

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Triammonium Citrate (E380) Bileşiğinin İn Vitro İnsan
Periferal Lenfositleri Üzerine Genotoksik Ve Sitotoksik Etkileri**

Emin ÖZTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Triammonium Citrate (E380) Bileşiğinin İn Vitro İnsan
Periferal Lenfositleri Üzerine Genotoksik Ve Sitotoksik Etkileri**

Emin ÖZTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi ..09/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA (Danışman)
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-16277

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

İçindekiler

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1.GİRİŞ	1
1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması	1
1.2. Gıda katkı maddelerinde E kodları	3
1.3. Gıda güvenliği ile ilgili kuruluşlar	4
1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Miktarlarının Belirlenmesi.....	6
1.5. Asitliği düzenleyiciler.....	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. Malik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları.....	15
2.2. Tartarik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları	17
2.3. Adipik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları	17
2.4. Askorbik asit (C Vitamini) ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları	18
2.5. Sitrik asit ve Triamonyum sitrat ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları	21
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	36
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Lamların Temizlenmesi.....	38
3.2.2. Sterilizasyon.....	38
3.2.3. Hücre Kültürü	38
3.2.4. Test Maddesinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi, Hazırlanması ve Sterilizasyonu	39
3.2.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyaması ve Mikroskopik İnceleme	39
3.2.6. Kromozom Anormalliklerin (KA) Saptanması	46

3.2.7. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	47
3.2.8. Ames/Salmonella Bakteriyel Geri Mutasyon Testi.....	51
3.2.9. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Testi.....	54
3.2.10. CCK-8 Testi	56
3.2.11. <i>In silico</i> Moleküler Kenetlenme Analizi	57
3.3. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	61
4.1. Bulgular	61
4.1.1. CCK-8 Testi ile Sitotoksosite Analizi	61
4.1.2. Triamonyum Sitratin Kromozom Anormalliği Üzerine Etkisi.....	63
4.1.3. Triamonyum Sitratin Mikronükleus Testi ile Genotoksik Profilinin Değerlendirilmesi	71
4.1.4. Triamonyum Sitratin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerine Etkileri	77
4.1.5. Triamonyum Sitratin Plazmid DNA ile Radikal/Anti-Radikal Etkileşimlerinin Analizi.....	80
4.1.6. Ames/Salmonella Gen Mutasyonu Bulguları.....	82
4.1.7. <i>In Silico</i> Moleküler Kenetlenme Analizi Bulguları.....	85
4.2. Tartışma.....	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	113

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Triammonium Citrate (E380) Bileşiğinin İn Vitro İnsan Periferik
Lenfositleri Üzerine Genotoksik Ve Sitotoksik Etkileri**

Emin ÖZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Triamonyum Sitrat (TS), gıda endüstrisinde asitlik düzenleyici, farmasötikte stabilizatör, temizlik sektöründe metal kaplama ajanı, su arıtımında ve laboratuvar araştırmalarında tampon madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma TS'nin genotoksik ve sitotoksik profilini multidisipliner metodolojilerle inceleyerek endüstriyel ve farmasötik kullanım güvenliğini değerlendirmeyi amaçlamıştır. TS'nin hücre canlılığı üzerine olan etkisi, MCF-7 (insan meme kanseri) ve NIH3T3 (fare fibroblast) hücre hatlarında CCK-8 testi ile değerlendirilmiş olup, her iki hücre grubunda da canlılık üzerine etki göstermemiştir. Genotoksik potansiyel, insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonu (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile değerlendirilmiş; TS'nin kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı veya kromozomal instabiliteye yol açmadığı saptanmıştır. Mutajenik aktivite, Ames testi (TA98 ve TA100 suşları) ile araştırılmış, 1-5 mg/petri konsantrasyonlarında revertant koloni artışı gözlenmemiştir. TS'nin DNA koruyucu aktivitesi, UV ve H₂O₂ kaynaklı pBR322 plazmit DNA hasarı modelinde analiz edilmiş; antioksidan benzeri koruyucu rol üstlendiği ve oksidatif stresi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Moleküler kenetlenme simülasyonları, TS'nin DNA polimeraz delta (-5.7 kcal/mol), Topoizomeraz 1 (-5.9 kcal/mol), Glutamat dehidrojenaz (-5.4 kcal/mol) ve Glutamin sentetaz (-6.1 kcal/mol) ile orta düzey afinite sergilediğini ortaya koymuştur. Sonuçlar, TS'nin tüm uygulama süre ve konsantrasyonlarında sitotoksik genotoksik/mutajenik risk taşımadığını ve DNA koruyucu özelliğiyle oksidatif hasarı azaltabileceğini kanıtlamıştır. Çok yönlü test bataryalarıyla desteklenen bu çalışma, TS'nin mevcut kullanımının güvenilir bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, söz konusu maddenin DNA hasarlayıcı ajanlara karşı gösterdiği koruyucu etkinin önemsenmesi ve kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekliliğinin altını çizmektedir.

Anahtar Kelimeler: Triamonyum Sitrat, sitotoksikite, genotoksikite, DNA koruma, moleküler kenetlenme.

**Genotoxic and Cytotoxic Effects of Triammonium Citrate (E380) on
Human Peripheral Lymphocytes In Vitro**

Emin ÖZTÜRK

Supervisor: Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Department of Biology

ABSTRACT

Triammonium citrate (TS) is widely used as an acidity regulator in the food industry, a stabilizer in pharmaceuticals, a metal-coating agent in cleaning products, and a buffering agent in water treatment and laboratory research. This study aimed to evaluate the genotoxic and cytotoxic profiles of TS through multidisciplinary methodologies to assess its safety for industrial and pharmaceutical applications. The cytotoxic effect of TS was analyzed using the CCK-8 assay in MCF-7 (human breast cancer) and NIH3T3 (mouse fibroblast) cell lines. The results showed that no cytotoxic effect was observed in both cell groups at all concentrations and times. Genotoxic potential was assessed in human peripheral lymphocytes via chromosomal aberration (CA), micronucleus (MN), and sister chromatid exchange (SCE) tests, which demonstrated no significant DNA damage or chromosomal instability compared to controls. Mutagenicity was evaluated using the Ames test (*Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains), and no increase in revertant colony formation was observed at concentrations of 1–5 mg/plate. TS exhibited DNA protective activity in a pBR322 plasmid DNA model against UV- and H₂O₂-induced damage, indicating antioxidant-like properties that mitigated oxidative stress. Molecular docking simulations revealed moderate binding affinity of TS with DNA polymerase delta (–5.7 kcal/mol), Topoisomerase 1 (–5.9 kcal/mol), Glutamate dehydrogenase (–5.4 kcal/mol), and Glutamine synthetase (–6.1 kcal/mol). These findings indicate that TS does not pose cytotoxic, genotoxic or mutagenic risks at all application times and concentrations, while its DNA-protective role may counteract oxidative damage. Supported by a comprehensive array of test batteries, this study demonstrates that the current use of TS exhibits a reliable safety profile. Furthermore, it underscores that its protective effects against DNA-damaging agents warrant careful consideration rather than being overlooked.

Keywords: Triammonium citrate, cytotoxicity, genotoxicity, DNA protection, molecular docking.

TEŞEKKÜR

Bu akademik yolculuğumda bana destek olan tüm kişi ve kurumlara en derin şükranlarımı sunarım.

Her şeyden önce, Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel bakış açımı şekillendiren, tez konumun belirlenmesinden uygulama aşamalarına kadar her adımda özveriyle rehberlik eden, sabrı ve engin bilgisiyle motivasyonumu daima yüksek tutan danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisiyle çalışmaktan aldığım ilham, akademik kariyerim için paha biçilemez bir temel oluşturmuştur.

Çalışmalarım sırasında teknik ve pratik desteğini esirgemeyen, laboratuvar süreçlerinde sabırla yol gösteren Uzman Araştırma Görevlisi Rumeysa MEŞE başta olmak üzere, Uzman Biyolog Hatice YILDIZ, Uzman Biyolog Sevgi TEKREÇ, Biyolog Mustafa YARARLI, Biyolog Besime CERİT ve Biyolog Gökçe BAYKÖSE'ye minnettarım. Deneyimlerini paylaşarak beni her koşulda cesaretlendirmeleri, bu sürecin verimli geçmesinde kritik rol oynamıştır.

Tezimin metodolojik çerçevesinin oluşturulmasında değerli katkılar sunan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Tahir HÜSUNET ve Doç. Dr. Erman Salih İSTİFLİ'ye, bilgi birikimlerini cömertçe aktardıkları için ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarımın yürütülmesinde kurumsal imkânları sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı ve Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne, maddi destekleriyle araştırmalarımı mümkün kılan Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi'ne şükranlarımı sunarım. Ayrıca, TÜBİTAK BİDEB 2210-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladıkları finansal destek için TÜBİTAK'a minnettarlığımı belirtmek isterim.

Son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu süreçte de sevgisi, sabrı ve inancıyla yanımda duran aileme; annem Hatice ÖZTÜRK, babam Erdal ÖZTÜRK ve kardeşlerime sonsuz teşekkür borçluyum. Onların desteği olmasaydı, bu başarıya ulaşmak mümkün olmazdı.

Bu tez, yalnızca benim değil, emeği geçen herkesin ortak bir ürünüdür. Tüm destekleriniz için bir kez daha teşekkürler.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Gıda katkı madde gruplarının E kodları.....	4
Çizelge 3.1. Triamonyum sitrat bileşiğinin analiz sonuçları.....	25
Çizelge 3.2.Moleküler Kenetlenme Simülasyonları İçin Tanımlanan Izgara Kutusu Parametreleri.....	59
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat (TS) bileşiğine 24 veya 48 saat süre boyunca maruz bırakılmış MCF-7 ve NIH3T hücre hatlarında ölçülen ortalama canlılık değerleri	63
Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat bileşiği ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, %Anormal Hücre KA/Hücre* ve Mitotik İndeks	70
Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat bileşiği ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Oranları.....	76
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda TS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Proliferasyon indeksi, Min-Max ve Hücre Başına Düşen Ortalama KKD sayısı.....	78
Çizelge 4.5. Triamonyum Sitrat'ın hasarlayıcı ve koruyucu etkisine dair densitometrik ölçümler .	82
Çizelge 4.6. Test maddesinin 5 farklı konsantrasyonu ile ortamda metabolik aktivatör bulunmadan muamele edilen Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarında gözlenen revertant koloni sayılarının ortalamaları*	84
Çizelge 4.7. Reseptör moleküllerin aktif bölgeleri ve ligandların moleküler kenetlenme analizi sonucu elde edilen enerji değişimleri (ΔG).....	86
Çizelge 4.8. Reseptör moleküller ve test maddesinin (TS) moleküler kenetlenme analizi sonucu kurulan bağ çeşidi ve mesafesi.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Triamonyum sitrat'ın açık formülü.....	26
Şekil 3.2 Triamonyum sitrat bileşiğinin fiziksel görüntüsü	26
Şekil 3.3. Colchicine'in açık formülü	31
Şekil 3.4. Cytochalasin-B'nin açık formülü.....	32
Şekil 3.5. 5' Bromo 2' deoxyuridine açık formülü	33
Şekil 3.6. Mytomycin-C'nin açık formülü.....	34
Şekil 3.7. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).....	42
Şekil 3.8. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in	43
kimyasal yapıları.....	43
Şekil 3.9. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak gösterilmesi	44
Şekil 3.10. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000).....	45
Şekil 3.11. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000).....	45
Şekil 3.12. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000)	46
Şekil 3.13. Bölünen hücrelerdeki metafaz plakları (x1000).....	47
Şekil 3.14. Bir nükleuslu hücre (x1000)	49
Şekil 3.15. İki nükleuslu hücre (x1000).....	50
Şekil 3.16. Üç nükleuslu hücre (x1000).....	50
Şekil 3.17. Dört nükleuslu hücre (x1000)	51
Şekil 3.18. Salmonella typhimurium TA98 suşunun kontrol görünümü.....	53
Şekil 3.19. Salmonella typhimurium TA100 suşunun kontrol görünümü.....	54
Şekil 3.20. DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.1. Endoreduplikasyon (ER) bulunan metafaz plağı (x1000).....	64
Şekil 4.2. (a) Sister Union (SU) ve (b) (c) kromozom kırıkları (B') bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 48 saatlik muamele ♂)	65
Şekil 4.3. Kromatid tipi (B'') kırıklar bulunan metafaz plağı (x1000) (2 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂).....	65
Şekil 4.4. (a) Disentrik kromozom (DS) ve (b) kromozom fragmenti (F') bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 24 saatlik muamele ♂)	66
Şekil 4.5. (a) Kromatid (B') kırığı ve (b) kromozom (B'') kırığı bulunan metafaz plağı.....	66
Şekil 4.6. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz (x1000) (100 µM MMC, 48 saat muamele ♀)	67
Şekil 4.7. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 48 saatlik muamele ♀)	67

Şekil 4.8. Endoreduplikasyon (ER) bulunan metafaz plağı (x1000).....	68
Şekil 4.9. (a) Kromatid tipi fragment (F') ve (b) kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saatlik muamele ♀).....	68
Şekil 4.10. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (x1000) (0,5 mg/ml TS, 48 saatlik muamele ♂).....	69
Şekil 4.11. Bir mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂) ..	72
Şekil 4.12. Bir mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♂) ..	72
Şekil 4.13. İki mikronükleuslu binükleer hücre (x1000) (0,5 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂)	73
Şekil 4.14. İki mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (2 mg/ml TS, 24 saat muamele ♀) ..	73
Şekil 4.15. İki mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♂) ..	74
Şekil 4.16. Beş mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 48 saat muamele ♀) ..	74
Şekil 4.17. 38 Kardeş Kromatid Değişimi bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 48 saatlik muamele ♂)	78
Şekil 4.18. Beş adet kardeş kromatid Değişimi bulunan metafaz (x1000) (2mg/ml TS, 48 saat muamele ♂).....	79
Şekil 4.19. 10 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♀).....	79
Şekil 4.20. Triamonyum sitrat bileşiğinin pozitif kontroller (H ₂ O ₂ , UV ve H ₂ O ₂) varlığında ve yokluğunda pBR322 plazmit DNA'sı üzerine hasarlayıcı/koruyucu etkisi.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

1A36	: DNA Topoizomeraz 1 için Protein Data Bank (PDB) veritabanında yer alan bir yapı kimliği
4-NPD	: 4-Nitro-o- phenylenediamine
6G2U	: Glutamat dehidrojenaz 2 (GLUD-2) PDB structure ID
6TNY	: DNA polimeraz delta PDB structure ID
8DNU	: Glutamin sentetaz (GLUL) PDB structure ID
ADI	: Kabul edilebilir günlük alım miktarı
Al	: Alüminyum
BPTES	: Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide
CAC	: Gıda kodeks komisyonu
CCFAC	: Gıda katkı ve kontaminantları komitesi
Cd	: Kadmiyum
CHO	: Çin hamsteri ovaryum hücreleri
Cu	: Bakır
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSB	: Çift zincirli DNA kırıkları
EDI	: Günlük tahmini alım miktarı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGCG	: Epigallocatechin gallate
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: U.S. Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	: Demir
G	: Gram
GHİ	: Genetik Hasar İndeksi
GRAS	: Güvenilir/zararsız kabul edilen listeler
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HB Agar	: Histidin-biyotin plakları
HBA	: Histidin-biyotin ampisilin plakları
HCl	: Hidroklorik asit
his+	: Histidine gereksinim duymayan suşlar
HMA	: High Melting Agar
HNO ₃	: Nitrik Asit

IC50	: Çalışma grubundaki canlıların %50'sinin fizyolojik faaliyetini inhibe eden konsantrasyon
INS	: Uluslararası numaralandırma sistemi
JECFA	: Birleşik (FAO/WHO) gıda katkıları uzman komitesi
KA	: Kromozom Aberasyonu
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KOMET	: Kuyruklu yıldız testi, Tek Hücre Jel Elektroforez testi
L	: Litre
LD ₅₀	: Çalışma grubundaki canlıların %50'sini öldüren doz konsantrasyonu
LMA	: Low Melting Agar
M	: Molar
m ³	: Metreküp
mg	: Miligram
MGA	: Minimal Glikoz Agar Plakları
MI	: Mitotik İndeks
ml	: Mililitre
Mm	: Milimolar
MMC	: Mytomycin-C
MN	: Mikronükleus
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NB	: Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı
NOAEL	: Hiçbir yan etkinin görülmediği konsantrasyon
°C	: Santigrat derece
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü
OH	: Hidroksil radikali
PBS	: Phosphate Buffer Saline
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
PK	: Pozitif Kontrol
ppm	: Milyonda bir konsantrasyon
RKSAO	: Revertant Koloni Sayısı Ortalaması
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
SA	: Sodyum Azid Çözeltisi

SH : Standart Hata
TS : Triamonyum sitrat
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
WTO : Dünya ticaret örgütü
 ΔG : Serbest bağlanma enerjisi
 μg : Mikrogram
 μl : Mikrolitre
 μM : Mikromolar



1.GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri, insanlığın varoluşundan bu yana besinleri işleme ve saklamada kullanılmaktadır. Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, besleyici değeri olan veya olmayan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir (TGKY, 2013).

İlkel zamanlardan bu yana insanlar, bitkisel ve hayvansal gıdaların bozulmadan daha uzun süre saklanması, lezzetinin artırılması ve daha kolay ulaşılabilir veya kullanılabilir hale getirilmesi için çeşitli işleme yöntemleri geliştirmişlerdir (Eroğlu ve Ayaz, 2018). Bu yöntemlerin uygulanması ile ilgili geçmişteki verilere bakıldığında ilk olarak MÖ 8000 yıllarında hayvanların evcilleştirilmesiyle beraber gıda güvenliğini sağlamak için doğal yolla gıda katkı maddelerin bulunması arayışı içine girilmiştir. Milattan önce 3000 yıllarında hayvancılıkta önde gelen uygarlıklarından olan Babiller ve Sümerliler tarafından sütlerin güvenliğini sağlamak amacıyla dar boğazlı kaplarda içerisinde saklanmıştır. Yine milattan önce (M.Ö.) 3000-900 tarihleri arasında hayvan etlerini bozulmadan güvenle muhafaza etmek için tuzlama, odun tütsüsü yardımıyla kurutulmuş ve peynir veya balmumu ile yüzeyi sıvanmıştır (Atman, 2004). Mısırlılar ürünlerin göze güzel görünmesi için milattan önce 1500’de gıda renklendiricileri olarak doğal bileşenleri kullanmışlardır. Bu amaçla kullanılan bazı bitki kısımları; zerdeçal, safran, çivit otu, mürver ağacı çiçeği, pancar kökü ve kadife çiçeği gibi doğal bileşenlerdir. Milattan önce 220’de Hunlar etin bozulmadan kalabilmesi için sucuk, pastırma ve kavurma gibi şekillerde saklanabileceğini keşfetmişlerdir. Yine aynı dönemlerde Kızılderililerin eti dondurma yöntemiyle muhafaza ettikleri bilinmektedir. Milattan önce 50’li yıllara gelindiğinde koruma için kullanılan birçok katkı ve işleme yönteminin lezzet verici olarak da kullanıldığı gözlemlenmiştir. Milattan sonra (MS) 772 yılına ait verilere bakıldığında ise; özellikle Dede Korkut Destanında Türklerin eti kavurarak, sütü kurutarak sakladıkları yazmaktadır (Boğa ve Binokay, 2010; Şimşek, 2010; Altuğ, 2009). 19. yüzyıldan bu yana ilerleyen kentleşme ve artan nüfusa paralel olarak gıdaya olan talep gitgide artmıştır. Artan ihtiyaç dolayısıyla gıda işleme teknolojileri ve gıda katkı maddelerinin kullanım sıklığı da pozitif bir korelasyon göstererek aynı ölçüde artmıştır (Atman, 2004).

1.1.Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddelerinin modern gıda üretiminin karmaşık zincirinde önemli bir rolü bulunmaktadır. Genel olarak gıdalar, sıcaklık dalgalanmaları, oksidasyon ve mikroplara maruz kalma gibi orijinal bileşimi değiştirebilecek birçok çevresel değişkene maruz kalmaktadır. Bu sebeple gıda katkı maddelerinin kullanımı gıda kalitesini ve özelliklerini korumak için artık zorunlu

bir durum haline gelmiştir. Gıdalarda bulunan katkı maddeleri gerek ambalajlarında gerekse doğrudan gıda ürünleri üzerinde, etiketleme yoluyla eksiksiz ve doğru bir şekilde belirtilmelidir. Ayrıca, gıda endüstrisinde kullanılan tüm katkı maddeleri, güncellemelerin zamanında yapılmasını ve sürekli bilgi yenilenmesini sağlayan sağlık otoriteleri tarafından oluşturulan ve düzenli olarak güncellenen bir 'pozitif liste' ye dahil edilmektedir (<https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers>).

Gıda katkı maddeleri birçok amaca hizmet etmektedir. Bu kullanım amaçlarına 3 ana grup altında sınıflandırılabilirler (Çalışır ve Çalışkan, 2003):

1. Bozulmayı önleyenler: Bu grup içerisinde bulunan gıda katkı maddeleri, gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaların üremesini engeller (Bağcı, 2006).

a) Antimikotikler (küflenmeyi önleyiciler): Mantarlar bulundukları gıdanın acılaşmasına, istenmeyen kokular oluşturmaya ve mikotoksin içermesine neden olmaktadır. Bu durumların gıdalarda meydana gelmemesi için antimikotikler kullanılmaktadır (Kalyoncu, 2008). Gıdalarda bu amaçla kullanılan örnek etkili ajanları da buraya ekleyelim (Sözgelimi; Sodyum benzoat, propiyonik asit gibi).

b) Mikrop antagonistleri (bakteri üremesini önleyiciler): Besinlerin bakteri metabolitleri sebebiyle bozulmasına karşı korumak, raf ömrünü uzatmak, doğal renk ve aromanın kaybedilmemesi amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. (Sözgelimi; Benzoik asit, sorbik asit, nitrat ve nitritler gibi)

c) Antioksidanlar (oksidlenmeyi önleyiciler): Gıdalarda istenilmeyen koku, aroma, tat değişikliklerini, enzimatik reaksiyonlardan dolayı meydana gelen kararmayı, oksidasyona bağlı renk kaybını, yağlı besinlerin tadındaki acılaşmayı önlemek veya geciktirmek amacıyla kullanılan katkı maddeleridir (Alfa tokoferol, bütüllendirilmiş hidroksianisol ve sodyum eritorbat gibi) (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

d) Antibrowning ajanlar (enzimatik esmerleşmeyi / kahverengileşmeyi önleyenler): Gıdalardaki mikrobiyal gelişime bağlı olarak zararlı enzimatik salınımlar gerçekleşebilmektedir. Bu salınının kontrolünün sağlanıp toksik etki gözlenmemesi amacıyla bu maddelerden faydalanılmaktadır. Doğal kaynaklı oldukları için tercih edilirler ve toksik değildirler (Sodyum metabisülfat, sodyum sülfat ve sodyum klorür gibi) (<http://www.zootechni.org.tr/ekran.asp?id=3&altid=79>).

2. Görünüm, lezzet, yapı ve kaliteyi geliştirenler: Bu grup içerisinde bulunan katkı maddeleri yeni gıdaların üretimi esnasında, üretim sonunda veya depolama sırasında meydana gelecek renk, koku ve tat gibi özelliklerindeki istenmeyen değişiklikleri önlemek amacıyla gıda sektöründe sıklıkla kullanımına başvuru maddelerdir.

a) Boyalar ve renklendiriciler: Tüketicideki beğeni algısını arttırmak için, doğal rengi kuvvetlendirmek, işlem sırasında renkte meydana gelen deformasyonları geri kazandırmak veya

renksiz olan bir ürünü renk katmak amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. (Tartrazin, karmoizin, brilliant blue ve eritrosin gibi)

b) Tat, koku vericiler ve artırıcılar: Tat ve kokuyu tüketicinin tercih etme isteğini arttıracak bir hal kazandırmak, doğal lezzeti arttırmak, işleme esnasında zarar gören veya tamamen kaybolan tat ve kokuyu kazandırmak amacıyla besinlere eklenen katkı maddeleridir. (Sodyum glutamat, disodyum inosinat, aspartam ve vanilin gibi)

c) Asit veya baz yapıcılar ve nötralize ediciler: pH'tan (besinlerin asitliğini veya bazlığını) dolayı besinlerde istenmeyen tat, koku veya görünüşü kontrol etmek, değiştirmek, istenilen düzeyi sağlamak amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. (Sitrik asit, askorbik asit, triamonyum sitrat ve tartarik asit gibi)

d) Yapı geliştiriciler, Emülsifiyer: Karışımı oluşturulması istenilen iki veya daha fazla sıvının iyi bir homojenite ve emülsiyon sağlamak, sıvının yüzey gerilimini azaltmak amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. (Jelatin, pektin, karragenan ve guar gum gibi)

3. Diğer Katkı Maddeleri: Bu grupta bulunan gıda katkı maddeleri gıdanın tüketicinin bu ürünün daha cezbedici görünmesi ve değişik bozulmaları önlemek için kullanılırlar (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

a) Diğer additifler (katkılar)

b) Solventler (Çözücüler)

c) Filtre ediciler (Karatepe ve Ekerbiçer, 2018)

1.2. Gıda katkı maddelerinde E kodları

Avrupa Birliği 1979 yılında gıdalara eklenen katkı maddelerinin toksikolojik testler sonucunda uygun dozlarda kullanılmasına izin verdiği E harfi ile başlayan bir numaralandırma sistemi geliştirmiştir. Gıda katkı maddelerini tanımlamak ve düzenlemek için E (Europe) harfi ile başlayan ardından üç veya dört numaradan oluşan kodlar ile katkı maddeleri belirtilmektedir (Yörük ve Danyer, 2016). Bu kodlama gıdada bulunan katkı maddesinin kimyasal isminin yerine kullanılmak için özelleştirilmiştir. Ancak bu katkı maddeleri hem E koduyla hem de ismiyle beraber halde, tek başına ismiyle veya tek başına E koduyla da yazılabilmektedir. Dünya üzerinde yüzlerce gıda katkı maddesi bulunuyorken Avrupa Birliği bunlardan sadece 350-400 tanesine onay vermiştir (Ünlü ve Bayır, 2022; Atman,2004). Bu onay verilen maddelerin kullanımları Avrupa ülkeleri arasında sosyolojik ve ekolojik durumlara göre değişiklik göstermektedir (Şimşek, 2010).

Çizelge 1.1. Gıda katkı madde gruplarının E kodları

GIDA KATKI MADDELERİ	E KODLARI
Renklendiriciler	E100-199
Koruyucular	E200-299
Antioksidanlar ve asitlik düzenleyiciler	E300-399
Kıvam arttırıcılar, stabilizatörler ve emülgatörler	E400-E499
pH düzenleyiciler ve topaklanmayı önleyiciler	E500-599
Tat arttırıcılar	E600-699
Antibiyotikler	E700-799
Tatlandırıcılar, yüzey kaplama maddeleri ve gazlar	E900-E999
Ek katkı maddeleri	E1000-1999

1.3. Gıda güvenliği ile ilgili kuruluşlar

Günümüz dünyasında çok fazla sayıda kuruluş insan sağlığını zarar gelmemesi ve onu zararlı etkilerden korumak için çeşitli araştırmalar yapmaktadır (Boğa ve Binokay, 2010). Gıdaların güvenliği hakkında uluslararası düzeyde kabul edilen kuruluşlardan birkaçı şunlardır:

Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission, CAC)

Gıda Kodeks Komisyonunun kurulması, Dünya Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 1961 yılındaki on birinci toplantısı ile Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1963 yılındaki on altıncı toplantısında kararlaştırılmıştır (Ravi, 2008). Komisyon, gıda kodekslerini Dünya Ticaret Örgütü (WTO) kuralları altında tarım ve gıda ürünlerinin uluslararası ticarete küresel güvenlik standartlarını sağlamak ve tüketici sağlığını korumak amacıyla belirlemektedir (Millstone and Zwanenberg, 2002).

Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi (CCFAC)

Gıdalara eklenecek katkı maddelerinin kullanımı konusunda kısıtlamalar getirir ve bu gıda katkı maddelerinin gıdalara eklenebilecek maksimum güvenli dozlarının düzeylerini belirler (Walton ve ark.,1999).

Birleşik (FAO/WHO) Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA)

Gıdalarda halihazırda kullanılan katkı maddelerinin insanların sağlığı için toksikolojik açıdan tehlike oluşturabilme potansiyeli olanlar hakkında çalışmalar yaparak kategoriler ve yapılan analizlerle ilgili metotları belirlerler (Luetzow, 2003; Walton ve ark.,1999; Sezgin ve Ayyıldız, 2017). Yapılan çalışmaların sonuçları Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) analiz raporlarıyla duyurulur ve Uluslararası Numaralandırma Sistemi (INS) ile tayin edilir. Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA) gıda katkılarıyla ilgili toksikolojik testlerin değerlendirilmesi sonucunda A, B, C listelerini oluşturur (Boğa ve Binokay,2010; Walton ve ark.,

1999; Topçu ve ark., 2005). Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) kurumu tarafından da gıda katkı maddeleri ile ilgili genel olarak güvenilir zararsız kabul edilen (GRAS) listeler oluşturulur. Kabul edilebilir günlük alım miktar (Acceptable Daily Intake=ADI) değeri, ileri derecede yapılan toksikolojik araştırmalar sonucunda bir katkı maddesinin günlük olarak alınmasında zarar bulunmayan dozu ifade eder. Bu ADI seviyesi değişken bir değerdir. Yapılan yeni test ve değerlendirmeler sonucunda elde edilen verilere bağlı olarak ADI değerinde değişiklikler yapılabilmektedir. JECFA'nın görevleri aşağıda belirtilen şekilde listelenebilmektedir (Sezgin ve Ayyıldız, 2017; Arslan, 2011; Pifferi ve Restani, 2003):

- Gıda katkı maddelerinin toksikolojik profillerinin değerlendirilmesi için yöntemleri tayin eder.
- Gıda katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmelerinin yürütülmesiyle ilgili sıkı bir takipte bulunur ve sonuçların değerlendirilmesi neticesinde katkı maddelerinin alınabilecek güvenilir dozları (ADI) belirler.
- Kullanılmaya başlayan veya kullanılacak olan her katkı maddesinin ayrıntılı tanımlamalarının yapılmasını, saflık kriterlerinin ve analiz metotlarının ortaya çıkarılmasını sağlar.
- Dünya çapında yapılan tarama verileri ile farklı toplumlarda günlük ve yıllık gıda katkı maddelerinin tüketim miktarlarını belirler ve bu veriler ışığında değerlendirme yapar (Gül ve ark., 2023).

JECFA A GRUBU

Bu grup içerisinde yer alan gıda katkı maddeleri halihazırda kullanılmaktadır. (Arslan, 2011).

- Bütün toksikolojik incelemeleri yapılarak günlük güvenli alım seviyeleri (ADI) belirlenmiş ve kullanımı yasal olanlar,
- İncelemeleri henüz bitmemiş fakat günlük güvenilir alım miktarları tespit edilerek geçici bir süre kullanımı yasal olanlar bu kategoridedir (Boğa ve Binokay,2010).

JECFA B GRUBU

Bu kategorideki gıda katkı maddelerinin incelemeleri henüz bitmemiştir (Çalışkan, 2021).

- Değerlendirmeleri başlamış fakat günlük güvenilir alım miktarları hakkında net bir sonuca varılamayan, incelemeleri devam eden katkı maddeleridir,
- Değerlendirmeleri henüz başlamamış fakat sırada olan katkı maddeleri bu kategoride yer almaktadır (Boğa ve Binokay,2010).

JECFA C GRUBU

Bu gruptaki katkı maddeleri yapılan toksikolojik değerlendirmeler sonucunda insan sağlığı açısından risk barındırdıklarından dolayı kullanımı yasalar tarafından engellenen veya kısıtlı

şartlarda ve düşük dozlarda kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddeleri de bu kategoride bulunmaktadır (Boğa ve Binokay,2010; Çalışkan, 2021).

GIDA KATKI MADDELERİ KONUSUNDA TÜRKİYE'DEKİ UYGULAMALAR

Toplumun sağlığı açısından gıda katkı maddelerinin kullanımını düzenleyen yasa, yönetmelik ve kodekslerin kabul edilmesi son derece önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ilgili komiteleri tarafından oluşturulan raporlar ve kabul edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak, her ülkenin sağlık otoriteleri katkı maddelerinin katılacağı gıdaları ve katılma miktarını kendi ülkelerinin uygunluk durumlarına göre belirlerler. Diğer tüm ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de gıda ile alakalı hizmetler devletin kontrolü altındadır. Ancak yetkiler tek bir kısımda toplanmamıştır. Türkiye'de gıda kontrolünden sorumlu kurumlar bünyesinde 26 yasa, 6 tüzük, 10 yönetmelik, 6 genelge, çeşitli tebliğ ve standartlar mevcuttur. Bu durum bir mevzuat karmaşası ve yetki sorunu ortaya çıkarmaktadır (Çalışır ve Çalışkan,2003).

1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Miktarlarının Belirlenmesi

Paracelsus (1493-1541) “Tüm maddeler zehirdir, zehir olmayan madde yoktur. Alınan doz, bir maddenin zehirlilik ve faydalılık durumunu tayin eder. Zehir ile ilacı ayıran dozdur” demiştir (Boğa Pekmezemek, 2004).

Gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerine muhtemel oluşturabileceği toksik etkileri gözlemek için birçok disiplinin yer aldığı çok uzun süreli, geniş çaplı, detaylı ve maliyeti yüksek test yöntemleri ile araştırılmaktadır. Araştırmalarda uygulanan prosedür;

- ✓ Deney hayvanlarına, belirli bir katkı maddesinin öldürücü etkisini belirlemek amacıyla yüksek konsantrasyonlarda (dozlarda) verilir. Deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne yol açan yüksek doz, "letal doz" (LD50) olarak adlandırılır. Bu değer bir popülasyondaki bireylerin yarısının hayatını kaybetmesine yol açan toksik etkiyi belirlemek için kullanılır.
- ✓ Doz kademeli şekilde azaltılarak doz-cevap etkileşimi incelenir. Maruz bırakılan her dozda; katkı maddesinin emilimi, metabolizması ve vücuttan atımı incelenir.
- ✓ Deney hayvanlarının hücre, doku ve organları incelenerek, karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve alerjik etkileri araştırılır.
- ✓ Katkı maddesinin zararlı etkisinin olmadığı bir doz miktarı bulunamazsa, o katkı maddesinin gıdalarda kullanılmasına izin verilmez.
- ✓ NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, Hiçbir yan etkinin görülmediği konsantrasyon) belirlenir. Bulunan NOAEL dozu ile deney hayvanlarının yaşam süresinin %85'ini kapsayacak sürede vücutlarının çeşitli organlarında karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve alerjik etkilenebilmesinin olmadığı günlük doz miktarları, hayvanın kilogram olarak ağırlığı başına miligram olarak tespit edilir. Yapılan

deneyler, insanlar üzerinde hem etik nedenlerden hem de toksikolojinin belirlenmesindeki külfetten dolayı yapılamayacağından, güvenlik değerlendirmeleri deney hayvanları üzerinde yapılmaktadır. Deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100'ü insan için kabul edilir. $ADI = NOAEL / 100$. Burada ADI değeri insanın vücut ağırlığının kilogramı başına miligram olarak belirlenir. Günlük maksimum alım $= ADI \times Vücut\ ağırlığı$ şeklinde saptanır.

- ✓ Besine eklenecek katkı maddesinin en yüksek miktarını belirlemenin ikinci aşaması, üretim teknolojisinin gerektirdiği miktarın (GMP = Uygun Üretim Teknolojisi) ADI sınırları içinde belirlenmesidir. Eğer GMP miktarı ile ADI değeri aşıyorsa katkı maddesinin kullanılmasına izin verilmez (Boğa ve Binokay,2010; Yörük ve Danyer, 2016)

Türkiye’de gıda katkı maddelerinin eklenecek miktarları belirlenirken aşağıda belirtilen ilgili mevzuatta maddeleri çerçevesinde hareket edilir:

1. Bir gıda katkı maddesinin kullanım miktarı, gözlenmesi istenilen etkiyi yerine getirebilmek için gerekli olan en düşük miktar olarak belirlenir.
2. Bir gıda katkı maddesinin kullanım miktarı belirlenirken;
 - Gıda katkı maddesi için küresel ölçekte ve toplumumuza uygun oluşturulmuş kabul edilebilir günlük alım miktarları veya buna eşdeğer bir değerlendirme ve bu katkı maddesinin bütün kaynaklardan alınacak muhtemel günlük alım miktarları (Günlük tahmini alım miktarı= EDI, Estimated Daily Intake),
 - Gıda katkı maddesi, özel olarak talep eden tüketici gruplarının tükettiği gıdalarda kullanıldığında, bu grupların günlük tüketmesi muhtemel miktarlar göz önünde bulundurulur.
 - Değerlendirmeler ile birlikte uygun görüldüğü takdirde, gıda katkı maddesi için maksimum sayısal değer sınırlaması getirilmez. Bu durumda, gıda katkı maddesi sayısal olarak bir maksimum değerinin belirlenmediği (Quantum Satis, “gerektiği kadar” veya “yeterli miktarda”) prensibine göre kullanılır.
 - Herhangi bir değişiklik belirtilmediği sürece, mevzuatta yer alan gıda katkı maddelerinin maksimum miktarları, gıdaların piyasaya sürüldüğü haline uygulanır. Fakat sulandırma işlemi gerektiren toz, kurutulmuş veya konsantre edilmiş gıdalar için maksimum miktarlar, gıda etiketinde belirtilen kullanım miktarına göre hazırlanmış gıdaya seyreltme faktörü en düşük tutulacak şekilde hesaplanarak uygulanır (TGKY, 2013).

1.5. Asitliği düzenleyiciler

Gıda katkı maddelerinin bu grubu her ne kadar ‘‘asit’’, ‘‘baz’’, ‘‘tampon’’ ve ‘‘pH ajanı’’ olarak ifade edilseler de en yaygın olarak kullanılan ve uygun olan terim asitlik düzenleyicilerdir.

Gıdaların asitliğini veya alkali özelliğini değiştiren veya kontrol eden pH düzenleyicileri olarak görev alırlar. Öncül olarak her ne kadar gıda ortamının asitliğini düzenlemek olsa da pH aracılığıyla tat konusunda istenilen niteliğe ulaşmak için kullanılmaktadır. Asitlik düzenleyicilerin bulunması gereken, ancak eklenmediği gıdalarda yavanlık veya aşırı tatlılık gibi çeşitli dengesizlikler ortaya çıkmaktadır. Bir gıdanın lezzetini belirleyen en önemli etmenlerden birisi de şeker/asit oranıdır. Bu oran gıdalar arasında değişkenlik göstermektedir (Gardner, 1966). Asitlik düzenleyicilerinin bu görevinin yanında başka kullanım alanları da mevcuttur. Ekstra kullanım alanlarından biri sterilizasyona yardım etmektir. Birçok gıda patojenik bakteri veya diğer mikroorganizmalar ile kontamine olmaktadır. Bu kontaminasyondan dolayı meydana gelecek olumsuz etkiyi önlemek amacıyla özellikle konserve gıdalar yüksek derecede ısıya maruz bırakılmaktadır. Ancak ısıya dirençli spor oluşturan patojenik mikroorganizmalar düşük pH'lı ortamda ısıya duyarlılıkları arttığı için asitlik düzenleyiciler yardımı ile ortamın pH'ı düşürülerek daha güvenli bir sterilizasyon sağlanır. Bahsedilen indirekt etkinin dışında mikroorganizmaların üremesi ortamın pH seviyesine de bağlıdır. Asitliği düzenleyici maddeler ile gıda maddesinin bulunduğu ortamın pH'ı ayarlanır. Bu sayede ortamın pH'ı mikroorganizmaların büyüme gelişmesi için uygun olmayan değerlerde tutularak engellenmektedir (Altuğ, 2009).

Asitliği düzenleyen katkı maddelerinin bir diğer önemli işlevi de şelatlama (bağlanma) özelliğidir. Bu katkı maddelerinden bazıları demir (Fe) ve bakır (Cu) başta olmak üzere bu gibi iyonları şelatlama yeteneğine sahiptir. Başta bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi iyonlar, yağlarda acılaşmaya, meyvelerde esmerleşmeye gibi gıdada tüketicinin istemeyeceği özellikler ortaya çıkarabilmektedir. Bu katkı maddeleri ise yukarıda bahsedilen istenilmeyen özelliklerin ortaya çıkmasına neden olan iyonlar ile bağlanarak (şelatlama) bu etkinin ortadan kalkması sağlanmaktadır.

Organik ve inorganik asitler doğada bulunan sistemler içerisinde halihazırda yaygın olarak bulunmaktadır. Asitlik düzenleyicilerin ana görevi ortamın pH'ını dengelemek olsa da bunun dışında nadiren de olsa bazı fonksiyonları mevcuttur. Bunlardan bazıları şunlardır;

Peynir yapımında kullanılan rennet ile beraber ortama sitrik asit veya hidroklorik asit gibi asitlik düzenleyiciler soğuk süte (4-8°C) eklenip süütün ısıtılmasıyla (35°C) birlikte düzgün bir jel yapısının oluşumundan sorumludur.

Yumuşak şekerleme üretiminde elde edilen gıdanın tekstürünün kristalleşerek bozulmasının önüne geçilmesine ihtiyaç vardır. Potasyum tartarat gibi asitlik düzenleyiciler üretim esnasında ortama eklenerek Sakkaroz'un inversiyonu ile fruktoz ve glikoz (invert şeker) miktarını arttırarak kristalleşmenin olabildiğince önüne geçilmesi sağlanır.

Antioksidan maddelere benzer olarak asitlik düzenleyicilerden bazıları da hızlı oksitlenmeden dolayı gıdaların oksitlenmesi yerine kendileri okside olarak gıdaların enzimatik olan veya enzimatik olmayan esmerleşmesinin önüne geçmektedir.

Asitliği düzenleyici maddelerin bir diğer fonksiyonu ise ortamdaki uçucu bileşiklerin buharlaşma hızını kontrol ederek eklendiği gıdaların rengine, tadına ve aromasının kontrol edilmesini sağlamaktadır. Sodyum hidroksit (NaOH) gibi asitliği düzenleyiciler zeytinin acılığını ortadan kaldırıp, rengine koyulaşmasını sağlayarak renk ve lezzetini olumlu yönde etkilemektedir. Genel olarak gıda asitlik düzenleyiciler, ana görevleri dışında gıda işlenmesi sırasında ortama ilave edilerek gıdada istenilen düzeyde özelliklerin elde edilmesinde yardımcı moleküller olarak görev yapmaktadırlar (Altuğ, 2009).

İnsanlar gün içerisinde direkt veya dolaylı olarak binlerce çeşit kimyasala maruz kalmaktadır. Hatta maruz kalınan bu kimyasalların sayısı da ihtiyaç dahilinde zamanla artmaktadır. Çevresel kirleticiler, hastalıkların tedavisi veya takviye amacıyla kullanılan ilaçlar, temizlik ürünleri, gıdalarda doğal olarak bulunan biyoaktif bileşenler ve gıda katkı maddeleri buna örnek olarak verilebilir. Her biri fayda esasına dayalı üretilmiş ürünlerin ya gözle görülecek şekilde yan etkileri veya gözle görülmeyen yan etkileri olabilir. Bunların güvenlik testleri yapılarak ticari alana sürülmesi veya kullanımının denetlenmesi gerekmektedir. Güvenlik testleri arasından bugünlerimizi ve yarınlarımızı ilgilendiren en önemli prosedürlerden birisi de akut genotoksisite testleridir.

Yukarıda bahsedilen güvenlik endişelerinden dolayı bu çalışmanın test maddesi olarak bir gıda asitlik düzenleyicisi olan Triamonyum sitrat (amonyum sitrat tribazik) bileşiği kullanılmıştır. Bu ajanın genotoksik potansiyelini belirlemek için kültüre edilmiş insan periferik lenfositleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

Kimyasal maddelerin hücrenin genomunda bulunan bilgiye direkt veya dolaylı yollar ile zarar verebilme potansiyeline genotoksisite denir. Genotoksik maddeler, DNA dizisi veya yapısı ile etkileşime girerek genomun zarar görmesine neden olur. Kanseri ile bağlantısı olan genlerde meydana gelen etkileşimler sonucu ortaya çıkan mutasyonlar karsinogeneze yol açabilir (Alenius ve ark., 2014). Genotoksik maddeler mutajenlerle karıştırılırlar; tüm mutasyona neden olan maddeler genotoksikken, genotoksik maddelerin hepsi mutasyona neden olmamaktadır (Seukep ve ark., 2014). Meydana gelen bu kalıtsal değişiklikler, somatik hücrelerde veya üreme hücrelerinde gerçekleşip kalıcı olabilmektedir. Genomun zarar görmesi direkt veya indirekt olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Direkt etki, bazılar ile doğrudan bir etkileşim kurup buradaki stabilizasyonu bozarak iplik kopmaları gibi zararlar görmesini sağlayabilir. İndirekt etki, hedefi doğrudan genetik materyal olmayıp hücre döngüsünde görev alan yapı ve moleküllerin (mikrotübüller, kinetokorlar, sentrioller, topoizomera, endonukleazlar gibi genlerin ifadeleri) zarar görmesini sağlayan kimyasalların etkisi sonucu gözlenen durumlardır (Jenkins ve ark., 2005). Bu etkiye maruz kalmış hücrelerde DNA onarımı veya apoptoz yoluyla hata meydana gelmiş genlerin ekspresyonu önlenir, ancak her zaman zararlı etkiden kurtulamayıp mutajenezle sonuçlanabilir. Kuşku bir maddenin, genetik materyale olan etkilerini incelemek için genotoksisite testleri geliştirilmiştir. Bakteri, maya, bitki ve hayvan hücrelerine uygulanabilmektedir (Anonim 4).

Yukarıda bahsedilen bilgiler doğrultusunda zararlı etkiye sahip moleküllerin genotoksik etkilerinin saptanması göz ardı edilemeyecek derecede önemlidir. Kanser önleme çalışmaları, çevresel faktörlerin ve endüstriyel kimyasalların etkilerinin incelenmesi, ayrıca ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerinin ve güvenilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla genotoksisite testleri kullanılmaktadır. Bu testler ilk defa 1960'ların sonlarında ortaya çıkmıştır ve o zamandan günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Work-group of European Union (EU), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) ve Work- group of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) bilim camiasının büyük bir çoğunluğunun kabul ettiği bir dizi test yöntemini tanımladılar (Kramer ve Pharm Pharmacol, 1998; Rama ve ark., 2002; Bedir ve ark., 2004). Standart *in vitro* testleri, kardeş kromatid değişimi (KKD)(Tucker ve ark.,1993), kromozom aberasyonu (KA) (Carrano ve Natarajan,1988; Hagmar ve ark.,1994; Anderson, 1988), mikronükleus (MN) (Fenech,2002; Heddle ve ark.,1991) ve tek hücreli jel elektroforez (Komet) (Singh ve ark.,1988) testleridir. Perry ve Evans (1975)'ın bilinen mutajen ve kanserojenlerin Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*=Çin kemiricisi) yumurtalık (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından sonra bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. (Perry ve Evans,1975) Salmonella bakteriyel geri mutasyon testi (Ames testi), nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonlarının sıklığının saptanmasında kullanılan basit, bilimsel olarak tutarlı ve kabul edilebilir kısa süreli mutajenite test sistemlerinden birisidir. Test ilk olarak 1971 yılında Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiştir (Ames ve ark.,1973; Maron ve Ames, 1983; Zeiger,2004).

Mikronükleus testi (MN) genotoksik ajanların belirlenmesinde başvuru başarılı ve güvenilirliği yüksek son nokta testlerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Klastojenlerin ve anöjenlerin belirlenmesinde kullanılmaya elverişli bir yöntemdir(Fenech,2002; Heddle ve ark.,1991). İlk olarak 1950'li yıllarda bitki hücrelerinde, 1970'li yıllarda ise hayvan hücrelerindeki kromozom hasarlarının değerlendirilmesinde ve 1976'da ise Heddle ve arkadaşlarının ilk kez kültüre alınmış periferik kan lenfositlerindeki kimyasal kanserojen maddelerin hasar düzeylerinin belirlenmesine yönelik olarak MN'nin kullanılması öne sürülmüştür (Bonassi ve ark.,2001; Countryman ve Heddle,1976). Sonraki yıllarda Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilen sitokinezi engellenmiş MN testi ile spesifik olarak bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdeki MN'ler incelenmesine olanak tanımış ve bu sayede MN skorlamasına olan güvenilirlik artmıştır.(Fenech ve Morley,1985) Mikronükleuslar (MN), hücre bölünmesi sırasında anafaz evresinde ana çekirdek kütesine dahil olamayan genetik materyalden oluşan küçük, ektranükleer yapılardır. Bu genetik materyal, kırık kromozom veya kromatid parçalarından (asentrik fragmentler) veya hücre döngüsünün düzensiz ilerlemesi sonucu anafazda geri kalan (kalgın) ve ayıramayan tüm kromozomlardan oluşabilir. Sonuç olarak, bu genetik materyal, telofaz evresinde yeni oluşan ana çekirdeklerin dışında yer alan ve kendi nükleer zarlarıyla çevrili ikincil bir

çekirdekçik olarak mikronükleusları oluşturur (Kirsch-Volders ve ark.,2011; Surrallés ve ark.,1995). Mikronükleus oluşumuna ikiden daha fazla kutuplu (multipolar) anafaz ve telofaz da neden olabilmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). Mikronükleus hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybı için uygun ve güvenilir bir belirteç görevi görür (Fenech,2000). MN oluşumunun sebeplerinden olan kromozomların ayrılmaması (non-disjunction) ya da kromozom kaybı, yaşlanma ve kanser ile artış gösteren önemli karyotipik bozukluklardan birisidir. Bu durumun olası sebebi ise sentromer ve iğ ipliklerinin yapılarının bozulması veya metafaz evresinden önce kromozom yapılarının erken yoğunlaşması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu prematür kondensasyon, kromozomların metafaz plağında düzgün bir şekilde hizalanmasını ve sonrasında anafazda ayrılmasını engelleyebilir, böylece mikronükleus oluşumuna yol açabilir (Dellarco ve ark.,1985; Kirsch-Volders ve ark.,1997; Norppa ve Falck,2003).

Kromozom anormalliği testi, mutajenler ve genotoksik ajanlar tarafından tetiklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. Bu anormallikler mutajenik aktivitenin güvenilir indikatörleri olarak kabul edilmiştir (Mohandas ve Grant,1972). Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozom ve kromatid kırıkları DNA'daki onarılmayan çift zincir kırıkları sonucu oluşurken, bu oluşan DNA kırıklıklarının yanlış onarılmasıyla da yeni yapıya sahip kromozomlar oluşmaktadır. DNA'da meydana gelen bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek kromozom anormalliği frekansı ise, kanser riskinin arttığını göstermektedir (Badr,1983; Norppa ve ark.,2006; Savage,1993; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Yüksek kromozomal anormallik frekansı (kromozom boşlukları hariç), etiyolojiden bağımsız olarak artan kanser riski ile ilişkilidir ve bu ilişki çok sayıda epidemiyolojik çalışmada gösterilmiştir (Bonassi ve ark.,2000; Norppa,2004; Norppa ve ark.,2006; Hagmar ve ark., 1998). Düşük kromozomal anormallik frekansına sahip bireylere kıyasla, yüksek frekans gösteren bireylerde, özellikle Bonassi ve arkadaşları (2000) ve Fenech (2002) tarafından yapılan çalışmalarda vurgulandığı gibi, %130 ile %160 oranında artmış bir kanser insidansı gözlemlenmiştir (Bonassi ve ark.,2000; Fenech,2002). Bu bulgu, kromozomal instabilitenin karsinogeneze önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda hem kromozom tipi hem de kromatid tipi anormalliklerin karsinogeneze sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak bazı veriler kansere, kromozom tipi anormalliklerin kromatid tipi anormalliklere göre daha etkili bir belirteç olabileceğini göstermektedir (Norppa ve ark.,2006).

Genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan etkili yöntemlerden birisi de kardeş kromatid değişimi (KKD) testidir. KKD, DNA replikasyonu sırasında homolog kromozomlarda meydana gelen çift zincirli DNA kırıklarının (DSB'ler) onarımı sırasında gerçekleşir. Bu süreçte, kardeş kromatidler arasında simetrik bir şekilde genetik materyalin değişimi olur ve bu değişim, homolog rekombinasyon mekanizmasıyla kırıkların onarımı sırasında gerçekleşir (Sonoda ve ark.,1999). KKD testinin sitogenetik incelemelerde mutajenlerin ve kanserojenlerin belirlenmesinde hızlı ve

güvenilir bir yöntem olduğu bazı çalışmalarca rapor edilmiştir (Helleday,2003; Perry ve Wolff,1974; Wilson ve Thompson,2007). Sitojenik hasara yatkınlık gösterdiği bilinen hem endojen hem de eksojen faktörlerin varlığında kardeş kromatid değişimlerinin (KKD) sıklığında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Bilhassa, bilinen mutajenlere ve kanserojenlere maruziyet, KKD oluşumunda artışa neden olmuştur. Dahası, artmış kromozom kırılabilirliği ve instabilitesi ile karakterize edilen çok sayıda kalıtsal sendrom, KKD sıklığında yükselmiş bir yatkınlık sergilemektedir (Albertini ve ark.,2000; Perry ve Evans,1975). Artan KKD sıklığıyla ile tek gen mutasyonu arasında aynı yönde bir artış eğilimi olduğu da saptanmıştır (Carrano ve ark.,1978). Yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda yine artan KKD sıklığıyla tümör oluşumu arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir (Cheng ve ark., 1981). KKD testi sayesinde, DNA'ya yapışarak (DNA eklentisi oluşturarak) veya DNA'nın kendini kopyalamasını (replikasyon) engelleyerek genetik materyale zarar veren maddeler tespit edilebilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). (Ancak KKD testi genotoksik ajanları belirlemede çalışma prensibinden dolayı doğrudan DNA'da meydana gelen hasarların aksine replikasyon esnasındaki mekanizmaların incelenmesinde başvurulur. Bu sebepten ötürü KKD testi bir genotoksisite belirleme aracı olmayıp indikatör test olarak kullanılmaktadır (Norppa ve ark.,2006).

Ames Salmonella/mikrozom mutajenite testi (Salmonella testi; Ames testi), nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonunu kapsayan gen mutasyonlarına yol açan genetik hasar üretebilecek birçok genotoksik ajanın belirlenebilmesi için özel olarak tasarlanmış kısa süreli bir bakteriyel mutasyon testidir (Mortelmans ve Zeiger,2000). Ames testinin prosedürü 1970'lerde Dr. Bruce AMES ve Berkeley Üniversitesindeki bir araştırma grubu tarafından ortaya çıkarılmıştır (Ames ve ark.,1975). Bu test etkisi değerlendirmek istenilen bileşiğin veya karışımın mutasyon meydana getirme derecesini belirlemede hızlı, düşük maliyetli ve hassas bir şekilde ölçmek için tasarlanmıştır. Bahsedilen değerleri ve yapılan çalışmalarla test yönteminin geçerliliği sayesinde genotoksik etkisinin değerlendirilmesi istenilen kimyasalların incelenmesi için laboratuvarların vazgeçilmez bir ön tarama testi haline gelmiştir (Ames ve ark.,1975). Bu yöntemde kullanılan bakteriler doğal şartlarda atasal formları olan LT2 suşlarındaki histidin sentezleyebilme özelliği suni yollar ile kaybettirilmiş *Salmonella typhimurium* suşlarıdır. Bunlardan bazıları çerçeve kayması (TA1538, TA1537, TA104, TA98), bazılarıysa baz çifti değişimi mutasyonuna (TA1535, TA102, TA100) hassas *Salmonella typhimurium* mutant suşlarıdır (Zeiger ve Mortelmans,1999). Bu bakteriler, mutasyonları saptamak için tasarlanmış ya çerçeve kayması mutasyonu ya da nokta mutasyonuna sahip histidin (-) dışa bağımlı (oksotrofik) suşlardır. Mutajenler sayesinde meydana gelen bu histidin sentezleyeceği gen bölgesinde mutasyona uğramasıyla temel bir aminoasit olan histidini sentezleme işlevselliğini geri kazanmaktadır. Bu suşlar ek olarak hücre geçirgenliğini arttırmak için hücre duvarını oluşturacak olan lipopolisakkarit yapısında ve de test yöntemini daha etkili ve hassas bir hale getirmek için eksizyon onarım sisteminde de mutasyona sahip genler taşımaktadırlar (Ames ve ark.,1973; McCann ve ark.,1975). Geri dönüşümü geçiren bakterilere

Revertant denirken bu test yöntemi de genel olarak ‘Geri Mutasyon Test Sistemi’ olarak adlandırılmaktadır. Ames testinde kullanılan Salmonella suşları, histidin gen operonundaki çeşitli genlerde farklı özellikler katması için mutasyonlara sahiptir. Bu mutasyonların her biri farklı mekanizmalarla etki eden mutajenlere hassasiyet gösterecek şekilde tasarlanmıştır. Çok çeşitli maddelere karşı daha hassas olmalarını ve bu test yönteminin optimizasyonunu sağlamak için bu suşlara ek mutantlar da geliştirilmiştir (Ames ve ark.,1975).

Bu mutant bölgeler farklı mekanizmalar yoluyla DNA hasarına neden olan mutajenler için belirteç noktalar görevi görür. Ames test suşları, eser miktarda histidin bulunan minimal bir ortam agar plağı üzerinde çoğaltıldığında ortamdaki histidinin yetersizliğinden dolayı sadece histidin operonunda geri mutasyon geçirerek histidine gereksinim duymayan suşlar (his+) koloni oluşturabilmektedir. Plaka başına herhangi bir mutajen etkisi olmaksızın indüklenen revertant kolonilerin sayısı genellikle sabittir. Buna ek olarak plakaya bir mutajen eklendiğinde, petri başına gözlenen revertant kolonilerin sayısı, genellikle ortama eklenen doza bağlı olarak artmaktadır (Ames ve ark.,1975).

DNA hasarlayıcı veya koruyucu aktivite için Russo ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek uygulanmaktadır (Russo ve ark.,2000). Metabolizma sonucu ortaya çıkan olumsuz etkisi en yüksek radikallerden ikisi; hidroksil (OH•) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) radikalidir. Bu moleküllerin reaktif özellikleri nedeniyle DNA'nın yapısında geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir (Gutteridge, 1984). Ortamda H₂O₂ bulunduğunda ve/veya UV ile ışınlaması durumunda, plazmid DNA'nın süper sarmal (heliks) yapısının yarılmasına, dairesel formdaki DNA'nın açılmasına ve lineer formdaki DNA'nın ise her iki zincirinde de bir veya birden fazla parçalanmaya sebep olmaktadır (Tepe ve ark.,2011). DNA zincirinde meydana gelen bu parçalanmaların bir sonucu olarak genetik kusurlar gelişebilmektedir. Geri dönüşümsüz DNA hasarı karsinogenez, yaşlanma ve diğer dejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilebilir. (Russo ve ark.,2000; Feig ve ark., 1994) Bu çalışmada kullanılan test maddesinin, DNA hasarlayıcı veya hasara karşı koruyucu etkisini belirlemek amacıyla pBR322 plazmid DNA'sı kullanılacaktır. Bu plazmid hem test maddesinin doğrudan etkilerini hem de zararlı etmenler (H₂O₂ ve UV) tarafından neden olunan DNA hasarına karşı koruma aktivitesini değerlendirmek için oksidatif ajanlar ve ışınlama sonrası analiz edilmiştir.

Son olarak kimyasalların hücre canlılığına olan etkilerinin kolorimetrik olarak değerlendirildiği güvenilir yöntemlerden biri olan CCK-8 (WST-8) testi uygulanmıştır. Ortama eklenen tetrazolyum tuzlarının canlı hücrelerdeki dehidrojenaz enzimleri tarafından renkli formazan kristallerine indirgenmesi kolorimetrik hücre canlılığı testlerinin temelini oluşturmaktadır. Canlı olmayan hücrelerde böyle bir enzimatik aktivite görülmeyp indirgenme reaksiyonu gerçekleşemeyeceği için formazan kristalleri oluşamayacak ve renk değişimi gözlenmeyecektir (Mosmann, 1983). Hücre içi indirgeme kapasitesi, öncelikli olarak mitokondriyal, sitozolik ve plazma membranındaki dehidrojenaz enzimlerinin faaliyetleri

sonucunda oluşan NAD(P)H ve diğer endojen elektron taşıyıcılarının etkisiyle sağlanmaktadır (Riss ve Moravec, 2006). Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesi esasına bağlı olan canlılık deneyleri arasında, CCK-8 testi düşük hücre yoğunluğunda bile hassas ölçümü sayesinde diğer kolorimetrik testlere kıyasen daha güvenilirdir (Ishiyama ve ark.,1997). CCK-8 testinde kullanılan suda çözünür WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], esasında mitokondriyal redüktazlar başta olmak üzere, canlı hücrelerdeki dehidrojenaz enzimlerinin etkisiyle elektron alarak indirgenir ve suda çözünür bir formazan kristali oluşturur. (Sigma-Aldrich) Bu işlemler testin temel prensibini oluşturmaktadır. Canlılık tespitinin ölçümü için kullanılacak olan formazan miktarı, spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçülen optik yoğunluk ile belirlenir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Bu çalışmanın temel amacı, Triamonyum sitrat bileşiğinin genotoksik, sitotoksik ve mutajenik profilini ortaya koymaktır. Söz konusu bileşik, başta gıda endüstrisi olmak üzere çeşitli endüstriyel alanlarda kimyasal bileşen olarak yaygın kullanıma sahip olmasına rağmen, mevcut literatür taraması, toksikolojik etki potansiyelinin henüz kapsamlı bir biçimde değerlendirilemediğini göstermektedir. Çalışmalar, *in vitro* koşullarda sağlıklı ve gönüllü bireylerden alınan periferik kan kültürlerinde genotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla kromozom aberasyonu (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, mutajenik etkinin saptanabilmesi için çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarını tespit etmek üzere *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları TA98 ve TA100 kullanılarak Ames (bakteriyel geri mutasyon) testi uygulanmıştır. Sitotoksik profilin belirlenmesi amacıyla ise hücre canlılığı kolorimetrik olarak ölçülen güvenilir bir yöntem olan CCK-8 testi kullanılmıştır. Ek olarak, doğrudan plazmid DNA (pBR322) üzerinde radikal veya antiradikal etkiler araştırılmıştır. Elde edilen mutajenite, sitotoksisite, genotoksisite ve proliferasyon ile ilgili bulgular, test edilen kimyasalın kullanımına yönelik yaklaşımları önemli ölçüde etkileyecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılacak olan Triamonyum sitrat (E380), su arıtma süreçlerinde şelatör, ilaç endüstrisinde ve gıda ürünlerinde ise stabilizatör ve asidite düzenleyici olarak işlev gören bir bileşiktir. 1986 yılında patente sahip olan bu bileşik (Anonim 6), kullanım alanlarının genişliğine rağmen, sitogenetik değerlendirmeler açısından mevcut literatür taramaları sonucunda çok sınırlı veriye sahip olduğu tespit edilmiştir. Triamonyum sitrat, sitrik asidin amonyum tuzları ile reaksiyona girerek oluşur, dolayısıyla sitrik asidin bir türevi olarak kabul edilir. Bu bölümde triamonyum sitrat, sitrik asit ile aynı başlık altında ele alınacaktır. Bu bağlamda, gıda asitlik düzenleyicilerine yönelik hem *in vitro* hem de *in vivo* sitogenetik veriler aşağıda sunulmuştur.

2.1. Malik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Triamonyum sitrat gibi malik asit de ilaç ve gıda endüstrisinde asitlik düzenleyici, lezzet verici ve şelatlama ajanı olarak yaygın şekilde kullanılır. Yoshida ve Okamoto (1982)'nin yaptığı bir çalışmada 550°C'de 1 dakika kalmış malik asit pirolizatlarının (yüksek ısı ve oksijensiz ortamda organik maddelerin parçalanma ürünü) Ames/Salmonella test yöntemi kullanılarak TA98 ve TA100 suşlarına hem metabolik aktivatör varlığında hem de yokluğunda mutajenik etkileri değerlendirilmiştir (Yoshida ve Okamoto,1982). Bu çalışmanın sonucunda malik asit pirolizatlarının mutajenik olmadığı sonucuna varılmıştır. Aksine Kuroda ve ark. (1985) yaptığı bir diğer çalışmada ise yine malik asit pirolizatlarını Ames/Salmonella test yöntemi TA97 ve TA98 suşları kullanılarak metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda ortamın pH değişimine bağlı olarak mutajenik etkiler saptamışlardır (Kuroda ve ark.,1985). Malik asit pirolizatlarının nötr ortamda TA97 suşu üzerine metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda mutajenik etkileri olduğu bulunmuştur. Bu etki asidik ortamda zayıf iken bazik ortamda her iki suş için de herhangi bir mutajenik etki bulunmamıştır.

Ishidate ve ark. (1984) tarafından yürütülmüş bir çalışmada Japonya'da kullanılmakta olan birçok gıda katkı maddesinin genotoksik ve mutajenik potansiyelinin belirlenebilmesi için Ames/Salmonella ve Çin hamster (*Cricetulus griseus*) ovaryumu fibroblast hücre hattında (CHO) kromozom anormalliği (KA) yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Malik asit sırasıyla Ames testinde 10 mg/plate, kromozom anormalliği testinde ise 1 mg/ml olacak şekilde maksimum dozları belirlenmiş ve herhangi bir genotoksisiteye veya mutajeniteye sahip olmadığı bildirilmiştir (Ishidate ve ark.,1984).

Al- Ani ve Al-Lami (1988)'nin yaptığı bir çalışmada Ames/Salmonella test sistemi TA97, TA98, TA100 ve TA104 suşları kullanılarak metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda seçilmiş olan 4 gıda asitlik düzenleyicisinden birisi olan malik asit test edilmiştir. Bu çalışmada üç farklı doz (500, 1000 ve 2000 µg/plate) bir negatif ve bir pozitif kontrol varlığında mutajenik etkileri

değerlendirilmiştir. İncelemeler sonucunda hem metabolik aktivatör varlığında hem de yokluğunda anlamlı bir revertant koloni sayısı gözlenmemiş ve bunun sonucunda herhangi bir mutajenik etki olmadığına dair bir sonuca ulaşılmıştır (Al-Ani ve Al-Lami,1988).

Ouchi ve ark. (1990)'nın yaptığı çalışmada malik asitten türevlenen bazı maddelerin P-388 lenfositik fare modelleri kullanılarak antitümör özelliği değerlendirilmiştir. Bu türevlenen maddelerden malik asidin 5-fluorourasil ile birleştirilmiş çoklu (α -malik asit) birimlerinin toksik etki göstermeksizin antitümöral özellikte olduğunu ortaya koymuştur (Ouchi ve ark.,1990).

Hsiao ve ark. (2015), yaptığı bir çalışmada normal insan epidermal keratinositleri (NHEKs) ve insan keratinosit (HaCat) hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini ve potansiyel apoptotik yollarının belirlenmesi üzerine araştırma yapılmıştır. Bu çalışmadaki hücre canlılığı ve inhibisyon sonuçları doğrultusunda IC50 değeri 15 mM olarak belirlenip çalışmanın devamını bu doz üzerinden 24 ve 48 saatlik muamele süreleri esas alınmıştır. Hücrelerdeki DNA parçalanması, G0/G1 fazındaki hücrelerin artması ve DAPI boyaması sonucu hasar görmüş çekirdeklerin boyanması apoptozu indüklediğini işaret etmektedir. Apoptoz indüksiyonunu FasL, Fas, Bax, Bid, kaspaz-3, -8, -9, sitokrom c ekspresyonlarının artması ve Bcl-2, PARP ekspresyonlarının azalması; GRP78, GADD153 ve ATF6 α gibi endoplazmik retikulum stresine ilişkili protein ekspresyonunu artmasıyla temellendirilmiştir. Bu veriler ile malik asidin antiproliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Hsiao ve ark.,2015).

Guo ve ark., (2017) yaptığı bir çalışmada kadmiyum (Cd) ve alüminyum (Al) gibi ağır metaller kendileri başlı başına toksik etki gösterebilecekleri gibi mutajenik etkiye neden olabilecek Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumuna da neden olabilmektedir. Malik asidin, hücre sel glutatyon seviyesini artırarak kadmiyum (Cd) birikimine bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu etkin bir şekilde azaltabildiği ortaya konulmuştur (Guo ve ark.,2017). Üstelik, birden fazla çalışma Malik asidin alüminyum (Al)'un gösterdiği toksik etkilerine karşı *in vitro* ve *in vivo* ortamda koruyucu olduğuna dair raporlar bildirilmiştir (Al-Qayim ve Saadoon,2013; Domingo ve ark.,1988; Al-Qayim ve Mashi, 2014)

Arslan (2021), malik asidin insan fibroblast (HDFa) ve glioblastoma (U87-MG) hücre hattı üzerinde dört farklı test yöntemi ile birbirinden farklı dozlarda (3.12'den 400 μ g/ml'ye kadar ekspanansiyel artan seviyelerde) antikanser etkileri ve genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. MTT ve LDH salınımı testleri ile malik asidin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi sonucunda insan fibroblast hücre hattına kıyasen glioblastoma hücre hattında büyük ölçüde daha fazla toksik etki göstermiştir. Yapılan diğer test yöntemlerinden biri olan kromozomal bütünlük analizinde sitotoksikite verilerinde bulunan sonuçlarla aynı doğrultuda veriler bulunup glioblastoma hücre hattında doz artışına bağlı olarak nükleer anormalliklerde de artış gözlenmiştir. Son olarak yapılan akış sitometrisi deneyi sonucunda yukarıda bahsedilen sonuçlara paralel olarak glioblastoma hücre hattında daha yüksek bir hücre ölümü gözlenmiştir. Bu hücre ölümü fibroblast hücrelerinde

apoptoz yolu ile olurken, glioblastoma hücrelerinde ise nekrotik yol ile olduğu sonucuna varılmıştır (Arslan, 2021)

2.2. Tartarik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Triamonyum sitrat gibi tartarik asit de gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir asitlik düzenleyicisidir. Ishidate ve ark. (1984), tarafından yürütülmüş bir araştırmada Japonya'da kullanılan 200'e yakın gıda katkı maddesinin genotoksik ve mutajenik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada mutajenitenin belirlenmesi için metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 92, TA 94, TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 mutant suşlarıyla Ames/Salmonella testi ve Çin hamsteri yumurtalık fibroblast hücre hattı (CHO) üzerinde kromozom anormallliği (KA) deneyleri uygulanmıştır. Bu yürütülen çalışma sonucunda tartarik asidin herhangi bir mutajenik veya genotoksik etki göstermediği raporlanmıştır (Ishidate ve ark.,1984)

Cambridge'de yayımlanmakta olan bilim topluluğunun bir çalışmasında (Dose, 1994), *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 ve TA104 ve *E.coli* suşları üzerinde tartarik asidin herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir.

Çin merkezli bir biyoteknoloji şirketinin inceleme raporunda yapılan çalışmaya göre (CMBEC, 2004), *in vivo* fare kemik iliği hücreleriyle mikronükleus yöntemi uygulanarak tartarik asidin genotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Erkek farelere 0, 598, 1,075 ve 2,150 mg/kg; dişi farelere ise 0, 395, 790 ve 1,580 mg/kg olmak üzere 24 saat aralıklar ile iki doz uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir sonuca varılmamıştır. Aynı şirketin bir diğer çalışmasında tartarik asit 5 gün boyunca 0, 598, 1,075 ve 2,150 mg/kg dozlarda erkek farelerin primer spermatositleri üzerine hiçbir dozda genotoksik etki bulunmamıştır.

Yılmaz ve ark. (2014), yaptığı diğer bir çalışmada ise insan lenfositleri kullanılarak alkalın tek hücre jel elektroforezi (Komet) testi gerçekleştirilmiştir. Tartarik asidin 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozları ile insan periferik lenfositleri 1 saat süre boyunca maruz bırakılmıştır. Deneyin sonucunda hem kuyruk uzunluğu hem de kuyruk yoğunluğu bakımından da doza bağlı bir artış görülmüştür. Aynı zamanda bu çalışmada fosforik asit ve sitrik asidin kombine hali de aynı dozlarda denenmiştir. Kombine hali de tek başına olduğu gibi artan doza bağlı olarak DNA hasarının da arttığı sonucuna varılmıştır (Yılmaz ve ark.,2014).

2.3. Adipik asit ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Gıda sanayiinde asitlik düzenleyici ve jel oluşturuıcı olarak kullanılan adipik asit ilaç sanayiinde daha sınırlı bir yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Adipik asidin mutajenik ve genotoksik potansiyeli, çeşitli araştırmacılar tarafından farklı test sistemleri kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. 1974 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yayımlanan bir raporda adipik asidin mutajenik potansiyelinin değerlendirilmesi

amacıyla *Salmonella typhimurium* TA 1530 ve G46 suşları ile *Saccharomyces cerevisiae* D3 suşu kullanılmıştır. Ayrıca, *in vivo* genotoksik etkilerin araştırılması için oral gavaj yöntemi ile ratlara adipik asit uygulanmıştır. *In vitro* genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla ise insan doku kültürü hücreleri üzerinde kromozomal aberasyonlar incelenmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde, adipik asidin test edilen sistemlerde herhangi bir mutajenik veya sitogenetik etki göstermediği rapor edilmiştir.

Simmon ve Eckfard (1978), Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı adına yürüttükleri çalışmada, Ames test yöntemine göre adipik asidin mutajenik aktivite göstermediği rapor edilmiştir. Ramel ve Magnusson (1979), aralarında adipik asidin de bulunduğu 31 farklı bileşiği inceledikleri çalışmalarında, *Drosophila*'da kromozom ayrılmaması ve kromozom kaybı fenomenlerini test etmişlerdir. Adipik asit 4000 ppm konsantrasyonda uygulanmış olup, ne kromozom kaybında ne de ayrılmama durumunda herhangi bir artış gözlenmemiştir (Ramel ve Magnusson,1979). Shimizu ve ark. (1985), 43 farklı kimyasal maddenin mutajenik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, adipik asidi *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 ve *Escherichia coli* WP2 suşları üzerinde, mikrozomal aktivasyon varlığında ve yokluğunda test etmişlerdir. Elde edilen bulgular, adipik asidin hem metabolik aktivasyon varlığında hem de yokluğunda mutajenik etki göstermediğini ortaya koymuştur (Shimizu ve ark.,1985). Yine Priva ve ark. (1991), 49 farklı kimyasalın mutajenik aktivitelerini inceledikleri çalışmalarında, adipik asidi de değerlendirmişlerdir. *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 suşları ve *E. coli* WP2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen revertant koloni sayımı yöntemiyle yapılan analizler sonucunda, adipik asidin test edilen suşlar üzerinde herhangi bir mutajenik aktivite göstermediği bildirilmiştir (Priva ve ark.,1991).

Bu çalışmaların tümü, adipik asidin çeşitli test sistemlerinde mutajenik veya genotoksik etki göstermediğine işaret etmektedir.

2.4. Askorbik asit (C Vitamini) ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite

Çalışmaları

Askorbik asidin (C vitamini) DNA üzerindeki etkileri ve potansiyel genotoksisitesi, farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu çalışmalar, askorbik asidin farklı koşullarda ve dozlarda hem koruyucu hem de zararlı etkilere sahip olabileceğini göstermiştir. Galloway ve Painter (1979) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* koşullarda insan periferik lenfositleri ve *Cricetulus griseus* (Çin hamsteri) ovaryum hücreleri (CHO) kullanılarak kardeş kromatid değişimi testi ve bir rahim ağzı kanseri hücre hattı olan HeLa hücrelerinde ise DNA sentez inhibisyonu testi uygulanarak askorbik asidin genotoksik etkileri incelenmiştir. Bu çalışma, askorbik asidin bir genotoksik ajan kadar toksik etki gösterdiğini ortaya koyan bir rapor sunmuştur (Galloway ve Painter,1979).

Speit ve ark. (1980), tarafından yürütülmüş bir çalışmada Askorbik asidin *in vitro* ve *in vivo* etkileri kardeş kromatid değişimi testi kullanılarak araştırılmıştır. *In vitro* sonuçlar Çin hamsteri hücrelerinden (V79), *in vivo* sonuçlar ise Çin hamsteri kemik iliğindeki hücrelerinden elde edilmiştir. 24 saat süre ile 200 ila 10000 mg/kg arasında değişen dozlarda intraperitoneal veya oral yol ile hayvanlara uygulanmıştır. Yapılan incelemeler de *in vitro* sonuçlarda doza bağlı bir kardeş kromatid değişimi (KKD) artışı gözlenirken, *in vivo* sonuçlara bakıldığında böyle bir etki gözlenmeyip herhangi bir dozda KKD artışı saptanmamıştır. Bu farkın sebebi ortamdaki fizyolojik ve metabolik faktörler olabileceği sonucuna varılmıştır (Speit ve ark.,1980). Green ve ark. (1994)'nın yaptığı bir çalışmada iyonize radyasyona karşı askorbik asidin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma askorbik asit alımına takiben donörlerden alınan periferik kan lenfositleri kullanılarak tek hücre jel elektroforezi yöntemi (Komet) ile DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma esnasında sadece askorbik asit ile muamele edilmiş kontrol grubunda, 200 µM'den daha yüksek dozların kromozomlardaki koruyucu etkisinin aksine, kromatid kırıklarına neden olduğu gözlemlenmiştir (Green ve ark.,1994). Anderson ve ark. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, askorbik asidin H₂O₂ ve bleomisin gibi bilinen oksijen radikali üreten moleküllerin genotoksik etkilerine karşı koruyucu rolü araştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak, 0 µM, 40 µM, 200 µM, 1 mM ve 5 mM dozlarında askorbik asidin etkileri incelenmiştir. İlginç bir şekilde, askorbik asidin negatif kontrol olarak kullanıldığı durumda, doz artışına bağlı olarak DNA hasarını artırdığı gözlemlenmiştir (Anderson ve ark.,1994). Antunes ve Takahashi (1998) ise askorbik asidin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerini mitotik indeks ve kromozom anormallikleri açısından değerlendirmiştir. Bu çalışmada, 100, 200, 500 ve 1000 mg/ml dozlarında askorbik asit 24 saat boyunca uygulanmıştır. Sonuçlar, 100 mg/ml dozunda mitotik indekste bir değişiklik gözlenmezken, daha yüksek dozlarda önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Kromozomal anormallikler açısından ise, yalnızca en yüksek konsantrasyon olan 1000 mg/ml'de anlamlı bir artış gözlenmiştir (Antunes ve Takahashi,1998). Nefić (2008), tarafından askorbik asidin insan lenfositleri üzerine etkileri farklı parametreler kullanılarak incelenmiştir. Üç erkek üç kadın sağlıklı 6 kişiden alınan insan periferik kan lenfositlerine 1, 10, 20, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında askorbik asit ortama eklenerek 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Bu kültürlerin sonucunda mitotik indeks ve mitoz bölünmenin safhalarındaki yapısal anormallikler incelenmiştir. Düzensizlikler en çok anafaz ve telofazda görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/ml dışında kayda değer klastojenik bir aktivite belirlenmemiştir. Klastojenik etkiyle tutarlı olarak 250, 500 ve 1,000 µg/ml konsantrasyonlarında mitotik indeks değerlerinde önemli azalmalar görülmüştür (Nefić, 2008). *In vitro* ve *in vivo* şartlarda klastojenik etkileriyle bilinen ve anti tümöral etkiye sahip siklofosamid, doksorubisin, sisplantin ve bleomisin gibi ilaçların klastojenik aktiviteleri askorbik asit tarafından azaltıldığını gösteren sonuçlar birden fazla çalışmada ortaya konmuştur (Antunes ve ark.,1999; Antunes ve Takahashi,1998; Ghaskadbi ve ark.,1992; Antunes ve Takahashi, 1999; Anderson ve

ark.,1994; Antunes ve ark.,2000; Giri ve ark.,1998; Nefic, 2001). Yine antikanserojen olarak kullanılan etken maddelerin yanı sıra kromozomal hasarı indüklediği bilinen etil metansülfonat, siklofosamid, mitomisin C gibi bileşikler ve oksijen radikallerinin oluşturduğu genotoksik hasarı askorbik asidin azalttığına dair birçok çalışma sonucu bildirilmiştir (Anderson ve ark.,1994; Antunes ve ark.,2000; Krishna ve ark., 1986). Verrax ve Calderon (2009), farmakolojik dozlarda askorbik asidin sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini çeşitli kanser hücre hatları (TLT, MCF-7, T24, DU145, HepG2 ve Ishikawa) ve fare modelleri üzerinde incelemiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, askorbik asidin yüksek derecede sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Fare tümör modellerinde ise, oral yolla verilen dozlarda tümör büyüklüğünde anlamlı bir değişim gözlenmezken, intravenöz ve intraperitonel yolla verilen dozlarda tümör büyüme hızının azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışma, askorbik asidin uygulama yolunun önemini vurgulamaktadır (Verrax ve Calderon,2009). Yeom ve ark. (2009) tarafından yapılan araştırmada, yüksek doz (1.7×10^4 mol) askorbik asidin Sarkoma 180 kanser hücre hattı ve bu hücrelerin inoküle edildiği Balb/c fareleri üzerindeki kanserostatik etkileri incelenmiştir. Çalışmada qRT-PCR, histolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleri ile hücre göçü ve yara iyileşmesi modelleri kullanılmıştır. Sonuçlar, askorbik asit uygulamasının hayatta kalım oranını muamelesiz kanserli hücrelere kıyasla %20 artırdığını göstermiştir. Ayrıca, anjiyogenezle ilişkili üç genin ifadesini farklı oranlarda azalttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, gözlemlenen antikanserojen etkinin anjiyogenezin inhibisyonu yoluyla gerçekleştiği sonucuna varmışlardır (Yeom ve ark.,2009). Ranzato ve ark. (2010), MM98 ve REN malign hücre hatlarında askorbik asidin (0-10 mM) sitotoksik etkilerini değerlendirmiştir. Bu çalışma, nötral kırmızı alımı, apoptoz ve nekroz derecesinin belirlenmesi, Western blot ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin ölçülmesi gibi yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Askorbatın her iki hücre hattında yüksek toksisiteye neden olduğu ve bu durumun yüksek düzeyde ROS üretimiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (Ranzato ve ark.,2010). Du ve ark. (2010), askorbik asidin (0, 5 ve 10 mM/L) pankreatik adenokarsinom hücre hatları (MIA PaCa-2, AsPC-1 ve BxPC-3) üzerindeki antikanserojen etkilerini incelemiştir. Bu etkiler MTT, Annexin V/FITC ve H_2O_2 ölçümü kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada askorbatın doza bağımlı olarak H_2O_2 seviyesini artırdığı, hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca fare modellerinde, tümör büyümesinin engellendiği ve sağkalım süresinin uzadığı rapor edilmiştir (Du ve ark.,2010). Mamede ve ark. (2012), askorbik asidin insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı ve balb/c fareleri üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini araştırmıştır. MTT, akış sitometrisi, annexin-V/propidium iyodür (AV/PI) birleşmesi, hücre içi peroksidaz düzeyi, süperoksit radikal seviyesi, GSH ekspresyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli gibi değerlendirme yöntemleri kullanılmıştır. Sonuçlar, askorbatın hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Mamede ve ark.,2012). García-Rodríguez ve ark. (2016), askorbik asidin genotoksik etkilerini farelerde incelediği çalışmasında, askorbik asidin bilinen bir genotoksik ajan olan vanadyum pentoksitine karşı

koruyucu etkisi olduğunu saptamıştır. Apoptoz değerlendirmelerinde, negatif kontrole kıyasla erken apoptozda bir düşüş, geç apoptozda ise bir artış gözlenmiştir; nekrotik hücrelerde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (García-Rodríguez ve ark.,2016). Wang ve ark. (2016), askorbik asidin yüksek dozlarının (100-1000 µg/ml) 4T1 göğüs kanseri ve CT26 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki antitümöral etkinliğini araştırmıştır. Yüksek doz askorbatın her iki hücre hattının büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur. Farelerdeki tümör modellerinde ise, tümör büyümesinin geciktiği tespit edilmiştir (Wang ve ark.,2016). Chen ve ark. (2019), askorbik asidin A375 melanom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini ve apoptoz indüksiyonunu değerlendirmiştir. MTT, Annexin V/FITC, mitokondriyal membran potansiyeli analizi ve Western Blot yöntemleri kullanılarak yapılan bu çalışma, askorbatın kaspaz-3, kaspaz-9, Bcl-2 ve Bax yolları üzerinden apoptozu tetiklediğini ve mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir düşüşe neden olduğunu ortaya koymuştur (Chen ve ark.,2019). Bogar ve Tuylu (2019), askorbik asit ve diğer gıda katkı maddelerinin mikronükleus testi ve nükleer bölünme indeksi yöntemleri ile insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerini incelemiştir. 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml dozlarda 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda, askorbik asidin hiçbir dozda sitotoksik veya genotoksik bir etki göstermediği rapor edilmiştir. (Bogar ve Tuylu,2019)

2.5. Sitrik asit ve Triamonyum sitrat ile yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Ishidate ve ark. (1984), tarafından yapılmış bir çalışmada Japonya'da kullanılan 200'e yakın gıda katkı maddelerinden ikisi olan sitrik asit ve triamonyum sitratın genotoksik ve mutajenik etkileri incelenmiştir. Bu etkinin belirlenebilmesi için metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 92, TA 94, TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 mutant suşlarıyla Ames/Salmonella testi ve Çin hamsteri yumurtalık fibroblast hücre hattı (CHO) üzerinde kromozom anormallliği (KA) yöntemleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında sitrik asit ve triamonyum sitratın herhangi bir mutajenik veya klastojenik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Ishidate ve ark.,1984). Chan ve ark. (1999), sitrik asidin sitotoksik etkilerini MTT test yöntemi yardımıyla %0,25, %0,5 ve %1'lik konsantrasyonlarda 1, 2 ve 3 saat süre muamele ettikleri insan dental kök hücre hattında araştırmışlardır. Elde edilen veriler doğrultusunda sitrik asidin yüksek seviyede sitotoksik olduğu ve bu sitotoksisitenin asidite kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır (Chan ve ark.,1999). Koçak (2005), yılında yaptığı bir çalışmada kadife balığının (*Tinta tinca*) sitrik asidin 200, 300 ve 400 ppm'lik dozlarına 24, 48, 72, 96 saatlik sürelerle maruziyetinin genotoksik etkileri mikronükleus yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda mikronükleus sıklığında önemli bir artış belirlenmiştir (Koçak, 2005). Türkoğlu (2007), birçok gıda katkı maddesinin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada sitrik asidin 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm'de 5, 10 ve 20 saat süre ile soğan kök uçlarına maruziyeti sonrası genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Klastojenik etkinin araştırılması için mitotik indeks ve

mitozdaki aşamaların sayıları dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bulgular sonucunda doza ve süreye bağlı artışlarla beraber mitotik indekste de bir azalma gözlenmiştir. Hücre bölünmesinin aşamalarında da mitotik indekse benzer olarak artan süre ve doza bağlı olarak kontrole kıyasla mitotik evrelerin yüzdelerinde de sapmalar gözlenmiştir. Ayrıca incelenen mitoz evrelerinde farklı mitotik şekiller de gözlenmiştir (Türkoğlu, 2007). Amaral ve ark. (2007)'nın yürütmüş olduğu bir çalışmada %15'lik sitrik asidin de içinde bulunduğu dış tedavilerinde kullanılan bir solüsyonun sitotoksik etkisi, kemirgen makrofaj kültürlerinde MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu deney düzenlemesi kısa vade olarak 6, 12 ve 24 saatlik muameleler ve uzun vade olarak 1, 3, 5 ve 7 günlük muameleler ile değerlendirilmiştir. Hem kısa vadede hem de uzun vadede sitrik asit sitotoksik özellik sergilemiştir (Amaral ve ark.,2007). Yılmaz ve ark. (2008)'nın yaptığı bir çalışmada sigara içmeyen biri erkek birisi kadın iki kişiden alınmış insan periferik lenfositleri üzerine sitrik asidin klastojenik etkileri araştırılmıştır. Test edilen konsantrasyonların (50,100, 200 ve 3000 µg/ml) etkisi kromozom anormallığı, mikronükleus, kardeş kromatid değişimi, mitotik indeks ve replikasyon indeksi yöntemleri ile incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda sitrik asidin, tüm dozları ve muamele süresi kromozom anormallığını önemli ölçüde arttırmıştır. Mitotik indeksi 24 saatte 100 ve 200 µg/ml dozlarda 48 saatte ise tüm dozlarda önemli ölçüde düşürmüştür fakat replikasyon indeksinde önemli ölçüde bir düşüş gözlenmemiştir. Negatif kontrole kıyasla MN sayısında tüm dozlarda ve sürelerde önemli bir artış belirlenmiştir. Kardeş kromatid değişimi sonuçlarına bakıldığında ise 24 saatte 100 ve 200 µg/ml, 48 saatlik tüm dozlarda önemli ölçüde bir artış saptanmıştır (Yılmaz ve ark.,2008). Navarro-Escobar ve ark. (2010), yaptığı bir çalışmada aralarında sitrik asidin de bulunduğu bir grup kimyasalın kemirgen fibroblast hücre hattı üzerine (3T3-L1) sitotoksik etkileri MTT test yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada hücre hattı %15 sitrik asit konsantrasyonu ile 1, 6 ve 24 saat sürelerle muamele edildiğinde önemli sitotoksik etki gözlenmiştir (Navarro-Escobar ve ark.,2010). Marins ve ark. (2012), yaptığı bir çalışmada içerisinde sitrik asidin de yer aldığı bir grup kimyasalın tripan mavisi ve komet yöntemleri kullanılarak kemirgen fibroblast hücre hattı (3T3-L1) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. İncelenen sonuçlar doğrultusunda 10.5 ve 21 µg/ml dozlarının negatif kontrole kıyasen istatistiksel olarak anlamlı derecede sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Komet testi sonuçlarına bakıldığında ise tüm dozların herhangi bir genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir (Marins ve ark.,2012).

Ying ve ark. (2013), yapmış olduğu bir çalışmada sitrik asidin farklı deney yöntemlerine göre değişen dozlarda (2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 mM) uygulanması sonucu immortal (ölümsüzleştirilmiş) insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Bu etkilerin belirlenebilmesi için DAPI boyama, flow sitometri ile hücre döngü oranları ve apoptoz oranı, ROT miktarı, western blot ve apoptoz için kaspaz-3,8,9 aktiviteleri değişen sürelerde ve konsantrasyonlarda ölçülmüştür. Yapılan deneyler neticesinde sitrik asit doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azaltıp beraberinde G2/M ve S fazında durmasını da

sağlamıştır. Ayrıca Bcl ile ilişkili X proteini seviyelerinde (BAX), kaspaz 3-8-9 aktivasyonunda da bir artış gözlenmiştir. B- hücre lenfoma-2 (BCL-2) ve B hücre lenfoma ekstra büyük (BCL-XL) moleküllerinde de bir azalma saptanmıştır. İlâveten apoptoz indüksiyon faktörü (AIF), endonükleaz G (EndoG), kaspaz-8 ve BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti (BID) proteini olan hücre ölüm yollarını da aktif hale getirmiştir (Ying ve ark.,2013). Pandir (2016)'in yürüttüğü bir çalışmada içerisinde sitrik asidin de bulunduğu dört farklı gıda katkı maddesinin insan sperm hücre kültürü üzerindeki genotoksik etkileri komet yöntemi yardımıyla araştırılmıştır. Sağlıklı donörlerden alınan sperm örnekleri kültürlendikten sonra 1 saat boyunca 50, 100, 200 ve 500 µg/ml olacak şekilde sitrik asitle muamele edilmiştir. 50 ve 100 µg/ml olan dozlarda kontrole kıyasla herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir. Fakat doza bağlı olarak DNA kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinde artış olduğu bildirilmiştir (Pandir, 2016). Chen ve ark. (2016), yaptığı bir çalışmada sitrik asidin bir özofagus kanser hücre hattı (EC109) üzerindeki sitostatik potansiyeli değerlendirilmiştir. Sitrik asidin deney prosedürlerine göre değişen 24, 48, 72 ve 96 süreler ile 400, 800 ve 1600 µg/ml dozlarda muamele edilmiştir. Etkilerin değerlendirmesi için; MTT, mitokondri membran potansiyeli ölçümü, LDH seviyesi ölçümü, Annexin V/FITC boyama ve Hoechst 33258 boyama gibi yöntemler kullanılarak sitrik asidin sitotoksik ve apoptotik potansiyeli ölçülmüştür. Sonuçlar göz önüne alındığında hücre dışı LDH aktivitesi ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma, doza bağlı bir şekilde önemli düzeyde artış göstermiştir. Yüksek dozdaki (800 ve 1600 µg/ml) sitrik asit muamelesinde kontrole kıyasla hücre çoğalmasında bir azalma raporlanmıştır. Sitrik asitle muamele edilen kültürlerde tipik olarak apoptotik morfoloji ve apoptotik indekslerde artış gözlenmiştir (Chen ve ark.,2016). Abd-Elhakim ve ark. (2018)'nın yaptığı bir çalışmada gıdalarda kullanılmakta olan aralarında sitrik asidin de bulunduğu 3 farklı madde 100, 200 ve 300 µg/ml dozlarda farelerden izole edilmiş lenfositler üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada sitotoksik veriler için LDH salınımı ve MTT testi, genotoksisite verileri için ise komet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sitotoksisite yöntemleri için 24 ve 72 saat süreler ile genotoksisite yöntemi için ise 1 saat sitrik asit ile inkübasyon sonucunda değerlendirmeye alınmıştır. Sonuçlara bakıldığında hem hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunda doza bağlı bir azalma gözlemlenirken, LDH salınımı doza bağlı olarak bir artış göstermiştir. Komet testi sonuçlarına göz önüne alındığında yine doza bağlı olarak bir DNA hasarı artışı gözlenmiştir (Abd-Elhakim ve ark.,2018). Bogar ve Tuylu (2019) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, sitrik asit dahil olmak üzere bir dizi gıda katkı maddesinin genotoksik ve sitotoksik potansiyeli, insan periferik lenfositleri üzerinde *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, mikronükleus testi ve nükleer bölünme indeksi gibi sitogenetik yöntemler kullanılmıştır. Araştırmacılar, sitrik asidin en yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, mikronükleus indüksiyonu açısından, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında sitrik aside 24 ve 48 saat maruz kalan hücrelerde ve 100 µg/ml konsantrasyonunda 48 saat maruz kalan hücrelerde, çözücü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu bulgular, sitrik

asidin belirli konsantrasyonlarda ve maruziyet sürelerinde genotoksik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, triamonyum sitratın *in vitro* genotoksik ve sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla yürütülmüştür. Literatür taraması sonucunda, triamonyum sitratın genotoksik ve mutajenik potansiyelini direkt olarak değerlendiren çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmüştür (Bogar ve Tuylu, 2019).

Bu bulgular, triamonyum sitratın düşük genotoksik potansiyele sahip olabileceğini düşündürse de bu bileşiğin potansiyel risklerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle triamonyum sitratın metabolizması ve sitrik aside dönüşümü dikkate alınarak, farklı konsantrasyonlarda ve maruziyet sürelerinde *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde genotoksik ve sitotoksik etkileri detaylı bir şekilde incelenmelidir. Ayrıca, triamonyum sitratın farklı hücre tipleri ve organizmalar üzerindeki etkileri de araştırılmalıdır. Bu çalışmalar, triamonyum sitratın güvenli kullanımına yönelik daha kapsamlı bir değerlendirme yapılmasını sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada yapılan tüm deneyler *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada test maddesi olarak kullanılan triamonyum sitrat (E380) gıdalarda, asitlik düzenleyici, emülgatör, şelatlama ajanı ve pH stabilizasyonu için tamponlama amacıyla kullanılmaktadır. Deney materyali olarak sigara, alkol ve herhangi bir tedavi almayan, yaşları birbirine yakın (23-24 yaşlarında) sağlıklı ve gönüllü iki kadın ve iki erkekten alınan heparinize kan kullanılmıştır. Bu çalışma kurgusu içinde yer alan periferel kanın donörden alınması ve sonrasındaki deneysel süreçler, Ç.Ü.T.F. Etik Kurul tarafından (Onay no:31/137, 13 Ekim 2023) onanmıştır.

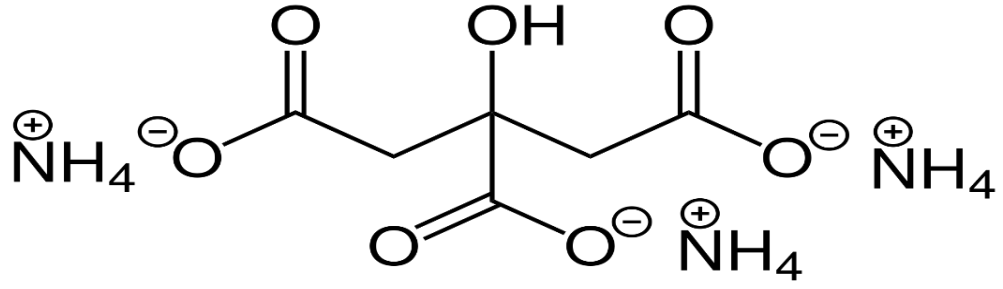
3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Triamonyum Sitrat (E380) (Test Maddesi)

Çizelge 3.1. Triamonyum sitrat bileşiğinin analiz sonuçları

	Triamonyum sitrat (E380)
Tanımlama	Triamonyum sitrat ($C_6H_{17}N_3O_7$) kimyasal formülüne sahip, sitrik asidin üç amonyum iyonu ile nötralize edilmiş tuzudur. Molekül, sitrik asidin karboksilat gruplarının amonyum iyonları ile bağlanması sonucu oluşur. Triamonyum sitrat geniş pH aralığında sabit kalabilmesinden dolayı öncelikle gıdalarda asitlik düzenleyici olarak (E380), farmasötikte stabilizatör olarak, temizlik endüstrisinde metal kaplama süreçlerinde, su arıtma işlemlerinde ve deneylerde tampon maddesi olarak kullanılmaktadır.
Form/Renk	Katı (Granül veya kristal) / Beyaz
CAS numarası	3458-72-8
Moleküler Ağırlığı	243,22 g/mol
Safılık	$\geq\%99$
Çözünürlük	H ₂ O
Depolama	Kuru ve ağzı sıkıca kapatılmalıdır.
Özel talimatlar	Gözde ciddi tahriş edici etkiye sahiptir. Dikkatli kullanılmalıdır.
Toksosite	Belirtilmiş bir toksosite raporu yoktur.
Referanslar	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triammonium-citrate https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.020.359



Şekil 3.1 Triamonyum sitrat'ın açık formülü



Şekil 3.2 Triamonyum sitrat bileşiğinin fiziksel görüntüsü

(%0,8/0.02 NaOH) Ampisilin Antibiyotiği Solüsyonu

Suşların ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolünde kullanılmış olup bu sayede kontaminasyon engellenerek seçici bir ortam sağlanmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Ampisilin Trihidrat	0.8 g
0.02 N Sodyum Hidroksit	100 ml

Ampisilin Trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözündürülmüştür. Sterilizasyon için 0.22 mµ çaplı filtreden geçirilmiştir. Ampisilin antibiyotik solüsyonu filtre yöntemi ile steril edileceğinden daha önceden bunun için bir beher ya da mavi kapaklı şişe steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

0.02N NaOH Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
NaOH	0.2 g

Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

(%0.13) Biotin (B7 vitamini) Çözeltisi

Test sonuçlarının güvenilirliği açısından genotip kontrolü ve master plakların hazırlanmasında beslenme desteği olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
D-Biotin	0.0013 g
Distile Su	100 ml

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözündürülmüştür. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Glikoz Çözeltisi (%20)

Minimal agarlı ortamlarda karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Glikoz	20 g
Distile su	100 ml

Belirtilen miktarda glikoz tartılıp distile su eklenerek son hacme tamamlanmış olup, bu karışım berraklaşana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan bu stok buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCI (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanarak ağzı kapalı cam bir kap içerisinde +4°C'de saklanmıştır. Her preparasyon işleminden yaklaşık 3 saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınarak 37°C'lik inkübatörde istenilen sıcaklık olan 37°C'ye gelene kadar bekletilip öyle kullanılmıştır.

(%0,5) Histidin Çözeltisi

Bu çözelti, başlangıç büyüme aşamasının desteklenmesi, mutasyon tespiti, genotip kontrolü ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
L-Histidin-HCI (F.W.191.7)	0.5 g
Distile Su	100 ml

Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)

Histidin gereksinimi kontrolünde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Agar	15 g
%20 Glikoz	100 ml
50xVB Tuzu	20 ml
Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
Distile Su	864 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Çözelti 45°C’ye soğutulup (20-30 dk) %20 glikoz, 50xVB (Vogel-Bonner) tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiştir. Solüsyonun biraz daha soğuması beklendikten sonra biyotin eklenerek karıştırılmıştır. 25 ml olacak şekilde petri kutularına dağıtılmıştır. +4°C’de saklanmıştır.

Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu (0.5 mM)

Bakteri suşları mutajenik kimyasallar varlığında veya besin eksikliğinde üreyemezler. Bundan dolayı ortama konan çok az miktardaki Histidin/Biyotin solüsyonu bakteri suşlarının birkaç bölünme geçirmelerine olanak tanır. Mutajenite deneylerinde 2 ml top agara 0.2 ml Histidin/Biyotin solüsyonu eklenerek kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
D-Biyotin (F.W. 247.3)	0.0309 g
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	0.024 g
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözündürülmüştür. Daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C’de 15 dk veya 0.22 µm membran filtre ile steril edilerek, +4°C’de saklanmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA)

Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Agar	15 g
50xVB Tuzu	20 ml
%20 Glikoz	100 ml

Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biotin	6 ml
(%0,8/0.02 NaOH) Ampisilin	3150 µl
Distile Su	860 ml

Agar ve su otoklavlanarak 45°C'ye kadar soğutulup %20 glikoz, 50xVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin de eklenerek plaklar petrilere 25 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler +4°C'de 2 ay saklanabilmektedir.

Minimal Glikoz Agar Plakları (MGA)

Mutajenite deneylerinde oksotrof hale dönen koloni sayılarının saptanması amacı ile kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Agar	15 g
50xVB tuzları	20 ml
%20 Glikoz	100 ml
Distile su	880 ml

Yukarıdaki listede belirtilen bileşenler yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilerek son hacimlerine tamamlanmıştır. Karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. 45°C'ye kadar soğutulan bu karışım petri kutularına 25 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

4-Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Bu kimyasal (4-NPD) bakterilerde çerçeve kayması tipi mutasyonu uyardığı bilindiğinden Ames testinde TA 98 bakteri suşu için metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
NPD	0.02 g
DMSO	10 ml

DMSO'da çözdürülerek, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol (NPD) hazırlanan stok çözeltiden 1/50 oranında seyreltilmiştir. Bu seyreltilen çözelti son konsantrasyon 0.04 µg/petri olacak şekilde petri başına 100 µl ilave edilmiştir.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Test suşlarının ön kültürlenmesi amacıyla (gecelik kültürde üreyebilmeleri için) kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Oxoid Nutrient Broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Toz halinde bulunan nutrient broth distile su ile iyice çözülünceye kadar elle karıştırılmıştır. Karışım otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilerek oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

Sodyum Azid Çözeltisi (SA)

Sodyum azid Ames testinde baz değişim tipi mutasyonları uyardığı bilinen bir kimyasaldır. Bu çalışmada TA 100 bakteri suşu için metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Sodyum azid	0.01 g
Distile su	100 ml

Distile su içerisinde çözdürülerek, +4 °C’de ve alüminyum folyoya sarılı olarak saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol (SA)’den son konsantrasyon 1 µg/petri olacak şekilde 100 µl alınarak petri kutularına ilave edilmiştir.

Top Agar

Mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Agar	6 g
NaCl	5 g
Histidin/biyotin solüsyonu	100 ml
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir.

Vogel-Bonner-E Ortamı (50xVB Tuzları)

Minimal glikoz agar (MGA) plaklarının tuzu olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>Miktar</u>
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum sülfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g
Distile su	670 ml

Yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilerek son hacimlerine tamamlanmıştır. Maddelerin tamamen çözülmesi için manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

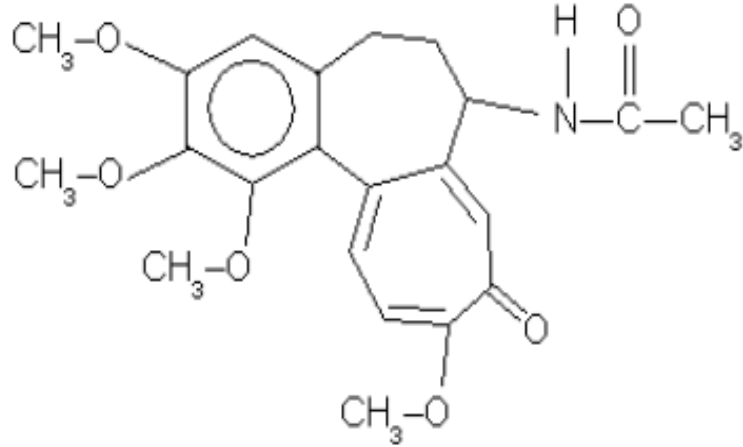
Etil Alkol (Sigma No: 32205)

Deneyin birçok aşamasında sterilizasyon amaçlı %70'lik etil alkol hazırlanarak temas yüzeylerinin ve kullanılan araç-gereç ve materyalin temizlenmesinde kullanılmıştır.

Colchicine (Kolşisin) (Sigma No: C-9754)

Ticari temin yoluyla alınan kolşisin, KA testinde iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini metafaz evresinde durduran mitotik bir zehir olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği, steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom mediumunun her mL'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/mL) 2.7 ml'lik hücre kültürüne ilave edilmiştir.

Kimyasal Adı	: Colchicine
Kapalı Formülü	: C ₂₂ H ₂₅ NO ₆
Molekül Ağırlığı	: 399.4
Etil Asetat İçeriği	: %3,4
Kloroform İçeriği	: <%0.1
Sigma No	: C-9754



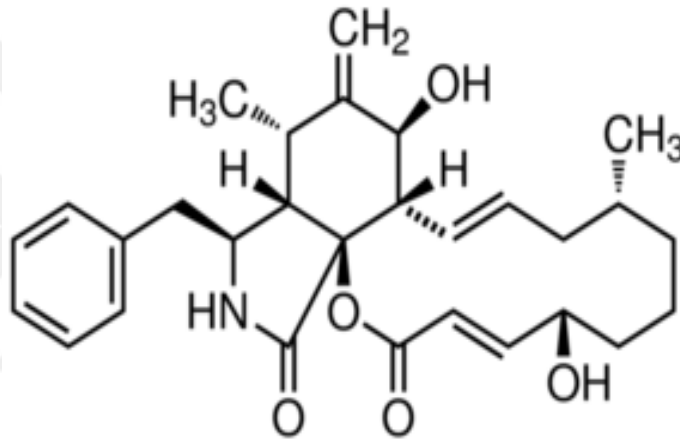
Şekil 3.3. Colchicine'in açık formülü

Cytochalasin-B (Sigma No: C-6762)

Mikronükleus (MN) testinde, hücre bölünmeye başladığı sırada sitokinezi engellemek ve iki veya daha fazla nükleuslu hücrelerin meydana gelmesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır. Bu ajan, sitokinez sırasında, aktin filamentlerinin polimerizasyonunu inhibe eder dolayısıyla kontraktil

mikrofilamentlerin oluşumu bloke edilmiş olur. Çözeltinin konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde %50'lik etanol içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

Kimyasal Adı	: Cytochalasin-B
Kapalı Formülü	: C ₂₉ H ₃₇ NO ₅
Molekül Ağırlığı	: 479.61 g/mol
Erime Noktası	: 218-223°C
Kaynama Noktası	: 218-223°C
Safılık Düzeyi	: %98
CAS No	: 14930-96
Sigma No	: C-6762



Şekil 3.4. Cytochalasin-B'nin açık formülü

5' Bromo 2' deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma No : B 5002)

BrdUrd, Sigma firmasından (Cat. No: B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği, bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten 20 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir. BrdUrd'nin moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı : 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

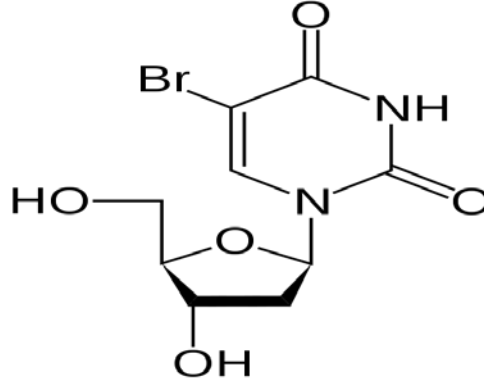
Kapalı formülü : C₉H₁₁BrN₂O₅

Molekül ağırlığı : 307.10 g/mol

Erime noktası : 191-194 °C

CAS No : 59-14-3

Sigma No : B 5002



Şekil 3.5. 5' Bromo 2' deoxyuridine açık formülü

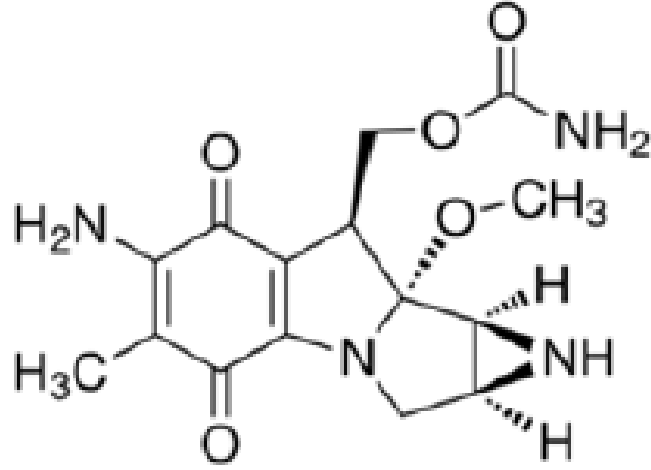
Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

Bu eriyik, kardeş kromatid değişimi (KKD) testinde kromozom preparatlarının ultraviyole (UV) ile ışınlandırılmasından sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Merck 1.06448) 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. Hazırlanan bu stok eriyik 5xSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmasıyla elde edilen 1XSSC eriyiği kullanılmıştır.

Mytomycin-C (CAS No: 50-07-7)

Mytomycin-C (MMC), KA ve MN testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok çözelti; 2 mg Mytomycin-C, 30 ml steril saf su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

Kimyasal Adı	:6-Amino-1,1'a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8amethoxy-5-methyl-azirino [2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a] indole-4,7-dione carbamate (ester)
Kapalı Formülü	: $C_{15}H_{18}N_4O_5$
Molekül Ağırlığı	: 334.33 g/mol
Erime Noktası	: >360°C
CAS No	: 50-07-7



Şekil 3.6. Mytomycin-C'nin açık formülü

Nitrik Asit (HNO_3)

Nitrik asit (Cas. No. 7997-37-2), kuvvetli bir asittir. Sitogenetik çalışmalarda lamaları temizlemek amacı ile 1 N çözelti olarak hazırlanmaktadır. Kapalı plastik bir kapta saklanarak, her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

Entellan (Merck Cat No: 7961)

Reçine kökenli ve tolüen solventli, ksilen ile çözülebilen, kuruduktan sonra hava kabarcığı oluşturmeyen, iyi kaplama sağlayan, yapışkan özelliğinde olup lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan şeffaf ve akıcı bir sıvıdır. Hazırlanan preparatları kalıcı hale getirmek için kullanılmıştır (Cat No: 7961).

Kromozom Mediumu (Gibco Cat. No. 12557-013)

Hücre kültürü için Gibco firmasının ürettiği PB MaxTM Kromozom karyotipleme Mediumu (Cat. No. 12557-013) kullanılmıştır. Bu medium her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Enjektöre 1/10 oranında heparin çekilerek istenilen miktarda kan alınmış ve heparin içermeyen bu mediuma heparinli kan ilave edilmiştir. Deneyde kullanılmak üzere CELLSTAR® Greiner BIO-ONE (Cat. No: 164160), 16.8/100 mm, kırmızı kapak, destek etekli, şeffaf, 12 ml, steril hücre kültürü tüpleri kullanılmıştır.

Fiksatif

KA ve KKD testini incelemek için yapılan preparasyonda, 1 hacim glisial asetik asidin 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmış olan alkol bazlı Carnoy fiksatif kullanılmıştır.

MN testini incelemek için yapılan preparasyonda ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif muamelesi için 1 hacim glisial asetik asit 5 hacim metanol ve 6 hacim %0.9 NaCl (1/5/6=glisial asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. İkinci fiksatif ise 1 hacim glisial asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5=glisial asetik asit/metanol) karıştırılması ile

elde edilmiştir. Fiksatifler kullanılmadan iki saat öncesinde hazırlanmış ve kapaklı cam bir şişede +4°C’de muhafaza edilmiştir. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4’lük KCI (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanarak ağzı kapalı cam bir kap içerisinde +4°C’de saklanmıştır. Her preparasyon işleminden yaklaşık 3 saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınarak inkübatörde 37°C’ye getirilerek kullanılmıştır.

Giemsa (Merck)

Alman mikrobiyolog Gustov Giemsa tarafından keşfedilen Giemsa boyası hücrelerin renklendirilmesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır. Giemsa boyası, adenin-timin yoğunluğunun yüksek olduğu DNA bölgelerine daha fazla bağlanır.

Sorensen tamponu içerisinde %5’lik olacak şekilde ve filtre edilerek hazırlanan boya eriyiği, kromozomları ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Sorensen Tamponu ilk olarak Danimarkalı Søren Peter Lauritz Sørensen tarafından kullanıldığı için bu ismi almıştır. Sorensen Tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır. Bu tamponlar %5’lik Giemsa boyası hazırlanırken çözeltinin pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içerisinde 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 içerisinde eritilmiştir (pH=9.3).

Glasiyal Asetik asit (CAS No: 64-19-7)

Kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) deneylerinde fiksatif hazırlamak için kullanılan ana bileşenlerden birisidir.

Metanol (CAS: 67-56-1)

KA ve MN deneylerinde fiksatif hazırlamak için kullanılmıştır.

Serum Fizyolojik (%0,9)

Fiksatif 1 hazırlamak için bileşenlerden biri olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Miktar

NaCl

9 g

Distile su ile

1000 ml’ye tamamlanır

Agaroz jel (%1)

Test maddesinin neden olduğu DNA hasarlayıcı-koruyucu (radikal-antiradikal) aktivite deneylerinde elektroforez işlemi sırasında DNA molekülünün (pBR322 plazmidi) yürütüldüğü (koşturulduğu) hareket ortamı olarak kullanılmıştır. 1 gr agaroz, 100 ml 0,5X Tris-Borik asit-EDTA

(TBE) tampon içinde çözünene kadar ısıtılmış ve 60-70°C sıcaklığa gelince nükleik asitleri güvenli şekilde görselleştirmek için 5 µl DyeAll™ (Cat. No. SM-D01-001) DNA boyası eklenmiştir. Hazırlanmış jel elle tutulur sıcaklığa gelince jel kuyucuk tarakları yerleştirilmiş tanka dökülmüş ve jelin donması beklendikten sonra taraklar çıkartılmıştır.

DyeAll™ (Cat. No. SM-D01-001) DNA Boyası

DyeAll™, GeneAll Biotechnology Co., Ltd. tarafından üretilen ve agaroz jel elektroforezinde nükleik asitleri görselleştirmek için kullanılan güvenli ve geliştirilmiş bir nükleik asit boyasıdır. Bu ürün, toksik olan Etidyum Bromür'ün (EtBr) yerini alarak cam eşya, jel aygıtları ve çevre üzerindeki kontaminasyon risklerini ortadan kaldırır. Deneylerde pBR322 plazmid DNA'sını boyamak amacıyla %1'lik agaroz jel içine konularak kullanılmıştır.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (CAS No: 7722-84-1) DNA koruyucu aktivite ve hücre canlılık tespiti amacıyla kullanılan CCK-8 testi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DNA koruyucu aktivite deneyinde %10'luk, CCK-8 deneyinde %4'lük H₂O₂ çözeltisi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

pBR322 Plazmidi (172 ng/µL) (New England BioLabs inc. Cat. No. N3033S)

Ticari olarak satın alınan pBR322 plazmidinden 34,4 µl alınır ve distile su ile 100 µl'e tamamlanarak hazırlanmıştır.

10X TBE Tamponu

10X TBE stok solüsyonu ticari olarak temin edilmiştir. DNA hasarlayıcı-koruyucu (radikal-antiradikal) aktivite deneylerinde 10X TBE tamponu seyreltilerek 0.5XTBE tamponu olacak şekilde elektroforez tankının doldurulmasında kullanılmıştır. Ayrıca DNA molekülünün (pBR322 plazmidi) yürütüleceği hareket ortamı olan agaroz jel hazırlanırken de 0.5X TBE tamponu kullanılmıştır. Stoktan yapılan bu seyreltme için 50 ml 10XTBE stok solüsyonuna 950 ml distile su eklenir ve karıştırılır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

Buzdolabı

+4 °C'de saklanması gereken deney sarflarının muhafazası için kullanılmıştır.

Elektroforez Tankı

DNA koruyucu aktivite deneyinde DNA örneklerinin elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla Thermo Scientific marka, model no: B2, 14 x 21,5 x 5 cm ölçülerinde elektroforez tankı kullanılmıştır.

Elektroforez Güç Kaynağı

Elektroforez uygulamasında Thermo Scientific marka, model no: EC300XL2 güç kaynağı kullanılmıştır.

Hassas Terazi

Hava akımına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 g hassasiyetindeki Gec Avery marka terazi, katı kimyasal maddelerin tartılmasında kullanılmıştır.

İnkübatör

Deneyler sırasında kullanılan eriyiklerin ve kan kültürlerinin istenilen sıcaklıkta tutulması amacı ile Incucell marka, 0°C-100°C'ye kadar ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı

Ames testinde kimyasal maddeleri hazırlamak için Chiltern Hotplate HS31 marka karıştırma devri ve ısıtma sıcaklığı ayarlanabilir manyetik karıştırıcı ısıtıcı tabla kullanılmıştır.

Mikroskop

Preparat incelemeleri sırasında koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu kullanılmıştır. Tez de bulunan fotoğraflar ise yine OLYMPUS marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

Otoklav

Deneylerde kullanılan ekipmanların ve eriyiklerin sterilizasyonu amacıyla Hirayama marka otoklav kullanılmıştır. Sterilizasyon, 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk süre ile gerçekleştirilmiştir.

Petri Kutuları

Ames testi için Fıratmed tarafından cleanroom odalarında IVD 98/79/EC direktiflerine uygun olarak üretilen petri kutuları kullanılmıştır.

Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dk'ya (rpm) kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli Hettich Universal marka santrifüj çalışmalarında kullanılmıştır.

Vorteks

2 farklı hız kademesine sahip Velp Scientifica marka vorteks cihazı, örneklerin karıştırılması amacı ile kullanılmıştır.

Su Banyosu (Benmari)

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 Nüve marka 0-60° ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu kullanılmıştır.

Steril Kabin (Flow Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom medium konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, %99,9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m³/h emme kapasiteli, UV ve floresan ışık kaynağı olan flow kabin kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce 1/3 çift yüzeyi buzlu (rodajlı) lamlar (76x26 mm) şaleye dizilerek üzerlerini iyice örterek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin kapağı kapatılarak içinde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yaklaşık yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Deney esnasında soğuk olarak kullanılmışlardır.

3.2.2. Sterilizasyon

Deney aşamasında kullanılan cam malzemeler, pipet uçları, tüpler ve diğer tüm araç-gereçler alüminyum folyoya sarılmıştır. Daha sonra 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk süre ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Hücre Kültürü

MCF-7 ve NIH3T Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

%10 FBS

%1 L-glutamin

%1 Penisilin/Streptomisin

DMEM besiyeri

Çalışmada kullanılan medyum miktarı belirtilen oranlarda taze olarak hazırlanmıştır.

MCF-7 ve NIH3T Hücre Hattı Kültürü

Hücrelerin test maddesi ile belirlenen konsantrasyonlar (0.5, 1 ve 2 mg/ml) ve sürelerde (24 ve 48 saat) muamele edilebilmesi için öncelikle yeterli miktarda hücrelerin bölünmesi sağlanmıştır. Bunun için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- 25 cm² steril ve filtre kapaklı flasklara 1x10⁶ hücre ekimi yapılmıştır (Hücreler süspanse olduğu için flasklar dik konumda tutulur).
- Flasklara 10 ml taze hazırlanmış besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin besi ortamı değiştirilirken hücre yoğunluğu ve besi yeri rengi dikkate alınmalıdır.

-Hücre yoğunluğu: ml'de 1x10⁶ hücreden fazla olmamasına dikkat edilmelidir.

-Besiyeri rengi: Rengin açık sarıya dönmesi bölünme faaliyetlerinin arttığını aynı zamanda ortam asitliğinin arttığını ifade etmekte iken rengin koyu mora doğru değişmesi bölünme faaliyetlerin durduğu ya da hücre ölümünün arttığı aynı zamanda ortam bazikliğinin arttığı

anlaşılmalıdır. Deneylere başlayabilmek için hücre sayısının 12×10^6 hücreden fazla olmasına dikkate edilmelidir (Fazla olan hücreler bölünmesi için tekrar taze besi yerine ekilmiştir).

Lenfosit Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen hazır PB-Max kromozom medyumunu kullanılmıştır.

3.2.4. Test Maddesinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi, Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Test maddesinin deneylerde kullanılacak en uygun konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan doz belirleme çalışmaları sonucunda Triamonyum sitrat'ın sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda OECD'nin test yöntemleri için izin verdiği ölçüde üst sınırdaki dozları kullanılmıştır. Lenfositler ile yapılan çalışmalarda en yüksek konsantrasyon 2 mg/ml olup diğer dozlar olan 1 mg/ml ve 0,5 mg/ml olarak, AMES testinde ise en yüksek konsantrasyon 5mg/petri diğer dozlar 4mg/petri, 3mg/petri, 2mg/petri, 1mg/petri olarak kullanılmıştır. Steril saf su içinde çözülerek hazırlanan test maddesi membran filtreden (por çapı 0.22 µm) geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak

Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA ve MN testleri yardımıyla olabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslararası standartlara uygun hareket edilmesi gerekir. Bundan dolayı Triamonyum sitrat bileşiğinin insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bu çalışma Albertini ve ark. (2000)'ları tarafından yayınlanan IPCS (The International Programme on Chemical Safety) metodolojisine göre gerçekleştirilmiştir (Albertini ve ark.,2000).

Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

- Bu çalışmada KKD ve KA'yı saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması için Evans (1984)'un yöntemleri modifiye edilerek kullanılmıştır. (Evans,1984)
- Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın (23 ve 24) iki erkek ve iki kadından alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumuna (PB-Max karyotyping medium, Gibco cat. no. 12552-013) steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) olarak ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız bromodeoxyuridin (BrdUrd) eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde kan ekimi yapıldıktan 48 saat sonra ilave

edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 120 saat için inkübe edilmiştir.

- Triamonyum sitrat'ın etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce daha önce belirlenmiş son konsantrasyonları olan 0,5, 1 ve 2 mg/ml'lik miktarlarındaki Triamonyum sitrat bileşiği kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak mitomoycin C (MMC) kullanılmıştır. MMC tüplere son konsantrasyonu 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir de negatif kontrolü vardır.
- Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 $\mu\text{g/ml}$) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C 'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.
- Kültür süresinin sonu olan 120. saatin bitiminde preparat yapma işlemine geçilmiştir.
- Kültür tüpleri 2000 devir/dk'da 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.
- Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan ve hücreler resüspanse edildikten sonra tüplere, etüvde 37°C 'de tutulan hipotonik eriyik damla damla olacak şekilde yavaşça ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonunda kümeleşme olmaması için pipetleme yapılarak homojen hale getirilmiştir.
- Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüplerin kapağı kapatılarak 10 dk 37°C 'lik inkübatöre alınmıştır.
- Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1200 devir/dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.
- Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edilmiştir.
- Hücre süspansiyonu 10 dk 1200 devir/dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.
- Üçüncü fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır.
- Son santrifüjden sonra tüplerin dibinde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir.
- Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir.
- Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pastör pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılmıştır (her lama 3-4

damla). Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

- Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Preparatların Boyanması ve Daimî Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır (Speit,1984; Speit ve Haupter,1985) Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen tampon A, 5 ml Sorensen tampon B alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının 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. ışınlandırılmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 60°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)'de 60 dk. inkübe edilmiştir.

%5'lik Giemsa boyasının hazırlanması:

7.5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımı ile süzölmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 30 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimî hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra (en az iki gün) bu daimî preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

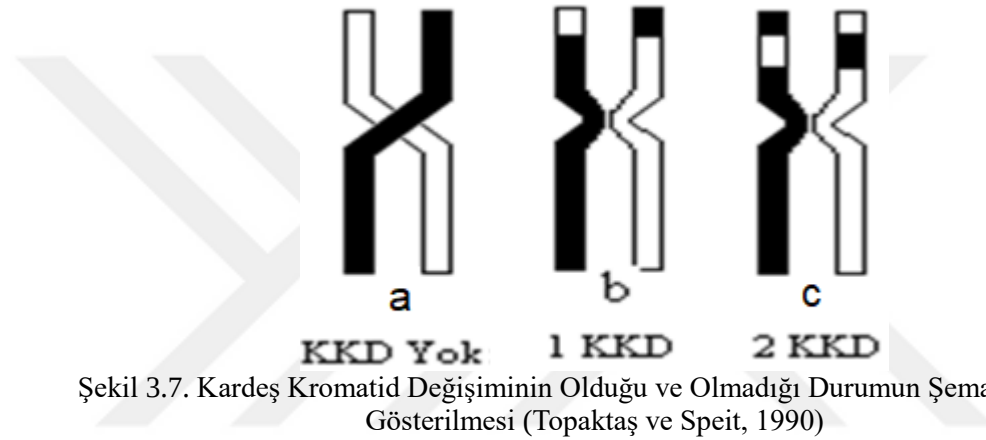
Daimî Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimî preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında KKD ve KA belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu değerler kullanılarak PI hesaplanmıştır.

3.2.6. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksi'nin (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 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 değerlendirilmiştir (Şekil 3.7.a). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.7.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.7.c)



Şekil 3.7. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması

Triamonyum sitrat'ın DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Bunun için her bir donörün kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilen 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

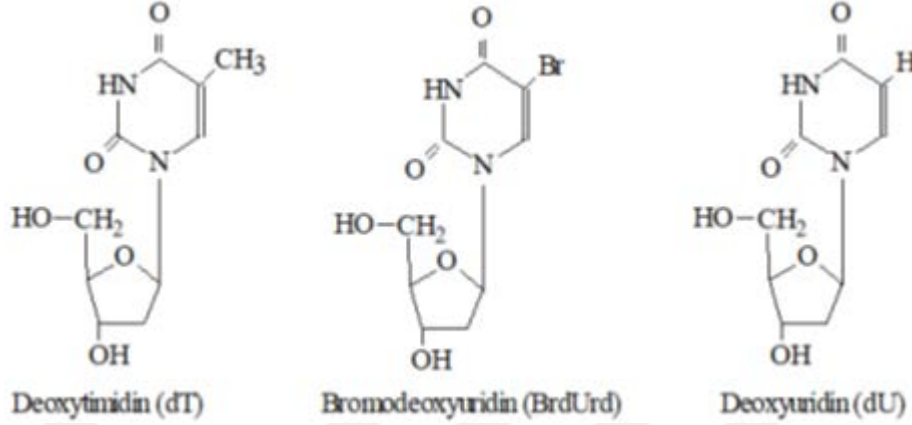
M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990):

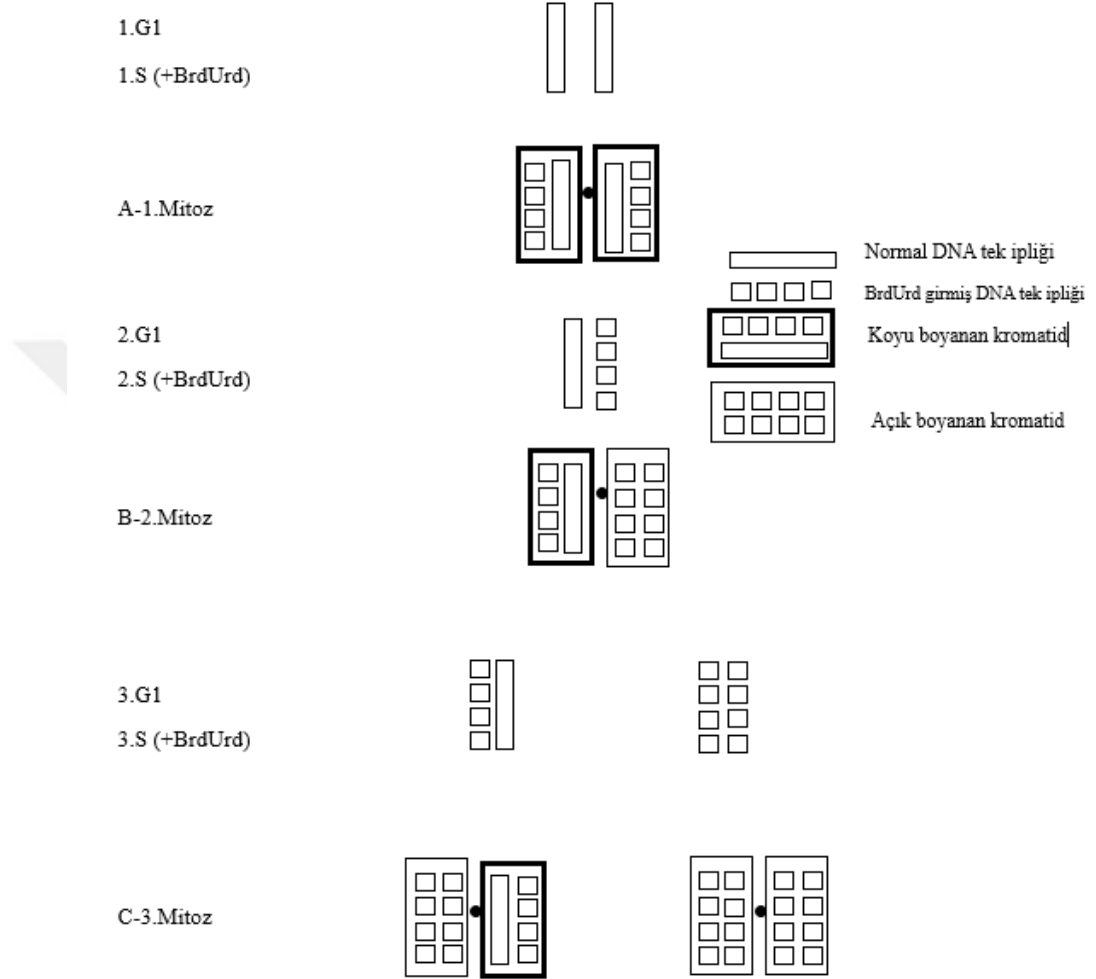
Bromodeoxyuridin (BrdUrd), deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT’de CH₃, BrdUrd’de Br ve dU’de H atomudur (Şekil 3.7).



Şekil 3.8. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)’in kimyasal yapıları

BrdUrd, DNA’nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA’larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT: dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 A ve Şekil 3.9). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd’li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd / dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinukleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd / BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır (BrdUrd / dT : BrdUrd / BrdUrd). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 B ve Şekil 3.10). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd’li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd / BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd / BrdUrd: BrdUrd / BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise (BrdUrd / dT), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd’li ve diğer kromatidinin bir ipliği timinli diğer ipliği BrdUrd’li olan bir kromozom (BrdUrd / BrdUrd : dT / BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır. İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı

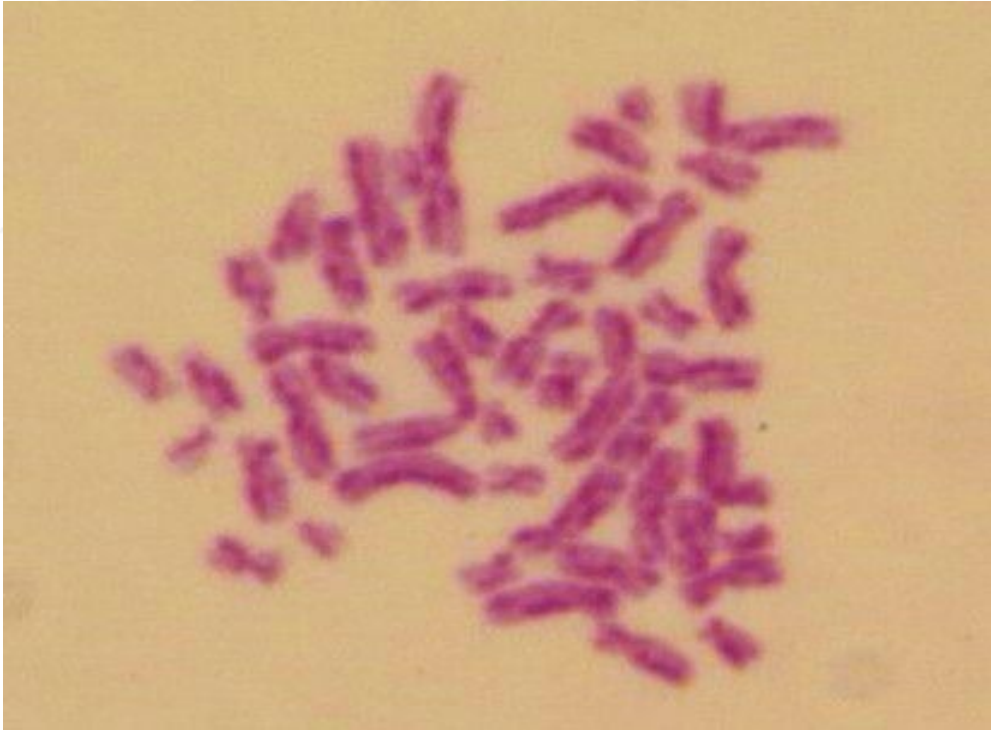
kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 C ve Şekil 3.11). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak gösterilmesi (During, 1985'e göre, Topaktaş ve Speit 1990).



Şekil 3.10. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000)



Şekil 3.11. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000)



Şekil 3.12. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (x1000)

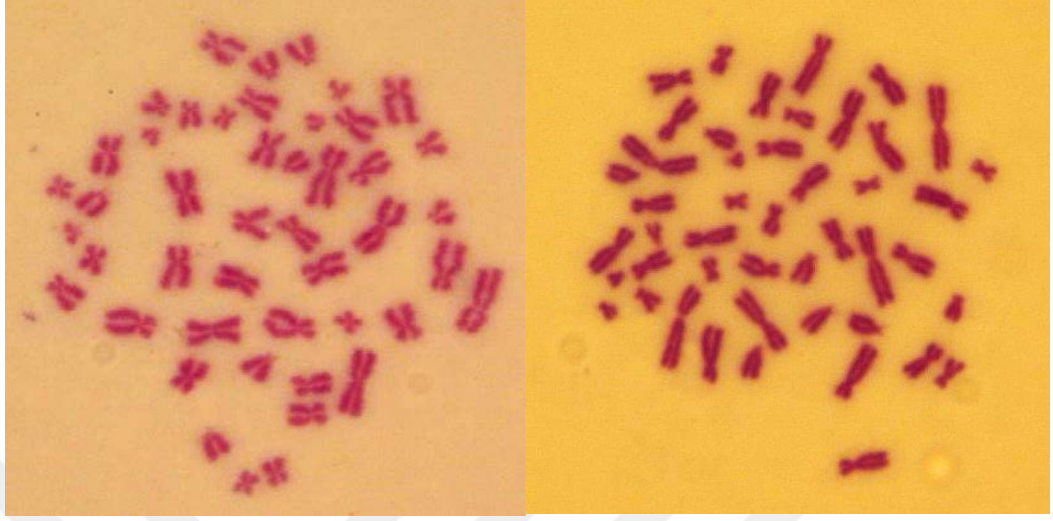
3.2.7. Kromozom Anormalliklerin (KA) Saptanması

Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. KA'lı hücrelerin toplam incelenen hücreler içerisindeki oranları hesaplanarak anormal hücre yüzdesi (%) belirlenmiştir. İncelenen 100 hücre içerisinde rastlanan toplam KA sayısı saptanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) bulunmuştur. Bu çalışmada gözlenen kromatid ve kromozom gap'ları anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark.,1978). Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir (Kauderer ve ark.,1991): Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda göstermişlerdir (Mace ve ark.,1978).

Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi,

kromatid değişimi, halka kromozom, fragment ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.13. Bölünen hücrelerdeki metafaz plakları (x1000)

3.2.8. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro MN testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki kadından (KA ve KKD testi için kan alınan kişiler) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir ve hücreler $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 120 saat inkübe edilmiştir.

- Çalışmada gıda katkı maddesi olarak kullanılan test maddesi Triamonyum sitrat'ın sitogenotoksik etkisini belirlemek için son konsantrasyon 0,5, 1 ve 2 mg/ml olacak şekilde kültürün son 48 veya 24 saatinde ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir negatif ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur.
- Kültürün son 24 saatinde her bir tüpe konsantrasyonu 6 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.
- İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 devir/dk.da (rpm) 5 dk. süresince santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCl) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüj edilmiştir.
- Hipotonik eriyik, KKD ve KA deneylerinde olduğu gibi kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir.

- Kültür tüpleri 1200 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0,9 NaCl) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir.
- Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 15 dk. muameleden sonra 1200 rpm’de 10 dk. daha santrifüj edilen tüplere bu kez glasiyal asetik asit / metanol (1/5) karışımından ibaret fiksatif ilave edilerek 10 dk. oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır (Bu fiksatif muamelesi iki kere tekrarlanmıştır).
- Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5’lik Giemsa boyası ile 4-5 dk. boyanmış ve boyanmış preparatlar üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek boyama işlemi durdurulmuş ve sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak daimî hale getirilmiştir.

Mikronükleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimî preparatlar Olympus marka ışık mikroskopunda $10 \times 40=400$ büyütmede incelenmiştir.

3.2.9. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla her bir donöre ait daimî preparatların her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiş ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Böylece mikronükleuslu hücrelerin toplam hücrelere oranlanması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen hücre sayısına oranlanmasıyla da hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) saptanmıştır. Buradan da MN yüzdesi hesaplanmıştır.

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)’e göre yapılmıştır (Fenech,2000; Titenko-Holland ve ark.,1997): (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN’ler sadece ana nükleusun $1/3$ ’ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN’ler ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN’ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklayıcı yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkânı vermesidir. Bu durum, sitokalsin-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu hücrelerin

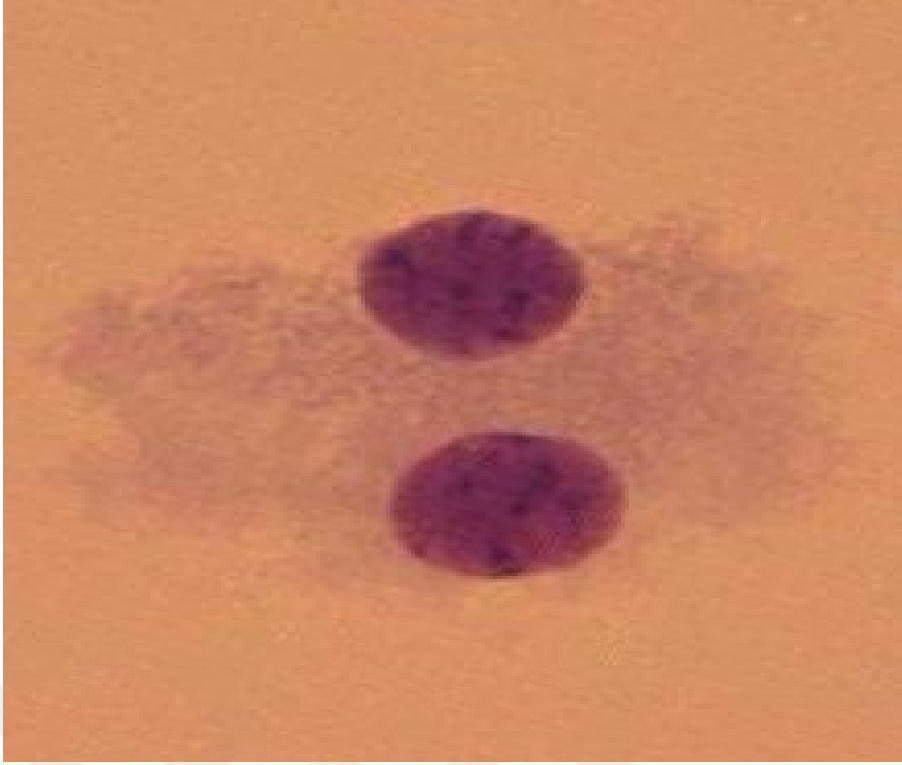
sayılarının belirlenmesiyle yapılır. Nükleus bölünme indeksi Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır (Eastmond ve Tucker,1989).

$$NBI = \frac{1 \times MI + 2 \times MII + 3 \times MIII + 4 \times MIV}{N}$$

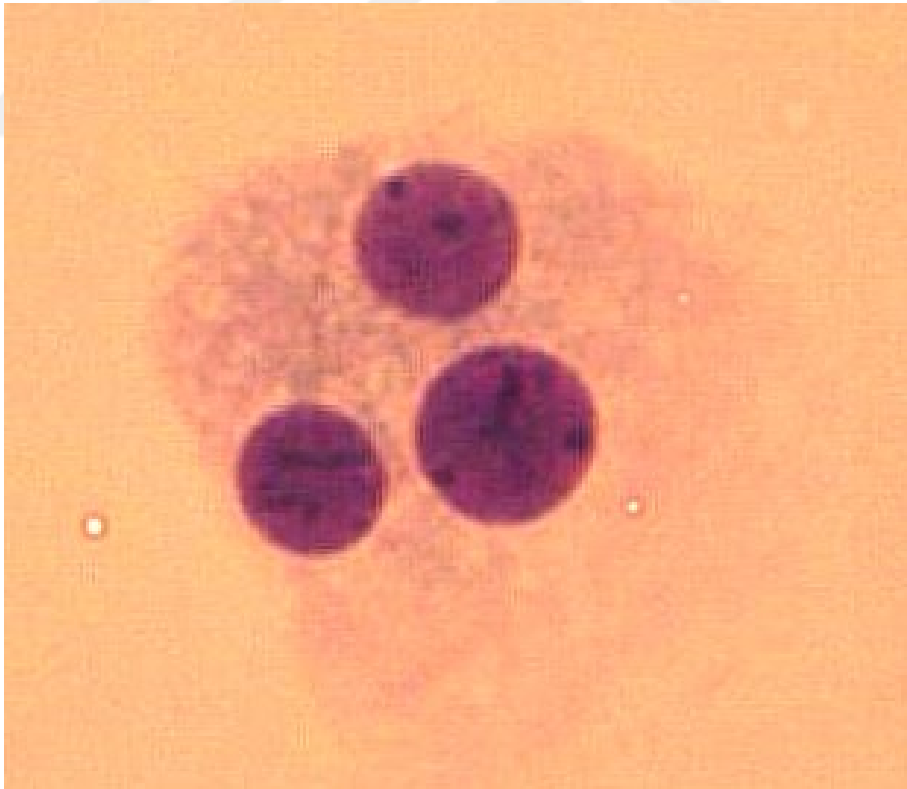
Formüle göre, *MI* bir nükleuslu (Şekil 3.12), *II* iki nükleuslu (Şekil 3.13), *III* üç nükleuslu (Şekil 3.14), *IV* dört nükleuslu (Şekil 3.15) hücrelerin sayısını, *N* ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal maddenin veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) (Nuclear Division Index=NDI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişide toplam 4000 hücre) incelenmiştir.



Şekil 3.14. Bir nükleuslu hücre (x1000)



Şekil 3.15. İki nükleuslu hücre (x1000)



Şekil 3.16. Üç nükleuslu hücre (x1000)



Şekil 3.17. Dört nükleuslu hücre (x1000)

3.2.10. Ames/Salmonella Bakteriyel Geri Mutasyon Testi

Ames Testinin Yapılış Amacı

Deneyin bilimsel esası, çoğalması için histidin amino asidine gereksinim duyan *Salmonella typhimurium* mutant oksotrofik suşların, mutajenik etkiler ile tekrar histidin sentezleyebilir atasal (prototrof) forma dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu yolla test maddelerinin neden olacağı geri mutasyonların frekansı saptanabilecektir. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 suşu ise baz çifti değişimi tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır. Ames testine metabolik aktivasyon olmaksızın çalışılmıştır.

Planlanan çalışma ile sitogeneotoksik etkinliği araştırılan test maddesinin (Triamonyum sitrat) mutajenik etkileri Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır.

Salmonella typhimurium Test Suşları

Maron ve Ames (1983) tarafından in vitro mutasyonlarla geliştirilen TA 98 ve TA 100 suşları ticari olarak temin edilip kullanılmıştır (Maron ve Ames,1983).

Salmonella Suşlarının Kültürlerinin Canlılıklarının Belirlenmesi

-80°C’de saklanan bakteri suşlarından bir öze yardımı ile kazıntı alınmıştır. TA 98 ve TA 100’ün Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına çizgi ekimleri yapıp 37°C’de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml Nutrient Broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek bir gece 16 saat 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde 140

rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Yeterli üremenin gözlenebilmesi için plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de 2 ay süre ile saklanabilmekte ve pasajlar yapılabilmektedir.

Bakteri Suşlarının Dondurulması ve Saklanması

Test suşlarının uzun süre canlılıklarını ve mutant özelliklerini koruyabilmek amacı ile dondurularak saklanmıştır. Bunun için steril edilmiş olan ependorf tüplerine önceden gecelik kültürü hazırlanan NB ortamından 500 µl bakteri alınarak üzerine 1:1 oranında olacak şekilde (500 µl) glisin eklenerek iyice karıştırılmıştır. -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra tekrar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Test suşları genetik özellikleri bozulmadan bu şekilde 3 yıl saklanabildiği rapor edilmektedir.

Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik Kontrolü

Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu his- bakteriler his+ bakterilerden ayırt edilir. Bu amaçla besiyerinden gecelik kültür hazırlanır. NB'da, bir gece üretilen bakterilerden sabah MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılır. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his- mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

Gecelik Kültürün Hazırlanması

Önceden hazırlanan ve -80 °C'de saklanan suş stokları eritilir ve 500 µl alınıp hazırlanan 50 ml NB ortamına ilave edilmiştir. 37°C'lik inkübatörde 16 saat süre ile üremeye bırakılmıştır.

Test Maddelerinin ve Dozlarının Belirlenmesi

KA, KKD ve MN testlerinde 0,5, 1 ve 2mg/ml olarak kullanılan dozlar, Ames testi için de kullanılan maddenin herhangi bir sitotoksik etkisi gözlemlenmediğinden dolayı OECD'ye göre Ames testi için en yüksek doz olarak 5mg/petri seçilmiştir. En yüksek konsantrasyonun seyreltilmesiyle 4, 3, 2, 1 mg/petri olacak şekilde alt dozlar da belirlenmiştir.

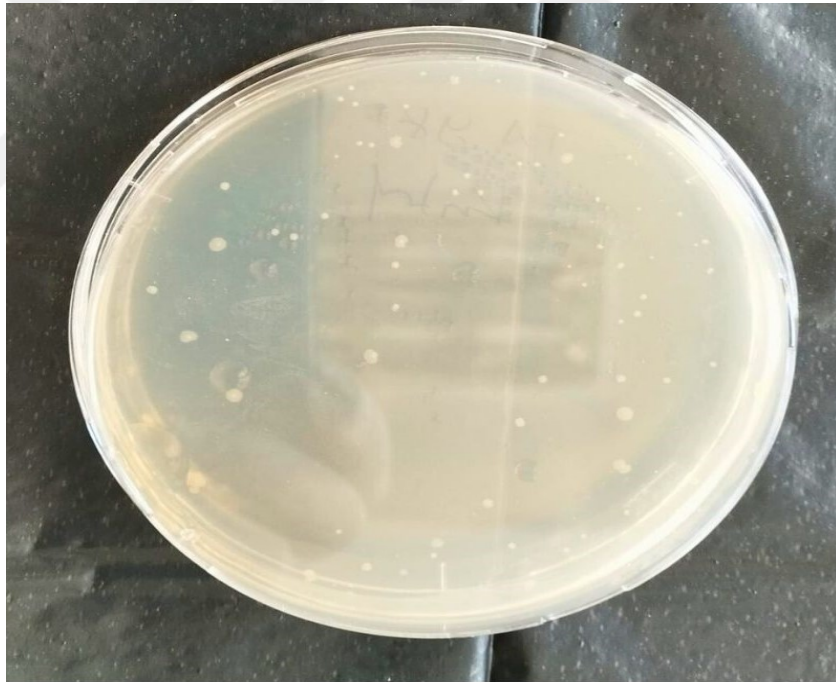
Pozitif Mutajenler

Suşların pozitif kontrollerini sağlamak amacı ile daha önceden mutajen oldukları tespit edilen kimyasal maddeler kullanılmıştır. S. typhimurium TA 98 için pozitif mutajen olarak 4-Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) (0.04 µg/petri) ve S. typhimurium TA 100 için Sodyum Azid (SA) (1 µg/petri) kullanılmıştır. Bu pozitif kontroller petri başına 100 µl olacak şekilde petrilere ilave edilmiştir.

Ames Testinin Yapılışı (Metabolik Aktivasyon Yokluğunda)

- Hazırlanan top (yumuşak) agar, otoklavda steril edilerek 45 °C'ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Bakterilerin yüksek sıcaklıkta ölmelerini engellemek için sıcaklık tayinine dikkat edilmiştir.

- Steril ortamda yapılan deneyde 2 ml top agardan (histidinli) alınıp, steril edilen tüpe aktarılmış ve gecelik kültür olarak hazırlanan NB ortamındaki bakterilerden 100 µl alınarak üzerine eklenmiştir.
- Daha önceden belirlenen dozlardan da (1, 2, 3, 4 ve 5mg/petri) 100 µl alınarak tüpe aktarılmış ve önceden hazırlanan MGA'lı plaklara dökülmüştür.
- Top agarın petri üzerinde homojen dağılmasını sağlamak için hızlı bir şekilde 8 işareti yapılmıştır.
- Petri kutularındaki agarların yoğunlaşması için 15 dk bekletildikten sonra petri kutuları ters çevrilerek 37°C'lik inkübatörde 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında petrilerdeki gözle görülür koloniler sayılmıştır.
- Elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi için de kontrol grupları kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak; TA98 suşu için 100 µl NPD, TA100 suşu için ise 100 µl sodyum azid top agar ve bakteri üzerine eklenmiştir.
- Her test konsantrasyonu 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.18. Salmonella typhimurium TA98 suşunun kontrol görünümü



Şekil 3.19. Salmonella typhimurium TA100 suşunun kontrol görünümü

3.2.11. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Testi

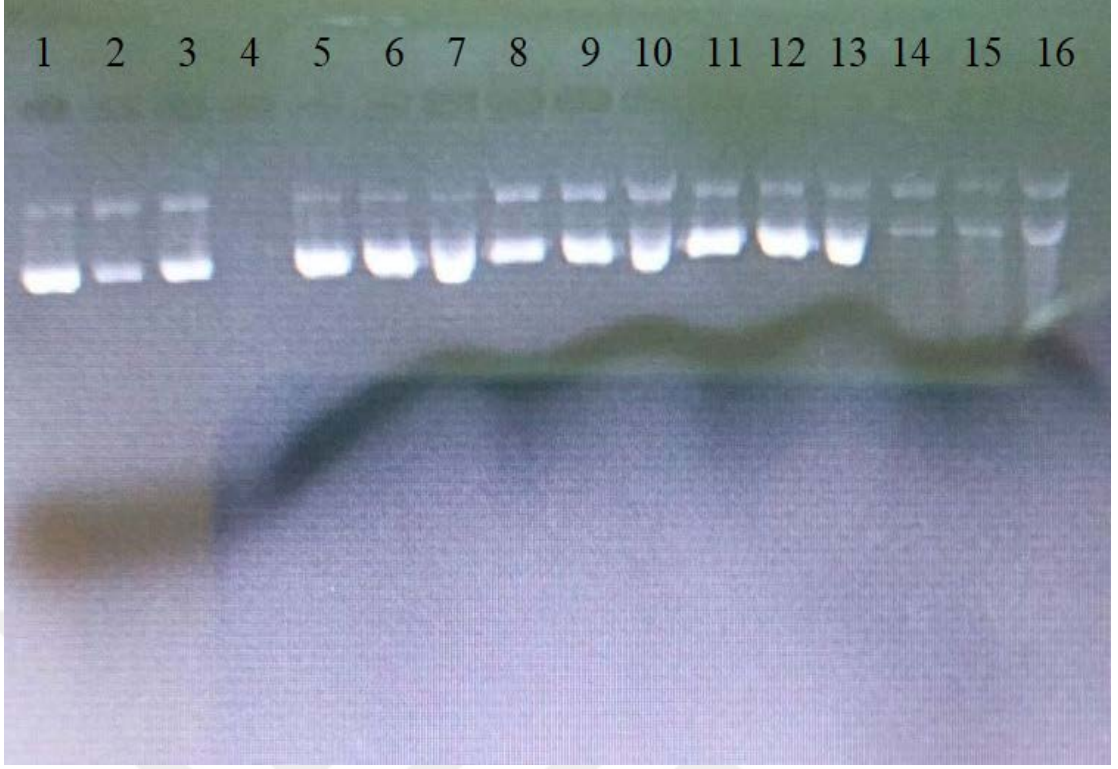
Bu çalışmada, test maddesinin doğrudan DNA hasarını uyarması veya tersine uyarılmış DNA hasarlarına karşı koruma aktivitesini belirlemek için pBR322 plazmid DNA (New England BioLabs inc. Cat. No. N3033S) kullanılmıştır. Doğrudan Triamonyum sitrat konsantrasyonlarına veya Triamonyum sitrat varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılan plazmid DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi için Russo ve arkadaşları (Russo ve ark., 2000) tarafından belirlenen metot modifiye edilerek kullanılmıştır (Russo ve ark.,2000).

- 0,5XTris Borik asit EDTA (TBE) elektroforez tamponu hazırlanmıştır (50 ml 10XTBE üzerine 950 ml distile su).
- %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır: 1 gr agaroz 100 ml 0,5XTBE tamponun içinde çözünene kadar ısıtılmış ve 60-70 °C sıcaklığa kadar soğuması beklenmiştir.
- 60-70°C sıcaklık aralığında gelince 5 µl DyeAll™ (Cat. No. SM-D01-001) DNA boyası agaroz jelin içine eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Elle tutulur sıcaklığa gelince tarakları yerleştirilmiş jel tankına dökülmüş ve jel donduktan sonra taraklar yavaşça çıkartılmıştır.
- Jel tankı, elektroforez yürütme tankına yerleştirilmiş ve elektroforez yürütme tankı 0,5XTBE tamponu ile doldurulmuştur.
- pBR322 plazmidi (172 ng/µl) hazırlanmıştır (34,4 µl pBR322 distile suyla 100 µl'ye tamamlanmış).

- Test edilecek örnekler hazırlanmıştır (Diğer testlerde kullanılan Triamonyum sitrat konsantrasyonlarının aynısı (0,5, 1 ve 2 mg/ml), pozitif kontrol olarak ise H₂O₂ ve UV kullanmıştır):

1. Kontrol: DNA (5 µl) + saf su (8 µl)
2. Kontrol: DNA (5 µl) + saf su (8 µl) + UV
3. Kontrol: DNA (5 µl) + saf su (5 µl) + H₂O₂ (3 µl)
4. Kontrol: DNA (5 µl) + saf su (5 µl) + UV + H₂O₂ (3 µl)
5. D(doz1): DNA (5 µl) + 1.doz (5 µl) + saf su (3 µl)
6. D(doz2): DNA (5 µl) + 2.doz (5 µl) + saf su (3 µl)
7. D(doz3): DNA (5 µl) + 3.doz (5 µl) + saf su (3 µl)
8. D(UV): DNA (5 µl) + 1.doz (5 µl) + saf su (3 µl) + UV
9. D(UV): DNA (5 µl) + 2.doz (5 µl) + saf su (3 µl) + UV
10. D(UV): DNA (5 µl) + 3.doz (5 µl) + saf su (3 µl) + UV
11. D(H₂O₂): DNA (5 µl) + 1.doz (5 µl) + H₂O₂ (3 µl)
12. D(H₂O₂): DNA (5 µl) + 2.doz (5 µl) + H₂O₂ (3 µl)
13. D(H₂O₂): DNA (5 µl) + 3.doz (5 µl) + H₂O₂ (3 µl)
14. D(2Pk): DNA (5 µl) + 1.doz (5 µl) + UV + H₂O₂ (3 µl)
15. D(2Pk): DNA (5 µl) + 2.doz (5 µl) + UV + H₂O₂ (3 µl)
16. D(2Pk): DNA (5 µl) + 3.doz (5 µl) + UV + H₂O₂ (3 µl)

- UV uygulanması gereken tüpler bir ultraviyole ışık kaynağı (UV lambası Camag, cıva tüplü 8000 µw'lık 302 nm kısa dalga boyu) altında 5-10 dk. UV ışığa maruz bırakılmıştır.
- Birinci tüpten 10 µl alınıp 3 µl jel yükleme boyası ile (Bromofenol boyası) karıştırılmış ve bu karışımdan 10 µl alınarak agaroz jeldeki birinci kuyucuğa yükleme yapılmıştır.
- Bu işlem sırayla bütün tüpler (16 tüp) için tekrarlanmış ve sonunda agaroz jelde 16 adet kuyucuğa yükleme yapılmıştır.
- Tankın kapağı kapatılarak, 100 V'ta 100 dk. yürütülmüştür (elektrik akımı uygulandığında moleküller porların içerisinden geçerek hareket etmeye başlarlar).
- Sürenin sonunda agaroz jel tanktan çıkarılarak jelde yürüyen DNA UV ışık altında görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3.20. DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi jel görüntüsü

3.2.12. CCK-8 Testi

CCK-8 testi hücrenin canlılığını ve metabolik aktivitesini saptamak amacıyla kullanılan oldukça hassas kolorimetrik bir yöntemdir. Herhangi bir maddenin sitotoksik veya sitostatik aktivitesini ölçmek için kullanılabilir. Testin esası canlı hücredeki dehidrojenaz enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak tetrazolium boyasını (WST-8, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) turuncu bir renge sahip çözünmeyen formazana indirgeme prensibine dayanmaktadır.

Çalışmamızda CCK-8 testi uygulanarak test maddesinin 0.5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarındaki sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

- MCF-7 ve NIH3T3 hücre hatları uygun hücre kültürü şartlarında büyütülmüştür.
- Hücresel çoğalmaya bağlı olarak hücre kültür kaplarında bulanıklık gözlemlendiğinde tripsinize edilip, her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 100'er µl ekim yapılmıştır.
- Deney her bir muamele saati ve doz için 4 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiştir.
- Hücreler plakalara ekildikten sonra 37 °C'de, %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Hücreler ekildikten sonra 24 veya 48 saat olarak muamele edilecek dozlar kuyulara ayrı ayrı eklenmiştir.

- Kontrol grupları olması için bir tane muamelesiz kontrol, bir tane de pozitif kontrol (H₂O₂) kullanılmıştır.
- Test maddesi uygulandıktan sonra toplamda hücreler 72 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresi bitmeden son 1 ila 4 saat arasında her bir kuyucuğa 10 µl CCK-8 reaktifi eklenmiştir. Bu süre hücrenin proliferasyon kapasitesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.
- Kit eklenmiş kuyular 37 °C’de, %5 CO₂ inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresi tamamlandığında hücreler bir mikropilaya okuyucuya konularak 450 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülerek hücre canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$HCO = \frac{\text{Muamele edilmiş örnek absorbanısı} - \text{Hüresiz kontrol absorbanısı}}{\text{Negatif kontrol absorbanısı} - \text{Hüresiz kontrol absorbanısı}} \times 100$$

3.2.13. *In silico* Moleküler Kenetlenme Analizi

Bu çalışmada gözlemlenen sitogenotoksik etkinin moleküler temellerini irdellemek ve birincil test bileşiği olan Triamonyum sitrat'ın (TS) hücrel makromoleküllerle potansiyel etkileşim profillerini *in silico* yöntemlerle öngörmek amacıyla moleküler kenetlenme simülasyonları yürütülmüştür. Hesaplamalı yapısal biyoloji alanında geçerliliği kanıtlanmış, açık kaynak kodlu AutoDock Vina (Sürüm 1.2.2) yazılımı [Trott & Olson, 2010], ligand-protein etkileşimlerini modellemek ve bağlanma afinitelerini tahmin etmek için tercih edilmiştir. Simülasyonlar, TS'nin seçilen hedef proteinlere bağlanma potansiyelini, bilinen genotoksik ajanlar ve spesifik inhibitörlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Ligand Veri Setinin Oluşturulması ve Rasyoneli:

Kenetlenme analizlerinde kullanılacak ligandların üç boyutlu (3B) konformasyonel yapıları, güvenilirliği yüksek biyokimyasal veri tabanlarından derlenmiştir. Bu analizlerdeki temel amaç, test bileşiği Triamonyum sitrat'ın (TS) seçilen hedef proteinlerle potansiyel etkileşimlerini, bilinen bir genotoksik ajan ve hedefe özgü referans inhibitörlerle karşılaştırmaktır. Bu karşılaştırmalı yaklaşım için aşağıdaki ligandlar seçilmiş ve yapıları PubChem veritabanı ve DrugBank veritabanından temin edilmiştir:

Test Bileşiği: Çalışmanın odak noktası olan Triamonyum sitrat (TS) [PubChem ID: 18954]. TS'nin her dört hedef proteine de kenetlenmesi planlanmıştır.

Genel Kontrol: *In vitro* genotoksisiteye referans sağlamak ve kenetlenme protokolünün genel performansını değerlendirmek amacıyla, DNA kovalent modifikasyon ajanı Mitomisin C (MMC) [PubChem ID: 5746] pozitif kontrol olarak seçilmiştir. MMC de TS gibi her dört hedef proteine karşı kenetlenecektir.

Hedefe Özgü Referans İnhibitörler: Her protein için, TS ve MMC'nin bağlanma modlarını ve afinitelerini, o proteinin fonksiyonunu etkilediği bilinen spesifik bir molekülle kıyaslamak amacıyla referans inhibitörler dahil edilmiştir. Bu sayede TS'nin bağlanmasının özgünlüğü ve potansiyel biyolojik anlamlılığı daha iyi değerlendirilebilecektir:

DNA Polimeraz δ (Pol δ) için: Bilinen inhibitörü Aphidicolin [DrugBank ID: DB04131]. Bu protein için kenetlenen ligandlar: TS, MMC, Aphidicolin.

DNA Topoizomeraz 1 (Top1) için: Spesifik inhibitörü Camptothecin [DrugBank ID: DB00787]. Bu protein için kenetlenen ligandlar: TS, MMC, Camptothecin.

Glutamat Dehidrojenaz 2 (GLUD-2) için: Bilinen inhibitörü olan 7-kloro-4-okso-1H-kinolin-2-karboksilik asit (7-CKA) [PDB ID:5CC2]. Bu protein için kenetlenen ligandlar: TS, MMC, EGCG.

Glutamin Sentetaz (GLUL) için: İnhibitör etkisi bilinen Methionine sulfoximine fosfat+ADP (MSOP + ADP) [PDB ID: 2QC8]. Bu protein için kenetlenen ligandlar: TS, MMC, MSOP + ADP.

Bu kapsamlı ligand seti ve hedef protein eşleşmeleri, TS'nin potansiyel etkileşim mekanizmalarını çok yönlü bir şekilde analiz etme ve elde edilen *in silico* bulguları, bilinen biyolojik aktivitelere sahip moleküllerin davranışları bağlamında yorumlama olanağı tanımaktadır.

Hedef Proteinlerin Seçimi ve Yapısal Hazırlığı:

TS'nin potansiyel moleküler hedefleri olarak, DNA replikasyonu/onarımı (Pol δ , Top1) ve hücrel metabolizma/stres yanıtı (GLUD-2, GLUL) gibi sitogenotoksiste ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili dört anahtar enzim belirlenmiştir. Bu proteinlerin yüksek çözünürlüklü 3B yapıları Protein Data Bank (PDB) veritabanından (www.rcsb.org) aşağıdaki PDB giriş kodları kullanılarak indirilmiştir: DNA Polimeraz δ (PDB: 6TNY), DNA Topoizomeraz 1 (PDB: 1A36), Glutamat Dehidrojenaz 2 (PDB: 6G2U) ve Glutamin Sentetaz (PDB: 8DNU). İndirilen ham PDB dosyaları, moleküler kenetlenme simülasyonları öncesinde su moleküllerinin uzaklaştırılması, Kollman yüklerinin atanması ve polar hidrojenlerin eklenmesi gibi standart ön işlem adımlarına tabi tutulmuştur.

Bağlanma Bölgesi Tanımlaması ve Izgara Kutusu Parametreleri:

Ligandların proteinler üzerindeki potansiyel bağlanma bölgelerinin doğru bir şekilde tanımlanması, anlamlı kenetlenme sonuçları elde etmek için esastır. Bu çalışmada, her bir hedef protein için bağlanma cebi şu şekilde belirlenmiştir:

Pol δ (6TNY): Lancey ve ark. (2020) tarafından rapor edilen yapısal analizler ve potansiyel substrat/inhibitör bağlanma bölgesi bilgileri temel alınarak, Discovery Studio (Sürüm 25.1.0.24284, BIOVIA, Dassault Systèmes, 2025) yazılımı ile yapılan görsel incelemeler sonucunda aktif bölgeyi çevreleyen amino asit kalıntıları tanımlanmıştır.

Top1 (1A36), GLUD-2 (6G2U), GLUL (8DNU): Bu proteinler için bilinen aktif veya allosterik bölgeler, sırasıyla Stewart ve ark. (1998), Dimovasili ve ark. (2021) ve Tringides ve ark.

(2023) tarafından literatürde tanımlanan spesifik amino asit kalıntıları referans alınarak belirlenmiştir.

AutoDock Vina simülasyonları için, tanımlanan bu bağlanma bölgelerini merkez alan ve ligandın olası tüm yönelimlerini keşfetmesine izin verecek yeterli büyüklükte üç boyutlu bir arama uzayı (ızgara kutusu) tanımlanmıştır. Her bir protein-ligand sistemi için kullanılan ızgara kutusu merkezi (X, Y, Z koordinatları), boyutları (X, Y, Z eksenlerindeki nokta sayısı) ve ızgara noktaları arasındaki çözünürlük (Ångström cinsinden aralık) değerleri Çizelge 3.2'de sunulmuştur. Bu parametreler, bağlanma cebini tamamen kapsayacak ve kenar etkilerini en aza indirecek şekilde dikkatlice ayarlanmıştır.

Kenetlenme Simülasyonu ve Sonuç Analizi:

AutoDock Vina'nın Lamarckian Genetik Algoritması tabanlı arama algoritması ve ampirik skorlama fonksiyonu kullanılarak, her bir ligand molekülünün ilgili hedef proteinin tanımlanmış bağlanma bölgesine en düşük enerjili bağlanma pozları (konformasyonları) araştırılmıştır. Skorlama fonksiyonu, bu en uygun bağlanma pozisyonu için tahmini serbest bağlanma enerjisini ($\Delta G_{\text{bağlanma}}$, kcal/mol cinsinden) hesaplar; bu değer, etkileşimin termodinamik kararlılığının bir göstergesidir (daha negatif değerler daha güçlü bağlanmayı ima eder). Her bir kenetlenme analizi için elde edilen en düşük enerjili (en iyi skora sahip) poz, ligandın proteine bağlanma biçimini temsil ettiği varsayılarak daha ileri analizler için seçilmiştir. Bu analizler, Discovery Studio v25.1 kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, ligand ile protein arasındaki hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, π -etkileşimleri ve diğer non-kovalent temasların ayrıntılı olarak incelenmesini içermiştir. Bu etkileşimlerin analizi, bağlanma modunun moleküler temelini anlamak ve TS'nin referans ligandlara kıyasla farklılıklarını veya benzerliklerini belirlemek için kritik öneme sahiptir.

Çizelge 3.2. Moleküler Kenetlenme Simülasyonları İçin Tanımlanan Izgara Kutusu Parametreleri

Hedef Protein (PDB ID)	İlişkili Ligand Grubu	Izgara Merkezi (X, Y, Z) (Å)	Izgara Boyutları (X, Y, Z) (nokta)	Izgara Aralığı (Å)	Referans Kaynak (Bölge Tanımı)
DNA polimeraz delta (6TNY)	TS, MMC, Aphidicolin	152.146, 204.405, 205.209	35, 35, 35	0.375	Lancey et al., 2020
DNA Topoizomeraz 1 (1A36)	TS, MMC, Camptothecin	17.157, 28.927, 32.508	28, 28, 28	0.375	Stewart et al., 1998
Glutamat dehidrojenaz 2 (GLUD-2) (6G2U)	TS, MMC, 7-CKA	91.906, 29.373, 122.037	88, 88, 88	0.375	Dimovasili et al., 2021
Glutamin sentetaz (GLUL) (8DNU)	TS, MMC, MSO-P + ADP	173.899, 147.117, 167.481	30, 30, 30	0.375	Tringides et al., 2023

3.3. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm nicel veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur. İstatistiksel test seçimi, verilerin parametrik test varsayımları açısından değerlendirilmesini takiben belirlenmiştir. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi kullanılarak, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Bu varsayımları karşılayan (yani normal dağılan ve varyansların homojenliğini gösteren) veriler için, istatistiksel karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından kontrol grubuna karşı çoklu karşılaştırmalar için Dunnett'in post-hoc testi kullanılarak yapılmıştır. Bu varsayımları ihlal eden veriler için, parametrik olmayan eşdeğeri olan Kruskal-Wallis testi kullanılmış, ardından ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Dunn'ın post-hoc testi uygulanmıştır. Analizler için 0,05'ten küçük bir p-değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm istatistiksel testler SPSS yazılımı (v.25.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada, test maddesi olarak Triamonyum sitrat (E380) bileşiği kullanılmıştır. Bu ajanın sitotoksik, genotoksik ve mutajenik potansiyelini değerlendirmek amacıyla kapsamlı bir deneysel yaklaşım benimsenmiştir.

Test maddesinin sitotoksik etkileri, meme kanseri (MCF7) ve fare embriyonik böbrek fibroblast (NIH3T3) hücre hatlarında hücre canlılığını ölçen Hücre Sayım Kiti-8 (CCK-8) testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, genotoksisite testleri kapsamında değerlendirilen Mitotik İndeks (MI), Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) ve Proliferasyon İndeksi (PI) verileri, hücre proliferasyonu ve bölünme dinamikleri hakkında kritik bilgiler sağlamıştır.

Genotoksik etkiler, insan periferik kan lenfosit kültürlerinde gerçekleştirilen Kromozom Anormallliği (KA), Mikronükleus (MN) ve Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testleriyle değerlendirilmiştir. Ek olarak, test maddesinin doğrudan DNA hasarı (zincir kırıkları veya oksidatif hasar) oluşturma veya hasara karşı koruma potansiyeli, plazmid DNA testi ile incelenmiştir.

Mutajenik etkilerin belirlenmesi için ise Ames geri mutasyon testi (*Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları) kullanılmış; revertant koloni sayıları üzerinden analiz yapılmıştır.

4.1.1. CCK-8 Testi ile Sitotoksisite Analizi

Bu çalışmada, gıda katkı maddesi olarak yaygın kullanılan Triamonyum sitrat (TS, E380) bileşiğinin sitotoksik etkileri, meme kanseri (MCF-7) ve fare embriyonik fibroblast (NIH3T3) hücre hatları üzerinde CCK-8 testi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığına ait veriler, bileşiğin 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinde gösterdiği konsantrasyon-bağımlı etkileri ortaya koymak amacıyla analiz edilmiştir. Deney tasarımının geçerliliğini sağlamak üzere pozitif kontrol olarak kullanılan %4'lük H₂O₂, her iki hücre hattında da (MCF-7 ve NIH3T3) hem 24 hem de 48 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir canlılık azalmasına yol açmıştır ($p \leq 0.001$, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında). Bu bulgu, deney koşullarının sitotoksisite tespiti için uygunluğunu ve sistemin duyarlılığını doğrulamaktadır. Elde edilen sonuçlar, TS'nin kanser ve normal hücre hatları üzerindeki etki mekanizmalarının karşılaştırmalı analizi için temel oluşturmuştur.

Triamonyum sitrat bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının (0,25; 0,5; 1 ve 2 mg/ml) MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri, 24 saatlik maruziyet sonrasında değerlendirildiğinde, genel olarak muamelesiz kontrol grubuna oldukça yakın hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir. Bununla birlikte, 0,5 mg/ml konsantrasyonu ile muamele edilen grupta hücre canlılığında belirgin gibi görünen bir azalma ($88,44 \pm 0,733$) saptanmış olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 48 saatlik maruziyetin ardından elde edilen bulgular ise, 24 saatlik uygulamanın aksine, paradoksal bir şekilde hücre canlılığında artış olduğunu göstermiştir. Ancak bu artışlar hem

sayısal açıdan birbirine yakın değerler sergilemiş hem de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, test sisteminin ayırt ediciliğini artırmak amacıyla, hücre canlılığını düşürdüğü bilinen pozitif kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, beklendiği üzere tüm deney gruplarının üçüncü seviyede anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

NIH3T3 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyet etkileri incelendiğinde, Triamonyum sitratın 0,25 mg/ml ($99,16 \pm 1,371$), 0,5 mg/ml ($101,37 \pm 1,243$), 1 mg/ml ($99,57 \pm 0,653$) ve 2 mg/ml ($96,63 \pm 2,991$) konsantrasyonlarında hücre canlılığı değerleri muamelesiz kontrol grubu ($100 \pm 0,000$) ile benzer seviyelerde seyretmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu bulgu, her ne kadar istatistiki olarak arada anlamlı bir fark olmasa da NIH3T3 hücre hattının 24 saatlik maruziyette Triamonyum sitrata karşı MCF-7 hücre hattına göre daha dirençli olabileceğini sayısal değerler ile göstermektedir.

NIH3T3 hücre hattında 48 saatlik maruziyet etkileri değerlendirildiğinde, Triamonyum sitratın 0,25 mg/ml ($95,90 \pm 0,336$), 1 mg/ml ($95,55 \pm 0,367$) ve 2 mg/ml ($92,27 \pm 903$) konsantrasyonlarında hücre canlılığı değerlerinde her ne kadar istatistiki olarak anlamlı olmayan azalmalar mevcutsa da canlılık değerinin düşen bir trendde olduğu bariz ortadadır. Özellikle 2 mg/ml konsantrasyonundaki azalma diğer dozlara göre belirgin düzeydedir. Buna karşın, 0,5 mg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığı değeri ($101,09 \pm 0,579$) muamelesiz kontrol grubu ($100 \pm 0,000$) ile benzer seviyede kalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. NIH3T3 hücre hattında 48 saatlik maruziyetin, 24 saate göre daha belirgin bir şekilde hücre canlılığını konsantrasyona bağımlı olarak düşürüyor görünse de bu bulguların hiçbirisi istatistiki olarak negatif kontrolden anlamlı derecede farklı bulunmamıştır.

Özetle, CCK-8 testi bulguları, Triamonyum sitrat bileşiğinin fare embriyo fibroblast hücrelerinde artan süre ve konsantrasyonla birlikte hücre canlılığında azalma eğilimine yol açtığını ortaya koymuştur. Buna karşın, adenokarsinom kökenli MCF-7 hücre hattında, bu eğilimin aksine, artan süre ve konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırıcı yönde bir etki olabileceğine işaret eden veriler elde edilmiştir. Ancak, her iki hücre grubunda da gözlemlenen bu değişimlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat (TS) bileşiğine 24 veya 48 saat süre boyunca maruz bırakılmış MCF-7 ve NIH3T hücre hatlarında ölçülen ortalama canlılık değerleri

Test maddesi	Süre (Saat)	Konsantrasyon (mg/ml)	MCF-7 Ortalama canlılık değeri ± SH	NIH3T3 Ortalama canlılık değeri ± SH
PK (H ₂ O ₂)	24	%4	6,5848±0,756	5,917±0,037
TS		0	100,000±0,000 a3	100,000±0,000 a3
		0,25	97,452±0,631 a3	99,167±1,371 a3
		0,5	88,447±0,733 a3	101,376±1,243 a3
		1	96,865±0,766 a3	99,578±0,653 a3
		2	98,315±1,015 a3	96,633±2,991 a3
PK (H ₂ O ₂)	48	%4	1,132±0,024	1,097±0,031
TS		0	100,000±0,000 a3	100,000±0,000 a3
		0,25	105,856±0,264 a3	95,909±0,336 a3
		0,5	103,299±1,184 a3	101,092±0,579 a3
		1	101,103±1,074 a3	95,559±0,367 a3
		2	101,765±1,417 a3	92,275±903 a3

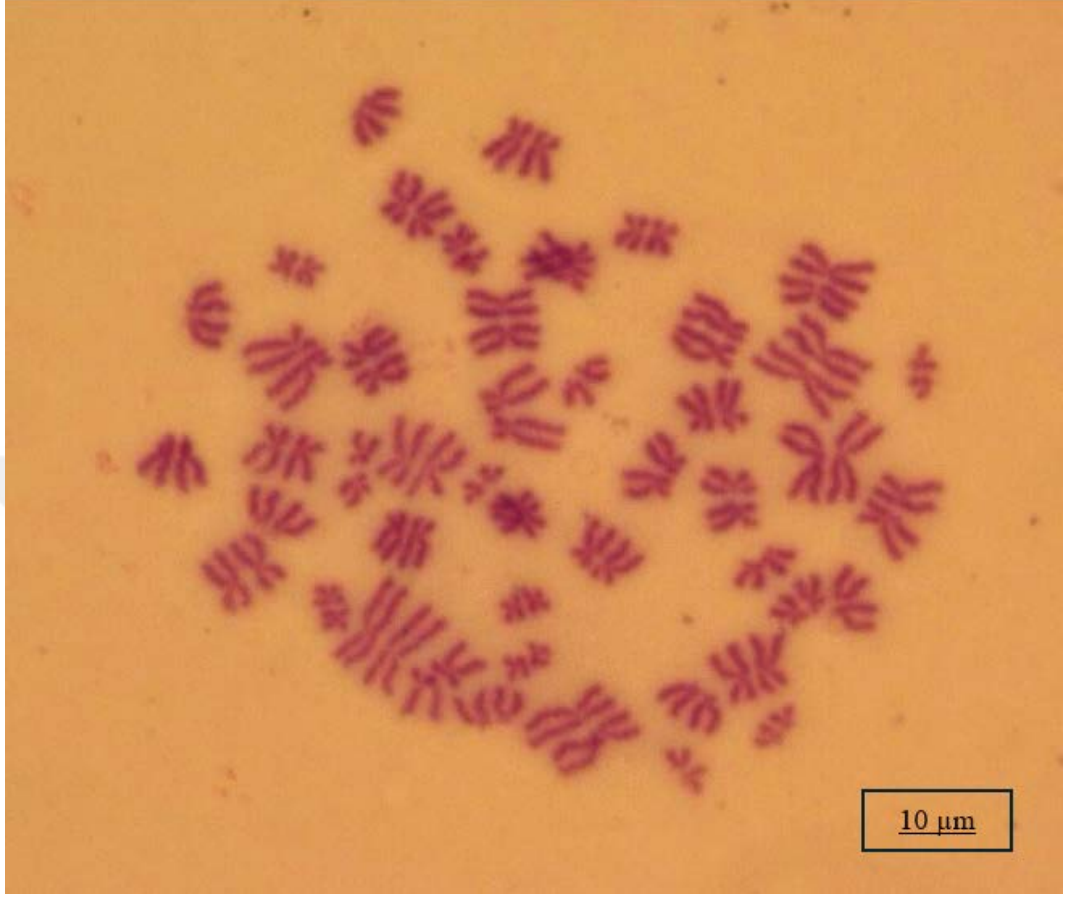
a: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a3: $P \leq 0.001$

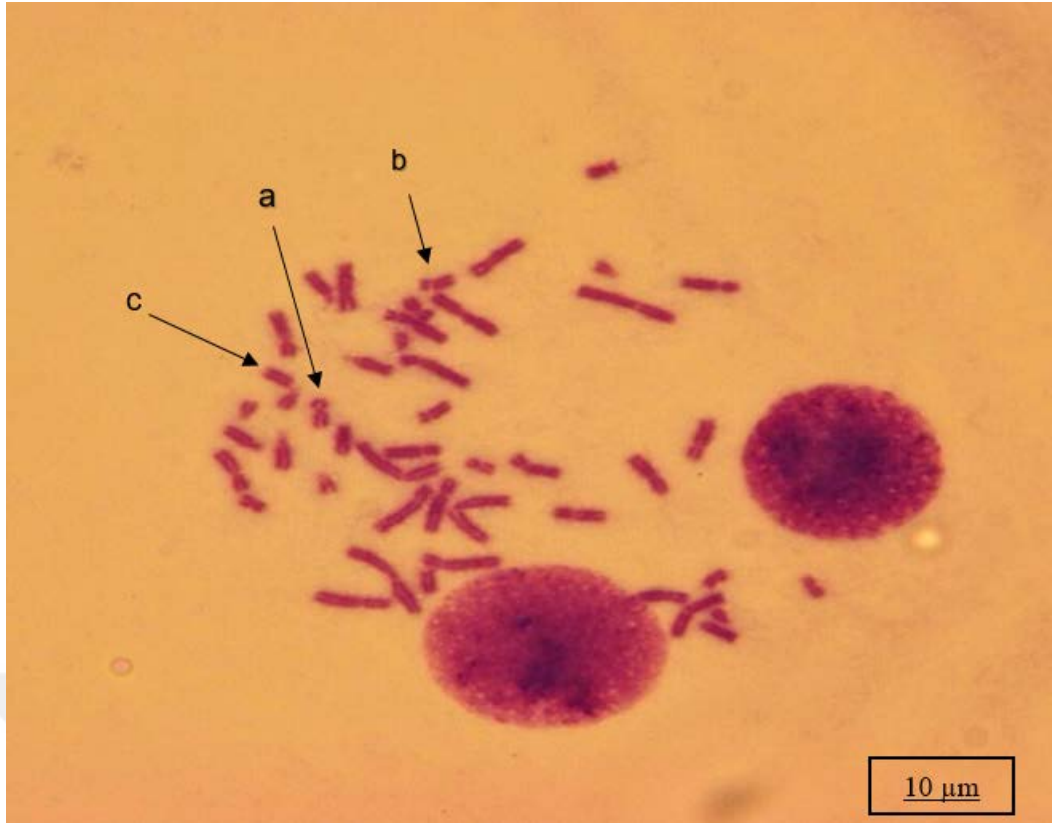
4.1.2. Triamonyum Sitratin Kromozom Anormallliği Üzerine Etkisi

Triamonyum sitratin (TS) genotoksik potansiyelini değerlendirmek amacıyla, sağlıklı insan periferik lenfosit kültürleri, ön çalışmalar ve literatür verileri ışığında seçilen 0.5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında TS ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Sitogenetik analizler sonucunda elde edilen kromozomal anormalliklerin tipleri, sıklığı ve dağılımı Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Tabloda, anormal hücre yüzdesi (AH%), hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı (KA/Hücre) ve mitotik indeks (MI) değerlerinin yanı sıra, TS’nin konsantrasyon ve süre bağımlı etkileri nicel olarak karşılaştırılmıştır. Gözlemlenen anormallikler arasında en baskın tip, toplam 450 adet ile kromatid kırıkları (B') olurken; bunu sırasıyla kromozom kırıkları (B", 289 adet), kromozom tipi fragmentler (F", 61 adet) ve diğer yapısal/kantitatif anomaliler (KD, P, DS, F", SU, endoreduplikasyon) izlemiştir (Şekil 4.1-4.11). Bu heterojen anormallik profili, TS’nin

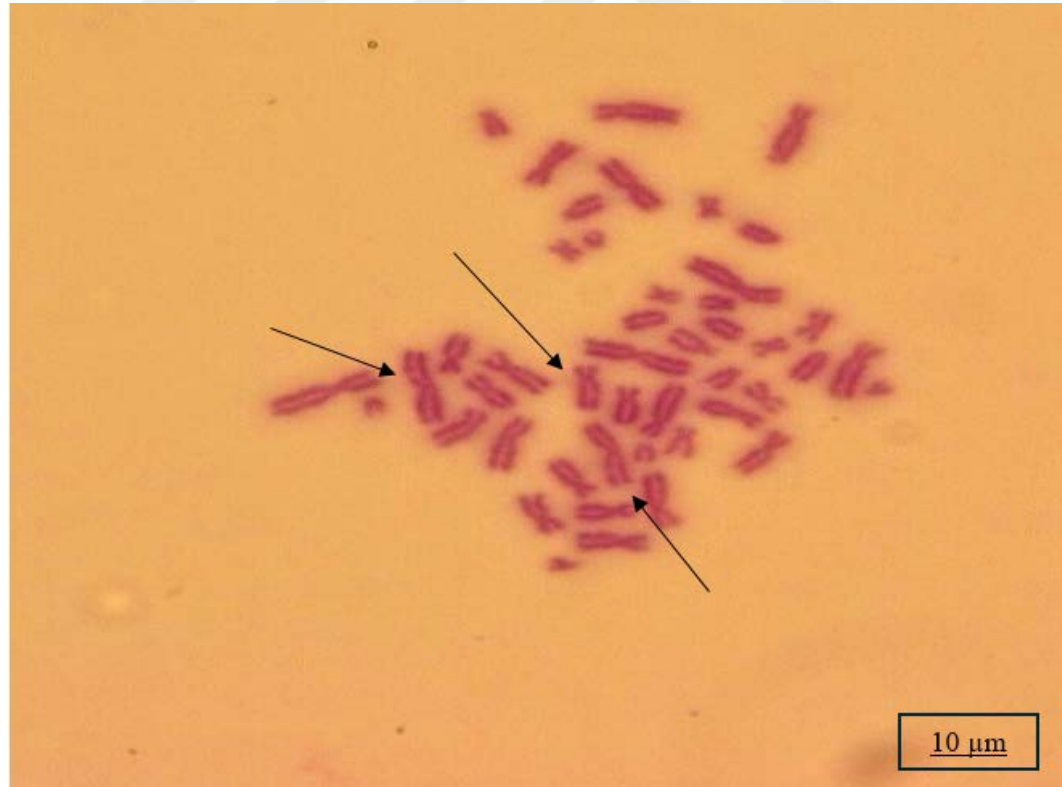
hücre döngüsü dinamiklerini bozarak hem yapısal (kırık, değişim) hem de sayısal (poliploidi, endoreduplikasyon) kromozomal hasar mekanizmalarını tetikleyebileceğine işaret etmektedir.



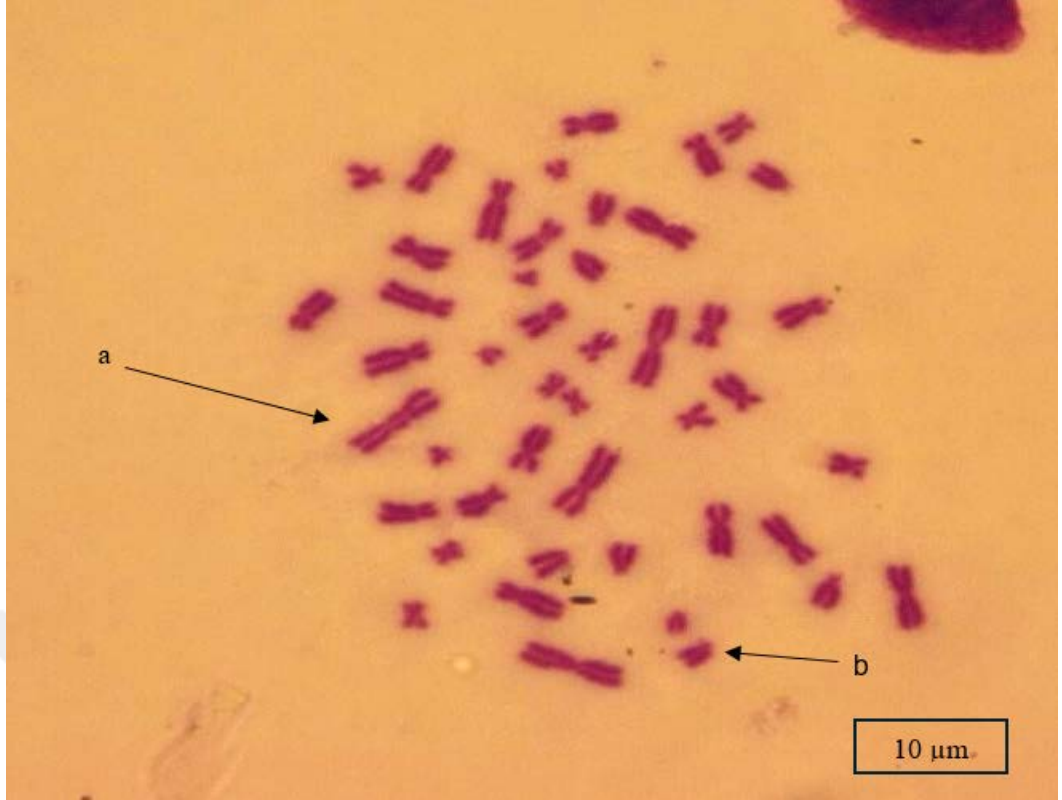
Şekil 4.1. Endoreduplikasyon (ER) bulunan metafaz plağı (x1000)
(0,5 mg/ml TS, 24 saat muamele ♀)



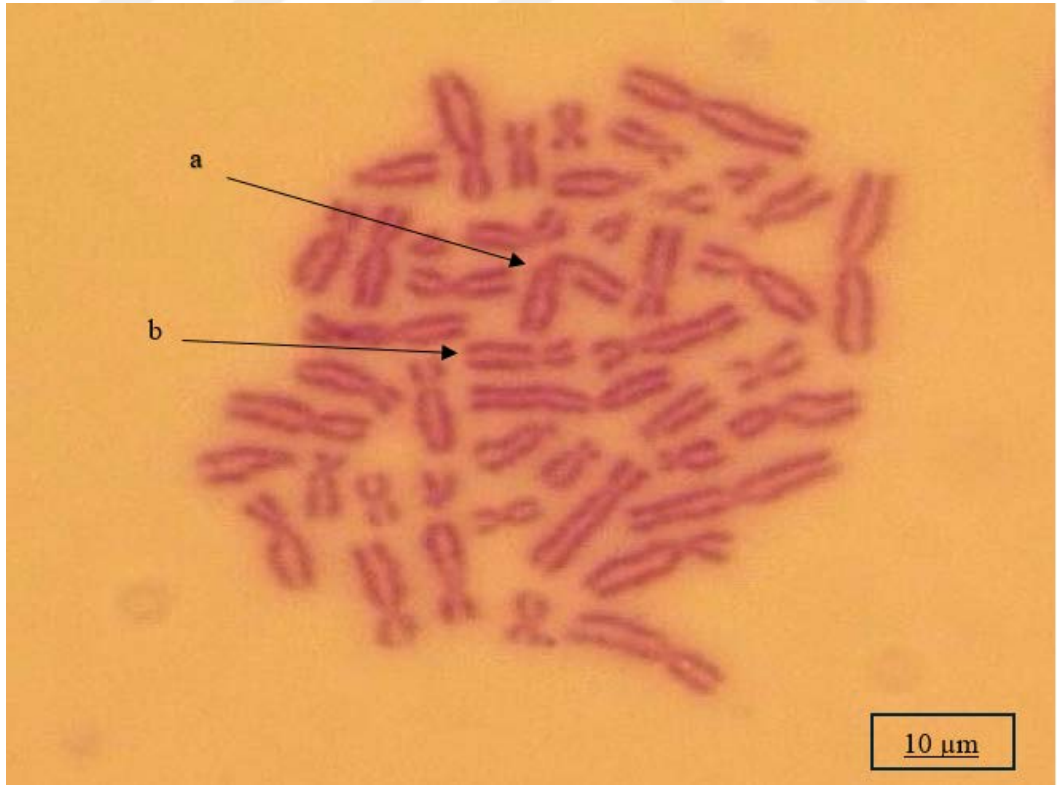
Şekil 4.2. (a) Sister Union (SU) ve (b) (c) kromozom kırıkları (B') bulunan metafaz plağı (x1000) (100 μM MMC, 48 saatlik muamele ♂)



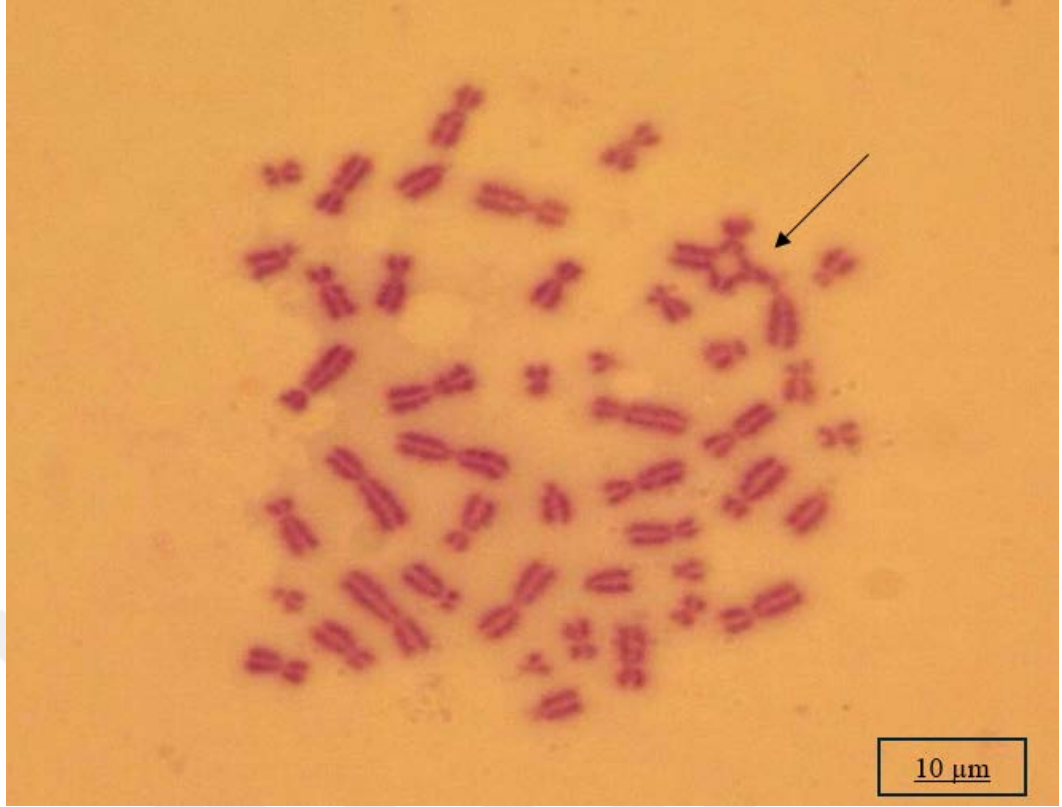
Şekil 4.3. Kromatid tipi (B'') kırıklar bulunan metafaz plağı (x1000) (2 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂)



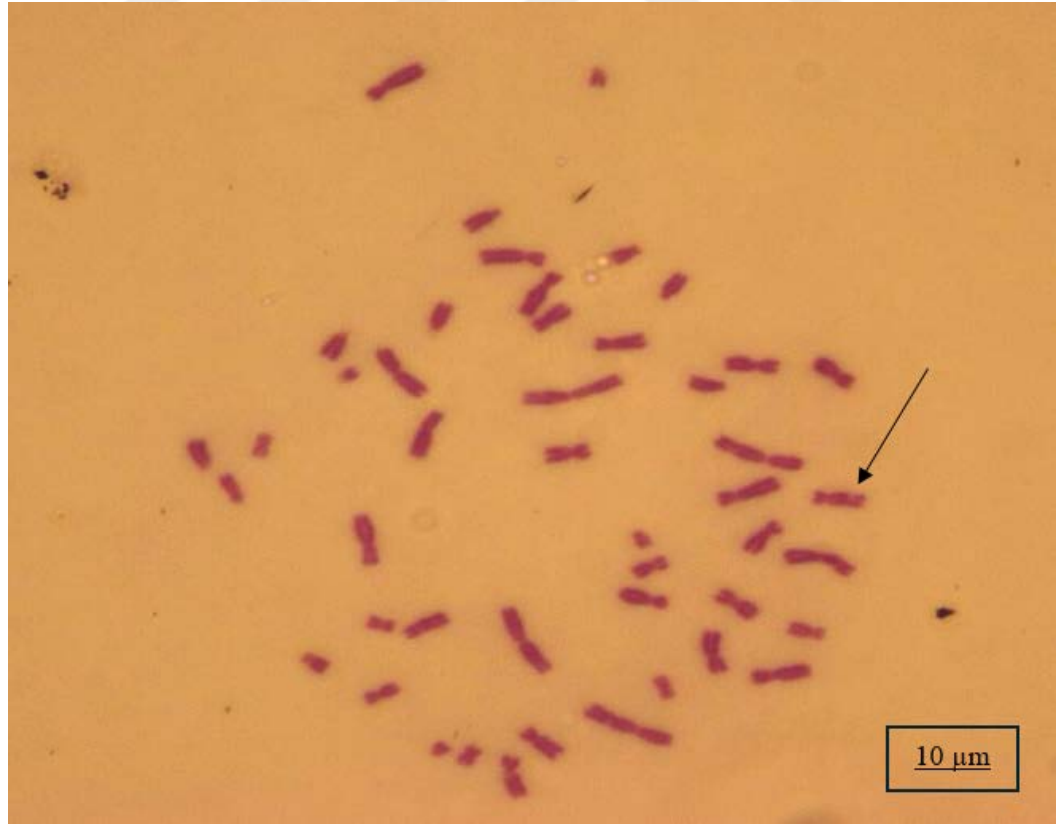
Şekil 4.4. (a) Disentrik kromozom (DS) ve (b) kromozom fragmenti (F') bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 24 saatlik muamele ♂)



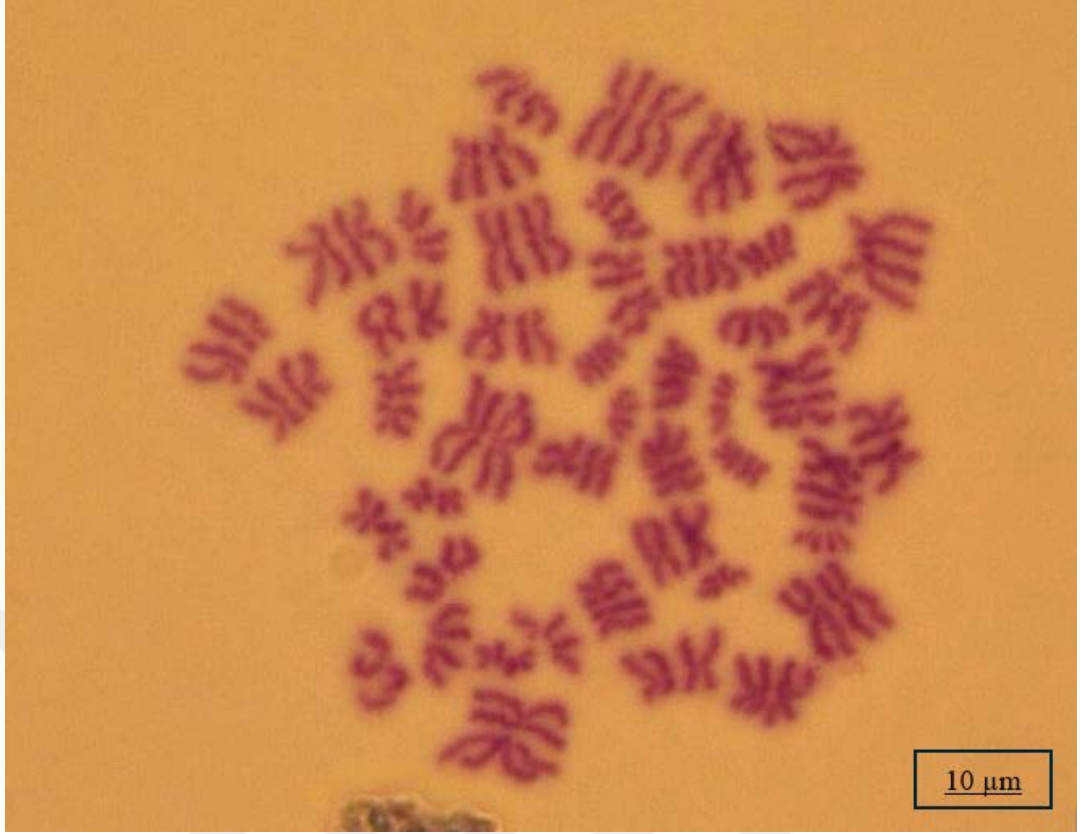
Şekil 4.5. (a) Kromatid (B') kırığı ve (b) kromozom (B'') kırığı bulunan metafaz plağı (x1000) (0,5 mg/ml TS, 24 saatlik muamele ♂)



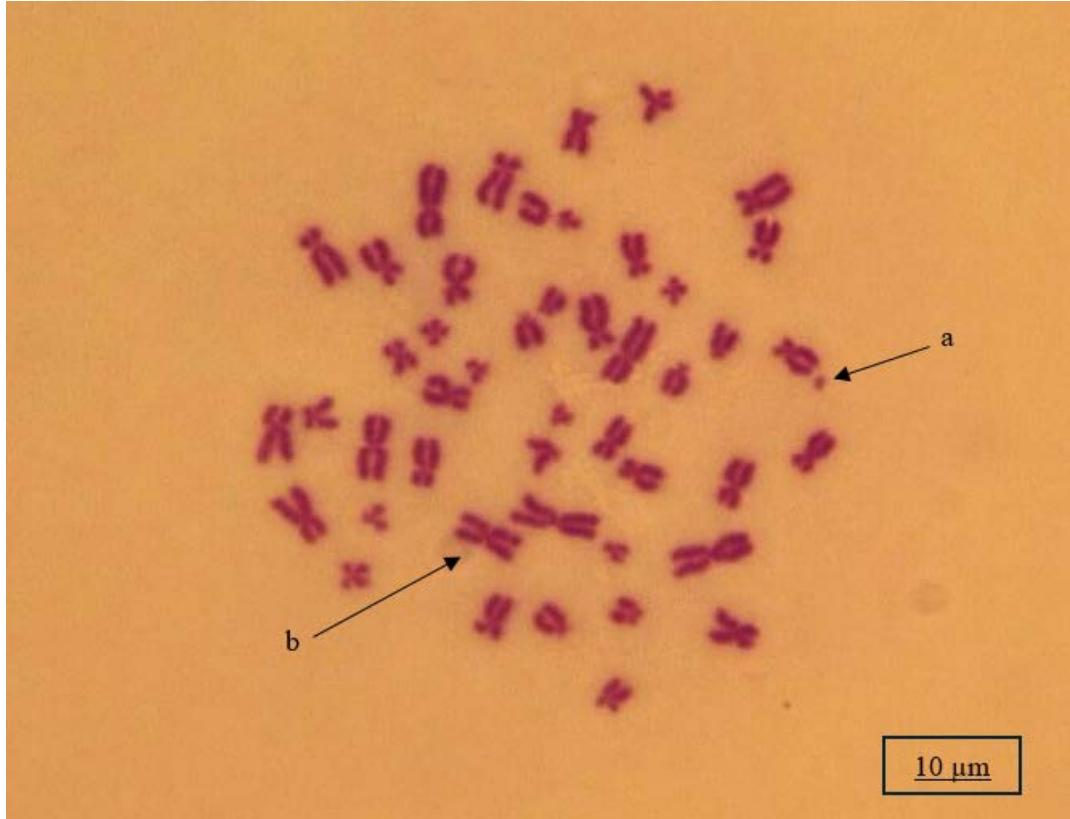
Şekil 4.6. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz (x1000) (100 µM MMC, 48 saat muamele ♀)



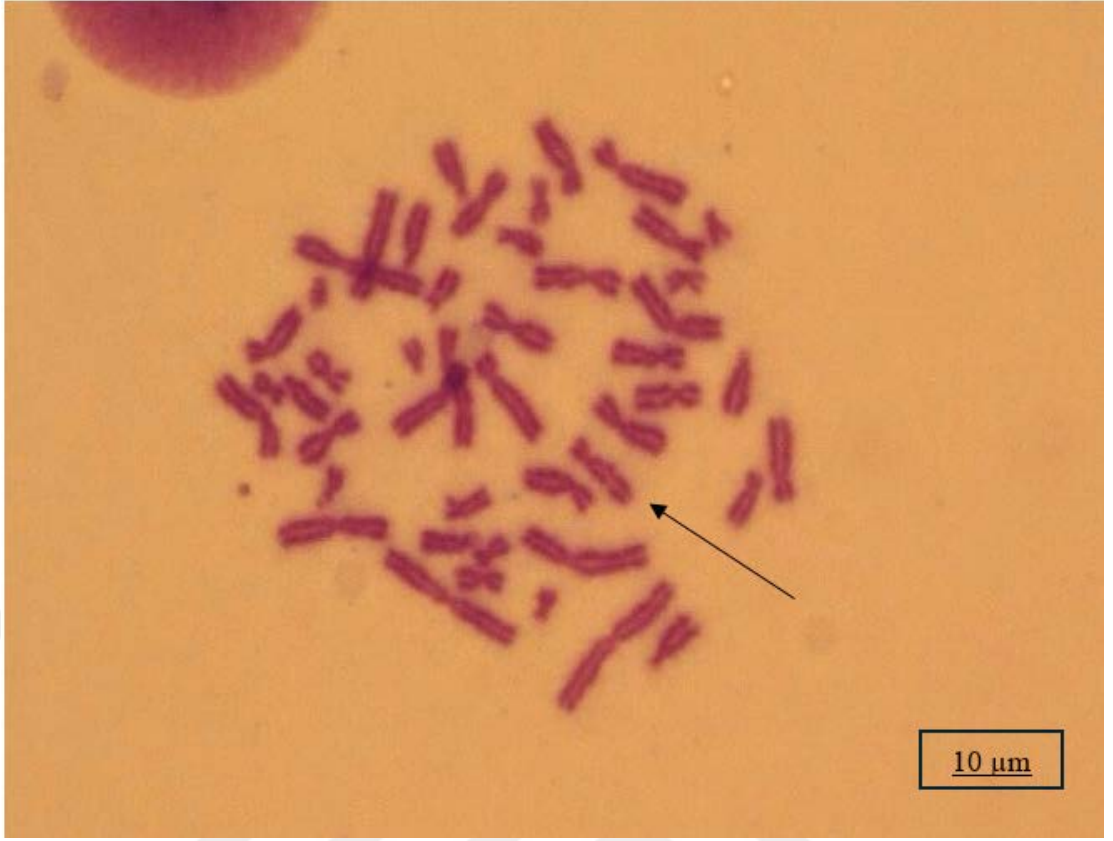
Şekil 4.7. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 48 saatlik muamele ♀)



Şekil 4.8. Endoreduplikasyon (ER) bulunan metafaz plağı (x1000)
(1 mg/ml TS, 48 saatlik muamele ♀)



Şekil 4.9. (a) Kromatid tipi fragment (F') ve (b) kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (x1000)
(1 mg/ml TS, 24 saatlik muamele ♀)



Şekil 4.10. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (x1000)
(0,5 mg/ml TS, 48 saatlik muamele ♂)

Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat bileşiği ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, %Anormal Hücre KA/Hücre* ve Mitotik İndeks

Test maddesi	Muamele		Anormallik çeşitleri								%Anormal hücre±SH	KA/Hücre±SH	MI±SH**
	Süre (saat)	Kons. (mg/ml)	B''	F''	B'	F'	SU	KD	DS	P	ER		
PK (MMC)	24	10 µl	92	8	120	1	-	12	5	1	1	0,6±0,033	1,18±0,05
		0	12	4	23	3		1	3	-	-	10,5±0,64 a3	4,06±0,42
		0,5	13	5	34	-	-	-	-	3	3	0,145±0,011 a3	3,25±0,81
		1	23	2	35	-	1	-	-	1	-	0,155±0,009 a3	3,48±0,51
		2	14	10	20	-	1	2	1	4	-	0,13±0,008 a3	3,22±1,07
PK (MMC)	48	10 µl	71	21	106	7	2	12	7	5	-	0,577±0,055	0,80±0,02
		0	12	4	23	3	2	1	3	-	-	0,12±0,012 a3	4,06±0,42
		0,5	17	2	35	-	2	-	1	3	1	0,152±0,010 a3	3,93±0,42
		1	15	3	27	-	2	-	1	3	1	0,13±0,012 a3	2,95±0,52
		2	20	2	27	1	-	1	1	4	1	0,142±0,011 a3	2,91±0,96

B'': Kromozom Kırığı, F'': Kromozom Tipi Fragment, B': Kromatid Kırığı, F': Kromatid Tipi Fragment, SU: Sister Union, KD: Kromatid Değişimi, P: Poliploidi,

DS: Disentrik Kromozom, İnv: İnversiyon Tipi Kromozom

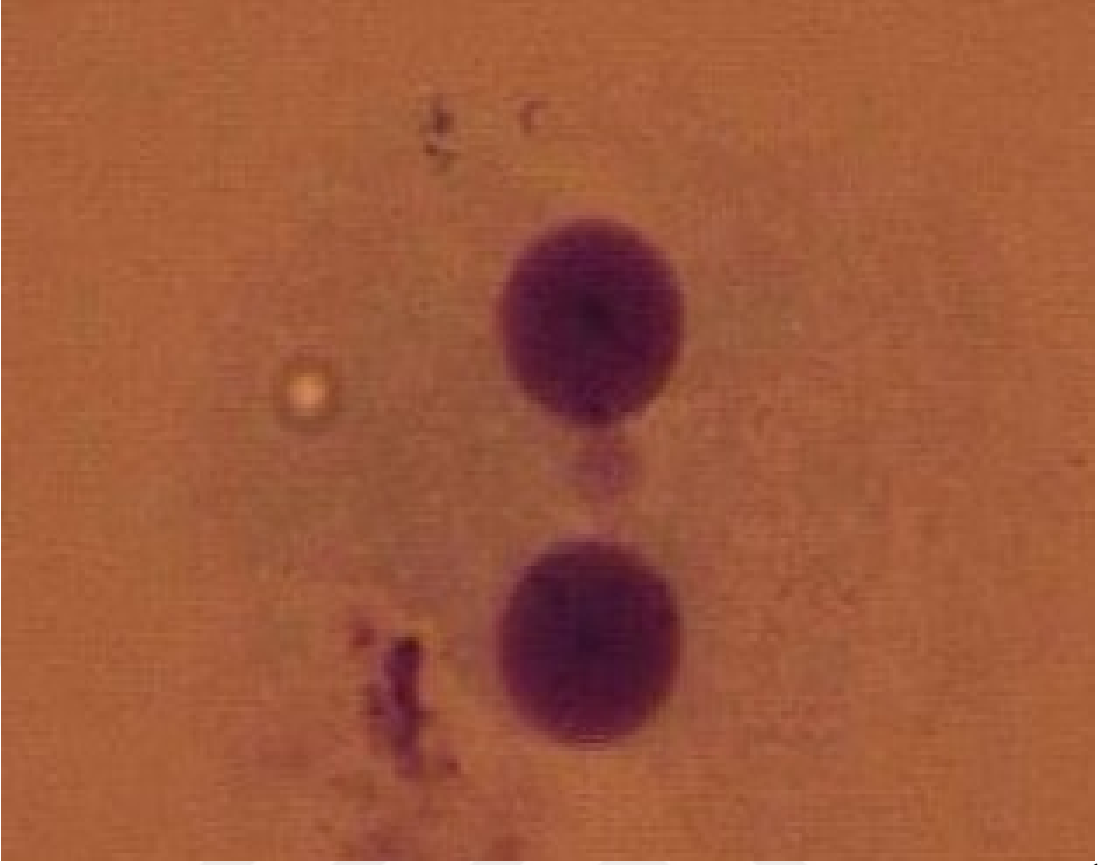
a: Pozitif Kontrol ile arasındaki fark önemlidir. a3: P≤0.001

*: Her bir grup için toplamda 400 metafaz incelenmiştir. **: Her bir grup için 3 kişi üzerinden hesaplanmıştır.

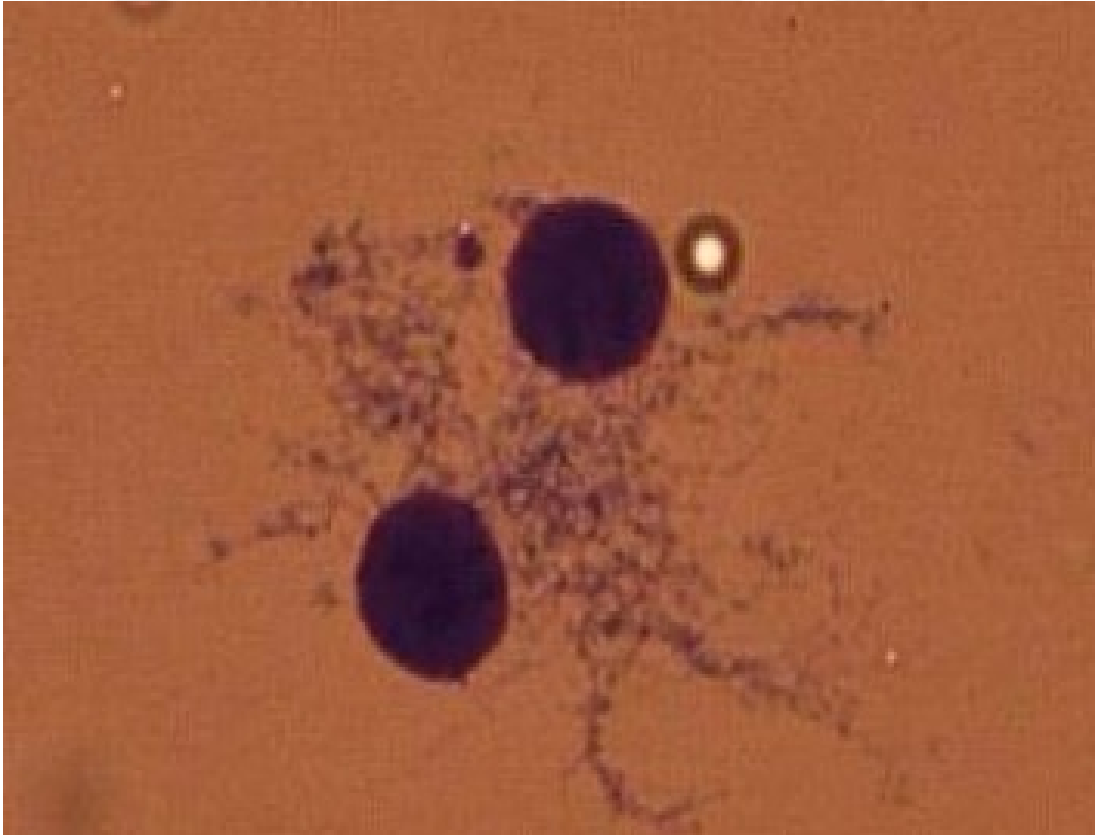
Çizelge 4.2'de sunulan veriler, Triamonyum sitrat (TS) bileşiğinin 24 ve 48 saatlik maruziyet süreleri sonunda insan periferik lenfositlerindeki potansiyel genotoksik ve sitotoksik etkilerini göstermektedir. Test sisteminin geçerliliği, pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomisin C (MMC) ile doğrulanmıştır. MMC, hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda, negatif kontrol grubuna kıyasla % Anormal Hücre ve KA/Hücre oranlarını istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p \leq 0.001$). Sitotoksik etkinin bir göstergesi olan mitotik indeks (MI) üzerinde ise, negatif kontrole kıyasla sayısal olarak belirgin bir düşüşe yol açmış, ancak bu düşüşün istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görülmüştür. Bu bulgular, test sisteminin genotoksik hasarı tespit etmedeki yüksek duyarlılığını doğrulamaktadır. Triamonyum sitratın (TS) test edilen tüm konsantrasyonlarında (0,5, 1 ve 2 mg/ml) ise, her iki maruziyet süresi (24 ve 48 saat) için de tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. TS uygulanan gruplarda, ne % Anormal Hücre oranında ne de KA/Hücre sayısında negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Aynı şekilde, mitotik indeks değerleri de TS muamelesiyle kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiş, bu da test edilen konsantrasyonlarda belirgin bir sitotoksik etki olmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, tüm TS gruplarındaki genotoksisite düzeylerinin pozitif kontrol (MMC) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.001$). Gözlenen anormallik tipleri incelendiğinde, tüm gruplarda en sık rastlanan hasar tipinin kromatid tipi kırıklar (B') olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan test koşulları altında Triamonyum sitrat, insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallikleri indüklememiş ve hücre bölünmesi üzerinde sitotoksik bir etki yaratmamıştır; bu da bileşiğin test edilen konsantrasyon aralığında genotoksik bir potansiyel taşımadığını güçlü bir şekilde desteklemektedir.

4.1.3. Triamonyum Sitratın Mikronükleus Testi ile Genotoksik Profilinin Değerlendirilmesi

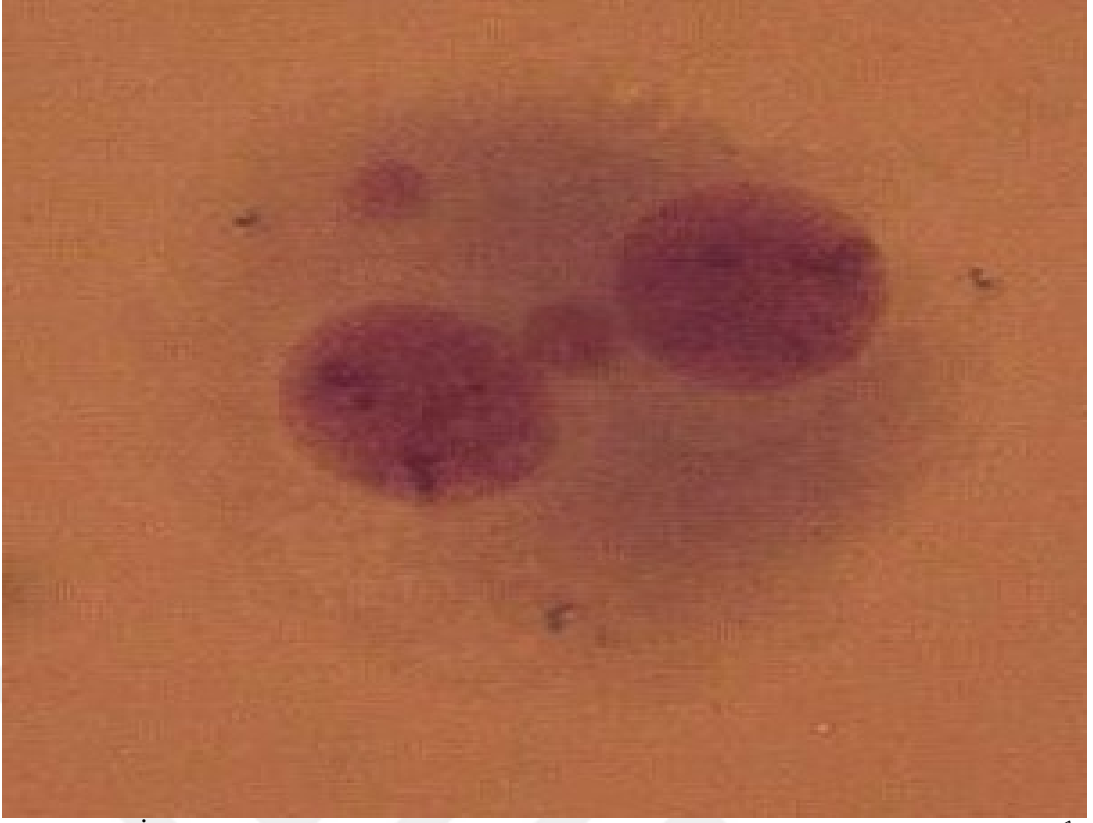
Triamonyum sitratın (TS) genotoksik potansiyeli, insan periferik lenfosit kültürlerinde mikronükleus (MN) testi kullanılarak 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinde incelenmiştir. Seçilen 0,5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyon aralığında, TS'nin MN indüksiyon kapasitesi ile sitotoksik etkileri paralel olarak analiz edilmiştir. Çizelge 4.3'te sunulan MN frekansı, MN içeren hücre yüzdesi ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) verileri, bileşiğin genotoksik ve sitotoksik eşik değerlerinin belirlenmesine yönelik nicel bir temel sağlamaktadır. Sitokinez blokajı yöntemiyle izole edilen binükleer hücrelerde gözlemlenen MN formasyonları (Şekil 4.12-4.17), TS'nin kromozomal kırılma artışı veya mitotik aparat işlev bozukluğu gibi mekanizmalarla DNA hasarına yol açabileceğini desteklemektedir. Elde edilen bulgular, konsantrasyon ve maruziyet süresi artışıyla MN insidansındaki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlılığının değerlendirilmesi için kritik bir veri seti oluşturmaktadır. Bu sonuçlar, TS'nin genotoksisite profilini literatürdeki benzer bileşiklerle kıyaslanabilir kılmaktadır.



Şekil 4.11. Bir mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂)



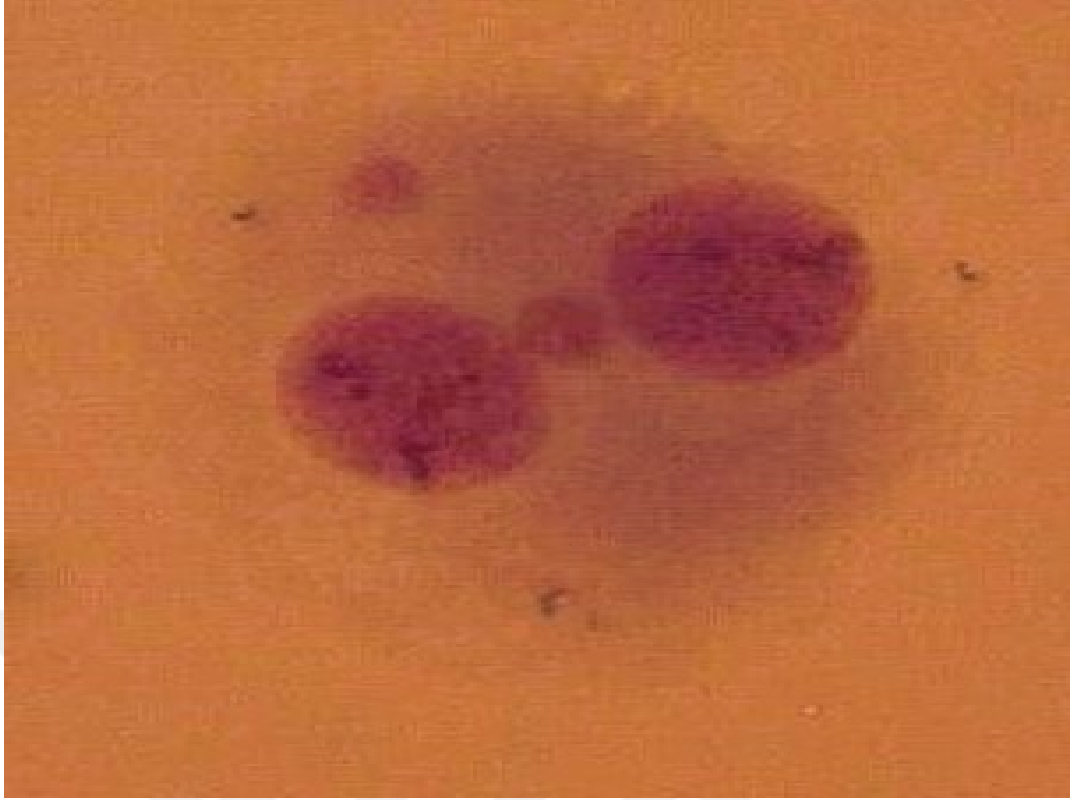
Şekil 4.12. Bir mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♂)



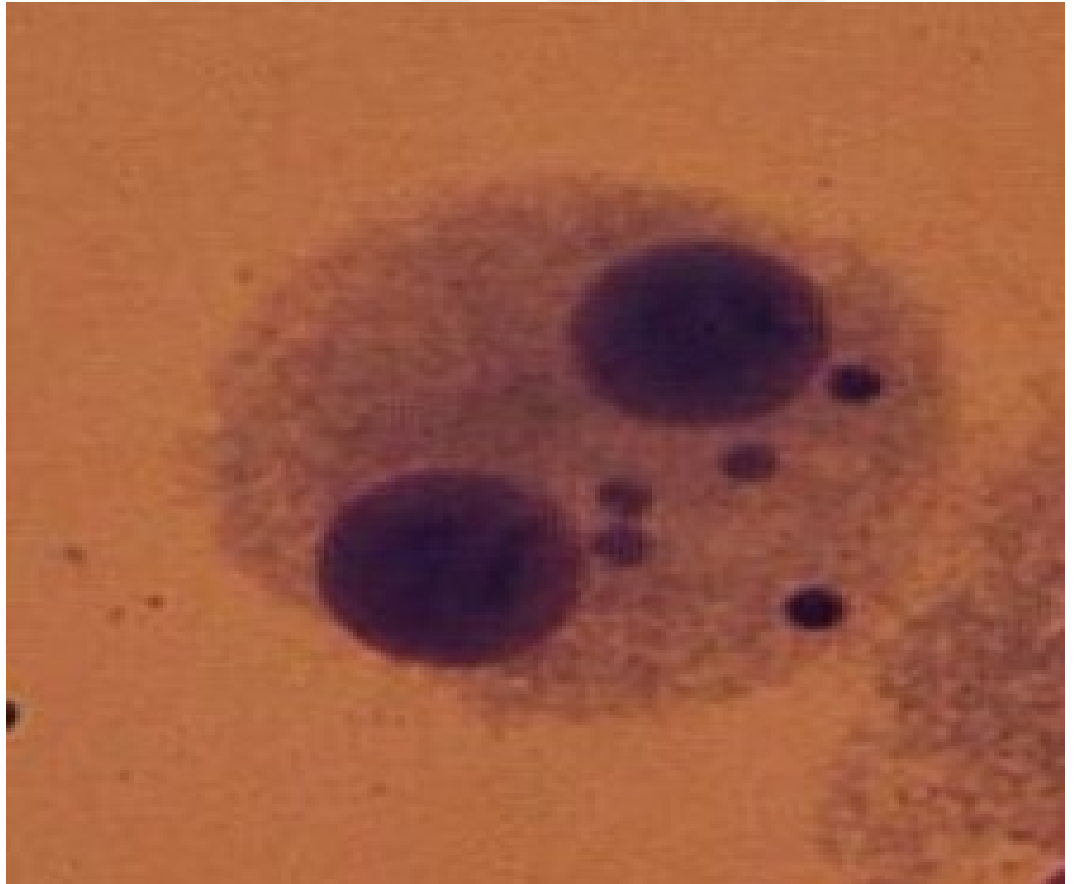
Şekil 4.13. İki mikronükleuslu binükleer hücre (x1000) (0,5 mg/ml TS, 48 saat muamele ♂)



Şekil 4.14. İki mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (2 mg/ml TS, 24 saat muamele ♀)



Şekil 4.15. İki mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♂)



Şekil 4.16. Beş mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000) (1 mg/ml TS, 48 saat muamele ♀)

Çizelge 4.3, Triamonyum sitratın (TS) insan periferik lenfositlerindeki mikronükleus (MN) indüksiyonu ve hücre bölünmesi üzerindeki etkilerini Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) ile özetlemektedir. Test sisteminin geçerliliği, kontrol gruplarının beklenen sonuçları vermesiyle teyit edilmiştir: Pozitif kontrol (MMC), hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda negatif kontrol grubuna kıyasla % Toplam MN ve % MN içeren iki nükleuslu hücre oranlarını istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı bir şekilde artırmış (24 saatte % Toplam MN: 24.00, % MN içeren hücre: 22.50; 48 saatte % Toplam MN: 76.50, % MN içeren hücre: 70.50) ve beklendiği üzere sitotoksik etki göstererek NBI değerlerini (24 saatte: 1.304; 48 saatte: 1.250) belirgin şekilde düşürmüştür.

Elde edilen genotoksisite bulguları, hem 24 hem de 48 saatlik maruziyet süreleri için oldukça tutarlıdır. Triamonyum sitrat, test edilen hiçbir konsantrasyonda (0.5, 1 ve 2 mg/ml), negatif kontrol grubuna kıyasla % Toplam MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Ayrıca, konsantrasyon artışına bağlı bir doz-yanıt ilişkisi de gözlenmemiştir. % MN içeren iki nükleuslu hücre oranları incelendiğinde de TS gruplarında negatif kontrole kıyasla sayısal olarak bir artış eğilimi gözlenmiş olsa da bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Her iki genotoksik parametre (% Toplam MN ve % MN içeren iki nükleuslu hücre) için de tüm TS uygulama gruplarındaki frekanslar, MMC'nin neden olduğu yüksek hasar seviyelerine göre istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p \leq 0.001$ 'den $p \leq 0.01$ 'e kadar değişkenlik göstermektedir).

Sitotoksisite göstergesi olan Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) verileri, TS'nin hücre proliferasyonunu olumsuz etkilemediğini açıkça göstermektedir. TS ile muamele edilen tüm grupların NBI değerleri, negatif kontrol grubuyla istatistiksel olarak farksızdır. Dahası, TS gruplarının NBI değerleri, hücre bölünmesini güçlü bir şekilde baskılayan MMC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$ 'ten $p \leq 0.001$ 'e kadar), bu da TS'nin sitotoksik bir profil sergilemediğini teyit etmektedir.

Sonuç olarak, mikronükleus testi verileri bütüncül olarak değerlendirildiğinde, Triamonyum sitratın, çalışılan konsantrasyon ve sürelerde insan periferik lenfositlerinde ne genotoksik (kromozom kırığı veya kaybına yol açan) ne de sitotoksik/sitostatik bir etki göstermediği kanıtlanmıştır. Bu bulgular, bileşiğin bu test sistemi koşulları altında genetik materyal üzerinde hasar oluşturma potansiyeli taşımadığına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Triamonyum sitrat bileşiği ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Oranları

Test maddesi	Muamele		% MN	% MN içeren iki nükleuslu hücre	Nükleus sayısı				NBI±SH
	Süre (saat)	Kons. (mg/ml)			1N	2N	3N	4N	
PK (MMC)	24	10 µl	24,00±3,24	22,50±2,72	2902	997	81	15	1,304±0,06
		0	6,25±0,62 a3	5,75±0,75	2161	1483	251	105	1,575±0,08 a1
		0,5	9,00±1,35 a3	8,50±0,86	2068	1662	156	114	1,579±0,08 a1
		1	8,00±1,47 a3	7,50±1,04	1911	1865	155	101	1,627±0,04 a1
PK (MMC)	48	2	6,75±0,62 a3	6,25±0,75	1850	1892	152	106	1,628±0,02 a1
		10 µl	76,50±8,85	70,50±7,18	3153	717	105	25	1,250±0,01
		0	6,25±0,62 a3	5,75±0,75 a2	2161	1483	251	105	1,575±0,08 a2
		0,5	8,75±1,54 a3	8,50±1,32	1709	2001	148	142	1,680±0,01 a3
Triamonyum sitrat	48	1	7,25±0,85 a3	7,00±0,91	2200	1537	156	107	1,510±0,06 a1
		2	9,00±1,08 a3	7,75±0,75	2079	1752	107	62	1,559±0,03 a2

a: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a1: $P \leq 0.05$; a2: $P \leq 0.01$; a3: $P \leq 0.001$ *: Her bir preparattan 1000, her muamele grubu için 4 donörden toplamda 4000 binökleer hücre değerlendirilmiştir.

4.1.4. Triamonyum Sitratin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerine Etkileri

Çizelge 4.4, Triamonyum sitratin (TS) insan periferik lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) oluşturma potansiyelini ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini (Proliferasyon İndeksi - PI) göstermektedir. Test sisteminin validasyonu, pozitif kontrol (MMC) grubunun beklenen etkileri göstermesiyle sağlanmıştır. MMC, her iki maruziyet süresinde de (24 ve 48 saat) negatif kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen KKD sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmış ve özellikle 48 saatlik uygulamada PI değerini anlamlı derecede düşürerek beklenen genotoksik ve sitotoksik profili sergilemiştir.

Triamonyum sitratin genotoksik potansiyeli incelendiğinde, test edilen hiçbir konsantrasyonun (0.5, 1 ve 2 mg/ml) ve maruziyet süresinin (24 ve 48 saat), negatif kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen KKD sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmadığı saptanmıştır. Gözlenen sayısal dalgalanmalar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Buna karşın, TS gruplarındaki KKD frekansları, pozitif kontrolün indüklediği yüksek hasar seviyelerinden belirgin şekilde daha düşük kalmıştır. Min-Max KKD aralıkları da bu bulguyu destekler nitelikte olup, TS gruplarının negatif kontrol ile benzer bir dağılım gösterdiği görülmüştür.

Hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, Triamonyum sitratin PI değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Her ne kadar 48 saatlik uygulamada konsantrasyona bağlı sayısal bir düşüş eğilimi gözlene de bu değişim istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamış ve TS gruplarının PI değerleri negatif kontrol ile benzer seviyelerde kalmıştır.

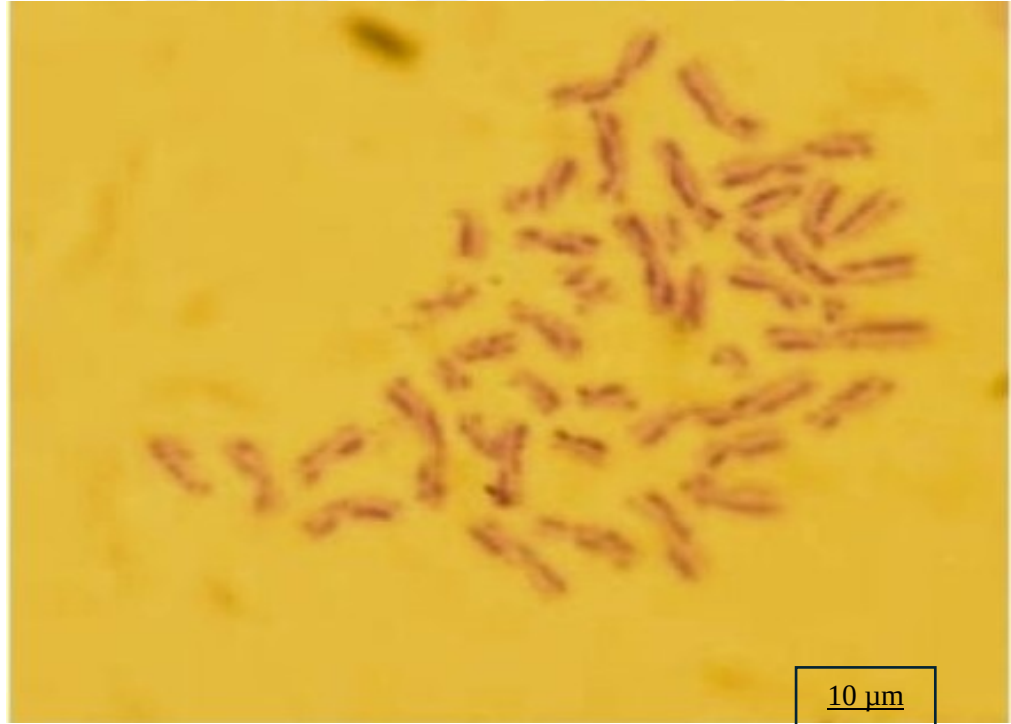
Sonuç olarak, Kardeş Kromatid Değişimi testi bulguları, Triamonyum sitratin test edilen koşullar altında DNA'da genotoksik hasara yol açmadığını ve hücre döngüsü kinetiğini önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, önceki Kromozom Anormallliği ve Mikronükleus testlerinden elde edilen bulgularla tam bir tutarlılık içindedir ve bileşiğin genotoksik risk taşımadığına dair kanıtları güçlendirmektedir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda TS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Proliferasyon indeksi, Min-Max ve Hücre Başına Düşen Ortalama KKD sayısı

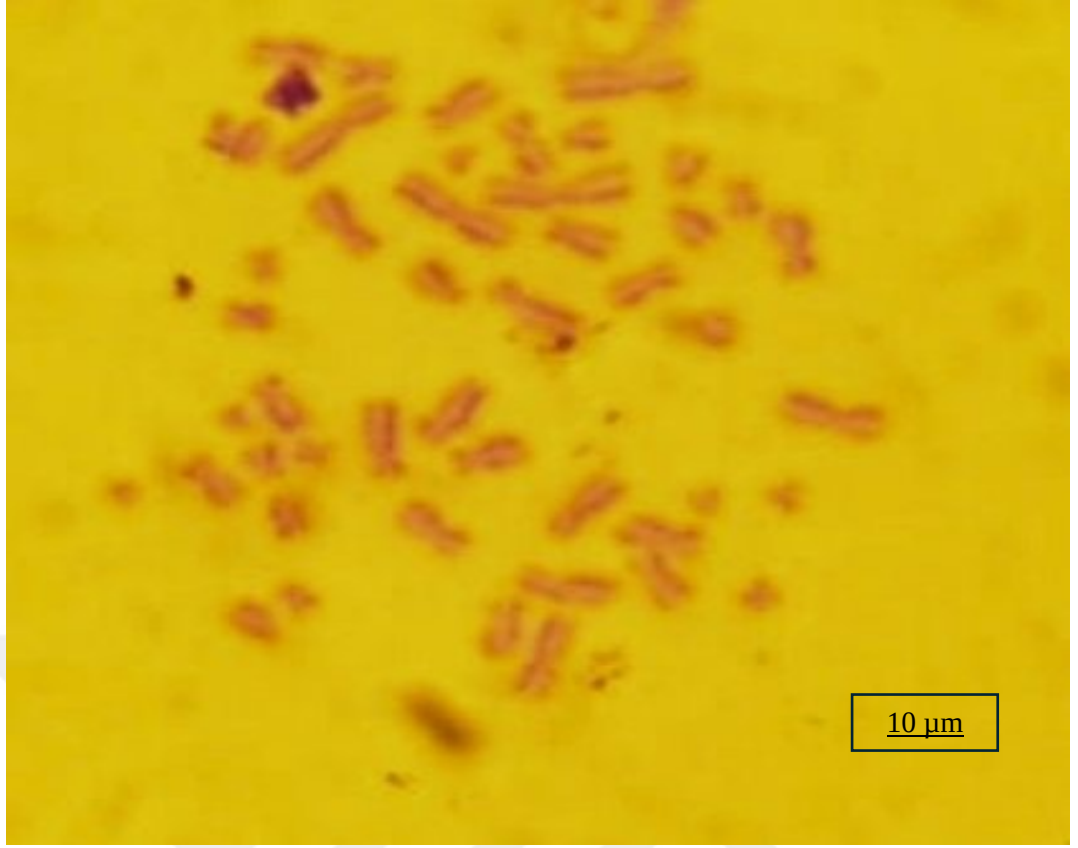
Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Kons. (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SH*	PI±SH**
PK	24	10 µL	5-39	14,68±0,65	2,28±0,03
Triamonyum Sitrat		0	0-10	2,23±0,05 a1	2,51±0,02
		0.5	0-9	2,71±0,10	2,36±0,04
		1	0-8	2,50±0,07	2,42±0,04
		2	0-16	2,36±0,08	2,46±0,06
PK	48	10 µL	3-72	25,40±1,35	1,99±0,08
Triamonyum Sitrat		0	0-10	2,23±0,05 a2	2,51±0,02 a1
		0.5	0-12	2,54±0,16	2,38±0,05
		1	0-9	2,93±0,11	2,36±0,07
		2	0-9	2,35±0,13 a1	2,30±0,06

a: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir. a1: $P \leq 0.05$; a2: $P \leq 0.01$

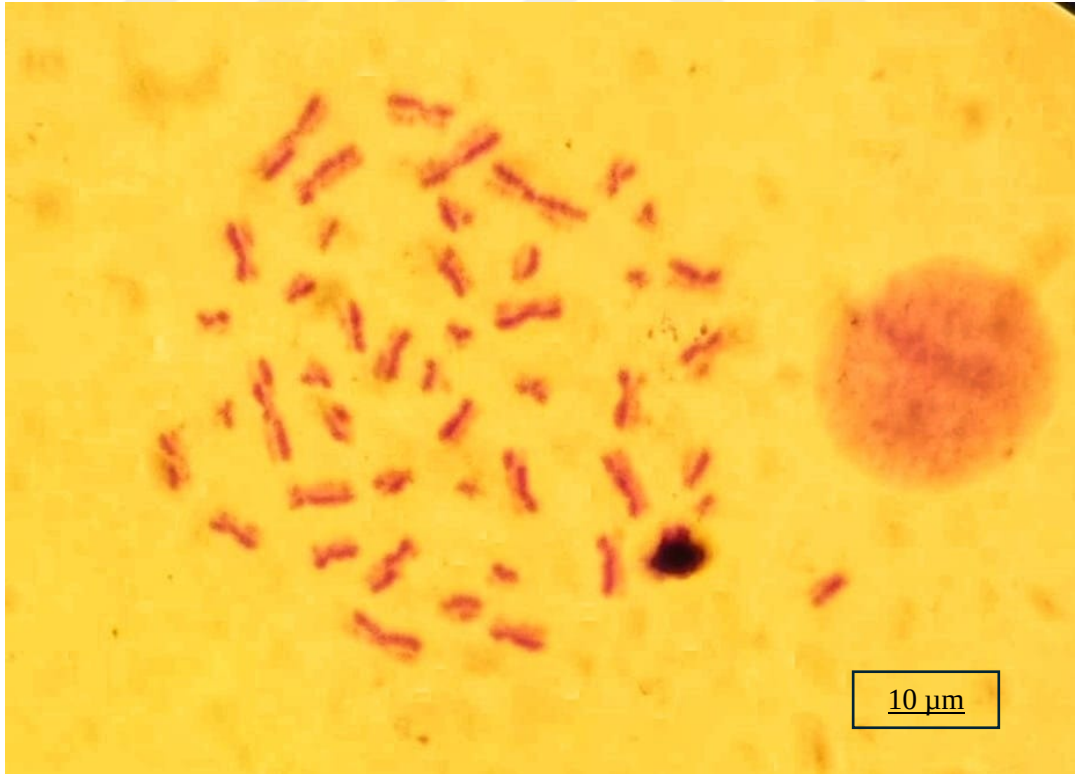
*: Her bir preparattan 25, her muamele grubu için 4 donörden toplamda 100 mitoz 2 evresindeki metafazlar değerlendirilmiştir. **: Her bir preparattan 100, her muamele grubu için 4 donörden toplamda 400 metafaz değerlendirilmiştir.



Şekil 4.17. 38 Kardeş Kromatid Değişimi bulunan metafaz plağı (x1000) (100 µM MMC, 48 saatlik muamele ♂)



Şekil 4.18. Beş adet kardeş kromatid Değişimi bulunan metafaz (x1000)
(2mg/ml TS, 48 saat muamele ♂)



Şekil 4.19. 10 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (x1000)
(1 mg/ml TS, 24 saat muamele ♀)

4.1.5. Triamonyum Sitratin Plazmid DNA ile Radikal/Anti-Radikal Etkileşimlerinin Analizi

Triamonyum sitratin (TS) pBR322 plazmit DNA'sı üzerindeki doğrudan hasarlayıcı ve potansiyel koruyucu etkileri, agaroz jel elektroforezi ve densitometrik analizlerle incelenmiştir. Şekil 4.20 ve Çizelge 4.5'te sunulan veriler, bu etkileşimleri hem nitel hem de nicel olarak ortaya koymaktadır.

Öncelikle, deney sisteminin validasyonu, pozitif kontrol gruplarının (PK1: UV, PK2: H₂O₂, PK3: UV+H₂O₂) beklendiği gibi çalıştığını göstermiştir. Bu gruplar, muamelesiz kontrol DNA'sına (%93.30 CCC) kıyasla süpersarmal (CCC) DNA formunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açarak (sırasıyla %71.60, %82.40 ve en şiddetlisi olan %7.76) DNA hasarını başarılı bir şekilde indüklemiştir. Buna karşın, tek başına uygulanan Triamonyum sitratin (0.5, 1 ve 2 mg/ml) plazmit DNA üzerinde herhangi bir hasarlayıcı etki göstermediği, %CCC DNA seviyelerinin muamelesiz kontrol ile istatistiksel olarak farksız olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, TS'nin test koşulları altında DNA'ya doğrudan zarar vermediğini kanıtlamaktadır.

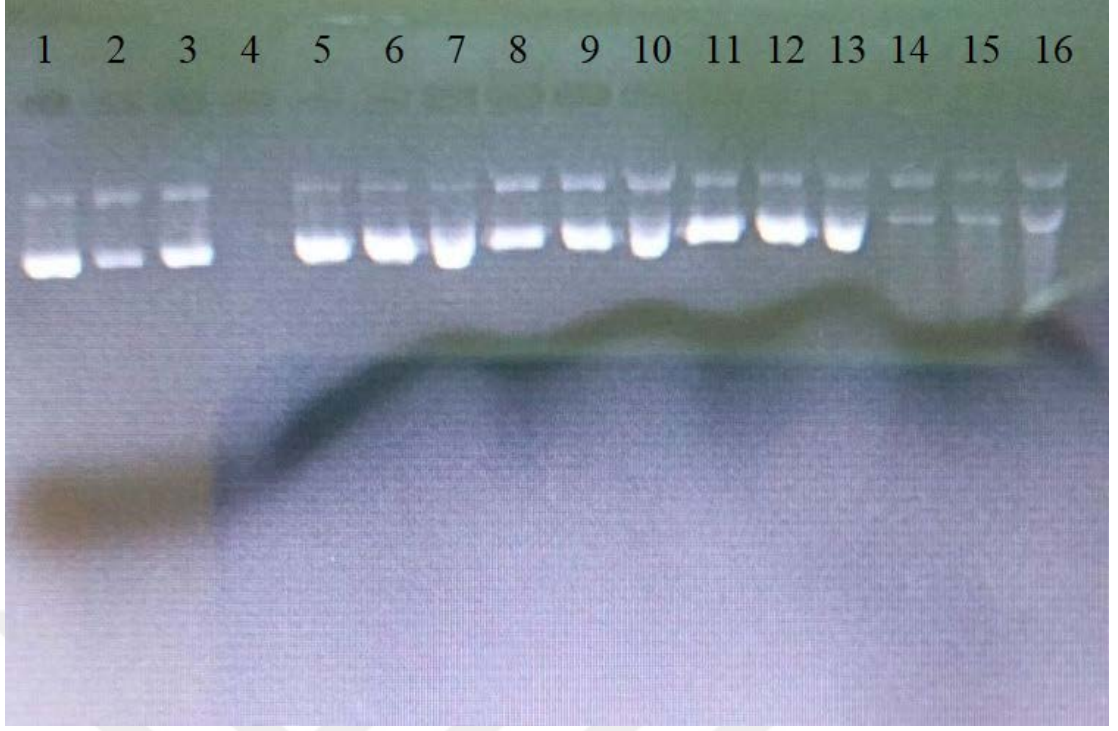
Çalışmanın en dikkat çekici bulgusu, Triamonyum sitratin indüklenen DNA hasarına karşı gösterdiği güçlü koruyucu kapasitedir.

H₂O₂ Kaynaklı Oksidatif Hasara Karşı Koruma: TS, H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı olağanüstü bir koruma sergilemiştir. Hasarlı kontroldeki %82.40 olan CCC DNA oranını, dozlara bağlı olarak %90.29-%92.85 aralığına yükseltmiştir. Bu seviyeler, muamelesiz kontrol grubundan istatistiksel olarak farksız bulunmuştur (a3 notasyonu), bu da TS'nin oksidatif hasarı neredeyse tamamen nötralize ederek DNA'yı doğal formuna geri getirdiğini göstermektedir.

UV ve Kombine Hasara Karşı Koruma: TS, UV kaynaklı (%35-41 koruma) ve özellikle şiddetli olan kombine UV+H₂O₂ hasarına karşı (%45-65 koruma) da istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı ($p \leq 0.001$) bir koruma sağlamıştır. Bu gruplarda DNA bütünlüğü tam olarak başlangıç seviyesine dönemese de (b3 notasyonu), TS'nin fotolitik ve sinerjik hasar mekanizmalarını da önemli ölçüde engellediği açıktır.

Koruyucu etkinin doz ile doğrusal bir ilişki göstermediği, en yüksek etkinin genellikle 1 mg/ml konsantrasyonunda elde edildiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu veriler Triamonyum sitratin doğrudan genotoksik bir ajan olmadığını, aksine özellikle oksidatif strese karşı tam koruma sağlayan ve diğer hasar türlerini de anlamlı ölçüde azaltan potent bir DNA koruyucu bileşik olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.20. Triamonyum sitrat bileşiğinin pozitif kontrollere (H_2O_2 , UV ve H_2O_2) varlığında ve yokluğunda pBR322 plazmit DNA'sı üzerine hasarlayıcı/koruyucu etkisi

- 1:Kont;2:PK1;3:PK2;4:PK3;5:D1;6:D2;7:D3;8:D1+PK1;9:D2+PK1;10:D3+PK1;11:D1+PK2;12:D2+PK2;13:D3+PK2;14:D1+PK3;15:D2+PK3;16:D3+PK3
- Dozlar: D1:0.5mg/ml, D2:1mg/ml, D3:2mg/ml
- Pozitif Kontroller: PK1:UV(10dk), PK2: H_2O_2 (%10), PK3:UV(10dk)+ H_2O_2 (%10)

Çizelge 4.5. Triamonyum Sitrat'ın hasarlayıcı ve koruyucu etkisine dair densitometrik ölçümler

Muamele grubu	TS Conc. (mg/ml)	Hasarlayıcı ajan	% CCC DNA	% OC DNA	Koruyucu Etki (%)
Kontroller					
Muamelesiz kontrol (Negatif)	--	--	93.30 ± 0.47	6.70 ± 0.47	100 ± 0.00
UV hasarlı kontrol	--	UV	71.60 ± 1.31	28.40 ± 1.31	0.00 ± 0.00
H ₂ O ₂ hasarlı kontrol	--	H ₂ O ₂	82.40 ± 0.31	17.60 ± 0.31	0.00 ± 0.00
Kombine hasarlı kontrol	--	UV + H ₂ O ₂	7.76 ± 0.39	92.24 ± 0.39	0.00 ± 0.00
TS hasarlayıcı kontrol					
Yalnız TS	0.5	--	93.01 ± 3.35	6.99 ± 3.35	--
Yalnız TS	1.0	--	94.72 ± 0.53	5.28 ± 0.53	--
Yalnız TS	2.0	--	96.69 ± 0.19	3.31 ± 0.19	--
UV'e karşı koruma					
TS + UV	0.5	UV	79.81 ± 1.08	20.19 ± 1.08	37.90 ± 0.95 a3b3
TS + UV	1.0	UV	80.61 ± 0.30	19.39 ± 0.30	41.29 ± 3.16 a3b3
TS + UV	2.0	UV	79.33 ± 0.91	20.67 ± 0.91	34.99 ± 8.60 a3b3
H₂O₂'e karşı koruma					
TS + H ₂ O ₂	0.5	H ₂ O ₂	90.29 ± 0.23	9.71 ± 0.23	72.63 ± 4.23 a3
TS + H ₂ O ₂	1.0	H ₂ O ₂	92.85 ± 0.10	7.15 ± 0.10	96.01 ± 3.59 a3
TS + H ₂ O ₂	2.0	H ₂ O ₂	92.16 ± 0.23	7.84 ± 0.23	89.73 ± 5.91 a3
Kombine hasara karşı koruma					
TS + UV + H ₂ O ₂	0.5	UV + H ₂ O ₂	46.83 ± 3.28	53.17 ± 3.28	45.67 ± 4.15 a3b3
TS + UV + H ₂ O ₂	1.0	UV + H ₂ O ₂	63.26 ± 4.78	36.74 ± 4.78	64.90 ± 6.02 a3b3
TS + UV + H ₂ O ₂	2.0	UV + H ₂ O ₂	58.12 ± 1.78	41.88 ± 1.78	58.88 ± 2.39 a3b3

a: İlgili hasarlı kontrol grubuna (UV, H₂O₂ veya UV + H₂O₂) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir. **b:** Muamelesiz (negatif) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir. Simgeler önem düzeyini belirtir: 1: P≤0.05; 2: P≤0.01; 3: P≤0.001. **TS:** Triamonyum Sitrat; **Conc.:** Konsantrasyon; **CCC DNA:** Süpersarmal (Kovalent Kapalı Dairesel) DNA formu, hasar görmemiş plazmiti temsil eder; **OC DNA:** Açık Dairesel DNA formu, tek zincir kırığı oluşmuş hasarlı plazmiti temsil eder; **UV:** Ultraviyole radyasyonu; **H₂O₂:** Hidrojen Peroksit.

4.1.6. Ames/Salmonella Gen Mutasyonu Bulguları

Ames testi, kimyasal bileşiklerin mutajenik potansiyelini değerlendirmek için Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının histidin bağımlılığını kullanarak revertant koloni oluşumunu ölçen standart bir yöntemdir. Bu çalışmada, Triamonyum sitrat (TS) bileşiğinin 1-5 mg/petri konsantrasyon aralığında mutajenik aktivitesi, metabolik aktivatör olmadan test edilmiştir. Pozitif kontroller olarak TA98 suşu için 4-Nitro-o-fenilendiamin (4-NPD), TA100 suşu için

Sodyum Azid (SA) kullanılmıştır. Elde edilen revertant koloni sayıları, pozitif kontrol grupları ve muamele edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

TA98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılan 4-Nitro-o-fenilendiamine (4-NPD) maddesi, beklenen şekilde yüksek bir revertant koloni sayısı ($584,67 \pm 20,078$) indükleyerek test sisteminin uygunluğunu doğrulamıştır. Muamele edilmemiş kontrol grubunda (0 mg/petri TS) ortalama revertant koloni sayısı $66,00 \pm 1,732$ olarak belirlenmiştir. Triamonyum sitratın 1 mg/petri ($50,00 \pm 8,327$), 2 mg/petri ($55 \pm 3,512$), 3 mg/petri ($64,33 \pm 7,356$), 4 mg/petri ($68 \pm 4,163$) ve 5 mg/petri ($66,67 \pm 3,667$) konsantrasyonlarında TA98 suşunda gözlenen ortalama revertant koloni sayıları, muamele edilmemiş kontrol grubu ile benzer seviyelerde bulunmuştur. Ancak, tüm TS konsantrasyonlarında, pozitif kontrol (4-NPD) grubuna göre revertant koloni sayıları anlamlı düzeyde düşüktür ($p \leq 0.001$) (Çizelge 4.5).

TA100 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılan Sodyum Azid (SA) maddesi de beklenen şekilde yüksek bir revertant koloni sayısı ($964,00 \pm 30,199$) oluşturarak test sisteminin bu suş için de uygunluğunu göstermiştir. Muamele edilmemiş kontrol grubunda (0 mg/petri TS) ortalama revertant koloni sayısı $339,00 \pm 0,577$ olarak tespit edilmiştir. Triamonyum sitratın 1 mg/petri ($352,67 \pm 1,453$), 2 mg/petri ($301,67 \pm 8,353$), 3 mg/petri ($290,33 \pm 51,914$), 4 mg/petri ($270,33 \pm 11,348$) ve 5 mg/petri ($354,00 \pm 22,368$) konsantrasyonlarında TA100 suşunda gözlenen ortalama revertant koloni sayıları, muamele edilmemiş kontrol grubu ile benzer seviyelerde bulunmuştur. Tüm TS konsantrasyonlarında, pozitif kontrol (SA) grubuna göre revertant koloni sayıları anlamlı düzeyde düşüktür ($p \leq 0.001$) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6. Test maddesinin 5 farklı konsantrasyonu ile ortamda metabolik aktivatör bulunmadan muamele edilen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında gözlenen revertant koloni sayılarının ortalamaları*

Test maddesi	Kons. (mg/petri)	TA98	TA100
		Koloni sayısı (mg/petri)	Koloni sayısı (mg/petri)
		RKSO±SH	
PK (4-NPD)	20 µg/petri	584,67±20,078	--
PK (SA)	1 µg/petri	--	964,00±30,199
Triamonyum Sitrata	0	66,00±1,732 a3	339,00±0,577 a3
	1	50,00±8,327 a3	352,67±1,453 a3
	2	55,00±3,512 a3	301,67±8,353 a3
	3	64,33±7,356 a3	290,33±51,914 a3
	4	68,00±4,163 a3	270,33±11,348 a3
	5	66,67±3,667 a3	354,00±22,368 a3

*: Her test konsantrasyonu 3 tekrarlı olacak şekilde sayılmıştır.

4-NPD: 4-Nitro-o-fenilendamine; SA: Sodyum Azid

a: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a1: P≤0.05; a2: P≤0.01; a3: P≤0.001

RKSO: Revertant koloni sayısı ortalaması

Elde edilen Ames testi bulguları, Triamonyum sitrat bileşiğinin test edilen konsantrasyonlarda ve metabolik aktivasyon sistemi (S9 miks) olmaksızın *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında gen mutasyonuna neden olmadığını göstermektedir. Her iki suşta da, Triamonyum sitrat uygulaması sonucu oluşan revertant koloni sayıları, muamele edilmemiş kontrol grubu ile benzer seviyelerde kalmıştır. Pozitif kontrol maddeleri ise test sisteminin duyarlılığını doğrulayarak beklenen mutajenik etkiyi göstermiştir.

Bu bulgular, Triamonyum sitratın bu deneysel koşullar altında bakteriyel sistemde DNA baz çifti kaymaları veya çerçeve kayması mutasyonları üzerinde indükleyici bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, önceki bölümlerdeki Kromozom Anormalliği testi, Mikronükleus testi, KKD analizi ve DNA hasar koruyucu aktivite sonuçları ile tutarlı olarak, Triamonyum sitratın genotoksik ve mutajenik risk taşımadığı teyit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler, Triamonyum sitratın genotoksik risk taşımadığını göstermekle birlikte, farklı genotoksisite mekanizmalarının ve *in vivo* sistemlerdeki olası etkilerin tamamen dışlanması için ileri çalışmalar gerekliliğini korumaktadır. Bununla birlikte, mevcut bulgular,

bileşimin güvenlik profilini desteklemekte ve terapötik kullanım potansiyelini bilimsel bir temele oturtmaktadır.

4.1.7. *In Silico* Moleküler Kenetlenme Analizi Bulguları

Triamonyum Sitrat'ın (TS) potansiyel biyolojik hedefleri olan insan DNA polimeraz delta (Pol δ), insan DNA Topoizomeraz 1 (hTop1), Glutamat dehidrojenaz 2 (GLUD2) ve Glutamin sentetaz (GLUL) enzimleri ile etkileşimleri, moleküler kenetlenme simülasyonları aracılığıyla incelenmiştir. Elde edilen bağlanma enerjileri (ΔG) ve etkileşim türleri sırasıyla Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6'da gösterildiği üzere, TS'nin DNA polimeraz delta (Pol δ , PDB ID: 6TNY), insan DNA Topoizomeraz I (hTOP1, PDB ID: 1A36), Glutamat dehidrojenaz 2 (GLUD2, PDB ID: 6G2U) ve Glutamin sentetaz (GLUL, PDB ID: 8DNU) ile hesaplanan bağlanma enerjileri (ΔG) sırasıyla -5,7; -5,9; -5,4 ve -6,1 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Çalışmada deneysel pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomisin C'nin (MMC) ise bu reseptörlerle bağlanma enerjileri (-6,4 – 8,7 kcal/mol aralığında) TS'ye kıyasla genellikle daha negatif bulunmuş olup, bu durum MMC'nin incelenen reseptörlere TS'den daha güçlü bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, ilgili enzimlerin bilinen spesifik inhibitörleri olan Aphidicolin (-8,2 kcal/mol), Camptothecin (-9,1 kcal/mol), 7-CKA (-7,4 kcal/mol) ve L-metiyonin-S-sülfoksimin fosfat ile ADP (MSO-P + ADP) (-10,2 kcal/mol) kompleksinin sergilediği bağlanma enerjileri de TS'nin değerlerinden belirgin şekilde daha negatif bulunmuştur. Bu bulgu, TS'nin söz konusu spesifik inhibitörlere kıyasla hedef reseptörlere daha mütevazı bir bağlanma afinitesi sergilediğini ortaya koymaktadır.

TS'nin reseptör moleküllerin aktif bölgeleriyle kurduğu spesifik etkileşimler Çizelge 4.7'de detaylandırılmıştır. TS'nin incelenen tüm reseptör molekülleriyle hidrojen bağları oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu hidrojen bağlarının mesafeleri, Pol δ için 1,96 Å; hTOP1 için 2,03 Å ile 3,06 Å arasında değişen üç adet; GLUD2 için 2,04 Å ile 3,28 Å arasında değişen beş adet ve GLUL için 2,15 Å ile 3,40 Å arasında değişen üç adet olmak üzere farklı sayılarda ve mesafelerde ölçülmüştür. Hidrojen bağlarına ek olarak, TS'nin Pol δ (4,62 Å), hTOP1 (5,12 Å) ve GLUD2 (5,25 Å) ile pi-alkil etkileşimleri kurduğu, ancak GLUL ile bu tür bir etkileşimin gözlenmediği belirlenmiştir. Ayrıca, TS ile hTOP1 arasında, 2,78 Å mesafede bir "Acceptor-Acceptor" olarak tanımlanan (veya sınıflandırılan) etkileşim de saptanmıştır. Bu etkileşim, elektron alıcı gruplar arasındaki itici özellik nedeniyle bağlanma stabilitesini zayıflatabilecek bir faktör olarak yorumlanmıştır. Sonuçlar, TS'nin zayıf-orta düzeyde afinite sergilediğini ve inhibitörlerden anlamlı derecede farklı olduğunu desteklemektedir.

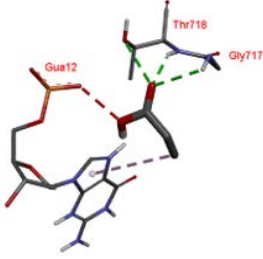
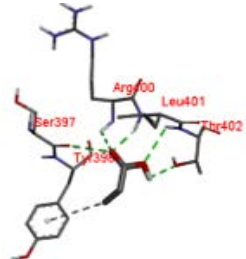
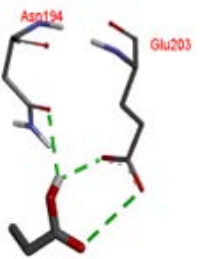
Bu moleküler kenetlenme sonuçları, Triamonyum Sitrat'ın test edilen enzimlerle orta düzeyde bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu ve bu etkileşimlerin temel olarak hidrojen bağları ve bazı durumlarda pi-alkil etkileşimleri aracılığıyla stabilize edildiğini göstermektedir. TS'nin

bağlanma enerjileri, bilinen güçlü inhibitörler ve MMC'ye kıyasla daha mütevazı kalsa da bu enzimlerle potansiyel bir etkileşiminin olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.7. Reseptör moleküllerin aktif bölgeleri ve ligandların moleküler kenetlenme analizi sonucu elde edilen enerji değişimleri (ΔG)

Ligand Grupları	Reseptör Moleküller ve Bağlanma Enerjileri (ΔG) (kcal/mol)			
	DNA polimeraz delta (Pol δ) (PDB ID: 6TNY)	DNA Topoizomeraz 1 hTop1 (PDB ID: 1A36)	Glutamat dehidrojenaz 2 (GLUD2) (PDB ID: 6G2U)	Glutamin sentetaz (GLUL) (PDB ID: 8DNU)
Test Maddesi (TS)	-5.7	-5.9	-5.4	-6.1
Deneysel Pozitif K. MMC	-6.4	-7.8	-8.7	-7.8
İnh. Aphidicolin	-8.2	-	-	-
Camptothecin	-	-9.1	-	-
7-CKA	-	-	-7.4	-
MSO-P + ADP	-	-	-	-10.2

Çizelge 4.8. Reseptör moleküller ve test maddesinin (TS) moleküler kenetlenme analizi sonucu kurulan bağ çeşidi ve mesafesi

Bağ çeşidi	Reseptör molekül +Ligand			
	Pol δ + TS (Å)	hTop1 + TS (Å)	GLUD2 + TS (Å)	GLUL + TS (Å)
Hidrojen bağı (H bond)	1.96	2.03, 2.82, 3.06	2.42, 2.94, 2.04, 2.77, 3.28	2.15, 2.61, 3.40
Pi - alkil etkileşimi (π - Alkil)	4.62	5.12	5.25	-
Acceptor - Acceptor (-)	-	2.78	-	-
TS'nin hedef moleküllerin aktif bölgesinin aminoasit kalıntılarıyla yaptığı etkileşimler				

4.2. Tartışma

Triamonyum sitrat, kendine özgü kimyasal reaktivitesi ve çok fonksiyonlu yapısıyla gıda, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde stratejik bir bileşen olarak öne çıkmaktadır. Gıda katkı maddesi olarak asitlik regülasyonu, emülsiyon stabilizasyonu ve metal şelasyonu gibi kritik işlevler üstlenirken, laboratuvar uygulamalarında pH tamponu olarak biyokimyasal reaksiyonların kontrolüne olanak sağlamaktadır. Farmakolojik formülasyonlarda ise ilaç stabilizasyonu ve biyoyararlanım optimizasyonunda kullanımı, bileşiğin endüstriyel önemini daha da artırmaktadır. Ancak bu yaygın kullanımına tezat oluşturacak şekilde, triamonyum sitratın sitotoksik, genotoksik ve mutajenik profiline ilişkin sistematik verilerin eksikliği hem insan sağlığı hem de çevresel risk değerlendirmeleri açısından önemli bir bilimsel boşluk oluşturmaktadır. Mevcut literatürdeki bu eksiklik, bileşiğin kronik maruziyet senaryolarındaki güvenlik parametrelerinin belirsiz kalmasına neden olmakta ve bu durum, disiplinler arası araştırmaların aciliyetini vurgulamaktadır.

Bu çalışma, triamonyum sitratın biyolojik etkileşimlerini çok boyutlu bir perspektifle ele alarak kapsamlı bir toksikolojik karakterizasyon sunmayı amaçlamaktadır. MCF-7 insan meme karsinoma hücre hattı, kanserleşmiş dokulardaki olası selektif toksisitenin değerlendirilmesi için seçilirken, NIH3T3 fare fibroblastları, normal somatik hücrelerdeki homeostatik yanıtların izlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Benzer şekilde insan periferik lenfositlerinin dahil edilmesi, genotoksik etkilerin insan genomu üzerindeki direkt yansımalarını somatik düzeyde ortaya koymak için tasarlanmıştır. Bakteriyel mutajenite potansiyelinin taranması için ise *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarıyla AMES testi uygulanarak, prokaryotik sistemlerdeki DNA interaksiyon mekanizmaları incelenmiştir.

Sitotoksisite kapsamında hücresel canlılık dinamiklerinin kantitatif analizi için CCK-8 testi ile metabolik aktivite ölçülmüş, proliferasyon kapasite ve replikatif stresin izlenmesi ise Proliferasyon İndeksi (PI) üzerinden hesaplanmıştır. Mitotik aktivitenin hücresel döngü regülasyonu bağlamında değerlendirilmesi için Mitotik İndeks (MI) kullanılırken, hücre popülasyonundaki nükleer bölünme frekansını belirlemek amacıyla Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) metodolojisi tercih edilmiştir.

Test maddesinin genotoksik ve mutajenik potansiyelini değerlendirmek amacıyla, kromozomal düzeydeki yapısal anomalileri saptamak için Kromozomal Aberasyon (KA) testi uygulanmıştır. Ayrıca, hücresel düzeydeki genotoksik stresin bir göstergesi olan mikronükleus formasyonunu analiz etmek için Mikronükleus (MN) testi ile destekleyici bir yaklaşım benimsenmiştir. DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidler arasındaki homolog rekombinasyon frekanslarını ölçmek üzere Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi kullanılmış, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının radikal temelli mekanizmalarla ilişkisini araştırmak için ise plazmid DNA üzerinde radikal/anti-radikal etki testi gerçekleştirilmiştir. AMES testi ise, bileşiğin bakteriyel mutajenite potansiyelini frameshift ve baz ikamesi mutasyonları yönünden taramak üzere tasarlanmıştır. Deneysel bulgular doğrultusunda, test maddesinin etkisinin olası hedef

enzimlerle hangi mekanizmalar üzerinden etkileşim kurarak ortaya çıktığı, moleküler kenetlenme (docking) analiziyle incelenmiştir.

Triamonyum Sitrat'ın (TS) hücre canlılığı ve proliferasyon indeksindeki her ne kadar istatistiki açıdan anlamlı olmasa da düşüş trendinin mekanizmasını anlamak için yapılan moleküler kenetlenme analizleri, seçilen hedef proteinlerin biyolojik işlevleriyle tutarlı sonuçlar sunmuştur. TS'nin DNA Polimeraz δ (Pol δ) ve DNA Topoizomerez 1 (Top1) ile zayıf-orta düzeyde etkileşimleri (-5,7 ve -5,9 kcal/mol), bu enzimlerin replikasyon sürecindeki kritik rollerini doğrudan inhibe edecek güçte değildir. Özellikle Top1 ile kurulan acceptor-acceptor etkileşimi (2,78 Å), elektron alıcı grupların itici özelliği nedeniyle bağlanma stabilitesini zayıflatarak, TS'nin DNA hasarı oluşturmada replikasyon stresine yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, genotoksisite testlerindeki negatif sonuçlarla uyumludur.

Sitrat metabolizması enzimlerinden Glutamat Dehidrojenaz 2 (GLUD2) ve Glutamin Sentetaz (GLUL) ile etkileşimler ise (-5,4 ve -6,1 kcal/mol) kısmi metabolik etkilere işaret etmektedir. GLUD2'nin enerji metabolizması ve redoks dengesindeki rolü göz önüne alındığında, TS'nin zayıf bağlanması, metabolik yollarda kısmi bozulma veya indirekt oksidatif stres artışıyla sitotoksik etkiye dair net bir bulgu saptanmasa da bu yöndeki eğilime dair bulgulara güçlendirmektedir. GLUL ile sınırda bir etkileşim (-6.1 kcal/mol), glutamin sentezinde olası bir azalmaya ve hücre stresine yol açabileceğini düşündürse de bu etki inhibitörlerin (-10,2 kcal/mol) çok altındadır.

Sonuç olarak, TS'nin zayıf bağlanma kapasitesi, direkt genotoksik veya enzimatik inhibisyonla ziyade, metabolik stres veya redoks dengesizliği gibi indirekt mekanizmalarla hücre canlılığındaki düşüş eğilimini açıklayabilir. Bu paradoks, TS'nin hedef dışı proteinlerle (örn. iyon kanalları, sinyal iletişim molekülleri) etkileşim olasılığını gündeme getirmektedir. İleri çalışmalarda, ROS üretimi ve metabolik analizlerle bu hipotezin test edilmesi dikkate alınabilir.

Çalışma için seçilen test bataryası, OECD kılavuzları (OECD 2016) ve ISO standartlarıyla (ISO 2003) uyumlu olarak, triamonyum sitratın kimyasal özelliklerinin (örn. Demir şelatör kapasite, iyonik etkileşimler) biyolojik sistemlerde tetikleyebileceği moleküler kaskadların kapsamlı şekilde haritalanmasına odaklanmıştır. Pozitif kontrollerde, hidrojen peroksit (H_2O_2), mitomycin C (MMC), 4-Nitro-o-fenilendiamin (4-NPD) ve sodyum azid (SA) gibi referans ajanların kullanımı, test sistemlerinin duyarlılığını kalibre etmek için kritik rol oynamıştır. Negatif kontroller ise deneysel koşulların intrinsik artefaktlardan arındırıldığını doğrulayarak, verilerin istatistiksel geçerliliğini güçlendirmiştir. Bu çok katmanlı yaklaşım, bileşiğin hücresel hedef yollarına ilişkin mekanistik ipuçları sunarken, endüstriyel uygulamalardaki güvenlik eşiklerinin bilimsel temellere dayandırılmasına katkı sağlamıştır.

Bu bölümde, triamonyum sitratın (TS) toksikolojik profilini değerlendirmek üzere, yapısal olarak türetildiği sitrik asit (SA) ile karşılaştırmalı bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu seçim, TS hakkındaki literatür veri eksikliğinin yanı sıra, SA'nın genotoksik ve sitotoksik etkilerine dair

kapsamlı çalışmaların mevcudiyeti ile motive edilmiştir. İlk olarak, TS ve SA'nın mutajenik potansiyeline ilişkin literatürdeki paradoksal bulgular dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda, Triamonyum Sitrata (TS) bileşiğinin sitotoksik etkileri, NIH3T3 fare embriyonik fibroblast hücreleri ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde doza ve zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Bulgular, NIH3T3 hücrelerinde TS'nin istatistiksel olarak anlamlı sitotoksositeye yol açmadığını, ancak sayısal değerlerin doza ve maruziyet süresine bağlı olarak artan bir sitotoksik eğilime işaret ettiğini göstermiştir. NIH3T3 hücre grubuna benzer şekilde, muamelesiz kontrole kıyasla her iki sürede de hücre canlılığı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte, 24 saatlik maruziyette artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığı ortalamasında sayısal bir düşüş gözlenirken, 48 saatlik maruziyette bu toksik etkinin azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da paradoksal biçimde hücre canlılığında artış eğilimi tespit edilmiştir. Bu paradoksal davranış, kanser hücrelerinin kimyasal stresörlere karşı geliştirdiği adaptif mekanizmalarla ilişkilendirilebilir. Literatürde, TS'nin yapısal öncülü olan Sitrik Asit (SA) bileşiğinin sitotoksik potansiyeline dair kapsamlı veriler mevcuttur. Chan ve ark. (1999), dental kök hücrelerinde SA'nın akut sitotoksik etkilerini MTT testi ile ortaya koymuş ve yüksek konsantrasyonlarda belirgin bir canlılık kaybı raporlamıştır (Chan ve ark.,1999). Benzer şekilde, Amaral ve ark. (2007), kemirgen makrofaj kültürlerinde SA'nın maruziyet süresinden bağımsız olarak toksik etki gösterdiğini belirlemiştir (Amaral ve ark.,2007). SA'nın sitotoksik etkileri, farklı hücre tipleri ve konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir. Örneğin, Navarro-Escobar ve ark. (2010), Chen ve ark. (2016) ve Abd-Elhakim ve ark. (2018), sırasıyla epitelyal hücreler, hepatositler ve lenfositler üzerinde SA'nın doza bağlı sitotoksitesini doğrulayan bulgular sunmuştur (Abd-Elhakim ve ark.,2018; Chen ve ark.,2016; Navarro-Escobar ve ark.,2010). Literatürdeki genel bulgular, SA'nın sitotoksiteyi indüklediğini ortaya koymaktadır. Ancak çalışmamızda kullanılan TS ile ne NIH/3T3 ne de MCF-7 hücre grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir sitotoksite saptanmamıştır. Bununla birlikte, özellikle 24 saatlik veriler değerlendirildiğinde her iki hücre grubunda da doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılık oranında sayısal bir düşüş eğilimi gözlenmiştir. Bu durum, her ne kadar literatürde bildirilen SA bulgularıyla tam bir örtüşme göstermese de sonuçların literatürdeki verileri bütünüyle reddetmediğini işaret etmektedir. Öte yandan, MCF-7 hücre grubunda 48 saatlik maruziyet sonucunda paradoksal biçimde hücre canlılık oranında artış kaydedilmiştir. Bu çelişkili bulgu, hücrelerin TS'ye karşı metabolik adaptasyon veya selektif direnç geliştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum ise kanser hücrelerinin yüksek mutasyon yükü ve heterojen yapısıyla ilişkilendirilebilir.

Triamonyum Sitrata (TS) bileşiğinin klastojenik potansiyelini değerlendiren çalışmalardan birisi Kromozomal Aberasyon (KA) testi olup elde edilen sonuçlar, TS'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir kromozomal anormallik veya klastojenik etkiye yol açmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, TS'nin genotoksik risk taşımadığı yönündeki önceki verilerle

uyumludur. Ancak, TS'nin yapısal öncülü olan Sitrik Asit (SA) ve türevlerinin klastojenik potansiyeline dair literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Ishidate ve ark. (1984), SA ve TS'nin de dahil olduğu bir dizi gıda katkı maddesinin Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde kromozomal aberasyon oluşturmadığını raporlamıştır (Ishidate ve ark.,1984). Bu bulgu, bizim TS ile elde ettiğimiz KA testi sonuçlarını desteklemekte ve TS'nin kromozomal stabiliteyi koruduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Yılmaz ve ark. (2008), insan periferik lenfositlerinde SA'nın KA testi sonucunda kromozomal anormallikleri anlamlı ölçüde artırdığını bildirmiştir (Yılmaz ve ark.,2008). Bu çelişkili sonuçlar, kullanılan hücre tiplerinin (CHO vs. insan lenfositleri) ve deneysel koşulların (örn. maruziyet süresi, konsantrasyon) sonuçlar üzerindeki etkisini vurgulamaktadır. Farklı bir çalışmada Marins ve ark. (2012), 3T3-L1 kemirgen fibroblast hücrelerinde komet testi kullanarak SA'nın kromozomal hasarı artırmadığını raporlamıştır (Marins ve ark.,2012). Bu bulgu, SA'nın klastojenik etkisinin hücre tipine ve test sistemine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Ayrıca, SA'nın kimyasal reaktivitesi ve hücre içi metabolizmasındaki farklılıklar, bu tutarsızlıkların altında yatan mekanizmalar olabilir. Örneğin, SA'nın pro-oksidan etkileri, hücre tipine bağlı olarak farklı redoks yanıtları tetikleyebilir ve bu da kromozomal stabiliteyi etkileyebilir.

Bu çalışmada, Triamonyum Sitrat (TS) bileşiğinin Mikronükleus (MN) testi kullanılarak klastojenik ve anojenik potansiyeli değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, TS'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir mikronükleus oluşumuna neden olmadığını ve dolayısıyla genotoksik bir etki göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu da TS'nin kromozomal stabiliteyi koruduğunu ve genotoksik risk taşımadığını işaret etmekte olup kromozom anormallik testinin sonuçlarıyla uyumludur. Ancak, TS'nin yapısal öncülü olan Sitrik Asit (SA) ile ilgili literatürdeki veriler tutarsızlık göstermektedir. Örneğin, Koçak (2005), kadife balığı (*Tinca tinca*) üzerinde yürüttüğü çalışmada SA'nın MN testi sonucunda genotoksik etki gösterdiğini raporlamıştır (Koçak, 2005). Benzer şekilde, Yılmaz ve ark. (2008), insan periferik lenfositlerinde SA'nın MN oluşumunu anlamlı ölçüde artırdığını belirlemiştir (Yılmaz ve ark.,2008). Bu bulgular, Bogar ve Tuylu (2019) tarafından da desteklenmiştir; insan lenfositlerinde yapılan MN testi, SA'nın doza ve süreye bağlı genotoksik potansiyelini doğrulamıştır (Bogar ve Tuylu, 2019). Buna karşılık, farklı bir çalışmada, 3T3-L1 kemirgen fibroblast hücrelerine komet testi uygulandığında SA'nın genotoksik etki göstermediği raporlanmıştır (Marins ve ark.,2012). Bu çelişkili sonuçlar, test sistemlerinin (örn. hücre tipi, tür, maruziyet süresi) genotoksik yanıtları nasıl şekillendirdiğini vurgulamaktadır.

Bizim TS ile elde ettiğimiz negatif MN testi sonuçları, Ishidate ve ark. (1984) tarafından raporlanan ve SA ile TS'nin kromozomal aberasyon oluşturmadığını gösteren bulgularla uyumludur (Ishidate ve ark.,1984). Ancak, SA'nın genotoksik etkilerini destekleyen çalışmalarla çelişmesi, TS ve SA arasındaki yapısal farklılıkların biyolojik etkileşimleri önemli ölçüde değiştirebileceğini düşündürmektedir. Özellikle, TS'nin üç amonyum grubu içeren yapısı, SA'nın karboksilik asit gruplarına kıyasla hücre içi penetrasyon ve DNA ile etkileşim potansiyelini farklılaştırabilir.

Bu çalışmada, Triamonyum Sitratın (TS) genotoksik potansiyeli indikatör deneylerden birisi olan Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, TS'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir kardeş kromatid değişimine neden olmadığını ve dolayısıyla genotoksik bir etki göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, TS'nin DNA replikasyonu ve homolog rekombinasyon süreçlerini bozmadığını işaret etmektedir. Bununla birlikte test maddesinin öncülü olan Sitrik Asit (SA) ile ilgili literatürdeki veriler, bu sonuçlarla çelişmektedir. Yılmaz ve ark. (2008), insan periferik lenfositlerinde yürüttükleri çalışmada SA'nın KKD testi sonucunda kardeş kromatid değişimini anlamlı ölçüde artırdığını raporlamıştır (Yılmaz ve ark.,2008). Bu bulgu, SA'nın DNA replikasyonu sırasında homolog rekombinasyon mekanizmalarını bozabileceğini düşündürmektedir. Bizim TS ile elde ettiğimiz negatif KKD testi sonuçları, Yılmaz ve ark. (2008) tarafından SA ile raporlanan bulgularla çelişmektedir. Bu çelişki, TS ve SA molekülleri arasındaki yapısal farklılıkların, DNA ile etkileşimlerini ve genotoksik potansiyellerini önemli ölçüde değiştirebileceğini göstermektedir. Özellikle, TS'nin amonyum gruplarının, SA'nın karboksilik asit gruplarına kıyasla farklı elektrostatik etkileşimler sergilemesi, bu moleküllerin DNA replikasyon enzimleri ve kromatid yapılarıyla olan bağlanma afinitelerini farklılaştırabilir.

Triamonyum Sitrat (TS) bileşiğinin plazmid DNA (pBR322) üzerindeki Hasarlayıcı/koruyucu etkisi, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı potansiyelini değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, TS'nin uygulanan tüm dozlarda hasarlayıcı ajana karşı anlamlı bir koruma sağladığını ve bu etkinin yüksek düzeyde önemli olduğunu ortaya koymuştur. Ancak hem yalnızca UV'ye hem de UV + H₂O₂'ye karşı koruyuculukta bu anlamlı fark kontrol grubu ile de gözlenmiş; dolayısıyla TS, tam koruma sağlayarak muamelesiz kontrol düzeyinde stabil bir etki göstermemiştir. Öte yandan, yalnızca H₂O₂'ye karşı koruma değerleri incelendiğinde, madde uygulanmayıp sadece hasarlayıcı kontrole kıyasla yüksek düzeyde anlamlı bir koruma tespit edilmiş; fakat muamelesiz kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamış ve sonuçlar kontrole oldukça yakın çıkmıştır. Bu durum, TS'nin özellikle H₂O₂ kaynaklı hasara karşı etkin bir koruma sağladığını göstermektedir. Bu bulgu, TS'nin antioksidan veya DNA koruyucu özelliklere sahip olabileceğine dair ilk ipuçlarını sunmaktadır. Literatürde, Sitrik Asit (SA) veya türevlerinin plazmid DNA üzerindeki koruyucu etkisine dair doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, sitrat molekülünün metal şelasyon yeteneği ve antioksidan özellikleri göz önüne alındığında, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu bir rol oynayabileceği teorik olarak öngörülebilir. Örneğin, sitratın demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlama kapasitesi, hidroksil radikali oluşumunu engelleyerek DNA hasarını azaltabilir. Bizim bulgularımız, TS'nin bu potansiyel koruyucu etkisini *in vitro* koşullarda desteklemektedir. Ancak bu etkinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, Triamonyum Sitrat (TS) bileşiğinin mutajenik potansiyeli, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak Ames testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, TS'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarda mutajenik bir etki göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, TS'nin bakteriyel sistemlerde genotoksik risk taşımadığını desteklemektedir. Bu sonuç, literatürdeki önceki bulgularla tutarlılık göstermektedir. Özellikle, Ishidate ve ark. (1984), TS ve SA'nın da dahil olduğu birçok gıda katkı maddesinin *Salmonella typhimurium* suşlarında mutajenik aktivite göstermediğini raporlamıştır (Ishidate ve ark.,1984). Bizim Ames testi sonuçlarımız, bu literatür bulgusunu teyit etmekte ve TS'nin prokaryotik sistemlerde mutajenik potansiyel taşımadığı hipotezini güçlendirmektedir.

Bu tez çalışması, Triamonyum Sitrat (TS) bileşiğinin *in vitro* sistemlerdeki toksikolojik profilini çok boyutlu bir perspektifle ortaya koyarak, bileşiğin biyolojik etkileşimlerine dair kritik ipuçları sunmaktadır. Elde edilen bulgular, TS'nin genotoksik, sitotoksik ve mutajenik bir risk taşımadığını; ancak ileri maruziyet koşullarında sitotoksik etkinin ortaya çıkabileceğine dair bazı şüpheler uyandırdığını göstermektedir. Özellikle CCK-8 sonuçlarında iki hücre grubunun farklı yönelimler sergilemesi, etkinin hücre tipi ve maruziyet süresine bağlı olarak dinamik bir karakter taşıdığını ortaya koymuştur. Bu paradoksal profil, TS'nin kimyasal yapısı ile biyolojik sistemler arasındaki karmaşık etkileşimleri yansıtmaktadır.

CCK-8 testi sonuçları, TS'nin sitotoksik etkisinin analizinde, NIH/3T3 fibroblast ve MCF-7 kanser hücrelerinde, dört farklı doz ile 24 ve 48 saatlik muameleler sonrasında herhangi bir doz veya süreye bağlı olarak sitotoksiste indüklediğini göstermiştir. Genotoksisite testlerinde (KA, MN, KKD) elde edilen negatif sonuçlar ise TS'nin kromozomal stabiliteyi koruduğunu ve DNA hasarına yol açmadığını desteklemektedir. Ayrıca, plazmid DNA üzerinde gözlemlenen kısmi koruyucu etki, TS'nin antioksidan veya metal şelatör özelliklerinin DNA hasarını önlemede rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

TS ile yapısal öncülü Sitrik Asit (SA) arasındaki toksikolojik farklılıklar, moleküler modifikasyonların biyolojik etkileri nasıl yeniden şekillendirebileceğini gözler önüne sermektedir. SA'nın literatürdeki çelişkili genotoksik bulgularına (örn. Marins ve ark.,2012; Yılmaz ve ark.,2008) karşın TS'nin tutarlı şekilde inert kalması, amonyum gruplarının karboksilik asitlerin reaktivitesini dengelediğini düşündürmektedir. Bu "yapısal dikotomi", kimyasal türevlendirmenin toksikolojik risk yönetiminde nasıl stratejik bir araç olabileceğini vurgulamaktadır.

TS'nin genotoksik, mutajenik ve sitotoksik risk taşıması, gıda ve farmasötik endüstrilerdeki kullanımını güvenilir kılmaktadır. Buna ek olarak, plazmid DNA üzerindeki koruyucu etki, TS'nin radyoprotektif veya kemoprotektif ajan olarak potansiyelini araştırmak için yeni kapılar aralamaktadır.

Bu çalışma, TS'nin toksikolojik profilini kapsamlı bir şekilde ortaya koyarken, kimyasal modifikasyonların biyolojik etkileşimleri nasıl dönüştürebileceğine dair disiplinler arası bir perspektif sunmaktadır. Elde edilen veriler, TS'nin endüstriyel kullanımının güvenliğini desteklese

de bileşğin terapötik potansiyelinin keşfi için yeni araştırma paradigmalarına ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu öncü çalışma, Triamonyum Sitrat (TS) molekülünün toksikolojik profilini *in vitro* modellerde multidisipliner bir yaklaşımla derinlemesine inceleyerek hem endüstriyel uygulamalarındaki güvenlik değerlendirmesine hem de potansiyel terapötik kullanım alanlarına yönelik önemli bulgular sunmuştur. Araştırma, TS'nin *in vitro* koşullarda genotoksik, sitotoksik ve mutajenik bir risk taşımadığını hatta plazmid DNA (pBR322) üzerinde radyoprotektif ve kemoprotektif bir etki göstermiştir. Bu bulgular, TS'nin biyolojik sistemlerle etkileşimlerinin nüanslarını anlamak ve potansiyel uygulama alanlarını keşfetmek için kritik bir temel sağlamaktadır.

Elde edilen sonuçlar, TS'nin toksikolojik özelliklerini çeşitli validasyonu yüksek test sistemleriyle kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Kromozomal Aberasyon (KA), Mikronükleus (MN) ve Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) analizleri yoluyla gerçekleştirilen genotoksisite testleri TS'nin kromozomal yapıyı bozmadığını, mikronükleus oluşumunu tetiklemediğini veya kardeş kromatid değişimi frekansını artırmadığını göstermiştir. Ames mutajenite testi, TS'nin *Salmonella typhimurium* sistemlerinde mutajenik aktivite sergilemediğini teyit ederek, bileşiğin bakteriyel DNA üzerinde mutasyon indüklemeye riskinin düşük olduğunu ortaya koymuştur. Sitotoksisite değerlendirmeleri, CCK-8, Nükleer Bölünme İndeksi (NBI), Mitotik İndeks (MI) ve Proliferasyon İndeksi (PI) gibi yöntemlerle değerlendirilmiş olup sitotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, TS'nin normal NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüş ile MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sayısal olarak artış eğilimi, net bir sonuç ortaya koymasa da bu etkilere dair şüpheli bakılması gerektiğini vurgulamaktadır. Buna ek olarak sağlıklı hücre grubunda hücre canlılık oranında düşüş eğilimi gözlenirken kanserli hücre grubunda artan sürelerde sayısal olarak canlılık oranında artış gözlenmiştir. Bu paradoksal yanıt, kanser hücrelerinin adaptif sağkalım mekanizmaları ve metabolik ihtiyaçlarındaki değişimlerle ilişkilendirilmiş; bu da TS'nin kanser biyolojisi ve farmakolojisi açısından dikkat çekici bir potansiyel sunduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, plazmid DNA koruyucu etki deneyi, TS'nin oksidatif (özellikle H₂O₂) stres kaynaklı DNA hasarına karşı sınırlı bir koruyucu etki sergileyebileceğine dair ilginç bir bulgu sunmuş ve bileşiğin potansiyel antioksidan veya DNA stabilizasyon mekanizmalarına sahip olabileceği hipotezini gündeme getirmiştir.

Bu çalışma, bilimsel literatüre önemli katkılar sağlamış ve TS'nin toksikolojik profilini anlamada özgün bir perspektif sunmuştur. Öncelikle, genotoksikite, sitotoksisite ve mutajeniteyi eş zamanlı olarak değerlendiren geniş bir test bataryası kullanılarak, TS'nin toksikolojik risk değerlendirmesi daha bütüncül ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Testlerin OECD ve ISO gibi uluslararası standartlarla uyumlu olması, bulguların global bilimsel platformda kabul edilebilirliğini artırmaktadır. İkinci olarak, TS'nin farklı fizyolojik özelliklere sahip hücre tiplerinde (normal fibroblastlar ve meme kanseri hücreleri) ve değişken maruziyet sürelerinde (24 ve 48 saat) sergilediği dinamik toksikolojik yanıtlar, bileşiğin biyolojik etkileşimlerindeki karmaşıklığı ve

sergilediği dinamik toksikolojik yanıtlar, bileşiğin biyolojik etkileşimlerindeki karmaşıklığı ve hücre-spesifik özelliklerini ortaya koymuştur. Üçüncü olarak, TS ile Sitrik Asit arasındaki toksikolojik farklılıkların sistematik karşılaştırması, kimyasal modifikasyonların (TS'deki amonyum ilavesi) biyolojik etkiler üzerindeki dönüştürücü rolünü aydınlatmış ve yapı-aktivite ilişkileri açısından literatüre değerli bir katkı sunmuştur. Son olarak, plazmid DNA üzerindeki kısmi koruyucu etki, TS'nin beklenmedik bir biyolojik özelliğine işaret ederek, bileşiğin antioksidan veya DNA stabilizasyon potansiyelini değerlendirmek için ileri araştırmalara ilham vermiştir.

Bu çalışmanın bulguları, TS'nin endüstriyel kullanımının genel güvenliğini desteklemekle birlikte, bileşiğin potansiyel terapötik uygulamalarını keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır. Bununla birlikte, çalışmanın bazı yönleri, *in vitro* modellerin doğası gereği belirli sınırlılıklar içermektedir. Örneğin, bu çalışma yalnızca *in vitro* sistemlere dayandığından, TS'nin *in vivo* koşullardaki farmakokinetik davranışları, sistemik toksisite profili veya uzun vadeli etkileri gibi parametreler değerlendirilememiştir. Bu tür bilgiler, TS'nin gerçek fizyolojik koşullardaki davranışını anlamak için önem taşımaktadır. Ayrıca, TS'nin sitotoksik ve koruyucu etkilerinin altındaki moleküler mekanizmalar, mevcut veri setimizle tam olarak çözülememiş olup, daha ileri düzey moleküler biyoloji ve biyokimya analizleri gerektirebilir. Ancak bu durum, gelecekteki çalışmalar için ilgi çekici bir araştırma alanı sunmaktadır. Bu sınırlamalar, bulguların doğrudan klinik veya çevresel bağlamda genellenmesini bir ölçüde kısıtlasa da çalışmanın *in vitro* koşullardaki kapsamlı sonuçları, TS'nin toksikolojik ve biyolojik potansiyelini anlamak için sağlam bir temel oluşturmaktadır.

Öncelikle TS'nin uzun vadeli toksikolojik etkileri, sistemik toksisite profili, hedef organ toksisitesi ve farmakokinetik özellikleri, uygun kemirgen modellerinde (örneğin, sıçan veya fare) kronik maruziyet protokolleriyle değerlendirilmelidir. Bu tür *in vivo* çalışmalar, *in vitro* bulgularımızın klinik ve çevresel bağlamda doğrulanmasına ve risk değerlendirmesine katkı sağlayacaktır. İkinci olarak, TS'nin DNA koruyucu etkilerinin moleküler mekanizmaları, transkriptomik, proteomik, metabolomik analizler ve sinyal yolları çalışmalarıyla daha derinlemesine incelenmelidir. Plazmid DNA üzerindeki koruyucu etkinin (antioksidan enzim indüksiyonu, DNA tamir yolları) ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, TS'nin biyolojik etkilerini moleküler düzeyde aydınlatılabilir. Üçüncü olarak, TS'nin farklı kanser hücre tiplerinde ve normal hücre popülasyonlarında etkileri karşılaştırmalı olarak araştırılmalıdır; bu, TS'nin kanser-spesifik toksisite veya terapötik potansiyelini değerlendirmek için önemli bir adım olacaktır. Dördüncü olarak, TS'nin endüstriyel kullanımında güvenli doz aralıkları ve kanser tedavilerinde potansiyel rolü, kronik toksisite çalışmaları ve klinik öncesi modellerle ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir. Bu tür araştırmalar, TS'nin gıda katkı maddesi olarak kullanım sınırlarını belirlemenin yanı sıra kanser biyolojisindeki olası uygulamalarını değerlendirebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, TS bileşiğinin toksikolojik davranışını farmakolojik mekanizmalar ve metabolik süreçler çerçevesinde sistemli bir şekilde inceleyerek, endüstriyel güvenlik parametreleri ile terapötik potansiyel arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Araştırma, TS'nin reseptör etkileşimlerinin dinamik yapısını ve toksisite-biyoaktivite dengesini açıklığa kavuşturarak literatürdeki veri boşluklarını doldurmuştur. Bulgular, kimyasal stabilitesinin risk yönetimi üzerindeki etkisini ve post-modifikasyonların farmakokinetik profil değişimlerini nicel olarak belgelemiştir. TS'nin terapötik özelliklerinin moleküler temellerinin ortaya konması, gelecekteki araştırmalar için ana bir yön önermektedir. Bu doğrultuda, maddenin DNA üzerindeki koruyucu etkisinin farklı sistemlerde de incelenmesi ve etkinliğinin artırılmasına yönelik kimyasal modifikasyonların araştırılması önemli geliştirmeler olacaktır. Bu amaçla, kimyasal biyoloji ile terapötik genomik yöntemlerin entegrasyonuna dayalı multidisipliner çalışmalar, TS'nin klinik ve endüstriyel uygulamalarını genişletmede kritik bir rol üstlenecektir.





KAYNAKLAR

- Abd-Elhakim, Y. M., Anwar, A., Hashem, M. M., Moustafa, G. G., & Abo-El-Sooud, K. (2018). Sodium Acetate, Sodium Acid Pyrophosphate, and Citric Acid Impacts on Isolated Peripheral Lymphocyte Viability, Proliferation, and DNA Damage. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(8).
<https://doi.org/10.1002/JBT.22171>,
- Al-Ani, F. Y., & Al-Lami, S. K. (1988). Absence of mutagenic activity of acidity regulators in the Ames Salmonella/microsome test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 206(4), 467-470. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(88\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(88)90055-9)
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D., & Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)
- Alenius, H., Catalán, J., Lindberg, H., Norppa, H., Palomäki, J., & Savolainen, K. (2014). Nanomaterials and Human Health. *Handbook of Nanosafety*, 59–133.
doi:10.1016/b978-0-12-416604-2.00003-2
- Altuğ T., 2009. Gıda Katkı Maddeleri., SİDAS, İzmir, 276s.
- Al-Qayim, M., & Saadoon, D. (2013). *ASSESSMENT OF THE AMELIORATIVE ROLE OF PROPLIS AND MALIC ACID IN INTESTINAL AND LIVER FUNCTIONS OF ALUMINUM EXPOSED MALE RATS*.
- Al-Qayim, M. A., & Mashī, S. (2014). Renal effects of propolis and malic acid in Aluminum exposed male rats. *App. Sci. Rep*, 5(1), 26-30.
- Amaral, K. F., Rogero, M. M., Fock, R. A., Borelli, P., & Gavini, G. (2007). Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *International Endodontic Journal*, 40(5), 338-343. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2007.01220.X>,
- Ames, B. N., Lee, F. D., & Durston, W. E. (1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 782-786.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.70.3.782>
- Ames, B. N., McCann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.; (Netherlands)*, 31.

- Anderson, D. (1988). GENETIC TOXICOLOGY TESTING AND BIOMONITORING OF ENVIRONMENTAL OR OCCUPATIONAL EXPOSURE-PREFACE. *Mutation Research*, 204(3), 353-353.
- Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J., & Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 261-271.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90300-X)
- Anonim 1: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm> [Son erişim tarihi: 15.07.2024]
- Anonim 2: <https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers> [Son erişim tarihi: 15.07.2024]
- Anonim 3: <http://www.zootezni.org.tr/ekran.asp?id=3&altid=79> [Son erişim tarihi: 15.07.2024]
- Anonim 4: https://en.wikipedia.org/wiki/Genotoxicity#Further_reading [Son erişim tarihi: 16.07.2024]
- Anonim 5: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/96992> => chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/381/017/96992dat.pdf> {Son erişim tarihi: 17.07.2024]
- Anonim 6: https://en.wikipedia.org/wiki/Triammonium_citrate#cite_note-pc-2 [Son erişim tarihi: 17.07.2024]
- Antunes, L. M. G., Araújo, M. C. P., Darin, J. D. A. C., & Bianchi, M. D. L. P. (2000). Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1-2), 131-137. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00220-X)
- Antunes, L. M. G., Darin, J. D. C., & Bianchi, M. de L. P. (1999). Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3), 415-417. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300022>
- Antunes, L. M. G., & Takahashi, C. S. (1998). Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 419(1-3), 137-143. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00132-6)
- Antunes, L. M., & Takahashi, C. S. (1999). Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 19(1), 53-59.

- Arslan, G. (2011). *Gıda katkı maddeleri ve yeni yapılan dioksimlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi*. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. <https://hdl.handle.net/20.500.12395/2073>
- Arslan, M. E. (2021). Anticarcinogenic properties of malic acid on glioblastoma cell line through necrotic cell death mechanism. *MANAS Journal of Engineering*, 9(1), 22-29. <https://doi.org/10.51354/MJEN.848282>
- Atman, Ü. C. (2004). Gıda katkı maddeleri ve gıda kontrolü. *Sted*, 13(3), 86-88.
- Boğa, U., & DoçDrSeçil BİNOKAY, Y. (2010). Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımıza Etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(3), 141-154. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/2219/29424>
- Badr, A. (1983). Mitodepressive and Chromotoxic Activities of Two Herbicides in *Allium cepa*. *CYTOLOGIA*, 48(3), 451-457. <https://doi.org/10.1508/CYTOLOGIA.48.451>
- Bağcı T Gıda Katkı Maddeleri Halk Sağlığı Temel Bilgiler Kitabı Haccettepe Üniversitesi Yayınları, 2006; (846-847) 7)
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş., & Alvr, M. (2004). DNA hasarı analizinde μ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 97-103.,
- Bogar, F., & Tuylu, B. A. (2019). Determination of genotoxic effects of some food additives with the help of CBMN technique.
- Boğa Pekmezekmek, A. (2004). *Nikel, magnezyum, kobalt, kadmiyum, çinko klorür`ün teratojenik; embriyotoksik etkilerinin fetax testi kullanılarak xenopus laevis`te araştırılması*. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/127686>
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.-P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Giorgio, M. Di, Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., ... Zijno, A. (2001). HUMAN MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37, 31-45. [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2001\)37:1](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2001)37:1)
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Huici Montagud, A., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., & Norppa, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Research*, 60(6), 1619-1625. <https://researchprofiles.ku.dk/en/publications/chromosomal-aberrations-in-lymphocytes-predict-human-cancer-indep>

- Carrano, A. V., & Natarajan, A. T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 204(3), 379-406. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(88\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(88)90036-5)
- Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A., & Minkler, J. L. (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 1978 271:5645, 271(5645), 551-553. <https://doi.org/10.1038/271551a0>
- Chan, C. P., Jeng, J. H., Hsieh, C. C., Lin, C. L., Lei, D., & Chang, M. C. (1999). Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 25(5), 354-358. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81171-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81171-4)
- Changmao Biochemical Engineering Co., Ltd (CMBEC), 2004. JiangSu Provincial Center For Disease Control and Prevention Inspection Report. Measure of Shu No (Z 0101), No L0180. 2004-Nov-4.
- Chen, X., Lv, Q., Liu, Y., & Deng, W. (2016). Effect of food additive citric acid on the growth of human esophageal carcinoma cell line EC109. *Cell Journal*, 18(4), 493-502. <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2016.4716>,
- Chen, X. Y., Chen, Y., Qu, C. J., Pan, Z. H., Qin, Y., Zhang, X., Liu, W. J., Li, D. F., & Zheng, Q. (2019). Vitamin C induces human melanoma A375 cell apoptosis via Bax- And Bcl-2-mediated mitochondrial pathways. *Oncology Letters*, 18(4), 3880-3886. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10686>,
- Cheng, M., Conner, M. K., & Alarie, Y. (1981). Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities. *Cancer Research*, 41(11_Part_1), 4489-4492.
- Countryman, P. I., & Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation research*, 41(2-3), 321-331. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(76\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(76)90105-6)
- Çalışır, Z. E., & Çalışkan, D. (2003). FOOD ADDITIVES AND EFFECTS ON THE HUMAN HEALTH. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(3), 193-206. https://doi.org/10.1501/ECZFAK_00000000411
- Çalışkan, A. (2021). Gıda Üreticisinin Hukuki Sorumluluğu (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul.
- Dellarco, V. L., Mavournin, K. H., & Tice, R. R. (1985). Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environmental mutagenesis*, 7(3), 405-424. <https://doi.org/10.1002/EM.2860070314>
- Dimovasili, C., Fadoulougrou, V. E., Kefala, A., Providaki, M., Kotsifaki, D., Kanavouras, K., Sarrou, I., Plaitakis, A., Zaganas, I., & Kokkinidis, M. (2021). Crystal structure of glutamate dehydrogenase 2, a positively selected novel human enzyme involved in

- brain biology and cancer pathophysiology. *Journal of Neurochemistry*, 157(3), 802-815. <https://doi.org/10.1111/JNC.15296>
- Domingo, J. L., Gómez, M., Llobet, J. M., & Corbella, J. (1988). Citric, malic and succinic acids as possible alternatives to deferoxamine in aluminum toxicity. *Clinical Toxicology*, 26(1-2), 67-79. <https://doi.org/10.3109/15563658808995398>.
- Dose (The Dictionary of Substances and their Effects) (1994) Royal Society of Chemistry, Cambridge 6: 1–1000.
- Du, J., Martin, S. M., Levine, M., Wagner, B. A., Buettner, G. R., Wang, S. H., Taghiyev, A. F., Du, C., Knudson, C. M., & Cullen, J. J. (2010). Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(2), 509-520. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1713>,
- Eastmond, D. A., & Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1), 34-43. <https://doi.org/10.1002/EM.2850130104>,
- Eroğlu, E. İ., & Ayaz, A. (2018). Gıda Katkı Maddelerinin Sağlık Üzerine Etkileri: Risk Değerlendirme. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(3), 311-319.
- Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.
- Feig, D. I., Reid, T. M., & Loeb, L. A. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer research*, 54(7_Supplement), 1890s-1894s.
- Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2), 11-18. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00041-4),
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-416. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00480-8)
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)
- Food and Drug Administration. Mutagenic Evaluation of Compound FDA 71-50, Adipic Acid. PB-245 466. 1974

- Galloway, S. M., & Painter, R. B. (1979). Vitamin C is positive in the DNA synthesis inhibition and sister-chromatid exchange tests. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 60(3), 321-327.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(79\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(79)90022-8),
- Gardner, H., 1966. Food Acidulants. Allied Chemical Corp. New York. 185s.
- García-Rodríguez, M. D. C., Hernández-Cortés, L. M., & Altamirano-Lozano, M. A. (2016). In Vivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 6797851.
<https://doi.org/10.1155/2016/6797851>
- Ghaskadbi, S., Rajmachikar, S., Agate, C., Kapadi, A. H., & Vaidya, V. G. (1992). Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the in vivo rodent micronucleus assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 12(1), 11-17.
<https://doi.org/10.1002/TCM.1770120103;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Giri, A., Khynriam, D., & Prasad, S. B. (1998). Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 421(2), 139-148.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00158-4)
- Green, M. H. L., Lowe, J. E., Waugh, A. P. W., Aldridge, K. E., Cole, J., & Arlett, C. F. (1994). Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutation Research DNAGing*, 316(2), 91-102.
[https://doi.org/10.1016/0921-8734\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0921-8734(94)90011-6)
- Guo, H., Chen, H., Hong, C., Jiang, D., & Zheng, B. (2017). Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 119-128. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.03.018>
- Gutteridge, J. M. C. (1984). Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 172(2), 245-249. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81134-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81134-5)
- Gül, E., Öztürk, M., & Bayır, A. G. Gıda Katkı Maddelerinin Sağlık Üzerine Etkisi. Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi, (6), 44-57.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C., Forni, A., Hansteen, I.-L., Högstedt, B., Huici Montagud, A., Lambert, B., Mitelman, F., Nordenson, I., Salomaa, S., Skerfving, S. 1998. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer-A Report From The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 58, 4117-4121.

- Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I.-L., Heim, S., Høgstvedt, B., Knudsen, L. E., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., & Sorsa, M. (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54(11), 2919-2922.
<https://nfa.elsevierpure.com/en/publications/cancer-risk-in-humans-predicted-by-increased-levels-of-chromosoma>
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, P., & MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 277-291. <https://doi.org/10.1002/EM.2850180414>
- Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532(1-2), 103-115. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2003.08.013>
- Hsiao, Y. P., Lai, W. W., Wu, S. B., Tsai, C. H., Tang, S. C., Chung, J. G., & Yang, J. H. (2015). Triggering apoptotic death of human epidermal keratinocytes by malic acid: Involvement of endoplasmic reticulum Stress- and Mitochondria-Dependent signaling pathways. *Toxins*, 7(1), 81-96. <https://doi.org/10.3390/TOXINS7010081>
- Ishidate, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., & Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22(8), 623-636.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(84\)90271-0](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90271-0)
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44(7), 1299-1305.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00017-9)
- ISO (2003). ISO 10993-3: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 3: Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity, and Reproductive Toxicity. Geneva: International Organization for Standardization.
- Jenkins, G. J. S., Doak, S. H., Johnson, G. E., Quick, E., Waters, E. M., & Parry, J. M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis*, 20(6), 389-398. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEI054>
- Kalyoncu, F. (2008). GIDA SANAYİNDE SIKLIKLA KULLANILAN ANTİFUNGAL KATKI MADDELERİ. *Engineering Sciences*, 3(3), 462-426.
<https://doi.org/10.12739/NWSAES.V3I3.5000067181>
- Karatepe, T. U., & Ekerbiçer, H. Ç. (2018). Gıda Katkı Maddeleri. *Sakarya Tıp Dergisi*, 7(4), 164-167. <https://doi.org/10.31832/SMJ.368978>

- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F. J. R., Speit, G., & Holden, H. E. (1991). Evaluation of the mutagenicity of β -myrcene in mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(1), 28-34. <https://doi.org/10.1002/EM.2850180106>,
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., & Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392(1-2), 19-30. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00042-6)
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., & Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology 2011* 85:8, 85(8), 873-899. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0691-4>
- Koçak, Y., 2005, Sitrik asitin Tinca tinca (L., 1758) (pisces: Cyprinidae) üzerindeki genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 55s.
- Kramer, P. J., & Pharm Pharmacol, J. (1998). Genetic Toxicology*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(4), 395-405. <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1998.TB06879.X>
- Krishna, G., Nath, J., & Ong, T. (1986). Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer research*, 46(6), 2670-2674.
- Kuroda, M., Yoshida, D., & Mizusaki, S. (1985). Mutagenicity of Pyrolyzates of Natural Substances toward Salmonella typhimurium TA97. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(6), 1893-1895. <https://doi.org/10.1271/BBB1961.49.1893>
- Lancey, C., Tehseen, M., Raducanu, V. S., Rashid, F., Merino, N., Ragan, T. J., Savva, C. G., Zaher, M. S., Shirbini, A., Blanco, F. J., Hamdan, S. M., & De Biasio, A. (2020). Structure of the processive human Pol δ holoenzyme. *Nature Communications 2020* 11:1, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14898-6>
- Luetzow, M. (2003). Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective. *Toxicology Letters*, 140-141, 419-425. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00038-9)
- Mace, M. L., Daskal, Y., & Wray, W. (1978). Scanning-electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 52(2), 199-206. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(78\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(78)90141-0),
- Mamede, A. C., Pires, A. S., Abrantes, A. M., Tavares, S. D., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J. E., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Maia, J. M., & Botelho, M. F. (2012). Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line

- (WiDr): In vitro and in vivo studies. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1049-1057. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.713539>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Marins, J. S. R., Sassone, L. M., Fidel, S. R., & Ribeiro, D. A. (2012). In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCL, MTAD and citric acid. *Brazilian Dental Journal*, 23(5), 527-533. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402012000500010>,
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- McCann, J., Spingarn, N. E., Kabori, J., & Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(3), 979-983. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.3.979>
- Millstone E, Zwanenberg PV, 2002. The Evolution of Food Safety Policy – Making Institutions in the UK, EU and Codex Alimentarius. *Social Policy & Administration*, 36(6): 593-609.
- Mohandas, T., & Grant, W. F. (1972). CYTOGENETIC EFFECTS OF 2,4-D AND AMITROLE IN RELATION TO NUCLEAR VOLUME AND DNA CONTENT IN SOME HIGHER PLANTS. <https://doi.org/10.1139/g72-095>, 14(4), 773-783. <https://doi.org/10.1139/G72-095>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 29-60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Navarro-Escobar, E., González-Rodríguez, M. P., & Ferrer-Luque, C. M. (2010). Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 15(1). <https://doi.org/10.4317/MEDORAL.15.E90>,
- Nefic, H. (2001). Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 498(1-2), 89-98. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00269-8)
- Nefić, H. (2008). THE GENOTOXICITY OF VITAMIN C IN VITRO. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 8(2), 141. <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2008.2969>

- Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 309-334. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2003.12.042>
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R. J., Knudsen, L. E., Barale, R., & Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 37-45. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2006.05.030>
- Norppa, H., & Falck, G. C. M. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3), 221-233. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/18.3.221>
- OECD (2016). Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Series on Testing and Assessment, No. 256, OECD Publishing, Paris. ENV/JM/MONO(2016)33. [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2016\)33/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2016)33/en/pdf)
- Ouchi, T., Fujino, A., Tanaka, K., & Banba, T. (1990). Synthesis and antitumor activity of conjugates of poly(α -malic acid) and 5-fluorouracils bound via ester, amide or carbamoyl bonds. *Journal of Controlled Release*, 12(2), 143-153. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90090-G](https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90090-G)
- Pandir, D. (2016). DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*, 68(4), 725-733. <https://doi.org/10.1007/S10616-014-9824-Y>
- Perry, P., & Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen–carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975 258:5531, 258(5531), 121-125. <https://doi.org/10.1038/258121a0>
- Perry, P., & Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Natur*, 251(5471), 156-158. <https://doi.org/10.1038/251156A0>
- Pifferi, G., & Restani, P. (2003). The safety of pharmaceutical excipients. *Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)*, 58(8), 541-550. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(03\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00079-X)
- Priva, M. J., Simmon, V. F., & Mortelmans, K. E. (1991). Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(4), 321-329. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90017-G](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90017-G)
- Rama, R. P., Kaul, C. L., & Jena, G. B. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian journal of pharmacology*, 34(2), 86-89.
- Ramel, C., & Magnusson, J. (1979). Chemical Induction of Nondisjunction in *Drosophila*. *Environmental Health Perspectives*, 31, 59. <https://doi.org/10.2307/3429143>

- Ranzato, E., Biffo, S., & Burlando, B. (2010). Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma a redox trojan mechanism. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(1), 108-117. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2009-0340OC>,
- Ravi AP, 2008. Why Would International Administrative Activity Be Any Less Legitimate. A Study of the Codex Alimentarius Commission, 9 GER. L.J. 1693, 1703 (2008)
- Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi.*, (5):19-24.
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2006). Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In *Cell biology* (pp. 25-31). Academic Press.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V. 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.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L., & Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2), 91-98. <https://doi.org/10.1023/A:1007685909018/METRICS>
- Savage, J. R. K. (1993). Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22(4), 198-207. <https://doi.org/10.1002/EM.2850220404>
- Seukep, A. J., Noumedem, J. A. K., Djeussi, D. E., & Kuete, V. (2014). Genotoxicity and Teratogenicity of African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 235–275. doi:10.1016/b978-0-12-800018-2.00009-1
- Sezgin, A. C. ve Ayyıldız, S. (2017). Food additives: Colorants. *Science within Food: Up-to-Date Advances on Research and Educational Ideas*, 8794.
- SHIMIZU, H., SUZUKI, Y., TAKEMURA, N., GOTO, S., & MATSUSHITA, H. (1985). The results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, 27(6), 400-419. <https://doi.org/10.1539/JOH1959.27.400>, 'TRUE', 'EN'),
- Simmon, V. F., & Eckford, S. L. (1978). MICROBIAL MUTAGENESIS TESTING OF SUBSTANCES. COMPOUND REPORT: F76-009, ADIPIC ACID, ALDRICH LOT EB050377, CAS NO. 124-04-9
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., & Takeda, S. (1999). Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 5166-5169. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.5166>
- Speit, G. (1984). Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 67(3), 264-269. <https://doi.org/10.1007/BF00291353/METRICS>
- Speit, G., & Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes - II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Human Genetics*, 70(2), 126-129. <https://doi.org/10.1007/BF00273070/METRICS>
- Speit, G., Wolf, M., & Vogel, W. (1980). The SCE-inducing capacity of vitamin C: Investigations in vitro and in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 78(3), 273-278. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(80\)90109-3](https://doi.org/10.1016/0165-1218(80)90109-3)
- Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G. J., & Champoux, J. J. (1998). A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. *Science*, 279(5356), 1534-1541. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5356.1534>
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., & Marcos, R. (1995). The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 342(1-2), 43-59. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90089-6)
- Şekeroğlu, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Şimşek H., 2010. Gıda Katkı Maddeleri Rehberi., Fazilet neşriyat, İstanbul, 299s.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., & Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82(2), 237-246. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2010.10.006>
- Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing.
- TGKY, 2013, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmî Gazete. 30 Haziran 2013. Sayı: 28693. Ankara.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M., & Smith, M. T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 388(1), 85-95. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(96\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(96)00140-4)

- Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 6(1), 112-118.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara, 176s.
- Topaktaş, M. ve Speit, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç. Ü. Sağlık Bil. Der., 5(1, 2, 3):73-84.
- Topçu, A. A., Yurttagül, M. ve Yücecan, S. (2005). Üniversite öğrencilerinin gıda katkı maddeleri ile ilgili bilgi ve davranışları. Beslenme ve Diyet Dergisi, 33(2), 39-50.
- Tringides, M. L., Zhang, Z., Morgan, C. E., Su, C. C., & Yu, E. W. (2023). A cryo-electron microscopic approach to elucidate protein structures from human brain microsomes. *Life Science Alliance*, 6(2). <https://doi.org/10.26508/LSA.202201724>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R., & Carrano, A. V. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 297(2), 101-180. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(93\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0165-1110(93)90001-4)
- Türkoğlu, Ş. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 4-14. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2006.07.006>,
- Ünlü, D., & Bayır, A. G. (2022). Koruyucu Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığa Etkisi. Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi, (4), 55-68.
- Verrax, J., & Calderon, P. B. (2009). Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 32-40. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.02.016>,
- Walton, K., Walker, R., Van De Sandt, J. J. M., Castell, J. V., Knapp, A. G. A. A., Kozianowski, G., Roberfroid, M., & Schilter, B. (1999). The application of in vitro data in the derivation of the Acceptable Daily Intake of food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37(12), 1175-1197. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00107-6)
- Wang, G., Yin, T., & Wang, Y. (2016). In vitro and in vivo assessment of high-dose vitamin C against murine tumors. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(5), 3058-3062. <https://doi.org/10.3892/ETM.2016.3707>,

- Wilson, D. M., & Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2006.11.017>
- Yeom, C. H., Lee, G., Park, J. H., Yu, J., Park, S., Yi, S. Y., Lee, H., Hong, Y. S., Yang, J., & Lee, S. (2009). High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. *Journal of Translational Medicine*, 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-70>
- Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., & Aksoy, H. (2008). Clastogenic effects of food additive citric acid in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*, 56(2), 137. <https://doi.org/10.1007/S10616-008-9137-0>
- Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., & Çelik, M. (2014). DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 30(10), 926-937. https://doi.org/10.1177/0748233712466132/ASSET/55097D87-7D9D-4AB8-ADE5-3B50D3C151FB/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_0748233712466132-FIG6.JPG
- Ying, T. H., Chen, C. W., Hsiao, Y. P., Hung, S. J., Chung, J. G., & Yang, J. H. (2013). Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase- and mitochondrial-dependent signaling pathways. *Anticancer Research*, 33(10), 4411-4420. <https://tcu.elsevierpure.com/zh/publications/citric-acid-induces-cell-cycle-arrest-and-apoptosis-of-human-imm-2>
- Yoshida, D., & Okamoto, H. (1982). Mutagenicity of the Pyrolysis Products of Ammonium Salts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(4), 1067-1068. <https://doi.org/10.1271/BBB1961.46.1067>
- Yörük, N. G., & Danyer, E. (2016). Gıda katkı maddeleri genel bilgiler ve tanımlar. Türkiye Klinikleri Food Sciences-Special Topics, 2(2), 1-10.
- Yurttagül M, Ayaz A. Katkı maddeleri: yanlışlar ve doğrular. Sağlık Bakanlığı yayını no: 727. 1. Basım. Ankara: Klavmat Matbaacılık 2008.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5), 363-371. <https://doi.org/10.1002/EM.20062>
- Zeiger, E., & Mortelmans, K. (1999). The Salmonella (Ames) Test for Mutagenicity. *Current Protocols in Toxicology*, 00(1), 3.1.1-3.1.29. <https://doi.org/10.1002/0471140856.TX0301S00>

ÖZGEÇMİŞ

Emin ÖZTÜRK ilk ve ortaöğrenimini Adana Tabipler Odası ilkokulunda, Lise öğrenimini Ramazan Atıl Anadolu Lisesinde tamamladı. 2018-2022 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2022 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

