



T.C.

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA KATKI MADDELERİ OLAN SODYUM ASETAT VE SODYUM
SÜLFİT'İN *IN VITRO* İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PINAR ALTUNKAYNAK

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ECE AVULOĞLU YILMAZ

**AMASYA
HAZİRAN 2023**

T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**GIDA KATKI MADDELERİ OLAN SODYUM ASETAT VE SODYUM
SÜLFİT'İN *IN VITRO* İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Pınar ALTUNKAYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

AMASYA
HAZİRAN 2023

PINAR ALTUNKAYNAK tarafından hazırlanan “**GIDA KATKI MADDELERİ OLAN SODYUM ASETAT VE SODYUM SÜLFİT’İN *IN VITRO* İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ

Bilgisayar Teknolojileri Bölümü, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Amasya Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof.Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Ekrem BÖLÜKBAŞI

Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, Suluova Meslek Yüksekokulu, Amasya Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 22.05.2023

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

.....

Prof. Dr. Ayşe Şahin Yağlıoğlu
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.



Sevgili aileme

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Sağlık 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,
- bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Pınar Altunkaynak

20.06.2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden bu yana bana her zaman destek olan, değerli bilgisinin yanı sıra sabrını, emeklerini, güler yüzünü asla esirgemeyen, tecrübesi ile bana yol gösteren danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ece Avuloğlu Yılmaz'a, Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının tüm akademik ve idari personeline; bilgileriyle bana yeni bir ufuk açan tüm saygıdeğer bölüm hocalarıma teşekkür, minnet ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar ortamında desteklerini esirgemeyen, iyi bir ekip olduğumuz sevgili çalışma arkadaşlarım Ebru Eker Kartal ve Öznur Günaydın'a,

Düşünmenin yazmaktan daha uzun zaman aldığı bu süreçte bana daima destek olan varlıklarını hissettiren canım kardeşlerim İsmail Bayer ile Şeymanur Bayer'e ve tez yazım sürecinde beni her daim yüreklendiren kadim dostum Şefika Selçuk'a,

Hayatımın her anına güzellikleri dokunan, gözümü açtığım andan itibaren her konuda yardımlarını esirgemeyen, koşulsuz sevgilerini hissettiren, en büyük güç kaynağım ve şansım olan annem Aynur Bayer'e, babam Alaaddin Bayer'e ve saygıdeğer babaannem Halise Bayer'e,

En büyüğü ise bu süreçte her an yanımda olan, gösterdiği sabır ve desteğini her zaman kalbimde hissettiğim hayat arkadaşım, sevgili eşim Gökhan Altunkaynak'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin (04.07.2022 tarih ve FMB-BAP 22-0565 numaralı) projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı	3
2.2. Gıda Koruyucularının Kullanım Amaçları	3
2.3. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Hususlar	4
2.4. GKM'nin Güvenli Kullanılması İçin Çalışan Ulusal/Uluslararası Kuruluşlar	4
2.5. GKM'nin E kodu ve Etiketle Belirtilmesi	5
2.6. GKM'nin Sınıflandırılması	6
2.7. Gıda Koruyucuları (Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri)	6
2.7.1. Sodyum asetat (E 262)	7
2.7.2. Sodyum sülfat (E 221)	8
2.8. Genotoksisite Testleri	8
2.8.1. <i>Salmonella</i> /mikrozom mutajenite (AMES) testi	9
2.8.2. Comet testi (comet assay)	9
2.8.3. Kromozom anormallikleri (KA) testi	10
2.8.4. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi	11
2.8.5. Mikronükleus (MN) testi	11
2.9. Koruyucu Gıda Katkı Maddeleriyle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Gereç	14
3.1.1. Test gereçleri	14
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Kültüre edilen insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) testi	17

3.2.2. Kùltùre edilen insan periferel lenfositlerinde mikronùkleus (MN) testi	18
3.2.3. İstatistiksel analizler	19
4. BULGULAR	20
4.1. Sodyum Asetat (SA) Uygulaması	20
4.1.1. Kromozom anormallikleri (KA) testi sonuçları	20
4.1.2. Mitotik indeks (Mİ) sonuçları	23
4.1.3 Mikronùkleus testi sonuçları	25
4.2. Sodyum Sùlfıt (SS) Uygulaması	26
4.2.1. Kromozom anormallikleri (KA) testi sonuçları	26
4.2.2. Mitotik indeks (Mİ) testi sonuçları.....	29
4.2.3. Mikronùkleus testi sonuçları	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	58

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfite LD ₅₀ Değeri.....	16
Tablo 4.1. Sodyum Asetat Uygulamasıyla Periferik İnsan Kan Lenfositlerinde Oluşan Kromozomal Anormallikler ve Elde Edilen Frekanslar	21
Tablo 4.2. SA Uygulamasının Periferik İnsan Kan Lenfositlerinde Mitotik İndeks Frekansları Üzerine Etkisi	24
Tablo 4.3. SA Uygulamasının Periferik İnsan Kan Lenfositlerinde MN ve NBI Üzerine Etkisi	25
Tablo 4.4. Sodyum Sülfite Uygulamasıyla Periferik İnsan Kan Lenfositlerinde Meydana Gelen Kromozom Anormallikleri ve Frekans Değerleri	26
Tablo 4.5. Sodyum Sülfite Uygulamasının İnsan Periferik İnsan Kan Lenfositlerinde Mitotik İndeks Frekansı Üzerine Etkisi	30
Tablo 4.6. SS Uygulamasının İnsan Periferik Lenfositleriyle MN ve NBI Üzerindeki Etkisi	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Sodyum Asetat'ın Yapısal Formülü	14
Şekil 3.2. Sodyum Sülfat'ın Yapısal Formülü.....	15
Şekil 4.1. SA Uygulamasının Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Anormal Hücre Yüzdesi Üzerine Etkisi.....	22
Şekil 4.2. Sodyum Asetat Uygulamasının Periferal İnsan Kan Lenfositlerinde Hücrenin Başına Düşen Anormallik Frekansı Üzerine Etkisi	23
Şekil 4.3. Sodyum Asetat Uygulamasında Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Mitotik İndeks Sonuçları.....	24
Şekil 4.4. Sodyum Asetat'ın İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mikronükleus Üzerine Etkisi	26
Şekil 4.5. Sodyum Sülfat Uygulamasının Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Anormal Hücre Yüzdesi Üzerine Etkisi.....	28
Şekil 4.6. Sodyum Sülfat Uygulamasının Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Hücre Başına Düşen Anormallik Frekansı Üzerine Etkisi	29
Şekil 4.7. Sodyum Sülfat Uygulamasıyla Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Mitotik İndeks Bulguları	30
Şekil 4.8. SS'in Periferal İnsan Kan Lenfositlerindeki Mikronükleus Üzerine Etkisi	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
g	Gram
IU	International Unit
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm ³	Milimetreküp
ppm	Parts Per Million
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
V	Hacim
µl	Mikrolitre
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µmol/litre	Mikromolar/litre
<	Küçük
>	Büyük

Kısaltmalar	Açıklama
ADI	Acceptable Daily Intake
AB	Avrupa Birliği
BHA	Butillenmiş Hidroksiyanozil
BHT	Butillenmiş Hidroksitoluen
BrdU	Bromodeoksiüridin
DMDC	Dimetil Dikarbonat

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GKM	Gıda Katkı Maddeleri
GRAS	Generally Recognized As Safe
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KA	Kromozom Anormallikleri
KKD	Kardeş Kromatit Değişimi
MI	Mitotik İndeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
NBİ	Nükleer Bölünme İndeksi
NDMA	N-nitrosodimetilamin
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
pH	Power of Hydrogen
SA	Sodyum Asetat
SS	Sodyum Sülfat
SCF	Scientific Committee On Food
WHO	World Health Organization

ÖZET

GIDA KATKI MADDELERİ OLAN SODYUM ASETAT VE SODYUM SÜLFİT'İN *IN VITRO* İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ

Pınar ALTUNKAYNAK

Amasya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Haziran/2023
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ece Avuloğlu YILMAZ

Gıdaların, insanlar için hayati bir ihtiyaç olduğu kaçınılmaz gerçeklerden biridir. Fakat gelişen bilim, teknoloji ve endüstri ile ilişkili olarak tüketiciye sunulan hazır gıdalar fazlasıyla kimyasal madde içermektedir. Günümüzde insanların daha çok pratik yiyecekler ve hazır gıdalar talep etmesi nedeniyle gıda koruyucularının kullanımı artış göstermiştir. Gıda katkı maddelerinden olan Sodyum Asetat (SA) ve Sodyum Sülfıt (SS) koruyucular sınıfında yer almaktadır. Bu tez çalışmasında, Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfıt'ın *in vitro* periferel insan kan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) ve mikronükleus testleri (MN) ile genotoksik etkileri incelenmiştir. Ek olarak, bu iki koruyucu katkı maddesinin mitotik indeks (Mİ) ve nükleer bölünme indeksine (NBİ) etkileri de araştırılmıştır. Sodyum Asetat'ın 15,63; 31,25; 62,50; 125,00 ve 250,00; µg/mL, Sodyum Sülfıt'ın 3,91; 7,81; 15,63; 31,25 ve 62,50 µg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyonun etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçta Sodyum Asetat 24 saatlik uygulama süresinde kromozomal anormallikleri en düşük konsantrasyon (15,63 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamasında ise sadece en yüksek konsantrasyonda (250 µg/mL) anlamlı oranda indüklemiştir. Mikronükleus frekansını ise en yüksek üç konsantrasyonda önemli derecede artırmıştır. Mitotik indekste düşüşe neden olmuştur ve bu düşüş 24 saatlik muamele süresinde 15,63; 62,50 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarda önemli iken, 48 saatlik muamele süresinde ise en düşük iki konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda önemlidir. Sodyum sülfıt tüm uygulama sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallikleri ve mikronükleus frekansını (mikronükleus testi için 3,19 µg/mL hariç) istatistiksel olarak anlamlı derece artırmıştır. Benzer şekilde mitotik indeksi uygulanan tüm süre ve konsantrasyonlarda (24 saatlik uygulamada 3,91 µg/mL hariç) azaltmıştır. Her iki gıda koruyucusu da nükleer bölünme indeksinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Elde edilen veriler ışığında Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfıt'ın *in vitro* periferel insan kan lenfositlerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçların farklı hücre grupları ve *in vivo* yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, Gıda katkı maddeleri, Kromozomal anormallikler, Mikronükleus testi

ABSTRACT

THE GENOTOXIC EFFECTS OF SODIUM ACETATE AND SODIUM SULFITE, FOOD ADDITIVES, ON *IN VITRO* HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Pınar ALTUNKAYNAK

Amasya University, Institute of Health Sciences
Department of Molecular Medicine, MSc, June/2023
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ece Avuloğlu YILMAZ

It is one of the inevitable facts that food is a vital need for humans. However, ready-to-eat foods offered to consumers in relation to developing science, technology and industry contain a lot of chemicals. Today, the use of food preservatives has increased since people demand more practical foods and ready-to-eat foods. Sodium Acetate (SA) and Sodium Sulphite (SS), which are food additives, are in the class of preservatives. In this thesis, the genotoxic effects of sodium acetate and sodium sulphite were investigated by chromosomal aberration (CA) and micronucleus assays (MN) in peripheral human blood lymphocytes *in vitro*. In addition, the effects of these two preservative additives on mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI) were also investigated. The effects of five different concentrations of Sodium Acetate (15.63, 31.25, 62.50, 125.00 and 250.00 µg/mL) and Sodium Sulphite (3.91, 7.81, 15.63, 31.25 and 62.50 µg/mL) were evaluated. As a result, sodium acetate significantly induced chromosomal aberrations at all concentrations except the lowest concentration (15.63 µg/mL) at 24-hour treatment and only at the highest concentration (250 µg/mL) at 48-hour treatment. Micronucleus frequency was significantly increased at the three highest concentrations. It caused a decrease in mitotic index and this decrease was significant at concentrations of 15.63, 62.50 and 250 µg/mL at 24 h treatment time, while it was significant at all concentrations except the two lowest concentrations at 48 h treatment time. Sodium sulphite significantly increased chromosomal abnormalities and micronucleus frequency (except 3.19 µg/mL for micronucleus test) at all treatment times and concentrations. Similarly, mitotic index was decreased at all times and concentrations (except 3.91 µg/mL for 24 h treatment). Both food preservatives did not cause any change in the nuclear division index. In the light of the data obtained, it was concluded that Sodium Acetate and Sodium Sulfite may have cytotoxic and genotoxic effects on peripheral human blood lymphocytes *in vitro*. These results should be supported by different cell groups and *in vivo* methods.

Key Words: Food additives, Genotoxicity, Chromosomal abnormalities, Micronucleus test.

1. GİRİŞ

Gıdaların, insanlar için vazgeçilemez ve ertelenemez olan hayati ihtiyaç olduğu bilinen gerçeklerden biridir. Fakat gelişen bilim, teknoloji ve endüstri ile ilişkili olarak tüketime sunulan gıdalar birden fazla kimyasal madde içermektedir. İçerdiği kimyasal maddelerin birçoğu besinin doğal bileşenleridir. Bunlar karbonhidrat, protein, yağ, vitamin ve minerallerdir. Ancak günümüzde insanların daha çok pratik yiyeceklere ve hazır gıdalara yönelmesi nedeniyle işletmelerin gıda raf ömrünü uzatabilmek amacıyla gıda koruyucularını kullanımı artmıştır. Besinlerin üretim ve tüketim ilişkileri, gıda koruyucularının kullanımını günümüzdeki yaşam koşulları için elzem bir hale gelmiştir. Ancak, yapılan araştırmalar koruyucuların çeşitli canlılarda genotoksik ve karsinojenik riskler oluşturabileceğini göstermeye başladığından bu yana, bu konularda yapılan araştırmalar artış göstermiş ve gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımına da kısıtlamalar getirilmiştir [1].

GKM, farklı amaçlar için tercih edilen kimyasal maddelerin içerisinde en fazla dikkat çeken grupların başında gelir. GKM, bireyin kendi isteği dışında yaşamı boyunca maruz kaldığı maddelerdir. GKM yüzeysel olarak “yiyeceklerin özelliklerini istenilen şekilde etkileyebilmek için kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Besinlerin üretim aşamasından tüketim aşamasına kadar olan süreçte tat, koku, lezzet ve görünüş gibi yapısal özelliklerinin korunmasını sağlamak ve artırmak amacıyla kullanılan maddelerdir [1].

GKM aşırı miktarda veya duyarlı olan risk grupları tarafından tüketildiği zaman toksikolojik açıdan risk yaratabilmektedir. GKM’nin fazla tüketiminin canlılar için riskli olduğunu söyleyebilmek mümkündür. Böylece bir GKM’nin güvenilir olup olmadığına ilişkin herhangi oluşan bir belirsizlik tüketici grubunun risk konusunda şüphelerini artırabilir. Oluşturdukları tehlikeler uzun bir dönem sonrasında ortaya çıkabilmektedir. Bu durumda da daha çok kronik hastalıklara sebebiyet vermektedir. Böylece gıda sektöründe tercih edilecek GKM’nin, kısa vadede veya uzun vadede bedende birikme olasılığının ortaya çıkaracağı zararların göz önünde bulundurularak buna göre kullanılması gereken konsantrasyonun ayarlanması gerektiği vurgulanmıştır [2].

Toksikoloji sürekli gelişen bir alan olup tıp biliminin bir dalıdır. Hipokrat dahil olmak üzere tıp tarihinde yer alan tüm önemli isimler toksikoloji bilimine katkı sağlamışlardır. Toksikolojide en çok öne çıkan hekim ise 16. Yüzyılın önemli bilim insanı

olan İsviçreli Paracelsus'tur. Paracelsus "Her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur. Zehirle ilacı ayıran ise dozdur" deyiimiyle modern toksikolojide temel olan doz-yanıt ilişkisine dikkatleri çeken bilim insanı olmuştur. Toksikoloji bilim dalı bugünkü konumuna ortalama son elli yıldaki bilimsel gelişmeler sayesinde ulaşmıştır [3-4]. Toksikolojinin bir alt dalı olan genotoksisite; fiziksel veya kimyasal ajanlar (mutajen ve kanserojenler) tarafından genetik materyalde hasar oluşumunu kapsayan genel bir terimdir. Genom veya DNA'nın kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere sebebiyet vermesi ise genotoksik etki olarak ifade edilmektedir [5].

Genotoksik etkiye sahip ajanların neden olduğu çeşitli sağlık sorunlarının artışı, bu ajanların belirlenmesini sağlayan kısa süreli genotoksisite testlerinin gelişmesine sebep olmuştur. Kısa süreli genotoksisite testleri, dünyanın her yerinde geçerliliğini kabul ettirerek, GKM'nin karsinojenik ve genotoksik potansiyellerin tespitinde en çok tercih edilen testler haline gelmişlerdir. Bahsi geçen genotoksisite testleri arasında en sık kullanılan testler mikronükleus (MN) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD), comet testi ve kromozomal anormallikleri (KA) testleridir [6].

Bu tez çalışmasının amacı, gıdalarda sık sık kullanılmasına rağmen genetik etkileri yönünden yok denecek kadar az sayıda çalışma bulunan koruyucu gıda katkı maddelerinden Sodyum Asetat (SA) ve Sodyum Sülfat (SS)'in insan periferik lenfosit kültüründe kromozom anormallikleri ve mikronükleus testi ile genotoksik etkilerini araştırmaktır. Bu araştırmanın, söz konusu iki koruyucu GKM'nin kullanımına ilişkin verilen veya verilecek olan izinlerin güncellenip, üretici ve tüketici bakımından farkındalığın artırılmasında büyük bir öneme sahip olduğu, diğer yandan da Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfat ile yapılacak daha sonraki araştırmalara temel olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı

Latince dilinde ‘addere’ olan katkı kelimesi ‘katmak’ sözcüğünden türemiştir. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu’nun (Codex Alimentarius Commission-CAC) raporunda GKM "yalnız başına yiyecek olarak tüketilmeyen ve gıdaların basit bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, uygulama, hazırlama, ambalajlama, paketleme, koruma, taşıma ve depo adımlarında, gıdalara teknolojik sebeple eklenen, bu besinlerin içerisinde ya da yan ürününde dolaylı veya doğrudan olarak gıdaların bileşeni haline gelen ya da bunların karakteristiklerini değıştiren maddelerin tamamı" şeklinde anlatılmıştır [7].

Yaşamımıza devam edebilmek için en temel ihtiyacımız beslenmedir. Zamanın hızlı akışı içerisinde besin tercihlerimiz de gittikçe değışmektedir. Tüm dünyada ve ülkemizde daha pratik, daha kolay tüketilebilen ürünlere istek hızla artmaktadır. Bununla birlikte hazır gıda piyasası gün geçtikçe gelişip, üretim şirketleri tarafından gıda katkı maddeleri daha fazla miktarda kullanılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin bu şekilde kullanımının sonucu olarak üreticilerin ve tüketen bireylerin bilinçli olmadığı toplumlarda gıda katkı maddeleri insan sağlığı açısından ciddi genotoksik riskler oluşturmaktadır [8]. Gıda katkı maddelerinin oluşturduğu karsinojenik ve genotoksik riskler genelde uzun vadede ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle vücutta depolanma ihtimalleri göz önünde bulundurulmalı ve kullanım konsantrasyonları dikkatle ayarlanmalıdır [2].

2.2. Gıda Koruyucularının Kullanım Amaçları

Gıda koruyucuları, besinin kalitesini ve lezzetini koruyarak raf ömrünü uzatarak ekonomik kaygıları azaltırlar. Besinlere eklenen koruyucu gıda katkı maddeleri küf, hava, mantar, bakteri ve mayaların sebep olduğu bozulmayı yavaşlatır. İstenmeyen koku oluşumunu engellerler. Doğal renk ve aromayı korumak amacıyla kullanılırlar. Koruyucu olarak kullanılan antioksidanlar, yiyeceklerin içindeki katı ve sıvı yağların bayatlamasını veya tadındaki değışiklikleri, enzimatik kararmayı engellemek amacıyla ilave edilen koruyucu maddelerdir [9]. E vitamini (Tokoferoller) ve C vitamini (askorbik asit) gibi doğal antioksidanlar, galler gibi sentetik antioksidanlar kullanıldıkları besini havadaki oksijenin etkilerinden koruyarak sağlığa zararlı hale gelmesini engellerler [8].

2.3. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Özellikler

Bir katkı maddesinde aranılan nitelikler;

1. Var olan bilimsel kanıt temelli kullanma derecesi tüketici sağlığı bakımından güvenlik riski doğurmayacaksa,
2. Ekonomi ve teknoloji açısından yapılabilir başka metotlarla uygulanamayacak teknolojik bir ihtiyaç var ise,
3. Kullanımıyla tüketici bireyi yanıltmıyorsa, gıda katkı maddelerinin kullanımına onay verilir [7].

2.4. GKM'nin Güvenli Kullanılması İçin Çalışan Ulusal/Uluslararası Kuruluşlar

1. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC): Bu kuruluş Birleşmiş Milletlere bağlı olarak çalışır. Bu kuruluşun faaliyetleri, dünya çapında besinlerle ilgili uygulamaların sağlık açısından ve teknoloji bakımından standardize edilebilmesidir.
2. Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA): Bu komite, GKM için bilimsel verilerin tamamını inceleyip değerlendirmeler yapmaktadır. ADI yani kabul edilebilir günlük alım miktarı değerlerini tespit etmektedir.
3. Pestisit FAO/WHO Ortak Toplantısı (JMPR): Besin içeriğinde pestisit kalıntılarını değerlendirmeye alan aynı zamanda besinlerin günlük alımında insan sağlığına önemli seviyede zarar vermeyecek maksimum pestisit miktarını belirleyen bir kuruluştur.
4. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA): Avrupa Birliği'nin (AB) besinlerle ilgili hijyen, beslenme ve toksikoloji konularından sorumlu olan komitesidir. Besin zincirindeki tüm tehlikeyle ilgili iletişimi ve değerlendirmeyi yapmakla sorumludur.
5. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA): GKM'nin güvenli kullanılması amacıyla faaliyet gösteren uluslararası kuruluşların başında gelip en uzun tarihe sahip olan kurumdur. Amerika'ya ait bir ulusal kuruluş olmasına rağmen dünya çapında referans olarak gösterilen bir kuruluştur [10-11].

2.5. GKM'nin E kodu ve Etiketle Belirtilmesi

Gıda katkı maddelerinin isimlendirildiği numaralar, Avrupa Birliği (AB)'nin alt komitesi olan "Scientific Committee on Food (SCF)" tarafından yapılmaktadır [12]. GKM'nin standartlaştırılması amacıyla Avrupa Birliği tarafından Europe kelimesinin baş harfi olan "E" kullanılarak E kodları oluşturulmuştur. Oluşturulan E kodları GKM konusunda çalışan uluslararası kuruluşların ortak çalışması sonucu oluşmuştur [13]. E ile başlayıp yanına sayılar eklenerek kodlanır [14]. Tüketicinin sağlığı bakımından Avrupa Birliği, E kodu bilinen GKM'nden tercih edilmesini öncelik verilmesini tavsiye etmektedir.

"E" numara kod listesi ile katkı maddesinin ana fonksiyonlarına bağlı sınıflandırılması şu şekilde özetlenebilir [15]:

- E100 –199 Renklendirici maddeler
- E200 –299 Koruyucu maddeler
- E300 –399 Antioksidan - Asitlik Düzenleyici maddeler
- E400 –499 Kıvam Arttırıcı – Stabilizatörler – Emülgatör maddeler
- E500 –599 Asitlik Düzenleyiciler - Topaklanma Önleyici maddeler
- E600 –699 Lezzet(Aroma) Arttırıcı maddeler
- E700 –799 Antibiyotik maddeler
- E800 –899 Yedek isimler yelpazesi
- E900 –999 Parlatici - Gazlar – Tatlandırıcı maddeleri
- E1000 –1599 Diğer Gıda Katkı Maddesi

E kodu metoduyla GKM'nin kodlanması bazı kolaylıkları beraberinde getirmiştir [16]:

- Bazı GKM'nin kimyasal adı çok uzundur (örneğin kalsiyum-sodyum etilen-diamintetraasetat). Böylece bu gibi GKM'nin küçük paketli gıdalarda etikette yazılması, yazılsa bile okunması çok güçtür. GKM'nden birçoğunun kimyasal adı da tüketicilerin birçoğu için anlam ifade etmemektedir (sorbitan monostearat vb.). E kodu ile GKM'nin ambalajlara yazılması daha kolay hale gelmiştir.
- GKM'nden birçoğunun birden çok adı veya sinonimi vardır. Örneğin kurkimin, turmerik, ve safran isimleri aynı renklendiriciye aittir. Karmoisin ve azorubin de aynı durumdadır. Bu nedenle aynı GKM'sini farklı üreticiler farklı isimlerde belirtme olasılıkları bulunmaktadır. E kodu kullanılmasıyla aynı kod tüm dünyada

aynı anlama gelmekte ve uluslararası ortak bir iletişim dili oluşturmaktadır. Bu durum piyasada uluslararası besin ticaretini kolaylaştırmaktadır [14].

2.6. GKM'nin Sınıflandırılması

GKM işlevlerine göre 4 alt başlıkta toplanabilir.

- Raf Ömrü Uzatan Gıda Katkı Maddeleri
- Duyusal Özellikleri Farklılaştırmak İçin Kullanılan Gıda Katkı Maddesi
- İşlem Yardımcı Gıda Katkı Maddesi
- Besinin Değerini Fazlalaştırmak İçin Kullanılan Gıda Katkı Maddesi

2.7. Gıda Koruyucuları (Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri)

Gıda koruyucuları, gıdaların raf ömrünü uzatan ve besin değerini koruyan gıda katkı maddeleridir. 2013 yılında ve 28693 numaralı Resmi Gazetede yayımı yapılarak tedavüle giren Türk Gıda Kodeksi GKM Yönetmeliğinde; “Besinleri, bakterilerin sebebiyet verdiği bozukluklara ya da patojen olan mikroorganizmaların oluşumlarına karşı koruyup gıdaların raftaki ömür süresinin artırılmasını sağlayabilen maddeler” tanımıyla ifade edilmiştir [7]. Tarım uygulamalarındaki farklılıklar, dayanıksız gıdaların tüketicinin beslenmesinde fazlaca bulunması, gelişen dağıtım sisteminde bakterilerin bulaşması yani kontaminasyon ihtimalinin çoğalması; pratik ve basit besinlere yönelim, gıdayı muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesini kalıcı hale getirmiştir. Gıda sektöründe kullanılan muhafaza tekniklerinin önde gelenleri başlıca ısıtma, dondurma, kurutma ve ışınlamadır. Fakat bu işlemlerin uygulanmadığı veya eksik kaldığı durumlarda gıdalara koruyucu madde katılması söz konusudur. Gıda koruyucuları, gıdada bakteri, maya ve küf gibi mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara engel olarak; gıdanın muhafaza süresini uzatan kimyasal maddeler olarak ifade edilmiştir. Örneğin; sirke, tuz ve şeker geçmişten bugüne mikrobiyal bozulma oluşumunu engelleme amacıyla tercih edilmesine karşın bu maddeler gıda katkı maddeleri olarak ifade edilememektedir. Mikrobiyal bozulma, farklı tür bakterilerin hareketleri sonucu besin güvenilirliğinin gittikçe azalmasıdır. Besinlerin içeriğinde bulunan karbonhidrat, protein, vitamin, mineral ve su gibi bileşenler bakterilerin gelişebilmesi için uygun bir alan oluşturmaktadır. Ayrıca gıdanın oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, su aktivesi ile pH değeri de önemlidir. Mikrobiyal bozulmadan etkilenen en önemli gıdalar; sebzeler, meyveler, meyve suyu, süt ve süt ürünü, tahıl ve tahıl ürünü ile etlerdir [13].

Gıda koruyucusu olarak kullanılan gıda katkı maddeleri genelde antimikrobiyal maddeler şeklinde de ifade edilmektedir. Antimikrobiyal yani koruyucu maddeler, gıdanın bünyesinde yer alan bakterilerin gelişmesini önleyen maddelerdir. Koruyucu maddeler, bakterilerin büyümesini –statik yani durdurucu (bakteriyostatik, fungistatik) ve –sidal yani öldürücü (bakteriyosidal, fungisidal) etki olmak üzere iki farklı şekilde engellemektedirler [17].

Gıda koruyucularının etki mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

1. Mikroorganizmaların genetik sisteminin etkilenmesi,
 - Protein sentezinin inhibisyonu,
 - Replikasyon ve transkripsiyonun inhibisyonu,
2. Mikroorganizmaların hücre çeperine veya membranına etkisi,
3. Mikroorganizmaların enzimlerinin inhibisyonu [17].

2.7.1. Sodyum asetat (E 262)

Asetik asidin sodyum tuzu formunda olup susuzdur. Sodyum Asetat (SA), asetat ve sodyum iyonu (Na^+) oluşturmak üzere suda ayrışır. Sodyum, hücrenin dış sıvısının ana katyonudur. Elektrolit ve sıvı replasman tedavisinde önemli bir değere sahiptir. SA susuz, normal elektrolit ayarını bozmadan hücrenin dış sıvısının akut kayıplarının parenteral olarak değiştirilmesi amacıyla izozmotik solüsyonda bir elektrolit takviyesi olarak da kullanılır [18].

SA kimyasal olarak suda hemen çözünür ve higroskopik toz formundadır. Formülü CH_3COONa şeklindedir. Gıda koruyucusu olarak kullanılmasının yanı sıra ısıtma yastıkları, endüstri, tampon çözeltiler ve beton imalatında da kullanılabilen bir maddedir. Tıbbi olarak SA intravenöz olarak verildiğinde bir elektrolit takviyesi olarak önemli bir yere sahiptir. Asıl hiponatremik hastaların sodyum düzeylerini dengelemek için endikedir. Metabolik asidoz ile idrar alkalizasyonunda da tercih edilebilir [18]. SA bromoetan gibi alkilerle beraber ester oluşturmak için tercih edilebilir. Sezyum tuzları reaksiyonunu kataliz eder [19].

Türk Gıda Kodeksi'ne göre Sodyum Asetat'ın kıymadan hazırlanan et karışımları, hazır ambalajlı ve katkı maddeleri veya tuz haricinde diğer bileşenlerin eklendiği hazırlanmış et karışımlarında kullanımına izin verilmektedir [20].

2.7.2. Sodyum sülfid (E 221)

Formülü Na_2SO_3 şeklindedir. Sülfirik Asit'in sodyum tuzu formundadır. Sodyum Sülfid; en düşük ağartıcı ve oksitleyici faktörler kadar iyi olan gıdaların bozulmasını ve renksizleşmesini engelleyen koruyucu gıda katkı maddesidir. Renksizleşmeyle nitelenen bakteriyel bozulmayı maskeler. Etin içerisinde kararmayı önleyebilmesine rağmen et ürünlerinin içerisinde kullanımına izin verilmemektedir. Yumurta sarısı içeren ürünler ile bira, salatalar, karamel ve ekmek gibi besinlerde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır [21].

Sodyum Sülfid, indirgeme özelliğine sahip beyaz bir kristal veya toz halinde olup, kokusuzdur. Suda batabilir ve yavaşça çözünür. Gıda koruyucu ve indirgeyici ajan olarak bir role sahiptir. İnorganik bir sodyum ve sülfid tuzudur. Sodyum Sülfid ağartma, kükürt giderme ve klor giderme aktiviteleri sergiler. Bu koruyucu gıda katkı maddesi, gıda endüstrisi tarafından gıda ürünlerinin taze görünümünü korumaya yardımcı olmak için kullanılmıştır. Aynı zamanda, birçok ilacın, etkilerini ve stabilitesini korumaya yardımcı olan bir bileşendir [22].

2.8. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite testleri yaklaşık 50 yıldan beri kullanılmaktadır ve her geçen gün daha fazla uygulama alanı bulmaktadır. İnsanlar, teknolojinin gelişimiyle beraber günlük hayatta veya iş hayatında genotoksik ajanların karsinojenik ve mutajenik etkisine maruz kalmaktadırlar. Çağımızda kimyasal madde tüketiminin tüm alanlarda hızla çoğalması sonucunda bunların insan genomunda negatif etkisi olup olmasının saptanması fazlasıyla önem kazanmıştır. Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların kromozom anormalliklerine, mutasyonlara, DNA hasarına neden olup olmadığını saptayabilmek ve bu ajanların etki mekanizmalarını kavrayabilmek amacıyla yapılmaktadır. Bunun için farklı *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır [23]. Genelde tercih edilen genotoksisite testleri şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Mikronükleus Testi
- Kromozom Anormallikleri (KA) Testi
- Ames Testi
- Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi
- Comet Testi

2.8.1. *Salmonella*/mikrozom mutajenite (AMES) testi

Ames testi, *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi olarak da isimlendirilir. Bu test, kimyasal maddenin mutajenik ve karsinojenik etkisinin araştırılmasında uygulanır. Test değişkenleri açısından iyi standardize edilmiştir. Mutajen ile karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en çok uygun görülen bakteriyel test protokollerinden biridir. Çabuk sonuç vermesi, uygun fiyatlı olması ve uygulanabilirliğinin basit olması sebebiyle çok yaygın uygulama alanına sahiptir. Ames testi, *S. typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneğini mutasyon ile kaybetmiş suşlarının, test maddesiyle uygulandıktan sonra ikinci mutasyon geçirip histidini sentezleme özelliğini tekrar kazanmasına ve histidinsiz ortamda üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Histidinsiz ortamda üreyebilen koloniler sayılıp mutajenitesi belirlenmektedir [6]. DNA ile kimyasalların etkileşimlerini engelleyerek karsinojenik etkilerini ve mutajenik etkilerini yok eden antikarsinojenik ile antimutajenik maddelerin tayininde de sık sık uygulanmaktadır. Ames testi, biyokimya uzmanı Bruce Ames aracılığıyla 1970 yılında geliştirilen bir testtir. Bu testte, *Escherichia coli* mutant suşları da kullanılmaktadır [6].

2.8.2. Comet testi (comet assay)

Son zamanlarda gelişen comet testi yöntemi, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlarının sebep olduğu tek ve çift zincirli DNA kırıklarının saptanabilmesi amacıyla kullanılan pratik, hızlı, güvenilir ve hassas bir metottur. Single cell gel electrophoresis (comet assay) metodu olarak da isimlendirilen, birden çok memeli hücresinde farklı kimyasal ajanlar ile fiziksel ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan araştırma çalışmalarında tercih edilmektedir. DNA kırıklarının tayini prensibinden kaynaklanan bu metot, birden çok fiziksel mutajen ile kimyasal mutajenin bilhassa canlılarda neden olduğu DNA hasarının tayininde kullanılmaktadır. Bazı hastalıklarda (kanser gibi) artan DNA hasarını tespitinde tercih edilen bir biyoizlem metodudur. Diğer taraftan genotoksik maddeleri önce etki bölgelerinde değerlendirebilmesi, ökaryotik hücrelerin neredeyse tamamında uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesinin ölçülebilmesi, çok az hücre örneği gerektirdiği için hızlı, pratik, basit ve uygun bir metot olması gibi avantajlarından dolayı yaygın bir kullanım çerçevesine sahiptir. Bu test, DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasını sağlar [6,24,25].

2.8.3. Kromozom anormallikleri (KA) testi

Kromozomal anormallik (KA) testi, yapısal kromozom anormallikleri ile sayısal kromozom anormalliklerini belirler [26]. Genellikle KA testinde, *in vitro* mitojen ile uyarılan Çin hamster fibroblast kaynaklı (CHO ve CHL) hücre hatları ve insan periferik kan lenfositleri kullanılarak yapılan kültürler çok tercih edilmektedir [27]. Bu yöntem kimyasal ajanların genotoksikite çalışmalarında Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından onaylanmış bir yöntemdir (Test no:473). Tüm hücre siklusunda sadece bir çekirdekte ortalama 5000 adet DNA tek zincir kırığı oksidanlar tarafından meydana getirilmektedir. Oluşan DNA tek zincir kırıklarının sadece ortalama %1'i çift zincir kırığına dönüşebilmektedir. Bu çift zincir kırıkları onarılamadığında veya yanlış onarıldığında hücre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bunlar kromozom anormalliklerine veya genomik kararsızlığa sebep olurlar. Çift zincir kırıklarının en çok sebep olduğu oluşum kromozom anormallikleridir. Kromozom anormalliklerinin oluşma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde kromozom anormalliklerinin oluşum mekanizmasıyla ilgili iki teori yer almaktadır. Birincisi kırılma ve yeniden birleşme teorisi, ikincisi ise değiş-tokuş (exchange) teorisidir. Birinci teoriye göre kromozomlardaki kırıklar;

- Yeniden birleşebilir ve yeniden orjinal yapı oluşabilir,
- Diğer kırıklarla birleşip değiş-tokuş tipi anormalliklere yol açabilir.

Değiş-tokuş teorisine göre anormallikler, tek bir DNA ipliğindeki çift zincir kırığının rekombinasyonel onarımıyla oluşabilir [6]. Genellikle DNA replikasyonu sırasında kimyasal madde tarafından indüklenen ve böylelikle DNA'da oluşan hasarın genotoksik etkiye sebep olduğu saptanmıştır. Çevremizde yer alan genotoksik ajanlar kromozomal mutasyon yolu ile kromozomun yapısında değişikliğe sebep olur. Bu değişiklikler, direkt olarak (DNA zincir kırıkları, bazların hidrolizi, baz hasarı) veya dolaylı olarak (DNA topoizomerazlarının inhibisyonu, ROS, vb.) kromozom değişikliklerine sebep olurlar [28]. Gerçekleştirilen çalışmalarda, periferik kan lenfositlerinde kromozom anormallikleri sıklığı, genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken biyolojik etkileri, kanserin bireysel duyarlılığı yansıtılarak insanlarda kanser riskiyle ilgili bir ilişki olduğu saptanmıştır [29]. Diğer bir deyişle, DNA'ya hasar verebilen maddelere maruz kalan bireyler için kanser riskinin artmasında gösterge olarak göz önünde bulundurulur. Oluşan yüksek kromozom anormallik frekansı sonucu genetik materyalde oluşan hasarlar

onarılmadığında; kanser, doku hasarı, rekombinasyon, mutasyon ve yaşlanma gibi komplike etkiler oluşabilir [23].

2.8.4. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatit değişimi (KKD), kromozomun yapısında farklılık yaratmadan, kardeş kromatitlerin homolog lokuslarının arasında DNA segmentlerinin simetrik değişimi protokolüne dayanan bir metottur [6]. Kardeş kromatit değişimi testinde, DNA kırıklarını görünür yapabilmek için hücre kültürüne timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesi tercih edilir. BrdU ile hücre siklusu esnasında kardeş kromatitlerin arasına girip homolog kromozomdaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi görünür hale getirilmektedir. KKD testi çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların karsinojenik ve mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla deneysel çalışmalarda indikatör test olarak kullanılır. KKD testi, kromozomlarda oluşan yapısal değişimi incelemek yönüyle de fazlaca önem taşımaktadır [6].

2.8.5. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi esnasında meydana gelen, ana çekirdeğe dahil olmayan, asentrik kromozom fragmentlerinden veya bütün bir kromozomdan köken alıp oluşmaktadır [30]. Mikronükleus testi, mitozla çoğalabilen nerdeyse bütün memeli hücre çeşitleri üzerinde *in vivo* ve *in vitro* şeklinde uygulanabilir olması nedeniyle genotoksikoloji çalışmalarında çok kullanılan bir test halini almıştır [31]. MN testinin *in vitro* uygulamasında, uygun olan ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce *in vitro* da ortalama 44. saatinde sitokalsin-B(Cyt-B) maddesi eklenmektedir. Cyt-B sitokinezi inhibe eder. Hücre siklusunu tamamlayan çift nükleuslu olan binükleat hücrelerin oluşumunu gerçekleştirmektedir. İnkübasyonun sona ermesinin sonucunda kültürler protokollere uygun şekilde preparasyona tabi tutulur. Daha sonra preparatlarda mikronükleus barındıran binükleat hücrelerin oranı hesaplanmaktadır [6]. Mikronükleus testi, sitogenetik hasarın tespit edilmesinde kromozom anormalliğine oranla daha basit uygulanması, çok sayıda hücrenin taranması ve sonuçların analiz edilmesinin kolaylığı açısından avantajlıdır [32].

Mikronükleus (MN) testi, günümüzde en çok tercih edilen genotoksikite testlerinden biridir. MN yöntemi anöjenik veya klastojenik etkilerin tespit edilmesinde hızlı ve güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple insanların genotoksik kimyasallara

maruziyetinin belirlenmesinde sık sık tercih edilmektedir [33]. Kimyasal ajanların genotoksitesinin araştırıldığı çalışmalar ile epidemiyolojik çalışmalarda insan periferel kan lenfositlerinde mikronükleus frekansının artış gösterdiği ve kanser insidansı ile arasında önemli bir ilişki olduğu gözlenmektedir. MN oluşum mekanizmasına; iğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenler de yol açabilmektedir [34-35]. MN'ler tüm bir kromozomdan veya asentrik bir kromozom fragmentinden kaynaklanabilmektedir. Tüm kromozomun asıl çekirdekten ayrı kalmasının sebebi ise anafaz evresi esnasında mitotik iğ ipliklerine bağlanamayıp geri kalması veya kardeş çekirdeklerin düzgün bir şekilde ayrılamamasıdır. Tüm kromozom veya geri kalan fragment bir zarla çevrilip MN haline getirilir. Asentrik kromozom fragmentleri, kimyasallar tarafından indüklenen DNA zincir kırıklarının onarımında oluşan hatalardan ya da yanlış onarılmasından kaynaklanabilir [36]. Kimyasalların DNA hasarına neden olan mekanizmaları:

- DNA zincir kırıklarının onarımını inhibe etmek,
- DNA'daki fosfodiester bağını kırmak,
- Çapraz bağlar oluşturmak veya
- DNA eklentilerinden kaynaklanan replikasyon hatalarına sebep olmaktır.

Tüm bunlar asentrik fragmentlerin oluşumuna neden olabilir [37]. MN geri kalan tüm bir kromozomdan oluşuyor ise kimyasallar sentromer ya da diğer mitotik mekanizmalarda hasarlara sebep olabilir. Kimyasal tarafından indüklenmiş olan DNA zincir kırıklarının yanlış onarımı disentrik kromozoma ya da mitozda iki homolog çekirdek arasında oluşan nükleoplazmik köprü oluşumuna yol açabilir. Nükleoplazmik köprüler daha sonra kırılıp ve 'DNA kırığı-füzyon-köprü oluşumu' tekrarlayan döngüsünü başlatıp kromozom kararsızlığına sebep olabilir [37].

2.9. Koruyucu Gıda Katkı Maddeleriyle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Bu çalışmada genotoksik etkileri değerlendirilen Sodyum Asetat'ın ve Sodyum Sülfat'ın genotoksitesinin incelendiği bazı çalışmalar mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada, Sodyum Asetat'ın genotoksik etkisini belirleyebilmek amacıyla yetişkin erkek Sprague Dawley ratlarında (120-150 gram) comet testi uygulanmıştır. *In vitro* şartlarda izole edilmiş lenfositler Sodyum Asetat'ın 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarıyla 1 saat inkübe edilmiştir. Sonuçta DNA hasar yüzdesi konsantrasyona bağlı artış göstermiştir. Ek olarak aynı hücrelerle ve konsantrasyonlarda

MTT ve LDH yöntemiyle Sodyum Asetat'ın sitotoksitesitesi de incelenmiştir. Sonuçta hücre canlılığı azalmış, LDH salınımı da konsantrasyona bağlı artmıştır. Sodyum Asetat'ın incelenen konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik olduğu gözlenmiştir [38].

Farklı bir çalışmada Sodyum Sülfid'in genotoksik etkisini belirleyebilmek için *Drosophila melanogaster*'de SMART ve comet testleri uygulanmıştır. Bunun için yabancı bir suş ve letal bir mutasyon taşıyan suş (wtsMT⁴⁻¹) kullanılmıştır. 100 mM sodyum sülfid verilen *Drosophila melanogaster* suşlarında mutasyon ve tümörigenez indüklenmiş, comet testinde de DNA hasarının kontrole kıyasla anlamlı oranda arttığı gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre Sodyum Sülfid'in bu organizmada genotoksik etkili olabileceği yorumu yapılmıştır [39].

Koruyucu gıda katkı maddelerinden Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfid'in insan periferik kan lenfositlerinde olası genotoksik etkilerini kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri ile inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada GKM'nin koruyucular sınıfından olan Sodyum Asetat (SA) ve Sodyum Sülfat (SS)'in *in vitro* insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sağlıklı iki kadın donörden periferik kan sağlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen donörlerde tercih edilen özellikler;

- Herhangi bir sağlık problemi bulunmamak,
- İlaç, sigara ve alkol tüketmemek,
- Genotoksik ajanlara (minimum 3 ay) maruziyet öyküsü bulunmamak ve
- 22-27 yaş aralığında olmaktır.

Bu çalışma, Amasya Üniversitesi Etik Kurulu'nun 03.06.2021-87 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Test gereçleri

Sodyum Asetat (SA)

Kimyasal adlandırılması: Sodyum Asetat susuz (Sodium Acetate anhydrous)

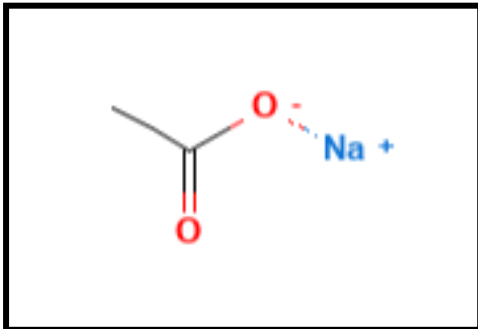
Molekül ağırlığı: 82,03 g/mol

Molekül formülü: CH₃COONa

CAS No: 127-09-3 (Sigma-Aldrich)

Safılık: $\geq 0,99$

Yapısal Formülü: Şekil 3.1.'de verilmiştir [40].



Şekil 1.1. Sodyum Asetat'ın yapısal formülü [40]

Sodyum Sülfid (SS)

Kimyasal adlandırılması: Sodyum Sülfid susuz (Sodium Sulfite anhydrous)

Molekül ağırlığı: 126,04 g/mol

Molekül formülü: Na_2SO_3

CAS No: 7757-83-7

Safılık: $\geq 0,98$

Yapısal Formülü: Şekil 3.2.'de verilmiştir [41].



Şekil 3.2. Sodyum Sülfid'in yapısal formülü [41]

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar:

Mitomisin C (CAS No: 200-008-6), sitokalsin B (CAS No: 14930-96-2), bromodeoksiüridin (CAS No: 59-14-3), NaCl (CAS No: 7647-14-5) Sigma-Aldrich'den alınmıştır.

3.2. Yöntem

Koruyucular grubunda olan Sodyum Asetat ile Sodyum Sülfid'in genotoksik etkileri kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde farklı iki genotoksisite testi kullanılarak belirlenmiştir. Bu testler, Kromozom Anormallikleri (KA) testi ile Mikronükleus (MN) testidir. Ek olarak bu kimyasalların mitotik indeks (Mİ) ve nükleer bölünme indeksine (NDİ) olan etkileri de değerlendirilmiştir.

Araştırmada kullanılacak olan konsantrasyonların belirlenmesi:

JECFA tarafından ve Türk Gıda Kodeksi'ne göre SA ve SS'in ADI değeri (ADI Not Specified) saptanmamıştır. Bundan dolayı insanda tercih edilen miktarlar belli değildir. Gerçekleştirilen bu araştırmada, uygulanan iki testte tercih edilen konsantrasyonların belirlenebilmesinde bu maddelerin literatürde olan LD₅₀ dozu referans edinilmiştir (Tablo 3.1). Söz konusu dozlardan yararlanarak bu araştırmada tercih edilecek konsantrasyonların belirlenebilmesi için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. SA'nın 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00 ve 500,00 µg/mL'lik konsantrasyonları denenip bunların sonucuna göre 15,63; 31,25; 62,50; 125,00 ve 250,00 µg/mL'lik konsantrasyonları tercih edilmiştir. SS'in ön çalışmalarında denenilen tüm konsantrasyonlar 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125,00 ve 250,00 µg/mL olup bunlardan 3,91; 7,81; 15,63; 31,25 ve 62,50 µg/mL'lik konsantrasyonları tercih edilmiştir. Ön çalışmalarda, kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi için mitotik indeks değerleri tespit edilmiştir. Mitotik indeks (MI) kimyasalların sitotoksik ve sitostatik aktivitelerinin tümöral ve normal deney modellerinde değerlendirilebilmesi için yararlı bir biyolojik belirteçtir ve mitoz geçiren hücrelerin oranını ölçer [6].

Tablo 3.1. Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfite LD₅₀ değeri [42-43]

Gıda Katkı Maddeleri	Canlı Türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ Değeri	Kaynaklar
Sodyum Asetat	Fare	Oral	3530 mg/kg	Sigma-Aldrich,
Sodyum Asetat	Tavşan	Dermal	10000 mg/kg	Sigma-Aldrich,
Sodyum Sülfite	Rat	Oral	2610 mg/kg	Sigma-Aldrich,

3.2.1. Kültüre edilen insan periferel lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) testi

Bu çalışmada kullanılan kromozomal anormallik (KA) testi Evans'ın (1984) metodunda birtakım değişiklikler yapılarak uygulanmıştır [44]. Sağlıklı donörlerden alınan ve heparinize edilen kan örnekleri, tüplerde bulunan 2,5 mL Lymphoplus besiyerine 0,2 mL oranında olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra bu tüpler sıcaklığı 37 C'de olan etüve alınıp ve burada 72 saat süresince inkübe edilmiştir. Kültürün başlangıcından 24. ve 48. saatin bitiminde Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfit'in yukarıda verilen konsantrasyonları hücelere uygulanmıştır. Buna ek olarak distile (saf) su negatif kontrol olarak, 0,20  g/mL'lik MMC (Mitomisin-C)'de pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Lenfosit kültürünün 70. saatinde tüm tüpler 10  g/mL kolkisin çözeltisiyle ön işleme tabi tutulmuştur. 72. saatin bitişinde tüpler 1100 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerden süpernatantı attıktan sonra kalan kısma KCl (0,075 M)   zeltisinden 5,0 mL eklenmiştir. KCl   zeltisiyle tüpler 37 C 'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 1100 rpm devirde 10 dakika santrifüj yapılp süpernatant atılmıştır. Daha sonra vorteksle 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatif yavaş yavaş damlatılarak eklenmiştir. Kültür tüpleri 45 dakika +4 C sıcaklıkta bu karışımla birlikte bekletilmiştir. Kültür tüpleri 1100 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilip süpernatantları atılmıştır. Ardından fiksasyon işlemi iki kez daha tekrarlanmıştır. Kültür tüplerinden süpernatant atıldıktan sonra tüplerin diplerinde kalan h celeri pipetaj işlemi yaparak homojen bir karışım haline getirilmiştir. Homojenize edilmiş süspansiyonlar deney başlamadan daha öncesinde temizlenip -20 C 'de muhafaza edilen soğuk lamaların üzerine damlatılıp isimlendirilmiştir. Hazırlanan preparatların tamamı 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması:

Oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış preparatlar, mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinin değerlendirilebilmesi için direkt Giemsa boyası (% 5 Giemsa boyası, pH =6,8) ile boyama işlemine tabi tutulmuştur. Distile saf su serisinde 3 aşamada sudan geçirilen lamalar, dik konuma yakın bir şekilde dizilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduğuna emin olunan preparatların üzerine entellan damlatılarak lamelleri yapıştırılmış böylece preparatlar daimi hale alınarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

Kromozomal anormalliklerin ve mitotik indeks bulgularının saptanması:

Mitotik indeksin (Mİ) saptanması için, tüm konsantrasyonlarda sayılmaya hazır olan preparatlardan bir donörde 2000 hücre olmak üzere iki donörde toplam 4000 hücre incelenmiştir. Mİ belirlenirken bölünebilen hücre sayısının tüm hücre sayısına (4000) oranı yüzdelik cinsinden hesaplanmıştır.

KA'nin değerlendirilmesinde ise her konsantrasyon için kromozomları iyice dağılmış toplam 400 metafaz (her donörde 200 metafaz olmak şartıyla) değerlendirilmiştir. Değerlendirilen tüm hücre sayısının içinde anormal hücre yüzdesi ile hücre başına düşen kromozomal anormalliklerinin sayısı belirlenmiştir.

3.2.2. Kültüre edilen insan periferel lenfositlerinde mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus (MN) testinin uygulamasında Fenech (2000)'in metodu birtakım değişiklikler yapılarak kullanılmıştır [45]. Her iki donörden de alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı engelleyebilmek amacıyla heparinize edilmiştir. Periferel insan kan lenfositlerinin kültüre edilebilmesi amacıyla Lymphoplus besiyeri bulunan kültür tüplerine 0,2 mL kan ekimi yapılmıştır. Tüm kültür tüpleri sıcaklığı 37 °C olan etüvde 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kültüre alınan hücreler Sodyum Asetat'ın 15,63; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00 µg/mL ve Sodyum Sülfid'in 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50 µg/mL'lik konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilmiştir. Ek olarak negatif kontrol (saf distile su) ve pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) her deney setine eklenmiştir. Sitokinezi engelleyebilmek için kullanılan Sitokalsin B (Cyt B)'den 7 µg/mL olacak şekilde tüm kültür tüplerine kültürün 44. Saatinde ekim yapılmıştır. 72 saat bitiminde kültür sonlandırılmış ve hemen 1000 rpm devirde 10 dakika santrifüj yapıp, daha sonra süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerine sırasıyla +4°C bekleyen soğuk KCl (0,075 M) solüsyonundan 5,0 mL eklenerek kültür tüpleri +4°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kültür tüpleri tekrar 10 dakika santrifüj yapıp ardından tekrar süpernatantı atılmıştır. Gerçekleşen işlemlerin ardından 3:1 oranında metanol:asetik asit karışımı ile fiksasyonu yapıp, kültür tüpleri +4°C'de 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Yapılan fiksasyon işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra +4°C'de 10 dakika boyunca tekrar bekletilmiştir ve son fiksatife formaldehit çözeltisi ilave edilmiştir. Ardından 1000 rpm devirde santrifüj yapıp kültür tüplerindeki süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde kalan hücreler pipetaj işlemiyle homojenize edilmiştir. Bu homojenize edilmiş süspansiyon daha

önceden temizlenmiş -20 °C’de bekletilen soğuk lamaların üzerine damlatılıp isimlendirilmiştir. Tamamlanan preparasyonun ardından lamalar 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması:

MN testi için hazırlanan preparatlar %5 Giemsa boyasıyla (pH=6,8) 15 dk boyunca boyanmıştır. 3 aşamalı distile suda sırasıyla fazla boyadan arındırılan preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından entellanla kullanımı sonsuzlaştırılmıştır. Kurumaya bırakılan preparatlar hazır hale gelince mikroskopta incelemeye alınmıştır.

Mikronükleus (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) bulgularının saptanması:

MN belirlenmesinde çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesi Sitokalsin-B(Cyt B) ile engellenen binükleat hücreler incelenir. İki sağlıklı donöre ait tüm preparatlardan 2000’er tane (toplam 4000 tane) çift çekirdekli hücre incelenmiştir. Yapılan araştırmada MN içeren hücreler 1 MN, 2 MN ve 3 MN içerenler olmak üzere sayılıp, $[1 \times (1MN) + 2 \times (2MN) + 3 \times (3MN + 4MN)] / N$ (N değerlendirilen tüm hücre sayısı) formülü kullanılarak hücrenin başına düşen mikronükleus sayısı (MN/hücre) saptanmıştır.

NBI saptanırken tüm konsantrasyonlardan her donörden 1000’er adet olmak üzere 2000 hücre incelenmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde sayılmış ve NBI $[1 \times (1N) + 2 \times (2N) + 3 \times (3N + 4N)] / n$ (n incelenmiş olan tüm hücre sayısı) sayısal formülünden faydalanılarak saptanmıştır.

3.2.3. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada,

- Mikronükleus testinin değerlendirilmesi,
- Kromozom anormalliği testinde uygulanan kontrol konsantrasyonları ve uygulama konsantrasyonları gruplarından ulaşılan hücre başına düşen kromozomal anormallik ve anormal hücre frekansının sonuçlarının değerlendirilmesi ile Mİ ve NBI bulguları z testiyle incelenmiştir.
- Diğer taraftan kontrol konsantrasyonlarına göre önemli değişkenlik gösteren uygulama grupları için ise konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koyabilmek için SPSS 22.0 bilgisayar paket programıyla regresyon analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sodyum Asetat (SA) Uygulaması

4.1.1. Kromozom anormallikleri (KA) testi sonuçları

Sodyum Asetat'ın *in vitro* şartlarda insan periferik kan lenfositleriyle yapılan 24 ile 48 saatlik uygulama süresinde gerçekleştirilen kromozom anormallikleri testinde beş çeşit yapısal kromozom anormalliği gözlenmiştir. Bu anormalliklerin görülme sıklığı sırayla kardeş kromatitlerde birleşme (%30,63), kromatit kırığı (%20,0), kromozom kırığı (%19,37), fragment (%19,37) ve kromatit değişimi (%9,38)'dir. Sayısal kromozom anormalliklerinden ise poliploidi (% 1,25) gözlenmiştir.

Yapılan incelemeler sonucunda, Sodyum Asetat'ın hücre başına düşen anormallik ile anormal hücre frekansını uygulama sürelerinin tamamında kontrole göre konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptanmıştır (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısı için $r=0,96$, 48 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için ve hücre başına düşen anormallik sayısı için $r=0,85$). Gerçekleşen bu artışın 24 saatlik uygulamasında en yüksek dört konsantrasyonda (31,25; 62,50; 125,00 ve 250,00 $\mu\text{g/mL}$), 48 saatlik uygulamasında ise en yüksek konsantrasyonda (250,00 $\mu\text{g/mL}$) anlamlı olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1.; Şekil 4.1.; Şekil 4.2.).

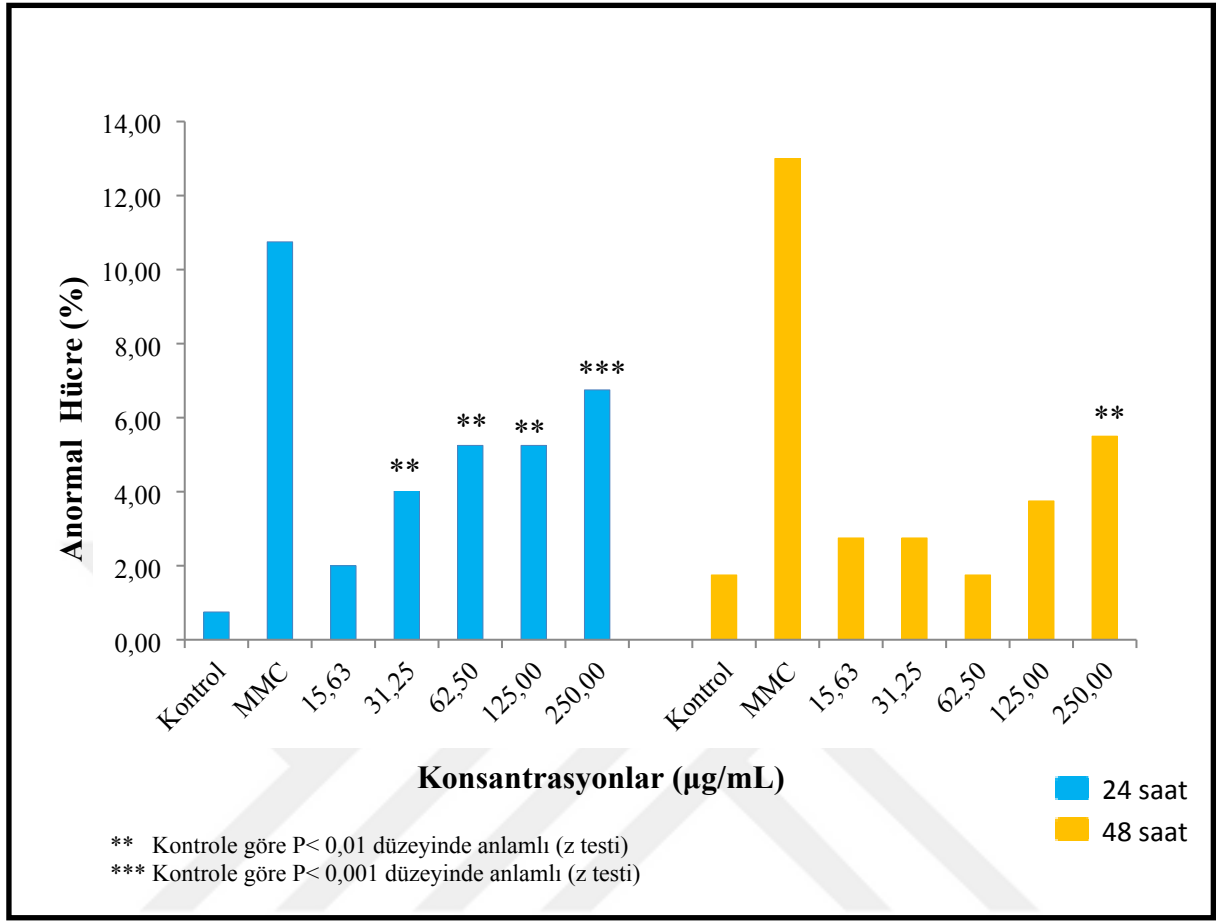
Tablo 4.1. Sodyum Asetat uygulamasıyla periferel insan kan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ±SH(%)	KA/Hücre ±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	kkb	ds	ktk	f	p		
Kontrol	24	0,00	1	-	1	-	-	1	-	0,75 ± 0,43	0,0075 ± 0,0043
MMC	24	0,20	7	8	16	3	1	7	1	10,75 ± 1,55	0,1075 ± 0,0155
SA	24	15,63	2	1	2	-	-	3	-	2,00 ± 0,70	0,0200 ± 0,0070
		31,25	3	3	9	-	1	1	-	4,25 ± 1,01**	0,0425 ± 0,0101**
		62,50	4	4	6	-	-	6	1	5,25 ± 1,12**	0,0525 ± 0,0112**
		125,00	8	3	7	-	-	3	-	5,25 ± 1,12**	0,0525 ± 0,0112**
		250,00	5	7	4	-	2	9	-	6,75 ± 1,25***	0,0675 ± 0,0125***
Kontrol	48	0,00	-	3	1	-	-	3	-	1,75 ± 0,66	0,0175 ± 0,0066
MMC	48	0,20	13	9	10	5	2	12	1	13,00 ± 1,68	0,1300 ± 0,0168
SA	48	15,63	2	5	3	-	-	1	-	2,75 ± 0,82	0,0275 ± 0,0082
		31,25	-	-	2	-	4	4	1	2,75 ± 0,82	0,0275 ± 0,0082
		62,50	2	1	1	-	2	1	-	1,75 ± 0,66	0,0175 ± 0,0066
		125,00	1	7	6	-	1	-	-	3,75 ± 0,95	0,0375 ± 0,0095
		250,00	5	-	9	-	5	3	-	5,50 ± 1,14**	0,0550 ± 0,0114**
Kromozomal anormallik yüzdesi			20,00	19,37	30,63	0,0	9,38	19,37	1,25		

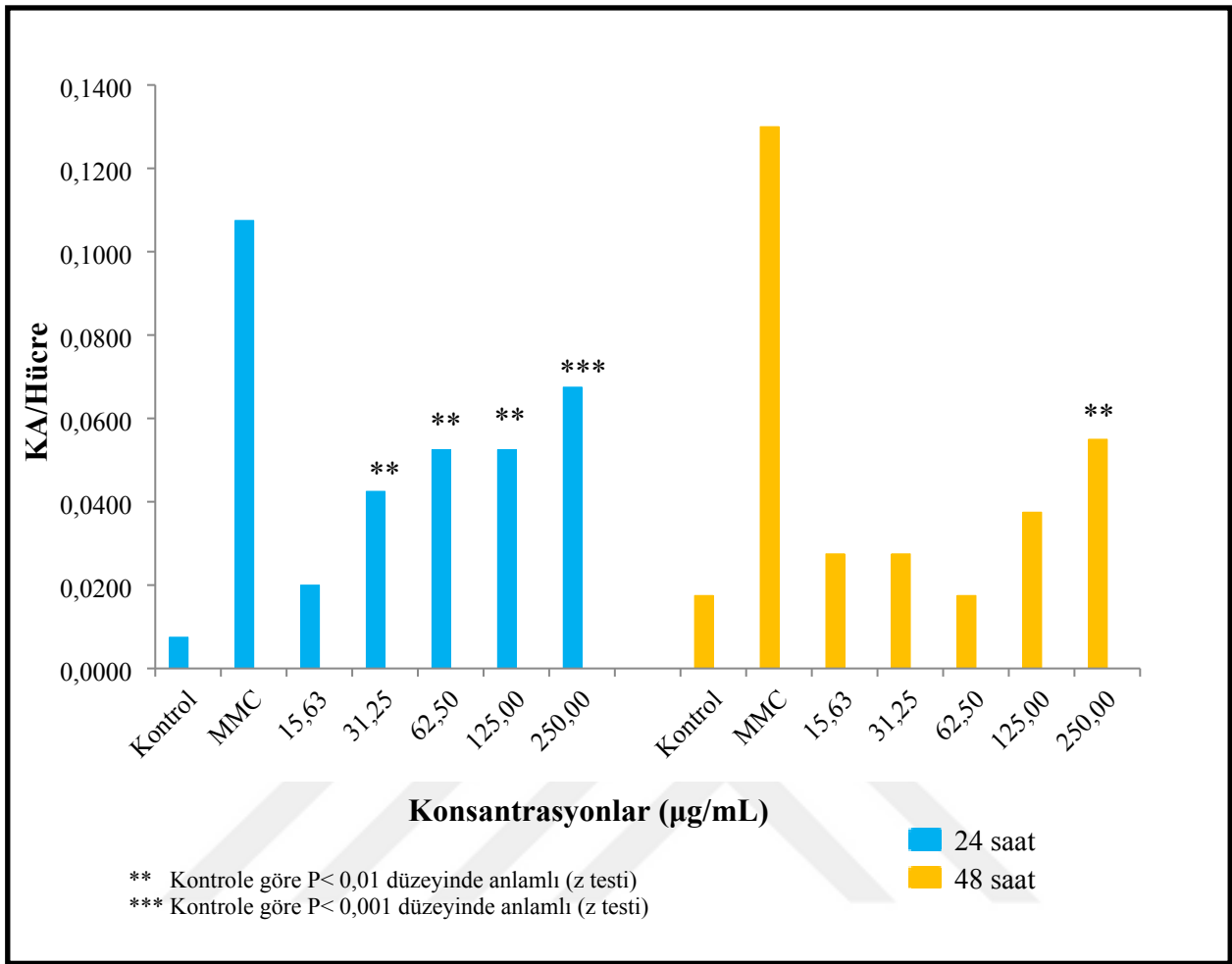
kzk:kromozom kırığı, ktk:kromatit kırığı, kkb:kardeş kromatitlerde birleşme, ktd: kromatit değişimi, ds:disentrik kromozom, p:poliploidi, f: fragment.

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

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



Şekil 4.1. SA uygulamasının periferel insan kan lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.2. Sodyum asetat uygulamasının periferel insan kan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkisi

4.1.2. Mitotik indeks (Mİ) sonuçları

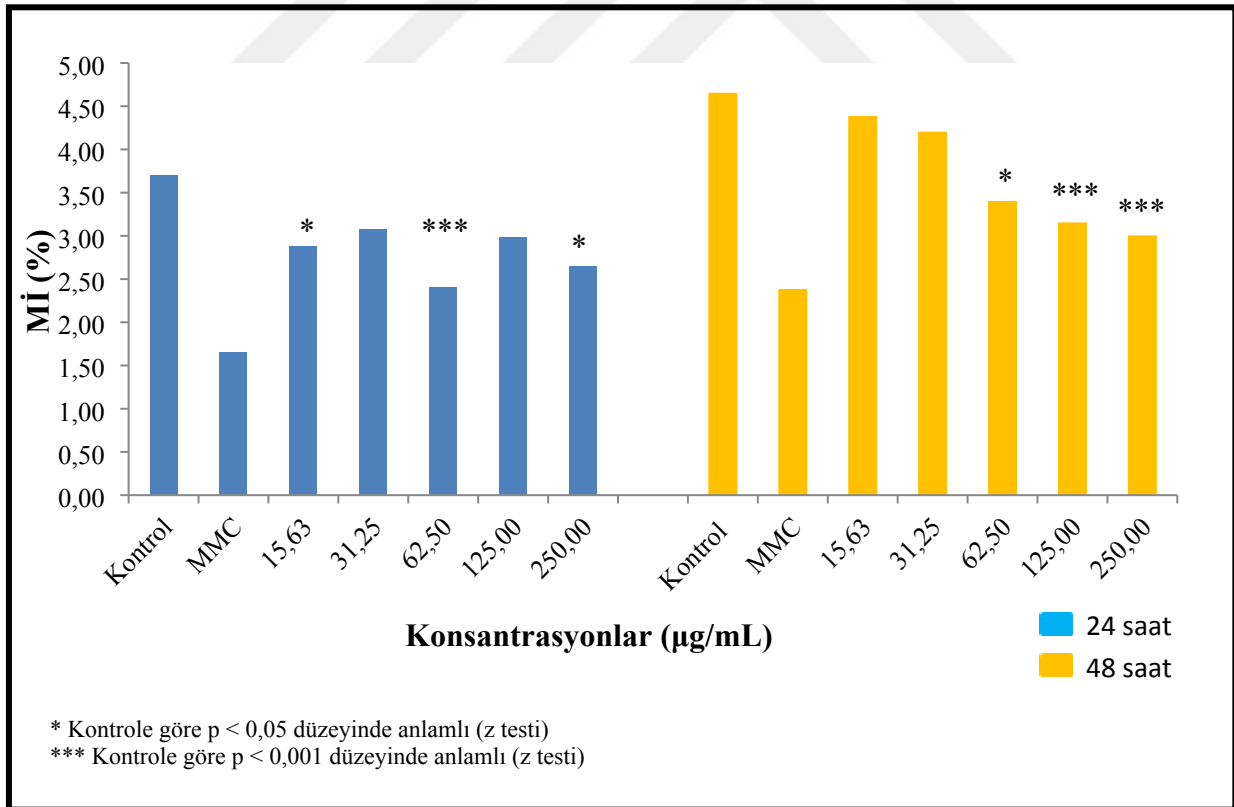
SA'nın Mİ üzerinde 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerindeki etkileri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Mitotik indeks 24 saatlik uygulamanın 15,63; 62,50 ve 250,00 µg/mL'lik konsantrasyonlarında kontrole kıyasla önemli oranda düşmüştür. 48 saatlik uygulamanın ise en yüksek üç konsantrasyonunda (62,50; 125,00 ve 250,00 µg/mL) anlamlı azalış saptanmıştır (Tablo 4.2.; Şekil 4.3). Fakat bu azalışın 24 saatlik muamelede konsantrasyonla ilişkisi oldukça zayıf ($r=-0,59$) iken, 48 saatlik muamelede ($r=-0,36$) ise konsantrasyonla ilişkisi yoktur.

Tablo 4.2. SA uygulamasının periferal insan kan lenfositlerinde mitotik indeks frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	
Kontrol	24	0,00	3,70 ± 0,298
MMC	24	0,20	1,65 ± 0,201
SA	24	15,63	2,88 ± 0,264*
		31,25	3,08 ± 0,273
		62,50	2,40 ± 0,242***
		125,00	2,98 ± 0,269
		250,00	2,65 ± 0,254*
Kontrol	48	0,00	4,65 ± 0,333
MMC	48	0,20	2,38 ± 0,241
SA	48	15,63	4,38 ± 0,323
		31,25	4,20 ± 0,317
		62,50	3,48 ± 0,290*
		125,00	3,15 ± 0,276***
		250,00	3,00 ± 0,270***

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

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

**Şekil 4.3.** Sodyum Asetat uygulamasında periferal insan kan lenfositlerindeki mitotik indeks sonuçları

4.1.3 Mikronükleus testi sonuçları

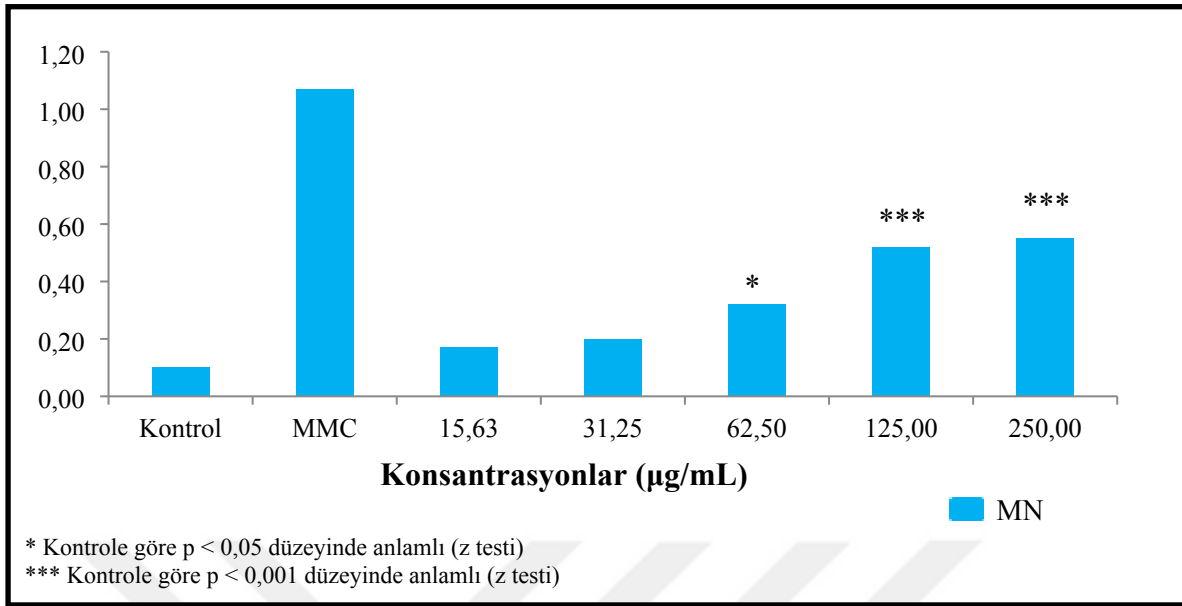
SA ile 48 saatlik muamele sonucu insan lenfosit hücre kültürde mikronükleus taşıyan binükleer hücre yüzdesi değerinde artış saptanmıştır. Burada saptanan artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (15,63 µg/mL ve 31,25 µg/mL konsantrasyonları hariç) ve konsantrasyona bağlı olduğu gözlenmiştir ($r=0,98$) (Tablo 4.3; Şekil 4.4). SA uygulaması sonucu her bir uygulama grubundan donör başına 2000 binükleat hücre (toplam 4000) analiz edilmiştir. Analizlerde yalnızca bir mikronükleuslu binükleatlarla karşılaşılmıştır. Bu çalışmada SA'nın nükleer bölünme indeksi (NBI) değerini etkilemediği gözlenmiştir.

Tablo 4.3. SA uygulamasının periferik insan kan lenfositlerinde MN ve NBI üzerinde etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	MN $\pm$ SH	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) $\pm$ SH
	Süre	Konsantrasyon			
	(saat)	(µg/mL)			
Kontrol	48	0,00	4000	0,100 $\pm$ 0,050	1,725 $\pm$ 0,412
MMC	48	0,20	4000	1,075 $\pm$ 0,163	1,287 $\pm$ 0,356
SA	48	15,63	4000	0,175 $\pm$ 0,066	1,655 $\pm$ 0,403
		31,25	4000	0,200 $\pm$ 0,071	1,640 $\pm$ 0,402
		62,50	4000	0,325 $\pm$ 0,090*	1,598 $\pm$ 0,397
		125,00	4000	0,525 $\pm$ 0,114***	1,368 $\pm$ 0,367
		250,00	4000	0,550 $\pm$ 0,117***	1,324 $\pm$ 0,361

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

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



Şekil 4.4. Sodyum Asetat'ın insan periferal kan lenfositlerinde mikronükleus frekansı üzerine etkisi

4.2. Sodyum Sülfid (SS) Uygulaması

4.2.1. Kromozom anormallikleri (KA) testi sonuçları

Periferal insan kan lenfositleriyle Sodyum Sülfid'in 24 ve 48 saatlik uygulaması sonucunda tüm konsantrasyonlarda gözlenen anomallik çeşitleri, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen anomalliklerin oranları standart hatalarıyla beraber Tablo 4.4.'te verilmiştir. Sodyum Sülfid kardeş kromatitlerde birleşme (%30,80), kromatit değişimi (23,20), kromatit kırığı (%17,60), kromozom kırığı (%10,00), disentrik kromozom (%5,60), fragment (%12,40) ve poliploidi (%0,40) gibi çeşitli anomalliklere sebep olmuştur. Bunlardan en çok gözleneni kardeş kromatitlerde birleşme olup ve en az gözlenen anomallik poliploididir.

SS periferal insan lenfosit kültürüne 24 saatlik ve 48 saatlik muamelesi sonucunda anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anomallik frekansında tüm uygulama sürelerinde ve konsantrasyonlarında istatistiki olarak kontrole kıyasla önemli bir artışa neden olmuştur (Tablo 4.4.; Şekil 4.5; Şekil 4.6). Söz konusu bu artışlar konsantrasyona bağlıdır (Anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anomallik için 24 saat $r=0,82$, 48 saat $r=0,88$).

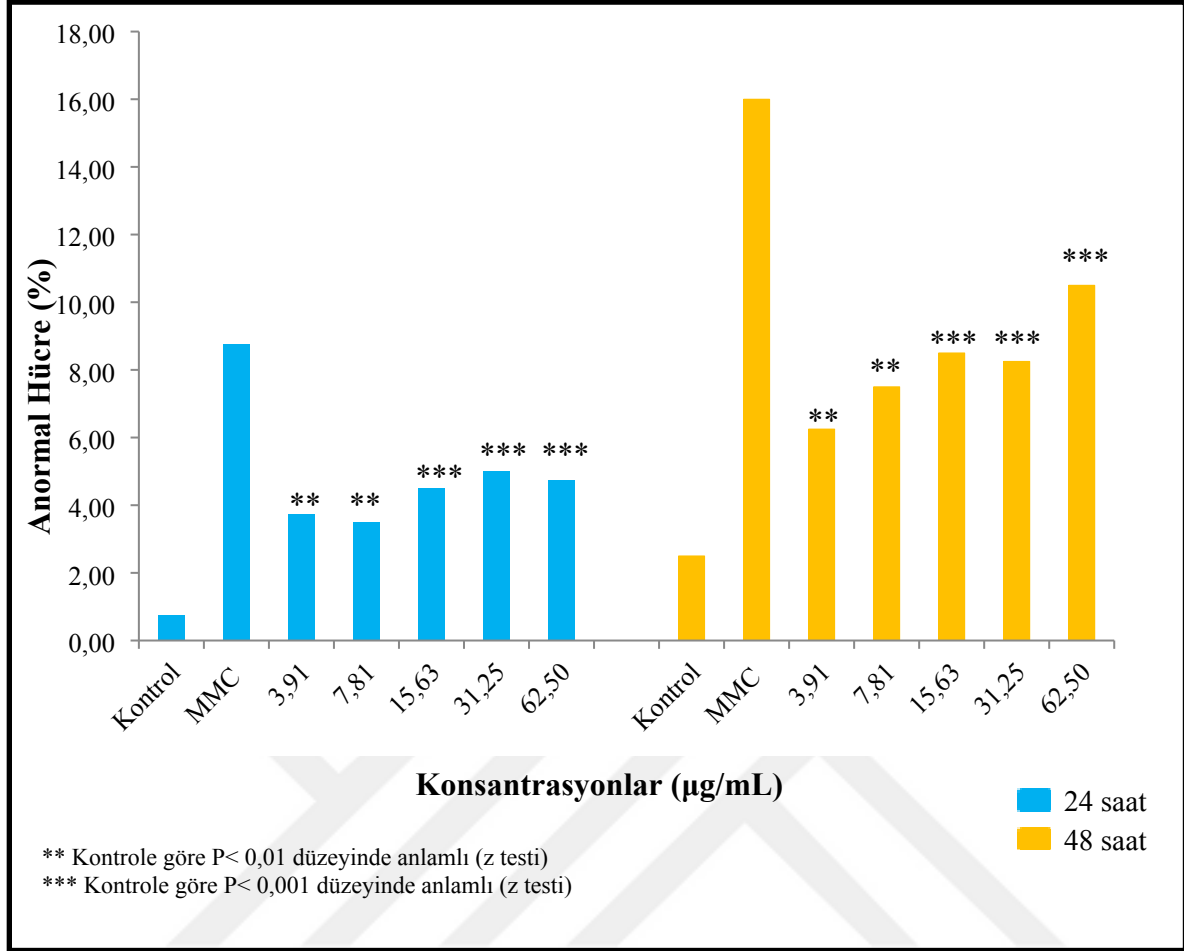
Tablo 4.4. Sodyum Sülfid uygulamasıyla periferik insan kan lenfositlerinde meydana gelen kromozom anormallikleri ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ±SH(%)	KA/Hücre ±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	kkb	ds	ktd	f	p		
Kontrol	24	0,00	-	-	2	-	-	1	-	0,75 ± 0,43	0,0075 ± 0,0043
MMC	24	0,20	6	2	5	2	3	16	1	8,75 ± 1,41	0,0875 ± 0,0141
SS	24	3,91	8	-	4	1	-	2	-	3,75 ± 0,95**	0,0375 ± 0,0095**
		7,81	5	2	6	-	-	1	-	3,50 ± 0,92**	0,0350 ± 0,0092**
		15,63	-	1	10	2	2	3	-	4,50 ± 1,04***	0,0450 ± 0,0104***
		31,25	-	6	2	1	4	6	1	5,00 ± 1,09***	0,0500 ± 0,0109***
		62,50	6	3	5	-	2	3	-	4,75 ± 1,06***	0,0475 ± 0,0106***
Kontrol	48	0,00	4	1	3	-	-	2	-	2,50 ± 0,78	0,0250 ± 0,0078
MMC	48	0,20	3	3	34	-	-	23	1	16,00 ± 1,83	0,1600 ± 0,0199
SS	48	3,91	4	-	5	3	12	1	-	6,25 ± 1,21**	0,0625 ± 0,0121**
		7,81	6	3	6	2	7	6	-	7,50 ± 1,32**	0,0750 ± 0,0132**
		15,63	9	-	15	3	5	2	-	8,50 ± 1,39***	0,0850 ± 0,0139***
		31,25	6	4	10	1	9	3	-	8,25 ± 1,38***	0,0825 ± 0,0138***
		62,50	-	6	14	1	17	4	-	10,50 ± 1,53***	0,1050 ± 0,0153***
Kromozomal anormallik yüzdesi			17,60	10,00	30,80	5,6	23,2	12,4	0,4		

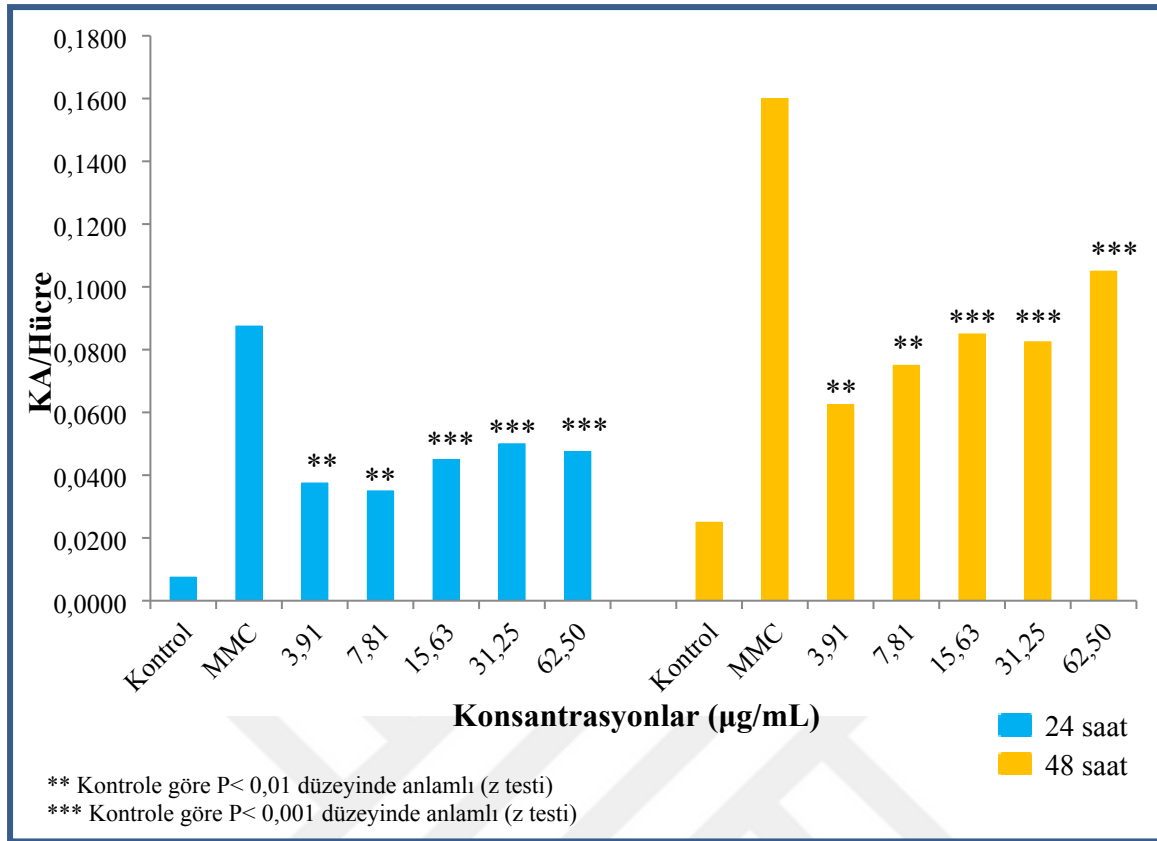
kzk:kromozom kırığı, ktk:kromatit kırığı, kkb:kardeş kromatitlerde birleşme, ktd: kromatit değişimi, ds:disentrik kromozom, p:poliploidi, f:fragment,

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

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



Şekil 4.5. Sodyum Sülfıt uygulamasının periferal insan kan lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.6. Sodyum Sülfid uygulamasının periferel insan kan lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerinde etkisi

4.2.2. Mitotik indeks (Mİ) testi sonuçları

Sodyum Sülfid'in Mİ üzerinde 24 saat ve 48 saat uygulama sürelerindeki etkisi Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. SS'in tüm uygulama sürelerinde ve konsantrasyonlarında (24 saatlik uygulamada 3,91 µg/mL'lik konsantrasyon hariç) Mİ'i kontrole kıyasla anlamlı derecede düşürdüğü saptanmıştır (Tablo 4.5; Şekil 4.7). Bu düşüşler 24 saatlik muamelede dozla ilişkili olmayıp ($r = -0,39$), 48 saatlik muamelede ise konsantrasyonla ilişkisi zayıftır ($r = -0,60$).

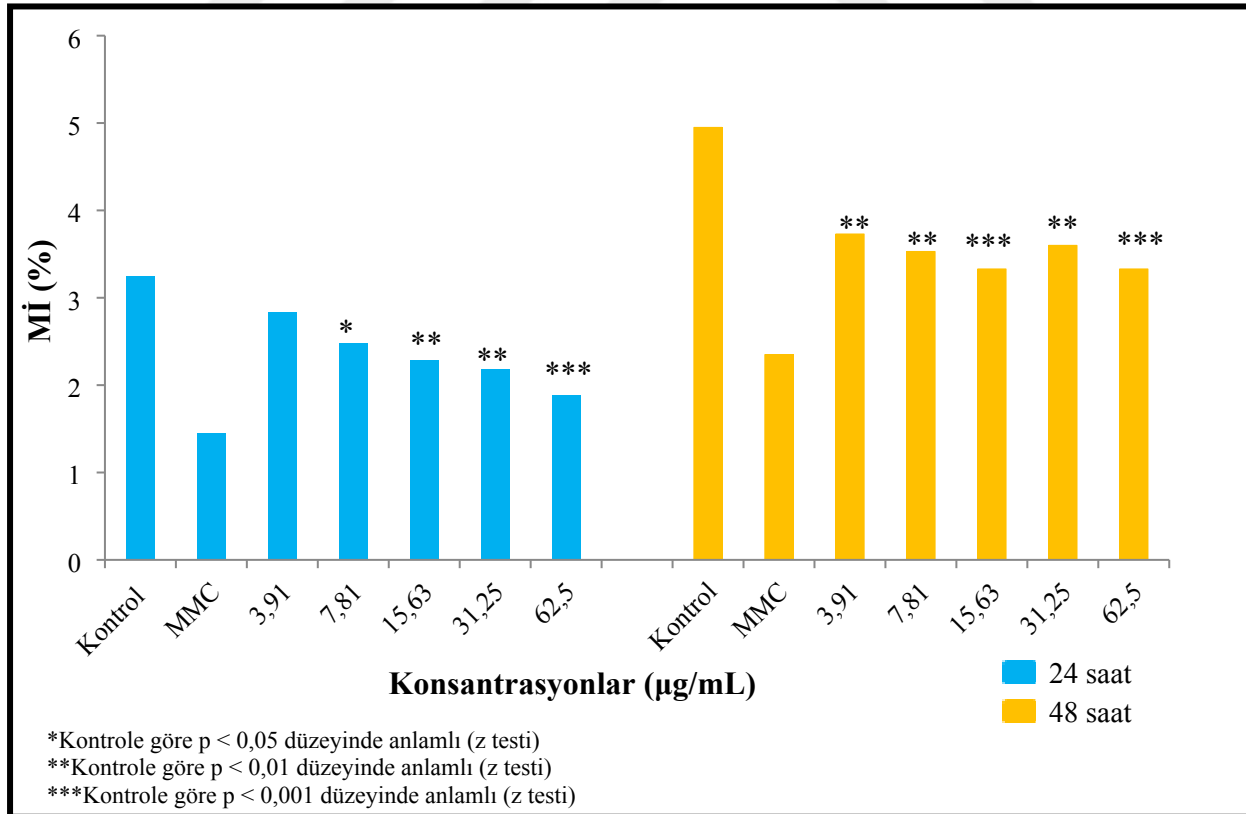
Tablo 4.5. Sodyum Sülfid uygulamasının insan periferel insan kan lenfositlerinde mitotik indeks frekansı üzerinde etkisi

Test maddesi	Uygulama		Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	
Kontrol	24	0,00	3,25 ± 0,280
MMC	24	0,20	1,45 ± 0,189
SS	24	3,91	2,83 ± 0,262
		7,81	2,48 ± 0,245*
		15,63	2,28 ± 0,235**
		31,25	2,18 ± 0,230**
		62,50	1,88 ± 0,214***
Kontrol	48	0,00	4,95 ± 0,343
MMC	48	0,20	2,35 ± 0,239
SS	48	3,91	3,73 ± 0,299**
		7,81	3,53 ± 0,291**
		15,63	3,33 ± 0,283***
		31,25	3,60 ± 0,294**
		62,50	3,33 ± 0,283***

* 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)



Şekil 4.7. Sodyum Sülfid uygulamasıyla periferel insan kan lenfositlerindeki mitotik indeks bulguları

4.2.3. Mikronükleus testi sonuçları

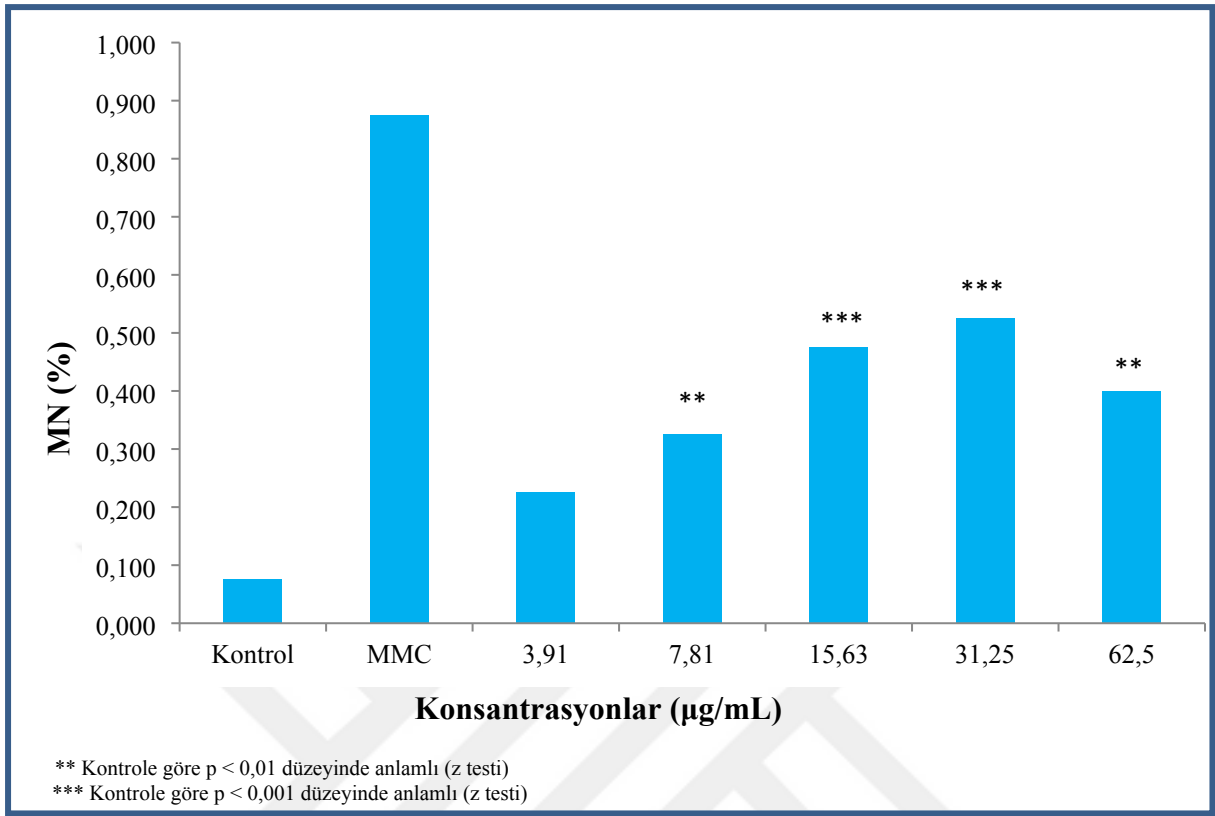
Sodyum Sülfid'in 48 saatlik uygulamasında kültürde MN taşıyan binükleer hücre yüzdesinde artış saptanmıştır. Oluşan artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (3,91 µg/mL konsantrasyonu hariç) ve konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,85$) (Tablo 4.6; Şekil 4.8). Yapılan incelemelerde yalnızca bir MN içeren binükleat hücreler gözlenmiştir. Ek olarak SS'in nükleer bölünme indeksini etkilemediği belirlenmiştir.

Tablo 4.6. SS uygulamasının insan periferik lenfositleriyle MN ve NBI üzerindeki etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	MN $\pm$ SH	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) $\pm$ SH
	Süre	Konsantrasyon			
	(saat)	(µg/mL)			
Kontrol	48	0,00	4000	0,075 $\pm$ 0,043	1,401 $\pm$ 0,372
MMC	48	0,20	4000	0,875 $\pm$ 0,147	1,413 $\pm$ 0,373
SS	48	3,91	4000	0,225 $\pm$ 0,074	1,460 $\pm$ 0,379
		7,81	4000	0,325 $\pm$ 0,090**	1,435 $\pm$ 0,376
		15,63	4000	0,475 $\pm$ 0,108***	1,479 $\pm$ 0,382
		31,25	4000	0,525 $\pm$ 0,114***	1,500 $\pm$ 0,384
		62,50	4000	0,400 $\pm$ 0,099**	1,379 $\pm$ 0,369

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

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



Şekil 4.8. SS'in periferel insan kan lenfositlerindeki mikronükleus üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Çağımızın en önemli konusu besin güvenliğini sağlayabilmektir. Besin güvenliğini sağlayabilmek, besin üretiminde artışa geçilmesi ve üretilecek olan yiyeceklerde kayıpların önüne geçilmesi, yiyeceklerin fazlaca olduğu zamandan daha az bulunduğu zamana gıdaların kalitesinin korunarak saklanabilmesi ve raflardaki ömrünü uzatabilmesi bakımından önem arz etmektedir. Böylece gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımı gün geçtikçe artmaktadır [46]. Gıda katkı maddelerinin yasalara göre uygun kullanımı ise üreticinin, tüketicinin ve devletin iş birliği halinde mümkün olabilmektedir. Üreticiler oto kontrole, üretilen gıdanın kalitesine, üretim seviyelerindeyken ve gıdalar satışa çıkarılmadan önce kontrol edilmesine önem vermelidirler. Özellikle üretici ve tüketici gıda katkı maddeleri hususunda daha çok bilince kavuşturulmalıdır [46].

Günümüzde yaşamın gerekliliği olarak gıda katkı maddelerinden kendimizi soyutlamamız imkansızdır. Dikkat edilmesi gereken husus, gıda katkı maddelerinin yasalara uygun bir şekilde kullanılması gereken miktarda uygulanmasını sağlayıp oluşacak tehlikeyi olabildiğince minimize etmektir [47]. Bütün GKM'nin üretim safhasından tüketim safhasına kadar bütün atılan adımlarda ülkemizde Türk Gıda Kodeksi tarafından hazırlanan tüzük ve yönetmeliklere uyum sağlanmalı; böylece tüketim için sağlıklı besinler üretilmelidir.

Yapılan araştırmaların genelinde, günümüzde kullanım miktarları zamanla daha da artan farklı farklı kimyasal ajanların çok az kullanılan değerlerinin bile teratojenik, karsinojenik ve mutajenik olabileceği gerçeği ortaya konmaktadır [46]. Bu sebeple, söz konusu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan fiziksel ve kimyasal ajanların insanların genomu için genotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkiye sahip olup olmadıklarının ortaya koyulması önem arz etmektedir. Mutajenite testlerinde çıkan pozitif sonuçlar genotoksik olan birden fazla maddenin beraberinde karsinojenik de olduğunu ortaya koymaktadır [46].

Mutajenlerin oluşturduğu genetik hasarın seviyesinin tespiti ve insan sağlığının üzerinde etkileri bakterilerin, çeşitli memeli hücrelerinin, bitkilerin veya *Drosophila*'nın tercih edildiği farklı test sistemleriyle değerlendirilebilmektedir. Bunların içerisinde en çok tercih edilen insan periferik kan lenfositleridir. İnsan periferik kan lenfositlerinde sıklıkla tercih edilen genotoksikite testleri ise kromozomal anormallikler ve mikronükleus testleridir [47-49].

Bu tez çalışmasının amacı, GKM'nin sıklıkla tercih edilmesi ve bazı maddelerin toksik etkiyle beraber karsinojenik etki göstermesi sebebiyle, günümüzde sürekli maruz bırakıldığımız ve bundan önce periferik insan kan lenfositlerinde genotoksiteleriyle ilgili herhangi bir araştırma yapılmayan Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfid'in *in vitro* şartlarda genotoksik etkilerini KA ve MN testleri ile araştırmaktır.

Bu çalışmada genotoksik etkileri değerlendirilen GKM'den biri olan SA, 24 saatlik uygulamada 31,25; 62,50; 125,00 ve 250,00 µg/mL konsantrasyonlarında ve 48 saatlik uygulamada 250,00 µg/mL konsantrasyonunda kromozom anormallikleri frekansını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda artırmıştır. SA insan periferik kan lenfositlerinde beş çeşit kromozom anormalliğinin görülmesini tetiklemiştir. Bu kromozomal anormalliklerinden fazlaca rastlanan kardeş kromatitlerde birleşmedir. Bu çalışmada kullanılan diğer GKM olan Sodyum Sülfid ise, 24 saatlik ve 48 saatlik muamelede ve bütün konsantrasyonlarda anormallik frekansında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Kromozom anormalliklerinden en çok yine kardeş kromatitlerde birleşme saptanmıştır.

Kromozomal anormallik testi, yapısal kromozom aberasyonları ile anormal kromozom seperasyonundan dolayı meydana gelen normal kromozom sayısındaki değişiklikleri yani anöploidi ve poliploidiyi tanımlayarak kromozomda oluşan hasarın ve genomdaki kararsızlığın biyogöstergesi olarak kullanılır. [50]. Kromozom anormallikleri, kendiliğinden veya kimyasal uygulamaların bir sonucu olarak meydana gelebilmektedir. Kromozomal anormalliklerinden olan yapısal kromozom anormallikleri direkt DNA'nın kırılmasından, hasarlı DNA kalıbının replikasyonundan veya DNA sentezinin inhibisyonundan kaynaklanabilir [51]. Sayısal kromozom anormallikleri de anöjen uygulamanın bir sonucu olarak meydana gelebilir [52]. Hücre siklusunun G0/G1 evreleri boyunca genotoksik ajana maruz kalan hücrelerde, kromozom kırılmasını ve fragmentlerin tekrardan düzenlenmesini takiben genellikle homolog olmayan uç birleşmesi sebebiyle kromozomal anormallikler saptanır [53]. Bu çalışmada kromozom anormalliklerden en fazla kardeş kromatitlerde birleşme saptanmış olması, GKM'nin yüksek konsantrasyonlarda ve uzun sürede klastojenik etkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Kardeş kromatitlerde birleşme (sister union), aktarılmayan tipteki mutasyondur. Araştırmacılara göre kromozomların üzerindeki kırılmalar rastgele bir yerde olmazlar. Kromozomlardaki bazı bölgelerin kırılmaya karşı olan duyarlılıkları farklı bölgelere oranla daha çoktur. Genelde kromozomlar tek kromatit şeklinde bulunduklarından metabolik

evrede çok daha kolay kırılırlar. Eğer tekrardan bir yapışma olmazsa ortaya çıkan sentromerli parçalar ile sentromeri olmayan parçalar mitoz ilerlerken uzunlamasına yarılr. Ardından her biri iki kromatit oluşturur. Bu iki kromatidin kırık uçları birbiriyle birleşebilir. Bu durum kardeş kromatitlerde birleşme olarak tanımlanır [54]. SA ve SS uygulamaları sonucunda oluşan diğer anormallikler ise kromatit değişimi, kromozom kırığı, disentrik kromozom ve fragmenttir.

Kromatit değişimi, homolog olmayan kromozomların arasında meydana gelen tipik triradyal ya da quadriradyal değişimlerdir [55]. Kromozom kırığı, bir kromozomun her iki kromatitinde birden kırık olması durumu olup, herhangi bir dış etken olmadan kendiliğinden veya mutajenik etki sonucu oluşabildiği gibi; kimyasal maddeler de bu duruma neden olmaktadır [56]. Disentrik kromozom, iki kromozomun uçlarında oluşan kırıkların, sentromeri bulunan kısımlarının kırılmış uçlardan birleşmesidir [57]. Fragmentlerin ise kromozom veya kromatitlerde oluşan kırılmalar ile genelde terminal delesyonlar sonucunda oluştuğu bilinmektedir [58].

In vivo koşullar ile *in vitro* şartlarda, kimyasal sebeplere bağlı olarak oluşan en önemli hücresel yanıt, hücre döngüsünün gecikmesi veya döngünün engellenmesidir. Mİ, sitotoksitenin göstergesi olarak kabul edilmiş önemli parametre testlerden biridir. Sitotoksik seviye ise Mİ'deki azalmayla saptanabilir [59-61]. Mİ'nin değerinin azalmasının nedeni olarak hücrelerin mitozu girebilmesini sağlayan G2 aşamasının engellenmesi veya ATP seviyesindeki azalma öne sürülmektedir. Enerji üretim merkezinde oluşan bozukluktan da kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Mİ değerindeki düşüşün farklı sebepleri arasında DNA sentezinin engellenmesi veya iğ oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması da gösterilebilir [62-64]. Bu çalışmada gözlenen Mİ frekansındaki düşüşler, bu GKM'nin hücre proliferasyonu için gerekli enzimler ile proteinlerin engellemesinden kaynaklanabilir.

Çalışmada kullanılan diğer mutajenite testi periferel insan kan lenfositlerinde son zamanlarda sıklıkla tercih edilen mikronükleus testidir. SA ve SS uygulamasıyla MN barındıran binukleat hücrelerin frekansı da artmıştır. Bu artışlar Sodyum Asetat uygulamasında 62,50; 125,00 ve 250,00 µg/mL konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede gerçekleşmiştir. Sodyum Sülfid uygulamasında 7,81; 15,63; 31,25 ve 62,50 µg/mL konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede gerçekleşmiştir. Diğer taraftan bu iki gıda koruyucularının NBI üzerinde herhangi bir etki etmediği saptanmıştır.

Farklı ajanların hücrelerde meydana getirdiği yapısal kromozom anormallikleri ve sayısal kromozom anormalliklerinin indirekt göstergesi olarak belirlenen, basitçe uygulaması yapılabilen *in vitro* MN testiyle organizmayı etkileyebilen ajanların genotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için yapılabilen her türlü tarama çalışmalarında güven ile tercih edilebilecek mutajenite testlerinden biridir [46]. Mikronükleus tekniği, periferik insan kan lenfositlerinde ve kemik iliğinde kimyasal ajanların genotoksik potansiyelini belirlemede yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Teknikte sonuca kısa zamanda ulaşılması, basit olması ve DNA hasarı konusunda çoğunlukla güvenilir bilgi vermesi bu tekniği vazgeçilmez hale getirmiştir [36]. Mikronükleus testi genetik hasarın tespitinde, kanser riskinin belirlenmesinde ve ilaç sanayisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Mikronükleus oluşumunun temelinde DNA hasarı bulunmaktadır. Organizmanın çeşitli klastojenik, mutajenik ajan ve karsinojenik ajanlara maruz bırakılması sonucunda DNA'da hasar ortaya çıkmaktadır. MN'ler hücre siklusu sırasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kaybını gösterir. Böylece mikronükleus testiyle kromozom kayıpları saptanmakta olup; klastojenik ve anöjenik etkiler belirlenebilmektedir [65]. Günümüzde kanser takip programlarında ve kanser önleme programında biyobelirteç olarak sıklıkla tercih edilmektedir [66].

Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfid ile yapılmış farklı genotoksisite çalışmaları mevcuttur. Yapılan bir çalışmaya göre, Sodyum Asetat'ın genotoksik ve sitotoksik etkisi yetişkin erkek Sprague-Dawley ratlarının lenfositlerinde comet, MTT ve LDH (laktat dehidrogenaz) testleriyle incelenmiştir. Sodyum Asetat lenfositlere 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Comet testi sonuçlarına göre Sodyum Asetatın konsantrasyona bağlı olarak kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca MTT testinde hem hücre canlılığı hem de çoğalmasında konsantrasyona bağlı düşüş tespit edilmiş olup, LDH salınımında da konsantrasyona bağlı bir artış rapor edilmiştir. Tüm sonuçlara bakılarak Sodyum Asetat'ın incelenen konsantrasyonlarında sitotoksik ve genotoksik olduğu saptanmıştır [38]. Bu tez çalışmasında insan lenfositlerinde Sodyum Asetat'ın hem genotoksik hem de sitotoksik etki göstermesi de bu sonuçları destekler niteliktedir.

Sodyum Sülfid'in genotoksik etkisi *Drosophila melanogaster*'de SMART ve comet testiyle incelenmiştir. Bu çalışmada bir yabancı tip ve bir wtsMT⁴⁻¹ (letal bir allel) alleli taşıyan suş olmak üzere iki farklı *Drosophila* suşu kullanılmıştır. Deney grubundaki hayvanlara 100 mM Sodyum Sülfid verilmiş SMART testi sonuçlarına göre negatif

kontrole kıyasla yüksek düzeyde somatik mutasyonla, tümör indüksiyonu ve sıklığı tespit edilmiştir. Comet testi bulgularına göre ise DNA hasarında da önemli artış gözlenmiş, kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti istatistiksel olarak anlamlı oranda indüklenmiştir. Elde edilen bulgulara göre Sodyum Sülfid'in genotoksik etkili olduğu, sonuçların DNA bozulması ve zincir kırılmalarının açık bir göstergesi olduğu vurgulanmıştır [39]. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında Sodyum Sülfid'in insan periferik lenfositlerinde gösterdiği genotoksik ve sitotoksik etki, yukarıda anlatılan çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Koruyucu gıda katkı maddelerinden Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfid'in insan periferik kan lenfositlerinde olası genotoksik etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan farklı koruyucu gıda katkı maddelerinin değişik hücre gruplarında genotoksitesinin incelendiği çalışmalar mevcuttur.

Sitrik Asit, Askorbik Asit ve Sodyum Sitrat'ın insan lenfosit hücrelerinde 50, 150, 300 ve 600 µg/mL'lik konsantrasyonlarının potansiyel genotoksik etkileri comet testiyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, denenen konsantrasyonlarda Askorbik Asit'in herhangi bir DNA hasarına sebep olmadığı gözlenmiştir. Sodyum Sitrat, 300 ve 600 µg/mL'lik konsantrasyonlarında DNA hasarında kontrole göre sınırlı artış göstermiştir. Sitrik Asit ise en yüksek konsantrasyonda oldukça yüksek DNA hasarına sebep olmuştur. Sitrik Asit'in aynı oranda uygulanan Askorbik Asit ve Sodyum Sitrat konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında da en yüksek DNA hasarına neden olduğu saptanmıştır. Diğer konsantrasyon gruplarında ise DNA hasarında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Sitrik Asit ve Sodyum Sitrat'ın yüksek konsantrasyonlarında DNA hasarına neden olabileceği için dikkatli kullanımı tavsiye edilmiştir [67]. Sitrik Asit, Borik Asit, Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Sitrat'ın *Allium cepa* kök uçlarında kromozomal anormallik testiyle genotoksitesileri incelenmiştir. Bu koruyucular 5, 10 ve 20 saat boyunca 20 ile 100 ppm arasında değişen bir dizi konsantrasyonda kök uçlarına uygulanmıştır. Kullanılan gıda katkı maddelerinin hepsi tüm konsantrasyonlarda ve uygulama periyotlarında kontrol ile karşılaştırıldığında mitotik indeksi önemli ölçüde azaltmıştır. Öte yandan, mitotik aktivitedeki azalma, maruz kalma süresi 5 saatten 20 saate çıkarıldığında oldukça önemli ölçüde indüklenmiştir. Ayrıca, mitotik evrelerin yüzdesinde de farklılıklar gözlenmiştir. Toplam anormallik yüzdesi genellikle bu kimyasalların artan konsantrasyonları ve uzun maruziyet süresi ile artmıştır. Tüm mitotik evrelerde anafaz köprüleri, C-mitoz,

mikronükleus, anafazda geri kalma, yapışık kromozom, kromozom kırıkları tespit edilmiştir [68].

Farklı bir çalışmada insan periferik lenfositlerinde yine Sodyum Benzoat'ın (SB) genotoksik etkisini belirleyebilmek amacıyla kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri uygulanmıştır. Ayrıca, SB'nin mitotik indeks (Mİ), nükleer bölünme indeksi (NBİ) ve replikasyon indeksine (Rİ) etkileri de incelenmiştir. SB'nin *in vitro* lenfositlere 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/ml'lik konsantrasyonları uygulanmıştır. Sonuçta incelenen konsantrasyonlarda bu koruyucunun KA, KKD ve MN frekansında anlamlı ve konsantrasyona bağlı bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Mİ değerlerinin ise uygulamaların tümünde konsantrasyona bağlı düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ek olarak, edinilen bulgulara göre replikasyon indeksini ve nükleer bölünme indeksini etkilemediği saptanmıştır. Comet testi sonuçlarına göre SB, kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda kuyruk uzunluğunu ve kuyruk yoğunluğunu artırmıştır. Tüm bu gözlemlere dayanarak Sodyum Benzoat'ın *in vitro* periferik lenfositlerde klastojenik, anöjenik, mutajenik ve sitotoksik etkili olduğu belirtilmiştir [69]. Sodyum Benzoat'ın HGF hücreleri (Gingival Fibroblast) üzerindeki genotoksik etkileri de farklı araştırmacılar tarafından comet testiyle incelenmiştir. Bu hücreler 1 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda SB'a (10, 50, 100 ve 150 mM) maruz bırakılmıştır. Analizden elde edilen sonuçlara göre, tüm konsantrasyonlar kontrol grubuna kıyasla DNA hasarını indüklemiş böylelikle SB'nin bu hücrelerde de genotoksik etkili olduğu saptanmıştır [70]. Bir diğer çalışmada da Potasyum Sorbat (PS) Sodyum Benzoat (SB) ve Sodyum Nitrit (SN)'in periferik insan kan lenfosit kültüründeki olası genotoksitesinin tespiti mikronükleus testiyle araştırılmıştır. Türk Gıda Kodeksi'nin bu GKM'ler için önerdiği kullanım değerleri dikkate alınıp PS için 200, 500 ve 1000 µg/mL, SB için 100, 300 ve 800 µg/ml ve SN için ise 1, 10 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlar tercih edilmiştir. PS ve SB'nin yiyeceklerde tercih edilen konsantrasyonlarının önemli bir genotoksik etkiye neden olmadığı fakat SN'in muamele edilen tüm konsantrasyonlarının mikronükleus oluşumunu anlamlı olarak arttırdığı ve genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [71]. Bir diğer çalışmada SN'in mutajenitesi *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle analiz edilmiştir. *In vivo* çalışmalar, 24 saat arayla iki kez intragastrik olarak 1.72, 5.18, 15.55 ve 46.66 mg/kg dozlarında SN ile muamele edilen erkek rat ve fareler ile 3 ay boyunca içme suyuna günlük olarak aynı dozlarda sodyum nitrit ile muamele edilen erkek tavşanlarda gerçekleştirilmiştir. Kromozomal aberasyon testi her 3 hayvan türünde de yapılmış,

mikronükleus indüksiyonu sadece farelerde değerlendirilmiştir. Sodyum Nitrit, her 3 hayvan türünde de anormal metafazlarda artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, farelerde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin sayısında artışa sebep olmuştur. Kromozomal aberasyonların ve mikronükleusların frekansındaki artışlarda doza bağlı tepkiler gözlenmemiştir. *In vitro* çalışmalar, 24 saat boyunca 0,265 ve 0,530 mg/ml dozlarında sodyum nitrit içeren kültürlerde yetiştirilen BSC-1 ve HeLa hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her iki konsantrasyon da kromozomal anormalliklerin yüzdesinde önemli artışlar meydana getirmiş ancak pozitif doz-etki ilişkisi göstermemiştir [72]. Yine aynı gıda koruyucusu ile yapılan başka bir çalışmada SN, *in vitro* Çin hamster embriyonik ve erişkin hücrelerinde 50 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarda kromozom anormalliklerine neden olup, fare kemik iliği hücresinde ise kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus frekans düzeylerini artırmıştır [73-74]. Sodyum Nitrit'in aynı zamanda sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA1535 için mutajenik olduğu, *S. typhimurium* TA100 için mutajenik etkisinin ise zayıf olduğu saptanmıştır. Fakat bu çalışmada testlerde kullanılan süre, saat ve konsantrasyon gibi önemli bilgilere yer verilmemiştir [75]. Sodyum Nitrit'in 0,04 ve 0,16 mg/L konsantrasyonlarıyla *Allium cepa*'nın kök ucu hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik muamele yapılarak sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Kök büyümesi, yeni primordialların ortaya çıkışı ve kök morfolojisi tüm konsantrasyonlardan önemli derecede etkilenmiştir. 0,04 mg/L'lik konsantrasyonun farklı kromozomal anormalliklere (kromozomal kodensasyon, çift çekirdekli hücreler, kromozom kontraksiyonu, yapışıklık, mikronükleus ve anafaz köprüsü) neden olduğu belirtilmiştir. Kontrol grubunun MI değeri her iki konsantrasyonla da karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur bu da SN'nin hücre bölünmesini engellediğini göstermektedir. Hücre morfolojisinde de farklılıklar görülmüş, yüksek konsantrasyon büzüşmeye neden olmuştur ve bunun kimyasala maruz kalma süresi uzadıkça daha belirgin olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre SN'nin, genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [76]. Yapılan farklı bir çalışmada Sodyum Nitrat (SNa), Sodyum Nitrit (SNi), Potasyum Nitrat (PNa) ve Potasyum Nitrit'in (PNi) ve bunların 25 mM konsantrasyondaki beşli kombinasyonunun, genotoksik etkileri *Drosophila melanogaster* hücrelerinde somatik mutasyon ve rekombinasyon testiyle (SMART) değerlendirilmiştir. İki bağlantılı resesif kanat kılı mutasyonu (çoklu kanat kılı ve parlama) içeren trans-heterozigot üç günlük larvalar, standart *Drosophila* besiyerinde test bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarıyla (25, 50, 75 ve 100 mM) beslenmiştir. Ortaya

ıkan yetişkin sineklerin kanatları, somatik mutasyon veya mitotik rekombinasyondan kaynaklanabilecek mutant hücrelerin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için, muamele edilen serilerde kanat başına düşen mutasyonların frekansları, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Toplam mutasyonlar ile mutasyona sahip kanat sayısı arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Kullanılan kimyasallar genotoksik etkilerinin yüksekliğine göre SNi, PNi, SNa ve PNa olarak sıralanmıştır. Ayrıca, kombine uygulama genotoksik etkiyi önemli ölçüde artmıştır. Yazarlar gıda koruyucularının doğru uygulanmasının gerekliliğinin insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini belirtmişlerdir [77].

Potasyum Sorbat (PS), GKM'nin en sık kullanılan koruyucular grubunda bulunur ve geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olması nedeniyle gıdaların mikroorganizmalarla bozulmalarını engelleyerek raftaki ömrünün uzamasını sağlar. PS'ın, insan lenfosit hücrelerinde 24 ve 48 saat uygulanan 0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/mL'lik konsantrasyonlarının genotoksik etkisi mikronükleus ve kromozomal anormallik testleri ile incelenmiştir. Ek olarak aynı konsantrasyonlar ve uygulama süreleri kullanılarak, sitotoksitesi MTT testiyle ve oksidatif stres indükleme yeteneği de süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ile llmştir. Potasyum Sorbat, her iki test sisteminde de incelenen tüm konsantrasyonlarda mikronükleus ve kromozomal anormalliklerini anlamlı oranda tetiklemiştir. MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığı tüm uygulamalarda önemli derecede azalmış, oksidatif stres de artmıştır [78]. Potasyum Sorbat ile yapılan bir başka çalışmada genotoksik etkileri kardeş kromatit değişimi (KKD), kromozomal anormallik (KA) ve comet testleri kullanılarak analiz edilmiştir. KA ve KKD testleri için 125, 250, 500 ve 1000 g/mL'lik konsantrasyonları insan periferal kan lenfositlerine 48 saatlik süre ile muamele edilmiştir. PS'ın, KKD'ni indüklerken replikasyon indeksini etkilemediği saptanmıştır. Mitotik indekste ile konsantrasyona bağlı anlamlı düşüş gözlenmiştir. KA frekansını ise yüksek konsantrasyonlarda yükselttiği belirlenmiştir. Comet testi için ise aynı konsantrasyonlar 1 saat süreyle lenfositlere uygulanmıştır. Konsantrasyonların tamamında kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğunda kontrol konsantrasyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. Bulgular ışığında Potasyum Sorbat'ın bu hücre grubunda çalışılan konsantrasyonlarda sitotoksosite ve genotoksisiteye neden olabileceği, bu sebeple dikkatle kullanılması gerektiği yorumu yapılmıştır [79]. Güncel bir çalışmada Potasyum Sorbat (PS)'ın, Jurkat hücre hattında genotoksik etkileri sitokinez-blok mikronükleus sitom

testi ile sitotoksik etkileri de PrestoBlue testi ile incelenmiştir. Hücreler 25, 50, 75 ve 100 mM PS'a 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. PS, en yüksek üç konsantrasyonda hücre canlılığını azaltmış ve Jurkat hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Genotoksisite açısından ise nekrotik hücre sayısında anlamlı artışa neden olmuş ancak MN, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve apoptotik hücre frekansında ise önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu bulgular, PS'nin Jurkat hücreleri üzerinde genotoksik etkili bir ajan olmadığı şeklinde yorumlanmıştır [80]. Farklı bir çalışmada Sorbik Asit (SA) ve tuzları olan Potasyum Sorbat (PS) ve Kalsiyum Sorbat'ın (KS) Ames testi ile mutajenitesi araştırılmıştır. Bunun için *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları kullanılmış ve söz konusu koruyucuların 0.1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg ve 5 mg/plate konsantrasyonları metabolik aktivasyon varlığında test edilmiştir. İncelenen maddelerin hiçbirinin mutajenik aktivite göstermediği tespit edilmiştir [81].

39 farklı GKM'nin genotoksik etkileri, farelerin 8 farklı organında comet testiyle analiz edilmiştir. Araştırmacılar, farelere bu GKM'lerini intraperitoneal olarak 3-24 saat süresince uygulamıştır. Muamele edilen sürenin bitiminde farelerin kemik iliği, beyin, idrar kesesi, karaciğer, böbrek, kolon, mide ve akciğer dokularında olası DNA hasarını saptamışlardır. Elde edilen bulgular, Sorbik Asit, Benzoik Asit, Sodyum Benzoat, Potasyum Sorbat, Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) gibi koruyucu GKM'nden bazılarının oldukça yüksek genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [82]. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHA) ve Bütillenmiş hidroksianisol (BHT), *Allium cepa*'nın kök ucu hücrelerinde 1000, 1500, 2000, 2500 ppm konsantrasyonları kullanılarak kromozom anormallikleri testi ile incelenmiştir. Yapılan analizde söz konusu olan maddelerin kontrole kıyasla KA frekansı ile DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre BHA ve BHT'nin genotoksik olabileceği gözlenmiştir [83].

Potasyum Benzoat'ın insan periferik kan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri ile *in vitro* genotoksik etkisi incelenmiştir. Ek olarak Potasyum Benzoat'ın mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de saptanmıştır. Potasyum Benzoat'ın 62,50; 125,00; 250,00; 500,00 ve 1000,00 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. PB'nin KA, KKD ve MN frekansında anlamlı ve

konsantrasyona bağılı bir artışa sebep olduğu ve Mİ'in uygulamaların tamamında konsantrasyona bağılı düşüş gösterdiği gözlenmiştir. PB'in, Rİ ve NBI'ni etkilemediği saptanmıştır. Potasyum Benzoat comet testi sonuçlarına göre konsantrasyonların tamamında kuyruk uzunluğunu ve kuyruk yoğunluğunu kontrole kıyasla artırmıştır. Buna göre Potasyum Benzoat'ın, hem sitotoksik hemde genotoksik olduğu belirtilmiştir [69]. Farklı bir araştırmada, Benzoik Asit'in (BA) potansiyel genotoksik etkisi 50, 100, 200 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarında comet testiyle belirlenmiştir. BA'in insan sperm hücrelerinde 500 µg/mL'lik konsantrasyonu kontrol konsantrasyonuyla karşılaştırılınca comet testinde kuyruk uzunluğunu, kuyruk yoğunluğunu ve kuyruk momentini anlamlı seviyede yükselttiği saptanmıştır. Araştırmacılar BA'in 500 µg/mL'lik konsantrasyonunda sperm hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğunu saptamışlardır [84]. Koruyucu olarak kullanılan Benzoik Asit'in fenolik bir türevi olan Parabenin, *in vitro* insan periferik kan lenfositlerinde MN, KKD ve comet testleri ile genotoksik etkileri incelenmiştir. MN ve KKD testleri için 24 ve 48 saat uygulamalarında 50, 100, 250 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmış ve bu testlerde anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Comet testi için 250, 500, 750, ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlar kullanılmış ve en yüksek konsantrasyonunun DNA hasarını anlamlı artırdığı gözlenmiştir. Mitotik indeks ise tüm konsantrasyonlarda ve uygulamalarda azalma göstermiştir. Elde edilen bulgulara göre Paraben'in sitotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğu söylenmiştir [85]. Güncel bir çalışmada 100 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonlarında metil ve butilparaben deri altı enjeksiyon yoluyla erkek ratlara 10 gün süreyle verilmiştir. Bu *in vivo* uygulama ile söz konusu gıda koruyucularının erkek rat üreme sisteminde değişken murinometrik ölçümler, antioksidan kapasite ve genotoksisite açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Parabenlerin uygulanması su ve gıda tüketimini etkilememiştir. Bununla birlikte, testislerin ve seminal vezikülün ağırlığında bir azalma olmuştur. Metilparaben (200 mg/kg) ve butilparabenin her iki konsantrasyonu süperoksit dismutazda artışa neden olmuştur. Katalaz, paraben ile muamele edilen tüm gruplarda artmış aktivite göstermiştir. Buna karşılık, glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz her iki paraben ile muamele edilen gruplarda azalmıştır. Bu sonuçlar, parabenlerin, özellikle de butilparabenin, rat testisinin enzimatik antioksidan sistemini etkileyerek hücrel antioksidan kapasitesini azaltabileceğini göstermektedir. Genotoksisite yine erkek üreme hücrelerinde comet testi ile değerlendirilmiş, butilparaben uygulamalarının kontrolden önemli ölçüde yüksek DNA

hasarı sergilediği gösterilmiştir. Bu çalışma ilk kez parabenlerin erkek rat üreme organında genotoksisiteye neden olabileceğini gösterdiği için önemli olduğu vurgulanmıştır [86].

Bir diğer sık kullanılan koruyucu da Propiyonik asit ve onun tuzlarıdır. Propiyonik asit ile yapılan bir çalışmada, Propiyonik Asit'in *E. Coli*'de DNA onarım testi (125 µL/petri) hariç, SOS chromo testinde (0,01-10 mM), *Salmonella*/mikrozom testinde (0,01-10 µL/petri) ve Çin hamsteri V79 hücreleri kullanılarak yapılan kardeş kromatit değişimi testinde (0,1-33,3 mM) mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir [87]. Propiyonik Asit'in 160 µg/petri konsantrasyonunun, Ames testinde mutasyon frekansını arttırdığı gözlenmiştir [88]. Ayrıca bu maddenin *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğu da saptanmıştır [89]. Propiyonik Asit'in (PA), *Drosophila melanogaster* larvalarının hemositlerinde (0.1-10 mM arasında değişen beş konsantrasyonda) genotoksik potansiyel riskini tespit etmek için *in vivo* model olarak comet testiyle değerlendirme yapılmıştır. Propiyonik Asit'in en yüksek iki konsantrasyonunda (5 ve 10 mM) DNA hasarı seviyesinde önemli bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Analizden elde edilen bulgulara göre PA'nın genotoksik olabileceği belirlenmiştir [90]. Diğer bir çalışmada, Sodyum Propiyonat (SP) ve Potasyum Propiyonat'ın (PP) *in vitro* genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla KA, KKD, MN ve comet testleri kullanılmıştır. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için, SP'nin 15,62; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00; 500,00 µg/mL ve PP'nin 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Sodyum Propiyonat ve Potasyum Propiyonat'ın; KA, KKD ve MN frekansını kontrole kıyasla anlamlı oranda artırdığı saptanmıştır. Comet testi bulgularına göre ise kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini yine önemli oranda artırdığı gözlenmiştir. SP ve PP, *in vitro* insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik etkili olabileceği vurgulanmıştır [91]. Farklı araştırmacılar tarafından Kalsiyum Propiyonatın (KP) *in vitro* insan periferik kan lenfositlerinde; KA, KKD, MN ve comet testleri ile genotoksik etkileri incelenmiştir. KP'nin 50,0; 100,0; 200,0 ve 1000,0 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Yapılan analizde söz konusu ajanın kontrole kıyasla KA, KKD ve MN frekansı ile DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı gözlenmiştir. Mitotik indeks ise anlamlı düşüş göstermiş, ancak Kalsiyum Propiyonat'ın replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksini etkilemediği saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre Kalsiyum Propiyonat'ın genotoksik ve sitotoksik olabileceği gözlenmiştir [79]. Sodyum Propiyonat (SP), Kalsiyum Propiyonat (KP) ve Potasyum Propiyonat'ın (PP) *Allium cepa* kromozomlarında genotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada bu

üç gıda katkı maddesinin 1000,0; 1500,0; 2000,0; 2500,0 ve 3000,0 µg/mL'lik konsantrasyonları 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik muamele sürelerinde kök uçlarına uygulanmıştır. Sonuçta çalışılan tüm gıda koruyucularının Mİ değerlerini önemli oranda düşürdüğü, KA frekansını ise önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. Bu maddelerin etkisiyle c-mitoz, anafaz köprüleri, MN, yapışıklık, kalgın kromozomlar ve kromozom kırıklarına rastlandığı vurgulanmıştır [92].

Sodyum Metabisülfid'in (SMB) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyonlar ve kardeş kromatit değişimi testiyle genotoksik etkileri incelenmiştir. SBM'nin farklı konsantrasyonlarıyla (75, 150 ve 300 g/ml) hücrelere 24 ve 48 saat uygulama yapılmıştır. Uygulama sürelerinin tamamında ve konsantrasyonlarda SBM, KA ve KKD değerlerini konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır. Ayrıca, 150 ve 300 g/mL konsantrasyonlarında replikasyon indeksini (RI) ve mitotik indeksi (MI) konsantrasyona bağlı azaltmıştır. Bu sonuçlara göre, SMB'nin büyük olasılıkla genotoksik bir risk oluşturduğu sonucuna varılabileceği vurgulanmıştır [93]. Yapılan farklı bir çalışmada SMB'in, *Allium cepa* kök uçlarında sitogenetik etkileri incelenmiştir. 7,5; 15 ve 30 mg/L SMB konsantrasyonlarıyla kök uçlarına 10 ve 20 saat süreyle uygulama yapılmıştır. SMB'nin, tüm konsantrasyonlarında ve uygulamaların tümünde Mİ'yi konsantrasyonlara bağlı önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir [94]. Aynı madde ile yapılan *in vivo* farklı bir çalışmada SMB'nin farenin farklı dokuları üzerindeki genotoksik etkileri comet testi (karaciğer ve kan hücrelerinde) ve mikronükleus testiyle (kemik iliği ve kan hücrelerinde) incelenmiştir. Hayvanlara 0,5, 1 ve 2 g/kg SMB tek doz halinde verilmiş ve 24 saat sonra dokular toplanmıştır. Tüm dokular için, 1 ve 2g/kg'lık dozlar kontrole kıyasla DNA hasarında önemli artışa neden olmuştur. En yüksek doz SBM verilen farelerin periferik kan ve kemik iliği hücrelerindeki ortalama mikronükleus frekanslarının önemli yükseliş gösterdiği ve polikromatik eritrositlerin normokromatik eritrositlere oranında da önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Sonuçlar, yüksek dozda verilen oral SMB'nin genotoksik bir risk oluşturabileceğini göstermektedir [95]. Potasyum Metabisülfid'in ve Potasyum Nitrat'ın *Allium cepa* kök uçlarında genotoksik etkileri kromozom anormallikleri testiyle incelenmiştir. *A. cepa*'nın köklerine 3, 6, 12, 24 ve 48 saat boyunca 50 ppm ile 100.000 ppm arasında değişen bir dizi konsantrasyonla muamele edilmiştir. Konsantrasyonunun ve uygulama süresinin artmasıyla mitotik indeksin azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda daha fazla aberasyon görülmüş, her iki gıda koruyucusu da bir takım

kromozom sapmalarına neden olmuştur. Bu nedenle gıda koruyucu olarak PMB ve PN kullanırken dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir [96]. Farklı bir çalışmada Potasyum Nitrat'ın genotoksik etkileri *Drosophila melanogaster*'da SMART testi ve comet testiyle analiz edilmiştir. Potasyum Nitrat, SMART testi bulgularına göre yüksek konsantrasyonlarda kontrole kıyasla tümör indüksiyonu ve sıklığını artırmıştır. Comet testi ile saptanan DNA hasarı ise bu maddenin yüksek konsantrasyonlarda genotoksik olduğu sonucunu desteklemiştir [97]. Kükürtdioksit ve hidratlarının (bisülfid ve sülfid), *Allium staviun* ve *Vicia faba* kök hücrelerinde mikronükleus ve kromozomal anormallik testi kullanılarak genotoksitesi incelenmiştir. Çeşitli oranlarda sodyum bisülfid ve sodyum sülfid (1:3) karışımı 1×10^{-4} ve 2×10^{-3} M konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, kontrol konsantrasyonuna kıyasla doza bağlı MN ve KA frekansında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Analizlere göre, maddelerin genotoksik olduğu saptanmıştır [98].

Doğal gıda koruyucuları olarak kullanılan biberiye yağı ve kekik yağının *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde kromozom anormallikler ve mikronükleus testiyle genotoksitesi incelenmiştir. Bunun için yağların %0,1 %0,5 ve %1'lik konsantrasyonlarıyla 3 saat kök uçlarına uygulama yapılmıştır. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda mitotik indeks önemli ölçüde azalmış, kromozomal anormallikler ve mikronükleus frekansı konsantrasyona bağlı olarak yükselmiştir. Yazarlara göre, çalışılan yağların antimikrobiyal ajanlar olarak etkin rollerine rağmen, ökaryotik hücrelerdeki genotoksite potansiyellerinin varlığı onların gıda koruyucusu olarak kabul edilmemesi gerektiğini göstermiştir [99].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, genotoksik etkisi incelenen Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfat gıda katkı maddeleri sık kullanılan koruyuculardandır. Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfat'ın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, son zamanlarda yapılan çalışmalar gıdalarda kullanılan katkı maddelerinin serbest radikal ve özellikle reaktif oksijen türleri oluşturabileceğini destekler niteliktedir. Abd-Elhakim ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada Sodyum Asetat'ın genotoksitesisi *in vivo* şartlarda araştırılmış ve önemli bir genotoksik etki ve sitotoksik etki tespit edilmiştir. Asetat tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasının, Sodyum Asetat'ın sitogenotoksik etkisinin altında yatan bir mekanizma olabileceği belirtilmiştir [38]. Buradan hareketle tez çalışmasında görülen genotoksik ve sitotoksik etkinin ROS salınımına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Gelişen teknolojik metotlar, daha güvenilir ve kaliteli işlenmiş gıda üretimini sağlayabiliyorken serbest radikaller gibi vücutta zararlı etkiler gösteren bazı istenmeyen ürünlerin de oluşmasına sebep olabilir. Gıdaların çoğunda az bulunan serbest radikaller, gıdaların işleme tekniğine bağlı artmaktadır. Yani işlenen bir gıdanın serbest radikal içeriği, ham maddenin içeriğinden daha fazla olmaktadır [100]. Oluşan ROS ve serbest radikaller hücrenin protein, lipid ve DNA gibi birden çok hayati bileşenleriyle reaksiyona girerek bu bileşenlerin yapı ve fonksiyonunu bozabilmektedir. Örnek olarak ROS radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerini hızlı bir şekilde oksidasyona uğratabilmesi sebebiyle, yapısında bu yağ asitlerini çok miktarda bulunduran beyinde iskemi (kanlanmanın yavaşlaması ve durması), Alzhemier ve Parkinson gibi önemli dejeneratif hastalıkların meydana gelmesine sebep olabilir. Ayrıca ROS radikalleri başta olmak üzere serbest radikal stresi oluşturan tüm bileşikler, biyolojik olarak yaşlanmayı da hızlandırır [101].

Sağlıklı bir bedende, oksijen radikalleriyle antioksidan savunma mekanizmaları tam bir denge halinde çalışır. Normal metabolizma sırasında ROS ve antioksidanlar arasında yer alan denge, güneş ışınları, GKM, ilaçlar, kozmetikler, kirletici kimyasalları içeren birtakım çevresel prooksidanlar tarafından ROS yönüne kaydırılabilmektedir. Bu durumda da lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA mutasyonu veya kırılması, enzim aktivasyonu veya inaktivasyonuna yol açar. ROS'a maruz kaldıktan sonra hücrelerde DNA hasarı, hücre siklusu düzensizliği, DNA tamir veya replikasyon bozukluğu ve gen mutasyonları görülebilmektedir [102].

DNA sürekli endogenik ve ekzogenik mutajenler ve karsinojenlerle hasara uğrar. Oluşan bu hasarlar; yanlış eşleşme tamiri, baz-kesip çıkarma tamiri, nükleotit kesip-çıkarma tamiri ve çift iplik tamiriyle onarılabilir [103]. Onarılmayan DNA hasarına sahip olan hücreler apoptosize ya da kötü huylu tümör olma yoluna doğru ilerler. DNA hasar tamirinde bir deformasyon veya etkinlik düşüşü kanser riski gelişiminde önemli rol oynar [103].

Yapılan çalışmalarda XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların, DNA'da tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir [104]. XRCC1 proteini, parçalanmış lezyonlar ve küçük DNA hasarının onarımında büyük bir öneme sahiptir. PARP-1 enzimi DNA tamirinden sorumlu olup, aşırı aktive olduğunda apoptoz ve nekroza sebep olan nükleer bir enzimdir [105]. PARP1 aktivitesinin eşik düzeyine göre, DNA tamiri, apoptoz veya nekroz oluşur [106]. Bu çalışmada kullanılan iki koruyucu gıda katkı maddesinin neden olabileceği ROS salınımının da bu proteinlerin fonksiyonlarında bozulmalara sebep olarak, DNA'da tek zincir kırıklarına neden olabileceği ve böylece mutajenik etkilerinin meydana geldiği düşünülebilir. Fakat bunların etki mekanizmasıyla ilgili detaylı çalışmaların yapılması gereklidir.

Yapılan bu tez çalışmasında hazır tüketilen yiyeceklerde sıklıkla kullanılan koruyucu GKM olan Sodyum Asetat ile Sodyum Sülfid'in periferik insan kan lenfosit kültüründeki genotoksik etkileri ortaya konulmuştur. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Her iki gıda koruyucusu için de farklı hücre grupları ve testleri kullanılarak yapılan az sayıdaki çalışmada gözlenen genotoksik etki bu tez çalışmasının sonuçlarını destekler niteliktedir. Söz konusu çalışmalar ile beraber düşünüldüğünde farklı dokularda farklı testlerle birbirini destekleyen sitogenotoksik etki sebebiyle Sodyum Asetat ile Sodyum Sülfid'in kullanımında dikkatli olunması gerektiği önerilmektedir. SA ve SS'in üretici ve tüketici tarafından bilinçli olarak kullanılmaları sağlanmalıdır ve mümkün olan en asgari seviyeye düşürülmelidir. Dünyada hızlıca artan nüfus nedeniyle gıda katkı maddelerinin kullanımı artmıştır. İnsan sağlığını en iyi şekilde korumak amacıyla, gıda üretim zincirinde bir sistem olarak ele alınması, gıda güvenliğinin devamlı kontrol edilmesi, alınan tüm önlemlerde bilimsel kanıtların ve her türlü risk değerlendirmesinin göz önünde bulundurulması tüketici çıkarının korunması bakımından son derece önemlidir.

Yapılan literatür incelemesi göz önüne alınarak aynı gıda koruyucusunun farklı hücre grupları veya test sistemleriyle etkileri incelendiğinde sonuçların birbirinden farklı olabileceği görülmektedir. Yani bir hücre grubunda veya konsantrasyon setinde genotoksisite gözlenirken şartlar değiştiğinde bu etki ortaya konamayabilir. *In vivo* ve *in vitro* şartlar için de aynı durum söz konusu olabilir. Yine literatürde bazı koruyucu GKM'nin de neredeyse tüm test ve hücre sistemlerinde benzer sonuçları verdiği görülmektedir. Bu nedenle ileriye dönük olarak da bu tez çalışmasının sonuçları *in vivo* çalışmalar ve farklı genotoksisite testleriyle de desteklenmeli bunlardan yapılan tespitlerle de belki SA ile SS'in yerini alabilecek daha güvenli ajanların sentezlenmesi sağlanmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Altunkaynak, P. and Yılmaz, E. A. (2021). Food Additives and Genotoxicity. *International Journal of Science Letters*, 3(2), 109-120.
2. Saldamlı, İ., Uygun Ü., (2005). Gıda Katkı Maddeleri. Gıda Kimyası, Saldamlı İ (baş editör), Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye, s. 487-522.
3. İnternet: Türk Toksikoloji Derneği. Günümüzde kimyasal maddeler ve toksikoloji. <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.turktox.org.tr%2Fassets%2Fgida%2Findex.php%3Fp%3Dtoksikoloji&date=2023-03-11>. Son Erişim Tarihi: 11.03.2023.
4. İnternet: National Library of Medicine. History of Toxicology. <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Ftoxtutor.nlm.nih.gov%2F01-001.html%23Three&date=2023-03-11>. Son Erişim Tarihi: 11.03.2023.
5. Sezginer, H. ve Dane, F. (2016). Toksik Maddelerin Genotoksik Analiz Yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 50-55.
6. Ünal, F. (Editor) ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editor) (2022). Genetik Toksikoloji. Ünal, Fatma; Yüzbaşıoğlu, Deniz (Ed.) Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
7. Türk Gıda Kodeksi, (2013). Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. T.C. Resmi Gazete, Sayı: 28693.
8. Karatepe, T. U. ve Ekerbiçer, H. Ç. (2017). Gıda katkı maddeleri. *Sakarya Tıp Dergisi*, 7(4), 164-167.
9. Erkan, T. (2010). Gıdalardaki katkı maddeleri. *Türk Pediatri Arşivi*, 45(4), 315-318.
10. Altuğ, T. (2009). Gıda Katkı Maddeleri. T. Altuğ (Editör). Gıda katkı maddeleri. Üçüncü Baskı. İzmir. Kan Yılmaz Matbaacılık, 1-16.
11. Tayfur, M. (2017). Gıda katkı maddeleri ve yasal düzenlemeler. M. Tayfur. (Editör) A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri. İkinci Baskı. Ankara: Detay Yayıncılık, 227-235.
12. Atman Ü. (2004). Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontrolü. Uzm.; Merkez 1 Nolu AÇS-AP Merkezi, Halk Sağlığı, Manisa, Cilt 18 ,Sayı 3.
13. Yaralı E. (2018). Gıda Katkı Maddesi, Ders Notları.
14. Ekşi, A. (2017). Gıda katkıları ve başlıca işlevleri. M. Tayfur. (Editör). A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri. İkinci Baskı. Ankara. Detay Yayıncılık, 5-7.
15. Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53(3), 220-235.

16. Erden-Çalışır, Z. ve Çalışkan, D. (2003). Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32 (3), 207-206.
17. Ova, G. (2009). Koruyucular. T. Altuğ (Editör). Gıda katkı maddeleri. Üçüncü Baskı. İzmir. Kan Yılmaz Matbaacılık, s. 105-156.
18. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (2023). CID 517045, Sodyum Asetat için PubChem Bileşik Özeti. 11 Mart 2023 tarihinde <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Acetate> adresinden alındı.
19. İnternet: The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). <https://web.archive.org/web/20160517034615/http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0565.html> Son Erişim Tarihi: 11.03.2023.
20. Türk Gıda Kodeksi, (2013). Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. T.C. Resmi Gazete, Sayı: 28693.
21. Benli, D. ve Türkoğlu, Ş. (2017). Bazı Gıda Koruyucularının *Drosophila melanogaster*'in Yaşama Yüzdesi ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkisi. *Cumhuriyet Science Journal*, 38(3), 461-472.
22. İnternet: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (2023). CID 24437, Sodyum sülfat için PubChem Bileşik Özeti. 11 Mart 2023 tarihinde <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Sulfate> adresinden alındı.
23. Güner, U. (2014). Toksikoloji. *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi*, 2, 186-189.
24. Choy, W. N. (2001). Regulatory genetic toxicology tests. In *Genetic toxicology and cancer risk assessment* (pp. 107-128). CRC Press.
25. Ostling, G. and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.
26. Registre, M. and Proudlock, R. (2016). The in vitro chromosome aberration test. In *Genetic Toxicology Testing* (pp. 207-267). Academic Press.
27. Registre, M. and Proudlock, R. (2016). The in vitro chromosome aberration test. In R. Proudlock (Ed.), *Genetic Toxicology Testing, A Laboratory Manual*. North Carolina. Academic Press, 1-3.
28. Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R. and Pandey, A. K. (2018). Chromosomal aberrations. In *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 69-92). Academic Press.
29. Ballarini, F. and Carante, M. P. (2016). Chromosome aberrations and cell death by ionizing radiation: Evolution of a biophysical model. *Radiation Physics and Chemistry*, 128, 18-25.

30. Choy, W. N. (2001). Genetik toksikoloji ve kanser risk değerlendirmesi . CRC Basın.
31. Stopper, H. and Müller, S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vitro*, 11(5), 661-667.
32. Demirel, S., Zamani, A., (2002). Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
33. Hemachandra, C. K. and Pathiratne, A. (2016). Combination of physico-chemical analysis, Allium cepa test system and Oreochromis niloticus erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotoxicology and environmental safety*, 131, 54-64.
34. Chandirasekar, R., Kumar, B. L., Sasikala, K., Jayakumar, R., Suresh, K., Venkatesan, R. and Ganesh, G. K. (2014). Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of cancer risk in smoking and smokeless tobacco users. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767, 21-27.
35. Ennaceur, S. (2017). Study of the genotoxic and cytotoxic effects of the α -, β -, and γ -Hexachlorocyclohexane isomers in human lymphocyte cells using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(1), 85-89.
36. Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W. P., Burgaz, S., Thomas, P. and Bonassi, S. (2011). The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis*, 26(1), 239-245.
37. Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L. and Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 12-25.
38. Abd-Elhakim, Y. M., Anwar, A., Hashem, M. M., Moustafa, G. G. and Abo-El-Sooud, K. (2018). Sodium acetate, sodium acid pyrophosphate, and citric acid impacts on isolated peripheral lymphocyte viability, proliferation, and DNA damage. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(8), e22171.
39. El-Hefny, I., Hozayen, W., AlSenosy, N., Basal, W., Ahmed, A. and Diab, A. (2021). Evaluation of genotoxicity of three food preservatives in drosophila melanogaster using smart and comet assays. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 2021, 38-41.
40. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 517045, Sodium Acetate. Retrieved May 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Acetate>.

41. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 24437, Sodium Sulfite. Retrieved May 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Sulfite>.
42. Internet:https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Sodiumacetate,MDA_CHEM-137046 Son Erişim Tarihi: 15.05.2023.
43. Internet:https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Sodiumsulfite,MDA_CHEM-106657.html Son Erişim Tarihi: 15.05.2023.
44. Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In *Handbook of mutagenicity test procedures*.
45. Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
46. Eroğlu, H. E. (2008). *Türkiye Helichrysum Mill.(asteraceae) taksonlarının genotoksik etkilerinin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri).
47. Fadeel, B., Pietroiusti, A. and Shvedova, A. A. (Eds.). (2017). *Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health*. Academic Press.
48. Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghighi, F. and Behravan, J. (2009). Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell biology and toxicology*, 25, 291-296.
49. Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. and Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 763-769.
50. Fazendeiro, M. S. P. P. (2013). DNA damage induced by acrylamide: role of genetic polymorphisms in DNA damage levels.
51. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
52. Suspiro, A. and Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: a minireview. *Toxicology letters*, 207(1), 42-52.
53. Cajiao, J. J. T., Carante, M. P., Rodriguez, M. A. B. and Ballarini, F. (2018). Proximity effects in chromosome aberration induction: Dependence on radiation quality, cell type and dose. *DNA repair*, 64, 45-52.

54. Büyükçoban, T. (2010). *Sağlıklı insan lenfositlerinde in vitro genotoksik analizler ve uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
55. Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L. Hagmar, L. and Strömberg, U. (2006). Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, 600 (1-2), 37-45.
56. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1): 93-100.
57. Kuru, M. ve Ergene, S. (2011). *Genetik* (Dördüncü baskı). Ankara Palme yayıncılık, 246-266.
58. Yılmaz, S., Unal, F., Aksoy, H., Yuzbasioğlu, D. and Çelik, M. (2008). Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on allium chromosomes. *Fresen Environ Bull*, 17, 1029-37.
59. Alakoç, C. ve Eroğlu, HE. (2011). Metal ark kaynak dumanına maruz kalan kaynakçıların periferik lenfositlerinde mitotik indeksin belirlenmesi. *Türk Biyoloji Dergisi*, 35 (3), 325-330.
60. Fındıklı, Z. ve Türkoğlu, Ş. (2010). Glyphos ve DDVP'nin Allium cepa L.'da mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkisi. *C. Ü Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 31(2), 49-62.
61. Thor, AD, Liu, S., Moore II, DH ve Edgerton, SM (1999). Meme kanserinde proliferasyonu ölçmek için mitotik indeks, in vitro bromodeoksiüridin etiketlemesi ve MIB-1 tahlillerinin karşılaştırılması. *Klinik Onkoloji Dergisi*, 17 (2), 470-470.
62. Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in Allium cepa roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios*, 57(228), 7-14.
63. Van't Hof, J. (1968). IAA ve kinetinin proliferatif ve durağan faz eksize edilmiş kök meristemlerinin mitotik döngüsü üzerindeki etkisi. *Deneyisel Hücre Araştırması*, 51 (1), 167-176.
64. Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Fatma, Ü. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.
65. Parry, J. M. and Kirsch-Volders, M. (2010). Special issue on in vitro MN trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 702(2), 132-134.
66. Chandirasekar, R., Kumar, B. L., Sasikala, K., Jayakumar, R., Suresh, K., Venkatesan, R. and Ganesh, G. K. (2014). Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of

- cancer risk in smoking and smokeless tobacco users. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767, 21-27.
67. Çelik, D. A., Toğay, V. A., Türel, G. Y. ve Özçelik, N. (2022). Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sitrik Asit, Askorbik Asit Ve Sodyum Sitratın İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksitesinin Değerlendirilmesi. *SdÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 29(3), 486-492.
 68. Türkoğlu, Ş. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 4-14.
 69. Mamur, S., Ataseven, N., Fatma, Ü. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2018). Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 235-245.
 70. Andarza, M., Lamukim, M. S. and Barghi, N. G. (2022). Evaluation Of Genotoxicity Induced By Sodium Benzoate In Normal Cell Line Of Gingival Fibroblast (Hgf) By Comet Assay Method. *Journal Of Positive School Psychology*, 6(7), 3270-3280.
 71. Özdemir, H., Turhan, A. B. ve Arıkoğlu, H. (2012). Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması. *European Journal of Basic Medical Science*, 2(2), 34-40.
 72. Luca, D., Luca, V., Cotor, F. and Răileanu, L. (1987). In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(3), 333-339.
 73. Tsuda, H., Inui, N. and Takayama, S. (1976). In vitro transformation of newborn hamster cells induced by sodium nitrite. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 67(2), 165-173.
 74. Ishidate Jr, M. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro—a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 48(3-4), 337-353.
 75. Akin, A. and Sümer, S. (1991). The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the Salmonella microsome test system. *Mikrobiyoloji bulteni*, 25(1), 94-107.
 76. Kathpalia, R., Bhardwaj, K., Biswas, L. and Verma, A. K. (2022) Cyto-Genotoxic Evaluation of Frequently Added Food Preservatives on the Root Meristem Cells of *Allium Cepa*.
 77. Sarıkaya, R. and Çakır, Ş. (2005). Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(3), 424-430.

78. Pongsavee, M. and Mishra, R. (2021). Potassium sorbate induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(2), 2795-2803.
79. Yuzbasioglu, D., Mamur, S., Avuloglu-Yilmaz, E., Erikel, E., Celebi-Keskin, A. and Unal, F. (2021). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870, 503391.
80. Softić, A., Srabović, N., Smajlović, A., Husejnović, M. Š., Lelić, M., Dautović, E. and Halilčević, D. (2022). Cytotoxicity and Genotoxicity of Sunset Yellow and Potassium Sorbate in Jurkat Cell Line. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 1-9.
81. Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cassand, P. and de Saint Blanquat, G. (2000). Genotoxicity study of reaction products of sorbic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3605-3610.
82. Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K. and Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119.
83. Pandey, H. and Kumar, S. (2021). Butylated hydroxytoluene and Butylated hydroxyanisole induced cyto-genotoxicity in root cells of *Allium cepa* L. *Heliyon*, 7(5), e07055.
84. Pandir, D. (2016). DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*, 68(4), 725-733.
85. Güzel Bayülken, D., Ayaz Tüylü, B., Sinan, H. and Sivas, H. (2019). Investigation of genotoxic effects of paraben in cultured human lymphocytes. *Drug and chemical toxicology*, 42(4), 349-356.
86. Martins, F. C., Oliveira, M. M., Gaivão, I., A. Videira, R. and Peixoto, F. (2023). The administration of methyl and butyl parabens interferes with the enzymatic antioxidant system and induces genotoxicity in rat testis: possible relation to male infertility. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-8.
87. Basler, A., Von der Hude, W. and Scheutwinkel, M. (1987). Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties. *Food and chemical toxicology*, 25(4), 287-290.
88. Ohara, A. and Matsuhisa, T. (2002). Anti-tumor promoting activities of edible plants against okadaic acid. *Food Science and Technology Research*, 8(2), 158-161.
89. Surjan, A. (1989). Nalysis (Of Genotoxic Activity Of 16 Compounds Ni) Mixtures By The Drosophila Mosaic Test. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 25(4), 569-572.

90. Turna Demir, F. and Demir, E. (2022). Genotoxicity mechanism of food preservative propionic acid in the in vivo *Drosophila* model: gut damage, oxidative stress, cellular immune response and DNA damage. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1-10.
91. Ataseven, N. (2015). Gıda Katkı Maddeleri olarak Kullanılan Monosodyum Glutamat, Sodyum Propiyonat ve Potasyum Propiyonatın İnsan Lenfosit Kültüründe Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. *Yayınlanmamış doktora tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
92. 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.
93. Rencüzoğulları, E., İla, H. B., Kayraldız, A. and Topaktaş, M. (2001). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2), 107-112.
94. Rencüzoğulları, E., Kayraldız, A., İla, H. B., Çakmak, T. and Topaktaş, M. (2001). The Cytogenetic Effects Of Sodium Metabisulfite, A Food Preservative İn Root Tip Cells Of *Allium Cepa* L. *Turkish Journal Of Biology*, 25(4), 361-370.
95. Carvalho, I. M., Cavalcante, A. A. M., Dantas, A. F., Pereira, D. L., Rocha, F. C. C., Andrade, T. J. and Da Silva, J. (2011). Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 720(1-2), 58-6.
96. Gömrüngen, A. N. (2005). Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70(2), 119-128.
97. Aledwany, A. Z., Basal, W. T., Al-Senousy, N. K. and Issa, A. M. (2018). Assessment of genotoxicity of potassium nitrate and sodium benzoate in *Drosophila melanogaster* using Smart and Comet Assays. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 10(2), 83-97.
98. Yi, H. and Meng, Z. (2003). Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 109-114.
99. Hamedo, H. A. and Abdelmigid, H. M. (2009). Use of antimicrobial and genotoxicity potentiality for evaluation of essential oils as food preservatives. *The Open Biotechnology Journal*, 3(1).
100. Yordanov, N. D. and Mladenova, R. (2004). EPR study of free radicals in bread. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(6), 1395-1400.

101. Erbaş, M. ve Şekerci, H. (2011). Serbest radikallerin önemi ve gıda işleme sırasında oluşumu. *Gıda*, 36(6), 367-374.
102. Karaca, Ş. ve Güder, H. (2009). Dermatolojide Antioksidan Sistem. *Turkish Journal of Dermatology/Turk Dermatoloji Dergisi*, 3(2).
103. Goode, EL, Ulrich, CM ve Potter, JD (2002). DNA onarım genlerindeki polimorfizmler ve kanser riski ile ilişkiler. *Kanser epidemiyolojisi biyobelirteçleri ve önleme*, 11 (12), 1513-1530.
104. Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F. and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer research*, 65(10), 4020-4030.
105. Roy, N. and Cardone, M. H. (2002). The caspases: consequential cleavage. *Apoptosis*, 93-135.
106. Cory, S. and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Pınar ALTUNKAYNAK
Doğum Yeri :
Doğum Tarihi :

EĞİTİM DURUMU

Ön Lisans Öğrenimi : Anadolu Üniversitesi
Lisans Öğrenimi : Hasan Kalyoncu Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Amasya Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : Arapça, İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar (-SCI –Diğer)

Altunkaynak, P. and Yılmaz, E. A. Food Additives and Genotoxicity. *International Journal of Science Letters*, 3(2), 109-120.

b) Bildiriler (-Uluslararası –Ulusal):

Altunkaynak, P. ve Yılmaz, E. (2023). Gıda Katkı Maddesi Olan Sodyum Sülfid'in Genotoksik Etkilerinin Kromozomal Anormallik Testi İle İncelenmesi. 5. Uluslararası Ankara Multidisipliner Bilimsel Çalışmalar Kongresi, 27-29 Ocak 2023, Türkiye.

c) Katıldığı Projeler

Amasya Üniversitesi BAP - Gıda Katkı Maddeleri Olan Sodyum Asetat ve Sodyum Sülfid'in *In Vitro* İnsan Periferik Lenfositlerinde Genotoksik Etkileri

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Antalya İl Milli Eğitim Müdürlüğü, 2022

İLETİŞİM

E-posta Adresi :