



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**Gıda Katkı Maddelerinin TK-6 Lenfoblast Hücrelerindeki Toksik
Etkileri**

Kübra METİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuncay ORTA**

Nisan, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, [Tarih girmek için burayı tıklatın.] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [.....],
[.....]nda [.....] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Tuncay ORTAI] (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

[Prof. Dr.] [Önder KILIÇ]
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

[Dr. Öğr. Üyesi] [Narin ABDULLAH]
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37280 numaralı projesi ile desteklenmiştir. |



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Tuncay ORTA'ya sonsuz minnet ve teşekkürü borç bilirim.

Araştırma ve çalışmalarımda yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Merve CİVELEK ve Medine TOY'a teşekkür ederim. Her anımda yanımda olan, destekleyen ve yol gösteren canım arkadaşlarım Betül DERE, Zeynep BAŞTAN ve Asena SÜTÇÜOĞLU'na çok teşekkür ederim. Bu yolda her zaman desteğini ve sevgisini her koşulda gösteren hayat arkadaşım Ogün BATARLAR'a ayrıca teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni destekleyen, eğitimim için elinden geleni yapan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. |

Nisan 2023

|Kübra METİN|

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 GIDA KATKI MADDELERİ.....	2
2.2 GIDA KATKI MADDELERİNİN ÇEŞİTLERİ VE SINIFLANDIRILMASI.....	3
2.3 GIDA KATKI MADDELERİNİN GÜVENİRLİLİĞİ.....	6
2.4 GIDA KATKI MADDELERİNİN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	6
2.5 ANTİMİKROBİYAL GIDA KARKI MADDELERİ.....	7
2.6 SODYUM SORBAT / SORBİK ASİT SODYUM TUZU (E-201).....	8
2.7 BENZOİK ASİT (E-210).....	10
2.8 POTASYUM BENZOAT (E-212).....	11
2.9 FARKLI MATERYAL VE DENEY SİSTEMLERİYLE YAPILAN GENOTOKSİK ARAŞTIRMALAR.....	13
2.10 KANSER VE GIDA KORUYUCULARI ARASINDAKİ İLİŞKİ.....	15
2.11 MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.....	16
2.11.1 Mikronükleus Hesaplamaları ve Değerlendirilmesi.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1 DENEY MATERYALLERİ.....	20
3.1.1 Sodyum Sorbat.....	20
3.1.2 Benzoik Asit.....	20
3.1.3 Potasyum Benzoat.....	21

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE MEDYUM HAZIRLIĞI.....	21
3.2.1 Medyum Hazırlığı.....	21
3.2.2 Hücre Pasajı.....	22
3.3. DENEY SÜRECİ.....	22
3.4. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	24
3.5. İSTATİKSEL METOT.....	25
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
6. KAYNAKLAR.....	39
7. ÖZGEÇMİŞ.....	48

|



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1:Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.2:Sodyum sorbatın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.3:Benzoik asitin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4:Potasyum benzoatın kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.5:Skorlanabilir binükleat hücre yapıları.....	18
Şekil 2.6:Skorlanabilir mikronükleus (MN) bulunduran hücre yapıları.....	19
Şekil 3.1:CO ₂ etüvünde inkübasyona bırakılmış hücre flaskları.....	23
Şekil 4.1:Benzoik asit uygulaması sonucu elde edilen MN/BN – Doz (µg/ml) grafiği...	27
Şekil 4.2:Benzoik asit uygulaması sonucu elde edilen Pİ/ Doz (µg/ml) grafiği.....	27
Şekil 4.3:Potasyum benzoat uygulaması sonucu elde edilen MN/BN–Doz(µg/ml) grafiği..	29
Şekil 4.4:Potasyum benzoat uygulaması sonucu elde edilen Pİ/ Doz (µg/ml) grafiği.....	29
Şekil 4.5:Sodyum sorbat uygulaması sonucu elde edilen MN/BN – Doz (µg/ml) grafiği...	31
Şekil 4.6:Sodyum sorbat uygulaması soucu elde edilen Pİ/ Doz (µg/ml) grafiği.....	31

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 4.1: Benzoik asit sayım sonuçları.....	26
Tablo 4.2: Potasyum benzoat sayım sonuçları.....	28
Tablo 4.3: Sodyum sorbat sayım sonuçları.....	30



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg/mL	: Mikrogram/mililitre
mg/kg	: Miligram/kilogram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
LD ₅₀	: Letal doz ₅₀
rpm	: Devir sayısı
V	: Volt
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mg/mL	: Miligram/Mililitre
KCL	: Potasyum Klorür
M	: Molar
CO ₂	: Karbondioksit
Dk	: Dakika
RPMI -1640	: Büyüme ortamı (medyum)

Kısaltmalar	Açıklama
CAs	: Chromosomal aberretions
Cyt-B	: Sitokalsin - B
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etildiaminotetra asetik asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda Tarım Teşkilatı
KA	: Kromozom Anormalliği
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
MN	: Mikronükleus
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
BHA	: Beta Hidroksi Asit
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
GKM	: Gıda Koruyucu Maddeleri
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
HPGRT	: Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz
NBI	: Nükleer Bölünme İndeksi
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
TK	: Timidin Kinaz
NaCl	: Sodyum Klorür
MMC	: Mitomisin – C
PBS	: Fosfat Tamponu
RI	: Replikasyon İndeksi
SCE	: Sister Chromatid Exchange
SCGE	: Single Cell Gel Electoroforosis
S9	: Karaciğer Özütü
PI	: Proliferatif İndeks
BN	: Binükleat
MN	: Mikronükleus

ÖZET

GIDA KATKI MADDELERİNİN TK-6 LENFOBLAST HÜCRELERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra METİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Gıda katkı maddeleri günümüzde raf ömrünü uzatarak artan nüfusun gıda ihtiyacını karşılayabilmek, besinleri daha steril hale getirmek ve lezzetlendirmek gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Yönetmelikler tarafından belirlenmiş değerlere göre kullanılan antimikrobiyal etkili pek çok gıda katkı maddesi bulunmaktadır. Örneğin benzoik asit, antifungal etki göstermesi sebebiyle meyve suları, reçel, ketçap, krema, pasta, şurup ve turşu gibi asitli gıdalarda kullanılmaktadır. Potasyum benzoat, benzoik asidin potasyum tuzu olmakla beraber küf, maya ve bakterilere karşı etkili olan antimikrobiyal ve antifungal bir kimyasaldır. Turşu, gazlı içecekler, meyve suları ve alkolsüz içecekler gibi asitli gıdalarda kullanımı yaygındır. Sodyum sorbat, sorbik asidin sodyum tuzudur. Daha çok maya ve küfler üzerinde etkili olmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde, şarap, çorba, unlu mamuller ve şekerleme gibi gıdalar üzerinde kullanılan antimikrobiyal etkili bir katkı maddesidir.

Antimikrobiyal etkili katkı maddeleri besinler üzerinde oluşabilecek patojenlerin protein, hücre duvarı ve enzim sentezini inhibe edip DNA yapılarına müdahale ederek koruyuculuk

sağlamaktadır. Fakat bu olumlu etkilerinin yanında alerjik, mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etki göstererek insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedirler.

Bu tez çalışmasında paketli gıdalarda sıklıkla kullanılan benzoik asit, potasyum benzoat ve sodyum sorbatın *in vitro* genotoksik etkisi, insan kökenli TK-6 lenfoblast hücrelerinde, mikronükleus (MN) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Kimyasalların TK-6 lenfoblast hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi bu kimyasalların insan sağlığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Çalışmada TK-6 lenfoblast hücreleri sodyum sorbatın 100, 200, 400, 600 ve 800 µg/ml’lik dozları, benzoik asitin 50, 100, 200, 500 ve 1000 µg/ml’lik dozları ve potasyum benzoatın 50, 120, 250, 500 ve 1000 µg/ml’lik dozlarıyla yarım saat boyunca muamele edilmiştir. Her bir deney grubu için elde edilen preparatlar değerlendirilmeye alınmış ve doz artışıyla birlikte binükleat (BN) sayısının azaldığı, mikronükleus (MN) taşıyan binükleat sayısının ise arttığı görülmüştür. Doz ve MN/BN değerleri arasında regresyon analizi yapılarak kimyasalların genotoksitesisi belirlenmiştir. Aynı zamanda her bir kimyasal ve dozlar için proliferatif indeks (Pİ) verileri de değerlendirilerek kimyasalların proliferasyona olan etkileri incelenmiştir.

Her üç kimyasal içinde uygulanan doz ile MN/BN oranları arasında yapılan regresyon analizlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmektedir. Bu artış özellikle benzoik asit uygulamasında daha belirgin olmakla birlikte 3 katkı maddesi içinde önemli derecede olmuştur. Hücrelere uygulanan doz ve hesaplanan Pİ değerleri için yapılan regresyon analizlerine göre benzoik asit uygulamalarında Pİ değerlerinin doz ile birlikte arttığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r^2=0,99$). Potasyum benzoatın artan dozuyla birlikte Pİ değerleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($r^2=0,001$). Sodyum sorbat uygulamalarında ise artan doza bağlı olarak Pİ değerlerinin azaldığı ve aralarında negatif yönde azalan güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ($r^2=0,91$). |

Nisan 2023, 62 sayfa.

Anahtar kelimeler: Sodyum sorbat, benzoik asit, potasyum benzoat, Mikronükleus, MN Tekniği |

SUMMARY

TOXIC EFFECTS OF FOOD ADDITIVES ON TK-6 LYMPHOBLAST CELLS

M.Sc. THESIS

Kübra METİN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Today, food additives are used to meet the food needs of the increasing population by extending the shelf life, to make foods more sterile and to flavor them. There are many food additives with antimicrobial effect that are used according to the values determined by the regulations. For example, benzoic acid is used in acidic foods such as fruit juices, jam, ketchup, cream, pastry, syrup and pickles due to its antifungal effect. Potassium benzoate, being the potassium salt of benzoic acid, is an antimicrobial and antifungal chemical that is effective against mold, yeast and bacteria. Its use is common in acidic foods such as pickles, carbonated drinks, fruit juices and soft drinks. Sodium sorbate is the sodium salt of sorbic acid. It is more effective on yeast and molds. It is an antimicrobial effective additive used on foods such as milk and dairy products, wine, soup, bakery products and confectionery.

Antimicrobial additives provide protection by inhibiting protein, cell wall and enzyme synthesis of pathogens that may occur on foods and interfering with DNA structures. However, in addition to these positive effects, they can adversely affect human health by showing allergic, mutagenic, carcinogenic and genotoxic effects.

In this thesis, the in vitro genotoxic effects of benzoic acid, potassium benzoate and sodium sorbate, which are frequently used in packaged foods, were investigated in human TK-6 lymphoblast cells using the micronucleus (MN) technique. Determining the effects of chemicals on TK-6 lymphoblast cells is important in terms of evaluating the effects of these chemicals on human health.

In the study, TK-6 lymphoblast cells were treated with 100, 200, 400, 600 and 800 µg/ml doses of sodium sorbate, 50, 100, 200, 500 and 1000 µg/ml doses of benzoic acid and potassium benzoate 50, 120, 250, 500 and 1000 µg/ml doses it was treated for half an hour. The preparations obtained for each experimental group were evaluated and it was observed that the number of binucleates (BN) decreased with the increase in dose, while the number of binucleates bearing micronucleus (MN) increased. The genotoxicity of the chemicals was determined by regression analysis between dose and MN/BN values. At the same time, the proliferative index (PI) data for each chemical and dose were evaluated and the effects of chemicals on proliferation were examined.

According to the regression analyzes performed between the dose applied and the MN/BN ratios for all three chemicals, a statistically significant relationship is observed. Although this increase was more evident in the application of benzoic acid, it was significant for 3 additives. According to the regression analyzes for the dose applied to the cells and the calculated PI values, it was observed that PI values increased with the dose in benzoic acid applications and there was a statistically significant correlation between them ($r^2 = 0.99$). There was no significant correlation between PI values with increasing dose of potassium benzoate ($r^2 = 0.001$). In sodium sorbate applications, it was determined that PI values decreased depending on the increasing dose and there was a strong correlation between them, decreasing negatively ($r^2 = 0.91$).

April 2023, 62 pages.

Keywords: Sodium sorbate, benzoic acid, potassium benzoate, Micronucleus, MN Technique

GİRİŞ

Günümüzde artan nüfus ve endüstrinin gelişmesiyle birlikte, insanlar doğal gıdalardan uzaklaşmış, ucuz ve kolay yoldan ulaşılabilen paketli gıdalara yönelmiştir. Bu gıdalarda kullanılan gıda katkı maddeleri eski çağlardan beri varlığını geliştirerek devam ettirmektedir. Eskiden tuz, baharat ve sirke gibi yöntemlerle gıdaların korunması sağlanmıştır. Teknolojinin ve endüstrinin gelişmesiyle birlikte geleneksel yöntemlerden uzaklaşmış ve çeşitli kimyasallar kullanılmaya başlanmıştır (Oğan, 1996) .

Gıda katkı maddeleri; gıdaların çeşitli etkenlerle bozulmasını engellemek ve besin değerinin artmasını sağlamak amacıyla günümüzde de oldukça fazla kullanılmaktadır (Gürsoy, 2001). Endüstriyel gelişimle birlikte gıda katkı maddelerinin sayıları hızla artmaktadır. Her yıl 2000 kadar yeni kimyasal madde endüstriye eklenmekte ve farklı alanlarda kullanılmaktadır (Agüloğlu, 1992).

Kimyasalların fazla derecede kullanılıyor olması sağlık açısından maruziyetlere sebebiyet vermektedir. Her ne kadar düşük dozlarda ve belli seviyelerde kullanılıyor olsa da bir süre sonra vücutta birikmesiyle insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu maddeler rastgele ve sık sık kullanıldığında tüketicilerde alerjik ve toksik reaksiyonların görülmesine yol açar (Arslan, 2004). Günümüzde çoğu gıda katkı maddesinin toksik etkisi bilinmemekte ve insanlar tarafından göz ardı edilmektedir. Bilim insanları çeşitli ürünlerde farklı amaçlarda kullanılan gıda katkı maddelerinin toksik ve mutajenik etkileri üzerinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapmaktadır. Çeşitli çalışmalar sonucunda bu kimyasalların toksik etkisi ortaya konulmuştur ve etkisi henüz net bilinmeyen kimyasallar ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Abe ve Sasaki, 1977; Luca ve ark., 1987; Meng ve Zhang, 1994; Sasaki ve diğ., 2002; Arslan, 2004; Kaya ve Topaktaş, 2007; Yılmaz, 2008; Mpountoukas ve diğ., 2008). Aynı zamanda birçok araştırma bizlere göstermiştir ki; gıda korucularının sebep olduğu mutasyon etki kanser oluşumuna da yol açmaktadır (Kaderlik ve diğ., 1992).

Özellikle biyoloji alanında yapılan çalışmalarda çeşitli kimyasalların toksikolojisini belirlemek için genotoksik testlere sıklıkla başvurulmaktadır (Güner, 2014). Güncel olarak

kullanılan bu genotoksik testlerin en önemlileri; gen mutasyonu (AMES, HPGRT), kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange = SCE), kromozom aberasyonu (CA) (Chromosome Aberration = CA) ve mikronükleus testleridir (Tucker, 1993; Carrona ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve diğ., 1994; Heddle ve diğ., 1991). Bu çalışmanın amacı; gıdalarda uzun süreli koruma sağlayan katkı maddelerinden sodyum sorbat (E-201), benzoik asit (E-210) ve potasyum benzoatın (E-212) genotoksik etkilerini kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde mikronükleus (MN) testlerini kullanarak *in vitro* metotlar ile tespit etmektir. Bu çalışma, sodyum sorbat, benzoik asit ve potasyum benzoatın sağlığınıza karşı olası tehditlerini bizlere göstermesi açısından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GIDA KATKI MADDELERİ

Eski dönemlerden beri gıdaları çeşitli etkenlerden korumak için katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu katkı maddelerinin gelişimi teknolojiyle doğru orantılı olarak artmıştır.

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre katkı maddesi, tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul madde bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977). Katkı maddelerinin insan sağlığı açısından katkısız ve doğal olması, yapaylıktan uzak kalması gerekmektedir (Oğan, 1996).

İlk defa gıda katkı maddesi olarak, 1886'da tuz, kalsiyum ve fosfat karışımı bir madde hazırlanmıştır. Bu madde çeşni olarak kullanılmış ve satılmıştır (Saldamlı, 1985). Hızla artan nüfus ve tüketimle birlikte gıda maddelerine duyulan ihtiyacın artması, gıda maddelerindeki kaliteyi artırma ihtiyacı, teknolojisinin ve transfer işlemlerinin gelişmesi gibi etkenlerle gıda koruyucularının çeşitli nedenlerle gıdalarda kullanımı da artmıştır (Altuğ ve diğ., 2000).

Gıda katkı maddelerinin güvenilirliği konusunda incelemeler yapan çeşitli kuruluşlar mevcuttur. Bu konuda Avrupa Birliğinde görevli olan birim Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu EFSA'dır. Uluslararası etkili olan birim ise Gıda ve Tarım Örgütü FAO ve Dünya Sağlık Örgütü WHO'nun birlikte oluşturduğu Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi JECFA' dır. Uluslararası bir kuruluş olan FAO/WHO Birleşik Kodeks Komitesi'nin tanımlamasında ise "Tek başına besin değeri taşımayan ancak gıdaya bilinçli olarak direkt veya indirekt olarak katılan, onların görünüş ve yapılarını düzeltmek için veya muhafaza olanağını artırmak için sınırlı miktarda katılan maddelerdir" denilmektedir.

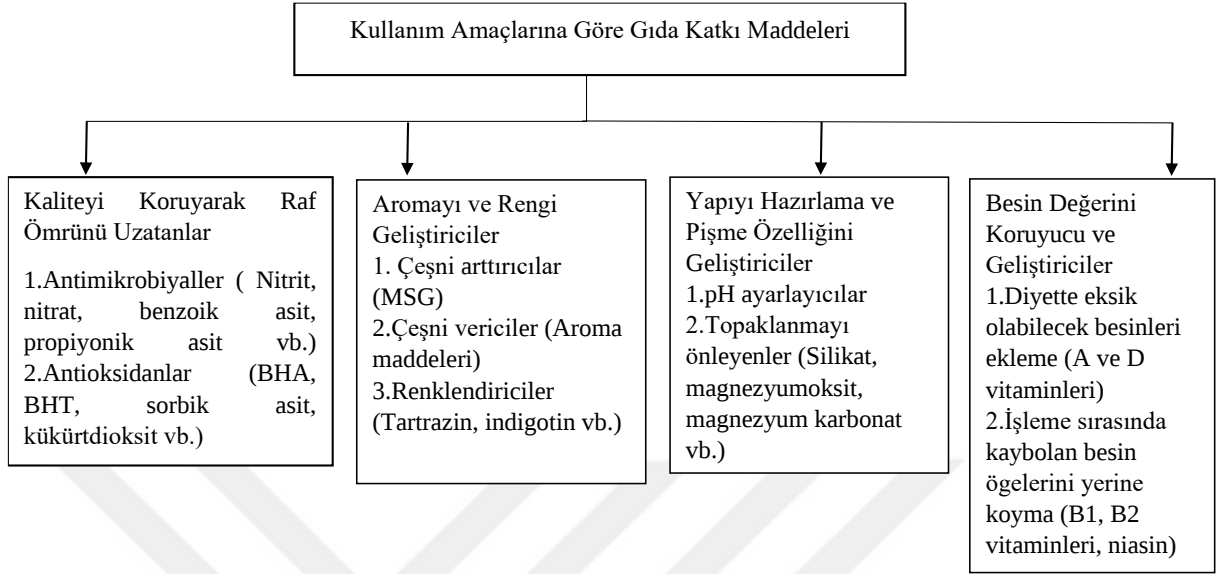
Gıda korunmasında antimikrobiyal ve antioksidan gibi maddelerden yararlanılmaktadır. Besin değerini etkileyen katkı maddelerinden doğal ve yapay tatlandırıcılar, gıdaları vitamin, mineral ve lif açısından zenginleştirmek amaçlı kullanılırlar ve doğal kaynaklı olduklarından toksik etkileri düşüktür. Aynı zamanda doğal ve organik olarak kullanılan bir diğer katkı grubu ise mayalar ve enzimlerdir. Bunlar dışında raf ömrünü uzatmak gibi amaçlarla asitlik düzenleyiciler, antimikrobiyal maddeler, antioksidanlar, emülgatörler, kıvam artırıcılar, jelleştiriciler, nem tutucular ve itici gazlar kullanılmaktadır.

Gıda katkı maddeleri, referans gösterilen değerlerde ve uygun koşullarda kullanılmazsa gıdaların besin değerlerinin düşmesine, lezzetlerinin bozulmasına ve böylece toksik etkilerinin oluşmasına neden olmaktadır (Uzun, 2021). İnsanlar tarafından katkı maddelerinin yüksek miktarlarda tüketilmesi kişide deri döküntüsü, cilt bozuklukları, tahriş, ishal, bulantı, aşırı duyarlılık hatta kanser riski oluşturabilmektedir (Adams, 1992; Yurttagül, 1993). Bu durumlar göz önüne alınarak kullanılacak katkı maddelerinin kullanım alanları ve dozları belirtilen değerlere göre olmalıdır (Oğan, 1996).

2.2. GIDA KATKI MADDELERİNİN ÇEŞİTLERİ VE SINIFLANDIRILMASI

Gıda katkı maddeleri farklı tanımlara göre gruplandırılabilir. Ait oldukları madde grubuna göre, kullanım amaçlarına göre ya da kullanıldığı besine göre sınıflandırılırlar.

Türk Gıda Kodeksi gıda katkı maddelerini kullanım amaçlarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırmıştır (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977).



Şekil 2.1: Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması (Keskin, 2018).

Kaliteyi koruyarak raf ömrü uzatanlar (koruyucular) antimikrobiyaller ve antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Antimikrobiyaller, mikroorganizmalar tarafından üretilen ya da yapay olarak elde edilen ve bakteri, küf ve maya gibi mikroorganizmaları öldüren ve çoğalmasına engel olan maddelerdir. Örneğin, nitrit, nitrat, benzoik asit, propionik asit, sorbik asit ve kükürt dioksit gibi maddeler örnek verilebilir.

Antioksidanlar ise oksidasyonun neden olduğu bozulmaları önlemek ya da geciktirmek amaçlı kullanılan polifenolik bileşiklerdir. Örneğin, C vitamini (askorbik asit), E vitaminleri tokoferoller, trioneller, karotenoidler, propel gallat, bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) örnek olarak gösterilebilir.

Aromayı ve rengi geliştiriciler; çeşni arttırıcılar, çeşni vericiler ve renklendiriciler olarak sınıflandırılmaktadır. Çeşni arttırıcılar, gıdanın aromasını daha iyi bir hale getirmek ya da var olan aromayı korumak için kullanılan maddelerdir. MSG (monosodyum glutamat) gibi maddeler örnek olarak verilebilir. Çeşni vericiler, tat ve kokuyu daha ilgi çekici hale getirmek, lezzeti geliştirmek ve işlem sırasında besinin kaybolan tadını geri kazandırmak için kullanılan aroma maddeleridir. Renklendiriciler ise tüketici beğenisini ve ilgisini çekmek, doğal rengi kuvvetlendirmek ya da kazanmak için kullanılan maddelerdir. Örneğin, eritrosin, ponso 4R ve indigotin gibi maddeler renklendirici olarak kullanılabilen kimyasallardır.

Yapıyı hazırlama ve pişme özelliğini geliştirenler oldukça çeşitlidir. Şekil 2.1’de detaylı olarak verilmese de çeşitli işlevlerle kullanılan kimyasallar bu sınıflandırmada bulunmaktadır. pH ayarlayıcılar, gıdaların asit ve bazlılığını korumak, değiştirmek ve ayarlamak için kullanılan maddelerdir.

Topaklanmayı önlemek amaçlı kullanılanlar gıdalarda ki toz ve partiküllerin birleşmesini ve topak haline gelmesini önleyen maddelerdir. Silikat, magnezyum oksit ve magnezyum karbonat örnek olarak verilebilen maddelerdendir.

Emülsifiyerler iki sıvı arasında homojen bir karışım elde etmek için kullanılan maddelerdir. Örneğin, lesitin, mono ve digliseritler.

Stabilizörler birbirine karışmayan ikiden fazla maddenin birbiri içerisine dağılımını sağlayıp homojen bir görüntü elde etmeyi sağlayan maddelerdir.

Kıvam arttırıcılar besinlerde ki yoğun tadı arttırmak amaçlı kullanan maddelerdir. Modifiye nişasta besinlerde kıvam arttırma amaçlı kullanılan örneklerdendir.

Tatlandırıcılar aromayı ve alınan tadı arttırma amaçlı kullanılan maddelerdir. Aspartam, asesulfam K, sorbitol, sakkarin tatlandırma amaçlı kullanılan maddelerdendir.

Mayalanmayı sağlayan ajanlar besinin mayalanarak tatlanmasını ve pişmesini hızlandıran maddelerdir. Örneğin, startırlar (lactobasiller).

Nem ayarlayıcılar özellikle paketli gıdaların bekledikçe kurumasını önlemek için kullanılan maddelerdir.

Olgunlaştırıcılar gıdaların istenilen bir lezzete gelmesini sağlayan maddelerdendir.

Ağartıcılar unun kalitesini ve rengini düzenlemek amaçlı kullanılan maddelerdendir.

Dolgu maddeleri jel görünümü oluşturarak besinin jel kıvamı kazanmasını sağlayan maddelerdir. Örneğin, jelleştiriciler.

Köpük ayarlayıcılar katı ve sıvılarda gaz fazın homojen dağılarak köpük oluşturmamasını ya da köpük oluşumunu engelleyen maddelerdir.

Parlatıcılar besinin dış yüzeyini parlatarak daha parlak ve canlı görünmesini sağlayarak gıdalara caziplik kazandıran maddelerdir.

Besin değerini koruyucu ve geliştiriciler ise işlem sırasında kaybolan besin değerlerini yerine getirmek amaçlı kullanılan B1, B2 ve niasin gibi maddeler ile diyet amaçlı olup A ve D vitamini bakımından besinin doyurulmasını sağlayan maddelerdir (Susever, 2016).

2.3. GIDA KATKI MADDELERİNİN GÜVENİRLİLİĞİ

Gıda katkı maddelerinin kötü kullanımları sonucu doğacak tehlikeleri engellemek amacıyla anayasaya bazı kanunlar eklenmiştir. Gıda katkı maddelerinin kullanılması için etkin deneylerin fare haricinde iki farklı hayvan üzerinde de yapılmış olması gerekmektedir. Gıdalarda kullanılacak katkı maddelerinin hayvan deneylerinde hiçbir toksik etki göstermeyen minimum dozun %1'inin kullanılması önerilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Gıda katkı maddelerinin güvenirliliği birçok ülke tarafından önemsenmektedir. GKM'ler kullanıldığı alana göre yararlı olmalı, tüketici üzerinde herhangi olumsuz bir etkisi olmamalı ve güvenilir olmalıdır. GKM'lerin gıdalarda kullanımı çeşitli kuruluşlar tarafından yapılan inceleme ve araştırmalar sonucunda onay alabilmektedir. EFSA, WHO, FAO ve JECFA gıda katkı maddelerini detaylı bir şekilde inceleyen ve toksikolojik, farmakolojik ve alerjik etkilerine bakarak kullanımlarına onay veren veya vermeyen kuruluşlardır.

2.4. GIDA KATKI MADDELERİNİN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Her insanın kimyasallara tepkisi farklı olabilmektedir. Kimisi kimyasallardan hemen etkilenirken, kimisi hiçbir koşulda etkilenmeyebilir. Fakat gıda katkı maddesi olarak kullanılan kimyasalların insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Goodman, 1990).

Kimyasallar ile karşılaşıldığında, kimyasal kan dolaşımıyla hedef organa taşınır. Burada alınan kimyasal dozuna da bağlı olarak vücut tarafından atılabilir ya da hedef organda

birikerek toksik etkisini ortaya çıkarabilir (Gürbüz, 2006). Hastalığın ortaya çıkmasında; maruz kalınan kimyasal çeşidi, kimyasalın dozu, maruziyet süresi, vücuda giriş yolu ve kişinin sağlık durumu gibi faktörler etkili olmaktadır (Gencer, 2017).

Aspartam, sülfür bileşikleri, tartrazin gibi gıda katkı maddelerinin doza bağlı olarak mide ve bağırsaklarda çeşitli toksik etkiler yaptığı gözlemlenmiştir (Groten, 2000). Nadiren de görülse sodyum benzoat alımıyla beraber Löko Klastik Vaskülit hastalığının meydana geldiği görülmüştür (Altuğ, 2001). Antioksidan olarak kullanılan nitrit ve nitratlar doza bağlı olarak kanser oluşumuna neden olan nitrozaminleri oluşturmaktadır. Yine antioksidanlar grubunda yer alan sodyum metabisülfid ve benzoik asit dozlarına bağlı olarak astım, deri döküntüleri, migren gibi hastalıklara sebebiyet verebilmektedir. BHA (Bütil hidroksi anizol) ve BHT (Bütil hidroksi tolüen) gibi güçlü antioksidanlar ise deri döküntüsü ve hiperaktiviteye neden olmaktadır (Bağcı, 1997). Nitrat tuzları, eritrosin, azurobin, aspartam gibi gıda katkı maddeleri dozlarına bağlı olarak tiroid ve adrenal beze etki etmekte ve çeşitli semptomlara sebebiyet vermektedir. Sorbik asit ve tuzları, EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit), aspartam gibi çeşitli amaçlarla kullanılan gıda katkı maddeleri de dozlarına bağlı olarak böbrekler üzerinde etkili olmaktadır. Gıda katkı maddeleri aynı anda alındığında birbirleri üzerinde etkili olmakta ve etkilerini arttırıp azaltabilmektedirler (Groten, 2000).

Gıda katkı maddelerinin olası zararlarından korunmak ya da en aza indirmek için; üreticilerin yasal düzenlemelere uyması, tüketicilerin ise dengeli ve doğal beslenmeye özen göstermesi, ucuz ve hazır olan gıdalardan olabildiğince uzak durması, gıdaların içeriği konusunda bilinçlenmesi ve katkı maddelerinin referans edilen değerlerinden fazlasını kullanmaması gerekmektedir (Bağcı, 1997).

2.5. ANTİMİKROBİYAL GIDA KATKI MADDELERİ

Geçmişten günümüze kadar gıdaları korumak için tuz, asit, şeker, tütsü gibi geleneksel yöntemlerden yararlanılmış ve günümüzde teknolojinin de gelişmesiyle beraber eski yöntemlerin yerini antimikrobiyal katkı maddeleri almıştır. Antimikrobiyal gıda katkı maddeleri, ortamdaki patojenlerin gelişimini engelleyen, bu patojenlere karşı direnç gösteren ve bunların oluşumunu engelleyen madde olarak tanımlanmaktadır. Antimikrobiyal katkı

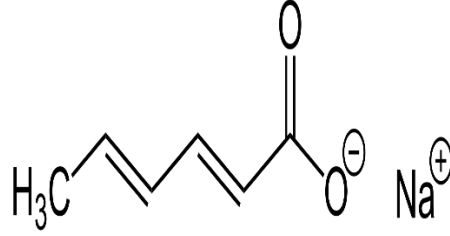
maddesi ürüne eklenince, ürünü hijyen açısından zenginleştirmek, kullanım ömrünü uzatmak ve tadının bozulmasını engellemek için aktif olarak çalışmaktadır.

Antimikrobiyal katkı maddeleri, her gün sıklıkla kullandığımız pek çok üründe aktif olarak kullanılmaktadır. Marmelat üretiminden kurutulmuş meyve ve sebze imalatına ve teknolojisine kadar uygulama alanı gelişmiştir ve her geçen gün gelişmeye devam etmektedir (Parlak, 2007). Koruyucular, gıdalara karşı spesifik davranırlar. Yani her katkı maddesi her gıdaya etki etmez ve bazısına etkisi azken bazısına oldukça fazladır (Ekşi, 1988; Eker, 1995).

Antimikrobiyal maddeler gıdalarda olabilecek patojenlerin oluşumunu, protein denatürasyonu ve inhibisyonu, enzimlerin inaktivasyonu, membran geçişlerinin engellenmesi, DNA'ya zarar verilmesi, hücre duvar sentezinin inhibe edilmesi gibi mekanizmalar ile engellemektedir (Robach, 1980; Sofos, 1986; Parlak, 2007). Antimikrobiyal maddeler patojenlerden koruma şeklindeki olumlu etkilerinin yanında kanserojen, mutajenik ve toksik etki de yapmaktadır. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin yasalara ve kurallara uyarak önerilen dozlarda kullanımı uygundur (Oğan, 1996). Tükettiğimiz çoğu gıdada kullanılan antimikrobiyal maddeler; benzoik asit, sodyum ve tuzları, күкүрт dioksit, potasyum benzoat, potasyum permanganat, sorbik asit ve tuzları, nitrit ve nitrat tuzları, asetik asit ve propiyonik asit şeklinde çoğaltılarak sayılabilir (Saldamlı, 2005; Bulduk, 2003).

2.6. SODYUM SORBAT /SORBİK ASİT SODYUM TUZU (E-201)

Sorbik asidin sodyum, kalsiyum ve potasyum gibi tuz formları 'sorbitlar' olarak adlandırılmaktadır (Robach, 1980; Sofos, 1986; Davidson ve Juneja, 1990). Sorbik asit sodyum hidroksit ile tepkimeye girerek bir sodyum tuzu olan sodyum sorbatı oluşturmaktadır. Tuz görüntülü ve kokusu zayıftır (Chichester ve Tanner, 1972). Kimyasal formülü, $C_6H_7NaO_2$ şeklindedir ve molar ağırlığı 134.10835 g/mol'dür. Sodyum sorbat bakterilerden ziyade daha çok maya ve küfler üzerinde etkili olmaktadır. Benzoik asit ve tuzlarına göre toksik etkisi daha düşüktür (Saldamlı, 1985). Optimum pH aralığı 6.5 altındaki asidik değerlerdedir ve sorbik aside göre suda çözünürlüğü daha iyidir.



Şekil 2.2: Sodyum sorbatın kimyasal yapısı.

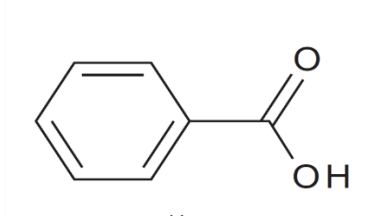
Sodyum sorbat, Avrupa dağ ağacının meyvesi olan *Sorbus aucuparia* ile birlikte yetişmektedir ve çeşitli kimyasal işlemlerden geçirilerek ticari amaçlı kullanılmaktadır. Günlük tüketim miktarı vücut ağırlığına göre 25 mg/ kg'dır. Daha çok süt ve süt ürünlerinde, unlu mamullerde, şarap, çorba, şekerleme gibi gıdalarda koruyucu amaçlı kullanılmaktadır.

Sodyum sorbat ile ilgili çeşitli hücre hatlarında çalışılmış ve sonuçlar paylaşılmıştır. Yapılan bir araştırmaya göre sodyum sorbat bir sorbik asit tuzu olmasına rağmen sorbik asitten daha fazla kromozom kırıklarına ve genotoksik etkiye neden olduğu saptanmıştır (Hasegawa ve diğ., 1984). Sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik dozları insan lenfositlerine uygulanmış ve özellikle 400 ve 800 µg/ml'lik dozlar kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansını arttırmıştır. Aynı dozlar ile yapılan mikronükleus (MN) testlerinde de anlamlı bir artış görülmüştür (Mamur, 2009). Sodyum sorbatın genotoksik etkisini araştırmak için daha çok hamster ve kemik iliği gibi hücrelerle çalışılmıştır. Hasegawa ve diğ. (1984), Çin hamsterinin V79 hücreleri ile yaptıkları çalışmada 200-800 µg/ml'lik sodyum sorbat dozlarında mutasyonların arttığını aynı zamanda aynı dozların kardeş kromatid değişimi ve kromozom anormalliği testlerinde anlamlı bir artış gösterdiğini saptamışlardır (Hasegawa ve diğ., 1984). Münzner ve diğ. (1990), Çin hamsterinin ovaryum hücreleriyle yaptıkları çalışmada 500-1000 µg/ml'lik sodyum sorbat dozlarında AMES, Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPGRT) ve kardeş kromatid değişimi testlerinde bir artış gözlemlenmemişlerdir. Aynı dozlarda Çin hamsteri ile yapılan çalışmada kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi testlerinde anlamlı bir artış olmamıştır. Çin hamsteri

ve fare kemik iliği hücrelerine 200 mg/kg dozunda sodyum sorbat uygulanmış fakat mikronükleus oluşumunda bir artış görülmemiştir (Münzner ve diğ., 1990). Schiffman ve Schlatter (1992), Suriye hamsteri embriyo fibroblast hücrelerinin beklemiş ve taze eriyikleri ile çalışmışlar ve hücreleri 120- 1200 µg/ml dozlarında sodyum sorbata maruz bırakmışlardır. Beklemiş eriyikte mikronükleus oluşumu ve hücre transformasyonu anlamlı bir artış gösterirken, taze eriyik halindeki hücrelerde aynı artış gözlenmemiştir. Çin hamsteri V79 hücrelerinde Schlatter ve diğ. (1992) tarafından mitotik indeks (MI) çalışması yapılmış ve 2500 µg/ml'lik sodyum sorbatın hücrelerde mitoz bölünmeyi durdurduğu belirtilmiştir.

2.7. BENZOİK ASİT (E-210)

Formülü C_6H_5COOH olan benzoik asit çeşitli besinlerde kullanılan ve mantarlara karşı etkili olan bir antifungal maddedir. Kimyasal yapısı şekil 2.3'te verilmiştir. Sudaki çözünürlüğü 25 °C' de 0,34 g/ 100 ml olmakla beraber oldukça düşüktür. Sahip olduğu antifungal etki asidik özelliğinden kaynaklanmayıp daha çok çözünmemiş moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Fakat asidik gıdalarda etkisi daha fazla olmaktadır. Optimum pH değeri 2,5- 4,0 arasındadır. Gıdalarda maksimum kullanım miktarı % 0,1'dir (Kalyoncu, 2008).



Şekil 2.3: Benzoik asidin kimyasal yapısı.

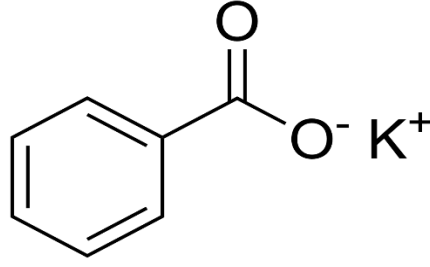
Antifungal etkinliği, hücredeki enzimleri inaktif etmesi dışında hücre çeperini çözünmeyen molekülleriyle aşmasından kaynaklanmaktadır. Ortamda bulunan NaCl benzoik asidin antifungal etkisi açısından aktivatör madde etkisi yapar (Cemeroğlu ve Acar, 1988). Benzoik asit eklendiği gıdanın tadını değiştirebilmektedir ve daha çok asidik gıdalardan olan meyve suları, reçeller, turşular ve meyveli kokteyllerde kullanılır. Aynı zamanda şurup, ketçap, krema ve pasta gibi ürünlerde de kullanılmaktadır (Sarıkaya ve Solak, 2003).

Salmonella typhimurium türüyle yapılan benzoik asit uygulamalarında benzoik asidin 1,67 µg/ml' lik ve 0,009 nmol'dan daha düşük dozları için yapılan AMES testlerinde ve DNA hasar analizlerinde genotoksik bir etkiye rastlanmamıştır (McCann ve diğ., 1975; Nakamura ve diğ., 1987; Ishidate diğ., 1984; Zeiger ve diğ., 1988). Çin Hamsteri ovaryum hücrelerine uygulanan 3 mM' lık benzoik asit uygulaması kardeş kromatid değişimi testine göre genotoksik açıdan olumlu bir artış göstermemiştir (Oikawa ve diğ.,1980). Aynı zamanda insan lenfoblast ve lenfosit hücrelerinde yapılan benzoik asit çalışmalarında (0,001 – 0,03 M) kardeş kromatid değişimi testlerinde genotoksik açıdan olumlu bir artış gözlemlenmemiştir (Tohda ve diğ., 1980). İnsan lenfositleriyle yapılan bir diğer çalışmada hücrelere benzoik asidin 0- 2 mM' lık dozları uygulanmış ve yapılan kardeş kromatid değişimi testinde anlamlı bir artış görülmemiştir (Jansson ve diğ., 1988). Ishidate ve diğ. (1984), Çin Hamsteri yumurta hücreleriyle yaptıkları kromozomal anormallik testlerinde benzoik asitin 1,5 mg/ml'lik dozda genotoksik etkileri olduğunu saptamışlardır. Özellikle hücrelerin yaşam ömrünü kısalttığını ve somatik mutasyonlara sebep olduğunu belirtmişlerdir (Ishidate ve diğ.,1984). Yılmaz ve diğ (2008), benzoik asitin *A.sativum* soğanlı bitkisinin kök uçlarında 200-500 mg/l' lik benzoik asit dozlarının kromozomal anormallik testlerinde pozitif bir artışa sebep olduğunu ve mitotik indeksi azalttığını saptamışlardır (Yılmaz ve diğ., 2008).

Benzoik asit genotoksisitesiyle ilgili önemli sonuçlar ortaya koymuş çalışmalar çok fazla bulunmamaktadır. Bu çalışmada benzoik asidin çeşitli dozları kullanılacak ve bu dozlara bağlı olarak insan periferik lenfoblast hücrelerindeki genotoksik etkisi MN testi ile incelenecektir.

2.8. POTASYUM BENZOAT (E-212)

Benzoik asidin potasyum tuzu olarak bilinmektedir. Kimyasal formülü $C_7H_5KO_2$ 'dir. Beyaz, katı görünümlü ve kokusuzdur. Küf, maya ve bakterilere karşı kullanılan antimikrobiyal ve antifungal bir gıda koruyucusudur. pH' ın 4,5 altı olduğu asidik ürünlerde koruyuculuk ve raf ömrünü uzatmak açısından olumlu sonuçlar vermektedir. Oda sıcaklığında (25 °C) suda çözünürlüğü 73,83 g/100 ml'dir ve sodyum benzoata göre suda çözünürlüğü düşüktür. Etanol ve metanol gibi organik çözücülerde de çözünmektedir.



Şekil 2.4: Potasyum benzoatın kimyasal yapısı.

Günlük potasyum benzoat alımı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 5 mg/kg olarak belirlenmiştir. İzin verilen en yüksek değer gıda çeşidine göre değişmektedir. Aromalı içeceklerde 36 mg/240 ml kullanılırken, meyve reçellerinde 7,5 mg/15 g kullanılmaktadır (Uzun, 2021). Meyve suyu (sitrik asit), gazlı içecekler (karbonik asit), alkolsüz içecekler (fosforik asit) ve turşu (sirke) gibi asidik gıdalarda daha çok tercih edilmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve DSÖ gibi kuruluşlardan onay almıştır. Hem potasyum benzoatı hem de askorbik asiti (C vitamini) aynı anda bulunduran alkolsüz içeceklerde ısı ve ışıkla tepkime gerçekleştiğinde benzen oluşabilmektedir. Bu durumda kurdeşen, egzama ve alerjik reaksiyonlara sebebiyet verebilmektedir (Uzun, 2021).

Potasyum benzoat ile yapılan genotoksik çalışmalar oldukça azdır. Vernole ve diğ (1987), potasyum benzoatın 2- 500 µg/ml'lik dozlarını insan lenfosit hücrelerine uygulamışlar ve doza bağlı olarak kromozom kırıklarının oluştuğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada KKD'de 200 µg/ml'lik dozdan itibaren artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Fakat KKD'de kromozom kırıkları gibi bariz bir artış görülmemiştir (Vernole ve diğ.,1988).

Zengin (2009) tarafından yapılan insan lenfositleri ve potasyum benzoatın 62,5 – 1000 µg/ml'lik dozlarıyla yapılan bir çalışmada 62,5 µg/ml'lik doz hariç diğer dozlarda kromozom ve kromatid kırıklarına rastlanmıştır. KKD'de 62,5 µg/ml'lik doz hariç tüm uygulamalarda dozun artmasına bağlı olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Mitotik indeks (MI), 62,5 µg/ml ve 125 µg/ml'lik dozlar hariç tüm uygulamalarda anlamlı bir düşüş sergilemiştir. Replikasyon indeksi ise potasyum benzoat uygulamasının hiçbir dozundan etkilenmemiştir. 62.5 µg/ml'lik doz hariç, tüm potasyum benzoat uygulamalarında doza bağlı olarak MN taşıyan binükleat hücre frekansında artış görülmüştür. Nükleer bölünme indeksinde (NBI) potasyum benzoatın bir etkisi görülmemiştir. Yapılan comet testine göre ise kuyruk uzunluğu sadece en yüksek

doz olan 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda görülmüştür. Kuyruk yoğunluğunda ise 250 µg/ml'lik doz hariç istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir (Zengin, 2009).

2.9. FARKLI MATERYAL VE DENEY SİSTEMLERİYLE YAPILAN GENOTOKSİK ARAŞTIRMALAR

Sodyum sorbat, benzoik asit ve potasyum benzoat dışında antimikrobiyal, antibakteriyel ve antifungal katkı maddeleriyle yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Farklı test sistemleri veya farklı hücre ve dokularla yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Salmonella typhimurium'un TA98 (S9 mix varlığında ve yokluğunda) ve TA100 (S9 mix varlığında ve yokluğunda) suşlarında yapılan AMES testinde potasyum sorbatın (askorbik asit ve Fe tuzu varlığında) mutajenik etkisi araştırılmıştır. TA98 (S9 mix varlığında ve yokluğunda) ve TA100 (S9 mix varlığında) suşunda doza bağlı bir mutajenik etki olmadığı görülürken, TA100 (S9 mix yokluğunda) suşunda doza bağlı artan mutajenik bir etki görülmüştür. Bu maddeler ayrı ayrı uygulandığında ise mutajenik etki görülmemiştir (Kitano ve diğ., 2002).

Sıçan karaciğer fraksiyonunun (S9) bulunduğu ve bulunmadığı ortamlarda AMES testi uygulanarak sodyum nitritin genotoksisite incelemesi yapılmıştır. Sodyum nitritin *Salmonella typhimurium*'un TA1535 suşu için güçlü bir mutajenik etki gösterdiği, TA100 suşu içinse zayıf mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Akın ve Sümer, 1991).

Allium cepa hücrelerinde sodyum propiyonat, potasyum propiyonat ve kalsiyum propiyonat gibi propiyonik asidin çeşitli tuzlarıyla çalışılmış ve doza bağlı olarak her bir kimyasal KA oranını arttırmış, MI ise düşürmüşlerdir. Aynı zamanda yine doza bağlı olarak MN oluşumları da görülmüştür (Türkoğlu, 2008).

Çin hamsteri hücreleriyle yapılan sodyum benzoat uygulamasında ise dozun yükselmesiyle kardeş KKD ve MI artışı görülmüştür (Abe ve Sasaki, 1977; Ishidate ve Odashima, 1977).

Sıçan kemik iliği hücrelerinde gıda koruyucularından olan sodyum metabisülfidin genotoksisitesi KA testiyle incelenmiştir. İntraperitoneal ve gavaj enjektör yoluyla ayrı ayrı

yapılan incelemelerde uygulanan tüm dozlarda hücrelerdeki anormallik artarken, gavaj enjektörü yoluna kıyasla intraperitoneal yolunda mitotik indeks düşük çıkmıştır. Ayrıca sodyum metabisülfitin, hücrelerde kromozom kırıklarına, kardeş kromatid değişimlerine ve fragment oluşumuna neden olduğu görülmüştür (Kayrayıldız ve Topaktaş, 2007).

39 adet gıda katkı maddesinin genotoksik hasarını belirlemek amaçlı farelerin 8 farklı organına (mide, beyin, böbrek, karaciğer, idrar kesesi, kolon, kemik iliği, akciğer) comet testi uygulanarak çalışılmıştır. Sonuç olarak, allura kırmızısı, tartrazin, filoksin, new coccine, erythrozin ve rose bengal gibi gıda boyaları, mide, idrar kesesi ve kolonda doza bağlı olarak DNA hasarı oluşturmuştur. Gıda boyaları haricinde gıdalarda çeşitli amaçlarla kullanılan kimyasallardan BHA (bütillendirilmiş hidroksi anisol), bifenil, sodyum o-fenilfenol, sodyum siklomat, BHT (bütillendirilmiş hidroksi toluen), thiabendazol, sakkarin, sodyum sakkarin ve sükraloza mide, kolon ve idrar kesesinde DNA hasarının artmasına sebep olmuştur (Sasaki ve diğ., 2002).

Bir başka gıda koruyucularından olan potasyum bromatın genotoksitesisi, insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet, mikronükleus ve timidin kinaz (TK) mutasyon testleriyle araştırılmıştır. DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ile birlikte mikronükleus olduğu görülmüştür. TK mutasyonlarını da doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Luan ve diğ., 2007).

İnsan periferik kan lenfositleriyle yapılan bir çalışmada sodyum sitrat, sitrik asit ve Askorbik asidin genotoksik etkisi comet testi kullanılarak incelenmiştir. Sodyum sitratın 50, 150, 300 ve 600 µg/ml'lik dozları hücrelere uygulanmış ve özellikle 300 ve 600 µg/ml'lik dozlarda DNA hasarının arttığı görülmüştür. Sitrik asidin sodyum sitrat ile aynı miktardaki dozları hücrelere uygulanmış ve özellikle 600 µg/ml'lik doz uygulamasında yüksek DNA hasarıyla karşılaşmıştır. Yine aynı dozlarda uygulanan askorbik asidin herhangi bir DNA hasarına yol açmadığı belirtilmiştir (Çelik ve diğ., 2022).

2.10. KANSER VE GIDA KORUYUCULARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Bölünerek çoğalma yeteneğine sahip olan hücrelerimiz kontrolsüz bir şekilde çoğalırsa kanseri meydana getirir. Tedavi edilmediği sürece hücreler kontrolsüzce bölünmeye devam

edip tümör oluşturabilmektedir. İyi huylu ve kötü huylu olarak ikiye ayrılabilen bu tümörlerden iyi huylu olan sağlık açısından bir tehdit oluşturmazken, kötü huylu tümör tedavi edilmezse ölümcül olabilmektedir.

Kanserin birçok sebebi vardır. Bunlardan en etkili olanları şöyle sıralanabilir;

- Sigara ve alkol kullanımı
- UV ışınına çok fazla maruz kalma
- Röntgen ışınlarına maruz kalma
- Katran, benzen, asbest gibi kimyasallara maruziyet
- Sağlıksız beslenme
- Genetik yatkınlık

Gıda koruyucularının kullanımı insan sağlığı üzerinde karsinojenik etkiler gösterebilmektedir. Nitrit ve nitrat ile yapılan bir genotoksisite çalışmasında, bu maddelerin karsinojen etkili N-nitroso bileşiklerine dönüştüğü görülmüştür (Oruç ve Ceylan, 2001). N-nitroso bileşiklerinin yüksek dozları, gastrointestinal kanser oranında artışa sebep olabilmektedir (Kumar ve diğ.,2013).

Diğer bir koruyucu amaçla kullanılan katkı maddesi sodyum benzoat, C vitaminiyle birleştiğinde kanserojen etkili benzeni oluşturabilmektedir (Mirza ve diğ., 2017).

Antioksidan özellikteki Butillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve Butillenmiş Hidroksianisol (BHA) gibi koruyucuların da kanser oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Tran, 2013).

2.11. MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU

Mikronükleuslar (MN), hücrenin mitoz bölünmesi sırasında oluşan ve ana çekirdeğe dahil olmayıp tam kromozom ya da asentrik kromozom fragmanlarından kökenlenen yapılardır (Fenech, 1993). Mitoz bölünmenin anafaz evresinde iğ ipliklerine tutunamamış kromozomlar kutuplara gidemez ve sitokinez sırasında aynı sitoplazma içinde ana çekirdekten ayrı olarak zarla çevrili mikronükleusları oluştururlar (Högstedt, 1984; Fenech, 1993). MN tekniği ilk olarak 1886 yılında Howell tarafından anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde uygulanmıştır (Anwar ve diğ., 1994). Bu sebeple mikronükleuslar hematolojide Howell –

Jolly cisimciği olarak bilinirler. 1976'da insan lenfositlerinde Countryman ve Heddle tarafından genotoksisitenin belirlenmesi için MN analizi kullanılmıştır. Fakat hücrelerin hücre bölünmesi geçirip geçirmediğini saptamak güç olduğu için ilk başlarda uygulanması zor olmuştur. Fenech ve Marley tarafından 1985'de hücrelerde sitokinezi durdurmak için sitokalsin B (Cyt B) eklenmiş ve böylece binükleat hücrelerin saptanması ve görülmesi kolaylaşmıştır (Fenech ve Morley, 1986).

MN yöntemi, günümüzde ekonomik ve en kısa sürede sonuç veren bir yöntem olduğu için genotoksisitenin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir. MN testi lenfositler, kemik iliği, dil, damak, yanak içi epitel, idrar kesesi, bronş epitelyumu gibi çeşitli dokularda uygulanabilmektedir (Tucker ve Preston, 1996). Kromozom kırıkları, kromozom kaybı, kromozomların farklı morfoloji göstermesi, hücre bölünme inhibesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin ortaya çıkarılması ve değerlendirilmesinde oldukça etkili bir yöntemdir (Fenech, 2000 ve 2006).

Kanser ve kromozom düzensizlikleri arasında doğrudan bir ilişki olduğu bilindiğinden MN testi kanser vakalarının belirlenmesinde tercih edilmektedir (Bolognesi ve diğ., 2002; Rothfub ve diğ., 2000). MN testi kanser dışında yaşlanma çalışmalarında da tercih edilmektedir. Yaşlanmayla birlikte kromozom düzensizlikleri ve hasarları artmaktadır. Bu hasar oranlarının belirlenmesinde MN analizi kullanılabilir.

MN ile yapılan birçok çalışma vardır. Maluf ve diğ., (2001) CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) yöntemiyle, Down sendromlu ve Fanconi anemili hastalarda MN artışının yüksek olduğunu saptamışlardır. Bisht ve Devi (1994) yaptıkları çalışmada, dozla orantılı olarak artan mikronükleuslardan 1'li MN frekansının fazla olmasının asentrik kromozom fragmentler nedeniyle olduğunu saptamışlardır. Fenech ve Crott (2002) ise NPB (Nucleoplasmic Bridge: Nükleoplazmik Köprü) oluşumunun anafazda sentromerlerin zıt kutuplara geçişi sırasında ortaya çıktığını ve NPB'lerin yanında 1'li ya da 2'li MN' ların %60' dan fazlasının asentrik kromozom fragmentlerinden kökenlendiğini açıklamışlardır.

Aminopirialid ve Florasulam herbisitlerinin genotoksik etkisini araştırmak için mikronükleus testi kullanılmıştır. Aminopirialid herbisitinin 25 mg/L'lik konsantrasyonu 24, 48 ve 72 saatlik süre ile *Gambusia holbrooki* türü üzerinde uygulanmıştır. Kontrole göre binükleat ve MN

frekansında anlamlı bir artış görülmüştür. Florasulam herbisiti içinde aynı uygulamalar yapılmış ve MN frekansında maruziyete bağlı olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Akata, 2022).

Bir başka çalışmada biyoatıklardan elde edilen nutrasötiklerin genotoksisitesini araştırmak için mikronükleus testinden yararlanılmıştır. Araştırmada üzüm çekirdeklerinden (*Vitis vinifera* L.) ve seyreltilmiş nektarından (*Prunus persica* L.) elde edilen biyoatıklar B16 melanoma ve HuH7 insan hepatoma hücreleri üzerinde uygulanmıştır. 25, 50 ve 100 µg/l'lik dozlarda MN artışı gözlenmemiştir (Musto ve diğ., 2023).

2.11.1. Mikronükleus Hesaplamaları ve Değerlendirilmesi

MN analizlerinde ilk olarak hücre tipleri belirlenmelidir. Mononükleus, binükleus, multinükleus, apoptotik ve nekrotik tiplerinde hücreler mevcuttur.

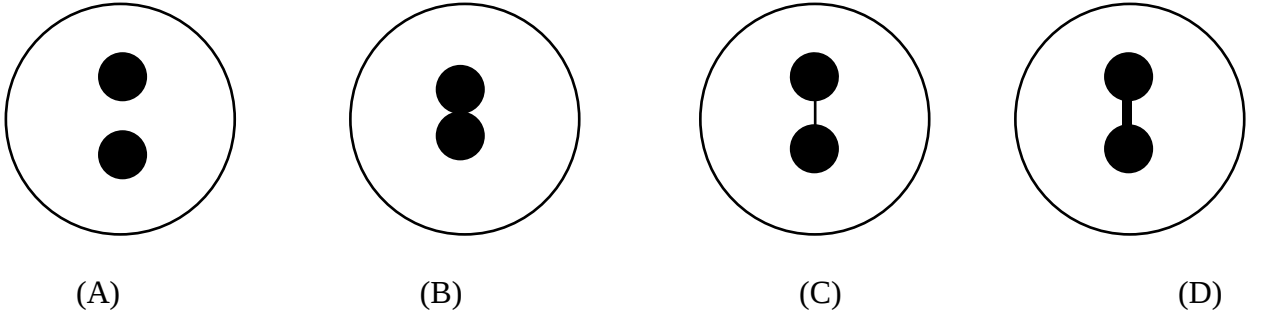
Mononükleus hücreler, küçük bir sitoplazma içinde büyük nükleus bulunduran hücre tipleridir. Binükleus hücreler, eş büyüklükte 2 nükleus barındıran hücre tipindedir. Bu hücrelere bazen nükleoplazmik köprü (NPB) eşlik edebilir. Multinükleuslar ise birkaç farklı boyuttaki nükleustan oluşan yapılardır. Bu hücrelerde birden fazla MN oluşumu gözlenebilir. Apoptotik hücre yapılarında sitoplazma bozulmamışken, kromatin yoğunluğu artmıştır. Nekrotik hücrelerde, sitoplazmadaki vakuol sayısı çok fazladır. Sitoplazmik zarın kısmen hasar almasıyla nükleusun az bozulmasıyla erken nekrotik evre görülür. Geç nekrotik evrede ise sitoplazma kaybolmuştur (Fenech, 2000).

Mikronükleus oluşumları binükleat hücrelerde skorlanır ve bu hücreler ile hesaplamalar yapılır. Sitokinezin bloke edilmesiyle mikronükleus oluşumları gözlenebilir. Mikronükleus testinde hesaplama yapılırken aşağıdaki kriterler göz önüne alınmalıdır.

1. Skorlanacak hücreler iki nükleuslu yani binükleat yapıda olmalıdır.
2. Mikronükleusların çapı ana çekirdeğin yarı çapının üçte biri ile on altıda biri arasında bir değere sahip olmalıdır.

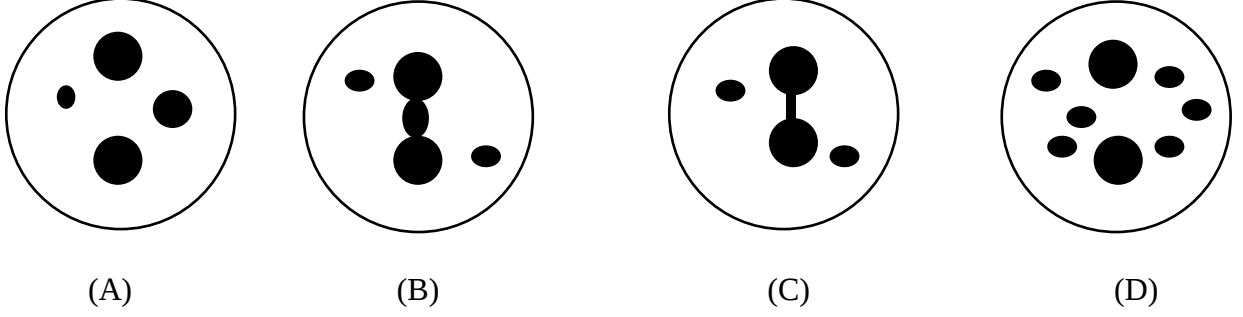
3. Mikronükleuslar ana çekirdeğe bağlı olmamalı ve üst üste konumlanmamalıdır. Birbirlerine dokunuyor durumda olsalar da MN yapısı çekirdekten bağımsız halde olmalıdır.
4. Mikronükleuslar genelde nükleusların arasındadır fakat bazen kutuplarda da bulunabilirler.
5. Mikronükleus genişliği ana nükleus alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
6. Mikronükleuslar küçük nükleus görüntüsünde olsa da hücrede bulunan küçük yapılı kabarcık veya noktalar ile karıştırılmamalıdır.
7. Nükleuslar ve mikronükleuslar genelde aynı miktarda boyanırlar fakat Mikronükleuslar bazen daha koyu boyanabilirler. Bu nedenle skorlama yapılırken boya kalıntılarıyla mikronükleuslar birbirine karıştırılmamalıdır (Fenech ,2000).

Yapılan mikronükleus analizi çalışmalarında kontrol grupları ve test materyali için en fazla 2000 binükleat hücre incelenmeli, yukarıda verilen kriterlere uymayan binükleat hücrelerle beraber, tekli, ikili, üçlü ve daha fazla nükleuslu hücreler de ayrı olarak puanlanmalı ve incelenmelidir.



(A) İdeal binükleat hücre yapısı, (B) nükleusları birbirine dokunan binükleat yapısı, (C) nükleuslar arasında dar bir nükleoplazmik köprü bulunan binükleat hücre yapısı, (D) daha geniş bir nükleoplazmik köprüye sahip binükleat hücre yapısı.

Şekil 2.5: Skorlanabilir binükleat hücre yapıları (Fenech ve diğ.,2003).



(A) Biri üçte biri, diğeri hücre içindeki ana nükleustan birinin dokuzda biri çapında iki mikronükleuslu hücre yapısı, (B) Mikronükleusların ana nükleuslara değdiği ancak üst üste gelmediği hücre yapısı, (C) Ana nükleuslar ile iki mikronükleus arasında nükleoplazmik köprü bulunduran iki nükleuslu hücre yapısı, (D) Farklı boyutlarda altı mikronükleuslu, iki nükleuslu ve nadiren görülen hücre yapısı.

Şekil 2.6: Skorlanabilir Mikronükleus (MN) bulunduran hücre yapıları (Fenech ve diğ.,2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 37280 numaralı başlık olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Bu tez projesinde insan kökenli lenfoblast hücre soyu olan TK-6 hücreleri kullanılmıştır. Her hücre flaskına 5 ml'de 2.5×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bu hücrelere sodyum sorbatın, benzoik asidin ve potasyum benzoatın çeşitli dozları uygulanarak genotoksik ve bölünme üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Hücrelerde kimyasalların etkisiyle oluşan genotoksik hasarlar ve proliferatif etkiler için doz cevap eğrileri oluşturulmuştur.

3.1. DENEY MATERYALLERİ

3.1.1.Sodyum Sorbat

Sorbik asit katı formu, Sigma- Aldrich firmasından %99.0 dan daha büyük saflıkta elde edilmiştir. Moleküler ağırlığı 112.13 g/mol' dür. Sorbik asitten sodyum sorbat elde edilirken, Schiffmann ve Schlatter (1992)'ın yöntemi bazı değişikliklere uğratarak uygulanmıştır. 1 gr sorbik asit 40 ml distile suda çözündürülmüş, vorteks cihazı ile 15 dk. hızlı bir şekilde karıştırılarak 10 N NaOH oda sıcaklığında damla damla eklenmiş ve çözeltinin optimum pH'ı 6.5 altında bir değer olduğundan pH değeri 6'ya ayarlanarak sodyum sorbat elde edilmiştir. Hücrelere; 100, 200, 400, 600 ve 800 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar uygulanmıştır.

3.1.2.Benzoik Asit

Sigma- Aldrich firmasından %99 dan daha büyük saflıkta ve katı form olarak temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 122.12 g/mol' dür. Doz uygulamaları için 40 ve 80 mM' lık stok konsantrasyonları saf su ile çözündürülmüştür. Hücrelere; 50, 100, 200, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar uygulanmıştır.

3.1.3. Potasyum Benzoat

Sigma- Aldrich firmasından %99 saflıkta ve katı formda eldesi sağlanmıştır. Moleküler ağırlığı 161.21 g/mol'dür. Doz uygulamaları için 40 ve 80 mM'lık stok konsantrasyonları saf su ile çözdürülmüştür. Hücrelere; 50, 120, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlar uygulanmıştır.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE MEDYUM HAZIRLIĞI

Genotoksisite çalışmaları için kullanımı uygun olan TK-6 lenfoblast hücrelerinin sürekliliğinin sağlanması için haftada iki kez olmak suretiyle iki üç gün aralıklarla deney süresince hücre pasajı yapıldı. Pasajlarda RPMI-1640 Hepes medyumumu ve %10 Fetal bovine serum kullanıldı. Pasajdan sonra hücrelerin bulunduğu flask %5 CO₂ içeren 37 °C etüvde muhafaza edildi.

3.2.1. Medyum Hazırlığı

Medyumda kullanılacak malzemeler sterilizasyon amaçlı otoklavdan geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. 1000 ml'lik balon joje içerisine manyetik karıştırıcı ile vorteks üzerine karıştırılmaya alındı. İlk turda balon jojeye 250 ml saf su ve toz halindeki RPMI-1640 Hepes medyumumu eklendi. 45 dakikalık periyotlar halinde 250 ml saf su uygulamasına devam edildi ve medyumun karışması sağlandı. 3.turda hassas terazide ölçülen 2000 mg sodyum bikarbonat 250 ml saf su ile birlikte eklendi. Son aşamaya gelindiğinde 0.2 ml streptomycin ve 0.2 ml penicilin 250 ml saf su ile birlikte eklendi ve 1 saat boyunca medyumun karışması için beklendi.

Vorteks üzerindeki karıştırma işlemi sonlandırılıp içerisine milipore filtre yerleştirilmiş bir süzme aparatından hava kompresörü kullanılarak medyumun süzülmesi sağlandı. Süzülen medyum tarihlendirilmiş ve numaralandırılmış 10 adet steril mavi kapaklı şişeye aktarılıp hücre pasajlarında ve deneyde kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de saklanmaya alındı.

3.2.2. Hücre Pasajı

Haftada iki kez 2-3 gün aralıklarla yapılan ve hücreler için elverişli bir yaşam ortamı oluşturan uygulamadır. Hücre pasajında flaska hücrelerle birlikte RPMI-1640 Hepes

medyumu ve toplam sıvının %10'u kadar Fetal bovine serum eklendi. Hücre pasajına başlamadan önce ilk olarak medyum ve serum 37 °C etüve kondu ve belli bir sıcaklığa gelmesi bekledi. Bu sırada laboratuvar ortamında UV ışığından yararlanılarak sterilizasyon sağlandı.

Hücre flaskındaki hücreler pipetajlanılarak biri 5 ml diğeri 1 ml olan iki ayrı tüpe alındı. 5 ml'lik tüp 200 g'de 8 dk santrifüjlendi. O sırada diğeri 1 ml tüpte bulunan hücrelerden alınan örnek hemositometre lamına damlatılarak hücre sayımı yapmak için mikroskoba yerleştirildi. Hemositometre lamındaki 16 karelik alan 1 ml'lik hücre ile kaplandı ve bu kısımdaki hücreler sayıldı. Sayılan hücre sayısına göre pasaj yapılacak hücre hesaplaması yapıldı. Pasaj yapılacak olan flaskın üzerine günün tarihi ve kaçınıcı pasaj olduğu yazıldı. Hepes medyum, %10 fetal bovine serum ve hücreler eklenerek hazırlanan flask kapağı hafif açık olacak şekilde CO₂ etüvüne yerleştirildi.

3.3. DENEY SÜRECİ

Deney günü ilk olarak sodyum sorbat, benzoik asit ve potasyum benzoatın moleküler ağırlıklarına göre hesaplamalar yapılarak stok konsantrasyonları hazırlandı. Deneyin 0.saatinde bir gün önce her birine tek tek ekim yapılan 6 flasktan beşine tek bir kimyasal için belirlenen dozlar ayrı ayrı verildi. Bir tane flask kontrol grubu olarak kullanıldı ve kimyasala maruz bırakılmadı. Kimyasal uygulanan hücre flaskları 30 dk etüvde bekletildi.

Etüvde bekletilme süreci dolduğunda 6 adet tüpe flasktaki hücrelerin tamamı sırasıyla numaralarına göre eklendi ve tüpler santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar atıldı ve yeni flasklar çıkarılıp numaralandırıldı. Yeni flaskların hepsine tek tek 4.5 ml Hepes medyumu, 0.5 ml Fetal bovine serumu ve tüplerdeki hücreler eklendi. 4 saat boyunca etüvde bekletildi.

Deneyin 4.saatinde flaskların her birine 3 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin-B eklendi. Hücre flaskları 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.1: CO₂ etüvünde inkübasyona bırakılmış hücre flaskları.

48. saate gelindiğinde inkübasyon süresi sonlandırılıp fiksasyon ve yıkama işlemlerine geçildi. İnkübasyonu biten hücreler deney tüplerine alındı, 200 g'de 8 dk santrifüje bırakıldı. Santrifüjden alınan hücrelerin süpernatantı atıldı ve üzerlerine 0,075 M soğutulmuş 5 ml'lik KCl çözeltisi eklenip 8 dk santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra tüpteki süpernatantlar atıldı ve pelete 7:1 oranında soğuk metanol-asetik asit karışımı uygulandı. Bu sırada hücrelerin homojen bir şekilde birbirinden ayrılması için tüpler vortex cihazında karıştırıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra hücreler buzlu lamlara damlatıldı ve kuruması için

bırakıldı. Lamlar tamamen kuruduktan sonra üzerlerine fosfat tamponlu %5'lik Giemsa boyası uygulandı.

Bu işlem 5 dk boyunca gerçekleştirildi ve süre geçince lamlar saf su ile yıkandı. 24 saat boyunca lamaların kuruması için beklendi. Lamlar tamamen kuruduktan sonra üzerlerine preparatı sabitleştirmek amaçlı entellan ile lamel kapatıldı ve 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Bu işlemler sayesinde hücreler mikroskop altında sayıma uygun hale getirilmiş oldu.

Bu işlemler sodyum sorbat, benzoik asit ve potasyum benzoat için belirlenen dozlarda ayrı ayrı 3'er kez tekrar edilmiştir.

3.4. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sayım işlemleri Nikon E100 ışık mikroskobunda x400 büyütme ile yapıldı. Görüntüleme doğrulanması için x1000 büyütme geçildi. Sodyum sorbat, potasyum benzoat ve benzoik asidin uygulanan dozları sonucunda elde edilen BN hücrelerdeki MN frekansları aralarında değerlendirildi. Her bir doz için 2000 binükleat hücre sayılmaya çalışıldı ve içlerindeki mikronükleuslar değerlendirmeye alındı. Binükleat hücrelerin yanı sıra bir, iki, üç, dört, beş ve daha fazla nükleusa sahip olan hücrelerde değerlendirmeye alındı. Değerlendirilen tüm preperatlar için proliferatif indeks (PI) hesaplandı.

$$PI = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4 + 5M5) / N$$

(Denklem: 1.1.)

M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks, N; toplam hücre sayısı (Eastmond ve Tucker, 1989).

Her bir katkı maddesinin farklı dozlarına ait MN frekans ve PI verilerinin doza bağımlı eğrileri elde edildi.

3.5. İSTATİKSEL METOT

Farklı kimyasallar ve bu kimyasalların farklı dozları uygulanarak yapılan deneylerde MN ve Pİ değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde Graphpad Prism 7.0 programı kullanılmıştır. Deney sonuçlarının değerlendirilmesi lineer ve lineer olmayan regresyon analizi ile yapılmıştır. Deneyler sonucu elde edilen her bir veri için doz başına MN/BN ve Pİ grafikleri elde edilmiştir. Veriler için en iyi fit veren grafik modelleri F testi ile karşılaştırılmış ve eğriler arasındaki anlamlılık farkını gösteren p değerlerine ulaşılmıştır.

Her bir kimyasal için elde edilen regresyon eğrilerinde artan dozlara bağlı olarak oluşan MN değerleri arasında belli bir korelasyon olup olmadığı değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır. Aynı zamanda Pİ regresyon grafiklerinde kimyasalların uygulanan dozuna bağlı olarak hücrelerdeki bölünme düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Elde edilen veri grafiklerine göre uygulanan kimyasalların hücreler üzerindeki genotoksik etkisi hakkında değerlendirmeler yapılmıştır.

4. BULGULAR

Benzoik asit, potasyum benzoat ve sodyum sorbat uygulamalarından elde edilen preparatlar mikroskop altında sayılmış ve MN/BN oranları hesaplanmıştır. Mikronükleus ve binükleat hücre sayımlarının yanında diğer tekli ve çoklu nükleuslu hücrelerde sayılarak Pİ değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablo ve grafiklerle verilmiştir.

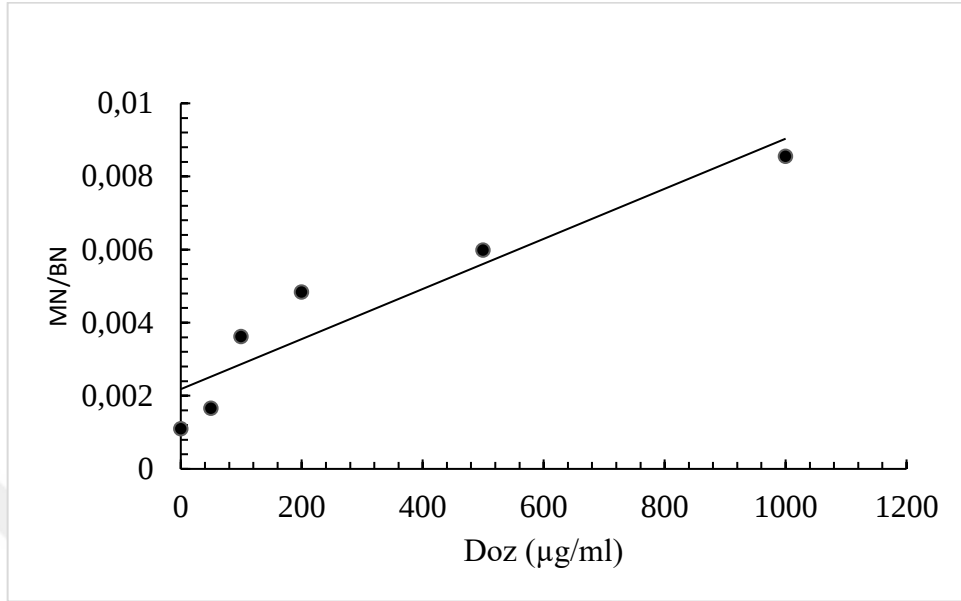
Benzoik asite ait veriler Tablo 1.1 üzerinde gösterilmiştir. Tablodaki verilerde hücrelere uygulanan dozlar sonrası preparatlardan sayılan binükleat hücreler gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Benzoik asit sayım sonuçları

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz (µg/ml)	BN Hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	1819	2	0,0011	1799	1059	1057	1082	974	2,55
2	50	1804	3	0,0016	1773	1065	940	964	972	2,53
3	100	1657	6	0,0036	1634	967	905	956	968	2,57
4	200	1653	8	0,0048	1561	803	1011	942	956	2,6
5	500	1504	9	0,0059	1362	801	927	904	911	2,64
6	1000	1403	12	0,0085	954	703	941	854	848	2,74

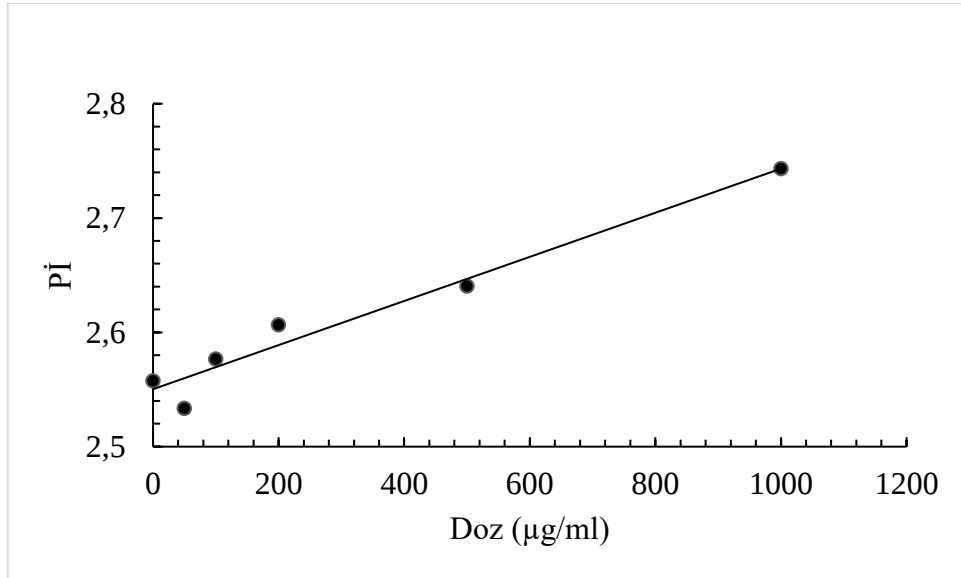
BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, PI; proliferatif indeks.

BN hücre sayıları dozun artmasıyla birlikte daha da azalmıştır. Artan dozla beraber hücrelerin sitoplazmaları hasara uğradığından sayım kriteri dışında kalmıştır. Doza bağlı olarak çoklu nükleuslarda da azalmalar görülmektedir. Çoklu nükleuslar ile hesaplanan Pİ' ler Tabloda verilmiştir.



Şekil 4.1: Benzoik asit uygulaması sonucu elde edilen MN/BN – Doz (µg/ml) grafiği.

Benzoik asit uygulaması ile elde edilen MN/BN ve uygulanan dozlar arasındaki ilişki Şekil 4.1’de gösterilmiştir. F testine göre en iyi fit veren lineer regresyonda grafik çizimi yapılmıştır. Doza bağlı olarak MN/BN oranında istatistiksel olarak anlamlı ($r^2 = 0,94$) bir artış görülmektedir.



Şekil 4.2: Benzoik asit uygulaması sonucu elde edilen Pİ / Doz (µg/ml) grafiği.

Şekil 4.2’de gösterilen benzoik asit grubundaki Pİ değerleri doz ile beraber artmıştır. Benzoik asit Pİ değerleri için de en iyi fit veren lineer regresyon analizi yapılmıştır. Hücrelere uygulanan doz ile Pİ değerleri arasında anlamlı ($r^2 = 0,96$) bir korelasyon görülmektedir.

Potasyum benzoata ait veriler Tablo 4.2 üzerinde gösterilmiştir. Hücre bütünlüğü tamamen bozulan ve sayım kriterlerine uymayan hücreler elenerek sayım yapılmıştır.

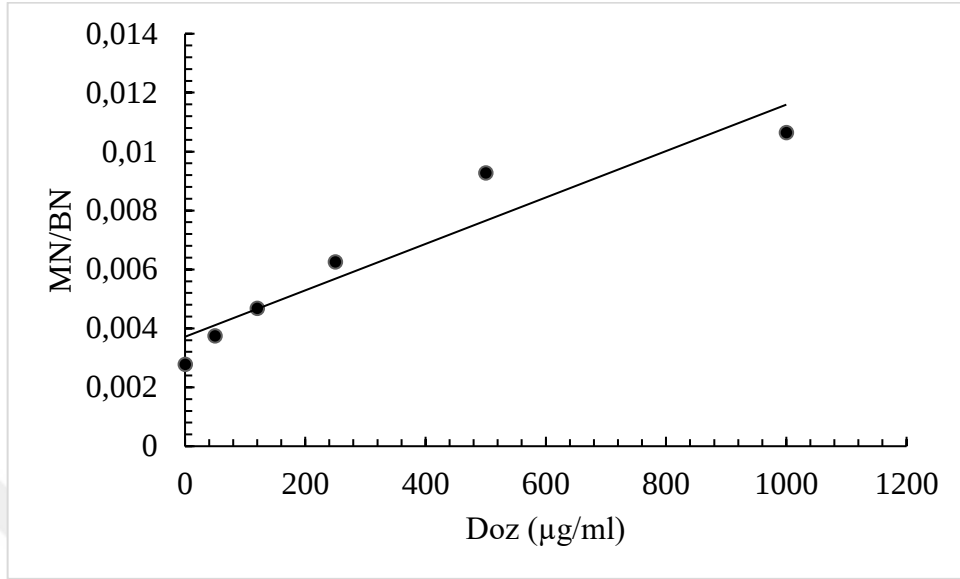
Tablo 4.2: Potasyum benzoat sayım sonuçları

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	BN Hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	1436	4	0,0027	1152	150	349	284	125	2,04
2	50	1334	5	0,0037	1928	286	553	268	71	1,85
3	120	1280	6	0,0046	2807	641	696	452	253	1,92
4	250	1437	9	0,0062	2874	628	786	574	377	2,02
5	500	1185	11	0,0092	2659	524	548	459	415	2
6	1000	1033	11	0,01	2509	380	478	409	318	1,94

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

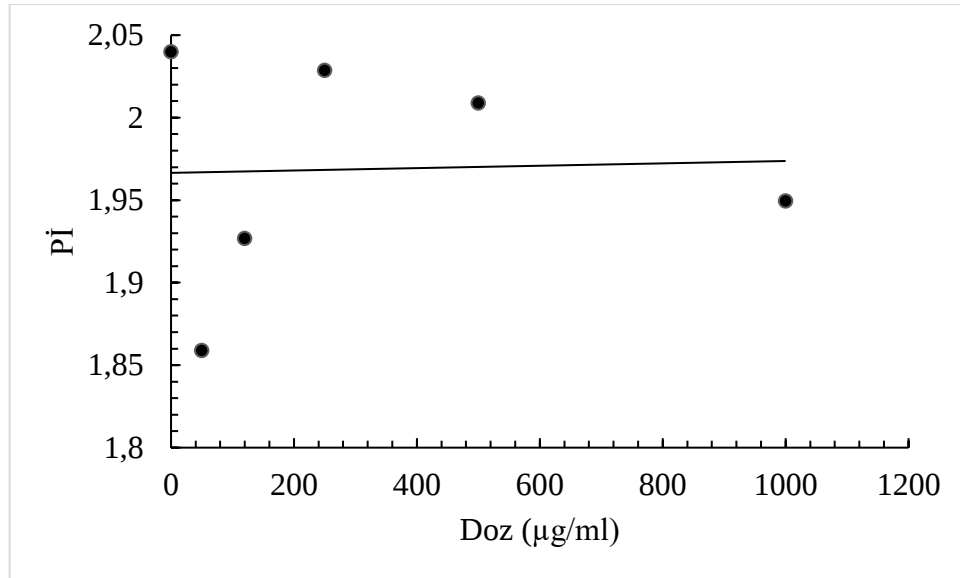
Potasyum benzoatın etkisiyle doza bağlı olarak BN hücreleri sayısal olarak azalmıştır. MN sayılarında ise artış gözlenmektedir.

Şekil 4.3’te hücrelere uygulanan potasyum benzoatın artan dozlarına bağlı olarak MN/BN oranları arasındaki ilişki verilmiştir.



Şekil 4.3: Potasyum benzoat uygulaması sonucu elde edilen MN/BN – Doz (µg/ml) grafiği.

Verilere lineer regresyon analizi yapılmıştır. Elde edilen regresyon grafiğine göre hücelere uygulanan potasyum benzoat dozları ile MN/BN değerleri arasında anlamlı bir korelasyon görülmektedir ($r^2 = 0,90$).



Şekil 4.4: Potasyum benzoat uygulaması sonucu elde edilen Pİ/ Doz (µg/ml) grafiği.

Şekil 4.4'te, potasyum benzoatın hücrelere uygulanan dozları ve hesaplanan Pİ değerleri için yapılan regresyon analizine göre anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($r^2=0,001$).

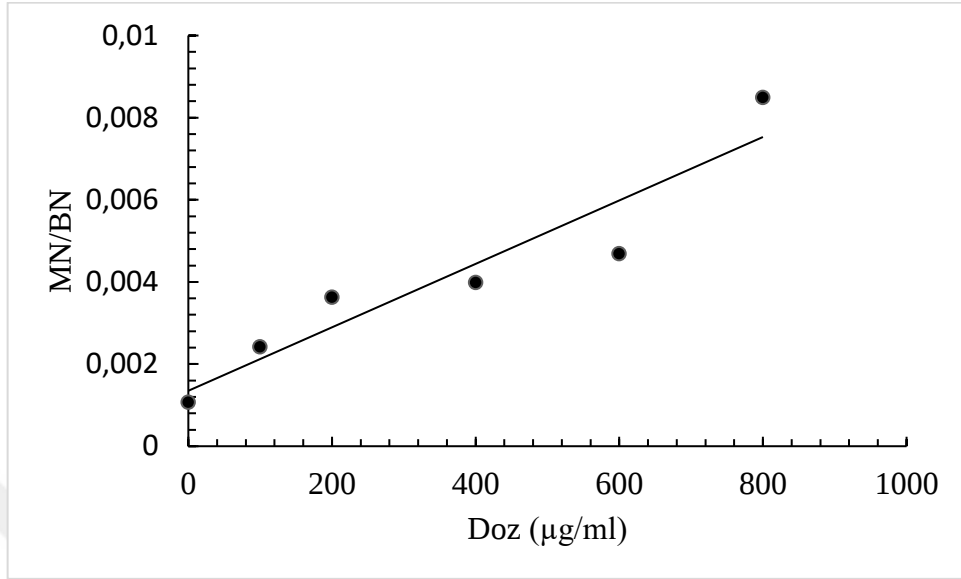
Sodyum sorbat kimyasal uygulamalarından elde edilen veriler ve hesaplamalar Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Hücrelere uygulanan kimyasallar içerisinde en fazla BN sayısına sodyum sorbat uygulamasında ulaşılmıştır.

Tablo 4.3: Sodyum sorbat sayım sonuçları

					Tekli ve Çoklu Nükleuslar					
No	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	BN Hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
1	0	1860	2	0,00108	1711	1389	1651	1673	1566	2,81056
2	100	1649	4	0,00243	1798	1275	1630	1591	1477	2,79034
3	200	1650	6	0,00364	1655	1038	1541	1572	1416	2,82033
4	400	1502	6	0,00399	1610	963	1168	1140	1122	2,6934
5	600	1492	7	0,00469	1603	814	1048	1045	944	2,62871
6	800	1412	12	0,0085	1590	803	932	1003	906	2,6118

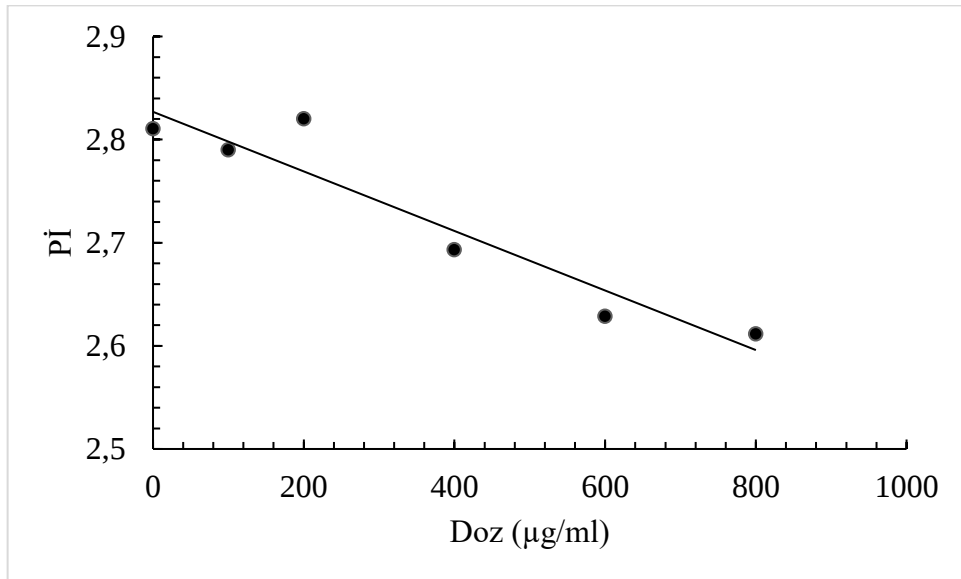
BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

Diğer kimyasal uygulamaları gibi doza bağlı olarak BN sayısı azalmış, MN içeren binükleat sayısı ise artmıştır. Çoklu nükleuslarda doza bağlı olarak azalmıştır.



Şekil 4.5: Sodyum sorbat uygulaması sonucu elde edilen MN/BN – Doz (µg/ml) grafiği.

Sodyum sorbat kimyasalının uygulanan dozlarına göre elde edilen MN/BN oranları arasındaki ilişki Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen veriler için F testine göre en iyi fit veren lineer regresyon grafiği çizilmiştir. Uygulanan doz ve MN/BN oranları arasında anlamlı ve güçlü bir korelasyon görülmektedir ($r^2 = 0,91$).



Şekil 4.6: Sodyum sorbat uygulaması sonucu elde edilen Pİ/Doz (µg/ml) grafiği.

Sodyum sorbatın uygulanan dozları ve hesaplanan Pİ değerleri şekil 4.6’da yer almaktadır. Veriler için yapılan lineer regresyon analizinde en iyi fit veren grafik modeli elde edilmiştir. Sodyum sorbatın artan dozlarına bağlı olarak Pİ değerleri düşme eğilimi göstermektedir. Sodyum sorbat ve Pİ değerleri arasında negatif yönde azalan güçlü bir korelasyon bulunmaktadır ($r^2 = 0,91$). |



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde zamansızlık, ekonomik nedenler ve doğallıktan uzaklaşma sonucunda paketli gıdaların kullanımı oldukça artmıştır. Artan nüfusa hizmet etmek amaçlı olarak üreticiler tarafından gıdaların tadını korumak, lezzetlendirmek ve raf ömrünü uzatmak gibi çeşitli amaçlarla gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Hazır ve paketlenmiş gıdalarla beslenmenin artmasıyla birlikte gıda koruyucu kimyasallara maruziyette artmıştır. Maruz kalınan katkı maddelerinin insanlar üzerindeki genotoksik, karsinojenik, mutajenik ve alerjik etkisinin belirlenmesi insan sağlığı açısından oldukça önemlidir (Bulduk,2003). Genotoksik etki, DNA hasarı ve kanser oluşumuna sebep olan etki olarak bilinmektedir. Genotoksik etkiyi ortaya çıkarmak için yapılan testlerde DNA hasarına bağlı olarak kanser riski belirlenebilmektedir (Salama ve diğ.,1999).

Gıda katkı maddelerine ne kadar az maruz kalınmaya çalışılsa bile bu kimyasallar zamanla vücutta birikirler (Briggs,1997). Bu birikim DNA ve kromozom hasarlarına sebep olabilir (Sarıkaya ve Solak, 2003). Çeşitli amaçlarla kullanılan gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin ve güvenilirliğinin belirlenmesi oldukça önemlidir (Yüzbaşıoğlu ve diğ.,2014). Günümüzde gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin araştırılmasında çeşitli testlerle yapılan birçok çalışma literatüre geçmiş ve konunun araştırılmasında aydınlatıcı olmuştur (Zengin ve diğ., 2011; Mamur ve diğ., 2010; Yılmaz ve diğ., 2008; Ataseven ve diğ., 2016).

Bu çalışmada gıda katkı maddelerinden olan benzoik asit, potasyum benzoat ve sodyum sorbatın insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik etkisini araştırmak üzere MN (mikronükleus) testi uygulanmıştır. MN testi genotoksik etkiyi ortaya çıkarmak için başvurulan güvenilir yöntemlerden biridir. MN, sitokinezi bloklanmış hücrelerde net bir şekilde görülen hücre bölünmesi sırasında iç ipliklerinden ayrılamayan ve sitoplazma içerisinde ana nükleustan daha küçük boyutta görülen yapılara verilen isimdir (Fenech ve diğ., 2016; Kirsch – Volders ve diğ., 2011). Özellikle hücrelerdeki kromozom kayıplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilen uygun ve güvenilir bir yöntemdir (Fenech, 2000).

MN oluşumu kanser çalışmalarında önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir (Kirsch- Volders ve diğ., 2011; García – Quispes ve diğ., 2013). MN, mutasyona uğramış, kontakt inhibisyonunu ve hücre döngüsü kontrol noktalarını kaybetmiş hücrelerde ve doğal olarak bu sebeple oluşmuş tümör hücrelerinde yüksek oranda görülmektedir (Terradas ve diğ.,2010).

Mikronükleus testi içeren birçok çalışma mevcuttur. Sodyum bisülfidin insan periferel lenfositlerinde 5×10^{-5} M'dan 2×10^{-3} M'a kadar MN oluşumunu anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir (Meng ve Zang, 1994). Bir başka çalışmaya göre gıdalarda renk verici olarak kullanılan brilliant siyahının 8.67, 86.7 ve 867 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ve quinoline sarısının 86.7 ve 867 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının insan periferel lenfositlerine uygulanması sonucunda MN frekansında kontrole oranla önemli bir artış oluşturduğu saptanmıştır (Macioszek ve Kononowicz, 2004). İnsan periferel lenfositleri ile yapılan bir başka çalışmaya göre de benzol peroksitin özellikle 75 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında 48 saatlik muamele sonucunda MN oluşumunu önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (Yavuz, 2005).

Bifenil kimyasalının 10, 30, 50 ve 70 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozları insan periferel lenfositlerine uygulanmış ve MN testi yapılmıştır. Sonuca göre bifenilinin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında doza bağlı olarak MN artışı olduğu saptanmıştır. Fakat bu artışın pozitif kontrol kadar olmadığı belirtilmiştir (Parlak, 2007). Potasyum sorbat + sodyum benzoat kombinasyonu bir arada insan periferel lenfositlerine uygulanmış ve bu kombinasyon MN frekansını anlamlı bir düzeyde arttırmıştır (Mamur ve diğ., 2018). Fakat potasyum sorbat hücrelere tek başına çeşitli dozlarda uygulandığında MN sayısında önemli bir artış görülmemiştir (Mamur ve diğ., 2010).

İnsan periferel lenfositleriyle yapılan bir çalışmada sodyum benzoatın 0,1; 0,3; 0,8 mg/ml'lik, potasyum sorbatın 0,2; 0,5 ve 1 mg/ml'lik, sitrik asitin 1, 3 ve 5 mg/ml'lik, benzoik asitin 0,1 ve 0,3 mg/ml'lik ve sodyum nitritin 0,1; 0,01; ve 0,001 mg/ml'lik dozları uygulanmıştır (Özdemir, 2006; Özdemir ve diğ., 2012). Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın MN oluşumunu arttırmadığı görülmüştür. Sodyum nitritin MN oluşumunu anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Benzoik asitin MN oluşumunda anlamlı bir artış göstermediği ancak kendi istatistikleri arasında değerlendirildiğinde MN oluşum sıklığını anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın genotoksisitesinde çıkan bu farklılığın

donör ve sayılan hücre sayısına aynı zamanda da laboratuvar koşullarına bağlı olabileceği belirtilmiştir.

Benzoik asitin genotoksik etkisini araştırmak için MN testi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada insan periferik kan lenfositlerine 50, 100, 200 ve 500 µg/ml'lik benzoik asit dozları uygulanmış ve sonuçlara göre MN sayısındaki istatistiksel artışın özellikle 200 ve 500 µg/ml'lik dozlarda olduğu fakat Benzoik asitin nükleer bölünme üzerinde etkili olmadığı belirtilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2009). Bir başka çalışmada da *A.sativum* soğanlı bitkisinin kök uçlarına sitrik asit ve benzoik asit uygulanmıştır. Benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 mg/l'lik dozları ve Sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 mg/l'lik dozları 24 ve 48 saatlik sürelerde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mikronükleus frekansında önemli artış sadece benzoik asitin 24 saatlik uygulamasında 200 ve 500 mg/l' lik dozlarda ve 48 saatlik uygulamasında 200 mg/l' lik dozunda görülmüştür (Yılmaz ve diğ., 2008).

Bu tez çalışmasında TK-6 lenfoblast hücrelerine uygulanan ilk kimyasal Benzoik asit olmuştur. Benzoik asitin farklı dozları uygulanarak hücreler üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkisi gözlenmiştir. Uygulanacak benzoik asit dozlarını belirlemek için gerekli literatür çalışmaları yapılmış ve yapılan denemelere göre en uygun olan dozlar seçilmiştir. Yapılan doz denemeleri sonucunda 1000 µg/ml üzerindeki uygulamalarda hücre bütünlüğü belirgin bir şekilde bozulmuş ve parçalanmış hücrelerle karşılaşmıştır. Bu sebeple hücrelere en fazla 1000 µg/ml' lik benzoik asit uygulaması yapılmıştır.

Laboratuvar ortamındaki TK-6 lenfoblast hücreleri normal insan lenfositlerine göre daha duyarlıdır. Kimyasallar 1 ve 2 saat olmak üzere daha yüksek sürelerle hücrelere uygulanmış fakat hücre formasyonları belirgin bir şekilde değiştiği için muamele süresi yarım saat olarak belirlenmiştir. Benzoik asitin uygulanan dozlarında MN taşıyan binükleat hücre sayısı artmıştır. Yapılan regresyon analizine göre artan kimyasal dozlar ile MN hasarı arasında belirgin ve anlamlı bir korelasyon görülmüştür ($r^2 = 0,94$).

Uygulanan doza bağlı olarak binükleat hücrelerinin yanında tekli ve çoklu nükleus bulunduran hücrelerin de azaldığı görülmektedir. Binükleat hücrelerle birlikte tekli ve çoklu nükleus bulunduran hücrelerin azalmasında benzoik asitin etkisinin yanında laboratuvar koşullarının da etkili olabileceği bilinmektedir. Uygulanan dozlar ve hesaplanan Pİ değerleri

arasında yapılan lineer regresyon analizlerine göre güçlü ve anlamlı bir korelasyon görülmüştür ($r^2=0,91$). Tekli ve çoklu nükleusların oluşumu doza bağlı olarak azalmış olsa bile bu etki bölünmeleri belirgin bir şekilde azaltmamış ve durdurmamıştır. Fakat uygulanan dozların artmasıyla MN oluşum sıklığının da artması aynı zamanda hücre sitolojisinin bozulması benzoik asitin hücreler üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkisi hakkında bilgi vermektedir. Uzun süreli benzoik asit maruziyeti hücrelerde genetik hasara neden olacaktır sonucuna varılabilir. Benzoik asitin hücreler üzerindeki etkisi göz önünde bulundurularak farklı dozlar ve farklı testler uygulanarak yapılacak çalışmalar bu sonuçları destekleyebilir.

Tez çalışmasında kullanılan bir diğer gıda katkı maddesi potasyum benzoattır. Potasyum benzoatın genotoksik etkisiyle ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır. Bu katkı maddesinin genetik hasar üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada insan periferik kan lenfositlerine potasyum benzoatın 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozları uygulanmış ve 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 62,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik doz hariç, mikronükleus taşıyan binükleat sayılarında anlamlı artışlar ($r^2=0,91$) görülmüştür (Zengin, 2009).

Bu çalışmada potasyum benzoatın 50, 120, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenen dozları hücrelere uygulanmış ve yarım saat süreyle muamele edilmişlerdir. Dozun artmasıyla birlikte hücrelerde deformasyonlar meydana gelmiş ve hücre profillerini tanımlamak zorlaşmıştır. Böylece doza bağlı olarak skorlanabilir binükleat sayısında azalmalar olmuştur. Hücrelere uygulanan potasyum benzoat dozu arttıkça MN sayısında artışlar meydana gelmiş ve yapılan regresyon analizlerine göre doz ile MN/BN oranları arasında anlamlı ve güçlü bir korelasyon ($r^2=0,90$) görülmüştür. MN taşıyan binükleat hücre sayısı özellikle 250 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda artış göstermiştir. Fakat potasyum benzoat uygulamalarında elde edilen Pİ değerlerine göre yapılan regresyon analizlerinde doz ve Pİ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmemiştir ($r^2= 0,001$).

Elde edilen verilere göre potasyum benzoatın hücreler üzerindeki genotoksik etkisinin benzoik asit kadar olmadığı sonucuna varılmaktadır. Ancak potasyum benzoatın dozları kendi aralarında değerlendirildiğinde doza bağlı olarak MN oluşum sıklığını arttırdığı görülmüştür. Potasyum benzoatın genotoksik etkisiyle ilgili çalışmalar oldukça az olmakla birlikte

literatürdeki bilgiler ile aynı sonuçlara ulaşılmıştır. Farklı dozlar ve farklı test sistemleri uygulanarak bu çalışmaların arttırılması gerekmektedir.

Tez çalışmasında genotoksik etkisi araştırılan bir diğer gıda katkı maddesi sodyum sorbat olmuştur. İnsan periferik kan lenfositleriyle yapılan bir çalışmada sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik dozları uygulanmıştır. Uygulama sonucu yapılan MN testine göre tüm dozlarda MN frekansının arttığı fakat bu artışın özellikle 400 ve 800 µg/ml'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda tekli ve çoklu nükleus bulunduran hücrelere de rastlanmıştır (Mamur, 2009).

Sodyum sorbatın genotoksik etkisiyle ilgili farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar mevcuttur. Çin hamsteri ve fare kemik iliği hücreleriyle yapılan mikronükleus (MN) testine göre 200 mg/kg dozunda uygulanan sodyum sorbatın MN oluşum frekansında etkili olmadığı görülmüştür (Münzner ve diğ., 1990). Suriye hamsteri embriyo fibroblast hücreleri üzerinde sodyum sorbatın genetik hasarını araştırmak için yapılan başka bir çalışmada 120, 300, 600 ve 1200 µg/ml'lik sodyum sorbat dozları taze ve bekletilmiş olarak iki ayrı şekilde hücrelere uygulanmıştır. Yapılan MN ve transformasyon testlerine göre sodyum sorbatın bekletilmiş stok çözeltisinin MN oluşum sıklığını arttırdığı görülmüştür. Fakat taze hazırlanmış sodyum sorbat çözeltisinin MN artışında etkili olmadığı belirtilmiştir (Schlatter ve diğ., 1992). Aynı zamanda Çin hamsteri V79 hücrelerine uygulanan 2500 µg/ml'lik sodyum sorbat çözeltisinin hücrelerdeki mitoz bölünmeyi engellediği görülmüştür (Schlatter ve diğ., 1992).

Bu çalışmada TK-6 lenfoblast hücrelerine 100, 200, 400, 600 ve 800 µg/ml'lik dozlar uygulanmış ve sodyum sorbata bağlı MN oluşumu doza bağlı olarak artmıştır. Yapılan lineer regresyon analizlerine göre uygulanan doz ile MN/BN oranları arasında anlamlı bir korelasyon ($r^2 = 0,91$) görülmüştür. Özellikle 800 µg/ml'lik doz uygulamasında MN sayısındaki artış önemli ölçüde olmuştur. Pİ değerleri için yapılan regresyon analizinde doza bağlı olarak lineer yönde azalan bir grafik modeli elde edilmiştir. Artan sodyum sorbat dozları nükleer bölünme üzerinde etkili olmuştur. Uygulanan doz ve hesaplanan Pİ değerleri arasında anlamlı bir negatif korelasyon görülmektedir ($r^2 = 0,91$). Sodyum sorbatın hücrelerde bölünmeyi azaltıcı etkisi olduğundan bahsedilebilir.

Sodyum sorbatın genetik hasara neden olabileceği ve vücutta birikimiyle bu hasarın daha da artabileceği sonucuna varılabilmektedir. Sodyum sorbatın genotoksik etkisiyle ilgili insan lenfositlerinde yapılan *in vitro* çalışmalar oldukça azdır. Elde edilen sonuçlar bu konuda çalışma yapmak isteyenler için aydınlatıcı nitelikte olacaktır. Sodyum sorbat kimyasalının farklı dozlarda uygulanması ve farklı genotoksisite testlerine tabi tutulmasıyla bu çalışmanın genişletilmesi gerekmektedir.

Bu araştırma, benzoik asit, potasyum benzoat ve sodyum sorbatın binükleat hücrelerde görülen MN sıklığını doza bağlı olarak arttırdığını göstermiştir. Bu artış özellikle benzoik asit uygulamasında daha belirgin olmakla birlikte 3 katkı maddesi içinde önemli derecede olmuştur. Çalışılan üç kimyasala da günlük hayatımızda sık sık maruz kaldığımız için bu kimyasalların vücutta birikmesiyle genetik hasarın indüklenebileceği görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre bu gıda katkı maddelerinin kullanımında dikkatli olunması gerektiği açıktır. Üretici de tüketici de gıda katkı maddeleri konusunda dikkatli olmalıdır. Özellikle gıda katkı maddelerini kullanarak üretim yapan laboratuvarlar ve işletmeler sıklıkla denetlenmelidir. Gıda katkı maddelerinin yönetmelikler tarafından belirlenen kullanılabilir değerleri dışına çıkılmamalıdır. Paketli ürünlerin besin değerleri ve içeriği şeffaf bir şekilde tüketiciyle paylaşılmalıdır.

Gıda katkı maddelerinin düşük miktarları bile vücutta birikerek alerjik, karsinojenik, mutajenik, genotoksik ve sitotoksik etkilere sebep olup insan sağlığını olumsuz etkileyebileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Kimyasalların genotoksik etkisiyle ilgili bu çalışmalar arttırılmalı ve çeşitlendirilmelidir. Özellikle *in vivo* çalışmalar yapılarak gıda katkı maddelerinin canlı organizmadaki metabolizması ve kimyasalların atılımı detaylı bir şekilde incelenmelidir. Çeşitli kimyasalların kombinasyonları bir arada hücrelere uygulanmalı ve farklı test sistemleri kullanılarak genotoksik etkisi hakkında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmalıdır. Elde edilen sonuçlar halkla paylaşılmalı ve tüketici bu konuda bilinçlendirilmelidir. |

6. KAYNAKLAR

- Abe, S. ve Sasaki, M.,1977, Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese Hamster cells exposed to various chemicals, *J. Natl. Cancer I.*, 58: 1635- 1643.
- Adams, E.J.,1992, Nutritional Care in Food Allergy and Food Intolerance, Mohan L.K., Arlin M. (Ed): Food Nutrition and Food Therapy, *WB Saunders Company*, Philadelphia.
- Agüloğlu, S. ve Ortakaya C.,1992, Eritromycin'in İnsan Kromozomları Üzerine İn Vitro Etkileri, *XI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Edirne, 208-216.
- Akata, D., 2022, *Aminopirallid ve Florasulam Herbisitlerinin Gambusia halbrooki (Girard, 1859) Üzerindeki Genotoksik Potansiyelinin Balık Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü., Demirağ, K., 2000, Gıda Katkı Maddeleri Analiz Yöntemleri, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, 22: 1-244.
- Altuğ, T.,2001, Gıda Katkı Maddeleri, *Meta Basım*, İzmir.
- Anderson D., 1988, Human Biomonitoring, *Mutation Reserach*, 204: 353-541.
- Anwar, W.A., Salama, S.I., El Serafy M.M., 1994, Hemida, S.A., Hafez, A.S., Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs, *Mutagenesis*, 4: 315-317.
- Arslan, M., 2004, *Borik asitin insan periferall lenfositlerinde in vitro kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1-62.
- Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A.Ç. ve Ünal, F., 2016, Genotoxicity of monosodium glutamate, *Food and Chemical Toxicology*, 91, 8-18.
- Bağcı, T.,1997, Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımız Üzerine Etkileri, *Hacettepe Tıp Dergisi*; 28(1); 18-23.
- Bisht, S.K. ve Devi, U.P, 1994, Dose dependent increase in the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations by misonidazole in mouse bone marrow, *Mutation Research*, 325: 57-63.
- Bolognesi, C., Filiberti, R., Neri, M., Perrone, E., Landini, E., Canessa, P.A., Simonassi, C., Cerrano, P.G., Mutti, L., Puntoni, R, 2002, High Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes as Index of Susceptibility to Plevral Malignant Mesothelioma, *Cancer Research*, 62: 5418-5419.

- Briggs, D. R., 1997, *Food Additives*, Food and Nutrition, In: Wahlqvist M.L. (ed), Chapter 3, Allen & Unwin Pty Ltd., Australia, ISBN: 1 86448 220 6, 128.
- Bulduk, S., 2003, Gıda ve Personel Hijyeni İnsan Sağlığı İlgili Yasalar, *Detay Yayıncılık*, Ankara, 111-127.
- Carrano A.V. ve Natarajan A.T., 1988, International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Consideration For Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques, *Mutation Research*, 204: 379-406.
- Chichester, D.F. ve Tanner, F.W., 1972, *Antimicrobial Food Additives*, In: Furia, T.E (ed), Handbook of Food Additives, 4rd., CRC Press, Newyork, 138-159.
- Çelik D., Toğay V., Türel G., Özçelik N., 2022, Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sitrik Asit, Askorbik Asit ve Sodyum Sitratın İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksitesinin Değerlendirilmesi, *SDÜ Tıp Fak. Derg.*, 29(3), 486-492.
- Davidson, M.P. ve Juneja, V.K., 1990, Antimicrobial Agent in Food Additives, 4rd Ed. (Brannen, A.L., Davidson, M.P., Salminen, A.), Marcel Dekker Inc., Newyork, 83-92.
- Eastmond, D.A. ve Tucker, J.D., 1989, Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13 (1), 34-43.
- Eker, Ö.Ü., 1995, *Reçellere katılan benzoik asit miktarının spektroskopik yöntemle tayini üzerine bir çalışma*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara, 9-10.
- Ekşi, A., 1988, Gıda muhafazası için koruyucu madde (antimikrobiyal) uygulamaları/ Teknolojik, toksikolojik ve yasal açıdan gıda katkıları semineri, T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Sınai Eğitim ve Geliştirme Merkezi Genel Müdürlüğü, Ankara, 1-8.
- Fenech, M. ve Crott, W.J., 2002, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research*, 504: 131-136.
- Fenech, M., 1993, The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations, *Environ. Health Persp.*, 101 (3): 101- 107.
- Fenech, M., 2006, Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutat. Res.*, 600(1-2): 58-66.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E., 2003, HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534 (1-2), 65-75.

- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T. and Kirsch-Volders, M., 2016, Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans, *Mutation Research*, 770, 12-25.
- Fenech, M., 2000, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.*, 455 (1-2): 81-95.
- Fenech, M. ve Morley, A.A., 1986, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 161 (2), 193-198.
- García-Quispes, W.A., Pastor, S., Biarnes, P.G.F., Castell, J., Velazquez, A. and Marcos R., 2018, Influence of DNA-repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients, *Mutation Research*, 750, 34-39.
- Gencer, G., 2017, *Potasyum Permanganat Maruziyetinin Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Tekniği ile Değerlendirilmesi*, Doktora, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Goodman, D., 1990, Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxytoluene (BHT), *Journal Allergy Clinical Immunology* October, V:86 N:4.
- Groten, J.P., 2000, An Analysis of the Possibility for Health Implication of Joint Actions and Interactions Between Food Additives, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, N:31, 77-91.
- Güner U., 2014, *Trakya Üni. Fen Fakültesi Toksikoloji Ders Notları*, http://www.academia.edu/6520109/toksikoloji_ders_notlar%c4%b1_v2 [Ziyaret Tarihi:27.02.2022].
- Gürbüz N., 2006, Endüstride Kullanılan Kimyasal Maddelerin Toksikolojik Etkileri, *Mesleki Sağlık ve Güvenlik Dergisi*, S.38.
- Gürsoy, S., 2001, *Besinlerde Katkı Maddelerinin Kullanımı ve Sitrik Asit Toksisitesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-21.
- Hagmar L., Brogger A., Hansteen İ.L. ve diğ., 1994, Cancer Risk in Human Predicted By Increased Levels Of Chromosomal Aberrations İn Lymphocytes: Nordic Study Group On The Health Risk Of Chromosome Damage, *Cancer Research*, 54: 2919-2922.
- Hasegawa, M., Nishi, Y., Ohkawa, Y., Inui, N., 1984, Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese Hamster cells, *Food Chem. Toxicol.*, 22 (7): 501-507.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., ve diğ., 1991, Micronuclei As An Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, And Future, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277-291.

- Högstedt, B.,1984, Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: A method for assessment of cytogenetic damage in man, *Mutat. Res.*, 130(1): 63-72.
- <http://gidaguvenciligi.ankara.edu.tr/tuketici-bilgilendirme/gida-katki-maddeleri/>, [Ziyaret tarihi: 23 Kasım 2022].
- <http://www.food-info.net/tr/e/e201.htm>, [Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2022].
- <https://asrkimya.com/UrunDetay/gida-ve-ilac-kimyasallari/benzoik-asit-69>, [Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2022].
- https://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_benzoate#/media/File:Potassium_benzoate.png, [Ziyaret tarihi: 25 Kasım 2022].
- https://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_benzoate, [Ziyaret tarihi: 25 Kasım 2022].
- https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_sorbate#/media/File:Sodium_sorbate_V.1.svg, [Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2022].
- https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_sorbate, [Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2022].
- <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri>, [Ziyaret tarihi: 29 Kasım 2022].
- <https://www.biocote.com/tr/what-is-an-antimicrobial-additive/0>, [Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2022].
- <https://www.gidabilgi.com/Kategori/Detay/e200--e300-gida-koruyuculari-da85a7>, [Ziyaret tarihi: 23 Kasım 2022].
- <https://www.medikalakademi.com.tr/kanser-nedir/>, [Ziyaret tarihi: 29 Kasım 2022].
- Ishidate M Jr., Sofuni T., Yoshikawa K., Hayashi M., Nohmi T., Sawada M., Matsuoka A., 1984, Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Food Chem Toxicol* , 22:623–636.
- Jansson T., Curvall M., Hedin A., Enzell CR.,1988, In vitro studies of the biological effects of cigarette smoke condensate. III. Induction of SCE by some phenolic and related constituents derived from cigarette smoke., *Mutat Res.*, 206:17–24.
- Kaderlik, R.K., Lin, D.X., Long, N.P., 1992, Advantages and limitation of laboratory methods for measurement of carcinogen DNA adducts for epilogical studies, *Toxicol. Let.*, 64: 469-475.
- Kalyoncu, F., 2008, Gıda Sanayinde Sıklıkla Kullanılan Antifungal Katkı Maddeleri, *New World Sciences Academy*, 3, 467 – 468.
- Kaya, F.F. ve Topaktaş, M., 2007, Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro, *Mutat. Res.*, 626: 48-52.

- Keskin, U., 2018, *Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Olarak Değerlendirilmesi*, <https://slideplayer.biz.tr/slide/13638854/>, [Ziyaret tarihi: 23 Kasım 2022].
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Loock, K.V. and Decordier, I., 2011, The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, *Archives Toxicology*, 85, 8, 873-899.
- Kumar, H., Jha, A., Taneja, K.K., Kabra, K., & Sadiq, H.M., 2013, A Study on Consumer Awareness, Safety Perceptions & Practices About Food Preservatives and Flavouring Agents Used in Packed/Canned Foods From South India, *National Journal of Community Medicine*, 4(3), 402-406.
- Macioszek, V.K., Kononowicz, A.K., 2004, The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline yellow (E 104) and Brilliant black BN (E 151), *Cell. Mol. Biol. Let.*, 9(1): 107-122.
- Maluf, S.W., Erdtmann, B., 2001, Genomic instability in Down Syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 124: 71-75.
- Mamur, S., 2009, *Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sodyum Sorbat ve Potasyum Sorbat'ın İnsan Periferik Lenfositlerinde Genotoksik Etkileri*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Yılmaz, S., 2010, Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?, *Toxicology In Vitro*, 24, 790–794.
- McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames BN., 1975, Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72: 5135–5139.
- Meng, Z. ve Zhang, L., 1994, Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced human lymphocytes by sodium bisulfite (sulfur dioxide), *Acta. Genet. Sin.* 21(1): 1-6.
- Mirza, S.K., Asema, U.K., & Kasim, S.S., 2017, To Study the Harmful Effects of Food Preservatives on Human Health, *J. Med. Chem. Drug Discovery*, 2, 610-616.
- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E., Lialiaris, T., 2008, Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives, *Food Chem. Toxicol.*, 46 (7): 2390-2393.
- Musto, G., Schiano, E., Iannuzzo, F., Tenore, G.C., Novellino, E., Stornaiuolo, M., 2023, Genotoxicity Assessment of Nutraceuticals Extracted from Thinned Nectarine (*Prunus persica* L.) and Grape Seed (*Vitis vinifera* L.) Waste Biomass, *Foods*, 12, 1171.

- Münzner, R., Guigas, C., Renner, H.W., 1990, Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential, *Food Chem. Toxicol.*, 28(6): 397- 401.
- Nakamura SI., Oda Y., Shimada T., Oki I., Sugimoto K.,1987, SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutat Res.*, 192:239–246.
- Oğan, H., 1996, Gıda İnsan Sağlığı İlgili Yasalar, *İstanbul Yayınevi*, İstanbul, 259-267.
- Oikawa A., Tohda H., Kanai M., Miwa M., Sugimura T.,1980, Inhibitors of poly (adenosine diphosphate ribose) induced sister chromatid exchanges, *Biochem Biophys Res Commun*, 97:1311–1316.
- Oruç, H.H., & Ceylan, S., 2001, Bursa’da Tüketilen Bazı Sebzelerde Nitrat ve Nitrit, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3), 17-21.
- Özdemir, H., 2006, *Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat, Sitrik Asit, Benzoik Asit ve Sodyum Nitrit’in Mutajenik Etkilerinin In Vitro’da Mikronükleus Tekniği Kullanılarak İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1-55.
- Özdemir, H., Turhan, A.B. and Arıkoğlu, H., 2012, Potasyum sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitrit’in Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2, 2, 34-40.
- Parlak, Ş.,2007, *Gıda Koruyucu Maddesi Olan Bifenil’in İnsan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Anormalliği ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana.
- Preston R.J., Au W., Bender M.A., Brewen J.G., Carrano A.V., Heddle J.A., McFee A.F., Wolff S., Wassom J.S., 1981, Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA’s Gene-Tox Program, *Mutat Res.*, 87: 143–88.
- Radack, K.L.,Pinney, S.M., Livingston, G.K., 1995, “Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population-based study. , *Environ. Mol. Mutagen.*, 26(1): 26-36.
- Robach, M.C., 1980, Use of Preservatives to Control Microorganisms in Food, *Fourth Edition, Food Technology*, 81-84.
- Rothfub, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., 2000, Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families, *Cancer Research*, 60: 390-394.
- Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., 1999, Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment, *Mutat. Res.*, 436(1): 99-112.

- Saldamlı, İ. ve Uygun, Ü., 2005, Gıda Kimyası/Gıda Katkı Maddeleri, *Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, Ankara, 533-547.
- Saldamlı, İ., 1985, Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyentler, *Önder Matbaası*, Ankara, 1- 197.
- Sarıkaya R. ve Solak K.,2003, Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması, *GU Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23:19–32.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat. Res.*, 519 (1-2): 103–119.
- Schiffmann, D. ve Schlatter, J., 1992, Genotoxicity and cell transformation studies with sorbates in Syrian Hamster embryo fibroblasts, *Food Chem. Toxicol.*, 30 (8): 669- 672.
- Schlatter, J., Wurgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Holliger, E., Graf, U., 1992, The potential genotoxicity of sorbates: Effects on cell cycle in vitro in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*, *Food Chem. Toxicol.*, 30 (10): 843-851.
- Sofos, J.N., 1986, Antimicrobial activity and functionality of reduced sodium chloride and potassium sorbate in uncured poultry products, *J. Food Sci.*, 51(1): 16-19.
- Susever, S., 2016, Gıda Katkı Maddeleri, http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/3gidakatkimaddeleri_92.pdf, [Ziyaret tarihi: 23 Kasım 2022].
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. and Genesca, A., 2010, Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?, *Mutation Research*, 705, 60-67.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E. K., Fenech, M., 2009, Buccal micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.*, 4(6) :825-837.
- Tohda H., Horaguchi K., Takahashi K., Oikawa A., Matsushima T.,1980, Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cells for study of sister chromatid exchange and their evaluation as a test system., *Cancer Res* , 40:4775–4780.
- Tran, A.V., 2013, Do BHA and BHT Induce Morphological Changes and DNA Double-Strand Breaks in *Schizosaccharomyces pombe*?, *Scripps Senior Theses*, 152.
- Tucker J.D., Auletta A., Cimino M.C. ve diğ.,1993, Sister-Chromatid Exchange: Second Report Of The Gene-Tox Program, *Mutation Research*, 297: 101.
- Tucker, J.D., Preston, R.J., 1996, Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assesment, *Mutat. Res.*, 365 (1-3): 147-159.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977, *T.C. Resmi Gazete*, Sayı:23172, 1-220.

- Uzun, 2021, *Potasyum Benzoat: Nedir ? Yararlı Mı Zararlı Mı ? Alımı ve Fazla Alımı, İçeren Besinler*, <https://bilim.gen.tr/gida-katki-maddelerinin-fayda-ve-zararlari/>, [Ziyaret tarihi: 25 Kasım 2022].
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F.,1998, Gıda Mikrobiyolojisi, *Mengi Tan Basımevi*, 1. Baskı, ISBN 975-483-383-4, İzmir.
- Vernole, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Melino, G., Porfirio, B., Bonmasar, E., Nicoletti, B.,1988, Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to 1-p-(3-methyltriazeno) benzoic acid potassium salt, *Mutat. Res.*, 208(3-4): 233-236.
- Vernole, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Porfirio, B., Melino, G., Bonmasar, E., Nicoletti, B.,1987, Cytogenetic effects of 1-p-(3-methyltriazeno) benzoic acid potassium salt on human lymphocytes in vitro, *Mutat. Res.*, 189(3): 349-356.
- Vural, N.,2005, Toksikoloji, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129.
- Wu, J., Lyons, GH., Graham, RD., Fenech, M., 2009, The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Mutation Research*, 24(3) :225-232.
- Yavuz, A.,2005, *Benzol peroksinin insan periferik lenfositlerinde in vitro genotoksik etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1-132.
- Yılmaz, S., 2008, *Bazı Gıda Maddelerinin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-112.
- Yılmaz, S., Ünal F., Yüzbaşıoğlu D., 2009, *Cytotechnology*, 60:55–61.
- Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., 2008a, Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on Allium chromosomes, *Fresen. Environ. Bulletin*, 17 (8a): 1029-1037.
- Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., 2008b, Clastogenic effects of food additive citric acid in human peripheral lymphocytes, *Cytotechnology*, 56 (2): 137- 144.
- Yurttagül, M., 1993, Hızlı Hazır Yemek Fast Food Sisteminde Kullanılan Katkı Maddeleri, Akdağ F., Arslan P(Ed): Hızlı Hazır Yemek Sistemi (Fast Food). *Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını*, No:6, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Ünal, F., 2014, Gıda Koruyucuları ve Genotoksikite Testleri, *Gıda/The Journal of Food*, 39, 3, 179-186.
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K.,1988, Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals, *Environ Mol Mutagen* 11:1–158.

- Zengin, N., 2009, *Sodyum Benzoat ve Potasyum Benzoatın İnsan Periferik Lenfositlerinde Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans, Gazi Üniversitesi.
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. and Aksoy, H., 2011, The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 4, 763-769. |



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Kübra METİN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Marmara Üniversitesi
Fakülte	Fen- Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	15.01.2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji Programı