



T.C

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TATLANDIRICI GIDA KATKI MADDELERİ OLAN LAKTİTOL VE
MANNİTOL'ÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU EKER KARTAL

OCAK 2023

EBRU EKER KARTAL	BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI	OCAK 2023
-------------------------	------------------------------------	------------------

**TATLANDIRICI GIDA KATKI MADDELERİ OLAN LAKTİTOL VE
MANNİTOL'ÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ebru EKER KARTAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

Yüksek Lisans Tezi kabul ve Onay Sayfası

Ebru EKER KARTAL tarafından hazırlanan “Tatlandırıcı Gıda Katkı Maddesi Olan Laktitol ve Mannitol’ün Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

Bilgisayar Teknolojileri Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ekrem BÖLÜKBAŞI

Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 26/01/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

EBRU EKER KARTAL

26.01.2023

TATLANDIRICI GIDA KATKI MADDELERİ OLAN LAKTİTOL VE MANNİTOL'ÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Ebru EKER KARTAL

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2023

ÖZET

Dünyada beslenme alışkanlıklarının da değişmesi ile hazır gıda tüketiminde artış yaşanmıştır. Bu artışla beraber gıdalarda kullanılan katkı maddeleri kullanımı da artmıştır. Gıda katkı maddelerinin güvenle kullanılabilir miktarlarının belirlenmesi uzun yıllardır araştırma konusu olmuştur. Çünkü söz konusu kimyasalların sağlığa olası etkileri tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada tatlandırıcı olarak kullanılan Mannitol ve Laktitol'ün *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferik lenfosit hücrelerinde kromozom anormallikleri (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca bu tatlandırıcı maddelerin mitotik indeks (Mİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. Mannitol için 500, 1000, 2000, 4000 ve 8000 µg/mL'lik, laktitol için 250,500,1000,2000ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Uygulanan testlerde iki farklı katkı maddesinde tüm konsantrasyon ve sürelerde hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansını ve anormal hücre yüzdesini etkilemediği, mikronükleus frekansında ve nükleer bölünme indeksi değerlerinde kontrole göre önemli bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir. Mitotik indeks değerlerinde ise Mannitol'ün 24 ve 48 saatlik uygulamalarında 2000, 4000 ve 8000 µg/mL 'lik konsantrasyonlarında, Laktitol'ün 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlarında kontrole oranla anlamlı düşüş gözlenmiştir. Sonuçta Mannitol ve Laktitolün *in vitro* insan lenfositlerinde kullanılan konsantrasyonlarda önemli bir genotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

Sayfa Adedi : 76
Anahtar Kelimeler : Gıda katkı maddeleri, genotoksisite, Laktitol, Mannitol
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF FLAVORING FOOD
ADDITIVES, LACTITOL AND MANNITOL

Master Thesis

Ebru EKER KARTAL

AMASYA UNIVERSITY INSTITUTE
OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Ocak 2023

ABSTRACT

There has been an increase in the consumption of ready-made food with the change in dietary habits in the world. The use of additives in foods was also increased with this situation. Determining the amounts of food additives that can be used safely has been the subject of research for many years. Because the possible effects of these chemicals on health continue to be a matter of discussion. In this study, the *in vitro* genotoxic effects of Mannitol and Lactitol used as sweeteners were evaluated in human peripheral lymphocytes by chromosomal abnormalities (CA) and micronucleus (MN) assays. In addition, the effects of these sweeteners on the mitotic index (MI) and nuclear division index (NBI) were also investigated. Concentrations of 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 µg/mL were used for mannitol and 250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg/mL for lactitol. In the assays applied, it was observed that the two different additives did not affect the chromosomal abnormality frequency per cell and the percentage of abnormal cells at all concentrations and treatments, did not cause a significant change in the micronucleus frequency and nuclear division index values compared to the control. In the mitotic index values, a significant decrease was observed at the concentrations of 2000, 4000 and 8000 µg/mL of Mannitol and 500, 1000, 2000 and 4000 µg/mL of Lactitol in 24 and 48h treatments, compared to the control. As a result, it was observed that mannitol and lactitol did not have a significant genotoxic effect at the concentrations used in human lymphocytes *in vitro*.

Number of Pages : 76

Keywords : Food additives, genotoxicity, genotoxicity tests, Lactitol, Mannitol

Consultant : Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her alanda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışmamı özenli bir şekilde yönlendiren tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, çalışmalarımda yardımlarından dolayı Pınar BAYER ALTUNKAYNAK, Öznur GÜNAYDIN ve Hümeysra GÜL'e, Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının tüm akademik ve idari personeline, çalışmam süresince zamanının birçoğunu benimle geçirerek destek olan kardeşim Esra EKER'e, her zaman arkamda duran ve varlıklarına şükrettiğim annem Selma EKER ve Babam Muammer EKER'e, her daim beni motive eden, desteği ile yanımda olan hayat arkadaşım Ramazan KARTAL ve kızım Hanne İpek KARTAL'a varlıklarından dolayı teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda, Gıda Teknolojisi ve Gıda Güvenliği.....	4
2.4. Gıda Katkı Maddelerini Kullanım Miktarlarının Belirlenmesi ve E Kodu.....	9
2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	10
2.5.1. Tatlandırıcılar	10
2.6. Genotoksisite Testleri.....	12
2.6.1. Mikronükleus Testi.....	13
2.7. Tatlandırıcılar ve Diğer Gıda Katkı Maddeleri ile Yapılmış Bazı Genotoksisite Çalışmaları	15
3.MATERYAL METOT	19
3.1.Materyal	19
3.1.1. Test Materyalleri	19
3.2. Metot	20
3.2.1 Çalışmada Kullanılacak Konsantrasyonların Belirlenmesi	20
3.2.3. Mikronükleus Testi.....	22

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
3.2.4. İstatistiki analizler	23
4.BULGULAR.....	24
4.1.Mannitol Uygulaması.....	24
4.1.1.Kromozom Anormallik (KA) Test Bulguları.....	24
4.1.2. Mikronükleus (MN) Testi Bulguları	29
4.2.Laktitol Uygulaması.....	31
4.2.1.Kromozom Anormallik (KA) Testi	31
4.2.2. Mikronükleus (MN) Testi.....	36
5.TARTIŞMA	39
6. SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4. 1 . Mannitol'ün ile insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri	30
Çizelge 4. 2. Mannitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri	33
Çizelge 4. 3.Mannitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi	35
Çizelge 4. 4. Lactitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri ve frekansları	37
Çizelge 4. 5. Laktitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri.....	40
Çizelge 4 6. Laktitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3. 1. Mannitolün yapısal formülü	19
Şekil 3. 2. Laktitolün yapısal formülü	20
Şekil 4 .1. Mannitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu anormal hücre yüzdesi.....	31
Şekil 4. 2. Mannitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik frekansı.....	32
Şekil 4. 3. Mannitol' ün insan periferal lenfositlerinde oluşan mitotik indeks değerleri... 34	
Şekil 4. 4. Mannitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları.....	35
Şekil 4 5. Laktitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik frekansları.....	38
Şekil 4.6.Laktitol'ün insan insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik frekansları.....	39
Şekil 4 7. Laktitol'ün insan periferal lenfositlerinde oluşan mitotik indeks değerleri.....	41
Şekil 4. 8. Laktitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları	42
Şekil 4. 9. Uygulama sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri kardeş kromatidlerde birleşme.....	43

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADI	Acceptable Daily Intake(Kabul edilebilir günlük alım)
BN	Binükleat
BrdU	Bromodeoksiüridin
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E	Europe
GLP	Good Laboratory Practic (İyi laboratuvar uygulaması)
KA	Kromozam Anormallikleri
MN	Mikronükleus
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (Gözlenmeyen yan etki seviyesi)

1. GİRİŞ

Günümüz toplum ihtiyaçlarının değişmesiyle birlikte buna paralel olarak gıda tüketiminde de değişiklikler meydana gelmiştir. Gıda sektöründe teknolojinin gelişmesi ile yeni üretim teknikleri kullanılması, ürünlerin çeşitlenmesi, toplumda çalışma hayatının giderek yoğunlaşması, kişilerin yoğun hayat temposunda yemek yemeğe daha kısa zaman ayırmak istemeleri gibi nedenlerle hazır gıdaya olan eğilim artmıştır. Böylece gıda endüstrisinde de hazır gıda üretiminde artma meydana gelmiştir. Bu artışla üretilen hazır gıdaların üretim aşamasından tüketiciye herhangi bir bozulma olmadan gelebilmesi gündeme gelmiştir [1-3]. Bu amaçla kullanılan gıda katkı maddeleri en geniş anlamı ile “gıdalara üretim aşamasında ilave edilen maddeler” olarak tanımlanabilir. Türk Gıda Kodeksi’nde, gıda katkı maddeleri “*tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın gıdalara teknolojik amaçlı katılan, doğrudan veya dolaylı olarak gıdaların bir bileşeni haline gelen veya bunların özelliklerini değiştiren maddelerdir*” diye tanımlanmaktadır [4].

Gıdalarda bulunan maddelerden yağlar, karbonhidratlar, proteinler, mineraller ve vitaminler doğal bileşen olarak kabul edilir. Bunun dışında gıdada besin değerinin artırılması, tatlandırılması, görünümünün iyileştirilmesi, besinlerde oluşabilecek kayıpların önlenmesi, gıdanın besin kalitesini koruyarak saklanması ve raf ömrünün uzatılması amacı ile gıdaya dışardan eklenen maddeler doğal bileşen dışında kabul edilir. Sayılan bu özelliklerin sağlanabilmesi amacıyla gıda katkı maddelerinin kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmıştır. Ancak gıda katkı maddeleri ile ilgili yapılmış olan araştırmalar, canlılarda sağlık riski oluşturabileceklerini gösterdiğinden hem araştırma sayısının artmasına hemde bazı katkı maddelerinin kullanımına kısıtlamalar getirilmesine sebep olmuştur [5-7].

Yapılan araştırmalar ile kullanılan katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri tartışılan bir konu haline gelmiş olup bu tartışma güncelliğini korumaktadır. Katkı maddelerinin tüzükte belirtilen miktardan fazla kullanılması, uzun süre kullanımda vücutta birikmesi sağlık risklerinin oluşmasını tetiklemektedir [8]. Son yıllarda gelişmiş ülkeler başta olmak üzere kullanılan katkı maddelerinde artış meydana gelmiş, bu artış ile birlikte baş ağrısı, depresyon, egzama gibi rahatsızlıklar, astım, ishal (özellikle çocuklarda) hiperaktiflik ve aşırı duyarlılık (hipersensitivite), alerjik reaksiyonlar, sindirim sistemi bozuklukları gibi rahatsızlıklara yönelik bulgular elde edilmiştir [9-10].

Katkı maddelerinin kullanım miktarlarının yönetmeliklerde sınırlandırılması sağlığa zarar vermeyeceği anlamına gelmemektedir. Katkı maddelerinin uzun süreli tüketimi insan sağlığına olumsuz etkiler oluşturabilmektedir [11]. İnsanların aynı gün içinde ne kadar kimyasala maruz kalabileceği, kişilerin beslenme alışkanlığına göre değişeceğinden, maruziyet oranı bilinmemektedir.

Tatlandırıcı; gıdaya tatlı tat veren ancak şeker olmayan madde olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak şeker yerine tüketilen, şekere oranla daha az enerji sağlayan, doğal ve yapay olarak üretilen katkı maddeleridir [11-12]. Genotoksisite, hücrelerin genetik materyalinde biyolojik, kimyasal veya fiziksel etkenlerin oluşturabileceği hasar olarak tanımlanabilir. Oluşabilecek bu hasarlar genel olarak kromozom anormallikleri, gen mutasyonları, DNA zincir kırıkları ve DNA eklentileri olabilmektedir. Meydana gelen bu genotoksik etki hücre içinde onarıldığında mutasyona neden olmayabilir ancak onarılmamış hasarlar genetik materyalde kalıcı değişikliklere neden olabilmektedir. Bu kalıcı değişiklikler mutasyonlar olarak adlandırılmaktadır. Mutasyonun kritik genlerde oluşması kanser gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Bu nedenle de oluşan mutasyonlar potansiyel kanserojen olarak kabul edilir. Mutajenitenin sağlık üzerinde birçok kalıcı etki bırakması açısından kullanılan tüm katkı maddelerinin etkilerinin belirlenip değerlendirilmesi, yine bu maddelerin güvenilirliklerinin artırılması amacıyla kullanılan testlerde önemli etken olmaktadır [13].

Çoğu alanda karşımıza çıkan bu katkı maddelerinin geniş kullanım alanı gıda sanayidir. Gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin incelenmesi ve kısa sürede tespit edilmesinde çeşitli genotoksisite testleri kullanılmaktadır. Söz konusu testler tüm dünyada gıda katkı maddelerinin karsinogenik ve genotoksik etkilerinin tespitinde rutin olarak kullanılmaktadır. Kullanılan bu testlere örnek olarak kromozom anormallikleri (KA), mikronükleus (MN), kardeş kromatit değişimi (KKD), comet ve Ames testleri verilebilir [14-18].

Çalışmamızda tatlandırıcılar grubuna dâhil olan gıda katkı maddelerinden Laktitol ve Mannitol'ün genotoksik etkileri *in vitro* insan lenfositleri kullanılarak kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri ile incelenmiştir. Ayrıca mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksleri tespit edilerek söz konusu gıda katkı maddelerinin sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasının ülkemiz ve dünyada araştırmaya konu olan gıda katkı maddelerinin kullanım alanlarına ilişkin verilen ve verilecek olan izinlerin

güncellenmesi, kullanımlarına ilişkin yol göstermesi ve bundan sonra yapılacak olan çalışmalara yön verebilmesi açısından öneminin büyük olabileceği düşünülmektedir.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda, Gıda Teknolojisi ve Gıda Güvenliği

Gıdavücuda dışarıdan alınan, enerji veren ve canlılığın devamını sağlayan, organizmanın besin ihtiyacını karşılayan, hücre yapım ve onarımını gerçekleştiren, bedenin sürekli ve düzenli çalışmasını sağlamak için canlılar tarafından tüketilen vazgeçilmez bir ihtiyaçtır. Tüketilen katı veya sıvı besinler işlenmemiş olabildiği gibi, yarı işlenmiş ve işlenmiş olabilmektedir [19,20].

Kentleşme oranının artması ile gıdalarda da büyük değişimler meydana gelmiştir. Gıdanın tüketiciye ulaşma aşamasında besin değeri ve gıda kalitesinde değişimler meydana gelebilmektedir. Üretilen gıdaların işleme, depolama ve dağıtım sırasındaki kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak farklılaşma yaşanabilmektedir. Gıdaların, üretimden başlayarak, tüketiciye ulaşana kadarg geçen süreçte yaşanacak olan bu değişimlerin en aza indirgenmesi ve sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi amacıyla gıda teknolojisi tekniklerinin uygulanması büyük önem taşımaktadır [21-23].

Gıda güvenliği insan sağlığını direkt etkilediğinden dünya çapında her zaman önemli bir konu olmuştur [5,6]. Sağlıklı gıda üretiminin yapılabilmesi için, gıda üretim proseslerinde ve gıdanın depolama, dağıtım aşamalarında kurallara riayet edilmesi ve bunun için gereken önlemlerin alınması gıda güvenliği olarak tanımlanmaktadır [24].

Günümüzde gıda maddelerinin üretim teknikleri değişmiş, ürün çeşitliliği artmış ve gıdaların taşıma, saklama, depolama sürelerinde artış meydana gelmiştir. Ancak bu işlemlerin yapılması sırasında gerekli koşulların sağlanmaması gıda üzerinde olumsuzluk yaşanmasına ve özellikle insan sağlığı üzerinde risk oluşturmasına neden olabilmektedir. Gıdada meydana gelebilecek herhangi bir olumsuzluktan korumak ve insan sağlığı üzerinde risk oluşturan etmenleri ortadan kaldırmak amacıyla gıda maddelerinin taşınması gereken asgari ve teknik kıstasları içeren yasal düzenlemeler yapılmaktadır. Gıda ile ilgilenen tüm kurum ve kuruluşlarda, gıda maddelerinin sağlığa uygun şartlarda üretilmesi ve tüketilmesi için tüm dünyada geçerli bir gıda mevzuatı uygulanması gerektiği düşünölmektedir [25].

Gıda Mevzuatı, genel anlamda, gıda maddelerinin üretiminin yapıldığı ve satıldığı her türlü mekânın niteliklerinin belirlendiği, üretimi yapılan gıda maddelerinin kalite ve hijyen bakımından uyması gereken kriterleri içeren kurallar şeklinde tanımlanabilir [25,26].

Ülkemizde Gıda Mevzuatı'na kaynaklık eden kuruluşlar;

1. Tarım ve Orman Bakanlığı,
2. Sağlık Bakanlığı,
3. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı,
4. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı ile bünyelerindeki genel müdürlükler,
5. İlgili diğer birimler ve taşra teşkilatlarındaki yapılanmalar şeklinde sıralanabilmektedir [25].

Dünya genelinde kalitenin bir standart olarak ortaya çıkması ile gıdagüvenliği dünya çapında iş birliği yapmayı gerektirmiştir. Bu bağlamda gıda güvenliği ile ilgili uluslararası kuruluşlar kurulmuştur.

Uluslararası Gıda Mevzuatı ile İlgili Kuruluşlar;

1. Birleşmiş Milletler Örgütü (United Nations)
2. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations -FAO)
3. Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission)
4. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization -WHO)
5. Pestisitler FAO / WHO Ortak Toplantısı (Pesticide FAO / WHO Joint Meeting)
6. Uluslararası Standart Organizasyonu (International Standards of Organisations - ISO)
7. Avrupa Birliği (European Union – EU)
8. Tüketici Sağlığı ve Güvenliği Genel Müdürlüğü Avrupa Komisyonu (Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission)
9. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority-EFSA)
10. Gıda ve Veterinerlik Ofisi (Food and Veterinary Office -FVO)
11. Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF)

12. Dünya Ticaret Örgütü (World Trade Organisation - WTO)
13. Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-WTO)
14. Gümrük Tarifeleri ve Ticaret Genel Anlaşması (General Agreement on Cumtons Tariffs and Trade -GATT) şeklinde sıralanabilmektedir [8, 25].

Çok uzun yıllardır var olan katkı maddeleri özellikle gıdanın dayanıklılığını ve tüketici beğenisini arttırmak, lezzet ve rengi korumak, besin değerinin kaybını önlemek ve arttırmak, raf ömrünün uzatmak amacıyla gıda endüstrisinde yardımcı maddeler olarak kullanılmaktadır [26,27].

2.2. Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanım Amaçları

Gelişen dünya ile birlikte gıdaların üretim ve tüketiminde de büyük değişimler meydana gelmiş, tüketicinin gıda beklentilerinde de değişimler gözlenmiştir. Gıda hazırlama aşamasında daha az vakit harcanmak istenmesi, beslenme alışkanlıklarının değişerek hazır gıdaya talebin fazla olması paketli gıda tüketimini artırmıştır. Bu durum da gıda katkı maddelerinin çeşit ve kullanım alanlarında artış meydana gelmesine neden olmuştur. Kullanılan bu gıda katkı maddelerinin artışı ile bunların sağlık bakımından etkileri tartışma konusu olmuştur ve bu tartışmalar halen güncelliğini korumaktadır. Hazır gıda tüketiminin artması ve bilinçsiz beslenme, katkı maddesinin alımını arttıracak için sağlık üzerinde olumsuz bir etki gösterebileceği öngörülen bir gerçektir [28].

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde gıda katkı maddeleri, “tek başına hammadde olarak kullanılmayan, tek başına ve yardımcı madde olarak kullanımı olmayan, yine tek başına besleyicilik değeri bulunmayan, gıdanın üretilmesinden tüketilmesine kadar geçen süreçte görünüş, tat, koku gibi yapısal özelliklerin korunması ve istenmeyen bir etkinin oluşmaması amacıyla kullanılan maddelerdir” şeklinde tanımlanmaktadır [17, 28].

Başka bir tanımlamaya göre gıda katkı maddeleri, gıdaların tat, koku, lezzet ve görünüş gibi duyu özelliklerini korumak ve arttırmak, gıdanın kalite özelliklerini kaybetmeden raf ömrünün uzatılmasını sağlamak, gıdanın işleme prosesinde ve depolama, taşıma, ambalajlama aşamalarında gıda değerinin korunmasını sağlamak amacıyla eklenen, besleyici değeri olmayan ve gıdanın bir bileşeni haline gelen maddelerdir [5,29].

Gıda katkı maddeleri kullanılırken dikkat edilecek bazı önemli hususlar bulunmaktadır. Bunlar;

- Özellikle sağlığa zararlı olmamalı ve yönetmeliklerce belirlenmiş olan katkı maddeleri kullanılmalıdır.
- Katkı maddelerinin kullanımında teknolojik zorunluluk bulunmalıdır.
- Kullanımında sakınca bulunmadığı belirlenen gıdalarda kullanılmalıdır.
- İzin verilen miktarlarda kullanılmalıdır.
- Üretilen gıdanın besin değerini ve kalitesini koruyacak katkı maddeleri kullanılmalıdır.
- Kullanılan katkı maddesi herhangi bir olumsuzluğu maskeleyerek amacı taşımamalıdır [28].

Bir gıda katkı maddesinin kullanım miktarı;

1. Katkı maddelerinin belirlenmiş olan günlük kabul edilebilir alım miktarlarıveya buna denk bir değerlendirme ile,
2. Özel gruplar için hazırlanan gıda maddelerine katılan katkı maddelerinin günlük alım miktarlarının bu gruplar için özellikle denenmiş olarak belirlenmesi gerekir [30].

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarına göre 4 grupta incelenebilir [6,28]. Bunlar;

1.Koruyucular

Gıdada tat, koku, lezzet gibi duyuşal; renk kaybı, acıma gibi yapısal özelliklerde meydana gelebilecek istenmeyen etkilerin engellenmesi ve gıdanın kalitesini koruyarak raf ömrünün uzatılmasını sağlamak için kullanılmaktadır. Bu amaçla genellikle antimikrobiyaller (nitrit, nitrat, benzoik asit) ve antioksidanlar (butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), galatlar)kullanılmaktadır.

2. Gıdanın lezzet, görünüş ve yapısını geliştirenler

a. pH ayarlayıcılar: Gıdanın asitlik veya bazlık derecelerini kontrol etmek, istenilen pH düzeyine getirmek için kullanılırlar.

b. Topaklanmayı önleyenler: Toz halinde olan karışımların bir araya gelerek topaklanmasını önleyerek yapısını koruyan maddelerdir. Bu amaçla alüminyum silikat, trikalsiyum fosfat gibi katkı maddeleri kullanılmaktadır.

c. Emülsifiyerler: Gıda içerisine katılan su ve yağın homojen bir görünüm alarak dağılmasını önleyen katkı maddeleridir. Bu amaçla lesitin, mono ve digliseritler gibi katkı maddeleri tercih edilmektedir.

d. Stabilizörler, kıvam arttırıcılar, yapay tatlandırıcılar

Stabilizörler: Homojen hale gelen su ve yağınuzun süre bu yapıda kalmasını sağlamak amacıyla gıdaya eklenmektedir.

Jelleştirme ajanı: Gıdaya jelimsi bir yapı ve doku kazandırmak amacıyla (keçiboynuzu zamkı, pektin gibi) kullanılmaktadır.

Yapay tatlandırıcılar: Şeker yerine kullanılan, kalorisi olmayan katkı maddeleridir. Gıdanın tadını tüketici açısından daha cazip hale getirir. Bu amaçla mannitol, laktitol, aspartam, sakkarin gibi katkı maddeleri kullanılmaktadır.

Renk stabilizasyon ajanı: Gıda ürününün rengini kalıcı hale getirmektedir.

3. Aroma ve Renk geliştiriciler

a. Aroma maddeleri: Gıdada bulunan aromayı daha cazip ve hoş hale getirmek için kullanılmaktadır. Bu amaçla daha çok lezzet arttırıcılar (örneğin, monosodyum glutamat=MSG) tercih edilmektedir.

b. Renklendiriciler: Gıdanın hazırlanma aşamasında meydana gelen renk kayıplarını tekrar kazandırmak, bazı renkleri kuvvetlendirilerek gıda albenisinin artmasını sağlamak için kullanılmaktadır. Bu amaçla tartrazin, indigotingibi maddeler tercih edilmektedir.

4. Besin değerini koruyucu geliştiriciler (Besin ögeleri): Gıda hazırlanma aşamasında eksilen besin ögelerinin tekrar kazandırılması (B1, B2, niasin) ve beslenmede eksik olan vitaminlerin eklenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar [6,28].

2.4. Gıda Katkı Maddelerini Kullanım Miktarlarının Belirlenmesi ve E Kodu

Gıda katkı maddelerinin sağlık üzerinde oluşturduğu etkileri hakkında bilgi sahibi olunabilecek verilerden biri de toksisite test sonuçlarıdır. Gıdada kullanılan katkı maddelerinin karsinojenik ve mutajenik etkileri sonucunda ortaya çıkabilecek olan toksik etkiler standart toksisite testleri ile değerlendirilmektedir. Katkı maddesinin toksik etki göstermediği dozların belirlenmesi amacıyla deney hayvanları ve/veya hücre kültürleri kullanılmaktadır. Yapılan test sonuçlarında hiçbir toksik etki göstermeyen doz belirlenmektedir. Herhangi bir toksik etki göstermeyen doz elde edilirse bu doza NOAEL (No Observed Adverse Effect Level=gözlenebilir yan etki oluşturmayan düzey) denir. NOAEL hiçbir etkinin görülmediği konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. NOAEL değerini belirlemek için öncelikle LD₅₀ değeri belirlenir. LD₅₀ değeri deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne neden olan dozdur. Daha sonra belirlenen LD₅₀ dozunun miktarı azaltılarak verilen her dozun toksik etkileri araştırılır. Deney hayvanlarının hücre ve dokularında oluşabilecek tüm toksik etkiler incelenir. Bu inceleme sonucunda araştırmaya konu olan katkı maddesinin zararsız olduğuna dair herhangi bir doz miktarı tespit edilemezse, o katkı maddesinin gıdalarda kullanılmasına izin verilmez. Kullanılacak gıda katkı maddelerinin izin verilen dozları NOAEL değeri bulunarak belirlenir. Doz belirleme deneyleri insanlar üzerinde yapılamadığı için deney hayvanında hiçbir yan etkiye sebep olmayan dozun 1/100'ü insan için (günlük kabul edilebilir alım miktarı =ADI değeri Acceptable Daily Intake) kabul edilir. ADI değeri, katkı maddesinin günlük alınmasına izin verilen miktar değeridir ve bu insanlarda güvenli doz olarak kabul edilir. İnsanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir. NOAEL değerinden ADI değerine geçişte kullanılan işlem ise ADI (Kabul edilebilir günlük alım) = NOAEL / 100 olarak belirlenmiştir [31-33].

Gıda katkı maddelerinin standartlaştırılması amacıyla Avrupa Birliği tarafından Europe kelimesinin baş harfi olan "E" kullanılarak E-kodları oluşturulmuştur. Oluşturulan E-kodları gıda katkı maddeleri konusunda çalışan uluslararası kuruluşların ortak çalışması sonucu oluşmuştur. E-kodu, isimleri uzun olan katkı maddelerinin etikette daha kısa şekilde belirtilmesi amacıyla da yarar sağlamaktadır. Ancak tüketicinin etikette belirtilen E-kodunun hangi katkı maddesine karşılık geldiğini bilmesi önemlidir."E" numara sistemi ile gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflandırılması ise aşağıda gösterilmiştir.

- Renklendiriciler E 100 – 180
- Koruyucular E 200- 297
- Antioksidanlar E 300 – 321
- Emülgatör ve stabilizatörler E 322- 500
- Asit / baz sağlayıcılar E 500- 578
- Tatlandırıcılar, koku verenler E 620 – 637[34,35].

2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddelerinin gıda sanayide birçok alanda kullanılmaktadır. Farklı alanlarda kullanılan bu katkı maddeleri üretilecek gıdaya ve kullanım amacına göre sınıflandırılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin fonksiyonel sınıfları, 30 Haziran 2013 tarih ve 28693 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde aşağıda belirtilen 26 ana başlıkta toplanmıştır [36]. Bunlar; tatlandırıcılar, renklendiriciler, koruyucular, antioksidanlar, taşıyıcılar, asitler, asitlik düzenleyiciler, topaklanmayı önleyiciler, köpüklenmeyi önleyiciler, hacim arttırıcılar, emülgatörler, emülsifiye edici tuzlar, sertleştiriciler, aroma arttırıcılar, köpük oluşturucular, jelleştiriciler, parlaticılar, nem vericiler, modifiye nişastalar, ambalajlama gazları, itici gazlar, kabartıcılar, metal bağlayıcılar, stabilizörler, kıvam arttırıcılar, un işlem maddeleridir [36].

2.5.1. Tatlandırıcılar

Tatlandırıcılar, ürüne şeker tadı vermesi amacıyla gıdaya katılan ve birçok gıdada kullanımını olan katkı maddeleridir. Kullanım alanları olarak unlu mamuller, şekerlemeler, tatlılar, dondurmalar, alkolsüz içecekler gösterilebilmektedir [37,38].

Yapılan araştırmalar sonucunda tatlandırıcıların tropikal ülkelerde asırlar önce kullanıldığı görülmektedir. *Thaumatococcus daniellii* bitkisinden elde edilen ve tomatın diye adlandırılan maddenin gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanıldığı anlaşılmaktadır. Sakkarinin keşfi ile gıda sanayinde yapay tatlandırıcılar kullanılmaya başlanmıştır. İkinci dünya savaşı sonrası ortaya çıkan şeker kıtlığı sonucunda yapay tatlandırıcı kullanımında artış meydana

gelmiştir. Tatlandırıcılar üretim şekillerine göre doğal ve yapay tatlandırıcılar olarak iki grupta incelenebilir [39-42].

2.5.1.1. Yapay tatlandırıcılar

Kimyasal yöntemlerle üretilen yapay tatlandırıcılar genel olarak besin değeri olmayan ve enerji sağlamayan katkı maddeleri olarak tanımlanabilmektedir. Bu tatlandırıcılar, genellikle diyet ürünlerinde, diş çürüklerinin engellenmesinde ve kan glukoz değerinin kontrolünde kullanılabilir. En yaygın olarak kullanılan yapay tatlandırıcılara örnek olarak sakkarin, aspartam, asesülfam-K ve siklamat verilebilir. Bu grup içinde sakkarin tatlılık derecesi en yüksek, kullanım alanı en geniş ve en ucuz tatlandırıcıdır [41,42,44].

2.5.1.2. Doğal tatlandırıcılar

Bitki ve bitki köklerinden üretilen ve besin değeri olan doğal tatlandırıcılar da genel olarak enerji vermektedirler. En yaygın olarak kullanılan doğal tatlandırıcılara; sakkaroz, glukoz, früktoz ve dekstroz örnek verilebilir [39,43].

Şeker alkollerini besleyicilik değeri olan, glisemik indeksi düşük tatlandırıcılardır. Enerji verme miktarı düşük olduğundan gıda üreticileri tarafından birçok üründe kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan şeker alkollerini sorbitol, eritriol, maltitol, mannitol, ksilitol ve laktitoldür [42].

Mannitol yaygın olarak kullanılan bir şeker alkolüdür. Gıda sanayide tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanıldığı gibi tıp ve eczacılıkta da kullanılmaktadır. Mannitol ısı düşürücü özelliğinden dolayı çikolata kaplamalarında, şekerlemelerde ve sakızlarda kullanılmaktadır. Glisemik indeksi sukroz ile kıyaslandığında daha düşük olduğu görülmektedir. Tıp uygulamalarında Mannitol'un, beyin ödeminin azaltılmasında etkili olduğu görülmüş ancak bazı yan etkilere neden olduğu rapor edilmiştir. Bu yan etkilerin başında dehidrasyon ve elektrolit sorunları yer almaktadır. Ayrıca böbrek sorunları meydana getirmesi ve kalp yetmezliğini ilerletmesi ciddi yan etkileri arasında gösterilmiştir. Mannitol'un hamilelik sırasında güvenli kullanımı ise belirsizdir. Diyabet hastaları için tatlandırıcı olarak kullanılan Mannitol, ilaç sanayinde çiğneme tabletlerinde ve gözlerde meydana gelen yüksek basıncı azaltmak için de kullanılmaktadır [43-48].

Laktitol, disakkarit şeker alkolüdür. Tatlılık derecesi sakkarozun yaklaşık %40'ı kadar olan laktitolün glisemik indeksi yok sayılacak seviyededir. Laktitol beyaz kristal formda bulunur ve molekül ağırlığı şekere yakın düzeydedir. Bundan dolayı su aktivitesinde benzer etki göstermektedir. Laktitol düşük tatlılık derecesinden ötürü tatlandırıcı olarak çekiciliği az olmasına karşın, tüketildiğinde ağızda acı tat bırakmaması ve hacim verici özelliği olmasından dolayı unlu mamullerde, dondurmalarda, çikolata ve benzeri ürünlerde kullanılmaktadır. Ayrıca bisküvilere gevrekliği sağlamak içinde laktitol kullanılmaktadır. Laktitol eczacılık alanında ve bazı gıdalarda da laktülozun yerine kullanılmaktadır [49,50].

2.6. Genotoksisite Testleri

Günümüzde kimyasal maddelerinin kullanımına paralel olarak genetik hastalıklarda ve kanser vakalarında artış meydana gelmiştir. Kullanılan kimyasal maddelerin insan genomunda herhangi bir olumsuzluğa neden olabileceği düşüncesi kimyasallar üzerinde yapılan araştırmaları daha önemli hale getirmiştir. Meydana gelebilecek mutasyonlar hem bireyi hem de gelecek nesilleri etkileyebilecek anormallikler oluşturabilmektedir. Bu sebeple kimyasal maddelerin genotoksik, mutajenik ve kanserojen etkilerinin araştırılması amacıyla farklı canlı gruplarıyla çeşitli testler geliştirilmiştir [51,52]. Bu kimyasal maddelerin sağlık üzerinde oluşturabileceği risklerin tespitinde kısa süreli genotoksisite testleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri, genetik hasara neden olan maddeleri belirlemek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* testler kültüre veya izole edilmiş hücre düzeneğine sahip testlerdir. Hücre kültürleri ile birçok kimyasal maddenin genotoksik etkisi araştırılabilmektedir. Toksisite çalışmalarında hücre kültürlerinin kullanım avantajları şu şekilde sıralanabilmektedir:

- a. Türler arası farklılığı gözletmez,
- b. Toksik etki yapabileceği düşünülen kimyasal maddenin deri, karaciğer, kan gibi kendine özgü doku hücrelerinde çalışma yapılmasına olanak sağlar,
- c. Oluşan toksisitenin hücreler üzerinde ortaya çıkmasını sağlar,
- d. Deney hayvanlarının acı çekmesi ve ölmesinin önüne geçilir [53,5-56]. İnsan hücre kültürlerinden genotoksisite testlerinde en yaygın olarak tercih edileni ise lenfosit kültürleridir. Lenfositlerin tercih edilme sebepleri ise;

1-Periferik kandan kolayca ve çok sayıda hücre elde edilebilmesi

- 2-Kan dolaşım sisteminde G0 evresinde olmaları,
- 3-Hücre kültürü ortamında bölünmeye kolayca teşvik edilebilmeleri,
- 4-Senkronize popülasyon yani aynı fazda, aynı anda olmaları sayılabilmektedir [57].

Genotoksisite testleri erişebilirliği ve uygulaması basit ve hızlı olması, genetik materyalde oluşan hasarın belirlenmesinde hassas olmaları, ucuz yöntemler olmaları gibi nedenlerle tercih edilmektedir [58,59]. Herhangi bir kimyasal maddenin genotoksik riskinin belirlenmesi amacıyla insan lenfosit kültürlerinde en yaygın kullanılan genotoksisite testleri kromozomal anormallik (KA) ve mikronükleus (MN) testleridir [60].

2.6.1. Mikronükleus Testi

Mikronükleus testi; 1986 yılında Howell tarafından eritrositlerde gözlenmiştir. 1907 'de Jolly, Howell'ın çalışmalarını desteklemiş, böylece mikronükleuslar "Howell-Jolly cisimcikleri" olarak da tanımlanmıştır. Bu test ilk olarak 1950'lerin ortalarında bitki hücrelerinde, 1970'lerin ortalarında ise hayvan hücrelerinde kullanılmaya başlanmıştır [61-64]. Mikronükleus; hücre siklusunun gerçekleştiği anda kromozomların serbest kalması ile ana çekirdekten bağımsız, çekirdek büyüklüğü ana çekirdeğin 1/3'ünden küçük olan, dış kısmı nükleus zarı ile çevrili yapılardır [65]. Sitoplazmaları birdir ve ana çekirdeğin hemen etrafında yer alırlar [50]. Mikronükleuslar hücredeki kinetokor ve iğ ipliklerinde oluşan hatalardan, hücre bölünmesinin denetimini yapan genlerindeki eksikliklerinden, kromozomlarda meydana gelen tahribat sonucu oluşmaktadır [66]. Mikronükleusların oluşumu hasarın meydana geldiği evreye bağlı değildir, hücre siklusu boyunca meydana gelmektedirler[50].

Mikronükleus testinde sitoplazma bölünmesini engellemek için sitokalasin-B kullanılır. Aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalasin-B, sitoplazma bölünmesini durdururken çekirdek bölünmesi devam eder ve binükleat oluşumu sağlanır. Bölünme sırasında mutajenik etkiler sonucu ana çekirdeğin etrafında küçük çekirdekler oluşmaktadır. Oluşan bu çekirdekler mikronükleus olarak adlandırılmaktadır [67-69].

Mikronükleus testi, genotoksik maddelerin kromozomlar üzerinde oluşturduğu etkilerin incelenmesinde genel olarak tercih edilmektedir. Bir maddenin uygulanması ile MN oranının kontrole göre fazla çıkması maddenin genotoksik olduğunu göstermektedir. Eğer MN oranında kontrole göre değişiklik meydana gelmemişse maddenin genotoksik olmadığı,

MN oranında azalmanın meydana gelmesi ise maddenin anti genotoksik etkide olduğunu gösterebilmektedir [70-73].

Farklı hücre çeşitlerine uygulanabilmesi, uygulama süresinin kısa ve kolay olması, güvenilir sonuç vermesi MN testinin genotoksik araştırmalarda sıkça tercih edilmesini sağlamıştır. *In vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen bu test genotoksitesini araştırılan maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [70,74,75].

Mikronükleus kanser teēhisinde de sıkça kullanılan bir test yöntemidir. Kanserine özgü kromozom düzensizliği MN testinin kullanılmasına olanak sağlamıştır. MN testi pestisit, gıda katkı maddeleri ve çevresel etmenlerden kaynaklanan kimyasal ve fiziksel etkenlerin neden olduğu genotoksik etkilerin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır [76-78].

2.6.2. Kromozom Anormallikleri Testi (KA)

Kromozom anormallikleri testi fiziksel ve kimyasal maddelerin genotoksik tahribatını belirlenmek amacıyla kullanılan bir test yöntemidir. Genotoksik maddelerin etkisi sonucunda DNA'da oluşan tahribat kromozomları sayı ve yapı bakımından etkilemektedir. Kromozomlarda meydana gelen bu değişimler kromozom anormallikleri olarak tanımlanmaktadır. Kromozomların yapısal olarak meydana gelen anormallikler kromatid ve kromozom kırığı, disentrik ve halka kromozom, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, inversiyon, izokromozom ve translokasyondur. Aneuploidi ve poliploidi ise sayısal anormalliklerdir. Kromozomlarda meydana gelen bu anormallikler genotoksik maddenin çeşitine ve hücre bölünmesini etkilediği evreye göre değişmektedir. Anormallik hücre bölünmesinin G1, S ve G2 safhalarının herhangi birinde oluşabilmektedir. Bu evrelerde oluşan kırıklar kromozom ve kromatid kırıkları olarak ikiye ayrılmaktadır. Genotoksik maddenin, mitozun G0 ve G1 evresinde etkili olması ile kromozom kırıkları oluşurken; kromatid kırıkları S ve G2 evresinde etkili olması ile oluşmaktadır. G1 safhasında sadece bir kromatidde oluşan kırık S safhasında da devam ederse, metafaz sonrasında iki kromatid de kırık görülerek kromozom kırığı oluşumuna neden olur. Meydana gelen bu kırıkta tekrar birleşme olmazsa asentrik fragment ve delesyonlu

kromozom oluşumu gözlenir. Oluşan bu fragmentler metafaz evresinde kaybolmaz ise anafaz evresinde mikronükleusların meydana getirir [67,78-82].

Kromozom anormallikleri testi ile hücrede meydana gelen sitogenetik tahribat kısa sürede belirlenebilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen bu test yöntemi fiziksel ve kimyasal maddelerin genotoksisitesi belirlemede en sık kullanılan yöntemdir. Bu test yönteminde genetik materyalde oluşan tahribat büyük ölçüde incelenebilmekte ve genomdaki tahribatın derecesi saptanabilmektedir. Anormallik sayısı ile kanser oluşumu karşılaştırılabilmekte ve genotoksik maddenin kanser riski belirlenebilmektedir [57,69,70,83].

Kromozom anormallikleri testinde meydana gelen anormalliklerin belirlenmesi için genellikle periferik lenfositler kullanılmaktadır. *In vitro* uygulamalarında kullanılan bu hücreler, kromozomlarda kendiliğinden oluşan hasar oranının düşük olması ve primer hücre olmaları tercih edilmektedir. Kromozom anormallikleri testinin kanser riski belirlemede önemli ve güvenilir sonuçlar vermesi avantajları arasında sayılmaktadır. Ancak oluşan kromozom anormalliklerinin tespit edilme sürecinin yavaş ve güç olması dezavantaj olarak görülmektedir [73,84,126].

2.7. Tatlandırıcılar ve Diğer Gıda Katkı Maddeleri ile Yapılmış Bazı Genotoksisite Çalışmaları

Bu çalışmada genotoksik etkileri değerlendirilen Mannitol ve Laktitol'ün genotoksisitesinin incelendiği bazı çalışmalar mevcuttur.

Laktitol'ün genotoksik etkisini belirlemek amacıyla comet testi uygulanmış ve izole edilmiş lenfositler 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlarla 1 saat muamele edilmiştir. Laktitol'ün DNA hasarına neden olmadığı gözlenmiştir. Ek olarak aynı konsantrasyonların BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine 24 saat muamelesi sonucu MTT testinde sitotoksik etki göstermediği kaydedilmiştir [85]. Yine laktitol ile gerçekleştirilmiş başka bir genotoksisite çalışmasında Çin hamster akciğer hücreleri ve fare polikromatik eritrosit hücreleri kullanılarak mikronükleus testi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda Laktitol'ün mutajenik ve genotoksik etki göstermediği

görülmüştür [86]. Benzer şekilde 1983 yılında JECFA Laktitol'ün *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında mutajenik olmadığını belirtmiştir [87].

Mannitol'ün insan periferik lenfositlerine 72 saat boyunca 2×10^5 ve 3×10^5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları ile uygulanmış ve KKD oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir [88]. JECFA (1986) Mannitol için aşağıdaki testleri uygulamıştır:

1. *Salmonella typhimurium* G46 TA1530 ve *Saccharomyces cerevisiae* D3 suşu kullanılarak yapılan fare konak aracılı test
2. Rat kemik iliği ve insan W1-38 hücrelerinde sitogenetik bir test (test adı, içeriği ve detayları raporda paylaşılmamıştır)
3. *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları ile Ames testi
4. Ratlarda dominant letal test

Mannitol için uygulanan bu testlerin herhangi birinde mutajenik etki gözlenmemiştir [89].

Laktitol ve Mannitol ile gerçekleştirilmiş başka bir genotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Ancak farklı tatlandırıcıların genotoksik potansiyellerinin araştırıldığı araştırmalar mevcuttur.

Doğal bir tatlandırıcı olan Steviosid ile 50 mg/petri dozunda *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak Ames testi uygulanmış ve sonucunda steviosidin mutajenik etki gösterdiği görülmüştür [90]. Bir tatlandırıcı olan eritritolün genotoksik etkisi erkek ICR fare kemik iliği hücreleri kullanılarak 1250, 2500 ve 5000 mg/kg konsantrasyonlarında *in vivo* mikronukleus testi ile incelenmiş ve mutajenik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır [91]. Yapay tatlandırıcı olan sorbitol, sakarin, aspartam ve Asesülfam-K'nın genotoksisiteleri comet testi ile incelenmiştir. Dört tatlandırıcı da insan periferik lenfosit hücrelerine 1,25; 2,5 ve 5 ppm konsantrasyonları ile üç saat uygulanmış ve tüm tatlandırıcıların comet kuyruk yoğunluğu ve momentini artırdığı saptanmıştır [92]. Dragsted ve ark. (2002)'nin sukrozile yaptıkları çalışmada, Fischer cinsi ratlar (Big Blue Rats) kullanılmıştır. 21 gün süresince ratların diyetlerine %6.9, %13.8 ve %34.5'lik sukroz ilave edilmiş ve çalışılan dozların kolon mukoza hücrelerinde yüksek mutasyon oluşturduğu ve sukrozun genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [93]. Bir şeker alkolü olan maltitolün genotoksik etkisinin araştırılması amacıyla insan periferik lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik, mikronukleus ve kardeş kromatit değişimi testleri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyon ve

sürelerde mikronükleus oluşumunun oransal olarak önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. KA değerini anlamlı olmamakla birlikte indüklediği, KKD değerinde ise herhangi bir genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir [94]. Johannes ve ark. (1992), şeker alkolü olan ve daha çok diyabetik hastaların tercih ettiği sorbitolün genotoksik etkisini incelemişlerdir. 0.9 M sorbitolün Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücrelerinde kromozomal anormallikleri artırdığını göstermişlerdir [95].

Tatlandırıcı olan sükrozun 35 g/L ve 70 g/L'lik konsantrasyonları 24 ve 48 saat süresince *A.cepa* kök ucu hücrelerine uygulanması sonucunda kontrole oranla anlamlı sonuçları saptanmıştır [96]. Durnev ve ark. (1995)'nin siklamat ile yaptıkları çalışmada C57Bl/6 farelerine 5 gün boyunca oral yolla günlük 11 ve 110 mg/kg konsantrasyonlarda siklamat verilmiş ve kromozom anormalliklerinin indüklenmediği rapor edilmiştir [97]. Takayama ve ark. (2000), sodyum siklamatın genotoksik etkisini maymunlar üzerinde çalışmışlardır. Doğumdan sonra diyetlerine günde 100-500 mg/kg sodyum siklamat eklenen maymunların bazılarında kolon kanserinin metastazı ile karaciğer ve prostat kanserlerinin oluşum gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak sodyum siklamatın, direkt kanser oluşumu ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir [98]. Mukherjee ve Chakrabarti (1997) asesülfam-K'nın genotoksik etkisini fare kemik iliği hücrelerinde 15, 30, 60, 450, 1500, 2250 mg/kg konsantrasyonları kullanarak değerlendirmişler ve söz konusu maddenin klastojeniteyeneden olduğunu açıklamışlardır [99]. Erkek Fischer 344 sıçanlarının içme sularına 28 gün süresince her gün %0.01 ve %0.05 oranlarında sodyum siklamat maddesi ilave edilmiş ve deney hayvanlarının idrar keselerinde neoplastik gelişime neden olmadığı bildirilmiştir [100].

Sasaki ve ark. (2002), sukraloz'un genotoksik etkisini araştırmak amacıyla farelerin 8 farklı organı (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile comet testi uygulamışlardır. 100, 1000 ve 2000 mg/kg konsantrasyonlarında 24 saat, 2000 mg/kg konsantrasyonunda 3 saat etkileşimi sonucunda farelerde gastrointestinal sistemlerinde DNA tahribatının oluştuğunu belirtmişlerdir [101].

Stevia bitki özütü fare ve insan hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Farelere bir ay süresince günde iki kez 500 mg/g özüt verilerek polikromatik eritrositlerde MN testi ve bir hafta süresince günde üç kez 750 mg/g özüt verilerek de fare primer spermatositlerinin analizi yapılmış, DNA hasarına neden olmadığı görülmüştür. Ayrıca insan lenfosit ve fare kemik iliği hücrelerinde yapılan kromozom anormallik testi sonucunda da genotoksik etkili

olmadığı saptanmıştır [102]. MS/Ae fareleri ile yapılan mikronükleus testinde 25, 250, 500 ve 1000 mg/kg steviol verilen deney hayvanlarından alınan kemik iliği eritrositlerinde genotoksik etki görülmediğibildirilmiştir [103]. Yapılmış başka bir araştırmada *Stevia rebaudiana* Bertoni yapraklarının etanolik ekstraktının genotoksitesisi Ames testi, fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi ve fare sperm malformasyon testi uygulanarak incelenmiştir. %1.04, %2.08 ve %3.12'lik ekstrakt oral olarak 90 gün süresince uygulanmış, tüm test sonuçlarında ratlarda toksik etkiye rastlanılmamıştır. Uygulama sonucunda hayvanlarda klinik, histopatolojik, hematolojik ve davranışsal değişiklik görülmediği belirtilmiştir [104]. Stevia için yapılmış diğer çalışmalarda *S. typhimurium* suşu TA98 kullanılmış, 50 mg/petri doz uygulaması yapılmış ve genotoksik etkiye neden olduğu saptanmıştır [105]. Yine *Salmonella typhimurium*'un TM677 suşu ile yapılan ileri mutasyon testinde pozitif sonuç vermiştir [106].

Yapay tatlandırıcı olan sakkarinin Çin hamster kemik iliğinde yapılan genotoksik çalışmada, KKD değerini arttırdığı görülmüştür. Yine sakkarin için yapılan diğer bir araştırmada *S.cerevisiae*'da rekombinasyona neden olduğu belirtilmiştir [108]. Sakkarin, sorbitol ve aspartamin 1,25; 2,5; 5 ppm lik konsantrasyonları insan periferel lenfositleri ile 1 saat muamele edilerek genotoksik etkisi comet testi ile incelenmiş vesöz konusu üç katkı maddesinin DNA hasarına neden olduğu görülmüştür [107]. %30 sukroz, %30 glikoz ve %30 fruktoz şeker konsantrasyonlarının genotoksik etkisini incelenmek amacıyla comet testi uygulanmıştır. 35 gün süresince ratlara verilen söz konusu maddelerin genotoksik etkili olmadığı görülmüştür [109].

3.MATERYAL METOT

3.1.Materyal

Bu araştırmada gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan Mannitol (Applichem CAS No: 69-65-8)ve Laktitol'ün (Sigma-Aldirich CAS No: 81025-04-9) ticari olarak satın alınmış hazır formları kullanılmıştır. Her iki madde beyaz kristal toz halinde ve suda çözüdür yapıdadır. Mannitol ve Laktitol'ün genotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için kültüre edilmiş insan periferel lenfosit hücreleri kullanılarak mikronükleus (MN) ve kromozomal anormallik (KA) testi uygulanmıştır. Bunun için kan, herhangi bir sağlık problemi bulunmayan, alkol, sigara, ilaç kullanmayan, 23-27 yaş arası bireylerden alınmıştır. Çalışma, Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınan (11.06.2020 tarih ve 42 nolu karar) izin ile gerçekteştirilmiştir.

3.1.1. Test Materyalleri

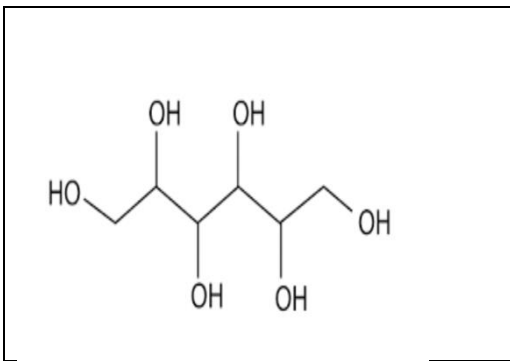
Mannitol

Kimyasal adlandırması: D-Mannitol

Molekül ağırlığı: 182,17 g/mol

Molekül formülü: C₆H₁₄O₆

Yapısal formülü: Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Mannitolün yapısal formülü [96].

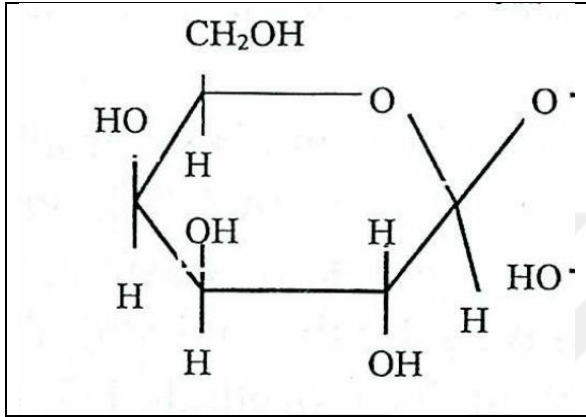
Laktitol

Kimyasal adlandırması: 4-O-β-D-Galaktopiranozil-D-glusitol

Molekül ağırlığı: 344,32 g/mol

Molekül formülü: C₁₂H₂₄O₁₁

Yapısal formülü: Şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3. 2. Laktitolün yapısal formülü [97].

3.2. Metot

3.2.1 Çalışmada Kullanılacak Konsantrasyonların Belirlenmesi

Laktitol ve Mannitol'ün literatürlerde belirtilen rat LD50 dozları referans noktası alınarak çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi için ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Buna göre, kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla ilk olarak Laktitol için 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/mL'lik, Mannitol için 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 µg/mL'lik konsantrasyonlar çalışılmıştır. Söz konusu denemelerin sonuçlarına göre Laktitol için çalışmada 4000, 2000, 1000, 500 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarının kullanılması uygun görünmüştür. Mannitol için ise 2000, 1000 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlar çalışma için uygunluk göstermiştir ancak daha yüksek konsantrasyonların da etkilerini değerlendirmek açısından yeni bir deneme

daha yapılmış ve Mannitol'ün 8000 ve 4000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları da çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.2. Kromozomal Anormallik (KA) Testi

Çalışmada kullanılan kromozomal anormallik (KA) testi Evans'ın metodunda birtakım değişiklikler yapılarak uygulanmıştır [114]. Daha önce özellikleri belirtilen donörlerden alınan kan örnekleri içerisinde LymphoPlus besiyeri bulunan tüplere ekilmiştir. Mannitol için 500, 1000, 2000, 4000 ve 8000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik, Laktitol için 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar lenfositlere 24 ve 48 saat uygulanmıştır. İçerisinde besiyeri bulunan tüplere 1/10 oranında heparinize edilen periferik kan örneklerinden 0,2 mL ekilmiştir. Daha sonra 37°C de ki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür ortamına, kültürlerin 24 ve 48 saat sonra Mannitol ve Laktitol maddelerinden belirlenen konsantrasyonları ilave edilmiştir. Bu aşamada kontrol (distile su) ve pozitif kontrol (0,20 $\mu\text{g/mL}$ mitomisin-C) çalışmaya dâhil edilmiştir. Kültürün 70. saatinde her bir tüpe 0,06 $\mu\text{g/mL}$ kolkisin çözeltisi eklenmiştir.

72. saat bitiminde kültür sonlanması yapılmıştır. Tüpler 1200 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılması sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda tüp dibinde kalan kısma 0,075 M KCl çözeltisi 5 mL damla damla ilave edilmiş ve homojen bir şekilde dağılması için vortekslenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmış, inkübe süresi sonunda tekrar santrifüj edilmiş, kalan süpernatant kısmı atılmıştır. Ardından kültür tüplerinin her birine daha önceden hazırlanmış ve buzdolabında soğutulmuş 3:1 metanol:asetik asit karışımından ilave edilmiştir. Bu işlem sonrasında tüpler 45 dk +4°C 'de bekletilip, fiksasyon işlemi iki kere daha tekrarlanmış, süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Homojenize edilmiş hücre süspansiyonu daha sonra; saf su ile yıkanarak temizlenmiş ve -20 °C 'de bekletilmiş lamalar üzerine damlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında 24 °C 'de kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar daha sonra Giemsa boyasında (%5, pH=6,8) 25 dakika boyanmıştır. Bu işlemden sonra preparatlarda bulunan fazla boya saf sudan geçirilerek yıkanmıştır. Yıkama aşaması tamamlanan preparatlar kuruduktan sonra entellan ile daimi hale getirilmiş, mikroskop incelemesi için hazırlanmıştır.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozomal anormallik (KA) tespit edilmesinde, çalışılan konsantrasyonlar için 600 metafaz (her donör için 200'er metafaz) incelemesi yapılmıştır. Metafaz evresinde hücre seçimi yapılırken dağılımın homojen olması ve sayımı yapılan kromozomların her birinin net olmasına dikkat edilmiştir. İnceleme yapılan toplam hücre içinde anormal hücrelerin yüzdesi belirlenmiş, hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı hesaplanmıştır. Mitotik indeksin (Mİ) tespitinde ise; her konsantrasyon için 2000'er hücre (toplam 6000 hücre) incelemesi yapılmıştır. Mitotik indeks metafaz evresinde bulunan hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanıp belirlenmiştir.

3.2.3. Mikronükleus Testi

Mikronükleus (MN) testinin uygulamasında Fenech (2007)'in metodu bir takım değişiklikler yapılarak kullanılmıştır [19]. Donörlerden alınan 1/10 oranında heparinli periferik kandan 0,2 mL'si, içerisinde 2,5 mL besiyeri ortamı bulunan (LymphoPlus) tüplere ilave edilmiş ve 37 °C 'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmamızda kullanılacak olan gıda katkı maddeleri konsantrasyonları laboratuvar koşullarında yapılan ön çalışmalara göre belirlenmiştir. Mannitol için 500, 1000, 2000, 4000 ve 8000 µg/mL'lik, Laktitol için 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL 'lik konsantrasyonları lenfositlere 48 saat uygulanmıştır. Her iki madde için bir pozitif kontrol (Mitomisin C; MMC) ve kontrol (distile su) grubu bulundurulmuştur. Sitokinezi engellemek için tüm kültürler inkübasyonun 44. saatinde Sitokalasin-B (5,2 µg/mL) ilave edilmiştir. 72 saat sonunda kültür sonlandırılmıştır. Her bir tüp 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atımı sağlanmıştır. Geriye kalan kısma 0,075 M KCL çözeltisinden 5 mL yavaş yavaş eklenerek vortekslenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 5 dakika +4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra tüpler tekrar santrifüj işlemine tabi tutulup, süpernatant atımı sağlanmıştır. Bu işlemden sonra her bir tüpe 5 mL, 3:1 metanol: asetik asit karışımı ilave edilmiş, daha sonra tüpler 15 dakika +4 °C'de bekletilmiştir. Fiksatif işlemi 2 defa daha tekrar edilmiş ve son fikstatife formaldehit eklenerek santrifüj edilmiştir. Son kez yapılan santrifüj işlemi sonrasında geriye kalan süpernatant atılmış ve pipetaj işlemi ile kalan hücreler homojen hale getirilmiştir. Homojenize olan hücre süspansiyonu buzdolabında bekletilmiş lamalar üzerine pipet ile yayılmıştır. Preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi (NBİ)'nin belirlenebilmesi için preparatlar %5'lik Giemsa tampon eriğinde (pH 6.8) 15-20 dk bekletilmiş, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar, daimi hale getirmek amacıyla entellan ile kapatılmış,

mikroskop ile incelemek için hazırlanmıştır. Nükleer bölünme indeksi belirlemek amacıyla her bir konsantrasyonda her donörden 1000 adet olmak üzere toplam 3000 adet, mikronükleus frekansını belirlenirken her bir konsantrasyonda her donörden 2000 adet olmak üzere preparatlardan toplamda 6000 adet hücre değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde tespit edilmiş, “n incelenen toplam hücre sayısı” olarak alınıp, $[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N)+4x(4N)]/n$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır [99].

3.2.4. İstatistiksel analizler

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen hücre başına düşen kromozom anormalliği, anormal hücre frekansı, mikronükleus frekansı, mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi sonuçları z-testi ile analiz edilmiş ve değerlendirme yapılmıştır. Araştırmamızda KA/ Hücre sayısı, anormal hücre sıklığı, MN/ Hücre sayısı, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksinin konsantrasyona bağlı etkileri regresyon analizi ile incelenmiştir.

4.BULGULAR

4.1.Mannitol Uygulaması

4.1.1.Kromozom Anormallik (KA) Test Bulguları

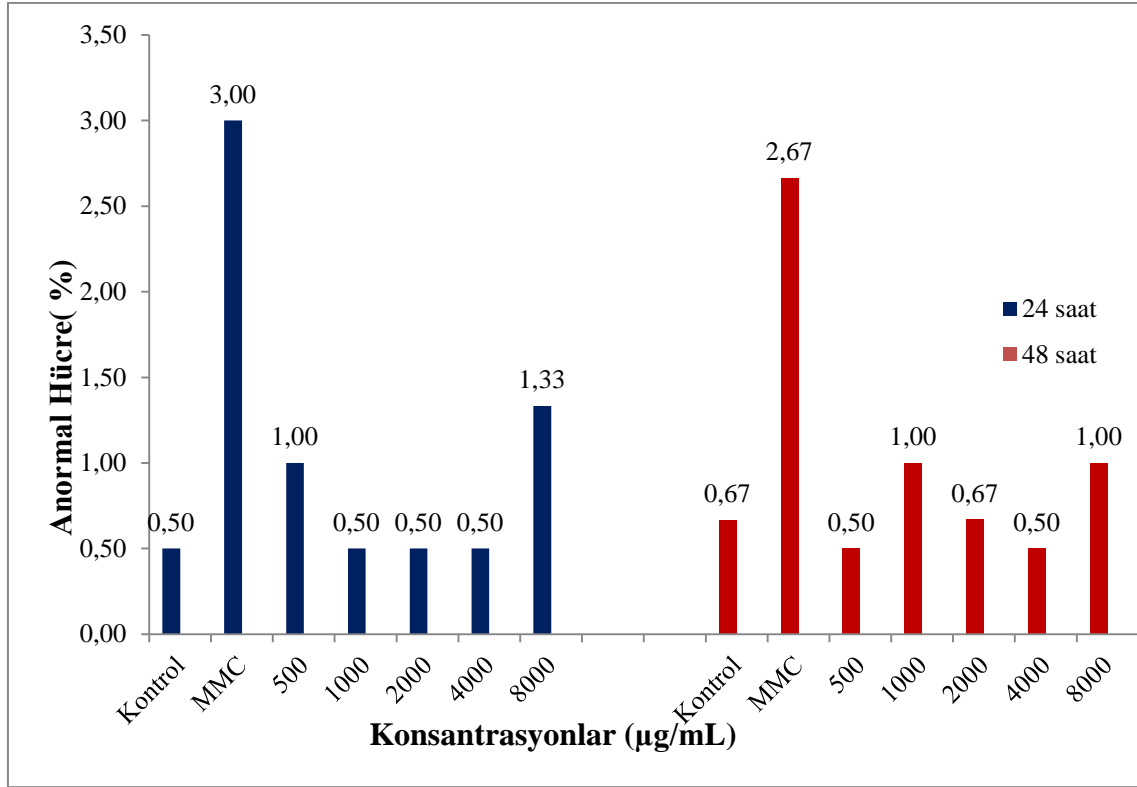
Mannitol'ün kültüre edilmiş insan lenfosit hücrelerinde 24 ve 48 saat uygulanmasındakarşılaşılan anormallikler görülme sıklığına göre sırasıyla kardeş kromatidlerde birleşme (%71,25), kromatit kırığı (%16,25), kromozom kırığı (%8,75), fragment (%2,50) ve poliploidi (%1,25)'dir(Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. de görüldüğü üzere lenfositlere 24 ve 48 saatlik mannitol muamelesi, kullanılan hiçbir konsantrasyonda, hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansını ve anormal hücre yüzdesini anlamlı oranda etkilememiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve 4.2)

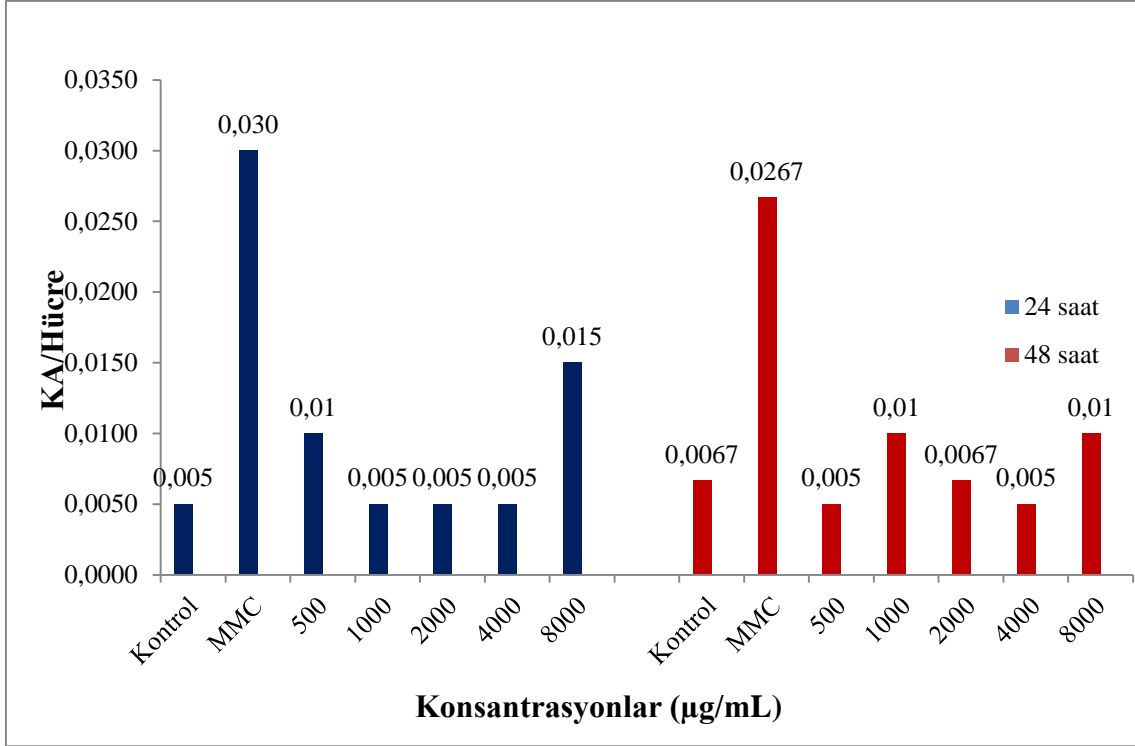
Çizelge 4. 1 .Mannitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu kromozomanormallikleri

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							KA	
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	yapısal				sayısal			Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			ktk	kzk	kkb	ktd	ds	f	p		
Kontrol	24	0	-	-	3	-	-	-	-	0,50 ±0,29	0,05 ± 0,0029
MMC	24	0,2	6	2	8	1	1	-	-	3,00±0,70	0,03 ± 0,0070
Mannitol	24	500	-	-	5	-	-	1	-	1,00 ±0,41	0,01 ± 0,0041
		1000	-	-	3	-	-	-	-	0,50 ±0,29	0,005±0,0029
		2000	-	-	2	-	-	-	1	0,50 ±0,29	0,005±0,0029
		4000	-	-	3	-	-	-	-	0,50 ±0,29	0,005±0,0029
		8000	1	1	7	-	-	-	-	1,33± 0,47	0,015±0,0050
Kontrol	48	0	1	-	3	-	-	-	-	0,67 ±0,33	0,0067±0,0033
MMC	48	0,2	4	-	7	5	-	-	-	2,67± 0,66	0,0267±0,0066
Mannitol	48	500	-	-	3	-	-	-	-	0,5 ± 0,29	0,0050±0,0099
		1000	1	1	4	-	-	-	-	1,00 ±0,41	0,0100±0,0041
		2000	-	1	3	-	-	-	-	0,67 ±0,33	0,0067±0,0030
		4000	-	-	2	-	-	1	-	0,5 ± 0,29	0,0050±0,0020
		8000	-	2	4	-	-	-	-	1,00 ±0,41	0,0100±0,0041
Kromozom anormallik yüzdesi			16,25	8,75	71,25	0,00	0,00	2,5	1,25		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, ktd: kromatit değişimi, f:fragment, p:poliploidi



Şekil4 .1. Mannitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu anormal hücre yüzdesi frekansı



Şekil4. 2. Mannitol'ün insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik frekansı

Mannitol 24 ve 48 saatlik uygulamalarının her ikisinde de mitotik indeksi en yüksek üç konsantrasyonda, konsantrasyona bağlı (24 saat $r = -0,97$ ve 48 saat $r = -0,96$) anlamlı olarak düşürmüştür (Çizelge 4.2, Şekil 4.3).

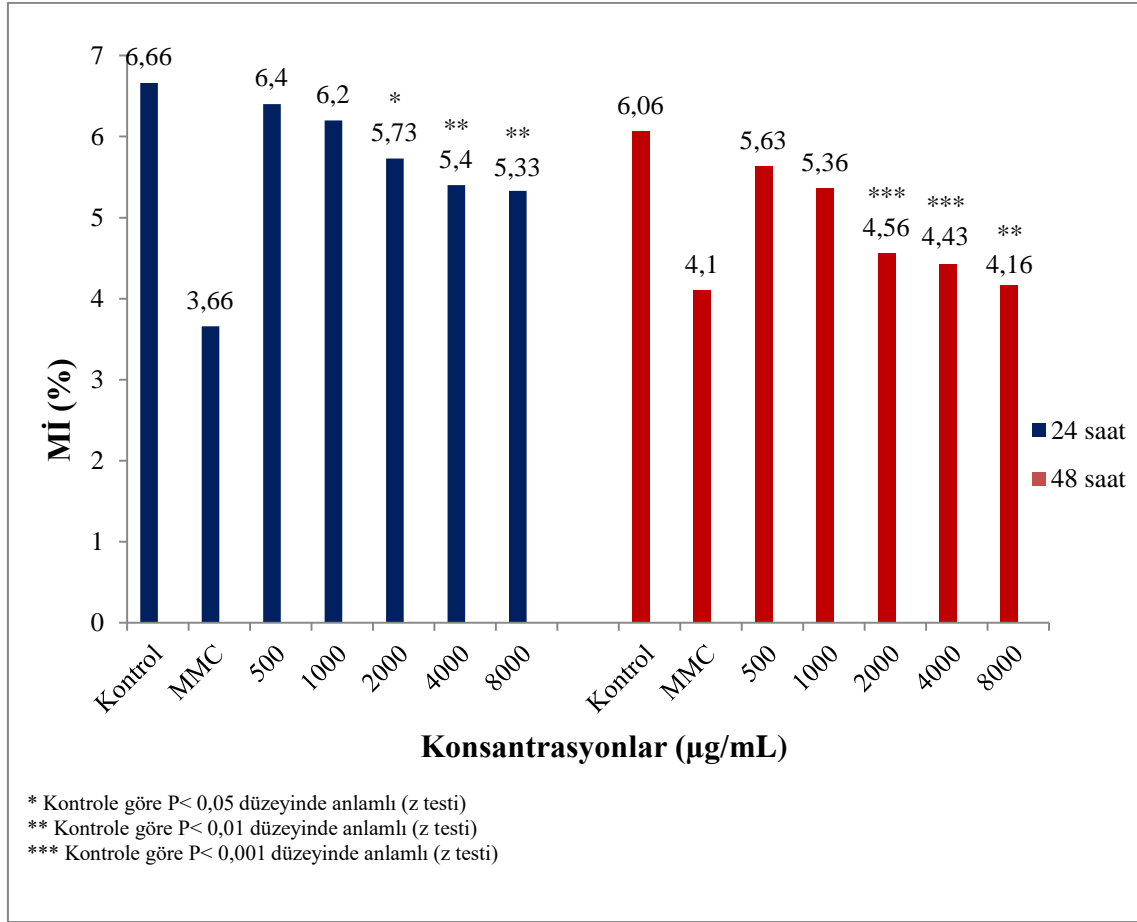
Çizelge 4. 2.Mannitoluygulaması sonucu lenfositlerde görülen mitotik indeks değerleri

Test maddesi	Uygulama		Mİ
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Mİ±SH %
Kontrol	24	0	6,66 ± 0,32
MMC	24	0,2	3,66 ± 0,24
Mannitol	24	500	6,40± 0,32
		1000	6,20 ± 0,31
		2000	5,73 ± 0,30*
		4000	5,40 ± 0,29**
		8000	5,33 ± 0,29**
Kontrol	48	0	6,06 ± 0,31
MMC	48	0,2	4,10 ± 0,26
Mannitol	48	500	5,63± 0,30
		1000	5,36 ± 0,29
		2000	4,56 ± 0,27***
		4000	4,43 ± 0,27***
		8000	4,16 ± 0,26***

* Kontrolle göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrolle göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

*** Kontrolle göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



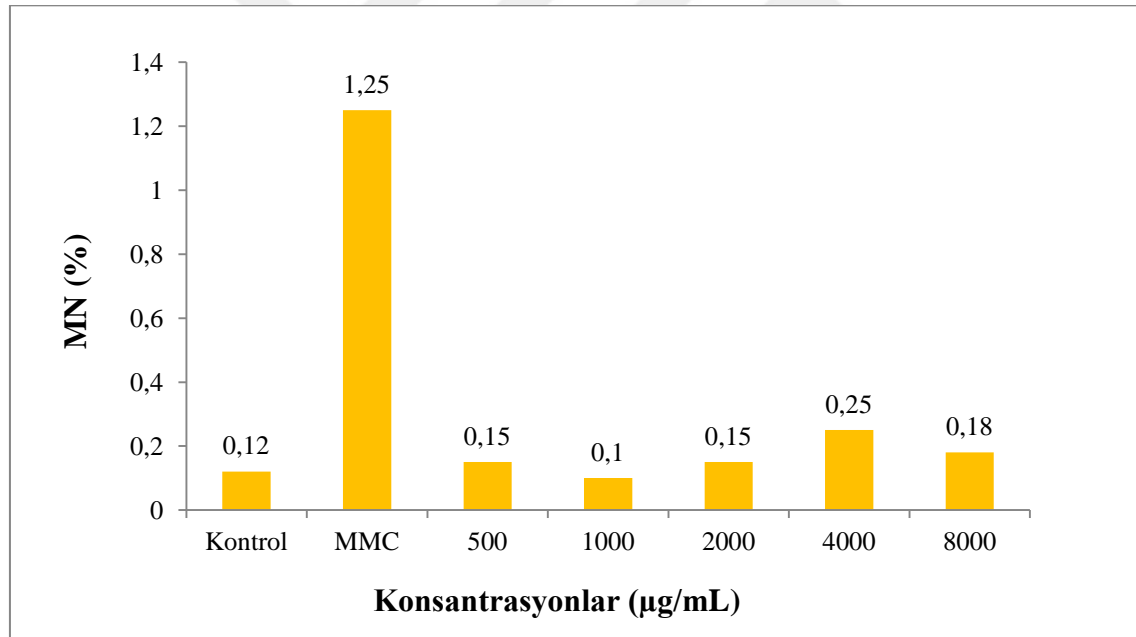
Şekil4.3. Mannitol uygulaması sonucu lenfositlerde görülen mitotik indeks değerleri

4.1.2. Mikronükleus (MN) Testi Bulguları

Mannitol ile insan lenfositlerinde 48 saat muamele sonucu elde edilen veriler istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Buna göre Mannitol, mikronükleus frekansında ve nükleer bölünme indeksi değerlerinde kontrole göre önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır (Çizelge4.3).

Çizelge 4. 3.Mannitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat (BN) hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)		
	Kontrol	48	0,00	6000	7	-	-	0,12 ± 0,04
MMC	48	0,20	6000	65	5	-	1,25 ± 0,14	1,30 ± 0,21
Mannitol	48	500	6000	9	-	-	0,15 ± 0,05	1,41 ± 0,22
		1000	6000	6	-	-	0,10 ± 0,04	1,42 ± 0,22
		2000	6000	7	1	-	0,15 ± 0,05	1,39 ± 0,21
		4000	6000	9	-	2	0,25 ± 0,06	1,30 ± 0,21
		8000	6000	9	1	-	0,18 ± 0,05	1,27 ± 0,20



Şekil4. 4. Mannitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları

4.2.Laktitol Uygulaması

4.2.1.Kromozom Anormallik (KA) Testi

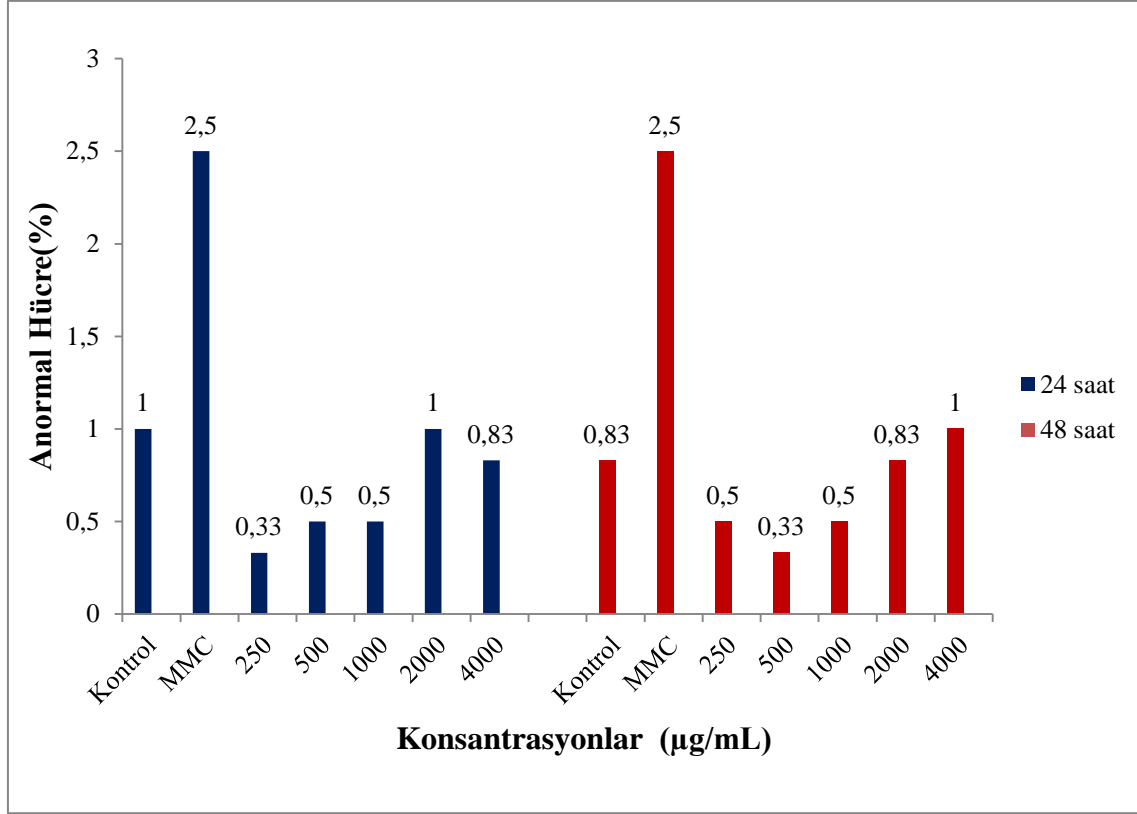
Laktitol'un kùltùre edilmiş insan lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanması ile karşılaşılan anormalliklerin gùrùlme sıklığı sırasıyla kardeş kromatidlerde birleşme (%81,94), kromatid kırığı (%8,34), kromozom kırığı (%6,94), kromatit değişimi (%1,39), disentrik kromozomlar (%1,39)'dır (Çizelge 4.4, Şekil 4.5 ve 4.6).

Laktitol uygulamasının insan periferal lenfositlerinde anormal hùcre yùzdesi ve hùcre başına dùřen anormallik sayısında tùm uygulama sùrelerinde ve konsantrasyonlarında kontrole gùre önemli bir değişikliğe neden olmadığı gùrùlmüřtür.

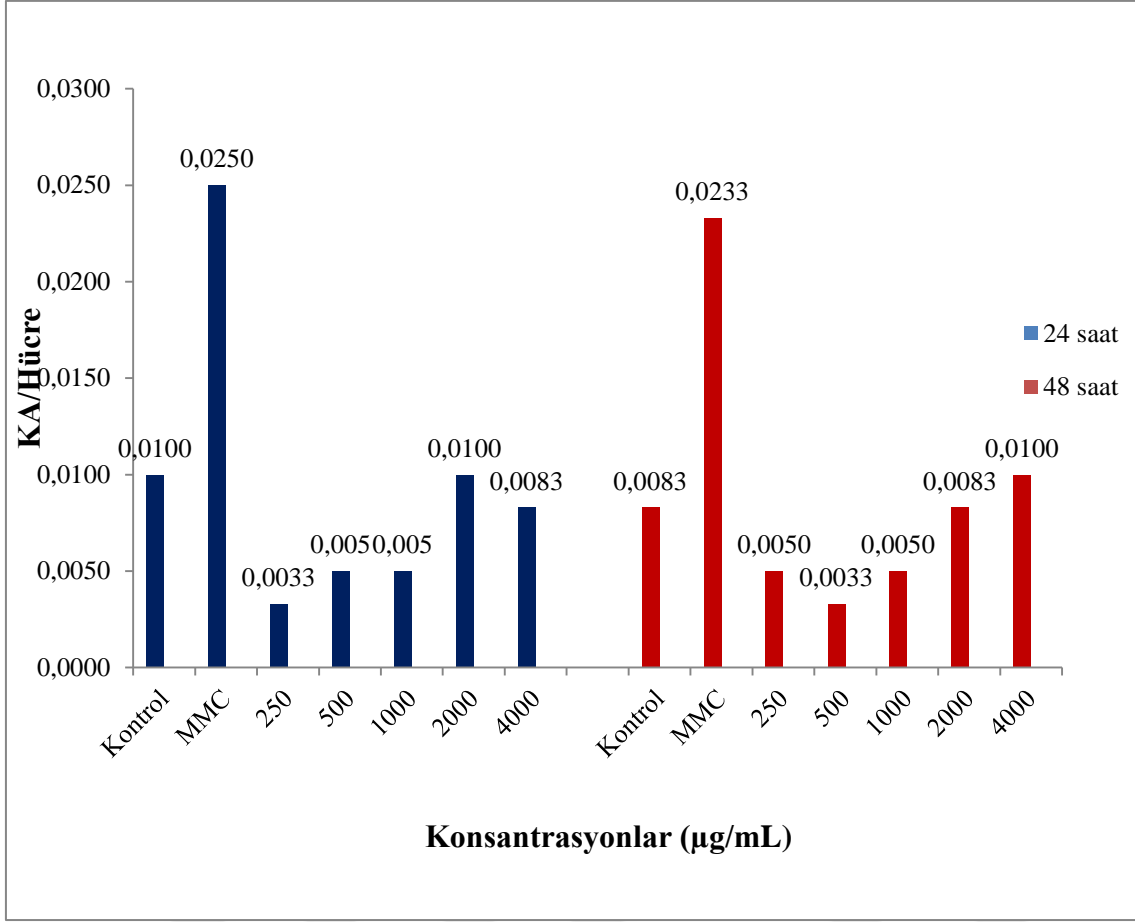
Çizelge 4. 4. Laktitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler					KA	
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	yapısal					Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			ktk	kzk	kkb	ktd	ds		
Kontrol	24	0	-	-	6	-	-	1,00 ± 0,41	0,0100 ± 0,0041
MMC	24	0,2	3	1	7	3	1	2,50 ± 0,64	0,0250 ± 0,0064
Laktitol	24	250	-	-	2	-	-	0,33 ± 0,24	0,0033 ± 0,0024
		500	-	-	3	-	-	0,50 ± 0,29	0,0050 ± 0,0029
		1000	-	-	3	-	-	0,50 ± 0,29	0,0050 ± 0,0029
		2000	1	-	5	-	-	1,00 ± 0,41	0,0100 ± 0,0041
		4000	-	1	4	-	-	0,83 ± 0,37	0,0083 ± 0,0037
Kontrol	48	0	-	-	4	1	-	0,83 ± 0,37	0,0083 ± 0,0037
MMC	48	0,2	1	2	9	2	-	2,33 ± 0,62	0,0233 ± 0,0062
Laktitol	48	250	-	-	3	-	-	0,50 ± 0,29	0,0050 ± 0,0029
		500	-	-	2	-	-	0,33 ± 0,24	0,0033 ± 0,0024
		1000	1	-	2	-	-	0,50 ± 0,29	0,0050 ± 0,0029
		2000	-	-	4	-	1	0,83 ± 0,37	0,0083 ± 0,0037
		4000	-	1	5	-	-	1,00 ± 0,41	0,0100 ± 0,0041
Kromozom anormallik yüzdesi			8,34	6,94	81,94	1,39	1,39		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, ktd: kromatit değişimi



Şekil4.5. Laktitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde anormal hücre yüzdesifrekansı



Şekil4.6. Laktitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik frekansları

Mitotik indeks değerlerinde insan lenfositlerinde Laktitol'ün 24 ve 48 saatlik uygulamalarında 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL 'lik konsantrasyonlarda kontrole oranla, konsantrasyona bağlı anlamlı düşüş (24 saat için $r = -0,96$, 48 saat için $r = -0,95$) gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

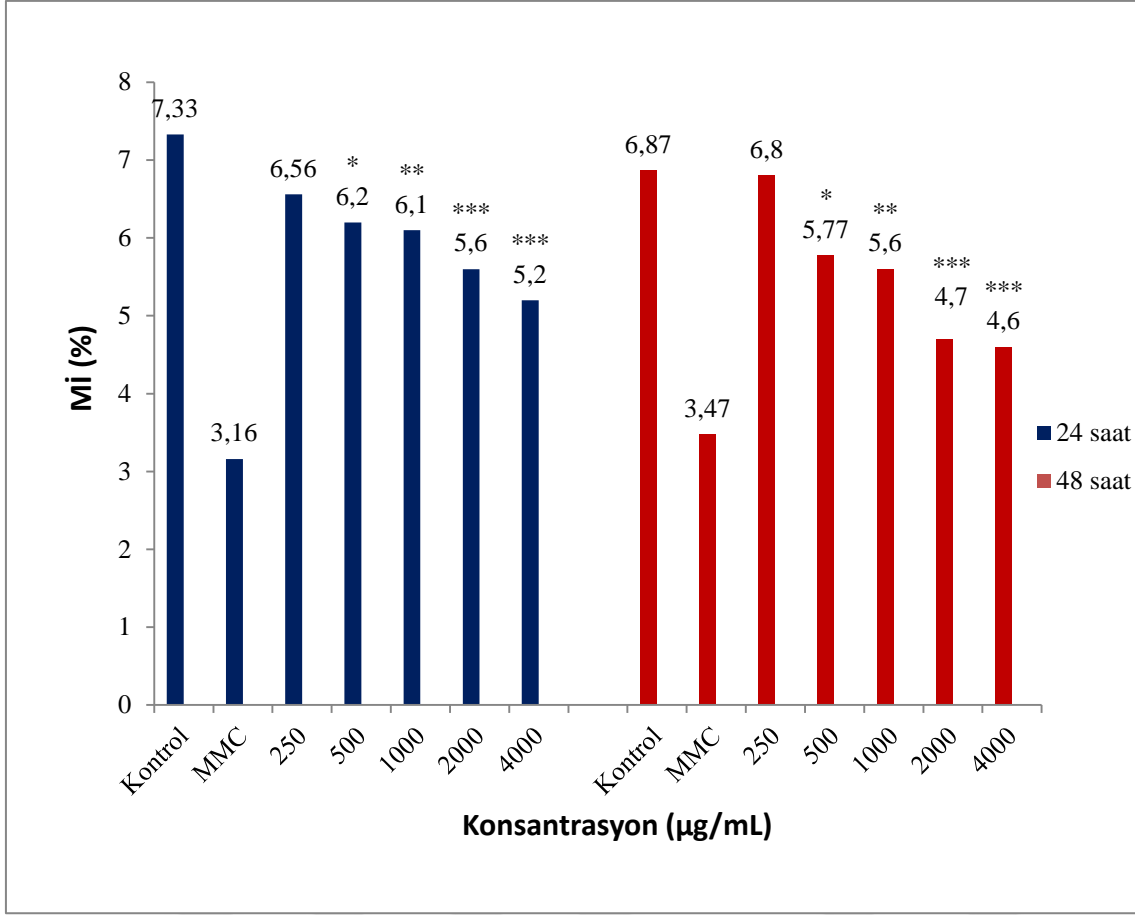
Çizelge 4. 5.Laktitol'ün insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri

Test maddesi	Uygulama		Mİ
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	
Kontrol	24	0	7,33 ± 0,34
MMC	24	0,2	3,16 ± 0,23
Laktitol	24	250	6,56 ± 0,32
		500	6,20 ± 0,31*
		1000	6,10 ± 0,31**
		2000	5,60 ± 0,30***
		4000	5,20 ± 0,29***
Kontrol	48	0	6,87 ± 0,33
MMC	48	0,2	3,47 ± 0,24
Laktitol	48	250	6,80 ± 0,33
		500	5,77 ± 0,30*
		1000	5,60 ± 0,30**
		2000	4,70 ± 0,27***
		4000	4,60 ± 0,27***

* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

*** Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil4.7. Laktitol'ün insan periferel lenfositlerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri

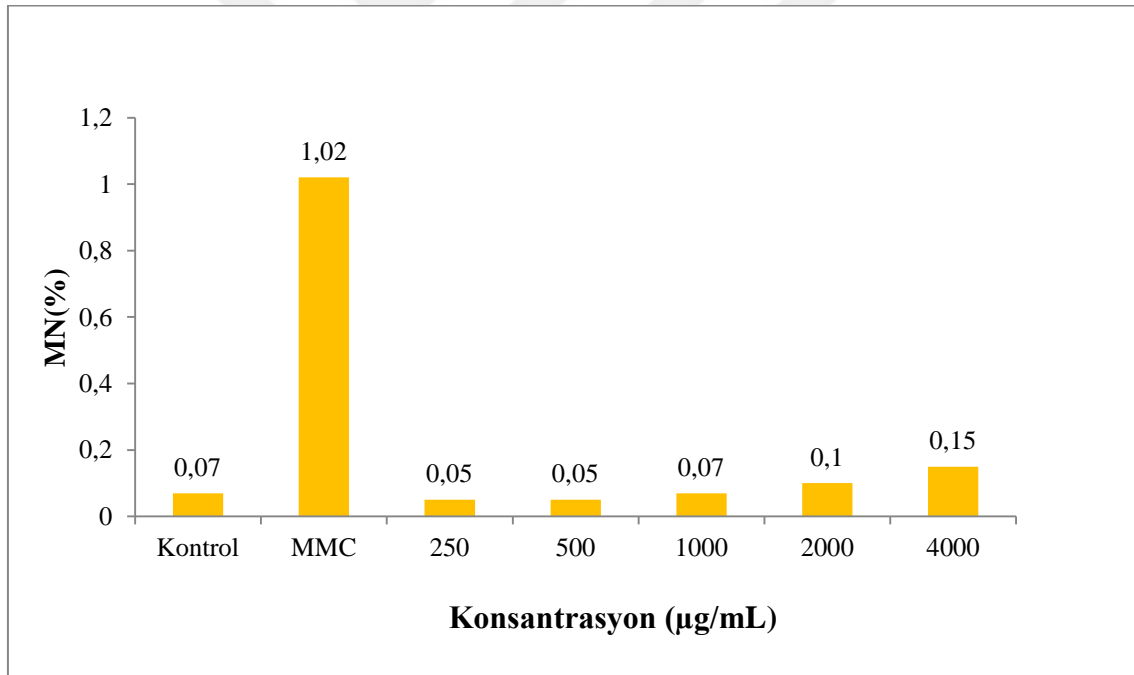
4.2.2. Mikronükleus (MN) Testi

Laktitol ile insan lenfositlerinde 48 saat muamele sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Buna göre Laktitol'ün mikronükleus frekansında ve nükleer bölünme indeksi değerlerinde kontrole göre önemli bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.8).

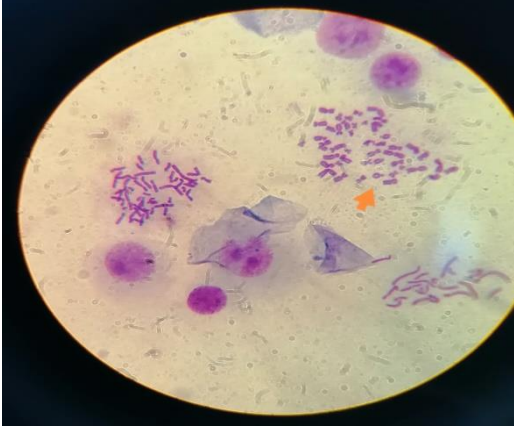
Çizelge 4 6. Laktitol'ün insanperiferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat (BN) hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)		
	Kontrol	48	0,00	6000	4	-	-	0,07 ± 0,05
MMC	48	0,20	6000	51	5	-	1,02 ± 0,18	1,34 ± 0,21
Laktitol	48	250	6000	3	-	-	0,05 ± 0,04	1,52 ± 0,22
		500	6000	3	-	-	0,05 ± 0,04	1,58 ± 0,23
		1000	6000	4	-	-	0,07 ± 0,05	1,30 ± 0,21
		2000	6000	6	-	-	0,10 ± 0,04	1,35 ± 0,21
		4000	6000	6	-	1	0,15 ± 0,05	1,23 ± 0,20

SH: Standart hata



Şekil4. 8. Laktitol'ün insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları



Şekil4. 9. Uygulama sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri kardeş kromatidlerde birleşme



5.TARTIŞMA

Nüfusun hızlı artışı ile birlikte gıdaya duyulan ihtiyaç da artmıştır. Güncel gelişmeler gıda sanayinde zorunlu değişimleri ve gelişmeleri meydana getirmiştir. Dünya hızlı bir küreselleşme yaşamış, bunun sonucu olarak insanlar yeme içmede pratikliğe yönelmiştir. Bu yönelim hazırlama aşaması kolay ve pratik gıdaya olan talebi arttırmıştır. Bunun sonucu olarak gıdada hızlı bir sanayileşme başlamış, bu da gıdaya katılan katkı maddelerinin kullanımında artış meydana getirmiştir. Gıda katkı maddeleri gıdanın bozulmadan daha uzun süre saklanması, raf ömrünün uzatılması, lezzet ve görünümün tüketicinin dikkatini çekecek şekilde olması ve üretim maliyetinin azaltılması amacıyla gıdaya belli oranlarda katılan maddelerdir. Bu amaçla kullanılan ortalama altı bin katkı maddesinin varlığı bilinmektedir [35,115]. Tüketilen katkı maddelerinin artması ile birlikte sağlık üzerinde oluşturabileceği riskler her zaman soru işareti oluşturmuştur. Her ne kadar katkı maddelerinin kullanım miktarları sınırlandırılrsa da uzun süreli kullanımlarda sağlık üzerinde ne gibi olumsuzluklar oluşturacağı önemli bir araştırma konusudur. Bazı katkı maddelerinin üzerinde yapılan ve halen yapılmakta olan genotoksisite çalışmaları, bazı katkı maddelerinin olumsuz etki oluşturabileceğini göstermiştir. Diyabet, obezite, üreme ve kardiyovasküler, özellikle çocuklarda hiperaktivite ve alerji gibi hastalıklara neden olduğu yapılan araştırmalar sonucu bilinmektedir [115-117].

Kimyasal maddelerin hücre içerisinde bulunan genetik materyale zarar vererek mutasyona neden olması genotoksisite olarak adlandırılır. Genotoksik maddeler hem maruz kalan kişide hem de gelecek nesillerde genetik hasara neden olmaktadır. Kimyasal maddelerin neden olduğu bu mutasyonların tespiti amacıyla genotoksisite testleri kullanılmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen genotoksisite testleri gıda katkı maddeleri gibi birçok ajanın genotoksik etkilerini araştırmada kullanılan güvenli testlerdir. Mikronükleus ve kromozom anormallikleri testi genotoksisite tespitinde en sık kullanılan testlerdir [14-17,118].

Bu çalışmada, gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan mannitol ve laktitol maddelerinin *in vitro* genotoksik etkileri kromozom anormallikleri (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırılmıştır.

Sonuçta her iki tatlandırıcı gıda katkısının da kromozomal anormallikler ve mikronükleus oluşumunu indüklediği görülmüştür. Ek olarak nükleer bölünme indeksi değerlerinde de

yine her iki gıda katkı maddesi muamelesinde kontrole göre önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Mitotik indeks değerlerinde ise her iki madde için kontrole göre anlamlı düşüş gözlemlenmiştir.

Kromozom anormalliği testi, kromozomlarda meydana gelen yapı ve sayı değişikliğini tespit etmekte kullanılan genotoksisite testidir. Bu test araştırmaya konu olmuş maddenin olası karsinojenitesinde değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Kromozomal anormallik çevresel faktörlerden meydana geldiği gibi kendiliğinden de meydana gelebilen, genel olarak yapısal ve sayısal anormallikler olarak incelenmektedir. Sayısal anormallikler; normal süreçte olmayan, kromozomal ayrılmada sorun nedeniyle oluşan ve kromozom sayısında değişiklik meydana gelen anormalliklerdir. Genel olarak anöploidi, poliploidi gibi anormallikler görülmektedir. Bir diğer anormallik ise yapısal anormalliktir. Yapısal anormallik kromozomların kırılmasıyla ya da kırılarak normal olmayan bir şekilde yapışıp tekrar birleşmesi ile oluşan anormalliktir. Yapılan çalışmalar sonucunda en sık görülen yapısal anormallikler; kardeş kromatitlerde birleşme, kromatit kırığı, kromozom kırığı, kromatid değişimi ve fragment gibi anormalliklerdir. DNA'da oluşan kromozom anormalliklerin belirlenmesinde hücre döngüsünün G2 evresi hasar tespiti için büyük öneme sahiptir. Meydana gelen hasarın onarımı G2 fazında gerçekleşmektedir. Hücre döngüsünün G1, S, G2 evrelerinde oluşan kromatid ve kromozom kırıkları, mitoz ve mayoz bölünmeler boyunca oluşabilmektedir. Kromatid ve kromozom kırıklarının oluşması hücre döngüsünün hangi evresinde etkili olduğuna bağlıdır. Çalışılan maddenin mitoz bölünmenin G0 veya G1 evresinde etkili olması kromozom tipi kırıklara neden olurken, S veya G2 evresinde etkili olması kromatid tipi kırıklara neden olmaktadır. Meydana gelen bu kromozom kırıkları, G1 evresinde sadece bir kromatitte bir kırık oluşturur, S evresinde de sürerse metafaz aşamasından sonra her iki kromatitte de kırık oluşmasına neden olur, bu da kromozom kırığı yapısını oluşturur. Eğer oluşan kırıklarda birleşme olmazsa bir asentrik fragment ile bir delesyonlu kromozom oluşumu görülür. Oluşan bu asentrik parçalar metafazda kaybolabilirken, anafaz evresinde mikronükleusları da oluşturabilmektedir [78,119-127].

Kromozom kırıkları herhangi bir dış etken olmadan kendiliğinden ya da mutajenik etki sonucu oluşabildiği gibi; kimyasal maddeler de DNA tahribatına neden olmaktadır [66]. Mutajenik etki kromozom kırıklarına neden olduğu gibi gen mutasyonlarını da etkilediğinden, gen mutasyonları ile ilgili yapılan araştırmalarda kromozom kırığı çalışmalarından yararlanılmaktadır [61,66,128-130]. DNA'da hem kromatid hem

kromozom kırıkları kanser riskini belirlemek için değerlendirilmektedir. Ancak kromozom tipi anormalliklerin belirleyiciliğinin, kromatid tipi anormalliklere oranla daha iyi sonuç verdiği dair araştırmalar mevcuttur [131,132].

Çalışmada gıda katkı maddelerinden tatlandırıcı olarak kullanılan maddelerin oluşturduğu diğer yapısal anormallikler kardeş kromatitlerde birleşme, fragment ve disentrik kromozomdur. Laktitol uygulamalarında kromatid değişimine ender olarak rastlanılmıştır. Kromatid değişimi, homolog olmayan kromozomlar arasında meydana gelen tipik triradyal veya quadriradyal değişimlerdir [128,133]. Diğer bir anormallik türü olan disentrikromozom, iki kromozomun uçlarında meydana gelen kırıkların, sentromeri bulunan kısımlarının kırılmış uçlardan birleşmesidir. Kardeş kromatitlerde birleşme ise çalışmamızda en fazla gözlemlenen anormalliktir. Kardeş kromatitlerde birleşme genellikle kromozomların iki ucunda oluşan kırıkların karşılıklı birleşerek halka görünümünü almasıdır [134,135]. Yaptığımız bu çalışmada sayısal anormallik olan poliploidi çok az miktarda görülmüştür. Poliploidi; canlının genomundaki mevcut kromozommiktarının, gametindeki mevcut kromozom sayısı kadar artış göstermesidir [134,136-138].

Mitotik indeks (MI), çeşitli kimyasal maddelerin sitotoksitesini yorumlamak ve hücresel bölünme süreleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için kullanılan önemli bir parametredir [139]. Sitotoksik etkiye neden olan birçok kimyasal maddenin varlığı mitotik indekste düşüslere neden olmaktadır. Mitotik indekste meydana gelen bu düşüşün nedenleri olarak hücrelerin mitoz bölünmesini sağlayan G2 evresinin engellenmesi, DNA sentezinin gerçekleşebilmesi için lüzumluolan ve iğ iplikleri oluşturan enzimlerin inhibisyonu gösterilmektedir [114,140,141]. Mitotik indeksin, hücrede hasar meydana getiren etkilerin araştırılmasında mitotik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan duyarlı bir belirteç olduğu düşünülmektedir. Mitotik indekste meydana gelen düşüş, hücrenin çoğalma özelliğini kaybettiğine, hücrenin ölümüne sebep olacak etmenlerin varlığına veya hücrenin interfaz aşamasında zamansız olarak büyümei durduğuna yorumlanabilir [142].

Mikronükleus testi (MN), fiziksel ve kimyasal etmenlerin oluşturduğu genotoksitenin, mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan, istatistiksel analizi kolay, fazladan kültür basamağı gerektirmeyen ve insan periferik kan lenfositlerinde, yanak mukozası ve kemik iliği gibi farklı tipteki hücrelerde uygulanabilen bir testtir. Test sonucunda hücrede meydana gelen kromozom kırıkları ve hücre yapısında meydana gelen anormallikler

kansergöstergesi kabul edilmektedir. Bu nedenle kansere sebebiyet veren maddelerle etkileşime girmiş bireylerde, kanser riskinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Yine bu test; ilaç sanayide, gıda sanayide özellikle katkı maddelerinde, tıp alanında radyoterapi ve bunun gibi fiziksel ve kimyasal birçok etkenin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır [57, 76-78,143].

Hücrenin klastojenik, karsinojenik ve mutajenik etkenler sonucu DNA'sında meydana gelen hasar MN'nin temelini oluşturur. Hücrede çeşitli nedenlerden veya kendiliğinden de MN oluşabilmektedir. Bu oluşumlara DNA da oluşan hasarların onarılmaması veya yanlış onarılması, kinetokor proteinlerinde, iğ iplikçiklerinde ve sentromerde meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır. Mutasyonlar sonucu, DNA'nın tamir genlerinde ve hücre bölünmesini kontrol eden genlerde oluşan hatalar MN frekansını arttırabilmektedir [67,143].

Sitotoksisite araştırmalarında kullanılan göstergelerden biri de nükleer bölünme indeksidir. Nükleer bölünme indeksi değerlendirilmesinde mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler sayılarak hesaplama yapılmaktadır. Hücrede bölünmeyi gerçekleştiremeyen, mononükleat olarak sayılan değer, en düşük NBİ değeri sayılır ve bu değer 1,0'dir. Bölünme tüm hücrelerde bir kez gerçekleşirse binükleat sayılacak ve NBİ değeri 2,0 olacaktır. Hücrelerin birden fazla bölünme geçirmesi sonucunda da 2'den daha fazla çekirdekli hücreler sayılacak ve NBİ değeri 2,0'dan büyük olacağı anlamına gelecektir [143,144]. Bu çalışmada mannitol ve laktitolün nükleer bölünme indeksini etkilemediği tespit edilmiştir.

Şeker yerine kullanılan, yapay tatlandırıcı olan mannitolün insan periferik lenfositlerinde genotoksisite ve sitotoksisite üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmıştır. Laktitolün ise insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksisite ve sitotoksisite etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Ancak farklı tatlandırıcı katkı maddelerinin genotoksisite ve sitotoksisite etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur.

Iwakura ve ark. (1994), Laktiol'ün genotoksik ve mutajenik etkisini bakterilerde ters mutasyon testi, kültürlenmiş memeli hücrelerinde kromozom anormallik testi ve farelerde mikronükleus testi ile incelenmiştir. Salmonella typhimurium (TA1535, TA100, TA1537 ve TA98) ve Escherichia coli (WP2uvrA) kullanılarak yapılan ters mutasyon testinde genotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Yine kromozom anormallik ve mikronükleus

test sonuçlarında da kontrole oranla anlamlı artış gözlenmediği bildirilmiştir [86]. Laktitol için yapmış olduğumuz çalışma sonucunda da genotoksik etki göstermediği ve araştırma sonuçlarının birbirini desteklediği görülmüştür.

JECFA 1983 yılında yayınladığı raporda laktitolün *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında mutajenik etkili olmadığını belirtmiştir [87].

Ninomiya ve ark. (1994a), laktitol ile yaptıkları çalışmada Sprague-Dawley sıçanları kullanarak gelişim ve doğurganlık üzerinde oluşturduğu toksik etkiyi araştırmışlar, sonuç olarak laktitolün dişi ve erkeklerde çiftleşme ve doğurganlığı etkilemediği, canlı fetusların gelişiminde olumsuzluk görülmediğini bildirmişlerdir [145]. Ninomiya ve ark. (1994b)'nin sıçanlarla yapmış olduğu başka bir çalışmada oral olarak 0,7; 2,65 ve 10 g/kg doz seviyelerinde laktitol verilmiş, sonuç olarak laktitolün iç organlar ve dış görünüşle ilgili anormal bir duruma da neden olmadığını tespit etmişlerdir [146].

Laktitol ile yapılan başka bir çalışmada Tesh ve ark. (1994)'nin tavşanlarla yaptıkları teratojenite çalışmasıdır. Bu çalışmada tavşanlara 0; 0,25; 0,75 ve 4,5 g/kg/gün laktitol oral yolla verilmiş, verilen dozların tavşanlarda toksik etki göstermediği ve üreme fonksiyonlarında olumsuzluğa neden olmadığı anlaşılmıştır [147].

Laktitol ile güncel olarak yapılan başka bir çalışma Avuloğlu-Yılmaz ve arkadaşlarının (2022), laktitolün sitotoksik etkisini BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde MTT testi ile, genotoksik etkisini insan periferik lenfositlerinde comet testi ile incelediği çalışmadır. Çalışmada laktitolün 125, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL konsantrasyon kullanılmış ve BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde önemli derecede sitotoksik etkiye neden olmadığı belirtilmiştir. Ek olarak, laktitolün izole lenfositlere 1 saatlik uygulaması sonucunda, test edilen tüm konsantrasyonlarda comet kuyruk yoğunluğu ve momentinin kontrole göre değişmediği gösterilmiştir [85].

Weitberg ve arkadaşları 1985 yılında mannitol üzerinde yaptıkları çalışmada insan periferik kan lenfosit hücrelerini 2×10^5 ve 3×10^5 µg/mL'lik konsantrasyonlarla 72 saat muamele etmiş, sonuç olarak KKD oluşumunun arttığını bildirmişlerdir [88].

JECFA'nın 1986 yılında yayınladığı rapora göre mannitol ile *Salmonella typhimurium* G46 TA1530 ve *Saccharomyces cerevisiae* D3 suşu kullanılarak fare konak aracılı test gerçekleştirilmiştir. Ayrıca test adı, içeriği ve detayları raporda paylaşılmamış olan Rat kemik iliği ve insan W1-38 hücrelerinde sitogenetik bir test yapılmıştır. Aynı raporda *S.*

typhimurium TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları ile Ames testi gerçekleştirilmiş ve ratlarda dominant letal test uygulanmıştır. Sonuç olarak raporda Mannitolün bu test sistemlerinin herhangi birinde gözlemlenebilir mutajenik etkiye neden olmadığı açıklanmıştır ancak raporda doz ve süreler gibi birçok ayrıntılı bilgiye ulaşılamamıştır [89]. Laktitol ve mannitol ile ilgili genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları oldukça sınırlıdır. Ancak bu yönde gerçekleştirilmiş diğer tatlandırıcılar ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) ve früktozun (FR) sitotoksik etkileri insan karaciğer karsinoma (HepG2) hücrelerinde MTT testi ile incelenmiştir. YFMS (%5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30) ve FR (62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL)'nin belirlenen konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı oranda sitotoksik etki gösterdiğini görülmüştür. Çalışmaya konu olmuş her iki tatlandırıcının genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik, mikronükleus, comet testi ve kardeş kromatit değişimi testi ile incelenmiştir. Her iki madde için de yüksek konsantrasyonlarda kromozom anormallik (48 saatlik uygulama) ve kardeş kromatit değişimi (24 ve 48 saatlik uygulama) frekanslarında artış görülmüştür. Yine her iki tatlandırıcı için yapılan mikronükleus ve comet testi sonucunda önemli genotoksik etki meydana gelmiştir [148].

Hansen ve ark. (2008) yaptığı genotoksisite çalışmasında früktoz, sükröz ve glikoz şekerlerinin %30'luk konsantrasyonları ratlara 35 gün süre ile uygulanmıştır. Uygulama sonunda karaciğer ve kolonda DNA tahribatı comet testi ile incelenmiştir. Çalışılan şekerlerin DNA'da zincir kırıklarına neden olmadığı, kolonda mutasyon oranını arttırdığı, ancak bu artışın anlamlı olmadığı belirtilmiştir [109]. Araştırmacılar çalışma sayısının artırılarak karşılaştırmalı olarak daha kesin sonuçlar elde edilmesini gerektiğini vurgulamışlardır.

Bir başka tatlandırıcı türü olan stevia için insan periferik lenfosit hücrelerinde mikronükleus ve kromozomal anormallik testleri ile genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL stevia konsantrasyonları ile insan periferik lenfosit hücrelerine 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Uygulama sonunda mikronükleus ve kromozomal anormallik sayısında kontrole oranla anlamlı değişikliğin görülmediği saptanmıştır [149]. Araştırmacı sonuçlarının önceki bulguları açıkça desteklediğini bildirmiştir.

Sakarın ve stevia ailesinden olan rebaudiozit A'nın günlük kullanım miktarının genotoksik etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada sıçanlara 48 gün süresince normal su ve farklı konsantrasyonlarda sakarın ve rebaudiozit A çözeltisi içeren diyet uygulanmıştır. Uygulama sonucunda sakarın diyeti içeren grupta östrojen siklus yüzdesinde ve serum progesteron seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Yine arttırılmış over kisti ve artan steroidogenez ile ilişkili faktörlerin ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca yumurtalıklar üzerinde sakarının olumsuz etkileri gözlenmiştir. Rebaudiozit A diyeti uygulanan gruplarda serum progesteron seviyelerinde azalış görüldüğünü belirtilmiştir [153].

Bir şeker alkolü olan ksilitolün genotoksik etkileri kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleri ile araştırılmıştır. Söz konusu araştırmada ksilitol 125; 250; 500 ve 1000µg/mL'lik konsantrasyonlarda insan periferik lenfositlerine 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde verilmiştir. Sonuçta uygulanan tüm testlerde özellikle yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre önemli genotoksik etki gözlenmiştir. Ek olarak mitotik indeksin yine benzer konsantrasyonlarda önemli düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir [127]. Bu nedenle xylitol'ün kullanımının azaltılmasının ya da kullanımına dikkat edilmesinin faydalı olacağı yönünde yorum yapılmıştır.

Çadırcı ve ark. (2020) yapay tatlandırıcı olan aspartamın genotoksik etkisini kromozomal anormallik testi, sitotoksik etkisini ise MTT testi ile insan periferik kan hücrelerinde araştırmışlardır. 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 mg/L'lik konsantrasyonlar insan periferik lenfosit hücrelerine 48 saat muamele edilmiş ve tüm konsantrasyonların hücre canlılığını önemli düzeyde etkilemediği görülmüştür. MTT testi sonucunda kromozomal anormallik frekansında artışa neden olarak genotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir [150]. Sonuç olarak, bu çalışmada aspartamın orta derecede sitotoksik aktiviteye sahip olduğunun belirlendiği, ancak yan etkileri nedeniyle izlenmesi ve sınırlandırılması gerektiği şeklinde yorum yapılmıştır. Vasileva ve ark. (2021)'nin aspartam üzerinde yapmış olduğu başka bir genotoksisite çalışmasında kromozomal anormallikler ve Mİ oranı *Allium cepa* L. testi ile incelenmiştir. 400, 600, 800 ve 1000 mg/mL aspartam ile 72 saat boyunca kök uçlarına uygulama yapılmıştır. Uygulama sonunda 400 mg/mL konsantrasyon hariç Mİ'i diğer tüm dozlarda azaltarak sitotoksik etkiye neden olduğu, kromozomal anormallik frekansını ise tüm konsantrasyonlarda artırdığı belirlenerek genotoksik etkili olduğu vurgulanmıştır [151]. Bu nedenle aspartam ile yapılacak çalışmaların artırılması ve dikkatli tüketilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Silva ve ark (2018), yapay tatlandırıcılardan asesülfam potasyumun (ASE-K) genotoksik etkisini insan periferik lenfosit hücrelerinde hem tek başına, hem de aspartamla (AS) birlikte araştırmışlardır. Comet testi için %0,5 ve %5 uygulama konsantrasyonları belirlenmiş, tek başına uygulanan ASE-K'un %0,5'lik konsantrasyonda genotoksik etki oluşturmadığını, AS+ASE-K birlikte kullanımı sonucu tüm konsantrasyonlarda önemli genetik hasar oluşturduğunu belirtmişlerdir [152]. Verilere dayanarak iki kimyasal maddenin birlikte tüketilmemesi önerilmektedir. ASE-K tatlandırıcısının 7.5, 15, 30, 60, 120 ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılarak (24 ve 48 saat) yapılan başka bir çalışmada ASE-K'nın yüksek konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerinde ve insan lenfositlerinde sitotoksik etki gösterdiği, KA ve comet testince hafif düzeyde genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak MN sıklığı ve nükleer bölünme indeksi açısından fark gözlenmedi. Yapay tatlandırıcıların sağlığa etkileri henüz tam olarak bilinmediği için bu maddeleri içeren besinlerin aşırı tüketilmemesi gerekmektedir. Bu nedenle daha fazla çalışma ihtiyaç vardır.

Aspartamın genotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada 500, 1000 ve 2000 µg/ml'lik konsantrasyonların insan periferik lenfositlerde 24 ve 48 saat muamele edilmesi sonucunda KKD oluşumunu etkilemediği ancak KA ve MN sayısını arttırarak genotoksik etkili olduğunu görülmüştür [154]. Bununla birlikte, farklı testlerde ileri çalışmalar yapmak gereklidir.

Canımoğlu ve ark. (2006) maltitolün genotoksitesini araştırmak amacıyla periferik lenfosit hücreleri üzerinde mikronükleus, kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testleri uygulamışlardır. Maltitolün 1,25; 2,5 ve 5 mg/mL konsantrasyonları hücrelere 24 ve 48 saat süresince verilmiştir. Kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi frekanslarında uygulanan sürelerde hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı artış görülmemiştir. Ancak uygulama yapılan sürelerde konsantrasyondan bağımsız olarak mikronükleus sıklığında artış belirlenmiştir. Mitotik indeks ve replikasyon indeksinde anlamlı bir değişim görülmemiştir [94].

Bandyopadhyay ve ark. (2008) tatlandırıcı olarak kullanılan sakkarin, aspartam ve asesülfam-K maddelerinin genotoksik etkilerini Ames testi ve fare kemik iliği hücrelerinde comet testi incelemişlerdir. Comet testinde 18 saat süresince sakkarinin 50, 100, ve 200 mg/kg'lık, aspartamın 7, 14, 28, ve 35 mg/kg ve asesülfam-K'nın 150, 300, ve 600 mg/kg konsantrasyonları farelerle verilmiş ve sonuçta comet parametrelerinde artış gözlenmiştir.

Ames testi için *S. typhimurium* TA 97a ve TA 100 suşları ile çalışma yapılmış ve çalışılankonsantrasyonlarda mutajenik etki görülmemiştir [158]. Tatlandırıcılar için toksik etkili kabul eden ve reddeden tartışmalı ve kafa karıştırıcı araştırmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte tatlandırıcı kullanımında kısıtlamalar önerilmektedir.

Başka bir tatlandırıcı türü olan tartrazinin genotoksik etkisini incelemek amacıyla 0,4 ve 4 ml'lik konsantrasyonları *Allium cepa* kök meristematik hücrelerine 24 ve 48 saat uygulama yapılmış, sonuç olarak mitotik indeks değerlerinde azalış gösterdiği ve yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [159]. Hassan (2010) 'nın yaptığı çalışmada, 7,5 ve 15 mg/kg tartrazin oral yolla farelere verilmiştir. Uygulamasonucunda tartrazininkonsantrasyon artışı ile paralel olarak kemik iliği hücrelerinde KA oluşumunun kontrole oranla arttığı belirlenmiştir. Comet testi sonucunda ise böbrek ve karaciğer hücrelerinde DNA tahribatına neden olduğu görülmüştür [160]. Renklendiricilerin tüketiminde özellikle çocuklar için kısıtlamaların getirilmesi sağlık açısından önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında tatlandırıcılar grubundan laktitol ve mannitolün genotoksik etkileri kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri kullanılarak incelenmiş ve her iki tatlandırıcı maddesinin kullanılankonsantrasyonlarda ve test şartlarında genotoksik etkiye neden olmayabileceği görülmüştür. Tatlandırıcılar üzerinde yapılmış olan diğer çalışmalarda bazı tatlandırıcıların yüksek dozlarının genotoksik etkili olduğu görülürken, bazı tatlandırıcıların ise kullanılan dozlarda genotoksik özellik göstermediği görülmüştür. Laktitol ve mannitolün daha önce yapılmış genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları tez sonuçlarını destekler niteliktedir. Yapılmış olan çalışmalarda doğal tatlandırıcılarında genotoksik özellikte olabileceği görülmektedir. Bundan dolayı doğal ve yapay tatlandırıcı farketmeksizin tatlandırıcı tüketiminin azaltılması sağlık açısından büyük öneme sahiptir.

Sitotoksik terimi hücrelerin ölümüne sebep olan anlamında kullanılmaktadır. Herhangi bir kimyasal maddenin sitotoksik potansiyelinin belirlenmesi amacıyla sitotoksisite araştırmaları yapılmaktadır. Sitotoksisite, incelenen kimyasal maddenin dozuna ve maruz kalınan süresine bağlı olarak hücrelere farklı oranlarda zarar vermektedir. Mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI), hücre döngüsü kinetiği, hücre çoğalması ve sitotoksisite belirteçleri olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda *in vitro* hücre bölünmesine birçok kimyasalın etkileri üzerine bilgi sağlar. Çünkü MI, RI ve /

veya NBI'da meydana gelen azalmalar hücre döngüsü ilerlemesinin engellenmesi ve kapasitenin kaybedilmesini gösterir [161-163].

Bu çalışmada Mannitol'ün 24 ve 48 saatlik uygulamalarının her ikisinde de mitotik indeksi en yüksek üç konsantrasyonda, Laktitol'ün ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarında 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL 'lik konsantrasyonlarda kontrole oranla, konsantrasyona bağlı anlamlı oranda azalttığı gözlenmiştir. Yine Mannitol ve Laktitol'ün her ikisinin de nükleer bölünme indeksi değerlerinde de kontrole göre önemli bir değişikliğe sebep olmadığı, bu nedenle sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Tatlandırıcıların sitotoksik etkileri üzerinde yapılmış olan başka çalışmalarda bulunmaktadır.

Laktitol'ün 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlar BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine 24 saat muamelesi sonucu MTT testinde sitotoksik etki göstermediği kaydedilmiştir [85].

Benzil benzoatın 10 mM, 15 mM ve 20 mM 'lik konsantrasyonları kullanılarak hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Benzil benzoatın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana getirdiği ve sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [164].

Rencüzoğulları ve arkadaşları 500, 1000 ve 2000 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılarak aspartamın sitotoksik etkisini incelemişler ve sadece yüksek konsantrasyonda kromozom aberasyonlarını ve mikronukleus formasyonunu indüklediği ve mitotik indeksi azaltma yoluyla sitotoksik etkiler gösterdiğini bulmuşlardır [154].

Xylitol (XYL) tatlandırıcısının 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılarak *in vitro* insan lenfositlerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır [127].

Sodyum sakkarin ve sodyum siklamat kullanılarak hem ayrı ayrı hem de kombine olarak sitotoksik etkisi incelenmiştir. Sodyum siklamatın 10,00; 15,00 ve 30,00 mg/mL ve sodyum sakkarinin 20,00; 40,00 ve 80,00 mg/ml'lik konsantrasyonları 48, 72 ve 168 saatlik uygulamaları sonucunda her iki madde ve bunların kombinasyonları konsantrasyona ve muamele süresine bağlı olarak iki test sisteminde de sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [165]. Sodyum siklamat, sodyum sakkarin, sükraloz, aspartam ve asesulfam-K'nın sitotoksitesisi 24, 48 ve 72 saat süresince Caco-2, HT-29 (kolon) ve

HEK-293 (böbrek) hücrelerinde 1-50 mM aralığında konsantrasyonlar kullanılarak MTT testi ile incelenmiş ve tüm tatlandırıcılar için ve 10 mM'dan büyük konsantrasyonlarda inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir [166].

Yapay tatlandırıcı olan maltitolün 1,25; 2,5 ve 5 mg / mL'lik (24 ve 48 saat) tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde replikasyon indeksini ve mitotik indeksi etkilemediği, sitotoksik etkili olmadığı bildirilmiştir [94]. Tatlandırıcı olan rebaudiosid A'nın etkisi MTT testi ile değerlendirilmesi amacıyla insan kolon kanser HT-29 ve T84 hücre hatlarında farklı konsantrasyonlar (%0, %0.001, %0.05, %0.1, %0.3, %0.5 ve %1) kullanılmıştır. Farklı miktarlarda Rebaudiosid A eklendiğinde (%1 hariç) hücresel canlılık ve proliferasyonda belirgin bir değişiklik olmadığı ve sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir [167]. Aspartamın 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, ve 100 mg/L'lik konsantrasyonları primer insan kan hücrelerinde sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığında konsantrasyona bağlı önemli oranlarda düşüşe neden olmuştur [150]. İnsan karaciğer karsinoma HepG2 hücrelerinde asesülfam K'nın sitotoksik etkisi MTT testi ile incelenmiştir. 48 saatlik uygulamada 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığını önemli düzeyde düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yine bu tatlandırıcının 24 ve 48 saatlik muameleleri boyunca MIdeğeri 60, 120 ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde düşüş gözlenmiştir [166].

Mitotik indekste meydana gelen azalmanın başlıca nedeni olarak membranlarda bulunan ATP'az enzimlerinin engellenmesi ile mitokondriyel fonksiyonun işlevini yerine getiremeyişi arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Ayrıca azalmanın nedenleri arasında mitoz bölünmesini sağlayan G2 evresinin engellenmesi, DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezinin gerçekleşebilmesi için lüzumlu olan ve iğ iplikleri oluşturan enzimlerin inhibisyonu gösterilmektedir. Mitotik indekste meydana gelen düşüş, hücrenin çoğalma özelliğini kaybettiğine, ortamda hücrenin ölümüne sebep olacak ajanların varlığına veya hücrenin interfaz evresinde büyümeyi zamansız olarak durdurması şeklinde yorumlanabilir [113,140,167,168].

6. SONUÇ

Gıda katkı maddeleri, gıdanın üretilmesinden tüketiciye ulaşıncaya kadar geçen sürede görünüş, tat, yapı, koku gibi özelliklerinde oluşabilecek olumsuzlukları önlemek amacıyla gıdaya katılan maddelerdir. Bu katkı maddeleri kullanılmadan önce toksikolojik çalışmalara tabi tutularak, ADI (kabul edilebilir günlük alım miktarı) değeri belirlenir. ADI değeri belirlenen katkı maddelerinin kullanımı sonucu herhangi bir olumsuzluğa rastlanılırsa ADI değeri azaltılırveya kullanımı yasaklanır. ADI değeri güvenli doz kabul edilmesine rağmen yapılan araştırmalar bazı katkı maddelerinin belirlenen dozlarının sağlık açısından risk oluşturabileceğini göstermektedir [1].

Gıda katkı maddesi olan ve kullanımı gün geçtikçe artan tatlandırıcılar; şeker yerine kullanılan ve tatlılık derecesi yüksek katkı maddeleridir. Kullanılan tatlandırıcıların şekere kıyasla düşük kalorili olması, düşük glisemik indeksli ve düşük maliyetli olması sıklıkla tercih edilme nedenleri arasındadır. Özellikle diyabet hastaları tarafından sıkça tüketilen bu maddeler günümüzde daha az kalori alımı ile şekere alternatif olarak birçok kişi tarafından tüketilmektedir. Her ne kadar ADI değerleri belirlenmiş olsa da sağlık açısından oluşturabileceği riskler endişeye neden olmaktadır. Tatlandırıcıların sağlık açısından herhangi bir olumsuzluğa neden olduğunu belirten *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Ancak yapılan bu çalışmalar çelişkili sonuçlarından dolayı tartışmalara neden olmuştur [2-5].

Bu tez çalışmasında tatlandırıcı türü olan Mannitol ve Laktitol'un insan periferik lenfosit hücrelerinde genotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmaya konu olan her iki maddenin uygulanan konsantrasyon ve sürelerde *in vitro* insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etki göstermediği ve bu açıdan herhangi bir risk taşımayabileceği görülmüştür. Ancak her iki tatlandırıcı da önemli oranda sitotoksik etki göstermiştir. Ancak bu çalışmalar yapılacak başka genotoksik ve sitotoksik testleriyle ve kullanılacak diğer hücre gruplarıyla da desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Altuğ, T. (1999). Gıda Katkı Maddeleri, Genel Başlıklar. *Hekim ve Yaşam*, 29-31.
2. Saldamlı, İ. (1998). *Gıda Kimyası*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 490- 541.
3. Bulduk, S. (2003). *Gıda ve Personel Hijyeni* (Altıncı baskı). Ankara: Detay Yayıncılık, 112- 119.
4. Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiricilerin Saflık Kriterleri Tebliği (2001, 10 Nisan). *Resmi Gazete*, 27.
5. Altuğ, T. (2009). *Gıda Katkı Maddeleri* (Üçüncü baskı). T. Altuğ (Ed). İzmir: Kan Yılmaz Matbaacılık, 1-16.
6. Yurttagül, M. ve Ayaz, A. (2008). *Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular* (İkinci baskı). Ankara: Klasmat Matbaacılık, 1-30.
7. Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., ve Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. *Gıda/The Journal of Food*, 39(3), 179-186.
8. Akbulut, M. (2011, Kasım). *Gıda Katkı Maddeleri: Fonksiyonları ve Kaynakları*. 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, Ankara.
9. Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği (2002, 23 Ağustos). *Resmi Gazete*, 55.
10. Silva, M.M., Reboredo, F.H. and Lidon, F.C. (2022). Food Colour Additives: A Synoptical Overview on their Chemical Properties, Applications in Food Products and Health Side Effects. *Foods* 2022, 11, 379.
11. Sarıkaya, S. ve Solak K. (2003). Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23(3), 19-32.
12. Yin, K.J., Xie, D.Y., Zhao, L., Fan, G., Ren, J., Zhang, L. and Pan, S. (2020). Effects of Different Sweeteners on Behavior and Neurotransmitters Release in Mice. *Journal of Food Science and Technology*. 57 (1), 113-121.
13. Siivola, K. K., Burgum, M. J., Suárez-Merino, B., Clift, M. J., Doak, S. H. and Catalán, J. (2022). A Systematic Quality Evaluation And Review Of Nanomaterial Genotoxicity Studies: A Regulatory Perspective. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 1-24.
14. Koppe, C. G. and Cordeiro, C. M. T. (2000). Variability In Micronucleus Induction With Different Mutagens Applied To Several Species Of Fish. *Genetics Molecular Biology*, 23(1), 235-239.

15. Rossi, L. F., Luaces, J. P., Browne, M., Chirino, M. G., Merani, M. S. and Mudry, M. D. (2016). *Chaetophractus Villosus* As A Sentinel Organism: Baseline Values Of Mitotic Index, Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 796, 40-45.
16. Carballo, M. A. (2006). *Indicadores y Marcadores Biológicos*. M. D. Mudry and M. A. Carballo (eds.). Argentina: Secretaría de Ciencia y Tecnología.
17. Roussel, C., Witt, K. L., Shaw, P. B. and Connor, T. H. (2019). Meta-Analysis Of Chromosomal Aberrations As A Biomarker Of Exposure In Healthcare Workers Occupationally Exposed To Antineoplastic Drugs. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 207-217.
18. Shen, M., Bin, P., Li, H., Zhang, X., Sun, X., Duan, H., Niu, Y., Meng, T., Dai, Y., Gao, W., Yu, S., Gu, G. and Zheng, Y. (2016). Increased Levels Of Etheno-DNA Adducts And Genotoxicity Biomarkers Of Long-Term Exposure To Pure Diesel Engine Exhaust. *Science of the Total Environment*, 543, 267-273.
19. Başoğlu, F. (2016). *Gıda Kalite Kontrolünün Esasları ve Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri (Üçüncü baskı)*. Türkiye: Dora Yayıncılık, 1-14.
20. Bender, D. A. (2006). *Benders' dictionary of nutrition and food technology*. Şikago: Woodhead Publishing.
21. Chemat, F. and Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
22. Tayar, M. ve Çıbık, R. (2016). *Gıda Kimyası (Dördüncü Baskı)*. Türkiye: Dora Yayıncılık, 2-208.
23. Aydemir, Ş.B. (2014). *Türkiye'de Gıda Biliminde Ve Gıda Sektöründe Bilgi Erişim Süreci*. (Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 2014).1-5.
24. Çetin, S.A. ve Şahin, B. (2017). Gıda Güvenliğinde Risk Faktörleri ve Hijyenin Önemi. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 5 (2), 310-321.
25. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. (2017). *Gıda Güvenliği ve Standartlar*. Ankara: Milli Eğitim Bakanlığı.
26. Yeşilören, G. Ve Ekşi, A. (2014). Gıda Gerçekliği ve Kontrol Yöntemleri. *Gıda/The Journal of Food*, 39(5): 315-322.
27. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı (2011) *İstenmeyen Katkıları Saptama*. Ankara: Milli Eğitim Bakanlığı.
28. Yurttagül, M. Ve Ayaz, A. (2008). *Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular*. Klasmat Matbaacılık, Ankara, 7.
29. Arslan, G. (2011). *Gıda Katkı Maddeleri ve Yeni Yapılan Dioksimlerin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, 2011), 8.

- 30.Duru, S., Gül, A. ve Hayran, S. (2019). Gıda Kodekslerinin Tarım ve Gıda Ürünleri Dış Ticareti Bakımından İncelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9, 2.
- 31.Ekici, H., Yipel, M., Portakal, P. ve Yarsan E. (2008). Ender Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Yönden İncelemesi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 1-2.
- 32.Kuş, E. (2013). *Gıda Katkı Maddelerinden Brilliant Blue ve Sunset Yellow'un İnsan Periferik Lenfosit Kültürlerinde Genotoksik Etkilerinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, 2013), 11.
- 33.Yurttagül M. ve Ayaz A. (2008). *Katkı Maddeleri Yanlışlar ve Doğrular* (İkinci baskı). Ankara: Klasmat Matbaacılık, 8-29.
- 34.Ekşi, A. (2014). Başlıca Gıda Katkıları Ve Kullanılma Amaçları, *A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri*. Ankara: Detay Yayıncılık, s.52-57.
- 35.Yörük, N.G. ve Danyer, E. (2016). Gıda Katkı Maddeleri Genel Bilgiler ve Tanımlar. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol- Special Topics*. 2(2),1-10.
- 36.İnternet: T.C Tarım ve Orman Bakanlığı. Mevzuat Türk Gıda Kodeksi [.https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM](https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM) Son Erişim Tarihi: Mart 2018.
- 37.Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z. and Fu, Z. (2017). Effects Of Environmental Pollutants On Gut Microbiota. *Environ Pollut*, 222, 1-9.
- 38.Kıvanç, P., Soylu, P., Özdemir, M. B., Şişik, N. ve Tayfur, M. (2017). *A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri*. M. Tayfur. (Editör). Ankara: Detay Yayıncılık.
- 39.Altuğ, T. ve Elmacı, Y. (2009). *Gıda Katkı Maddeleri*. T. Altuğ (Editör). İzmir: Kan Yılmaz Matbaacılık.
- 40.de la Peña C.(2010). Artificial Sweetener As A Historical Window To Culturally Situated Health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1190, 159-65.
- 41.Rubini M. E. (1968). Noncaloric Sweetening Agents. *American Journal of Clinical Nutrition*, 21, 644-5.
- 42.Whitney, E. and Rolfes, S. R. (2005). *Understanding Nutrition* (Onuncu baskı). New York: Thomson Learning Publication.
- 43.İşgören, A. ve Sungur, S.(2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific Journal of Health and Natural Sciences*, 3(1), 24.
- 44.Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (1990, 7 Haziran). *Resmi Gazete*.
- 45.Grenby, T.H. (2011). *Advances in Sweeteners* (Beşinci baskı). London: Blackie Academic and Professionel, 288.

- 46.Çamaş, M. (2006). *Borun Genotoksik Etkilerinin Hordeum vulgare L. Üzerinde İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Gebze Tebik Üniversitesi, 2006), 97.
- 47.Awuchi, C. (2017). Sugar Alcohols: Chemistry, Production, Health Concerns And Nutritional Importance Of Mannitol, Sorbitol, Xylitol and Erythriol. *International Journal of Advanced Academic Research*, 3, 2488-9849.
- 48.Kızılaslan, N. (2017). The Relationship Between Sweeteners and Metabolic Diseases. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(2), 191-198.
- 49.Altuğ, T. (2001). *Gıda Katkı Maddeleri*(Üçüncü baskı). İzmir: Meta Basımevi, 286.
- 50.Ünal, D. (2011). *Farklı Oranlarda Laktitol ve Sakkaroz İlavesiyle Hazırlanan Tekirdağ Peynir Helvalarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, 2011), 5-7.
- 51.Atlı-Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksikite Testleri, *Tübvav Bilim Dergisi*, 4 (3), 221-229.
- 52.Cavallo, D., Ursini, C. L., Perniconi, B., Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F.M., Marinaccio, A. and Iavicoli, S. (2005). Evaluation Of Genotoxic Effects Induced By Exposure To Antineoplastic Drugs In Lymphocytes And Exfoliated Buccal Cells Of Oncology Nurses and Pharmacy Employees, *Mutation Research*, 587, 45-51.
- 53.Börçek Kasurka, C. (2010). *Antihistaminik İlaç Olarak Kullanılan Feksofenadin Etken Maddesinin İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, 2010), 88.
- 54.Saygı, Ş.(2003). Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291-298.
- 55.Singh, S., Khanna, V. K. and Pant, A. B. (2018). *Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story*.A. Dhawan and S. Kwon (Eds.). London: Academic Press, 1-19.
- 56.Yırtıcı, Ü. (2007). *Tartrazinin Cyprinus carpio' daki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Yöntemi İle Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, 2018), 80.
- 57.Waters MD., Stack HF, Brady AL., Lohman PHM., Haroun, L. and Vainio H. (1988). Use Of Computerized Data Listings And Activity Profiles Of Genetic And Related Effects In The Review Of Compounds. *Mutation Research*, 205, 295- 312.
- 58.Öcal, A. (2012). *İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Hypericum Heterophyllum Vent. Türünün Mikronükleus, Mitotik İndeks ve Replikasyon İndeksi Üzerine Etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, 2012), 11-14.
- 59.Khan, M. S. (2014). Genotoxicity: In Vivo Cytogenetic Assays. *International Journal of Pharmamedix India*, 2(3), 792-803.

60. Anwar, W. A., Salama, S. I., Serafy, M. M. E. I., Hemida, S. A. and Hafez, A. S. (1994). Chromosomal Aberrations and Micronucleus Frequency in Nurses Occupationally Exposed to Cytotoxic Drugs. *Mutagenesis*, 9(4), 315-317.
61. Widel, M., Kolosza, Z., Jedruu, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K. And wwierniak, A. (2001). Micronucleus Assay In Vivo Provides Significant Prognostic Information In Human Cervical Carcinoma; The Updated Analysis. *International Journal of Radiation Biology*, 77 (5), 631-636.
62. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31 (1), 9-15.
63. Jagetia, G. C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D. And Vidyasagar, M. (2001). Evaluation Of Micronuclei Frequency In The Cultured Peripheral Blood Lymphocytes Of Cancer Patients Before And After Radiation Treatment, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491 (1), 9-16.
64. Yıldız, Y. ve Önen, Ö. (2016). Bazı Kirleticilerin Teleostlar Üzerindeki Genotoksik Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1):63-74.
65. Üstüner, D. (2011). Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(1): 64-69.
66. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. and Fenech, M. (2011). Micronuclei Frequency In Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Risk: Evidence From Human Studies. *Mutagenesis*, 26(1): 93-100.
67. Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 101-107.
68. Çakmak, G. (2000). *Trafik Polisi ve Taksi Sürücüleri Hava Kirliliği Maruziyetine Yönelik İdrarda 1- Hidroksipiren Değerlerinin, Periferik Lanfositlerde Kromozomal Aberasyon Ve MÇ Sıklığının Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 2000). 28-107.
69. Demirel Ş. ve Zamani A.G., (2002) Mikronükleus Tekniği Ve Kullanım Alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 126.
70. Al-Sabti, K. (1986). Comparative Micronucleated Erythrocyte Cell Induction In Threecyprinids By Five Carcinogenic-Mutagenic Chemicals, *Cytobios*, 47(190-191), 147-154.
71. Aydemir, N. (2001). *Bazı Kimyasalların Klastojenik Etkilerinin Fare Kemik İliği Metafaz Analizi Ve Mikronükleus Testlerinde Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması*. (Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, 2001). 162-176.
72. Heddle, J.A. (1991). Et Al., Micronuclei As An Index Of Cytogenetic Damage: Past, Present, And, Future, *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 18, 277-291.

73. Fenech, M., (2006). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Evolves Into a“Cytome” Assay of Chromosomal Instability, Mitotic Dysfunction and Cell Death. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 58-66.
74. Dey, P., Samanta, S. and Susheilia, S. (2012). Micronucleus Assay in Buccal Smears of Breast Carcinoma Patients, *Diagn Cytopathol*, 40(8), 664-6.
75. Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., McFee, A. F., Wolff, S. and Wassom, J. S. (1981). Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the US EPA's Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 87 (2), 143-188.
76. Choy, W. N. (2001). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (Birinci baskı). New York: CRC Press, 29-47.
77. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal Changes: İnduction, Detection Methods And Applicability İn Human Biomonitoring, *Biochimie*, 88 (11), 1515-1531.
78. J. R. (1993). Update On Target Theory As Applied To Chromosomal Aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22(4), 198-207.
79. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. ve Celik, M. (2008). Genotoxicity testing Of Fluconazole İn Vivo And İn Vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1-2), 155-160.
80. Natarajan, A. T. (2002). Chromosome Aberrations: Past, Present And Future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3-16.
81. Dean, B.J. ve Danford, N. (1984). *Mutagenicity Testing—a Practical Approach*. S. Venitt and J.M. Parry (eds). Oxford: IRL Press.
82. Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A. and Swanson, G.M. (2001). Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine*, 39(1), 92-99.
83. El-Zein, R., Vral, A. and Etzel, C. J. (2011). Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis*, 26(1), 101-106.
84. Avuloğlu, Y.E., Mamur, S., Erikel, E., Yüzbaşıoğlu, D. ve Ünal, F. (2022). Laktitolün Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 3(2), 133-143.
85. Iwakura, K., Tamura, H., Watanabe, M. and Sumi, N. (1994). Mutagenicity Studies Of Lactitol (NS-4)]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 3, 487-497.
86. JECFA (1983). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *JECFA Evaluations*. Cenevre, 1-47.

87. Weitberg, A.B., Weitzman, S.A., Clark, E.P. and Stossel, T.P. (1985). Effects Of Antioxidants On Oxidant-Induced Sister Chromatid Exchange Formation. *The Journal of Clinical Investigation*, 75,1835-1841.
88. JECFA (1986). *Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. JECFA Evaluations.
89. Suttajit, M., Vinitketkaumnue, U., Meevatee, U., and Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity And Human Chromosomal Effect Of Stevioside, A Sweetener From Stevia Rebaudiana Bertoni. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 53-56.
90. Chung, Y. S. and Lee, M. (2013). Genotoxicity Assessment Of Erythritol By Using Short-Term Assay. *Toxicological Research*, 29(4), 249.
91. Findıklı, Z. and Türkoğlu, S. (2014). Determination Of The Effects Of Some Artificial Sweeteners On Human Peripheral Lymphocytes Using The Comet Assay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 6(8), 147-153.
92. Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Vogel, U., Autrup, H. N., Wallin, H., Rısom, L., Moller, P., Molck, A. M., Hansen, M., Poulsen, H. E. and Loft, S. (2002). A Sucrose-Rich Diet Induces Mutations In The Rat Colon. *Cancer Res.*, 62:4339-4345.
93. Canımoğlu, S. and Rencüzoğulları, E. (2006). The Cytogenetic Effects Of Food Sweetener Maltitol In Human Peripheral Lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(3), 269-27.
94. Johannes, C., Boes, R. and Obe, G. (1992). Uptake of the restriction endonuclease AluI by Chinese hamster ovary cells measured by frequencies of induced chromosomal aberrations: effect of hypertonic concentrations of glycerol and sorbitol. *Mutagenesis*, 7, 225-232.
95. Acar, Ö. (2020). *Sakarın Ve Aspartamın Farklı Konsantrasyonlarının Genotoksik Etkilerinin Allium Testi İle Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Onsekiz Mart Üniversitesi,2020), 55-56.
96. Durnev, A. D., Oreschenko, A. V., Kulakova, A. V., Beresten, N. F. and Seredenin, S. B. (1995). Clastogenic Activity Of Dietary Sugar Substitutes. *Vopr Med Khim*, 41, 31-33.,
97. Takayama, S., Renwick, A. G., Johansson, S. L., Thorgeirsson, U. P., Tsutsumi, M., Dalgard, D. W. and Sieber, S. M. (2000). Long-Term Toxicity And Carcinogenicity Study Of Cyclamate In Nonhuman Primates. *Toxicological Sciences*, 53, 33-39.
98. Mukherjee, A. and Chakrabarti, J. (1997). In Vivo Cytogenetic Studies On Mice Exposed To Acesulfame-K-A Non-Nutritive Sweetener. *Food and Chemical Toxicology*, 35(12), 1177-1179.

99. Ito, N., Fukushima, S., Shirai, T., Hagiwara, A. and Imaida, K. (1984). Drugs, Food Additives and Natural Products As Promoters In Rat Urinary Bladder Carcinogenesis. *International Agency for Research on Cancer (IARC) Scientific Publication*, 56, 399-407.
100. Sasaki, Y. F., Kavaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. and Tsuda, S. (2002). The Comet Assay With 8 Mouse Organs: Result With 39 Currently Used Food Additives. *Mutation Research*, 519, 103-119.
101. Ghonema, M. A. (2014). Biosafety of Stevia Extract Employing a Variety of Short-Term Genotoxic Bioassays. *Journal of the Advances in Agricultural Researches*, 19 (4), 722-737.
102. Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M. Jr. And Sofuni, T. (1996). Evaluation Of The Genotoxicity Of Stevioside And Steviol Using Six In Vitro And One In Vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 11(6), 573-579.
103. Zhang, Q., Yang, H., Li, Y., Liu, H., and Jia, X. (2017). Toxicological Evaluation of Ethanolic Extract From *Stevia Rebaudiana* Bertoni Leaves: Genotoxicity and Subchronic Oral Toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, 253-259.
104. Suttajit, M., Vinitketkaumnun, U., Meevatee, U., and Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity and Human Chromosomal Effect of Stevioside, A Sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 53-56.
105. Terai, T., Ren, H., Mori, G., Yamaguchi, Y., and Hayashi, T. (2002). Mutagenicity of Steviol and its Oxidative Derivatives in *Salmonella typhimurium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1007-1010.
106. Fındıklı, Z. (2012). *Bazı Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültürü Üzerine Olan Etkisinin Comet Yöntemi İle Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, 2012).
107. Karaman, A. ve Keskinler, F. (2009). Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda Genomik Hasar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, 29 (6), 1392-97.
108. Hansen, M., Baunsgaard, D., Autrup, H., Vogel, U. B., Møller, P., Lindecrona, R., Wallin, Poulsen, H.E., Loft, S. and Dragsted, L. O. (2008). Sucrose, Glucose And Fructose Have Similar Genotoxicity In The Rat Colon And Affect The Metabolome. *Food And Chemical Toxicology*, 46(2), 752-760.
109. Rencüzoğulları, E., Parlak, S. and İla, H.B., (2008), The Effects of Food Protector Biphenyl on Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberrations, and Micronucleus in Human Lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 31(2), 263-274.

- 110.Yavuz-Kocaman, A., Rencüzoğulları, E., İla, H.B. and Topaktas, M. (2008). The Genotoxic Effect of Potassium Metabisulfite Using Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchange, Micronucleus Tests in Human Lymphocytes and Chromosome Aberration Test in BoneMarrow Cells of Rats.*Environmental And Molecular Mutagenesis*, 49, 276-282.
- 111.Türkoğlu, Ş. (2007), Genotoxicity Of Five Food Preservatives Tested On Root Tips Of *Allium Cepa* L. *Mutation Research*, 626 (1-2), 4-14.
- 112.Türkoğlu, Ş., (2008), “Evaluation Of Genotoxic Effects Of Sodium Propionate, Calcium Propionate And Potassium Propionate On The Root Meristem Cells Of *Allium Cepa*. *Food And Chemical Toxicology*, 46(6), 2035-2041.
- 113.Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. ve Aksoy, H. (2006). Clastogenicity Of The Fungicide Afugan İn Cultured Human Lymphocytes. *Mutation Research/Genetictoxiology And Environmental Mutagenesis*, 604,53-59
- 114.Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç. and Ünal, F. (2016). Genotoxicity Of Monosodium Glutamate. *Food And Chemical Toxicology*, 91, 8-18.
- 115.Bastaki, M., Farrell, T., Bhusari, S., Pant, K. and Kulkarni, R. (2017). Lack Of Genotoxicity İn Vivofor Food Color Additive Tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 278-284.
- 116.Otabe, A., Ohta, F., Takumi, A. and Lynch, B. (2018). Mutagenicity And Genotoxicity Studies Of Aspartame. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 103, 345-351.
- 117.Yüzbaşıoğlu, D., Engüzel-Alperen, C. and Ünal, F. (2018). Investigation Of *İn Vitro* Genotoxic Effects Of An Anti-Diabetic Drug Sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 235-241.
- 118.Cajiao, J. J. T., Carante, M. P., Rodriguez, M. A. B. and Ballarini, F. (2017). Proximity Effects İn Chromosome Aberration İnduction By Low-LET İonizing Radiation. *DNA Repair*, 58, 38-46.
- 119.Yirmibeş, K. M. (2007). İnsandaki Genetik Hastalıklar. *MİSED (Türk Eczacılar Birliği Yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi)*, 19–20, 5–15 .
- 120.Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard HF. Thompson and Thompson. (2005). *Tıbbi Genetik* (Altıncı baskı). Ankara: Güneş Kitabevi, 17–32, 135–155, 157–178.
- 121.Tobias, E. S., Connor, M. ve Ferguson-Smith, M. (2014). *Tıbbi Genetiğin Esasları* U. Özbek (çev). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- 122.Alqallaf, A. K., Alkoot, F. M. and Aldabbous, M. S. (2013). *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders*.M. Fitzgerald (ed.).İrlanda: IntechOpen.

- 123.El-Zein, R., Vral, A. and Etzel, C. J. (2011). Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay and Cancer Risk Assessment. *Mutagenesis*, 26(1), 101-106.
- 124.Fazendeiro, M. S. P. P. (2013). *DNA Damage Induced By Acrylamide: Role Of Genetic Polymorphisms In DNA Damage Levels*. (Doctoral Dissertation, Universidade Nova De Lisboa, 2013), 13-14.
- 125.Suspiro, A. and Prista, J. (2011). Biomarkers Of Occupational Exposure Do Anticancer Agents: A Minireview. *Toxicology Letters*, 207(1), 42-52.
- 126.Avuloğlu Yılmaz, E. (2018). *Gıda Katkı Maddeleri Olarak Kullanılan Monopotasyum Glutamat, Magnezyum Dıglutamat ve Xylitol'ün Genotoksik Etkilerinin Araştırılması*. (Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, 2018), 32-33.
- 127.Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-O, M. and Sofuni, T. (2002). Application Of Mfish For The Analysis Of Chemically-Induced Chromosomal Aberrations: A Model For The Formation Of Triradial Chromosomes. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 504(1), 57-65.
- 128.Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., Lindholm, C. and Norppa, H. (2004). Impact Of Types Of Lymphocyte Chromosomal Aberrations On Human Cancer Risk Results From Nordic and Italian Cohorts. *Cancer Research*, 64(6), 2258-2263.
- 129.Gardner, R. M., Sutherland, G. R. and Shaffer, L. G. (2004). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (Dördüncü Baskı). New York: Oxford University Press.
- 130.Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L. Hagmar, L. and Strömberg, U. (2006). Chromosomal Aberrations and SCE As Biomarkers Of Cancer Risk. *Mutatiton Research*, 600 (1-2), 37-45.
- 131.Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S. and Kleinsasser, N. H. (2014). Nicotine Derived Genotoxic Effects In Human Primary Parotid Gland Cells As Assessed In Vitro By Comet Assay, Cytokinesis-Block Micronucleus Test and Chromosome Aberrations Test. *Toxicology In Vitro*, 28(5), 838- 846.
- 132.Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D.and Çelik, M. (2008). Cytogenetic Effects Of Citric Acid and Benzoic Acid On Allium Chromosomes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(8 A), 1029-1037.
- 133.Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik* (Üçüncü baskı). Ankara: Nobel Yayınevi.
- 134.Kuru, M. Ve Ergene, S. (2011). *Genetik* (Dördüncü Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık, 246-266.
- 135.Sumner, A. T. (1998). Induction Of Diplochromosomes In Mammalian Cells By Inhibitors Of Topoisomerase II. *Chromosoma*, 107(6-7), 486-490.

- 136.Doğan, G., Yar, A. S., Ergin, V., Menevşe, S., Menevşe, A. ve Ekmekçi, A. (2013). L929 Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 38(2).
- 137.Cummings, J., Sumner, A. T., Slavotinek, A., Meikle, I., Macpherson, J. S. and Smyth, J. F. (1995). Cytogenetic evaluation of the mechanism of cell death induced by the novel anthracenyl-amino acid topoisomerase II catalytic inhibitor NU/ICRF 500. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 344(1), 55-62.
- 138.Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y. ve Erdoğan, S. F. (2015). Potential Cytotoxic Effect Of Anilofos By Using Allium Cepa Assay. *Cytotechnology*, 67(5), 783-791.
- 139.Van't Hof, J. (1968). The Action Of IAA and Kinetin On The Mitotic Cycle Of Proliferative and Stationary Phase Excised Root Meristems. *Experimental Cell Research*, 51(1), 167-176.
- 140.Jain, A. K. and Sorbhoy, R. K. (1988). Cytogenetical Studies On The Effects Of Some Chlorinated Pesticides. *Cytologia*, 53, 427-436.
- 141.Rodríguez-Mercado, J. J., Mosqueda-Tapia, G. And Altamirano-Lozano, M. A. (2017). Genotoxicity Assessment Of Human Peripheral Lymphocytes Induced By Thallium (I) And Thallium (III). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99, (5-6), 987-998.
- 142.Fenech, M. (2007). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- 143.Lonescu, M. E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A. G. and Diculescu, M. M. (2011). Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. *Maedica*, 6(3), 173.
- 144.Ninomıya, H., Kondo, J., Ide, Y., Yamashita, Y., Nishikawa, K., Kishida, K., Watanabe, M. and Sumi, N. (1994a). Reproductive and 76 Developmental Toxicity Studies Of Lactitol (Ns-4) (1)--Fertility Study İn Rats By Oral Administration. *The Journal of Toxicological Science*, 3, 429-439.
- 145.Ninomıya, H., Nishikawa, K., Ide, Y., Kondo, J., Kishida, K Yamashita, Y., Watanabe, M. And Sumi, N. (1994b). Reproductive And Developmental Toxicity Studies Of Lactitol (Ns-4) (2)--Teratogenicity Study İn Rats By Oral Administration *The Journal of Toxicological Science*, 3, 441-461.
- 146.Tesh, J.M., Ross, F.W., Wightman, T.J., Wilby, O.K., Weith, A., Watanabe, M. and Sumi, N. (1994). Reproductive and Developmental Toxicity Studies Of Lactitol (Ns-4) (3)--Teratogenicity Study İn Rabbits By Oral Administration. *The Journal of Toxicological Sciences*, 3:463-470.
- 147.Bülbül, N.S. (2021). *Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Ve Fruktozun In Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 2021),50-70.

- 148.Uçar, A., Yılmaz, S., Yılmaz, Ş. and Kılıç, M. S. (2017). A Research On The Genotoxicity Of Stevia In Human Lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 221-224.
- 149.Çadirci, K., Tozlu, Ö. Ö., Türkez, H. and Mardinoğlu, A. (2020). The In Vitro Cytotoxic, Genotoxic, and Oxidative Damage Potentials Of The Oral Artificial Sweetener Aspartame On Cultured Human Blood Cells. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 50(2), 448-454.
- 150.Vasileva, P., Stoyanov, I., Chayleva, E., Staykova, T. and Ivanova, E. (2021, 15-16 April). *Evaluation Of Cytotoxic and Genotoxic Effects Of Commonly Used Food Additives On The Root Meristem Cells Of Allium Cepa*. 5th Balkan Scientific Conference On Biology, Plovdiv, Bulgaria.
- 151.Silva, M. R., Moya, C. Á., León, A. G. S., Velasco, R. R. and Flores, A. M. C. (2018). Genotoxic Activity Of Saccharin, Acesulfame-K, Stevia and Aspartame-Acesulfame-K In Commercial Form. *Journal Of Clinical Toxicology*, 8(386), 2161-0495.
- 152.Jiang, J., Qi, L., Wei, Q. And Shi, F. (2018). Effects Of Daily Exposure To Saccharin Sodium and Rebaudioside A On The Ovarian Cycle and Steroidogenesis In Rats. *Reproductive Toxicology*, 76, 35-45.
- 153.Rencüzoğulları, E., Tüylü, B. A., Topaktaş, M., İla, H. B., Kayraldız, A., Arslan, M. ve Diler, S. B. (2004). Genotoxicity Of Aspartame. *Drug And Chemical Toxicology*, 27(3), 257-268.
- 154.Temizkan, S., Deyneli, O., Yaşar, M., Arpa, M., Güneş, M., Yazıcı, D. ve Yavuz D.G.(2015). Sucralose Enhances GLP-1 Release And Lowers Blood Glucose In The Presence Of Carbohydrate In Healthy Subjects But Not In Patients With Type 2 Diabetes. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 69,162-166.
- 155.Prasath, D. and Muthu, S. (2013). Detection Of Genotoxicity And Chromosomal Aberrations Induced By Furan and Monosodium Glutamate In Allium Cepa. *South Asian Journal Of Biological Science*, 3(1), 11-24.
- 156.Adeyemo, O. A. and Farinmade, A. E. (2013). Genotoxic And Cytotoxic Effects Of Food Flavor Enhancer, Monosodium Glutamate (MSG) Using Allium Cepa Assay. *African Journal Of Biotechnology*, 12(13), 1459-1466.
- 157.Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S. and Mukherjee, A. (2008). Genotoxicity Testing Of Lowcalorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, And Saccharin. *Drug And Chemical Toxicology*, 31(4), 447-457.
- 158.Gomes, K.M.S., De Oliveira, M.V.G. A., Carvalho, F. R. D., Menezes, C. C. and Peron A. P. (2013). Citotoxicity Of Food Dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Trazazine Yellow (E-102) On Allium Cepa L. Root Meristematic Cells. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33 (1): 218-223.

- 159.Hassan, G.M. (2010). Effects Of Some Synthetic Coloring Additives On DNA Damage and Chromosomal Aberrations Of Rats. *Arab Journal Of Biotechnology*, 13(1),13-24.
- 160.Riss, T.L. and Moravec, R.A. (2006). Cell Proliferation Assays: Improved Homogeneous Methods Used To Measure The Number Of Cells In Culture. *Cell Biology*. Celis J.E.(Editör). Burlington: Elsevier Academic Press.
- 161.Riss, T.L. and Moravec, R.A. (2004). Use Of Multiple Assay Endpoints To Investigate The Effects Of Incubation Time, Dose Of Toxin and Plating Density In Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay And Drug Development Technologies*, 2, 1, 51- 62.
- 162.Şekeroğlu, V., Aksoy, M. and Atlı Şekeroğlu, Z. (2017). Cytogenetic Alterations In Human Lymphocyte Cultures Following Exposure To Ofloxacin. *Drug And Chemical Toxicology*, 40(2), 140-145.
- 163.Kartal, A. (2015). *Benzil Benzoatın Sitotoksitesinin İn Vitro Koşullar Altında Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2015).30-38.
- 164.Oliveira, V. A., Alves De Oliveira, V. M., De Oliveira, T. W. N., Damasceno, A. N. C., De Oliveira Silva, C. E., Medeiros, S. R. A., Soares, B. M., Da Silva, F .C. C., De Aguiar, R. P. S., Islam, M. T., Melo-Cavalcante, A. A. C., Peron, A. P. and E Sousa, J. M. C. (2017). Evaluation Of Cytotoxic and Mutagenic Effects Of Two Artificial Sweeteners By Using Eukaryotic Test Systems. *African Journal Of Biotechnology*, 16(11), 547-551.
- 165.Van Eyk, A. D. (2015). The Effect Of Five Artificial Sweeteners On Caco-2, HT-29 and HEK-293 Cells. *Drug And Chemical Toxicology*, 38(3), 318-327.
- 166.Wu, X., Wang, B., Chen, T., Gan, M., Chen, X., Chen, F., Wei, H. and Xu, F. (2014). The Non-Cytotoxicity Characterization Of Rebaudioside A As A Food Additive. *Food And Chemical Toxicology*, 66, 334-340.
- 167.Azab, M., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., Hawamdeh, H., Quttina, M. And Nassar, L. (2017). Assessment Of Genotoxicity Of Pyrethrin In Cultured Human Lymphocytes. *Drug And Chemical Toxicology*, 40(3), 251-255.
- 168.Rodríguez-Mercado, J. J., Mosqueda-Tapia, G. and Altamirano-Lozano, M. A. (2017). Genotoxicity Assessment Of Human Peripheral Lymphocytes Induced By Thallium (I) and Thallium (III). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99, (5-6), 987-998.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ebru EKER

Uyruğu : Türkiye

Doğum tarihi ve yeri Cumhuriyeti :

Medeni hali :

e-posta :

Eğitim Bilgileri

DERECE	BİRİM	BÖLÜM	MEZUNİYET
Y.LİSANS	Amasya Üniversitesi	Biyoteknoloji	2023
ÖNLİSANS	Amasya Üniversitesi	Optisyenlik	DEVAM
LİSANS	Afyonkocatepe Üniversitesi	Gıda Mühendisliği	2015
LİSE	Atatürk Anadolu Lisesi / Çorum	Fen Bilimleri	2010

Tebliğler

Kartal E. E . Avuloğlu-Yılmaz E. (2021). *Determination of genotoxic effects of mannitol in human lymphocytes by in vitro cytokinesis block micronucleus test*. 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara, Turkey, 24-26 November.

