimler verilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with	
Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.1.1.3. Kolşisin (Kolkisin)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma cat. No. C9754) kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

3.1.1.4. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidestile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.5. Fiksatif

KKD ve KA için kullanılan fiksatif, 1 kısım glasial asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. MN için ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif 1 kısım glasial asetik asit'in 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden kullanılmıştır.

Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.6. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten kültür tüpleri içerisindeki kromozom medyumuna 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.1.7. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD'ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.1.8. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiğı

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ve 21.9 gr NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırladığımız bu stok eriyik 5xSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. Deneyimizde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1x SSC kullanılmıştır.

3.1.1.9. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (cat. no. 9204) temin edilmiş olup deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiğı preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.10. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, cat. no. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO_3)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları**3.1.2.1. Hassas Terazı**

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazı kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Rotor apı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 28 tp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan PRIOR marka binoküler ışık mikroskopu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoęraflar ise Olympos marka mikroskopta çekilmiştir.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücrelerin 37°C'de inkübe edilmesi için Dedeoęlu marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

3.1.2.6. Osmometre

Maltitol'un kromozom medyumunun osmatik basıncını değiştirip değiştirmediğini ölçmek için Knauer Osmometer Automatic marka osmometre kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketlenmiş olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak lamlar buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler**3.3.1. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması**

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C'de 72 saat için inkübe edilmiştir.

Maltitol'un etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala maltitol'un daha önce belirlenmiş konsantrasyonları olan 1.25, 2.5 ve 5 mg/ml'lik miktarları kültür tüplerine ilave edilmiştir. Maltitol suda kolayca çözünebilen ve en yüksek doz olan 5 mg/ml'lik dozda toksik olmayan bir kimyasaldır. Madle ve ark. (1993), toksik olmayan ve suda çözülmesi sınırlı olmayan maddelerin maksimum 5 mg/ml veya 10 mM/lt konsantrasyonunda kullanılabileceğini belirtmiştir. Bundan dolayı bu çalışmada maltitol'un en yüksek dozu 5 mg/ml olarak kullanılmıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere 0.25 µg/ml olacak şekilde verilmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 12 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

3.3.2. Preparatların Boyanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtünecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlanmıştır.

Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. İnkübasyon

süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

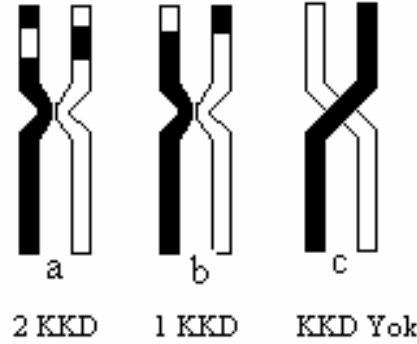
3.3.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Prior marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.3.3.1. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

3.3.3.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.2.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.2.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.2.c).



Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

3.3.3.1.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

Maltitol'un DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI bulunmuştur. Bunun için tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak RI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$RI = \frac{1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3}{100}$$

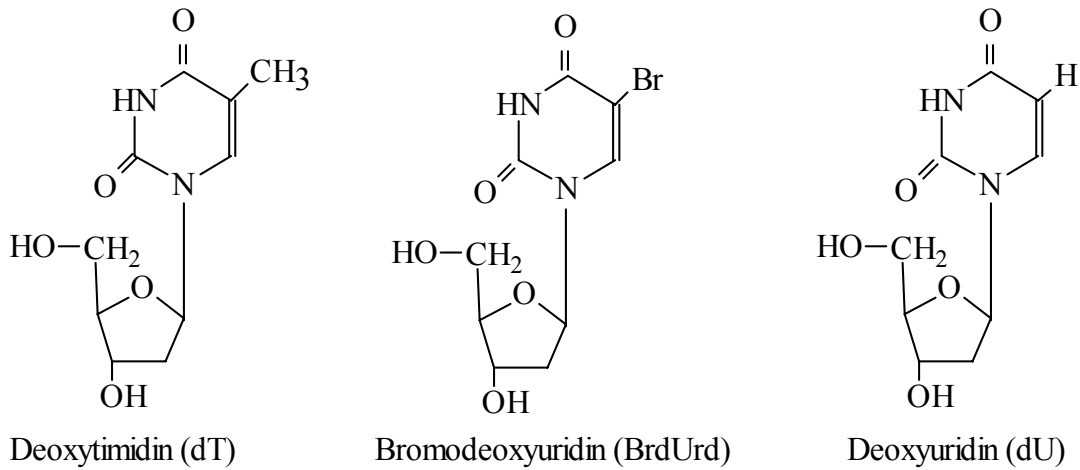
M_1 : 1. Mitozdaki hücre sayısı

M_2 : 2. Mitozdaki hücre sayısı

M_3 : 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir (Şekil 3.3). BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen

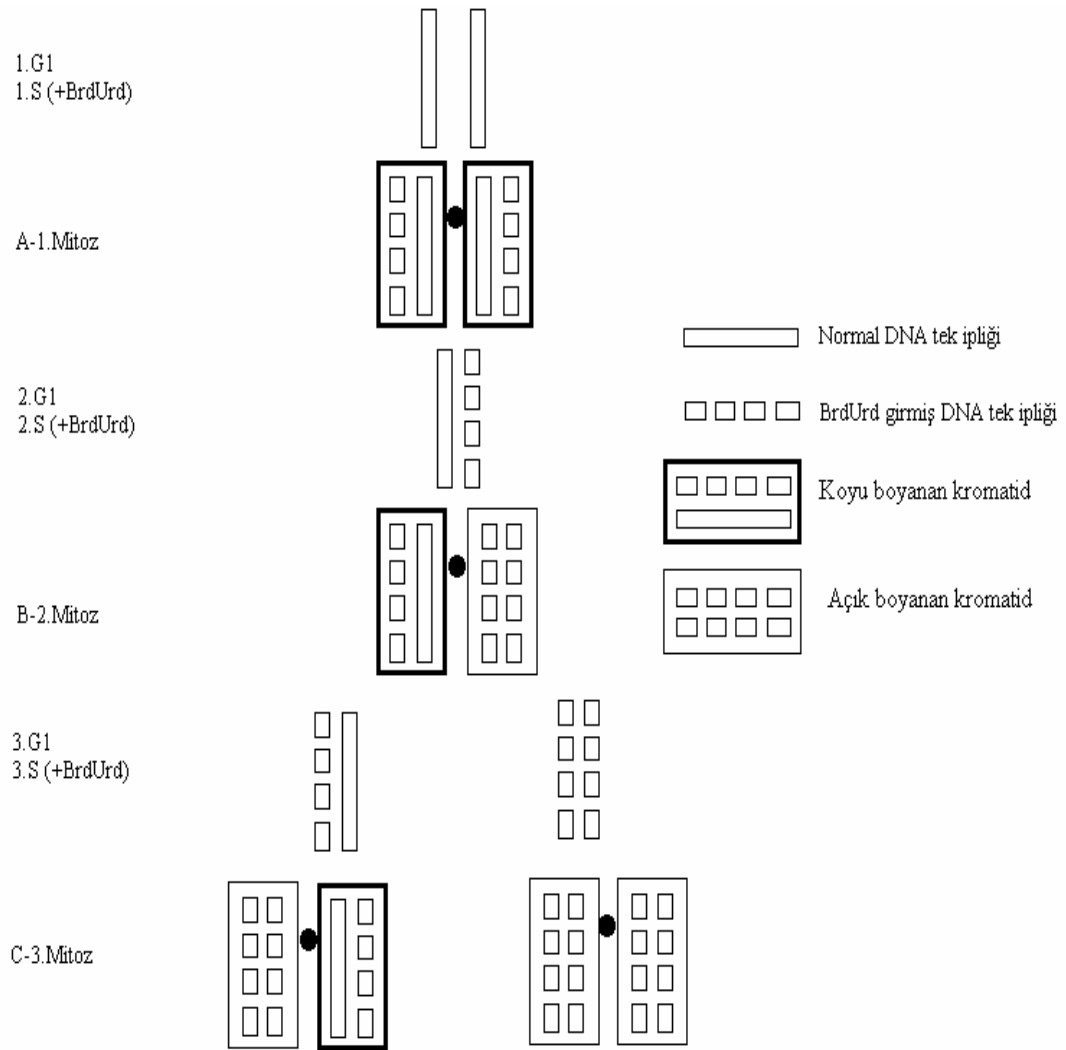
halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH₃, BrdUrd'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.



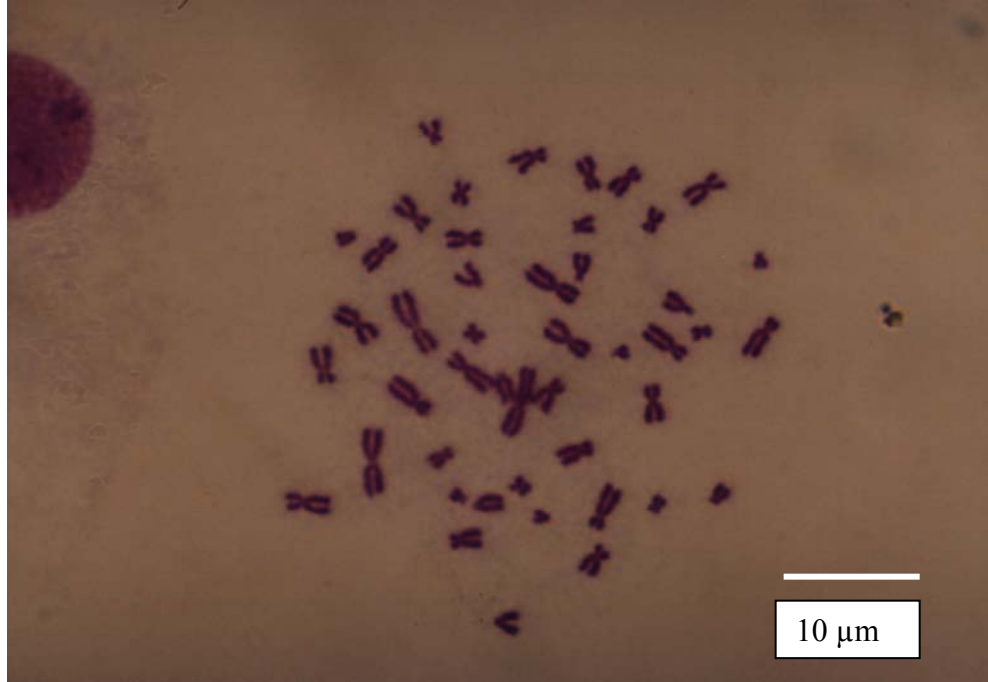
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analoğu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'ni alacaktır. Böyle hücrelerinin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdUrd:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4.A ve Şekil 3.5). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 2.S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdUrd) oluşturacaktır. BrdUrd'li ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat

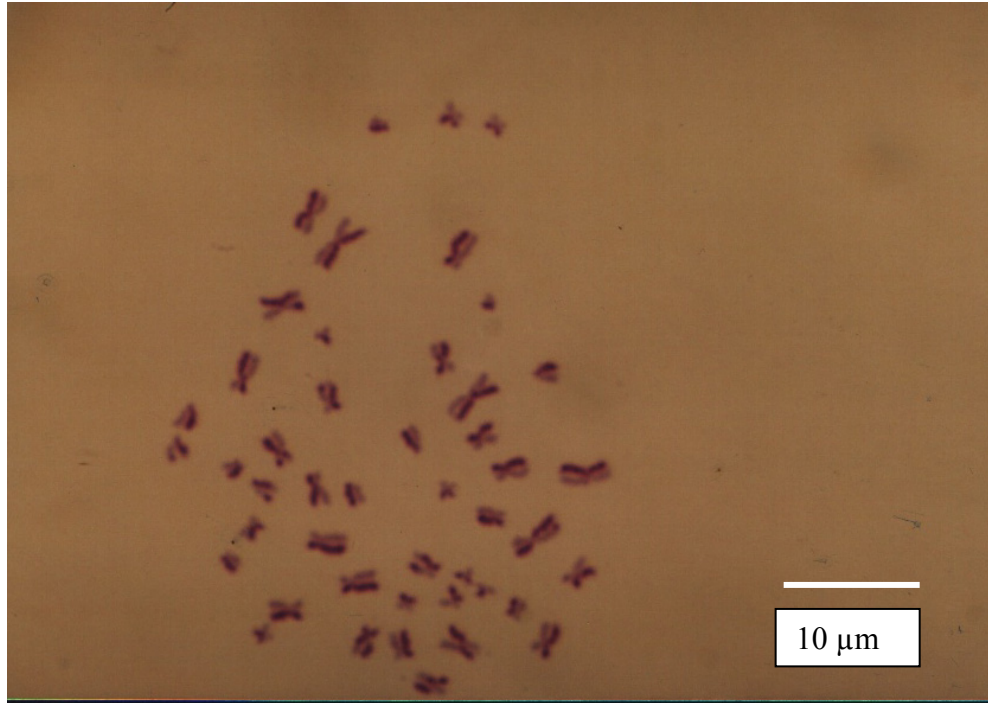
yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd) kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. (Şekil 3.4.B ve Şekil 3.6). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğeri kromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4.C ve Şekil 3.7). İşte bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre replikasyon indeksi (RI) hesaplanmıştır.



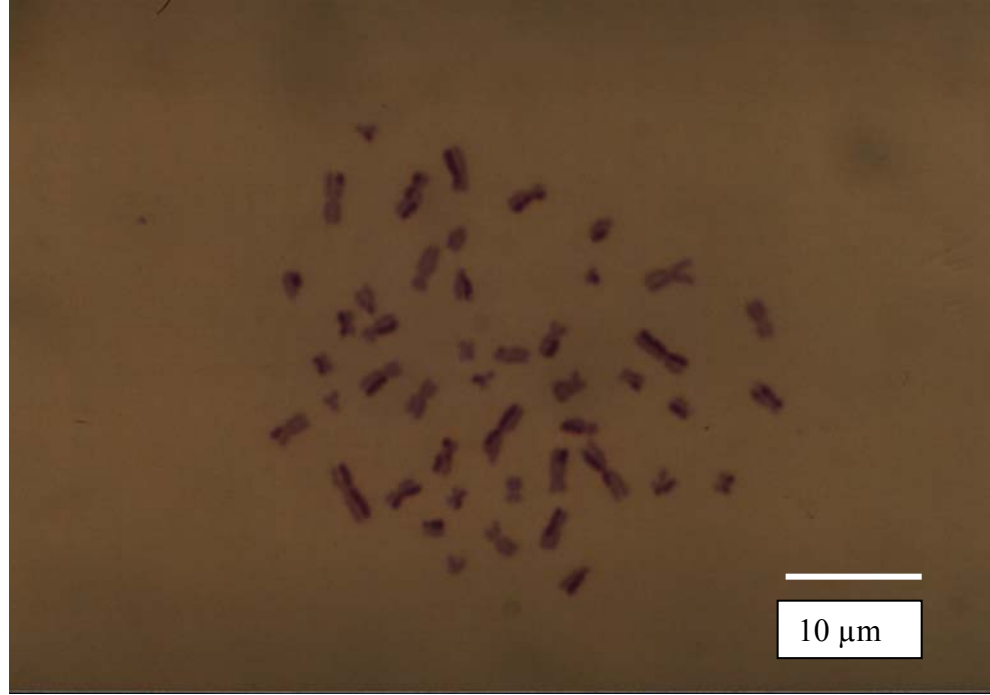
Şekil 3.4. BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den).



Şekil 3.5. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000



Şekil 3.6. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000



Şekil 3.7. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.x1000

3.3.3.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.3.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (4 kişiden toplam 400 hücre) KA'ni saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen bu 100 hücre içinde anormal hücrelerin yüzdesi ile toplam KA sayısı saptanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) bulunmuştur.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gaplar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Kauderer ve ark. (1991)'nın bildirdiğine göre Preston (1987)'a uygun olarak şu şekilde ayırt edilmiştir: Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde

(kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları ayrı ayrı saptanmıştır. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir.

3.3.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Maltitol'un mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile mitotik indeks bulunmuştur. Bunun için her kişiye ait preparatlardan toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 3 bin hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

3.4. Mikronukleus (MN) Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler

3.4.1. Mikronukleus Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

Mikronukleus sayısını saptamak için Rothfuss ve ark. (2000) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübe edilmiştir.

Maltitol'un etkisini incelemek için, daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlar da (1.25, 2.5 ve 5 mg/ml) maltitol kültür tüplerine ilave edilmiştir

ve hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca maltitol ile muamele edilmeleri sağlanmıştır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültürün bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma cat. no. C6762) ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere 0.25 µg/ml olacak şekilde verilmiştir.

Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmış ve ilk fiksatiften farklı karışımlar kullanılmıştır (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamlar üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine

dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

3.4.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzümüştür. Kuruduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 13 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.4.3. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Prior marka binoküler ışık mikroskopunda 40'luk objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 3000 iki nukleuslu hücre sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır.

3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympos marka mikroskopta 1000 ve 2000 büyütmede yapılmıştır. Daha önce 1., 2., ve 3. mitozu geçiren hücrelerin kromozomlarının, bazı ilginç KA'lerine ait örneklerin ve iki nukleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip

olanlardan birkaç örneğin fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraf çekiminde Kodak Gold marka 100 ASA'lık renkli film kullanılmıştır.

Ayrıca, iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranını (iki nükleuslu hücre/tek nükleuslu hücre) hesaplamak için toplam 3000 hücre sayılmış, bu hücrelerin içinde iki nükleuslu hücrelerin sayısı tek nükleuslu hücrelerin sayısına bölünmüştür.

3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskopik inceleme sonucunda muameleli gruplardan elde edilen KKD, KA, RI, MI, MN ve iki nükleuslu hücre/tek nükleuslu hücre sonuçları t-test metoduna göre kontrolleri ile karşılaştırılmıştır.

Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

Ayrıca mikroskopik incelemelerden elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

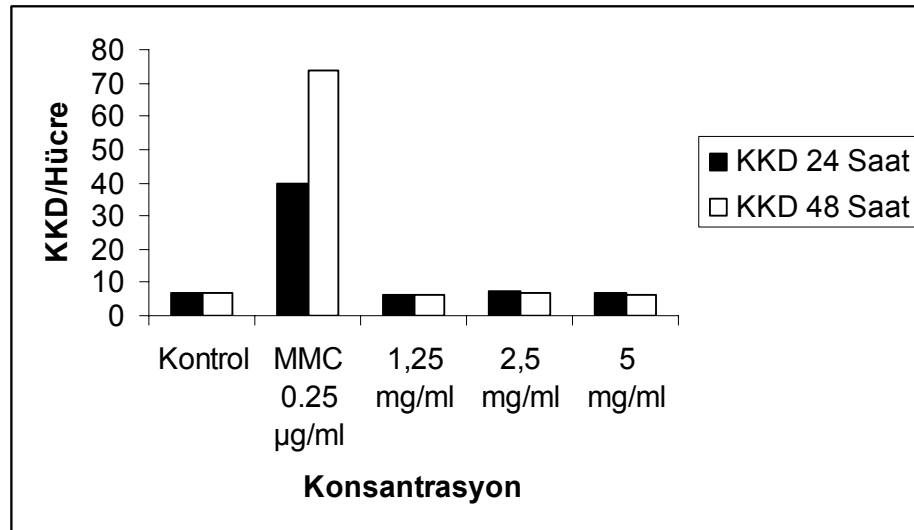
4. BULGULAR

4.1. Maltitol'un KKD Üzerindeki Etkileri

Maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD sayısında önemli bir artış görülmemiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Ayrıca, maltitol her iki muamele süresinde KKD sayısında doza bağlı bir artışa neden olmamıştır.

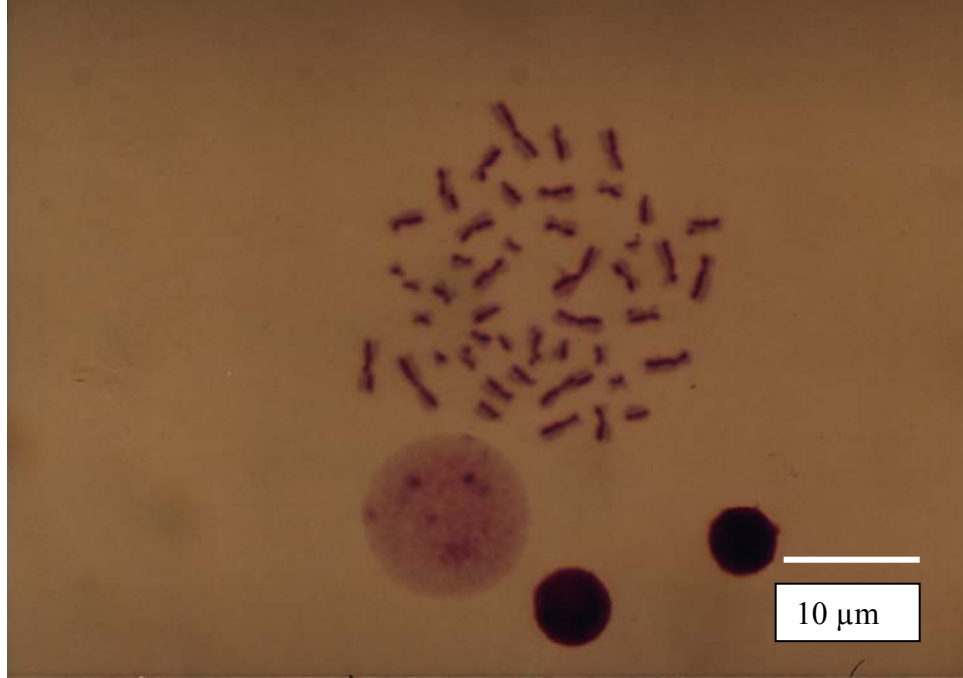
Çizelge 4.1. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde ortalama KKD sayısı.

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantraasyon mg/ml	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SE
Kontrol	-	-	1-16	6.82±0.47
MMC	24	0.25 µg/ml	6-64	39.57±2.50
Maltitol	24	1.25	1-14	6.33±0.52
"	24	2.50	1-29	7.42±0.80
"	24	5.00	2-17	6.77±0.59
MMC	48	0.25 µg/ml	36-141	74.02±3.62
Maltitol	48	1.25	1-14	6.23±0.37
"	48	2.50	1-16	6.69±0.60
"	48	5.00	1-21	6.34±0.84

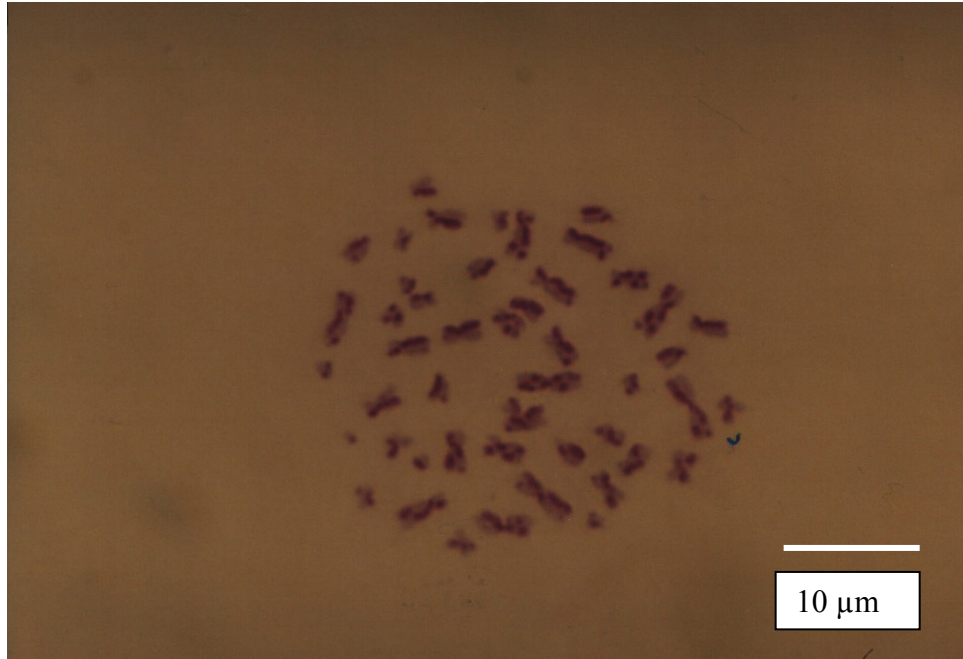


Şekil 4.1. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre sayısı.

Bu çalışmada maltitol KKD sayısını pozitif kontrol olan MMC kadar indükleyememiştir (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.).



Şekil 4.2. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde 8 KKD içeren hücre (2.5 mg/ml, 24 saat, ♂). x1000.



Şekil 4.3. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde 66 KKD içeren hücre (0.25 µg/ml, 24 saat, ♀). x1000.

4.2. Maltitol'un Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

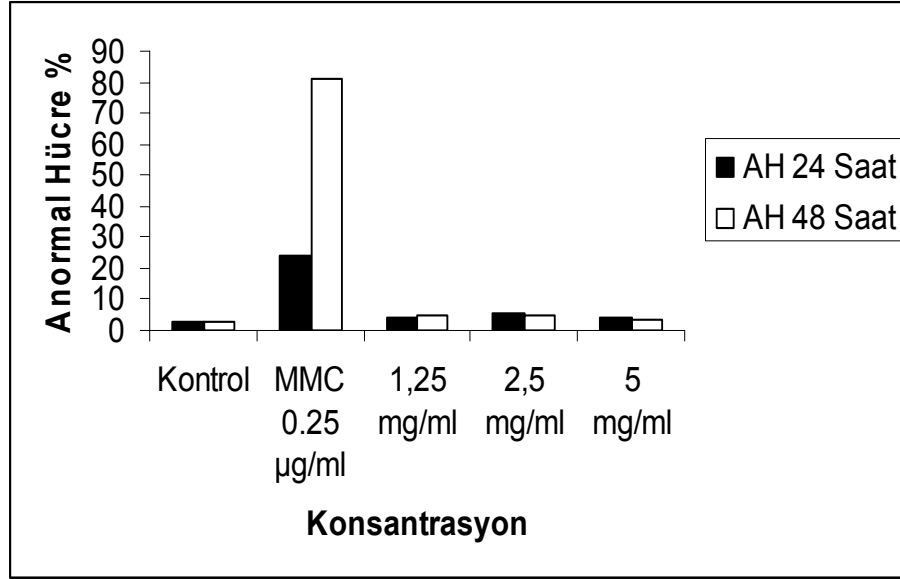
Maltitol 24 saatlik muamele süresinde sadece en yüksek doz olan 5 mg/ml'lik dozda anormal hücre yüzdesini kontrole nazaran istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır. Bununla birlikte, 24 saatlik muamelenin diğer konsantrasyonlarında ve 48 saatlik muamele süresinin tüm dozlarında maltitol, anormal hücre sayısını kontrol değerlerine nazaran artmış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4). Maltitol hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) sayısını tüm konsantrasyonlarda ve her iki muamele süresinde de istatistiksel olarak önemli derecede artırmamıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5). Maltitol ile muamele edilen lenfositlerde hem anormal hücre yüzdesi hem de KA/hücre sayısında doza bağlı bir artışın görülmediği saptanmıştır.

Çizelge.4.2. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı ve KA/hücre

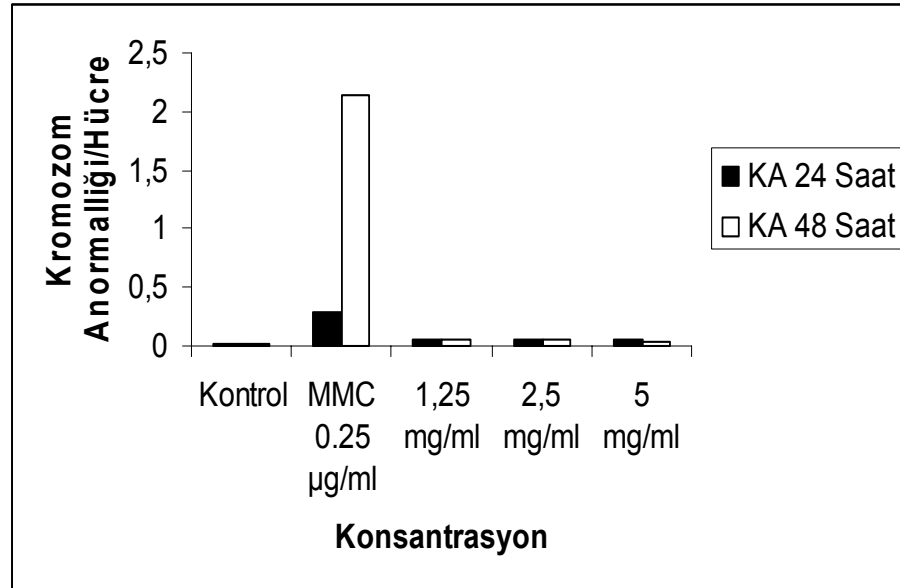
Test maddesi	Süre (saat)	Kons. mg/ml	Anormallik Çeşitleri+						Anormal hücre±SE (%)	KA/Hücre±SE
			B'	B''	KKB	DS	T	KD		
Kontrol	-	-	7	3	-	-	-	-	2.50±0.88	0.025±0.008
MMC	24	0.25 µg/ml	74	20	2	1	1	16	24.5±5.56	0.280±0.080
Maltitol	24	1.25	11	4	3	1	-	1	4.00±1.00	0.050±0.017
"	24	2.50	23	1	-	-	-	-	5.75±0.88	0.060±0.010
"	24	5.00	12	3	1	-	-	3	4.25±0.47*	0.047±0.008
MMC	48	0.25 µg/ml	476	247	4	14	-	116	81.0±5.29	2.140±0.460
Maltitol	48	1.25	16	2	1	-	-	1	4.50±1.45	0.050±0.017
"	48	2.50	18	-	4	-	-	1	5.00±1.22	0.057±0.012
"	48	5.00	15	1	-	-	-	-	3.75±1.75	0.040±0.016

+B':Kromatid kırığı, B'':kromozom kırığı; KKB:kardeş kromatid birleşmesi (SU: Sister Union); DS:Disentrik kromozom; T:Translokasyon; KD:Kromatid değişimi; P:Poliplodi

*:P < 0.05

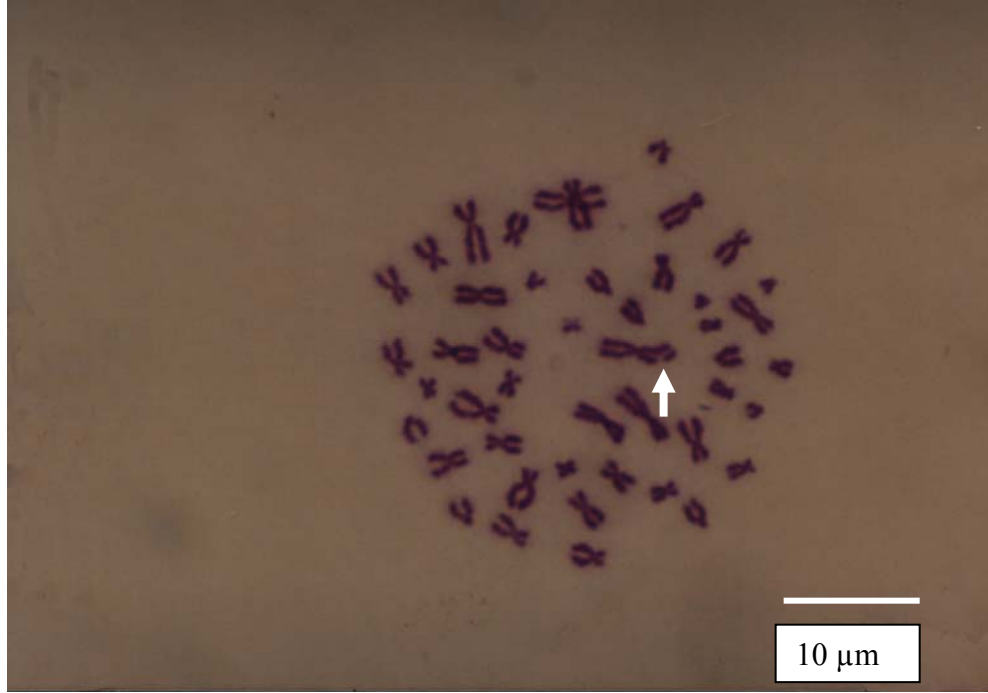


Şekil 4.4. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi.

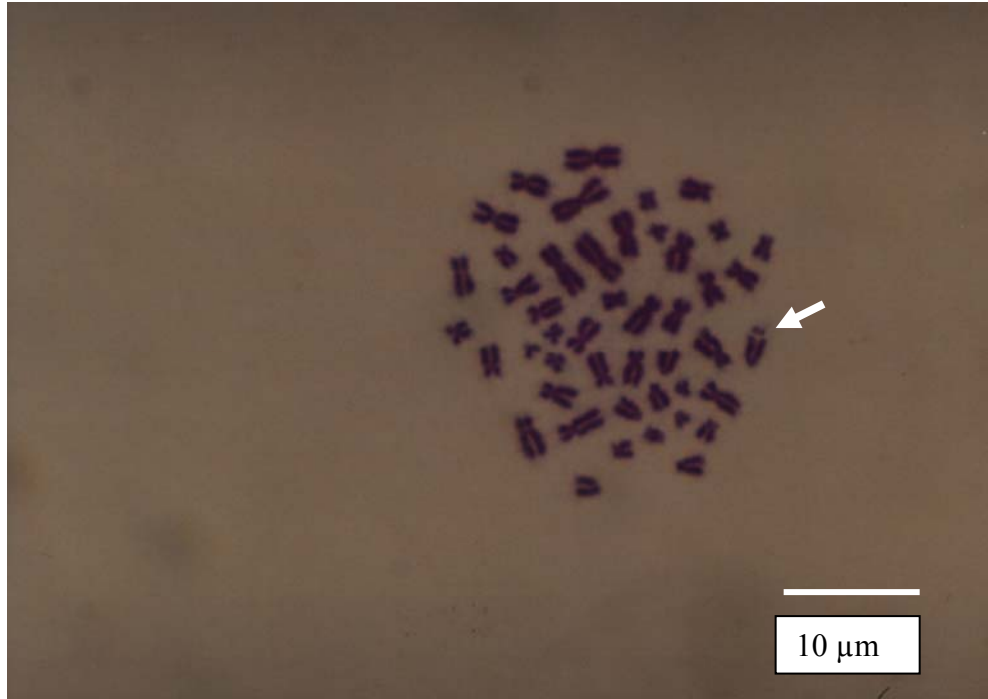


Şekil 4.5. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde KA/Hücre sayısı.

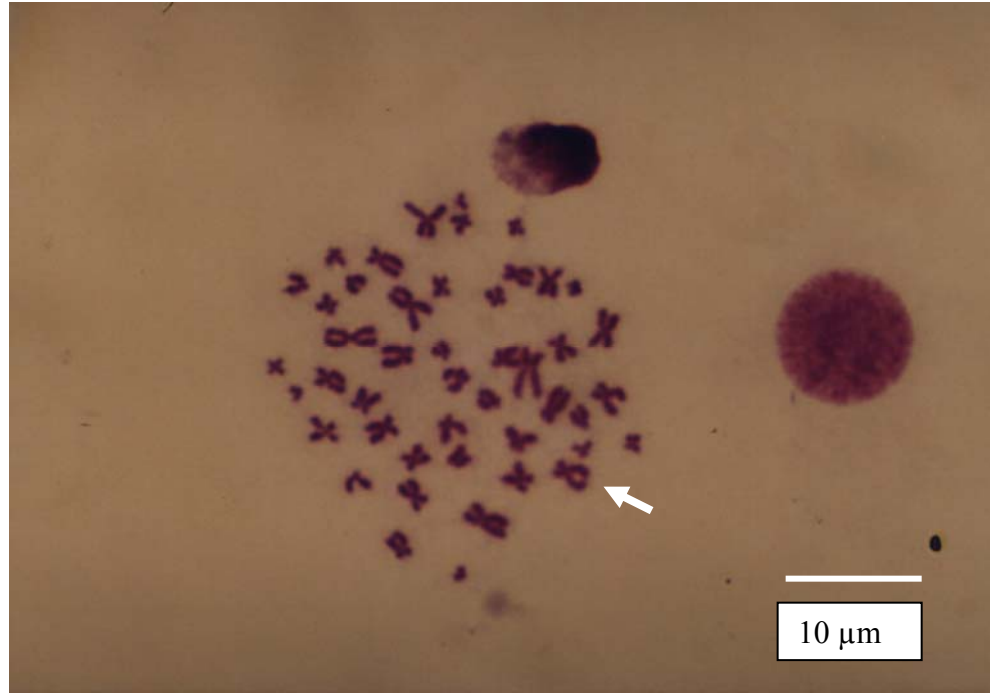
Maltitol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde en fazla kromatid kırığı (Şekil 4.6.) gözlenirken, daha az oranda olmak üzere kromozom kırığı (Şekil 4.7.), kardeş kromatid birleşmesi (sister union) (Şekil 4.8.) ve kromatid değişimi (Şekil 4.9.) gibi kromozomal anormalliklere de rastlanmıştır.



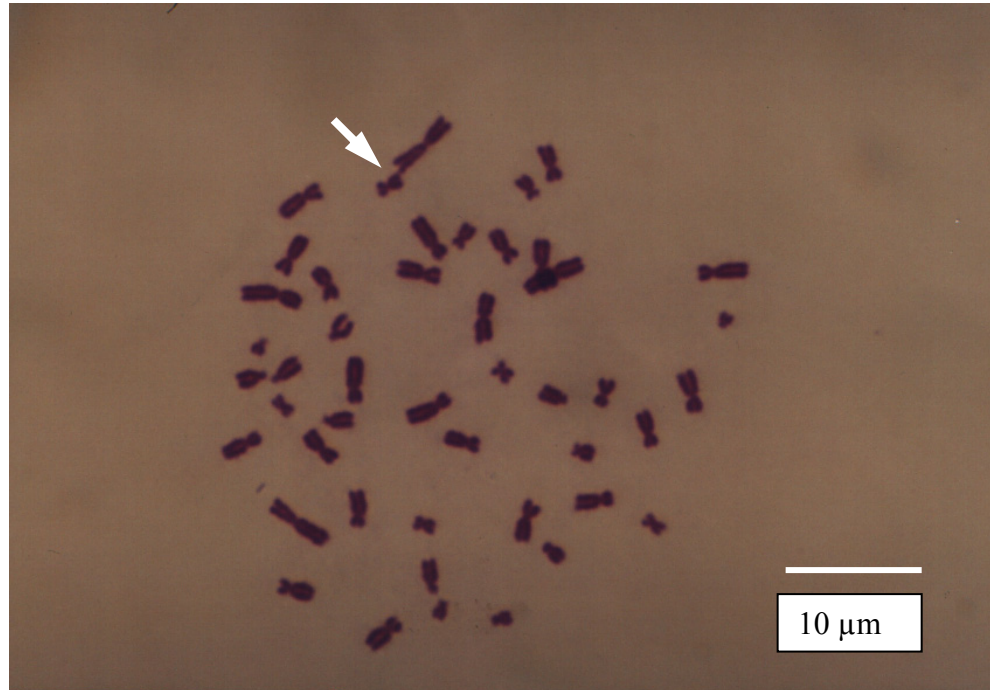
Şekil 4.6. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromatid kırığı (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.



Şekil 4.7. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromozom kırığı (2.5 mg/ml, 24 saat, ♂). x1000.

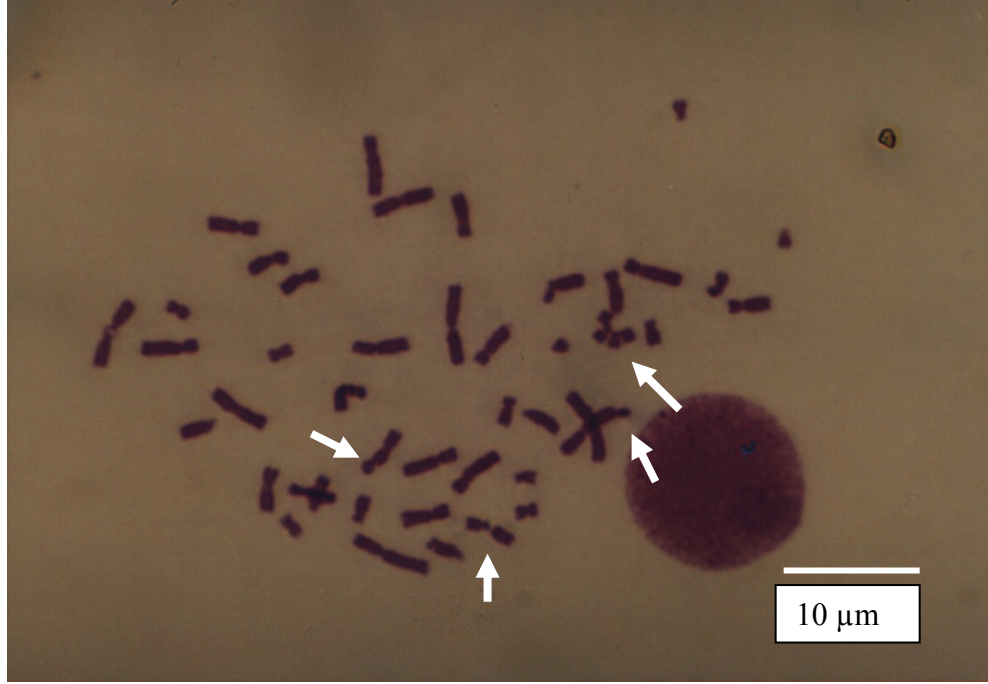


Şekil 4.8. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid birleşmesi (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.



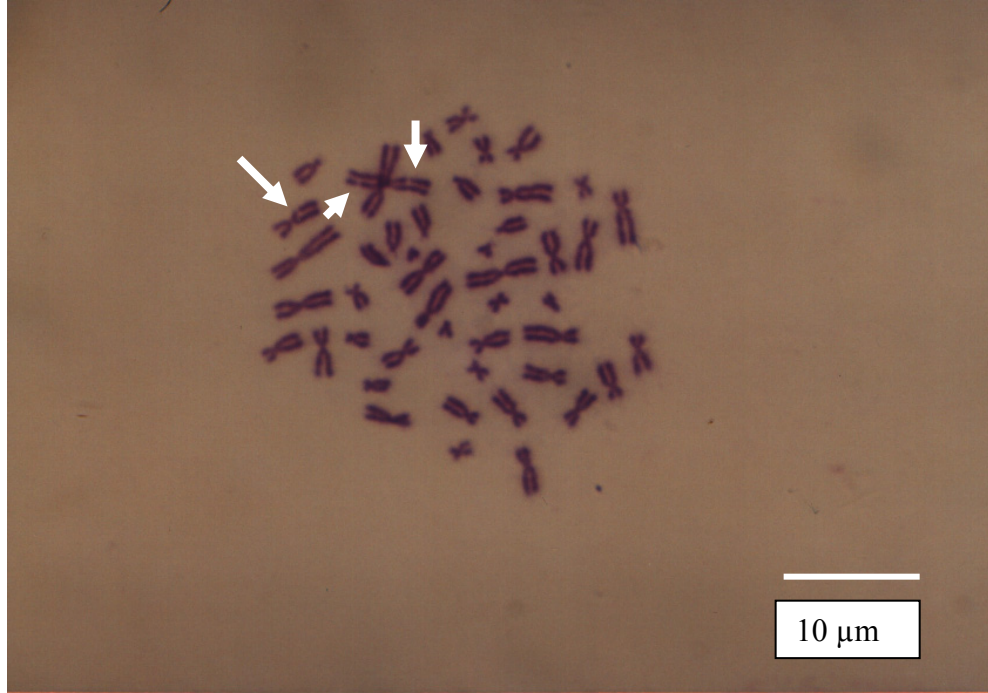
Şekil 4.9. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromatid değişimi (5 mg/ml, 24 saat, ♀). x1000.

Maltitol insan lenfositlerinde kromozom anormalliği sayısını pozitif kontrol olan MMC kadar indükleyememiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde çoklu anormallik içeren metafaz plâğı (0.25 µg/ml, 48 saat, ♂). x1000.

Bu çalışmada gaplar (Şekil 4.11.) kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.11. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromatid gap (5 mg/ml, 48 saat, ♀). x1000.

4.3. Maltitol'un Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkileri

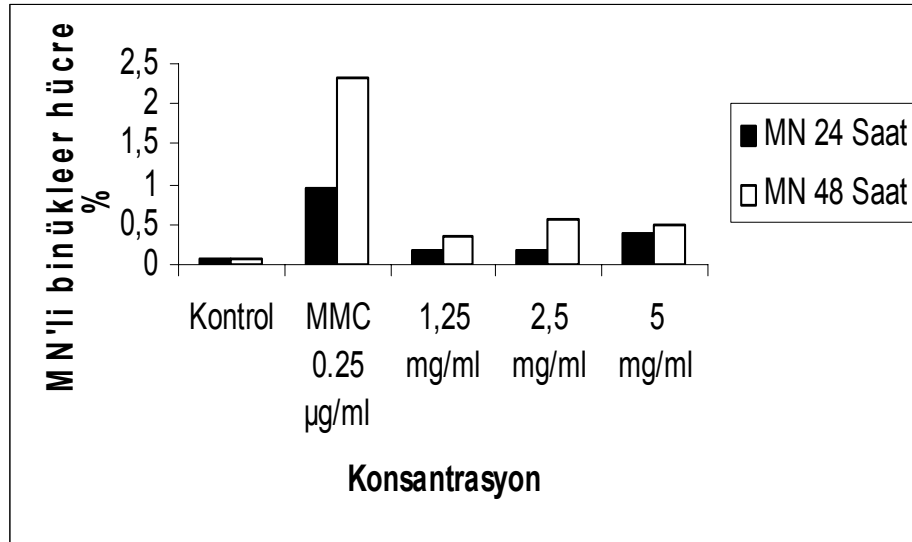
Maltitol, 2.5 mg/ml konsantrasyonunda 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MN'lu binükleer hücre yüzdesini kontrole nazaran önemli derecede artırmazken diğer konsantrasyonlarda (1.25 ve 5 mg/ml) MN'lu binükleer hücre yüzdesini kontrole nazaran önemli derecede artırmıştır. Ayrıca, 48 saat maltitol ile muamele edilen insan lenfositlerinde tüm dozlarda MN oluşumunun istatistiksel olarak önemli derecede uyarıldığı saptanmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12). Fakat MN sayısında gözlenen bu artışın doza bağlı olmadığı belirlenmiştir.

Maltitol, 24 saatlik muamele süresinde iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranını sadece en yüksek dozda kontrole nazaran önemli derecede düşürmüştür (Çizelge 4.3.ve Şekil 4.13.). 24 saatlik muamelede bu düşüşün doza bağlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.14.). 48 saatlik muamele süresinde ise maltitol sadece en düşük dozda iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranını kontrole nazaran önemli derecede düşürmüştür.

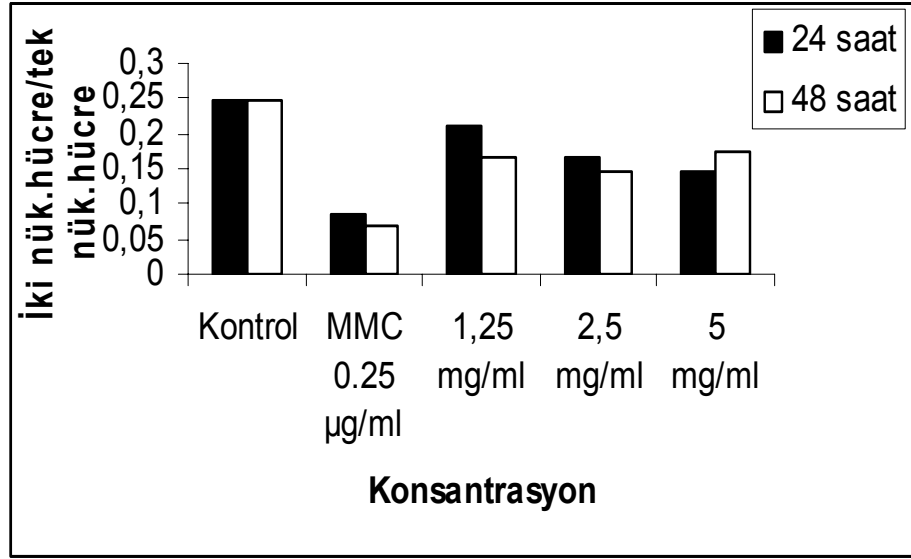
Çizelge 4.3. Değişik dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mikronükleus sayısı.

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon mg/ml	Mikronükleus sayısı/ binükleer hücre (%) $\pm$ SE	İki nükleuslu hücre/tek nükleuslu hücre $\pm$ SE
Kontrol	-	-	0.080 $\pm$ 0.01	0.248 $\pm$ 0.10
MMC	24	0.25 μ g/ml	0.955 $\pm$ 0.12	0.085 $\pm$ 0.03
Maltitol	24	1.25	0.173 $\pm$ 0.01*	0.210 $\pm$ 0.05
"	24	2.50	0.165 $\pm$ 0.03	0.166 $\pm$ 0.08
"	24	5.00	0.380 $\pm$ 0.06*	0.146 $\pm$ 0.03*
MMC	48	0.25 μ g/ml	2.31 $\pm$ 0.53	0.069 $\pm$ 0.04
Maltitol	48	1.25	0.355 $\pm$ 0.09*	0.168 $\pm$ 0.02*
"	48	2.50	0.572 $\pm$ 0.09*	0.147 $\pm$ 0.05
"	48	5.00	0.506 $\pm$ 0.04*	0.173 $\pm$ 0.04

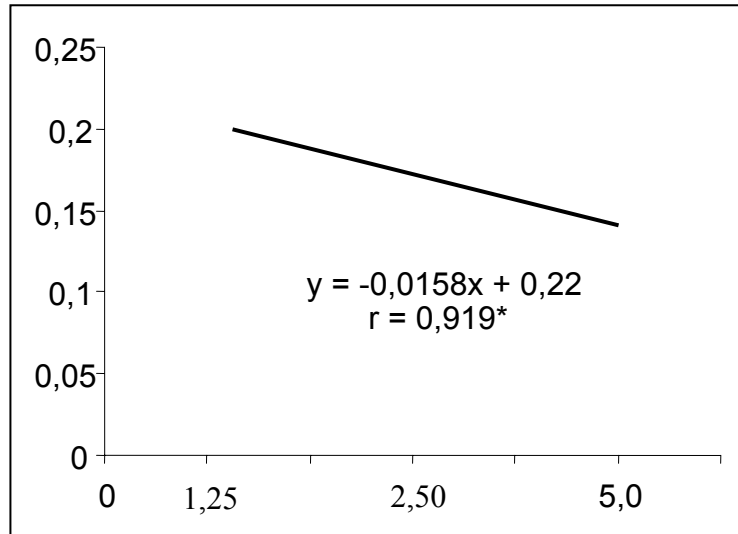
*: P < 0.05



Şekil 4.12. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde iki nükleuslu hücre başına düşen MN sayısı.

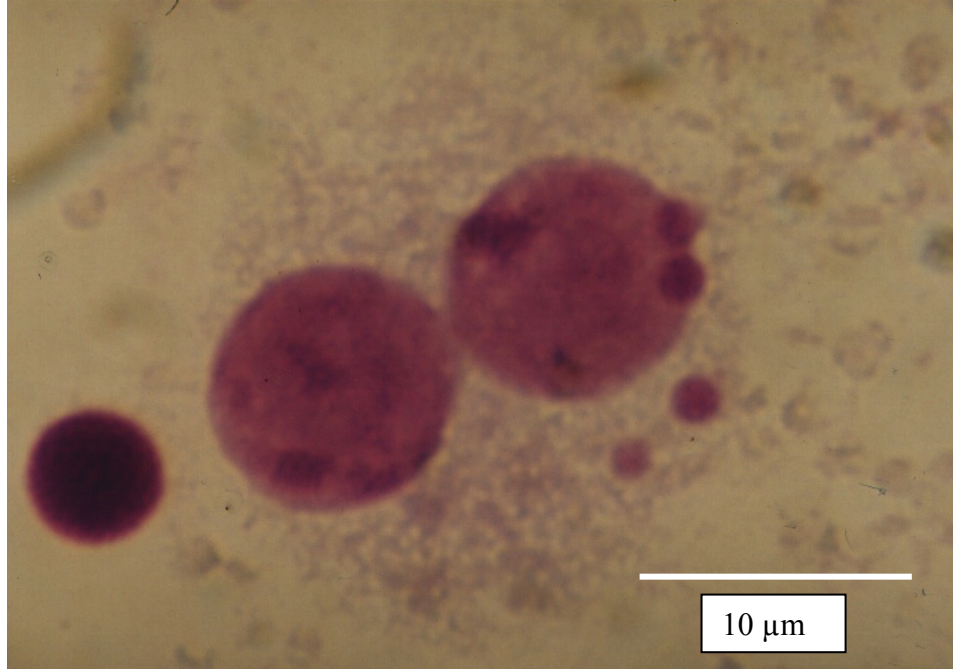


Şekil 4.13. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferik lenfositlerinde iki nükleuslu hücre/tek nükleuslu hücre.

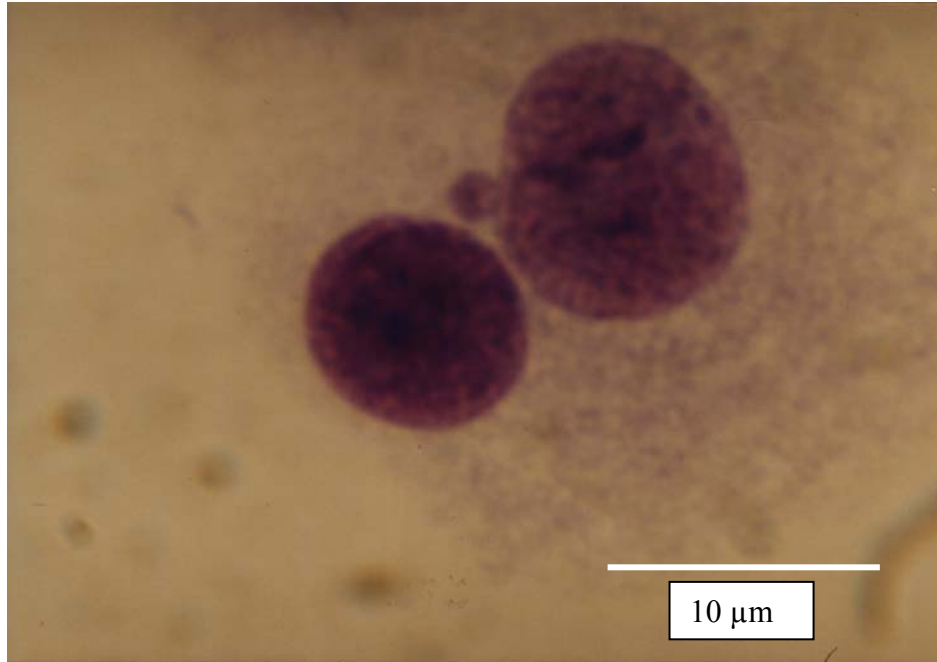


Şekil 4.14. Farklı dozlarda maltitol ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranının doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (* $P < 0.05$).

Bu çalışmada, MMC mikronükleus oluşumunu (Şekil 4.15.) maltitola nazaran daha fazla indüklemiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. MMC ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde 4 mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (0.25 µg/ml, 48 saat, ♂). x2000.



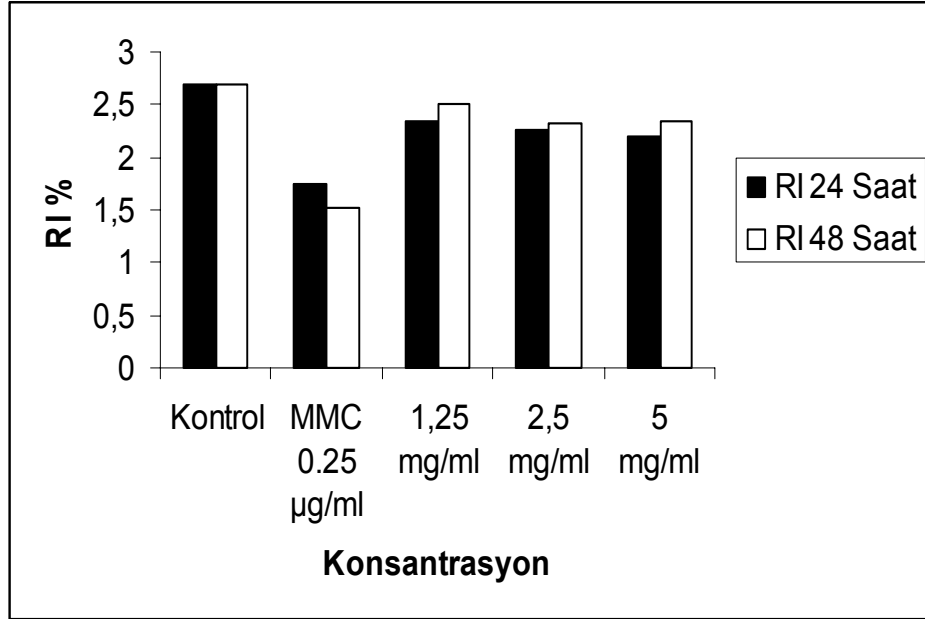
Şekil 4.16. Maltitol ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (5 mg/ml, 48 saat, ♀). x2000.

4.4. Maltitol'un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

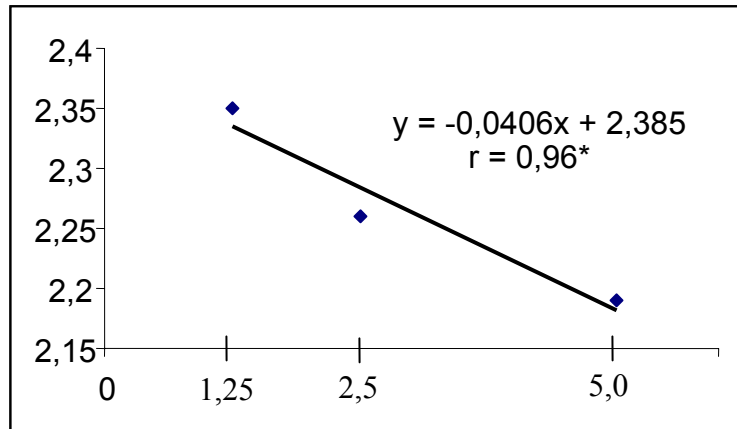
Maltitol'un DNA replikasyonu üzerindeki etkisi RI'nin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise MI'in bulunması yoluyla saptanmıştır. Maltitol hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde RI'ni kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede düşürmemiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.17). Halbuki, 24 saatlik muamele süresinde RI'de doza bağlı bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.18). Maltitol, her iki muamele süresinde ve kullanılan tüm dozlarda MI'i etkilememiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.19).

Çizelge 4.4. Değişik dozda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde RI ve MI.

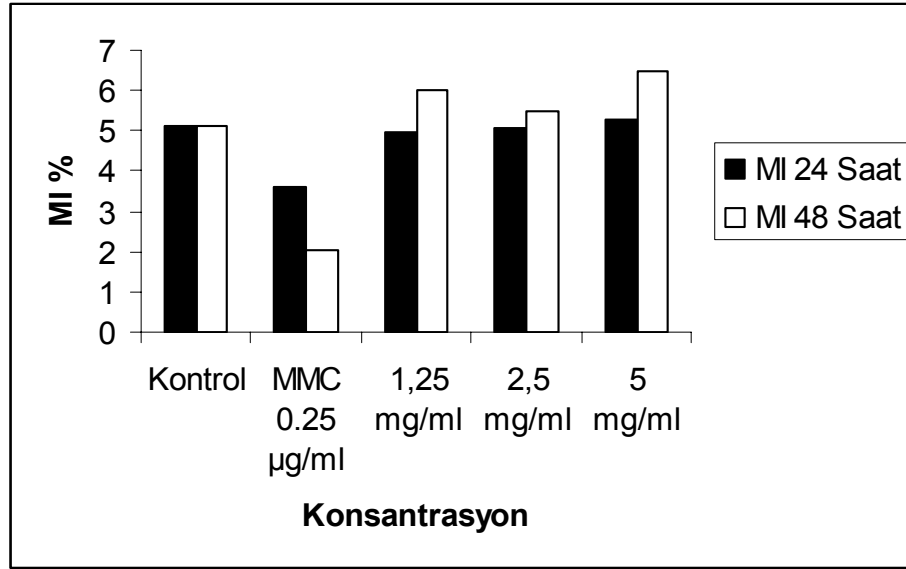
Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. mg/ml	M1	M2	M3	RI±SE	MI±SE
Kontrol	-	-	19	95	292	2.69±0.06	5.12±0.73
MMC	24	0.25 µg/ml	121	190	89	1.75±0.07	3.61±0.89
Maltitol	24	1.25	65	127	208	2.35±0.12	4.97±1.29
"	24	2.50	79	137	184	2.26±0.16	5.09±1.04
"	24	5.00	96	131	173	2.19±0.20	5.28±1.22
MMC	48	0.25 µg/ml	207	172	21	1.53±0.11	2.05±0.53
Maltitol	48	1.25	42	112	246	2.51±0.09	6.01±0.62
"	48	2.50	33	206	161	2.32±0.15	5.46±0.23
"	48	5.00	21	219	160	2.34±0.17	6.48±0.74



Şekil 4.17. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde RI.



Şekil 4.18. Farklı dozlarda maltitol ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde RI'nin doza bağlı düşüşünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (* $P < 0.05$).



Şekil 4.19. Farklı dozlarda maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferik lenfositlerinde MI.

Bu çalışmada maltitol en yüksek konsantrasyonda (5 mg/ml) kromozom medyumunun pH değerini değiştirmemiş (pH= 7.02) ve aynı dozda da ortamın osmatik değerini de (308 miliosmol/kg) etkilememiştir. Test maddesi ilave edilmemiş kromozom medyumunun osmatik basıncı ise 312 miliosmol/kg olarak ölçülmüştür.

5.TARTIŞMA

Bu çalışma, gıdalarda tatlandırıcı madde olarak kullanılan ve bir şeker alkolü olan maltitol'un insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimini (KKD=SCE), kromozom anormalliklerini (KA=CA) ve mikronükleus (MN) oluşumunu artırıp artırmadığını araştırmak ve bu testler yardımı ile insanlarda herhangi bir genotoksik etkiye sahip olup olmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, insan periferik lenfositleri in vitro olarak 1.25, 2.5 ve 5 mg/ml konsantrasyonlardaki maltitol ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla tartışılmıştır.

5.1. Maltitol'un KKD, KA ve MN oluşumu üzerindeki etkileri

Bu çalışmada maltitol, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm dozlarda KKD sayısını kontrole nazaran istatistiksel olarak önemli derecede artırmamıştır. Aynı şekilde maltitol, KA sayısını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda artırmamasına rağmen bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde olmamıştır. Halbuki, maltitol MN sayısını kontrole nazaran önemli derecede artırmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız maltitol (4-o- α -D-glukopiranozil-D-sorbitol) bir şeker alkolüdür (poliol) ve bir disakkarit olan maltozun hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır (Suzuki ve Tamura, 1988: Tsukamura ve ark., 1998'den). Maltitol sukroza (şeker) benzer tat vermesinden dolayı enerjisi azaltılmış diyet ürünlerinde şeker yerine yoğun bir şekilde kullanılabilir.

Takizawa ve Hachiya (1984) maltitol'un *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* suşlarında mutajen olmadığını ve fare kemik iliğinde MN oluşumunu artırmadığını bildirmişlerdir. Tsukamura ve ark. (1998) maltitol'un sıçan kalın bağırsağında dimethylhidrazin'in kanser oluşturma etkisini azalttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumaktadır. Ayrıca maltitol'un dişlerde plak oluşumuna sebep olmadığı (Maguire ve ark., 2000), genç ve yetişkin sıçanlarda ince bağırsaktan kalsiyum emilimini artırdığı ve kemiğin kırılma direncini yükselttiği (Kishi ve ark., 1996; Fukahori ve

ark., 1998; Goda ve ark., 1998) bildirilmiştir. Halbuki, 40 g olarak çikolataya enjekte edilen maltitol'un insanlarda sancı ve gaz oluşumuna sebep olduğu saptanmıştır (Koutsou ve ark., 1996; Storey ve ark., 1998). Maltitol, midede hidrolize olarak sorbitol ve glukoz'a dönüşmektedir (Altuğ ve Elmacı, 2001). Johannes ve ark. (1992) sorbitol'un CHO hücrelerinde DNA zararlarını indüklediğini, Tatewaki ve ark. (2002) da glukoz'un blastosit kültüründe KA oluşumunu artırdığını saptamışlardır. Ayrıca, Hinck ve ark. (2003) yüksek dozlarda glikozun sıçan trofoblast hücrelerinde endoreduplikasyon oluşumunu indüklediğini saptamışlardır. Sorbitol vücutta emiliminden sonra dehidrogenaz enzimi ile okside olarak fruktoza dönüşmekte, oluşan fruktoz ise fruktojenaz enzimi ile fruktoz-1-fosfata dönüşmektedir. Bu metabolit de karaciğerde aldolaz B enzimi ile dihidroksiasetonfosfat ve gliseraldehite parçalanmakta, dihidroksiasetonfosfat ise piruvat veya glikoz ve glikojene metabolize olmaktadır. MacGregor ve ark. (1989) fruktoz/lisin karışımının oral olarak verildiğinde farelerde MN oluşumunu artırmadığını halbuki, CHO hücrelerinde şiddetli klastojenik etki gösterdiğini saptamışlardır. 1,5-Anhydro-D-fruktozun fare limfoma L5178Y hücrelerinde ve Ames testinde mutajen olmadığı saptanmıştır (Yu ve ark., 2004).

Bu çalışmada 5 mg/ml olarak en yüksek dozda kullanılan maltitol KKD oluşumunu artırmamasına rağmen KA oluşumunu artırma eğiliminde olduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalardan da anlaşıldığı gibi maltitol sorbitol'a ve daha sonra da fruktoz ve glukoz'a kadar hidrolize olmaktadır. Bu bileşiklerden sorbitol ve glukoz in vitro ortamda DNA zararlarını indüklemektedirler ve KA oluşumunu da artırmaktadırlar. Maltitol, MN oluşumunu artırmıştır, fakat bu artışın doza bağlı olmadığı görülmüştür. Halbuki, Tsukamura ve ark., (1998), maltitol'un sıçanlarda anti-kanserojenik etki gösterdiğini saptamıştır.

Bu çalışmadan ve daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre maltitol'un kanserojenik özelliğe sahip olmadığını söyleyebiliriz. Fakat, özellikle metabolitleri başta olmak üzere maltitol'un zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir. Bu çalışmada en yüksek doz olarak 5 mg/ml kullanılmıştır. Tarım Bakanlığının yayınladığı Türk Gıda Kodeksine göre maltitol'un dozunun herhangi bir sınırlamaya tabi olmadığı ve gıdalarda istenilen miktarlarda

kullanılabileceği belirtilmiştir. Dolayısıyla daha yüksek dozlarda maltitol'un mutajenik etkisinin daha fazla olacağı düşünülebilir.

Maltitol maksimum dozda kromozom medyumunun pH'nı ve osmatik basıncını değiştirmemiştir. Bu durumda maltitol'un zayıf mutajenik etkisi kendisinin yapısından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Çünkü, fizyolojik osmoliteden (300 miliosmol/kg) sapmanın genotoksik bir etki yaratabileceği bildirilmiştir (Nowak, 1984; Galloway ve ark., 1987; Seeberg ve ark., 1989; Nowak, 1997).

5.2. Maltitol'un DNA replikasyonu (RI) ve mitoz bölünme (MI) üzerindeki etkileri

Bu çalışmada maltitol'un DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI) ve mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeksin (MI), saptanması yoluyla bulunmuştur. Bu çalışmada Maltitol tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde hem RI'ni hem de MI'ni kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede düşürmemiştir. Sadece iki nükleuslu hücrelerin tek nükleuslu hücrelere oranını düşürmüştü fakat bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Dolayısıyla kullanılan dozlarda maltitol'un sitotoksik olmadığını söyleyebiliriz. Aynı şekilde Tarım Bakanlığı da maltitol'un gıdalarda kullanım miktarını sınırlandırmamış, gıdalarda gıda özelliğine göre yetecek miktarlarda kullanılabileceğini bildirmiştir (Tarım Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi, 1997). Diğer bir çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda bazı tatlandırıcıların sitotoksik olmadığı (Damasceno ve ark., 2003), bazı tatlandırıcıların ise sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Lorenzi ve ark., 1985; Tucker ve Christensen, 1987; Rencüzoğulları ve ark., 2004).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan ve daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre maltitol mutajenik ve kanserojenik özelliğe sahip değildir. Fakat, özellikle metabolitleri başta olmak üzere maltitol'un zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir. Tarım Bakanlığı'nın maltitol'un kullanım dozuna her hangi bir sınır getirmemesi sonucunda aşırı kullanımı riski söz konusu olacaktır. Bu durum laksatif etki yaratabileceği gibi maltitol'un gastrointestinal sistemde parçalanması sonucu sorbitol ve fruktoz'un daha fazla miktarda açığa çıkmasına sebep olacaktır. Bu durum maltitol'un metabolitlerinin mutajenik etkisinin daha fazla olabileceği anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak, maltitol'un düşük dozlarda insanlar için fazla risk oluşturmayacağı, fakat yüksek dozlarda kullanılması durumunda özellikle metabolitlerinin mutajenik etki yaratabileceğini söyleyebiliriz. Bundan dolayı, maltitol içeren gıdaların tüketilmesi durumunda insanların dikkatli olması, hem kendi sağlıklarının hem de gelecek nesillerin sağlıklarının korunması açısından yararlı olacağı görüşündeyim.

KAYNAKLAR

- AHMED, F.E., and THOMAS, D.B.,1992. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. *Crit Rev Toxicol*, 22: 81-118.
- ALIEV, A.A., RAGIMOVA, G.K., GADZHIEV, R.R., and ALEKPEROV, U.K., 1992. The interrelation of the antimutagenic action of mannitol to its effect on cellular metabolic processes]. *Tsitol Genet*, 26: 9-13.
- ALTUĞ, T.,1999. Gıda katkı maddeleri, genel başlıklar. *Hekim ve Yaşam*, 29-31.
- ALTUĞ, T., ve ELMACI, Y., 2001. Gıda katkı maddeleri. *Tatlandırıcılar* (T. Altuğ editör) Meta Basım, İzmir, 286s.
- ARMSTRONG, B.K., 1985. Saccharin/cyclamates: epidemiological evidence. *IARC Sci Publ.*, 65: 129-43.
- ASHBY, J., and ISHIDATE, M. Jr., 1986. Clastogenicity in vitro of the Na, K, Ca and Mg salts of saccharin; and of magnesium chloride; consideration of significance. *Mutat Res.*, 163: 63-73.
- BAEK, N. I., CHUNG, M. S., SHAMON, L., KARDONO, L. B., TSAURI, S., PADMAWINATA, K., PEZZUTO, J. M., SOEJARTO, D. D., and KINGHORN, A. D., 1993. Selliguesin A, a novel highly sweet proanthocyanidin from the rhizomes of *Selliguea feei*. *J Nat Prod.*, 56: 1532-1538.
- BRANDS, C.M., ALINK, G.M., VAN BOEKEL, M.A., and JONGEN, W.M., 2000. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: effect of the Maillard reaction. *J Agric Food Chem.*, 48: 2271-2275.
- BREITENEDER, H., 2004. Thaumatin-like proteins-a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, 59: 479-481.
- BRUSICK, D., CIFONE, M., YOUNG, R., and BENSON, S., 1989. Assessment of the genotoxicity of calcium cyclamate and cyclohexylamine. *Environ Mol Mutagen.*, 14: 188-199.
- BUARD, A., CARLTON, B.D., FLOCH, F., and SIMON, G.S., 2003. Subchronic toxicity, mutagenicity and allergenicity studies of a cultured dextrose food product. *Food Chem Toxicol*, 41: 689-694.

- BUTCHKO, H.H., STARGEL, W.W., COMER, C.P., MAYHEW, D.A., BENNINGER, C., BLACKBURN, G.L., de SONNEVILLE, L.M., GEHA, R.S., HERTELENDY, Z., KOESTNER, A., LEON, A.S., LIEPA, G.U., McMARTIN, K.E., MENDENHALL, C.L., MUNRO, I.C., NOVOTNY, E.J., RENWICK, A.G., SCHIFFMAN, S.S., SCHOMER, D.L., SHAYWITZ, B.A., SPIERS, P.A., TEPHLY, T.R., THOMAS, J.A., and TREFZ, F.K., 2002. Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol*, 35: 1-93.
- CAIN, K.T., CORNETT, C.V., CACHEIRO, N.L., HUGHES, L.A., OWENS, J.G., and GENEROSO, W.M., 1988. No evidence found for induction of dominant lethal mutations and heritable translocations in male mice by calcium cyclamate. *Environ Mol Mutagen.*, 11: 207-213.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDL, P.A., and MINKLER, J.L., 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271: 551-553.
- COHEN, S.M., MURASAKI, G., FUKUSHIMA, S., and GREENFIELD, R.E., 1982. Effect of regenerative hyperplasia on the urinary bladder: carcinogenicity of sodium saccharin and N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res.*, 42:65-71.
- COMPADRE, C.M., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D., and KAMATH, S.K., 1985. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. *Science*, 227: 417-419.
- COMPADRE, C.M., HUSSAIN, R.A., LOPEZ de COMPADRE, R.L., PEZZUTO, J.M., and KINGHORN, A.D., 1988. Analysis of structural features responsible for the sweetness of the sesquiterpene, hernandulcin. *Experientia*, 44: 447-449.
- CREPPY, E.E., BAUDRIMONT, I., and BETBEDER, A.M., 1998. How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *J Toxicol Sci.*, 2: 165-172.
- DAMASCENO, D.C., GONCALVES, M.A., DURANTE, L.C., CASTRO, N.C., MOURA, C.H., and OLIVERA, C.B., 2003. Effects of a saccharin and cyclamate mixture on rat embryos. *Vet Hum Toxicol.*, 45: 157-159.

- DRAGSTED, L.O., DANESHVAR, B., VOGEL, U., AUTRUP, H. N., WALLIN, H., RISOM, L., MOLLER, P., MOLCK, A. M., HANSEN, M., POULSEN, H. E., and LOFT, S., 2002. A sucrose-rich diet induces mutations in the rat colon. *Cancer Res.*, 62:4339-4345.
- DROPKIN, R.H., SALO, D.F., TUCCI, S.M., and KAYE, G.I., 1985. Effects on mouse embryos of in utero exposure to saccharin: teratogenic and chromosome effects. *Arch Toxicol*, 56: 283-287.
- DURNEV, A. D., ORESCHENKO, A. V., KULAKOVA, A. V., BERESTEN, N. F., and SEREDENIN, S. B., 1995. Clastogenic activity of dietary sugar substitutes. *Vopr Med Khim*, 41: 31-33.
- ECKHARDT, K., KING, M.T., GOCKE, E., and WILD, D., 1980. Mutagenicity study of Remsen-Fahlberg saccharin and contaminants. *Toxicol Lett.*, 7: 51-60.
- FUKAHORI, M., SAKURAI, H., AKATSU, S., NEGISHI, M., SATO, H., GODA, T., and TAKASE, S., 1998. Enhanced absorption of calcium after oral administration of maltitol in the rat intestine. *J Pharm Pharmacol*, 50:1227-1232.
- GALLOWAY, S.M., DEASY, D.A., BEAN, C.L., KRAYNAK, A.R., ARMSTRONG, M.J., and BRADLEY, M.O., 1987. Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutat Res.*, 189:15-25.
- GEUNS, J.M.C., 2003. Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry*, 64: 913-921.
- GODA, T., KISHI, K., EZAWA, I., and TAKASE, S., 1998. The maltitol-induced increase in intestinal calcium transport increases the calcium content and breaking force of femoral bone in weanling rats. *J. Nutr.*, 128:2028-2031.
- GURNEY, J.G., POGODA, J.M., HOLLY, E.A., HECHT, S.S., PRESTON-and MARTIN, S., 1997. Aspartame consumption in relation to childhood brain tumor risk: results from a case-control study. *J Natl Cancer Inst.*, 89:1072-1074

- HANSEN, M., HALD, M.T., AUTRUP, H., VOGEL, U., BORNHOLDT, J., MOLLER, P., MOLCK, A.M., LINDECORONA, R., POULSEN, H.E., WALLIN, H., LOFT, S., and DRAGSTED, L.O., 2004. Sucrose and IQ induced mutations in rat colon by independent mechanism. *Mutat Res.*, 554: 279-286.
- HEDGE, V.L., and VENKATESH, Y.P., 2004. Anaphylaxis to excipient mannitol: evidence for an immunoglobulin E-mediated mechanism. *Clin Exp Allergy*, 34:1602-1609.
- HERBOLD, B.A., 1981. Studies to evaluate artificial sweeteners, especially Remsen-Fahlberg saccharin, and their possible impurities, for potential mutagenicity by the Salmonella/mammalian liver microsome test. *Mutat Res.*, 90: 365-372.
- HILL, A.M., and BELSITO, D.V., 2003. Systemic contact dermatitis of the eyelids caused by formaldehyde derived from aspartame? *Contact Dermatitis*, 49:258-259.
- HINCK, L., THISSEN, J.P., PAMPFER, S., and DE HERTOOGH, R., 2003. Effect of high concentrations of glucose on differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *Diabetologia*, 46: 276-283.
- ISHII, H., 1981. Incidence of brain tumors in rats fed aspartame. *Toxicol Lett.*, 7: 433-437.
- ITO, N., FUKUSHIMA, S., SHIRAI, T., HAGIWARA, A., and IMAIDA, K., 1984. Drugs, food additives and natural products as promoters in rat urinary bladder carcinogenesis. *IARC Sci Publ.*, 56:399-407.
- IWAKURA, K., TAMURA, H., WATANABE, M., SUMI, N., 1994. Mutagenicity studies of lactitol (NS-4)]. *J Toxicol Sci.*, 3: 487-497.
- JEFFREY, A.M., and WILLIAMS, G.M., 2000. Lack of DNA –damaging Activity of Five Non-nutritive Sweeteners in the Rat Hepatocyte / DNA Repair Assay. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 335-338.
- JEMISON, E.W., BROWN, K., RIVERS, B., and KNIGHT, R., 1984. Cytogenetic effects of cyclamates. *Adv Exp Med Biol.*, 172: 91-117.

- JOHANNES, C., BOES, R., and OBE, G., 1992. Uptake of the restriction endonuclease AluI by Chinese hamster ovary cells measured by frequencies of induced chromosomal aberrations: effect of hypertonic concentrations of glycerol and sorbitol. *Mutagenesis*, 7: 225-232.
- KAUDERER, B., ZAMIT, H., PAUMGARTTEN, F.J.R., and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 28-34.
- KESSLER, I.I., and CLARK, J.P., 1978. Saccharin, cyclamate, and human bladder cancer. No evidence of an association. *JAMA*, 240: 349-355.
- KISHI, K., GODA, T., and TAKASE, S., 1996. Maltitol increases transepithelial diffusional transfer of calcium in rat ileum. *Life Sci.*, 59:1133-1140.
- KLONGPANICHPAK, S., TEMCHAROEN, P., TOSKULKAO, C., APIBAL, S., and GLINSUKON, T., 1997. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. *J Med Assoc Thai*, 80 Suppl 1: 121-128.
- KOBAYASHI, M., FUJITA, K., KATAKURA, T., UTSUNOMIYA, T., POLLARD, R.B., and SUZUKI, F., 2002. Inhibitory effect of glycyrrhizin on experimental pulmonary metastasis in mice inoculated with B16 melanoma. *Anticancer Res.*, 22 :4053-4058.
- KOBUKE, T., INAI, K., NAMBU, S., OHE, K., TAKEMOTO, T., MATSUKI, K., NISHINA, H., HUANG, I.B., and TOKUOKA, S., 1985. Tumorigenicity study of disodium glycyrrhizinate administered orally to mice. *Food Chem Toxicol*, 23: 979-983.
- KOSKELA, H.O., HYVARINEN, L., BRANNAN, J.D., CHAN, H.K., and ANDERSON, S.D., 2004. Coughing during mannitol challenge is associated with asthma. *Chest*, 125:1985-1992.

- KOUTSOU, G.A., STOREY, D.M., LEE, A., ZUMBE, A., FLOURIE, B., LE BOT, Y., and OLIVIER, P., 1996. Dose-related gastrointestinal response to the ingestion of either isomalt, lactitol or maltitol in milk chocolate. *Eur J Clin Nutr.*, 50:17-21.
- KRUGER, C. L., WHITTAKER, M.H., and FRANKOS, V.H., 1999. Genotoxicity tests on D-tagatose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 29: 36-42.
- KULAKOVA, A.V., BELOGOLOVSKAIA, E.G., ORESHCHENKO, A.V., DURNEV, A.D., and SEREDENIN, S. B., 1999. The antimutagenic activity of aspartame. *Eksp Klin Farmakol*, 62: 48-50.
- LAMM, L.M., REICHERT, D.F., and LAMM, D.L., 1989. Rapid screening of potential human bladder carcinogens: genotoxicity in meiosis repair deficient *Drosophila melanogaster*. *J Urol.*, 142: 1356-1538.
- LEONARD, A., and LEONARD, E.D., 1979. Mutagenicity test with saccharin in the male mouse. *J Environ Pathol Toxicol*, 2: 1047-1053.
- LINA, B.A., DREEF,-van der MEULEN, H.C., and LEEGWATER, D.C., 1990. Subchronic (13-week) oral toxicity of neohesperidin dihydrochalcone in rats. *Food Chem Toxicol*, 28:507-513.
- LORENZI, M., CAGLIERO, E., and TOLEDO, S., 1985. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle and accelerated death. *Diabetes.*, 34 :621-627.
- MACE, Jr.M.L., DASKAL, Y., and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Res.*, 52: 199-206.
- MacGREGOR, J.T., WEHR, C.M., MANNERS, G.D., JURD, L., MINKLER, J.L., and CARRANO, A.V., 1983. In vivo exposure to plant flavonols. Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Mutat Res.*, 124:255-270.
- MacGREGOR, J.T., TUCKER, J.D., ZIDERMAN, I.I., WEHR, C.M., WILSON, R.E., and FRIDEMAN, M., 1989. Non-clastogenicity in mouse bone marrow of fructose/lysine and other sugar/amino acid browning products with in vitro genotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 27:715-721.

- MADLE, S., BEEK, B., and NOWAK, C., 1993. Zum verständis von chromosomenmutationtest an somazellen (R. Fahrig editör). Mutationforschung und Genetische Toxikologie, 224-242, Wissneschaftliche Buchgesellschaft, Dramstat, Germany.
- MAGUIRE, A., RUGG-GUNN, A.J., and WRIGHT, W.G., 2000. Adaptation of dental plaque to metabolise maltitol compared with other sweeteners. J Dent., 28:51-59.
- MAHON, G.A., and DAWSON, G.W., 1982. Saccharin and the induction of presumed somatic mutations in the mouse. Mutat Res., 103:49-52.
- MATSUI, M., MATSUI, K., NOHMI, T., MIZUSAWA, H., and ISHIDATE, M., 1989. Mutagenicity of steviol: an analytical approach using the Southern blotting system. Eisei Shikenjo Hokoku, 107: 83-87.
- MATSUI, M., MATSUI, K., KAWASAKI, Y., ODA, Y., NOGUCHI, T., KITAGAWA, Y., SAWADA, M., HAYASHI, M., NOHMI, T., YOSHIHARA, K., ISHIDATE, M. Jr., and SOFUNI, T., 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity. assays. Mutagenesis, 11: 573-579.
- MOLLER, P., HANSEN, M., AUTRUP, H., BORNHOLT, J., VOGEL, U., MOLCK, A.M., WALLIN, H., DRAGSTED, L.O., RISOM, L., POULSEN, H.E., and LOFT, S., 2003. Dietary low-dose sucrose modulation of IQ-induced genotoxicity in the colon and liver of Big Blue rats. Mutat Res., 527:91-97.
- MOORE, C.W., SCHMICK, A., 1979. Recombinogenicity and mutagenicity of saccharin in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res., 67: 215-219.
- MUKHERJEE, A., and CHAKRABARTI, J.,1997. In Vivo Cytogenetic Effect On Mice Exposed to Acesulfam-K – a Non-nutritive Sweetener, Food and Chemical Toxicology, 35: 1177-1179.
- MUKHOPADHYAY, M., MUKHERJEE, A., and CHAKRABARTI, J.,2000. In Vivo Cytogenetic Studies on Blends of Aspartame and Accesulfam – K. Food and Chemical Toxicology, 38: 75-77.

- NOWAK, C., 1984. Induction of chromosomal aberrations by hypotonic culture conditions is dependent of the S-phase in V79 hamster cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 44-49.
- NOWAK, C., 1997. Studies on the ability of hypotonic solutions to induce chromosomal aberrations in V79 cells, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 7: 515-525.
- OHTSUKA, M., FUKUDA, K., YANO, H., and KOJIRO, M., 1995. Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide mutagenicity. *Jpn J Cancer Res.*, 86:1131-1135.
- OLNEY, J.W., FARBER, N.B., SPITZNAGEL, E., and ROBINS, L.N., 1996. Increasing brain tumors rates: is there a link to aspartame? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 1115-1123.
- OKU, T., AKIBA, M., LEE, M. H., MOON, S. J., and HOSOYA, N., 1991. Metabolic fate of ingested [14C]-maltitol in man. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 37: 529-544.
- PECEVSKI, J., VUKSANOVIC, L., SAVKOVIC, N., ALAVANTIC, D., and RADIVOJEVIC, D., 1983. Effect of saccharin on the induction of chromosomal translocations in male mice and their F1 offspring. *Toxicol Lett.*, 19: 267-271.
- PERRY, P., and EVANS, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258:121-125.
- RENCÜZOĞULLARI, E., and TOPAKTAŞ, M., 1991. The Relationships Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood With Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium B. *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5: 19-24.
- RENCÜZOĞULLARI, E., TÜYLÜ, B.A., TOPAKTAŞ, M., İLA, H.B., KAYRALDIZ, A., ARSLAN, M., and DİLER, S. B., 2004. Genotoxicity of aspartame. *Drug Chem. Toxicol.*, 27: 257-268.
- RENNER, H.W., 1979. Possible mutagenic activity of saccharin. *Experientia*, 15:35(10), 1364-1365.

- RISOM, L., MOLLER, P., HANSEN, M., AUTRUP, H., BORNHOLDT, J., VOGEL, U., WALLIN, H., POULSEN, H.E., DRAGSTED, L.O., and LOFT, S., 2003. Dietary elevated sucrose modulation of diesel-induced genotoxicity in the colon and liver of Big Blue rats. *Arch Toxicol*, 77:651-656.
- ROTHFUSS, A., SCHÜTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., EBERHARDT, E., KREIENBERG, R., VOGEL, W., and SPEIT, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60: 390-394.
- SAHU, R.K., BASU, R., and SHARMA, A., 1981. Genetic toxicological of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutat Res.*, 89:69-74.
- SASAKI, Y. F., KAVAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., and TSUDA, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: result with 39 currently used food additives. *Mutation Res.*, 519: 103-119.
- SCHWARTZ, G.R., 1999. Aspartame and breast and other cancers. *West J. Med.*, 171: 300-301.
- SEEBERG, A.H., MOSESSO, P., and FORSTER, R., 1989. High-dose-level effects in mutagenicity assays utilizing mammalian cells in culture. *Mutagenesis*, 3: 213-218.
- SEKIHASHI, K., SAITOH, H., and SASAKI, Y., 2002. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *J. Toxicol Sci.*, 1:1-8.
- SHEPHARD, S.E., WAKABAYASHI, K., and NAGAO, M., 1993. Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation. *Food Chem Toxicol*, 31: 323-329.
- SHEU, C.W., CAIN, K.T., RUSHBROOK, C.J., JORGENSEN, T.A., and GENEROSO, W.M., 1986. Tests for mutagenic effects of ammoniated glycyrrhizin, butylated hydroxytoluene, and gum Arabic in rodent germ cells. *Environ Mutagen*, 8: 357-367.

- SPEIT, G., and HAUPTER, S., 1985. On the mechanisms of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum. Genet.*, 70: 126-129.
- SQUIRE, R.A. 1985. Histopathological evaluation of rat urinary bladders from the IRDC two-generation bioassay of sodium saccharin. *Chem Toxicol.*, 23:491-497.
- STOREY, D.M., KOUTSOU, G.A., LEE, A., ZUMBE, A., OLIVIER, P., LE BOT, Y., and FLOURIE, B., 1998. Tolerance and breath hydrogen excretion following ingestion of maltitol incorporated at two levels into milk chocolate consumed by healthy young adults with and without fasting. *J Nutr.*, 128:587-592.
- SUTTAJIT, M., VINITKETKAUMNUEN, U., MEEVATEE, U., and BUDDHASUKH, D., 1993. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ Health Perspect*, 3: 53-56.
- SUZUKI, H., and SUZUKI, N., 1988. Mutagenicity of saccharin in a human cell strain. *Mutation Res.*, 209:13-16.
- TARIM BAKANLIĞI, TÜRK GIDA KODEKSİ YÖNETMELİĞİ, 1997. Dünya Yayınları, s197.
- TARIM BAKANLIĞI, TÜRK GIDA KODEKSİ YÖNETMELİĞİ HAKKINDA DEĞİŞİKLİK YAPAN YÖNETMELİK, 2002. Yayımlandığı R. Gazete: 25.08.2002-24857, Tebliğ No: 2002/56.
- TAKAYAMA, S., SIEBER, S.M., ADAMSON, R.H., THORGEIRSSON, U.P., DALGARD, D.W., ARNOLD, L.L., CANO, M., EKLUND, S., and COHEN, S.M., 1998. Long-term feeding of sodium saccharin to nonhuman primates: implications for urinary tract cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 90: 19-25.
- TAKAYAMA, S., RENWICK, A. G., JOHANSSON, S. L., THORGEIRSSON, U. P., TSUTSUMI, M., DALGARD, D. W., and SIEBER, S. M., 2000. Long-Term toxicity and Carcinogenicity Study of Cyclamate in Nonhuman Primates. *Toxicological Sciences*, 53: 33-39.

- TAKIZAWA, Y., and HACHIYA, N., 1984. Bacterial reversion assay and micronucleus test carried out on hydrogenated glucose syrups 'Malti-Towa' (powder) and maltitol crystal. *Mutat Res*, 137: 133-137.
- TANAKA, M., MANO, N., AKAZAI, E., NARUI, Y., KATO, F., and KOYAMA, Y., 1987. Inhibition of mutagenicity by glycyrrhiza extract and glycyrrhizin. *J Pharmacobiodyn*, 10:685-688.
- TATEWAKI, R., KAGOHASHI, Y., FURUSE, K., and OTANI, H., 2002. Chromosome analysis of blastocysts cultured under the diabetic condition. *Congenit Anom (Kyoto)*, 42:21-26.
- TAYLOR, J.M., WEINBERGER, M.A., and FRIEDMAN, L., 1980. Chronic toxicity and carcinogenicity to the urinary bladder of sodium saccharin in the in utero-exposed rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54:57-75.
- TEMCHAROEN, P., SUWANNATRAI, M., KLONGPANICHPAK, S., APIBAL, S., GLINSUKON, T., and TOSKULKAO, C., 2000. Evaluation of the effect of steviol on chromosomal damage using micronucleus test in three laboratory animal species. *J. Med. Assoc. Thai.*, 1: 101-108.
- TERAI, T., REN, H., MORI, G., YAMAGUCHI, Y., and HAYASHI, T., 2002. Mutagenicity of Steviol and Its Oxidative Derivatives in *Salmonella thymphimurium* TM677. *Chem. Pharm. Bull*, 50: 1007-1010.
- THOMAS, G., GARNIER, R., and FOURNIER, E., 1986. Mutagenicity of urine after ingestion of saccharin in man. *Ann Med Interne (Paris)*, 137: 576-578.
- TOPAKTAŞ, M., ve SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.* 5: 73-84.
- TSUKAMURA, M., GOTO, H., ARISAWA, T., HAYAKAWA, T., NAKAI, N., MURAKAMI, T., FUJITSUKA, N., and SHIMOMURA, Y., 1998. Dietary Maltitol Decreases the Incidence of 1,2- Dimethylhydrazine – Induced Cecum and Proximal Colon Tumors in Rats. *J. Nutr*, 128: 536-540.
- TUCKER, J.D., and CHRISTENSEN, M.L., 1987. Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res.*, 190: 225-228.

- TURNER, S.D., TINWELL, H., PIERGORSCH, W., SCHMEZER, P., and ASHBY, J., 2001. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue rats. *Mutagenesis*, 16:329-332.
- VASANGE, M., LIU, B., WELCH, C.J., ROLFSEN, W., and BOHLIN, L., 1997. The flavonoid constituents of two *Polypodium* species (*Calaguala*) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta Med.*, 63:511-517.
- WAALKENS-BERENDSEN, D.H., KUILMAN-WAHL, M.E., and BAR, A., 2004. Embryotoxicity and teratogenicity study with neohesperidin dihydrochalcone in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 40:74-79.
- WANG, Z.Y., AGARWAL, R., ZHOU, Z.C., BICKERS, D.R., and MUKHTAR, H., 1991. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and skin tumor initiating and tumor promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetic acid: comparison of 18 α - and 18 β -stereoisomers. *Carcinogenesis*, 12:187-192.
- WANG, X.H., ANDRAE, L., and ENGESETH, N.J., 2002. Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *J Agric Food Chem.*, 50: 6923-6928.
- WEIHRAUCH, M.R., DIEHL, V., and BOHLEN, H., 2001. Künstliche süßstoffe-haben sie ein kanzerogenes potential? *Medizinische Klinik. (Munich)*, 96: 670-675.
- WEIHRAUCH, M. R., and DIEHL, V., 2004. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology*, 15: 1460-1465.
- WEITBERG, A.B., WEITZMAN, S.A., CLARK, E.P., and STOSSEL, T.P., 1985. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.*, 75:1835-1841.
- WOLFF, S., and RODIN, B., 1978. Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells. *Science*, 200: 543-545.
- YASUKAWA, K., KITANAKA, S., and SEO, S., 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull*, 25:1488-1490.

- YOSHIZAWA, S., MORIUCHI, S., and HOSOYA, N., 1975. The effects of maltitol on rat intestinal disaccharidases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 21: 31–37.
- YU, S., MEI, J., and AHREN, B., 2004. Basic toxicology and metabolism studies of 1,5-anhydro-D-fructose using bacteria, cultured mammalian cells, and rodents. *Food Chem Toxicol*, 42: 1677-1686.
- ZANI, F., CUZZONI, M.T., DAGLIA, M., BENVENUTI, S., VAMPA, G., and MAZZA, P., 1993. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrhiza glabra* extract, glycyrrhizinic acid, 18 alpha- and 18 beta-glycyrrhetinic acids. *Planta Med.*, 59:502-507

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi burada tamamladıktan sonra 1994 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Radyoloji Bölümüne başladım ve 1996 yılında mezun oldum. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğrenime başladım ve 2000 yılında yatay geçişle Ç. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğrenimime devam edip aynı Fakülteden 2001 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. Yine 2001 yılında Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığına bağlı Adana Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinde Radyoloji Teknikeri olarak göreve başladım ve halen aynı hastanede görevime devam etmekteyim.