

**GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN SODYUM
SORBAT VE POTASYUM SORBAT'IN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Sevcan MAMUR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2009
ANKARA**

Sevcan MAMUR tarafından hazırlanan “GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN SODYUM SORBAT VE POTASYUM SORBAT’IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ARSLAN

.....

(Biyoloji Eğitimi, Gazi Üniversitesi)

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Fatma ÜNAL

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

Tarih: 28/05/2009

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Sevcan MAMUR

**GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN SODYUM
SORBAT VE POTASYUM SORBAT'IN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**
(Yüksek Lisans Tezi)

Sevcan MAMUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mayıs 2009

ÖZET

Bu çalışmada, gıdalarda antimikrobiyal katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbatın *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferal lenfositlerinde, kromozom anormallliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılarak belirlenmiştir. Sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/ml ve potasyum sorbatın 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Her iki gıda katkı maddesi de kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimini negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. Sodyum sorbatın 400 ve 800 µg/ml'lik konsantrasyonlarında mikronükleus frekansında istatistiksel olarak önemli oranda artış gözlenmiştir. Bununla birlikte potasyum sorbat insan lenfosit kültüründe mikronükleus frekansını etkilememiştir. Sodyum sorbat 200 µg/ml'lik konsantrasyonda, potasyum sorbat ise 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda mitotik indekste negatif kontrole göre anlamlı düşüşe neden olmuştur. Replikasyon ve nükleer bölünme indeksleri sodyum sorbat ve potasyum sorbat tarafından herhangi bir şekilde etkilenmemiştir. Comet analizi sonuçlarına göre, her iki katkı maddesi de tüm konsantrasyonlarda primer DNA hasarını önemli oranda artırmıştır. Comet kuyruk yoğunluğu ve comet kuyruk uzunluğu (sodyum sorbatın 400 µg/ml

konsantrasyonu hariç) kontrole göre tüm uygulamalarda önemli düzeyde artmıştır. Elde edilen bulgular, çalışmada kullanılan katkı maddelerinin *in vitro* kültüre alınmış ve izole edilmiş insan lenfositlerinde klastojenik ve mutajenik etkili olduğunu ayrıca primer DNA hasarını indüklediğini göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048

Anahtar Kelimeler : Sodyum sorbat, potasyum sorbat, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet testi, mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ), nükleer bölünme indeksi (NBİ), genotoksik etki

Sayfa Adedi : 85

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

**THE GENOTOXIC EFFECTS OF FOOD ADDITIVES SODIUM SORBATE
AND POTASSIUM SORBATE IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES**

(M.Sc. Thesis)

Sevcan MAMUR

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

May 2009

ABSTRACT

In this study, the *in vitro* genotoxic effects of sodium sorbate and potassium sorbate which are frequently used in foods as antimicrobials, have been determined in human peripheral blood lymphocytes by using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN) and comet assay. 100, 200, 400 and 800 µg/ml concentrations of sodium sorbate and 125, 250, 500 and 1000 µg/ml concentrations of potassium sorbate were used. Both food additives used in this study significantly increased the frequency of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges compared with the negative control. Micronuclei frequency statistically increased in 400 and 800 µg/ml concentration of sodium sorbate. However potassium sorbate did not effect the micronuclei frequency in human lymphocytes culture. 200 µg/ml concentration of sodium sorbate and 1000 µg/ml concentration of potassium sorbate significantly decreased the mitotic index compared with the negative control. Replication and nuclear division indices were not effected by the sodium sorbate and potassium sorbate. According to the comet assay results, primary DNA damage significantly increased by all treatments of both additives. The comet tail intensity and comet tail length (except 400 µg/ml for tail length for sodium sorbate) significantly increased compared with the

control in all treatments. The results of experiments showed that the additives used in this study have clastogenic and mutagenic and also DNA damaging effects in cultured and isolated human lymphocytes.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Sodium sorbate, potassium sorbate, chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronuclei (MN), comet assay, mitotic index (MI), replication index (RI), nuclear division index (NDI), genotoxic effect

Page Number: 85

Adviser : Asost. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, ilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; yetişmeme katkıda bulunan ve tüm aşamalarda yanımda bulunarak bana destek veren hocalarım Dr. Serkan YILMAZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a; benden yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Gökçe TANER'e ve laboratuvardaki tüm Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2007(50) No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	3
2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	4
2.3. Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri	7
2.4. Sorbik Asit (E-200) ve Tuzları.....	8
2.4.1. Sodyum sorbat (E-201)	10
2.4.2. Potasyum sorbat (E-202).....	11
2.5. Genotoksisite Testleri	13
2.5.1. Kromozomal anormallik testi (KA)	14
2.5.2. Kardeş kromatid değişimi testi (KKD)	16
2.5.3. Mikronükleus testi (MN).....	16
2.5.4. Comet testi	18
2.6. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar ...	19

Sayfa

3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	23
3.1.2. Test materyali	23
3.2. Metot	25
3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar	25
3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. Sodyum Sorbat'ın KA Üzerine Etkileri	34
4.2. Sodyum Sorbat'ın KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri.....	40
4.3. Sodyum Sorbat'ın MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri	43
4.4. Sodyum Sorbat'ın Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkisi	44
4.5. Potasyum Sorbat'ın KA Üzerine Etkileri.....	46
4.6. Potasyum Sorbat'ın KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri	53
4.7. Potasyum Sorbat'ın MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri.....	56
4.8. Potasyum Sorbat'ın Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkisi	57
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sodyum sorbat'ın genotoksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalar.....	11
Çizelge 2.2. Potasyum sorbat'ın genotoksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalar.....	12
Çizelge 4.1. Sodyum sorbat uygulaması ile insan periferel lenfositlerinde oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları	35
Çizelge 4.2. Sodyum sorbat'ın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	41
Çizelge 4.3. Sodyum sorbat'ın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	43
Çizelge 4.4. Sodyum sorbat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	45
Çizelge 4.5. Potasyum sorbat uygulaması ile insan periferel lenfositlerinde oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları	48
Çizelge 4.6. Potasyum sorbat'ın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	54
Çizelge 4.7. Potasyum sorbat'ın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	56
Çizelge 4.8. Potasyum sorbat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Sorbik asitin yapısal formülü	24
Şekil 3.2. Sodyum sorbatın yapısal formülü	24
Şekil 3.3. Potasyum sorbatın yapısal formülü.....	25
Şekil 3.4. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile 1.,2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	30
Şekil 4.1. Sodyum sorbatın anormal hücre (%) frekansı üzerine etkisi	36
Şekil 4.2. Sodyum sorbatın KKD/hücre oranına etkisi	41
Şekil 4.3. Sodyum sorbatın MI (%) frekansı üzerine etkisi	42
Şekil 4.4. Sodyum sorbatın MN (%) frekansı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.5. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı	45
Şekil 4.6. Potasyum sorbatın anormal hücre (%) frekansı üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.7. Potasyum sorbatın KKD/hücre oranına etkisi	54
Şekil 4.8. Potasyum sorbatın MI (%) frekansı üzerine etkisi	55
Şekil 4.9. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı	58

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde meydana gelen gap oluşumu.....	36
Resim 4.2. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	37
Resim 4.3. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri	42
Resim 4.4. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	44
Resim 4.5. Sodyum sorbat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	46
Resim 4.6. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde meydana gelen gap oluşumu.....	49
Resim 4.7. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	50
Resim 4.8. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri	55
Resim 4.9. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	56
Resim 4.10. Potasyum sorbat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
LD ₅₀	Letal doz ₅₀
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper
mm	Milimetre
Kısaltmalar	Açıklama
AMES	<i>Salmonella</i> /memeli mikrozom testi
BrdU	Bromodeoksiüridin
CAs	Chromosomal aberrations
CAC	Kodeks Alimentarius Komisyonu
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda Tarım Teşkilatı

Kısaltmalar**Açıklama****FDA**

ABD Gıda İlaç Dairesi

H₂O₂

Hidrojen peroksit

HPGRT

Hipoksantin-guanin fosoribozil transferaz

JECFA

Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi

KA

Kromozomal anormallik

KKD

Kardeş kromatid değişimi

Mİ

Mitotik indeks

MMC

Mitomisin-C

MN

Mikronükleus

NaCl

Sodyum klorür

NaOH

Sodyum hidroksit

NBİ

Nükleer bölünme indeksi

PBS

Fosfat tamponu

Rİ

Replikasyon indeksi

SCE

Sister chromatid exchange

SCGE

Single cell gel elektroforezis

SMART

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

SSC

Salin sitrat tamponu

S9

Karaciğer özütü

WHO

Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artışlar, gıda sektörünü besleyen ham madde kaynaklarındaki azalmalar, insanların yaşam standartlarını yükseltme eğilimleri ve mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması gibi etmenler gıda katkı maddelerinin gıda endüstrisinde kullanımını zorunlu hale getirmiştir [Saldamlı ve Uygun, 2005]. Gıda katkı maddeleri; yiyeceklerin hazırlanması sırasında besinlerin bozulmasını önlemek, tadını, yapısını ya da besin değerini artırmak amacıyla besinlere eklenmiş maddelerdir [Gürsoy, 2001]. Son 30 yıldır, başta gelişmiş ülkelerde olmak üzere, yiyeceklere katılan kimyasal maddelerin sayıları hızlı bir şekilde artmıştır [Arslan, 2004].

Gıda katkı maddeleri; her ne kadar mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet ve koku gibi duyuşsal özellikleri düzeltme gibi amaçlar doğrultusunda kullanılıyorsa da aynı zamanda pek çok sağlık sorununu da beraberinde getirmektedirler. Bu maddeler gelişigüzel, tüzük dışı ve sürekli olarak kullanıldıklarında, tüketicilerde alerjik ve toksik reaksiyonların görülmesine neden olmaktadır [Arslan, 2004]. Tüketilen gıdalarla birlikte her gün çeşitli katkı maddelerinin vücut içerisine girdiği düşünüldüğünde, sağlığa zarar vermeyecek dozda kullanılsalar dahi, bu maddelerin bir süre sonra vücut içerisinde birikerek insan sağlığı için tehlikeli olabilecek miktarlara ulaşabilecekleri ve dokularda çeşitli hasarlar meydana getirebilecekleri göz ardı edilmemelidir [Sarıkaya ve Solak, 2003]. Dünyada hala pek çok gıda katkı maddesinin genotoksik etkili olup olmadığı bilinmemekte ve bu maddeler dikkatsiz bir şekilde kullanılmaya devam edilmektedir. Bu nedenle bilim adamları, çeşitli gıda katkı maddelerinin olası klastojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, pek çok gıda katkı maddesinin mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [Abe ve Sasaki, 1977; Luca ve ark., 1987; Meng ve Zhang, 1994; Sasaki ve ark., 2002; Arslan, 2004; Kaya ve Topaktaş, 2007; Yılmaz, 2008; Mpountoukas ve ark., 2008].

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, kısa süreli genotoksisite testleri olan kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri insan lenfosit kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasalların primer DNA hasarını indükleyip indüklediği ise, comet testi kullanılarak belirlenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, gıdalarda antimikrobiyal katkı maddeleri olarak sıklıkla kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbatın olası genotoksik etkilerini, kültüre alınmış insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) testleri ile ve izole edilmiş insan lenfositlerinde ise comet testi (SCGE) kullanarak *in vitro* yöntemlerle belirlemektir. Bu çalışma, sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerinde genetik bir risk oluşturup oluşturmayacağına açıklık getireceğinden dolayı önemli olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Katkı maddelerinin gıdalarda kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Toplumların bilinçsiz ve teknolojiden uzak olduğu dönemlerde bile gıda katkı maddeleri her zaman bir isteme bağlı olarak tüketilmişlerdir [Saldamlı, 1985]. Gıda katkı maddeleri genel anlamda “gıdaların özelliklerini istenilen biçimde etkilemek amacıyla kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler arasında görünüm, lezzet, doku besleyici değer ve depolama ömrü sayılabilmektedir [Altuğ ve ark., 2000].

İlk kez gıda katkı maddesi olarak, A.B.D. patenti ile 1886 yılında tuz ve kalsiyum fosfat karışımı bir preparat üretilmiş ve bu preparat çeşni maddesi olarak ticari işlem görmüştür [Saldamlı, 1985]. 1950’li yıllardan bu yana hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak gıda maddelerine duyulan gereksinimin çoğalması, şehirleşme ve insanların yaşam biçimlerinde oluşan değişimler, yüksek kalitede ve çeşitlilikteki gıda maddelerine duyulan ihtiyaç, seyahat ve nakil imkânlarının gelişmesi, yeni gıda işleme ve pazarlama yöntemleri nedeniyle katkı maddelerinin üretimi ve gıdalarda kullanımı büyük oranda artmıştır [Altuğ ve ark., 2000]. 1956 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 40 ülkeyi kapsayan ve 50 doğal renk maddesi ile 114 yapay renk maddesini içeren listeleri yayınlarak gıda katkı maddelerinin kullanımına izin vermiş ve gıda sektöründe uygulamaya alınmasına yol açmıştır [Saldamlı, 1985].

Gıda katkı maddeleri, Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya

istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir” olarak tanımlanmıştır [Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977].

Uluslararası bir kuruluş olan FAO/WHO Birleşik Kodeks Komitesi’nin tanımlamasında ise “ Tek başına besin değeri taşımayan ancak gıdaya bilinçli olarak direkt veya indirekt olarak katılan, onların görünüş ve yapılarını düzeltmek için veya muhafaza olanağını artırmak için sınırlı miktarda katılan maddelerdir” denilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan gıda katkı maddelerinin bazıları doğal, bazıları yapay ve bazıları da doğala özdeştir [Saldamlı ve Uygun, 2005]. Gıdaların korunmasında hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli doğal koruyucu sistemler kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki mikrobiyal gelişimin kontrolü amacıyla enzimlerden de yararlanılır. Enzimlerin gıda katkı maddeleri olarak kullanılmalarının avantajları vardır. Doğal kaynaklı oldukları için tercih edilirler ve toksik değildirler. Örneğin; invertazlar, yumuşak kremalı şekerleme dolgularının hazırlanmasında; proteazlar, taze etlerin olgunlaştırılması ve yumuşatılmasında; lipazlar, çeşitli peynirlerde aroma oluşturulmasında kullanılmaktadırlar [<http://www.gidacilar.net>].

Gıda katkı maddeleri fazla miktarda ya da duyarlı risk grupları tarafından tüketildiğinde toksikolojik açıdan tehlikeli olabilmektedirler. Katkı maddelerinin yarattığı riskler uzun dönemde ortaya çıkmakta [Saldamlı ve Uygun, 2005] ve egzama, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, ishal, bulantı, kusma, rinit, hiperaktivite, aşırı duyarlılık gibi çeşitli rahatsızlıklara yol açmaktadırlar [Adams, 1992; Yurttagül, 1993]. Bu nedenle gıda sanayinde kullanılacak katkı maddelerinin, kısa ve uzun vadede vücutta birikme olasılıklarının vücutta yaratacağı zararların ortaya konması ve ona göre de dozunun ayarlanması gerekmektedir [Saldamlı ve Uygun, 2005].

2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddeleri; bazen ait oldukları madde grubuna göre, bazen kullanılma amacına göre, bazen de üretiminde kullanıldığı gıdaya göre gruplandırılmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi'nin kullanım amaçlarına göre yapmış olduğu sınıflandırma aşağıda gösterilmiştir [Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977].

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular):

a) *Antimikrobiyaller*: Besinleri bakteri, küf ve maya bozulmalarına karşı korumak, besinlerin raf ömrünü uzatmak, doğal renk ve aromayı korumak amacıyla kullanılan maddelerdir.

b) *Antioksidanlar*: Arzu edilmeyen koku, aroma, tat değişikliklerini, enzimatik kararmayı veya oksidasyona bağlı renk kaybını geciktirmek ve önlemek, yağlı besinlerde acımayı geciktirmek ve önlemek amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

2. Yapıyı hazırlama, pişirme özelliğini geliştirenler:

a) *PH ayarlayıcılar*: Besinlerin pH'sını (asitliğini veya bazlılığını) kontrol etmek, değiştirmek ve istenilen düzeyi sağlamak amacıyla kullanılan maddelerdir.

b) *Topaklanmayı önleyenler*: Gıdalardaki partiküllerin biraraya toplanmasını önlemek amacıyla kullanılan maddelerdir.

c) *Emülsifiyerler*: Bir sıvının diğeri içinde muntazam küçük partiküller halinde dağılmasına yardımcı olmak, sıvının yüzey gerilimini azaltmak ve homojen bir dağılıma ve emülsiyon sağlamak amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

ç) *Stabilizörler*: Gıdada birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın tek düze dağılımını sağlamak amacıyla kullanılan maddelerdir.

d) *Kıvam artırıcılar*: Modifiye nişastalar gibi kıvam artırıcılar gıdalarda kıvamı yoğunlaştırmak amacıyla kullanılan maddelerdir.

e) *Tatlandırıcılar*: Aromayı ve tadı daha cazip hale getirmek, tatlı tadı vermek amacıyla kullanılan maddelerdir.

f) *Mayalanmayı sağlayıcı ajanlar*: Startırlar (laktobasiller) mayalanmayı hızlandırmak, pişme ve ürün kalitesini geliştirmek amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

g) *Nem ayarlayıcılar*: Düşük nemlilik oranına sahip bir ıslatma ajanı işlevi görerek, gıdaların kurummasını önlemek amacıyla kullanılan maddelerdir.

ğ) *Ağartıcılar*: Un işleme ajanı olup, unun pişme kalitesini veya rengini düzenlemek amacıyla kullanılan maddelerdir.

h) *Dolgu maddeleri*: Jelleştiriciler dolgu maddesi olarak işlev görüp, jel oluşumu ile gıdaya doku kazandırmak amacıyla kullanılan maddelerdir.

ı) *Köpük ayarlayıcılar*: Sıvı ya da katı gıdalarda, gaz fazın homojen dağılımını sağlayan maddelerdir. Köpürmeyi önleyici ajan olarak ta işlev görerek, köpürmeyi önleyen veya azaltan maddelerdir.

i) *Parlatıcılar*: Gıdanın dış yüzeyine parlak bir görünüm kazandırmak veya koruyucu bir tabaka oluşturmak amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

3. Aromayı ve rengi geliştiriciler:

a) *Çeşni arttırıcılar*: Aromayı daha cazip hale getirmek, doğal aromayı düzeltmek veya korumak amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

b) *Çeşni vericiler*: Tat ve kokuyu daha cazip hale getirmek, doğal lezzeti geliştirmek ve işleme esnasında kaybolan tat ve kokuyu kazandırmak amacıyla kullanılan maddelerdir.

c) *Renklendiriciler*: Tüketici beğenisi kazanmak, doğal rengi kuvvetlendirmek, işlem sırasında kaybolan rengi kazandırmak veya renksiz olan bir ürünü renklendirmek amacıyla kullanılan maddelerdir.

4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler:

a) İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2, niasin)

b) Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A,D vitaminleri)

FDA'nın bugüne kadar kullanımına onay verdiği gıda katkı maddesi sayısı yaklaşık 2800'dür. Ancak bunların önemli bir bölümü daha uygun alternatifleri bulunduğu için kullanılmamaktadır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda değişen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. Avrupa Birliği'nde ise kullanımına onay verilen gıda katkı maddesi sayısı 297'dir [Sarıkaya, 2005].

2.3. Antimikrobiyal Katkı Maddeleri

Çok eski yıllardan beri gıda muhafazasında mikroorganizmalara karşı kullanılan asitler, tuzlar, şeker ve onun islerinin (tütsü) yerine bugün antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Antimikrobiyal katkı maddeleri, gıdalarda bulunması istenmeyen bakteri, küf ve mayaları, patojen olan veya olmayan her türlü mikroorganizmayı ortamdan yok etmek, mikroorganizmaların çoğalmalarını ve faaliyette bulunmalarını önlemek amacıyla gıdalara katılan, besin ögesi olmayan, kullanım miktarları sınırlı ve gıdanın raf ömrünü uzatan kimyasal bileşimlerdir [Saldamlı, 1985; Yentür ve Bayhan, 1990]. Bu maddeler tat ve kokuyu korurken yağların ve yağ benzeri maddelerin acılaşmasını da engellerler [Saldamlı, 1985].

Antimikrobiyal katkı maddeleri; meyve-sebze ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, su ürünlerinde, süt ürünlerinde, margarinlerde, hububat ürünlerinde ve alkollü içecekler gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar. Bu alanlardan meyve sebze teknolojisi, reçel ve marmelât üretiminden kurutulmuş meyve sebze üretimine kadar uzanan geniş bir uygulama alanını kapsamakta olup, kullanılan antimikrobiyaller de geniş spektrum göstermektedirler [Parlak, 2007].

Koruyucuların antimikrobiyal özellikleri; maddenin antimikrobiyal spektrumu, kimyasal ve fiziksel özellikleri, sorbat derişimi, etki şekli, gıdanın bileşimi, işlem şartları, pH'sı ve depolama sıcaklığı gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörler sorbatların aktivitesine antagonistik veya sinerjistik etki gösterebilmektedir [Davidson ve Branen, 1993]. Bir koruyucu katkı maddesinin antimikrobiyal etkisi her mikroorganizmaya karşı aynı değildir. Bazı tiplere karşı etkisi diğerlerinden daha fazladır. Buna antimikrobiyal maddenin “spesifikliği” denilmektedir [Ekşi, 1988; Eker, 1995].

Antimikrobiyal katkı maddeleri gıdalarda bulunabilecek mikroorganizmaları birçok mekanizma ile etkilemektedir. Bunlar; proteinlerin denatürasyonu, protein sentezinin inhibisyonu, enzimlerin inaktivasyonu, geçirgenlik değişikliklerine neden olan hücre membranı ile reaksiyonlar veya alım ve transport fonksiyonlarının engellenmesi,

DNA'nın, hücre çeperinin ya da sitoplazmik membranın tahrip edilmesi, hücre duvarı sentezinin baskılanması ya da esansiyel metabolitlerle rekabet şeklinde olabilmektedir [Robach, 1980; Sofos, 1986; Parlak, 2007].

Antimikrobiyal maddeler bu olumlu etkilerinin yanında kanserojen olarak da etki gösterirler. Bu yüzden izin verilen gıdaların dışında ve en yüksek kullanım sınırlarının üzerinde kullanılmamalıdır [Oğan, 1996]. Bugün gıdalarda sıklıkla kullanılan antimikrobiyal maddeler; күкүрт dioksit ve çeşitli sülfidler, sorbik asit ve tuzları, nitrit ve nitrat bileşikleri, propiyonik asit, asetik asit, benzoik asit ve tuzlarıdır [Saldamlı ve Uygun, 2005].

2.4. Sorbik Asit (E 200) ve Tuzları

Sorbik asit, kısa zincirli, kendine özgü hafif kokusu ve ekşimsi tadı olan, beyaz-sarımsı kristal yapıda toz veya granül formda olup, tozdan arındırılmış bir doymamış yağ asitidir [Buazzi ve ark., 1991]. Su, alkol, propilen glikol ve bitkisel yağlarda çözünür. Sorbik asit ilk kez 1859 yılında bir Alman kimyacı olan A.W. Van Hoffman tarafından üvez bitkisinden izole edilmiş doğal bir katkı maddesidir. 1880'lerde yapısı tanımlanmış, 1900'lerde O. Doobner tarafından sentezi yapılmıştır [Davidson ve Juneja, 1990; Ekşi, 1988]. Doğal gıda katkı maddeleri bitkisel organizma, hayvansal organizma veya mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen maddelerdir. Bir kısmı da minerallerin doğal yapısında mevcuttur [<http://www.gidacilar.net>]. Bu nedenle insan sağlığı açısından olumsuz etkilerinin daha az olduğu düşünülmektedir.

Sorbik asit ve onun sodyum, potasyum, kalsiyum tuzları genel olarak “Sorbitlar” olarak tanımlanırlar [Robach, 1980; Sofos, 1986; Davidson ve Juneja, 1990]. Bu maddeler Avrupa Birliği ülkelerinde 1964 yılından itibaren yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddeleridir [Münzner, 1990]. Sorbik asitin suda az erimesi nedeniyle, onun yerine daha çok sentetik katkı maddeleri olan sodyum, potasyum ve kalsiyum tuzları kullanılmaktadır. Japonlar 1971'e kadar sorbik asit ve onun sodyum tuzlarını gıdalarda antimikrobiyal olarak kullanmışlardır. Fakat son

zamanlarda potasyum tuzu, sodyum tuzuna oranla suda daha fazla çözündüğünden, daha çok tercih edilmektedir [Hasegawa ve ark., 1984].

Sorbatlar; gıdalara doğrudan katılarak, daldırılarak, toz halinde serpilerek veya ambalaj içine yerleştirilerek uygulanmaktadırlar [Chichester ve Tanner, 1972; Davidson ve Juneja, 1990]. Sorbik asit ve tuzlarının gıdalarda genellikle kullanıldığı yerler; peynir ve peynirden yapılan ürünler, hububat ürünleri, meyva suları, şarapçılık, jöle, ketçap, mayonez, reçel, sucuk, salam, sosis, hazır salata ve meyve kokteylleri, kurutulmuş meyveler, puding tozları, margarin ve et mamulleri sanayidir [Warth, 1985; Cemeroğlu ve Acar, 1986]. En yaygın uygulama alanları ise peynir endüstrisidir. Sorbik asit ile sodyum ve potasyum tuzları hemen hemen 40 çeşit peynirde ve peynirden yapılan çeşitli ürünlerde küf önleyici olarak kullanılmaktadırlar [Saldamlı, 1985]. Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde, sorbik asitin ketçaplarda bulunması gereken maksimum sınır değerinin 1000 ppm'in altında olması gerektiği belirtilmiştir [Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 1990]. Yentür ve arkadaşları (1995) yaptıkları bir çalışmada, ketçaplardaki sorbik asit ve benzoik asit katkı maddelerinin toplam miktarının Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ndeki sınır değerinin üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir [Yentür ve ark., 1995].

Sorbik asit ve tuzları gıdalar içerisinde antimikrobiyal özelliğe sahip olup, antifungal, antimikotik ve antibakteriyal etkiler göstererek besinlerin raf ömürlerini uzatırlar [Lück, 1986; Davidson ve Juneja, 1990]. Antimikrobiyal gelişmeyi inhibisyon mekanizması kısmen enzimler üzerine etkisine bağlıdır. Bu enzimler mikroorganizmada çok önemlidirler. Bunlar; fümazaraz, aspartaz, süksinik dehidrogenaz, maya alkol dehidrogenazdır. Sorbik asit günümüzde bir sülfidril enzim inhibitörü olarak gösterilmektedir. Sorbatlar enzimlerin esansiyel sülfidril gruplarının sülfürler arası kovalent bağlarını inhibe ederek hücre zar yapısını bozarlar. Elektron transport sistemini birbirinden ayırırlar veya metabolitlerin hücre içinde geçişini inhibe ederler [FAO, 1974; Davidson ve Juneja, 1990]. Sorbik asit ve tuzlarının antimikotik etkinliği substratın pH değerine bağlıdır. pH=2 tam aktivite gösterirken, pH=6,5'ten sonra aktivite göstermezler [Yentür ve Bayhan, 1990].

Sorbik asit ve tuzlarının, Gıda Kodeksi Ekspertler Komitesi'nce belirlenen kişi başına günlük alınabilir miktarları 0-25 mg/kg (vücut ağırlığı/gün) (sorbik asit cinsinden) olarak belirlenmiştir [Saldamlı, 1985; FAO, 1986]. Çoğu gıdada sorbatların etkin olduğu konsantrasyon % 0.01 – 0.03 aralığında olup, bu düzey % 0.1'den fazla olduğunda istenmeyen tat değişimlerine yol açmaktadır [<http://www.yilmazkimya.com.tr>].

Sorbik asit ve tuzları, farklı çözünürlük özelliklerine sahip oldukları için uygulanma alanları genişdir. Son yıllarda sorbatlar, özellikle potasyum sorbat gıdalarda kullanımının yanı sıra eczacılıkta, kişisel bakım ürünlerinde, kozmetikte ve diğer endüstriyel ürünlerde de kullanılmaktadırlar [Robach, 1980; Cemeroğlu ve Acar, 1986; Sofos, 1986].

2.4.1. Sodyum sorbat (E-201)

Sorbik asitin sodyum tuzu olup, sorbik asit ile aynı aralıktaki gıdalar için uygun bir antimikrobiyal maddedir. Sulu sodyum hidroksit (NaOH) ile sorbik asitin reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Beyaz renge ve çok zayıf kokuya sahiptir. Uygulamada %20'lik çözeltisi kullanılır [Chichester ve Tanner, 1972]. Küf ve mayalara karşı çok etkili olan maddenin bakterilere karşı etkinliği zayıftır. Sodyum sorbatın benzoik asit ve tuzlarına oranla daha az toksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Saldamlı, 1985].

Sodyum sorbatın genotoksitesiyle ilgili insan lenfositlerinde yapılan çalışma bulunmamaktadır. Farklı hücre hatlarında yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 2.1'de gösterildiği gibidir. Hasegawa ve arkadaşlarının (1984) yaptıkları bir çalışmada, sodyum sorbatın sorbik asite göre daha fazla klastojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [Hasegawa ve ark., 1984]. Bu sonuç sodyum sorbatın sentetik bir katkı maddesi olduğu için daha fazla genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 2.1. Sodyum sorbat'ın genotoksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalar

Araştırma	Sonuç	Kaynak
Çin Hamsteri V79 hücreleri/ KA, KKD, Gen mutasyonu (200-800 µg/ml)	+	Hasegawa ve ark., 1984
Çin Hamsteri ovaryum hücreleri/ AMES, HPGRT, KKD (500-1000 µg/ml)	—	Münzner ve ark., 1990
Çin Hamsteri ve fare kemik iliği hücreleri/ MN (200mg/kg bw)	—	
Çin Hamsteri/ KA, KKD (500-1000 µg/ml)	—	
Suriye Hamsteri embriyo fibroblast hücreleri/ MN, Hücre transformasyonu (beklemiş eriyik) (120-1200µg/ml)	+	Schiffman ve Schlatter, 1992
Suriye Hamsteri embriyo fibroblast hücreleri/ MN, Hücre transformasyonu (taze eriyik) (120-1200µg/ml)	—	
Çin Hamsteri V79 hücreleri/ MI (2500 µg/ml)	+	Schlatter ve ark., 1992

(KA: Kromozomal anormallik, KKD: Kardeş kromatid değişimi, AMES: *Salmonella*/memeli mikrozom testi, HPGRT: Hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz, MN: Mikronükleus, MI: Mitotik indeks)

2.4.2. Potasyum sorbat (E-202)

Sorbik asitin potasyum tuzu; iyi çözünürlüğü, stabilitesi ve işlemdeki kolaylığı nedeniyle gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [Saldamlı, 1985; Davidson ve Branen, 1993]. Beyaz, yumuşak yapıda, parlak ve kokusuzdur. Suda kolay çözünür. Bu tuz özellikle sıvı stok solüsyonları için geliştirilmiştir [Chichester ve Tanner, 1972]. Günlük önerilen tüketim miktarı (ADI değeri) 0-25 mg/kg (vücut ağırlığı/gün) olarak saptanmış ve GRAS (Güvenilir Katkı Maddeleri) listelerinde gıdalara katılmasında sakınca olmayan bir madde olarak yer almıştır [Saldamlı, 1985]. Potasyum sorbatın peynirlerin raf ömrünü uzatmada etkili olduğu belirlenmiştir [Aworh ve Egounlety, 1985]. Özellikle peynirlerde bulunan *Penicillium patulin* ve

Penicillium roquforti mikroorganizmaları üzerinde, bu mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek etkili olduğu tespit edilmiştir [Bullerman, 1984].

Potasyum sorbatın genotoksisitesiyle ilgili farklı hücre hatlarında yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 2.2’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 2.2. Potasyum sorbat’ın genotoksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalar

Araştırma	Sonuç	Kaynak
Çin Hamsteri/ KA (3-4 mg/ml)	+	Abe ve Sasaki, 1977
	+	Ishodate ve Odashima, 1977
Çin Hamsteri V79 hücreleri/ KA, KKD, Gen mutasyonu (20mg/ml)	+	Hasegawa ve ark., 1984
Çin Hamsteri ovaryum hücreleri/ AMES, HPGRT, KKD (10-20mg/kg)	–	Münzner ve ark., 1990
Çin Hamsteri ve fare kemik iliği hücreleri/ CA, MN (200 mg/kg bw)	–	
Çin Hamsteri/ KA, KKD (10,000 ve 20,000 µg/ml)	–	
Suriye Hamsteri embriyo fibroblast hücrelerinde/ MN, Hücre transformasyonu (120-1200µg/ml)	–	Schiffman ve Schlatter, 1992
Çin Hamsteri V79 hücreleri/ MI (2500 µg/ml)	–	Schlatter ve ark., 1992
<i>Drosophila</i> /SMART (25 mM)	–	
Fare organları/ Comet testi (2000mg/kg)	–	Sasaki ve ark., 2002
İnsan lenfositleri/ KKD (4 ve 8 mM)	+/-	Mpountoukas ve ark., 2008

(KA: Kromozomal anormallik, KKD: Kardeş kromatid değişimi, AMES: *Salmonella*/memeli mikrozom testi, HPGRT: Hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz, MN: Mikronükleus, MI: Mitotik indeks, SMART: *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi)

Bu veriler doğrultusunda, sodyum sorbat ve potasyum sorbat katkı maddeleri ile ilgili farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında amaç, sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddelerinin insan lenfositlerinde genotoksik etkili olup olmadığının tespit edilmesidir.

2.5. Genotoksisite Testleri

Bir kimyasal maddenin kullanıma sunulmadan önce genotoksik, mutajenik ve karsinojenik potansiyele sahip olup olmadığının belirlenmesi insan sağlığı açısından önemlidir. Bunun için kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında değişik canlı gruplarını kapsayan çeşitli test sistemleri geliştirilmiştir.

Bir kimyasalın mutajenik etkili bir madde olup olmadığını anlamak için, en sık kullanılan testlerden biri Ames testidir. Ames, gen mutasyonlarının tespitinde yaygın olarak kullanılan bir bakteriyel mutajenite testidir. *Salmonella typhimurium* kullanılarak yapılan bu yöntem, genotoksik ve kanserojenik etkinin araştırılmasında birçok çevre kirleticisi ve ilaçlar için uygulanmaktadır. Deneme organizması olarak, histidine bağımlı *Salmonella* suşları kullanılır [Ames ve ark., 1975; Çelik, 2003]. Yapımı çok kolay ve oldukça ucuzdur. Öncelikle, bakterilerden onarım mekanizması çıkarılır ve bir amino aside bağımlı kılınır. Daha sonra bakteri önerilen maddeye maruz bırakılır ve mutasyonlara bakılarak mutajenitenin varlığı belirlenir [Gürsoy, 2001]. Bakteriyel denemeler, kimyasalların çok farklı dozları için uygulama imkanı verir ve bu denemelerin uygulanması fazla masraflı değildir [Ames ve ark., 1975; Çelik, 2003].

In vivo mutajenite testlerinde, deney hayvanlarına mutajenik etkisi araştırılacak madde belli konsantrasyonlarda ve çeşitli yollarla (beslenme, enjeksiyon gibi) verilmektedir. Bu testlerde genellikle böcek ve memeliler yaygın olarak kullanılır. En yaygın böcek deneme sistemi genetik yapısı en iyi bilinen *Drosophila* ile yapılan testlerdir. *Drosophila*'da en çok uygulanan test eşeye bağlı letalite testidir. Bu testte üreme hücrelerinde görülen anormallikler incelenmektedir. Aynı zamanda eşey hücreleri ile aynı popülasyonda *in vivo* mutasyonlar, kromozom anormallikleri gözlenebilmektedir [Kilbey ve ark., 1984; Sarıkaya, 2005]. *Drosophila* ırkları ile gerçekleştirilen bir diğer mutajenite metodu Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)'dir. *Drosophila* özellikleri yönünden mutajen ve kanserojen maddelerin uygulanma ve izlenmesi açısından uygun bir canlıdır [Falakalı, 1990; Sarıkaya, 2005]. SMART'ın avantajı, mutasyon etkilerini fenotipte göstererek

mitotik rekombinasyon içermesidir. İşaret genlerinin trans-heterezigot sineklerde bulunması ve kullanılması genotoksik denemede bu özelliklerin gözlenmesi, çalışmanın yöntem olarak kolay ve ucuz bir yol olduğunu gösterir [Frolich ve Würzler, 1990; Sarıkaya, 2005].

Memelilerde kullanılan *in vivo* mutajenite testlerinden biri ise dominant letalite testidir. Bu testte genotoksitesi ölçülecek kimyasal madde erkek ratlara uygulanmaktadır. *In vivo* testler kapsamında, kromozomlardaki yapısal değişmelere neden olan bileşiklerin tespiti için interfazda mikronükleus sayımı ve bölünen dokulardan elde edilen mitotik metafazdaki kromozom anormallikleri analizleri de bulunmaktadır. Bu amaç için deney hayvanlarına *in vivo* sitogenetik etkisi araştırılacak madde belli konsantrasyonlarda ve çeşitli yollarla verilmektedir. Sonra kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumu, kromozom anormallikleri ve kardeş kromatid değişimi incelemeleri yapılmaktadır [Çelik, 2003].

Bir kimyasal maddenin genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde, *in vivo* çalışmalarla birlikte *in vitro* testlerde uygulanmalıdır. *In vitro* mutajenite testlerinde genotoksik etkisi araştırılacak olan madde deney hayvanından veya insandan alınan dokulara belli konsantrasyonlarda uygulanır. Bu testlerin *in vivo* testlerden farkı, test edilen kimyasalın canlıya değil ondan alınan dokuya dış ortamda uygulanmasıdır. Yaygın olarak kullanılan *in vitro* mutajenite testleri; kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleridir.

2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik testi (KA), Perry ve Evans (1975)'ın bilinen mutajen ve kanserojenlerin KA'yı uyardığını saptamalarından sonra sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [Perry ve Evans, 1975]. Teknik, kültüre alınmış periferik kan lenfositlerinde kromozomal anormallik sıklıklarının değerlendirilmesi ile genotoksik hasarın boyutunun belirlenmesini sağlar [Çakmak, 2000]. Yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin karsinojeniteyle ilişkisi olduğuna dair deneysel ve epidemiyolojik bulgular tespit edilmiştir [Tucker ve Preston, 1996; Albertini ve ark.,

2000]. Bazı kimyasal mutajenler, DNA'da fosfodiester bağıını kırmakta ve S evresinde hatalı DNA replikasyonuna neden olmaktadır [Kimura ve ark., 1985]. Bu nedenle bu kimyasal mutajenler kromozom anormalliklerini meydana getirmektedir [Galloway ve Wolf, 1979; Kimura ve ark., 1985]. En sık rastlanan kromozomal anormallikler; gap, kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, poliploidi, halka kromozom, translokasyon ve inversiyonlardır [Brusick, 1987]. Kromozomal anormalliklerin belirlenmesinde periferik lenfositler yaygın olarak kullanılmaktadır. Periferik lenfositler kolay elde edilebilirliği, doku kültüründe kolay çoğaltılabilmeleri ve maruziyet analizlerinde tüm vücuda dağılabilmelerinden dolayı tahmini ortalama total vücut maruziyetinin belirlenmesinde kullanılmaları nedeniyle avantajlıdır [Tucker ve Preston, 1996].

Kromozomal anormallik tekniğinde kolşisin eklenmesi sonucu hücreler metafaz aşamasında tutulmakta, bu sayede kromozomların kolayca gözlenebilmesi sağlanmaktadır. Çoğu kimyasal madde, hücreler DNA replikasyonunu tamamlarken etkisini gösterirler ve kromozomal anormalliklere neden olurlar. Bu nedenle anormalliklerin oluşumunu gözleyebilmek için testler yapılırken, kimyasal madde uygulanmasından sonra verilen süre iyi ayarlanmalıdır. Çünkü zarar görmüş hücreler anormallik oluşumundan sonra bir veya iki hücre siklusundan daha fazla yaşayamazlar. Bu nedenle, genotoksik araştırmalar, kimyasal madde uygulamasından sonraki ilk metafazda yapılmalıdır [Evans, 1976; Çelik, 2003]. Kromozomal anormalliklerin değerlendirilmesinde kullanılan metafaz aşaması, kromozomlardaki kırılmaların ve yeniden düzenlenmelerin belirlendiği safhadır [Wolf, 1998; Albertini ve ark., 2000]. Primer olarak oluşan hasarlar DNA sarmal kırılmaları veya baz değişiklikleridir. DNA kırılmaları ya DNA tek sarmalını ya da birbirini tamamlayan iki sarmalı aynı anda etkileyebilir. Buna göre bir çift sarmal kırığı iki tek sarmal kırığından oluşur [Bender ve ark., 1988]. Değişim tipi anormallikler (disentrik kromozom, translokasyon, halka kromozom) çift sarmal kırıklarının etkisiyle sekonder oluşan hasarlardır.

2.5.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

In vitro mutajenik çalışmalar içinde yaygın olarak kullanılan bir diğer sitogenetik test tekniği de kardeş kromatid değişimi metodudur. KKD, kromozom morfolojisinde bir değişme olmadan, bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır [Latt ve ark., 1980; Sardaş ve Karakaya, 1990]. İlk defa 1957 yılında Taylor tarafından tanımlanmıştır. Kromozomların radyoaktif timidin (T^3) varlığında bir defa kendilerini eşlemelerine ve sonraki replikasyonda da izotopun yokluğunda kendilerini eşlemelerine izin verilmiştir. Otoradyografide DNA'nın semikonservatif eşlenmesi sonucunda, her bir kromozomun sadece bir kromatidinin işaretlendiği görülmüştür. Bu işaretleme sonucunda kardeş kromatidler arasında simetrik değişimler gözlenmiş ve Taylor bunları “kardeş kromatid değişimi” olarak adlandırmıştır [Perry ve Thomson, 1984]. Latt tarafından 1973'te uygulanan yeni yöntemde, timidin analogu olan BrdU iki replikasyon döngüsünde bulunacak şekilde kültür ortamına eklenmiştir. BrdU varlığında devam eden DNA sentezi sırasında yeni oluşan DNA'da timin yerine BrdU girer. Böylece her bir kromatid, bir timinli ve bir de BrdU'li DNA zinciri içerir. Mitoz sonrasında her bir kromatid farklı bir kardeş hücreye gider. BrdU'nin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, flöresan ışık altında ışınlanıp Giemsa ile boyanarak kardeş kromatidlerdeki kırıklar görünür hale getirilmiştir [Natarajan, 2002]. Boyama sonrasında, tek bir ipliğinde yer değiştirme olmuş kromatid, her iki ipliğinde yer değiştirme olmuş kromatide göre daha parlak floresan verir. Yapılan incelemede, bir kromatid iki tane BrdU içeren zincir taşıdığı için açık renk, diğeri bir timinli bir de BrdU'li zincir taşıdığı için koyu renkli gözlenir [Perry ve Wolff, 1974]. Bu şekilde kardeş kromatidlerdeki değişimler belirlenmiştir.

2.5.3. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus tekniği; çeşitli kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik ve aneugenik aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın kullanılan bir test tekniğidir [Kirsch-Volders ve ark., 1997; Cicchetti ve ark., 1999]. Mikronükleuslar

ilk olarak 1886 yılında Howell tarafından anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde gözlenmiştir. 1901’de Jolly yaptığı çalışmalarla mikronükleusun varlığını doğrulamıştır. Bu nedenle hematolojide “Howell-Jolly cisimleri” olarak bilinirler [Anwar ve ark., 1994]. Mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında anafazda geç kalan kromozom materyalinden veya iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen kromozomlardan meydana gelirler. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül eder ve böylece ana nükleusdan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşur [Fenech, 2000].

Mikronükleus test sistemi, memelilerdeki test sistemleri arasında en ekonomik ve en kısa süreli yöntem olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir [Emecen ve Ünlü, 1995]. 1973’te Heddle tarafından mikronükleus yönteminin sıçan kemik iliğine uygulanmasıyla memelilerdeki kromozomal hasarlar belirlenmeye başlanmıştır. 1976 yılında ise Countryman ve Heddle tarafından insan lenfositlerinde uygulanmaya başlanmıştır [Peace ve Succop, 1999]. Ancak mikronükleusun değerlendirileceği hücrelerin, maruziyet sonrası birinci mitozlarını geçirmiş ve ikinci bir bölünmeye başlamamış olması istenmektedir. Bu da 1985’te Fenech ve Morley tarafından sitokalsin-B adlı aktin polimeraz inhibitörü bir maddenin kültüre eklenerek nükleer bölünmeyi durdurmaksızın, sitoplazma bölünmesini bloke etmesiyle gerçekleştirilmiştir [Fenech ve Morley, 1985; Falck ve ark., 1997]. Bu sayede binükleat hücreler kolaylıkla tespit edilebilmekte ve kültürdeki tek mitoz geçiren hücrelerdeki mikronükleuslar değerlendirilerek tekniğin duyarlılığı büyük ölçüde artmaktadır [Peace ve Succop, 1999; Cavallo ve ark., 2005]. Mikronükleus yöntemi başlıca; lenfositler, eritrositler, kemik iliği, dil, damak, dudakların iç kısmı, idrar kesesi, bronş epitelyumu gibi teknik açısından mümkün olan tüm dokularda uygulanabilir [Tucker ve Preston, 1996]. Ancak periferik lenfositlerde mikronükleus uygulaması ile hedef doku toksisitesi yerine total vücut maruziyeti değerlendirilebilmektedir [Fenech, 1993]. Bu teknik, kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi açısından oldukça kullanışlıdır [Fenech, 2000].

2.5.4. Comet testi

Son yıllarda geliştirilen comet tekniği, *in vitro* genotoksisite çalışmalarında DNA hasarını ölçmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit ve oldukça güvenilir bir test yöntemidir [Singh ve ark., 1988; Martin ve ark., 1993, Fairbairn ve ark., 1995; Sardaş ve ark., 1995; Tice ve ark., 2000]. Lenfosit hücreesindeki DNA bağlarının kırılımı kuyruklu yıldız görünümünde olduğu için yöntem “comet” ismiyle adlandırılmıştır. İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan ve daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik, nötral pH’daki lizing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarının tayini sağlanmıştır [Rydberg ve Johanson, 1978; Ostling ve Johanson, 1984]. Fakat DNA hasarlarının tespitinde nötral şartlar, alkali şartlar kadar hassas değildir [Sardaş, 1996]. Nötral şartlar altında yapılan lize ve elektroforezis uygulamaları DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin verirken, DNA tek sarmal kırıklarının tespitine izin vermemektedir. Ancak birçok ajan DNA’nın çift sarmal kırığından daha çok DNA tek sarmalında kırıklar meydana getirmektedir. Bu nedenle teknik, Singh ve arkadaşları tarafından lysing ve elektroforezis işlemleri alkali koşullarda yapılarak modifiye edilmiştir. Böylece sadece DNA çift sarmal kırıklarının tayini değil, aynı zamanda alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların (alkali labile sites), DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine de olanak sağlanmıştır [Singh ve ark., 1988].

Son yıllarda en çok tercih edilen Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen alkali ortamda DNA hasarının belirlenmesi yöntemidir. Singh ve arkadaşlarının (1988) geliştirdikleri comet tekniğinde, hücreler agara gömüldükten sonra DNA çift sarmalının açılması ve hücrelerin lize edilmesi için en az 1 saat süreyle alkali çözeltide bekletilmektedirler. Elektroforezis işlemi sırasında, hasarlı hücrelerde DNA’nın negatif yüklü kırık uçları pozitif yüklü uca yani anoda doğru göçerler [Singh ve ark., 1988]. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız (comet) görünümü meydana gelir. DNA göçü, hem DNA’nın büyüklüğüne hem de DNA’daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar. Düşük hasar seviyelerinde DNA’da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla

DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde ise baş ve kuyruk tamamen ayrılmıştır [Fairbairn ve ark., 1995]. Comet tekniği; düşük hasar seviyesini ölçebilen duyarlı bir teknik olması, az hücre örneği gerektirmesi, hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması ve her türlü ökaryotik hücreye uygulanabilmesi gibi avantajlarından dolayı genetik toksikolojide geniş bir kullanım alanına sahiptir [Fairbairn ve ark., 1995; Kassie ve ark., 2000].

2.6. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar

Sodyum sorbat ve potasyum sorbat antimikrobiyal katkı maddeleri dışında, gıdalarda çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan farklı katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde, farklı test sistemlerinde yapılmış olan pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcuttur.

Borik asit, sitrik asit, potasyum sitrat, sodyum benzoat ve sodyum sitratın genotoksik etkileri *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde incelenmiştir. Çalışılan katkı maddelerinin tümü mitotik bölünmeyi azaltırken, anormal hücre frekansını doza bağlı olarak artırmıştır. Katkı maddeleri anafaz köprülerine, C-mitoza, yapışıklığa, geri kalmış kromozomlara, çeşitli kırıklara ve mikronükleus oluşumuna neden olmuştur [Türkoğlu, 2007].

Yılmaz ve arkadaşları (2008a), gıdalarda antioksidan katkı maddesi olarak kullanılan sitrik asitin genotoksik etkilerini *Allium sativum* kök ucu hücrelerinde araştırmışlardır. Sitrik asite maruz kalan *Allium sativum* kök ucu hücrelerinde mitotik indekste kontrole göre bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, sitrik asitin C-mitoz, köprüler, yapışıklık ve kalgın kromozomlar gibi anormalliklerin oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir [Yılmaz ve ark., 2008a].

Sodyum propiyonat, potasyum propiyonat ve kalsiyum propiyonatın genotoksik etkileri *Allium cepa* hücrelerinde incelenmiştir. Çalışılan katkı maddelerinin 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg/mL'lik konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süre ile *Allium cepa* hücrelerine uygulanmıştır. Katkı maddelerinin tümünün kromozomal

anormallik frekansını anlamlı oranda artırdığı, mitotik indeksi ise anlamlı oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Bu maddeler *Allium cepa* hücrelerinde; kromozom kırıklarına, C-mitoza, yapışıklığa, anafaz köprülerine, kalgın kromozomlara ve mikronükleus oluşumuna sebep olmuştur [Türkoğlu, 2008].

Koruyucu gıda katkı maddesi olan sodyum benzoatın genotoksitesisi Çin Hamsteri hücrelerinde araştırılmıştır. Sodyum benzoatın yüksek konsantrasyonlarda kromozomal anormalliğini, kardeş kromatid değişimini [Abe ve Sasaki, 1977] ve mitotik indeksi artırdığı belirlenmiştir [Ishidate ve Odashima, 1977].

242 tane gıda katkı maddesinin (190'ı sentetik, 52'si doğal kaynaklı) genotoksik etkileri, AMES ve *in vitro* Çin Hamsteri fibroblast hücrelerinde kromozomal anormalliği testleriyle belirlenmiştir. Bu katkı maddelerinden 3 tanesi (beet red, erythorbic asit, klorin dioksit) sadece AMES testinde, 43 tanesi ise sadece Çin Hamsteri fibroblast hücrelerine uygulanan kromozomal anormalliği testinde pozitif etkili oldukları gözlenmiştir. Çalışılan 11 tane katkı maddesinin ise (cinnamik aldehit, ECF, L-sistein mono hidroklorit, hidrojen peroksit, potasyum bromat, sodyum klorit, sodyum hipoklorit, sodyum nitrit, kakao pigmenti ve karamel, kalsiyum hipoklorit) her iki test sisteminde de pozitif etkili oldukları tespit edilmiştir [Ishidate ve ark., 1984].

Antimikrobiyal katkı maddesi olan sodyum nitritin mutajenik etkileri *in vitro* ve *in vivo* test yöntemleriyle araştırılmıştır. Sodyum nitritin 265 ve 530 µg/ml'lik dozları yapılan *in vitro* testlerle, BSC-1 ve HeLa hücrelerine uygulanmıştır ve bu maddenin kromozom anormalliği frekansını önemli oranda artırdığı belirlenmiştir [Luca ve ark., 1987]. Buna karşın, Çin Hamsteri V79 memeli hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda sodyum nitritin negatif genotoksik etkili olduğu gözlenmiştir [Budayova, 1985]. Yapılan *in vivo* deneylerde ise, sodyum nitritin 1,72; 5,18; 15,55 ve 46,66 mg/kg'lık konsantrasyonlarda kromozom anormalliği frekansını önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, sodyum nitritin farede mikronükleus frekansını da önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir [Luca ve ark.,

1987]. Ayrıca sodyum nitritin *Salmonella typhimurium*'un TA1535 suşlarında da mutajen olduğu belirlenmiştir [Akın ve Sümer, 1991].

Mukherjee ve arkadaşları (1992), *in vivo* olarak yaptıkları bir çalışmada, farede KA ve KKD test yöntemleri kullanılarak ester gum'ın zayıf klastojenik etkiye sahip bir madde olduğunu tespit etmişlerdir [Mukherjee ve ark., 1992]. Gıdalarda renklendirici katkı maddesi olarak kullanılan titanyum dioksitin genotoksitesi, Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde araştırılmış ve bu maddenin KKD ve MN frekanslarını önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir [Lu ve ark., 1998]. Sorbik asit ve onun kalsiyum tuzu; HeLa hücreleri, plazmid DNA ve AMES ile yapılan genotoksite çalışmalarında katkı maddelerinin mutajenik etkili olmadığı belirlenmiştir [Ferrand ve ark., 2000].

Sasaki ve arkadaşları (2002); 8 tane fare organı üzerinde 39 tane gıda katkı maddesinin genotoksitelerini comet test tekniğiyle araştırmışlardır. Çalışılan katkı maddelerini farelere intraperitoneal olarak 3 ile 24 saat boyunca uygulamışlardır. Araştırma sonucunda; amaranth, allura kırmızısı, new coccine, tartrazin, erythrozin, filoksin ve rose bengal gibi katkı maddelerinin mide, kolon ve idrar kesesi hücrelerinde DNA hasarını doza bağlı olarak artırdıkları belirlenmiştir. Çalışılan yedi boya maddesinin düşük konsantrasyonlarda bile (10-100 mg/kg) gastrointestinal organlarda DNA hasarına yol açtıkları gözlenmiştir. İki antioksidan (BHA, BHT), üç fungusit (bifenil, sodyum o-fenilfenol ve thiabendazol) ve dört tatlandırıcı (sodyum siklomat, sakkarin, sodyum sakarin, sükraloz) katkı maddelerinin tümünün gastrointestinal organlarda DNA hasarını artırdıkları tespit edilmiştir [Sasaki ve ark., 2002].

Sarıkaya ve Çakır (2005), sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitratın genotoksik etkilerini *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testini kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada small single spots tipi mutasyonlar yaygın olarak gözlenmiş ve bu mutasyonlarda doza bağlı olarak artış belirlenmiştir. Çalışılan dört katkı maddesinde 50, 75 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir [Sarıkaya ve Çakır, 2005].

Kayraldız ve Topaktaş (2007), rat kemik iliği hücrelerinde sodyum metabisülfite olası *in vivo* genotoksik etkisini kromozom anormalliği testini kullanarak araştırmışlardır. Bunun için sodyum metabisülfite 250, 500, 750 ve 1000 mg/kg'lık dozları 6, 12 ve 24 saat süreyle ratlara intraperitoneal ve gavaj yoluyla uygulanmıştır. İntraperitoneal uygulama anormal hücre frekansını tüm dozlarda artırırken, mitotik indekste düşüşe neden olmuştur. Bu düşüşün gavaj yoluyla uygulamaya kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Sodyum metabisülfite kromatid ve kromozom kırıklarına, kardeş kromatidlerde birleşmeye, kromatid değişimlerine ve fragment oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir [Kayraldız ve Topaktaş, 2007].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

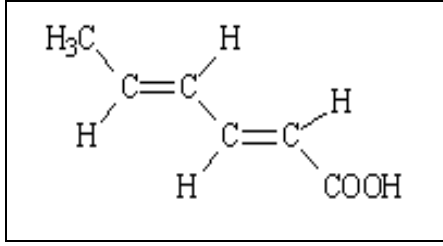
Bu çalışmada, sodyum sorbat ve potasyum sorbatın olası genotoksik etkilerini incelemek amacıyla kültüre edilmiş insan periferik lenfositleri ve izole lenfositler kullanılmıştır. Gıda katkı maddelerinin, uygun doz ve süreleri belirlenerek, lenfositlerin bu kimyasallarla muamelesi yapılmıştır. Her bir test materyali için kullanılacak olan periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, 24-25 yaşlarında sağlıklı bir bayan ve bir erkek donörden sağlanmıştır.

3.1.2. Test materyali

Test materyali olarak, sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddeleri kullanılmıştır. Sodyum sorbatın hazırlanması için kullanılan sorbik asit (Katalog No: 110-44-1) ve diğer katkı maddesi potasyum sorbat (Katalog No: 16827-11-8) Applichem'den temin edilmiştir.

Sorbik asit (E 200)

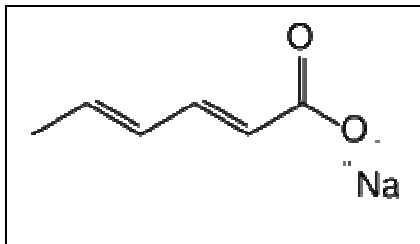
Sorbik asit; kokusuz, beyaz, kristal toz halinde ve hafif asidik tatlıdır. Moleküler formülü $C_6H_8O_2$, moleküler ağırlığı 112.12 g/mol' dür. Suda çözünürlüğü oldukça düşüktür (20°C 0.16 g/100ml). Etanolde çözünürlüğü ise 25°C, 14.8 g/100ml'dir. Yapısal formülü Şekil 3.1. 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sorbik asidin yapısal formülü

Sodyum sorbat (E 201)

Sodyum sorbat gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan sorbik asitin sodyum tuzudur. Gösterdiği bütün özellikler hemen hemen sorbik asitin özelliklerinin aynısıdır [Saldamlı, 1985]. Moleküler formülü $C_6H_7O_2Na$ şeklindedir. Yapısal formülü Şekil 3.2’ de verilmiştir. Suda çözünürlüğü %28 civarındadır. Test materyali olarak kullandığımız sodyum sorbatın hazırlanışında, Schiffmann ve Schlatter (1992) ve Schlatter ve arkadaşlarının (1992) kullandığı yöntem bazı modifikasyonlarla izlenmiştir. Bunun için öncelikle; 1 gr sorbik asit 40 ml bidistile suda çözülür. Bu çözelti, ultrasonikasyon cihazı ile (Vibra-Cell, Sonics & Materials Inc. Danbury, CT USA) 50 MHz hızda 15 dk sonikasyona tabi tutulur. Sonikasyon işlemi esnasında, sorbik asitin içerisine önceden hazırlanan 10 N NaOH oda sıcaklığında damla damla ilave edilir. Daha sonra, çözeltinin son PH’sı 7,4’e ayarlanır ve sodyum sorbat elde edilir.

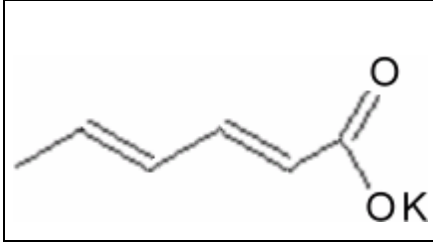


Şekil 3.2. Sodyum sorbatın yapısal formülü

Potasyum sorbat (E 202)

Potasyum sorbat gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan sorbik asitin potasyum tuzudur. Beyaz kristal toz halindeki potasyum sorbatın suda çözünürlüğü

çok yüksektir (139.2g/100ml). Moleküler formülü $C_6H_7O_2K$ olup, moleküler ağırlığı 150,22 g/mol' dür. Yapısal formülü Şekil 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3. Potasyum sorbatın yapısal formülü

Çalışmada kullanılan diğer maddeler; Bromodeoksiüridin (Katalog No: 59-14-3), Mitomisin-C (Katalog No: 200-008-6), Kolkisin (Katalog No: 64-86-8), Sitokalsin-B (Katalog No: 14930-96-2), NaCl (Katalog No: 7647-14-5) Sigma'dan, EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1), DMSO (Katalog No: 67-68-5), Düşük erime ısıları agar (LMA) (Katalog No: 9012-36-6), Yüksek erime ısıları agar (NMA) (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog No: 1239-45-8), KCl (Katalog No: 7447-40-7) AppliChem'den, Chromosome Medium B (Katalog No: F 5023), PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Biochrom'dan temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1.Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi testleri

Lenfosit kültürlerinin hazırlanmasında her iki katkı maddesi için ayrı ayrı sağlıklı, sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek donör kullanılmıştır. Bireylerden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kanlar, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi yerine (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Bu ortama, daha önceden sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5-Bromo-

2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan 10 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Ekim sonunda kültür tüpleri, 37 °C'deki inkübatöre alınarak 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/mL'lik, potasyum sorbatın 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik dozları kültür ortamına ilave edilmiştir. Ayrıca her bir kimyasal için bir negatif kontrol bir de pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) kullanılmıştır. Daha sonra kültürün 70. saatinde her bir tüpe, 0,06 µg/mL kolkisin çözeltisi ilave edilmiştir. Böylece hücreler 2 saat boyunca inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

72 saatlik inkübasyon sonrasında tüpler 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 mL'lik kısım vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Daha sonra tüplere, her bir tüpe 5 mL olacak şekilde, 37 °C'de bekletilen hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl) vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, önceden hazırladığımız buzdolabında soğutulan 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatif tüplere vorteks üzerinde damla damla her bir tüpe 5 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından tüpler buzdolabında 45 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılmıştır. Fiksatifle yıkama işlemi toplam üç kez tekrarlanmıştır.

Son fiksasyon işleminden sonra tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu homojen hale getirilen ve beyaz kan hücrelerini içeren çökelti, pastör pipetine çekilerek önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmıştır. Bu sayede hücrelerin patlatılması ve kromozomların yayılmaları sağlanmış olur. Hazırladığımız bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında karanlık bir ortamda kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus testi

Mikronükleus (MN) testi için, lenfosit kültürlerinin hazırlanması amacıyla her iki katkı maddesi için de ayrı ayrı sağlıklı, sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi yerine (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Ekimi takiben tüpler, 37°C'deki inkübatöre yerleştirilerek, burada 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra (48s muamele olacak şekilde), sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/mL'lik ve potasyum sorbatın 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik, dozları kültür tüplerine ekilmiştir. Uygulamada her bir katkı maddesi için bir negatif bir de pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) kullanılmıştır. Sitokinezi bloke etmek için, inkübasyonun 44. saatinde kültür ortamına 5,2 µg/mL sitokalsin B ilave edilmiştir. Tüpler, inkübasyon süresi tamamlandığında 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından üstte kalan süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 mL'lik kısmı vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir. Takiben tüplere, vorteks üzerinde her bir tüpe 5 mL olacak şekilde önceden hazırladığımız 4°C'de bekletilen 0,075 M KCl hipotonik solüsyondan damla damla ilave edilmiş ve sonra tüpler buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde tüpler etüvden çıkarılarak, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Daha sonra tüplere, önceden buzdolabında soğutulan soğuk fiksatif (3:1 metanol:asetik asit) vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Soğuk fiksatifle yıkama işlemi toplam üç kez gerçekleştirilmiş ve her fiksasyon işleminden sonra tüpler buzdolabında 5 dk bekletilmiştir. Sitoplazmaların korunması amacıyla üçüncü fiksatife % 1'lik formaldehit eklenmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Daha önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine, bu süspansiyon 10-15cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Hazırladığımız bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır.

Preparatların boyanması

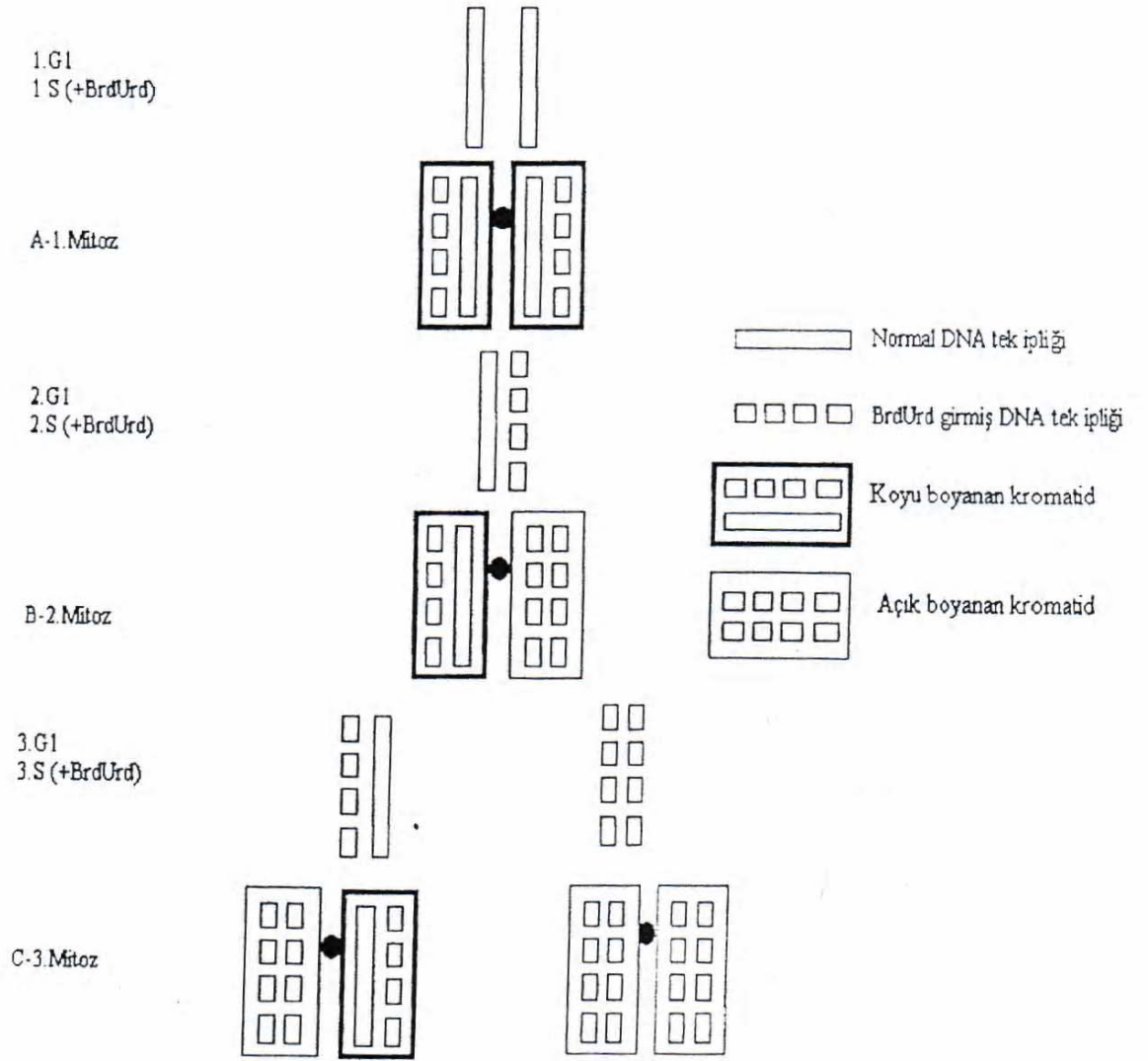
Kromozomal anormallik ve mitotik indeks için; preparatlar kuruduktan sonra Sorensen tamponu ile hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 15-20 dakika boyanmıştır. Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak için ise, floresan ve Giemsa boyama yapılmış, bu amaçla Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod bazı modifikasyonlarla izlenmiştir [Speit ve Haupter, 1985]. Buna göre kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konarak, üzeri ince bir tabaka halinde olacak şekilde ışınlama solüsyonu (Sorensen tamponu, pH=6,8) ile kaplanmıştır. Bu preparatlar, 254 nm (nanometre) dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile yükseklik 15 cm olacak şekilde, karanlıkta 13 dakika ışınlanmıştır. Süre sonunda preparatlar önceden ayarlanmış 60°C sıcaklıktaki 1xSSC (Sodyum klorür + Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonra, Sorensen tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa ile (pH= 6,8) 20 dakika boyanmıştır. Her iki yöntemde de Giemsa boyasından çıkarılan preparatlar, saf sudan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanmasında, her bir uygulama için kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz (dişi ve erkek toplam 200 metafaz) değerlendirilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir. Mitotik indeksin (Mİ) saptanmasında ise; tüm uygulamalar için hazırlanan preparatlardan 1000'er hücre (dişi ve erkek toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişiminin ve replikasyon indeksinin saptanması

Kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısının belirlenmesinde, dişi ve erkek bireye ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre (toplam 50 hücre) incelenmiştir. Kardeş kromatid değişiminin saptanabilmesi için kültür ortamına, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olan BrdU ilave edilmiştir. Burada, hücre DNA'sını replike ettiği sırada yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçmiştir. Ve BrdU'yu içine almış DNA ışınlanmaya maruz bırakıldığında, boyama sonucunda bu bölgeler açık renkli gözlenmiştir. Bu boyanma farkıyla da DNA'da kardeş kromatidler arasındaki değişimler belirlenmiştir (Şekil 3.4). Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir. Replikasyon indeksini hesaplamak için, dişi ve erkek bireyden hazırlanan preparatların her birinden 100 hücre (toplam 200 hücre) incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) metafaz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi (RI) = $1x(M_1) + 2x(M_2) + 3x(M_3)/N$ (N = incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile 1., 2. ve 3. Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması [During 1985'e göre Topaktaş ve Speit, 1990]

Mikronükleus frekansının ve nükleer bölünme indeksinin saptanması

Mikronükleus frekansının saptanmasında; çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli binükleat hücreler değerlendirilir. Çünkü bu hücreler, test edilen materyalin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Binükleat hücreleri elde etmek için, kültüre 44. saatte ilave edilen sitokalsin-B kimyasalı kullanılmaktadır. Daimi hale getirilmiş preparatlardan dişi ve erkek bireye ait her bir preparattan 1000 tane (toplam 2000 tane) binükleat hücre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada mikronükleus içeren hücreler 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu olmak üzere sayılmış ve $1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)/N$ (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) belirlenmiştir.

Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesinde ise, her bir donörden 500 hücre (dişi ve erkek toplam 1000 hücre) değerlendirilmiştir. Hücreler 1, 2, 3, 4 çekirdekli hücreler şeklinde sayılmış nükleer bölünme indeksi $1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)/n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Comet testi

Comet tekniğinde, her iki katkı maddesi için ayrı ayrı sağlıklı ve sigara içmeyen bir bayan ve bir erkek bireyden alınan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Teknikte Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metod bazı modifikasyonlarla izlenmiştir. Bu amaçla donörlerden alınan taze periferik kan ependorflara konulmuştur. Daha sonra, stok kandan 100'er µl alınarak içerisinde 1'er mL PBS bulunan ependorflara eklenmiş ve 10 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda, lenfosit ayırıcı solüsyonu olan Biocoll, her bir ependorfa 100'er µl eklenmiştir. Ependorflar 4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorfların

içerisinde eritrositlerin üzerinde oluşan bulutsu kısmın 100'er µl'si alınarak bir ependorfa aktarılmıştır.

Lenfositler, 100'er µl test maddeleri olan sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/mL'lik ve potasyum sorbatın 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonları ile pozitif kontrolün (hidrojen peroksit) 40 µM konsantrasyonu ile süspanse edilmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca, izole edilen lenfositlerde, hücrelerin canlılıklarının $\geq$ % 97 olduğu trypan blue ile tespit edilmiştir. Inkübasyon süresi sona erdiğinde ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra her bir doz 100'er µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Önceden yüksek erime ısıları agar ile kaplanan lamaların üzerine, 75 µl'si, 100 µl lenfositlerle karıştırılan düşük erime ısıları agar damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Bu şekilde preparatlar 15-20 dak. buzdolabında bekletilmiştir. Lameller lamaların üzerinden yavaşça kaldırıldıktan sonra lizing solüsyonuyla (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, PH: 10'a ayarlanır) muamele edilmiştir. Solüsyon kullanılmadan önce %1'lik Triton X-100 ve % 10'luk DMSO ilave edilir ve en az 1 saat buzdolabında bekletilir. Süre bitiminde lamalar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka yerleştirilmiş ve burada 20 dakika bekletilmiştir. Amaç, DNA sarmalının çözülmesidir. Daha sonra 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez yapılmıştır. Preparatlar, nötralizasyon tamponu (0,4 M Tris, pH=7,5) ile muamele edilmiştir. Nötralizasyon bitiminde lamaların üzeri 20 µg/ml'lik etidyum bromid boyasının 50 µl'si ile kaplanmıştır. Boyanan lamaların üzeri lamel ile kapatılmıştır. Preparatlar boyayla +4 °C'de 10-15 dakika muamele edilmiştir. Bu uygulamaların hepsi, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Görüntü analizi ve comet sayımı

Preparatlar boyandıktan sonra Olympus marka flöresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) altında 400X büyütmede incelemeye alınmıştır. Kullanılan her iki katkı maddesi için her bir donörden 100'er comet olmak üzere toplam 200 comet "Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK" kullanılarak

incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi sayısı, mitotik indeks, replikasyon indeksi, mikronükleus frekansı, nükleer bölünme indeksi ve % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

Deney gruplarındaki kromozomal anormallikler, mitotik indeks, replikasyon indeksi, mikronükleus frekansının ve nükleer bölünme indeksinin kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde *z* dağılım testi kullanılmıştır. Kardeş kromatid değişimleri ve comet değerlendirilmelerinde ise *students-t* testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sodyum Sorbat'ın Kromozomal Anormallikler (KA) Üzerine Etkisi

Sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik dozlarının insan lenfosit kültürüyle muamelesi sonucunda altı tip yapısal ve bir tip sayısal olmak üzere toplam yedi tip anormallik oluşturduğu belirlenmiştir. Yapısal anormallikler; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi ve disentrik kromozomdur. Sayısal anormallik ise poliploididir (Resim 4.2). En sık rastlanan anormallikler sırasıyla kromatid kırığı (%24) ve disentrik kromozomdur (%5). Bu anormalliklerin yanında spiral çözünme sonucu oluşan gaplar da (%66) yaygın olarak görülmektedir (Resim 4.1). İnsan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı ve anormal hücre frekansları gaplı (+G) ve gapsız (-G) olarak Çizelge 4.1' de ve Şekil 4.1' te gösterilmiştir. Bu katkı maddesinin anormal hücre yüzdesini (24s'lik uygulamada 100 µg/ml hariç) ve hücre başına düşen anormallikleri (KA/Hücre) gaplı (+G) değerlendirme de kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Gapsız (-G) değerlendirmede ise; tüm uygulama sürelerinde, sadece en yüksek doz olan 800 µg/ml dozda anormal hücre yüzdesinde ve hücre başına düşen anormallik (KA/Hücre) miktarında istatistiksel olarak önemli oranda ve doza bağlı bir artış gözlenmiştir (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi gaplı $r=0,79$, gapsız $r=0,93$; KA/Hücre gaplı $r=0,88$, gapsız $r=0,96$; 48s'lik uygulamada anormal hücre yüzdesi gaplı $r=0,92$, gapsız $r=0,97$; KA/Hücre gaplı $r=0,97$, gapsız $r=0,98$).

Çizelge 4.1. Sodyum sorbat uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Gap (G)	Anormal hücre ± SH (%) (+G)	Anormal hücre ± SH (%) (-G)	KA/Hücre ± SH (+G)	KA/Hücre ± SH (-G)
	Süre	Dozlar												
	(saat)	(µg/ml)	ktk	kzk	f	kkb	p	kd	ds					
Kontrol	24	0.00	6	1	-	-	-	-	2	12	8.50±1.97	4.50±1.46	0.105±0.021	0.045±0.014
Poz. Knt. (MMC)	24	0.20	26	4	1	1	2	-	5	42	28.00±3.20	17.50±2.68	0.405±0.034	0.195±0.028
Sodyum Sorbat	24	100	9	-	-	-	1	-	3	25	14.50±2.48	6.00±1.67	0.190±0.027*	0.065±0.017
		200	8	2	-	1	-	-	4	42	19.50±2.80**	7.00±1.80	0.285±0.031***	0.075±0.018
		400	13	-	-	-	-	-	4	46	22.00±2.92***	8.50±1.97	0.315±0.032***	0.085±0.019
		800	16	2	1	1	-	1	1	51	22.00±2.92***	9.50±2.07*	0.365±0.034***	0.110±0.022*
Kontrol	48	0.00	6	1	-	-	-	-	2	12	8.50±1.97	4.50±1.46	0.105±0.021	0.045±0.014
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	24	12	5	-	-	6	2	42	31.00±3.27	19.00±2.77	0.455±0.035	0.245±0.030
Sodyum Sorbat	48	100	10	-	-	-	-	-	2	27	16.00±2.59*	5.50±1.61	0.195±0.028*	0.060±0.016
		200	6	2	1	-	-	-	3	20	15.00±2.52*	5.00±1.54	0.175±0.026*	0.060±0.016
		400	16	1	1	-	-	-	-	38	22.00±2.92***	8.50±1.97	0.280±0.031***	0.090±0.022
		800	26	4	1	1	2	-	5	42	29.00±3.20***	11.50±2.25**	0.410±0.034***	0.120±0.022**
Kromozomal														
Anormallik			%24	%2.5	%1	%0,68	%0,68	%0,22	%5	%66				
Yüzdesi														

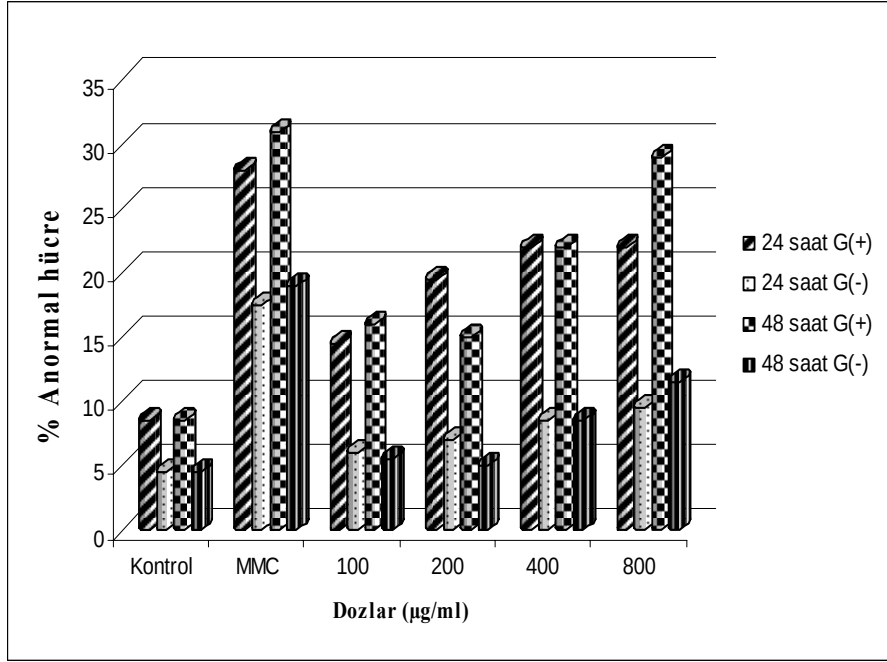
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, p: poliploidi, kd: kromatid değişimi, ds: disentrik

G: Gap, +G: Gaplı, -G: Gaspız

*Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrolle göre $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



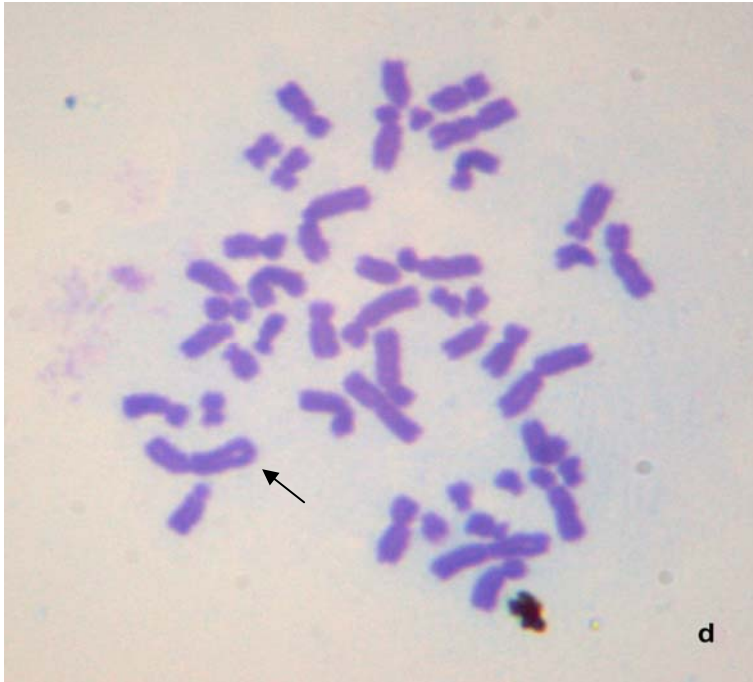
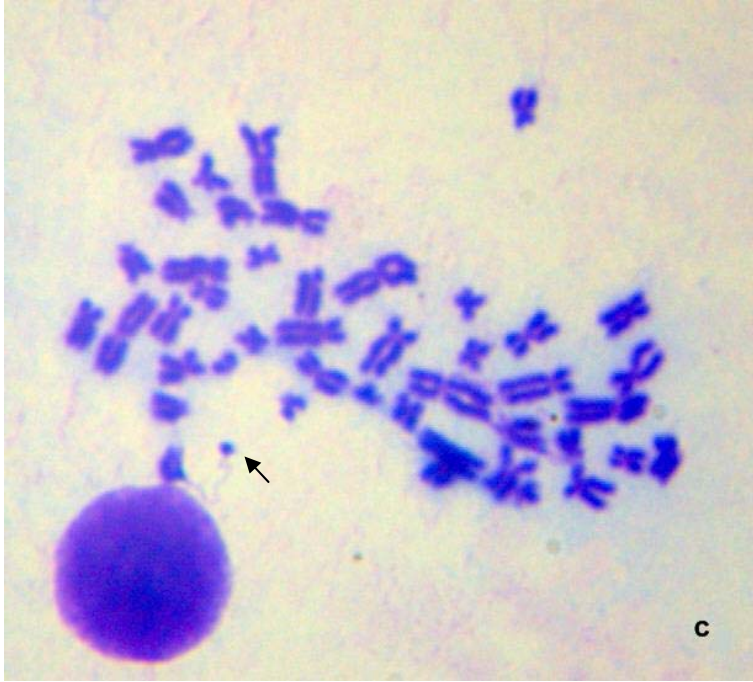
Şekil 4.1. Sodyum sorbatın anormal hücre (%) frekansı üzerine etkisi



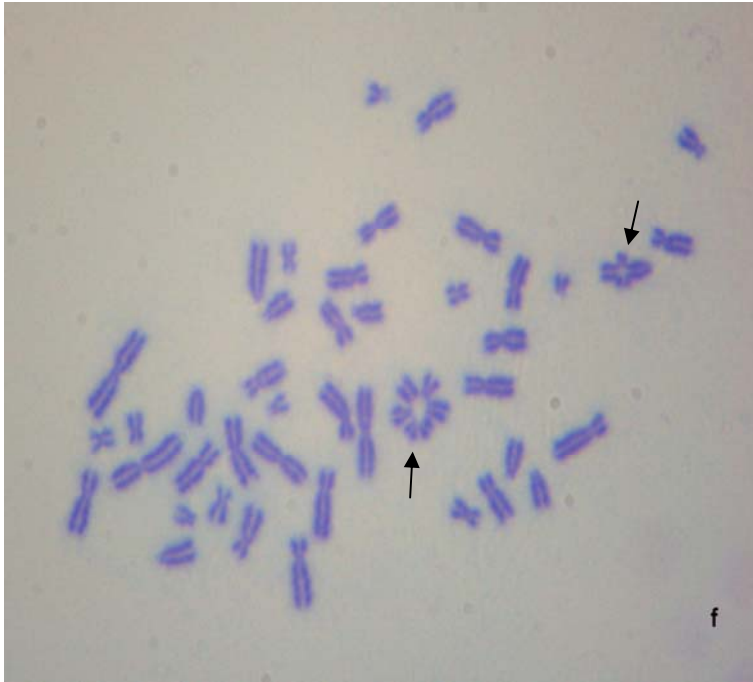
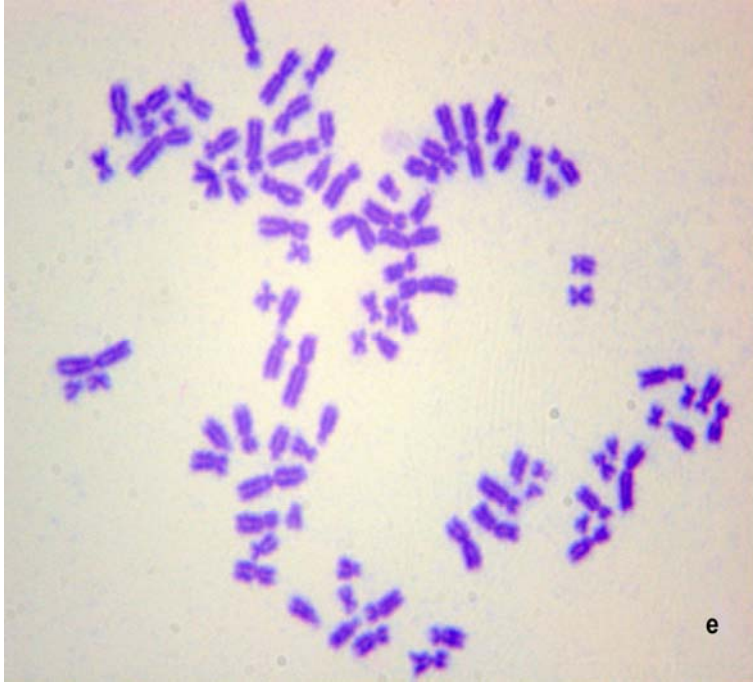
Resim 4.1. Sodyum sorbat uygulamasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği gap oluşumu



Resim 4.2. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.2. (Devam) Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.2. (Devam) Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.2. (Devam) Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom

4.2. Sodyum Sorbat'ın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Replikasyon İndeksi (Rİ) ve Mitotik İndeks (Mİ) Üzerine Etkisi

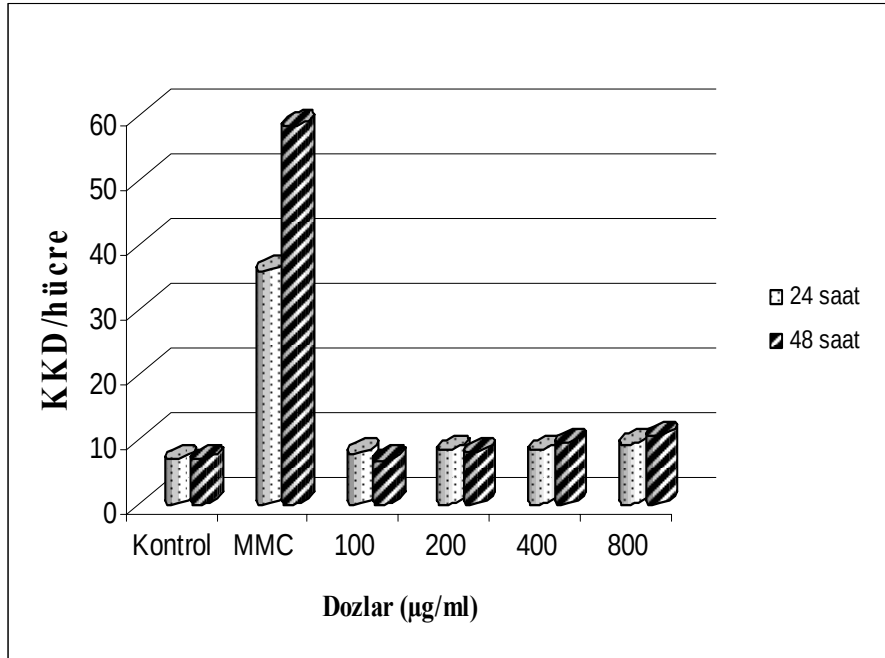
Sodyum sorbatın 400 ve 800 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonları her iki uygulama süresinde (24 saat ve 48 saat) kardeş kromatid değişim frekansını kontrole göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde ve doza bağlı olarak artırmıştır (24 saatlik uygulamada $r=0,90$; 48 saatlik uygulamada $r=0,95$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2, Resim 4.3). Bu çalışmada sodyum sorbatın replikasyon indeksi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Mitotik indeks de ise; tüm uygulamalarda kontrole göre düşüş gözlenmiştir, ancak bu düşüşün sadece 48 saatlik uygulamanın 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($r=-0,54$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.3).

Çizelge 4.2. Sodyum sorbatın insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

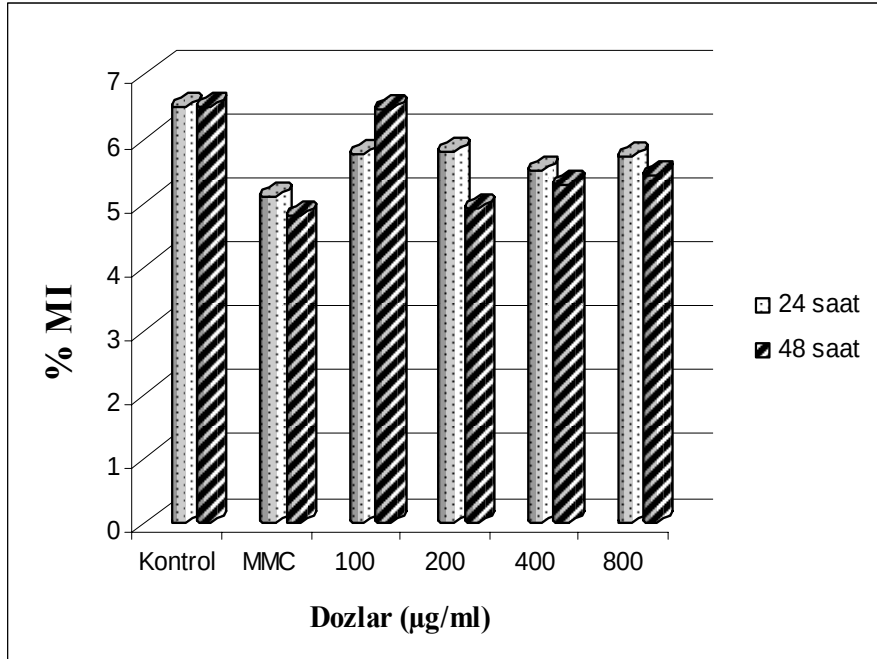
Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0.00	2-16	6.82±0.42	30	31	139	2.545±0.055	6.50±0.55
Poz. Knt. (MMC)	24	0.20	19-55	35.88±1.26	42	72	86	2.220±0.054	5.10±0.49
Sodyum sorbat	24	100	3-12	7.82±0.34	35	53	112	2.385±0.054	5.75±0.52
		200	2-20	8.32±0.54	37	59	104	2.335±0.054	5.80±0.52
		400	4-16	8.40±0.43a	46	61	93	2.235±0.056	5.50±0.50
		800	3-19	9.22±0.50a	32	48	120	2.440±0.053	5.70±0.51
Kontrol	48	0.00	2-16	6.82±0.42	30	31	139	2.545±0.055	6.50±0.55
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	33-83	58.22±1.76	75	104	21	1.730±0.045	4.80±0.47
Sodyum sorbat	48	100	2-16	6.76±0.44	35	43	122	2.435±0.054	6.45±0.54
		200	3-18	7.96±0.45	27	51	122	2.475±0.051	4.90±0.48*
		400	3-21	9.44±0.52 a	26	54	120	2.470±0.050	5.25±0.49
		800	5-20	10.36±0.56a	44	59	97	2.265±0.056	5.40±0.50

a Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

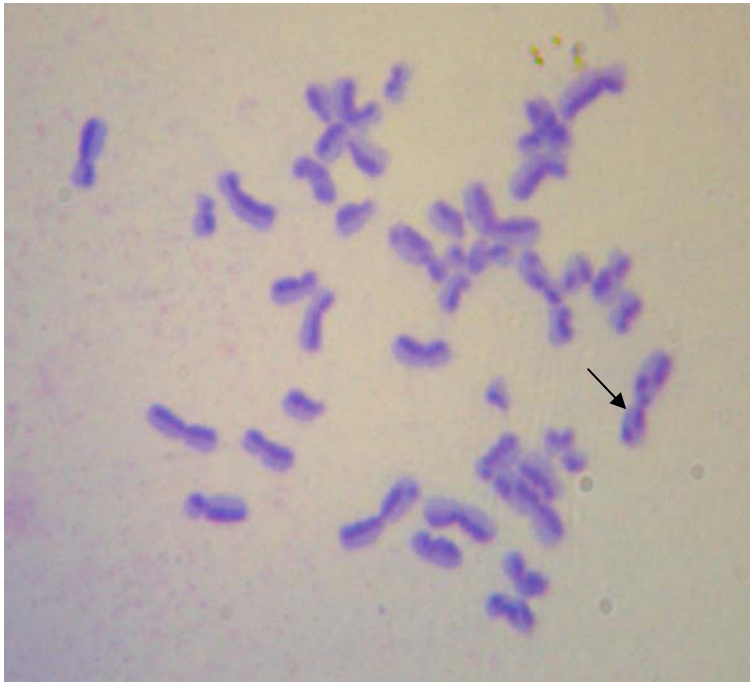
* Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.2. Sodyum sorbatın KKD/hücre oranına etkisi



Şekil 4.3. Sodyum sorbatın MI (%) frekansı üzerine etkisi



Resim 4.3. Sodyum sorbat uygulaması ile insan periferel lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

4.3. Sodyum Sorbat'ın Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) Üzerine Etkisi

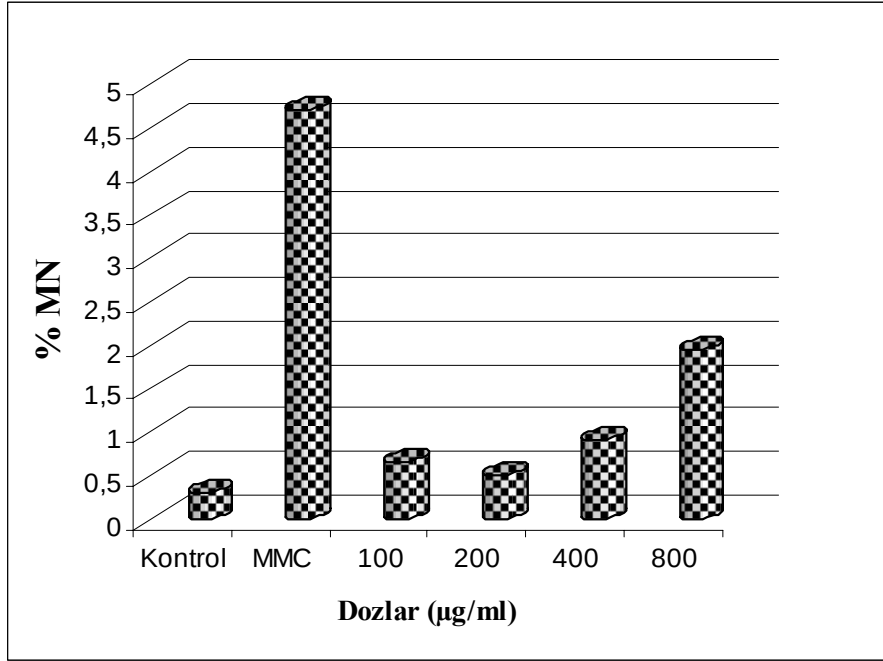
Yapılan MN analizi sonucunda; sodyum sorbatın MN frekansını tüm konsantrasyonlarda artırdığı, fakat bu artışın, sadece 400 ve 800 µg/ml'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.4). Mikronükleus frekansındaki bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,97$). İnsan lenfositlerinin sodyum sorbat ile muamelesi sonucunda; birli ve ikili mikronükleuslara rastlanılmıştır (Resim 4.4). Ayrıca sodyum sorbatın nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Sodyum sorbatın insan lenfosit kültüründe mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

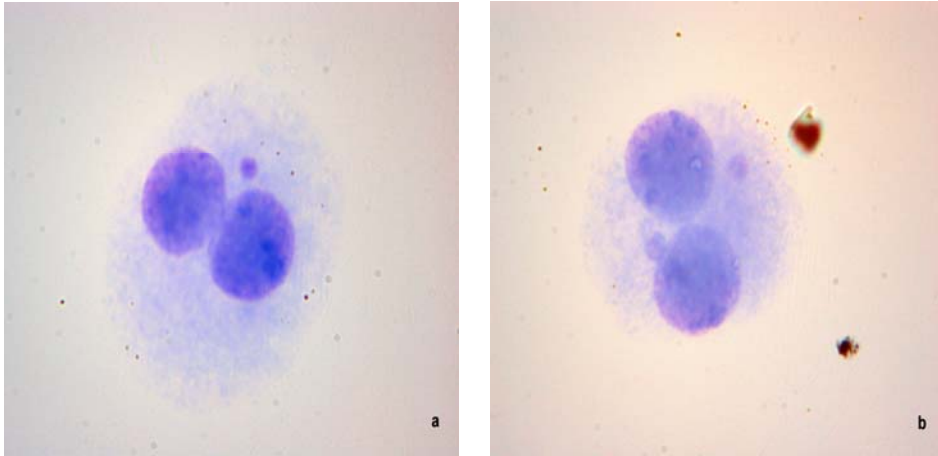
Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBİ)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0.00	2000	6	-	-	-	0.30±0.12	1.85±0.42
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	2000	62	8	4	1	4.70±0.47	1.59±0.39
Sodyum sorbat	48	100	2000	11	1	-	-	0.65±0.17	1.64±0.40
		200	2000	6	2	-	-	0.50±0.15	1.66±0.40
		400	2000	10	4	-	-	0.90±0.21*	1.85±0.42
		800	2000	33	3	-	-	1.95±0.30**	1.78±0.41

* Kontrole göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre $p<0.001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.4. Sodyum sorbatın MN (%) frekansı üzerine etkisi



Resim 4.4. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus

4.4. Sodyum Sorbat'ın Comet Kuyruk Yoğunluğu Ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkisi

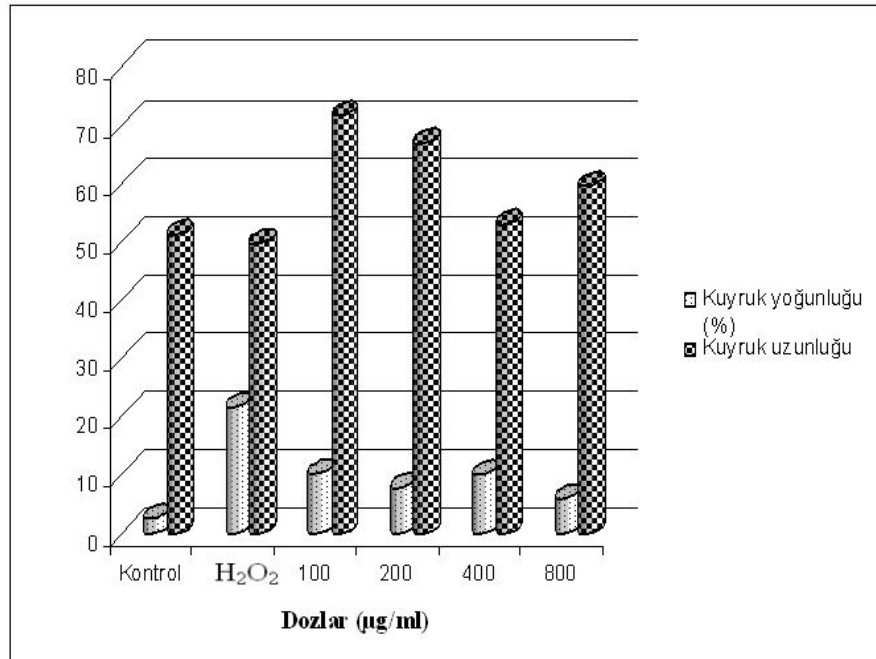
Çalışmamızda sodyum sorbatın DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı comet testi ile belirlenmiştir. Sodyum sorbatın 100, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik dozları 1 saat süreyle insan lenfositlerine uygulandığında, kuyruktaki DNA

yoğunluğu ve comet kuyruk uzunluğu (400 µg/ml’lik doz hariç) kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artmıştır. Fakat bu artışın, doza bağlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.5, Resim 4.5).

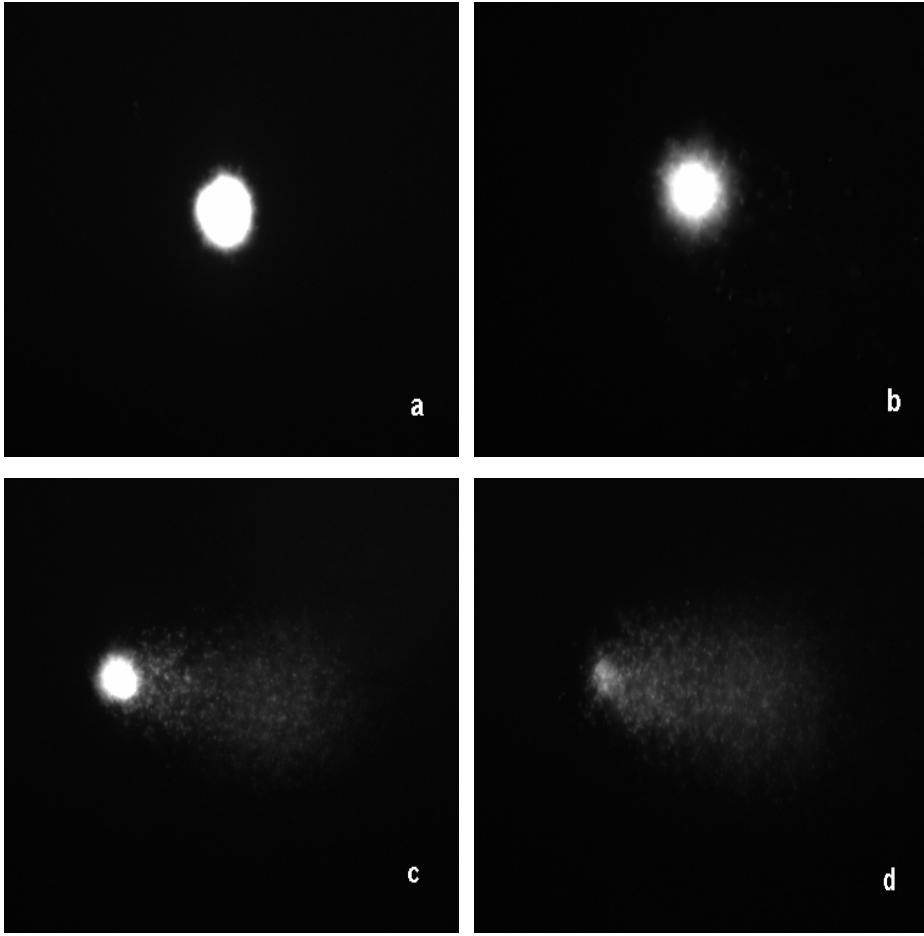
Çizelge 4.4. Sodyum sorbat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
Kontrol	0.00	2.73±0.21	51.42±0.95
Poz. Knt. (H ₂ O ₂)	40 µM	20.04±1.65	59.17±1.19
Sodyum Sorbat	100	10.30±1.11 a	71.85±2.51 a
	200	7.89±0.91 a	67.18±2.29 a
	400	10.19±1.30 a	53.26±1.32
	800	5.97±0.60 a	59.78±1.22 a

a Kontrole göre p< 0.05 düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.5. Sodyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı



Resim 4.5. Sodyum sorbat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

4.5. Potasyum Sorbat'ın Kromozomal Anormallikler (KA) Üzerine Etkisi

125, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlardaki potasyum sorbatın, insan lenfosit kültürüyle muamelesi sonucunda altı tip yapısal ve bir tip sayısal anormallik oluşturduğu belirlenmiştir. Poliploidi sayısal anormallik olarak değerlendirilmiştir. Gözlenen yapısal anormallikler ise; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi ve disentrik kromozomdur (Resim 4.7). Bu anormalliklerden en sık rastlanılanları kromatid kırığı (%31) ve kromozom kırığıdır (%6,73). Ayrıca gaplar da (%53,5) yaygın olarak görülmektedir (Resim 4.6). Potasyum sorbat uygulaması sonucunda oluşan kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı (KA/Hücre) ve anormal hücre

frekansları gaplı (+G) ve gapsız (-G) olarak Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Bu uygulamanın anormal hücre (%) frekansı üzerine etkisi Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Yapılan analizlerde, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin gaplı (+G) ve gapsız (-G) değerlendirmede; 24 saatlik uygulamada tüm dozlarda (125 µg/ml hariç) ve 48 saatlik uygulamada en yüksek iki dozda (500 ve 1000 µg/ml) kontrole göre önemli oranda ve doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (24s’lik uygulamada anormal hücre yüzdesi gaplı $r=0,93$, gapsız $r=0,85$; KA/Hücre gaplı $r=0,96$, gapsız $r=0,83$; 48s’lik uygulamada anormal hücre yüzdesi gaplı $r=0,98$, gapsız $r=0,97$; KA/Hücre gaplı $r=0,96$, gapsız $r=0,96$).

Çizelge 4.5. Potasyum sorbat uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Gap (G)	Anormal hücre ± SH (%) (+G)	Anormal hücre ± SH (%) (-G)	KA/Hücre ± SH (+G)	KA/Hücre ± SH (-G)
	Süre	Dozlar												
	(saat)	(µg/ml)	ktk	kzk	f	kkb	p	kd	ds					
Kontrol	24	0.00	4	-	1	-	-	-	1	11	8.00±1.91	2.50±1.10	0.085±0.019	0.030±0.012
Poz. Knt. (MMC)	24	0.20	34	13	-	3	-	3	4	20	29.00±3.20	23.00±2.97	0.385±0.042	0.285±0.031
Potasyum Sorbat	24	125	5	1	-	-	1	-	1	10	8.00±1.91	4.00±1.38	0.090±0.020	0.040±0.013
		250	12	2	-	-	-	-	2	14	15.00±2.52*	8.00±1.91*	0.160±0.025*	0.090±0.020**
		500	9	-	-	1	-	-	5	24	14.50±2.48*	7.00±1.80*	0.195±0.028**	0.075±0.018*
		1000	17	3	-	-	-	-	2	31	21.00±2.88***	9.50±2.07**	0.260±0.031***	0.105±0.021**
Kontrol	48	0.00	8	-	1	-	-	-	-	10	9.50±2.07	4.50±1.46	0.095±0.020	0.045±0.014
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	26	13	7	6	-	9	5	10	35.50±3.38	30.50±3.25	0.380±0.034	0.330±0.033
Potasyum Sorbat	48	125	7	3	2	-	-	-	2	12	13.00±2.37	7.00±1.80	0.130±0.023	0.070±0.018
		250	7	2	-	2	-	-	-	17	13.50±2.41	5.50±1.60	0.140±0.024	0.055±0.016
		500	17	2	-	3	-	1	-	26	22.00±2.92***	11.00±2.21*	0.245±0.030***	0.115±0.022**
		1000	18	7	-	3	-	-	1	25	27.50±3.15***	15.50±2.55***	0.280±0.031***	0.155±0.025***
Kromozomal														
Anormallik			%31	%6.73	%0.67	%3	%0.33	%0.33	%4.37	%53,5				
Yüzdesi														

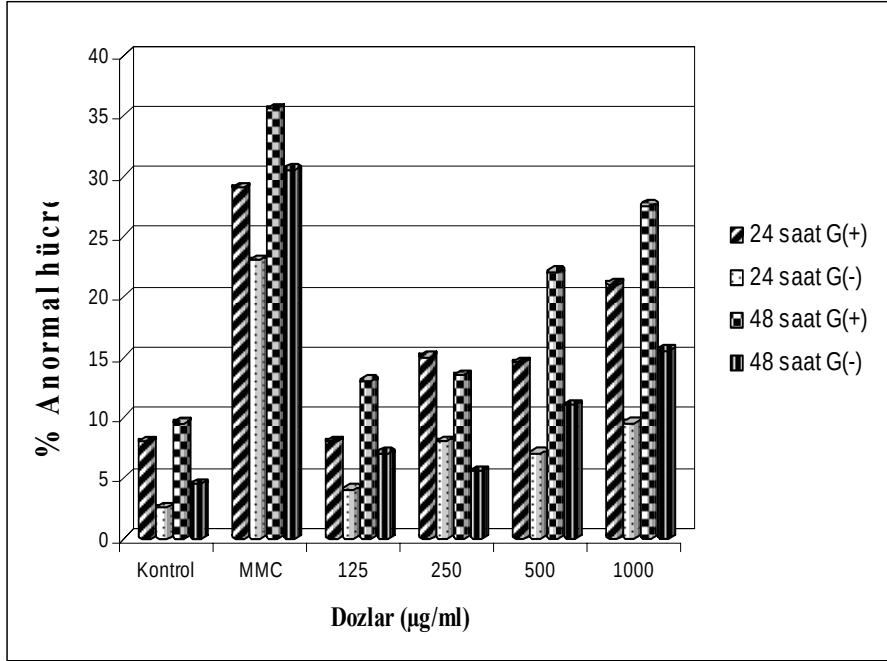
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, p: poliploidi, kd: kromatid değişimi, ds: disentrik

G: Gap, +G: Gaplı, -G: Gapsız

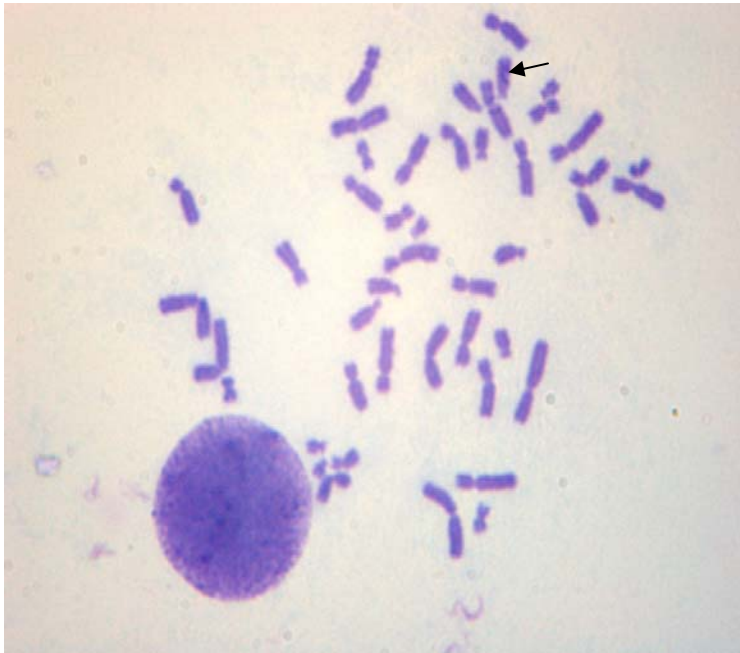
*Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

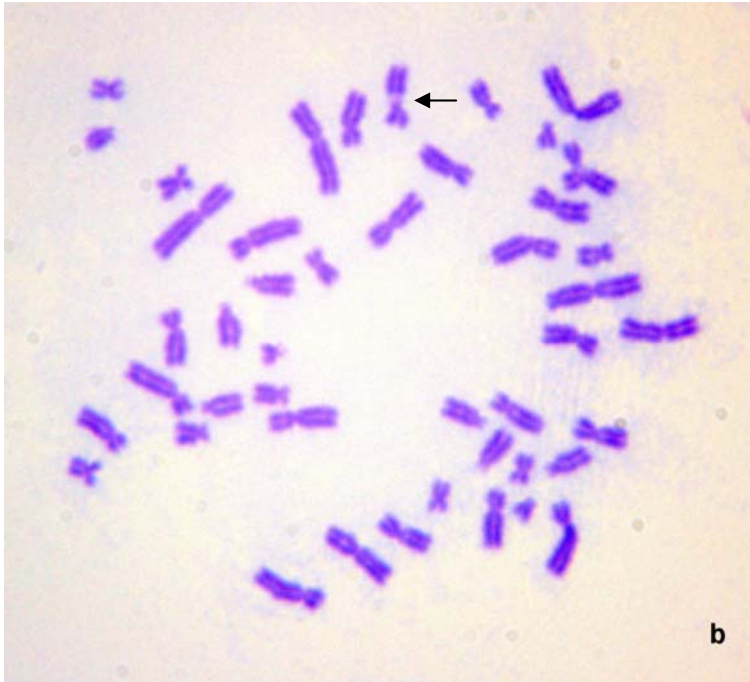
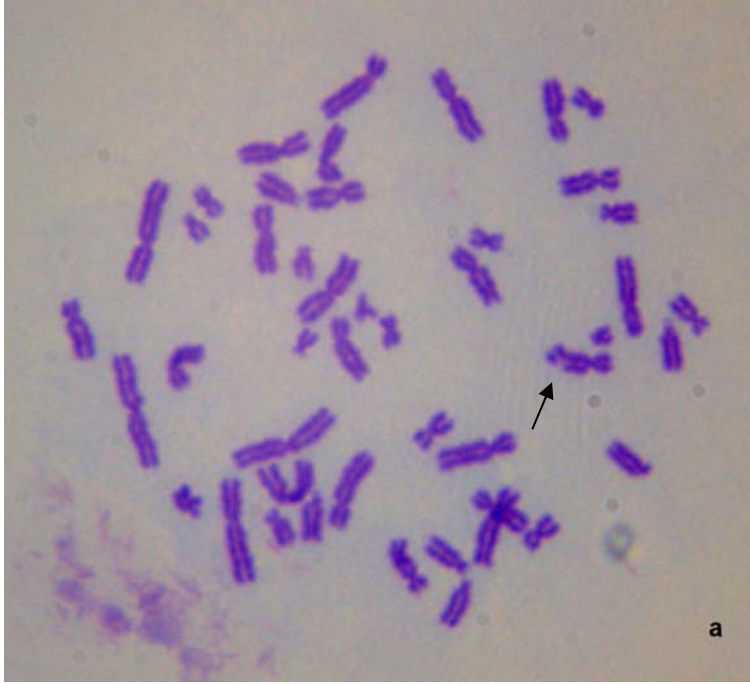
***Kontrolle göre $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



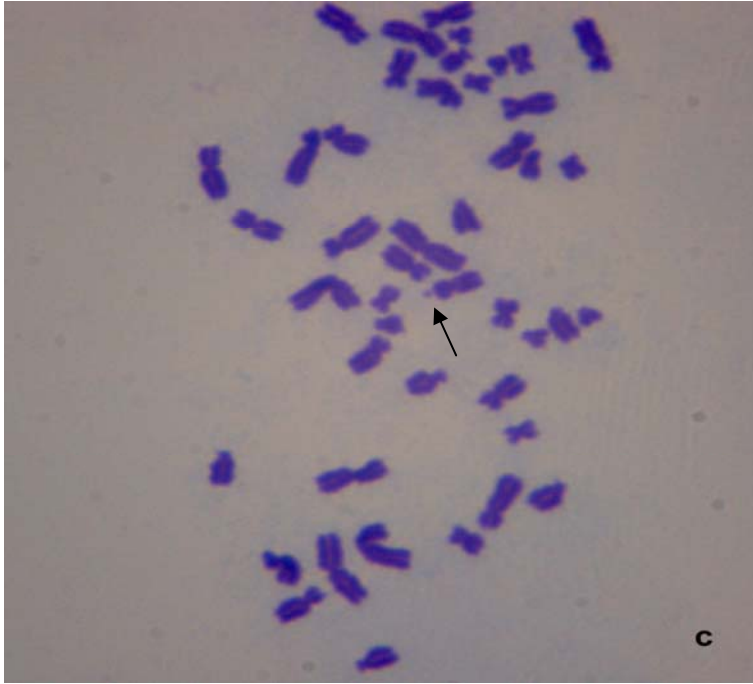
Şekil 4.6. Potasyum sorbatın anormal hücre (%) frekansı üzerine etkisi



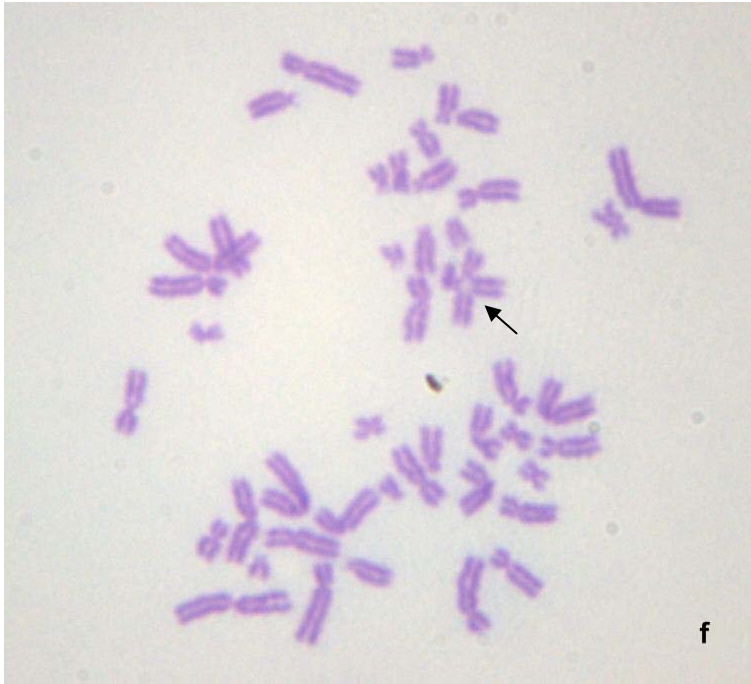
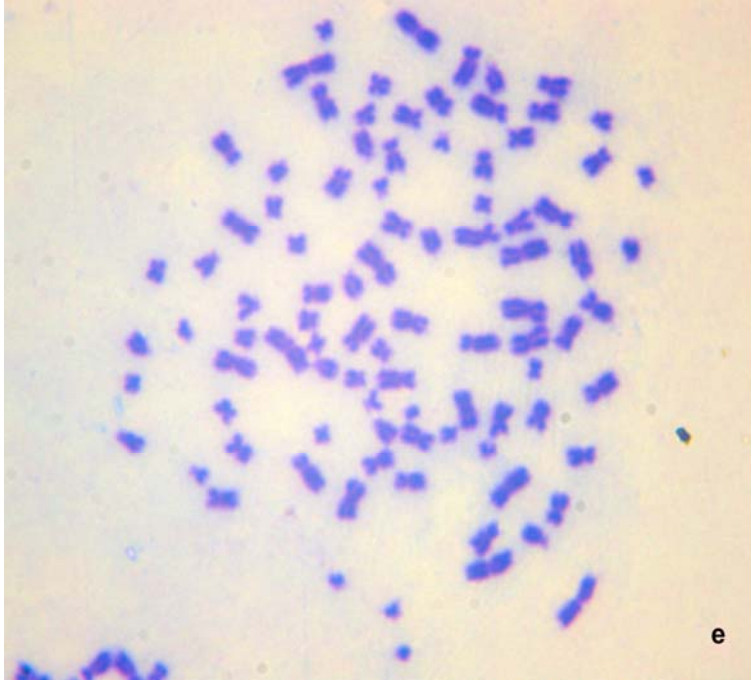
Resim 4.6. Potasyum sorbat uygulamasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği gap oluşumu



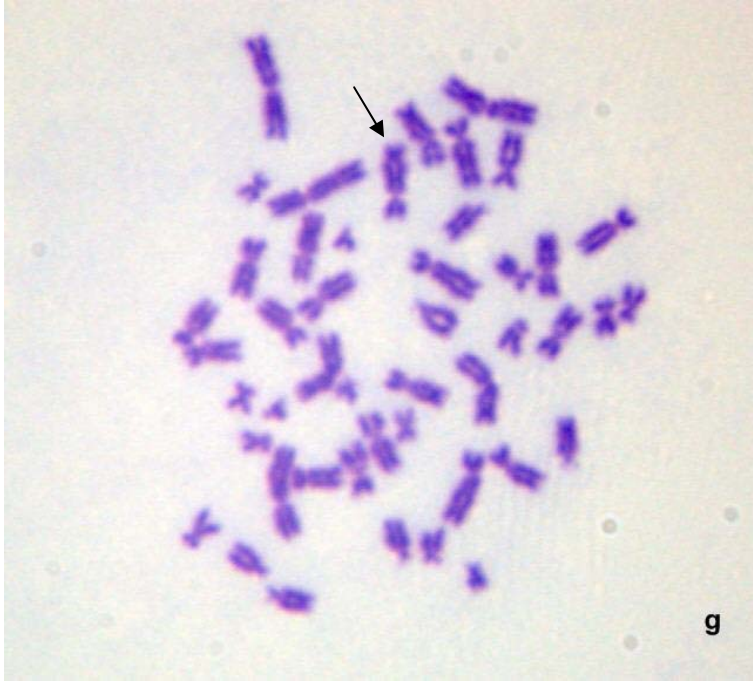
Resim 4.7. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.7. (Devam) Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.7. (Devam) Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom



Resim 4.7. (Devam) Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom

4.6. Potasyum Sorbat'ın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Replikasyon İndeksi (Rİ) ve Mitotik İndeks (Mİ) Üzerine Etkisi

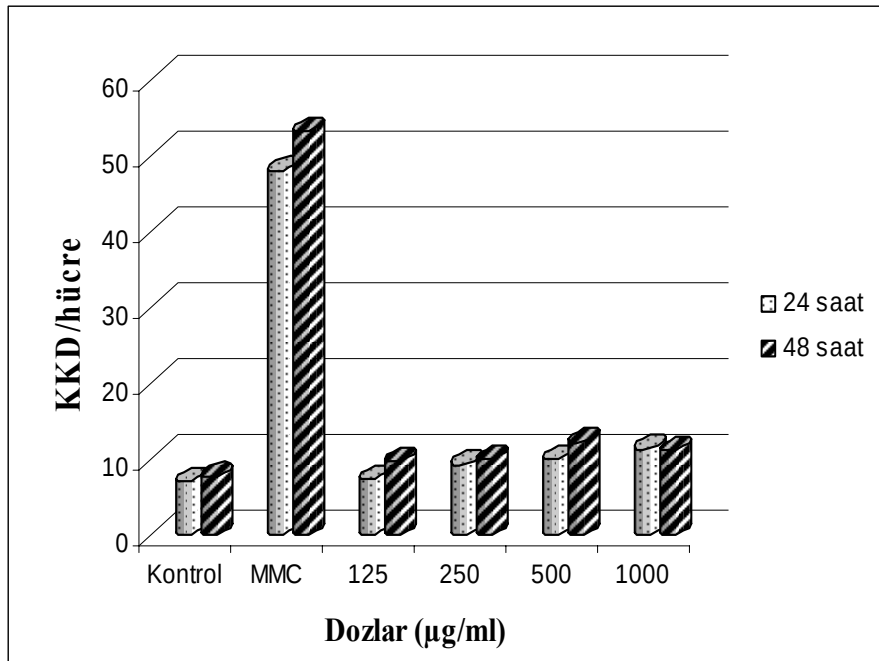
Kardeş kromatid değişim frekansı; tüm uygulamalarda (24 saatlik uygulamada 125 $\mu\text{g/ml}$ hariç) kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde ve doza bağlı olarak artırmıştır (24 saatlik uygulamada $r=0,94$; 48 saatlik uygulamada $r=0,74$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.7, Resim 4.8). Yapılan analizlerde, potasyum sorbat uygulamasının, replikasyon indeksi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenirken (Çizelge 4.6), mitotik indeks üzerinde ise, her iki uygulama süresinde de 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda kontrole göre önemli oranda bir düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=-0,93$; 48 saatlik uygulamada $r=-0,88$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.8).

Çizelge 4.6. Potasyum sorbatın insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

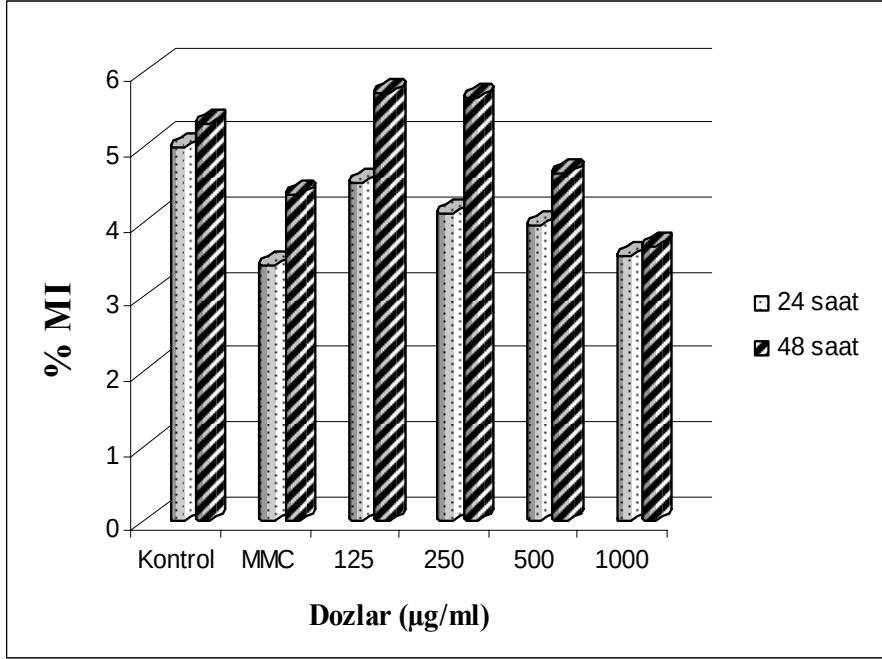
Test maddesi	Uygulama		Min.-maks.	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0.00	1-15	6.90±0.47	27	47	126	2.495±0.051	5.00±0.487
Poz. Knt. (MMC)	24	0.20	18-78	48.14±1.62	47	80	73	2.130±0.054	3.40±0.405
P. Sorbat	24	125	3-19	7.30±0.40	26	66	108	2.410±0.050	4.50±0.463
		250	2-19	9.20±0.44 a	29	53	118	2.445±0.051	4.10±0.443
		500	2-31	9.94±0.72 a	34	65	101	2.335±0.053	3.95±0.435
		1000	3-23	11.28±0.62 a	51	90	59	2.040±0.052	3.55±0.413*
Kontrol	48	0.00	2-20	7.68±0.46	35	55	110	2.375±0.054	5.30±0.500
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	37-78	53.36±1.42	78	96	26	1.74±0.047	4.35±0.456
P. Sorbat	48	125	4-17	9.66±0.42 a	43	56	101	2.29±0.056	5.70±0.518
		250	5-20	9.98±0.49 a	57	62	81	2.12±0.058	5.65±0.516
		500	5-24	12.14±0.58 a	51	70	79	2.14±0.056	4.65±0.470
		1000	5-20	11.12±0.61 a	99	72	29	1.65±0.050	3.65±0.419*

a Kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

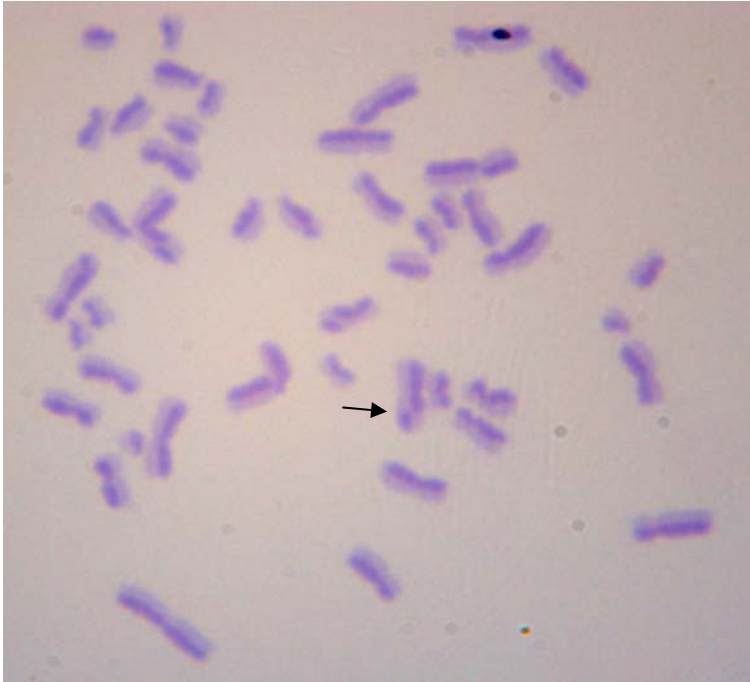
* Kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.7. Potasyum sorbatın KKD/hücre oranına etkisi



Şekil 4.8. Potasyum sorbatın MI (%) frekansı üzerine etkisi



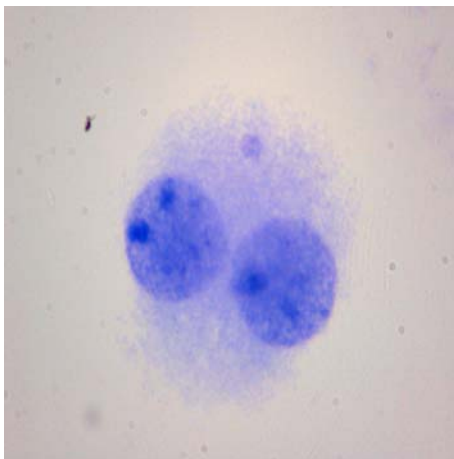
Resim 4.8. Potasyum sorbat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

4.7. Potasyum Sorbat'ın Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) Üzerine Etkisi

Potasyum sorbatın tüm uygulamalarda MN frekansını kontrole göre artırdığı, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Bu gıda katkı maddesi, binükleat hücreler içerisinde yalnızca birli mikronükleusların oluşumuna sebep olmuştur (Resim 4.9). Aynı zamanda potasyum sorbatın nükleer bölünme indeksini herhangi bir şekilde etkilemediği de belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Potasyum sorbatın insan lenfosit kültüründe mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBİ)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0.00	2000	4	1	-	-	0.30±0.12	1.75±0.41
Poz. Knt. (MMC)	48	0.20	2000	94	5	-	-	5.20±0.49	1.38±0.36
Potasyum Sorbat	48	125	2000	5	-	-	-	0.25±0.11	1.67±0.40
		250	2000	5	-	-	-	0.25±0.11	1.63±0.40
		500	2000	8	-	-	-	0.40±0.14	1.52±0.38
		1000	2000	10	-	-	-	0.50±0.15	1.34±0.36



Resim 4.9. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan bir mikronükleuslu binükleat hücre

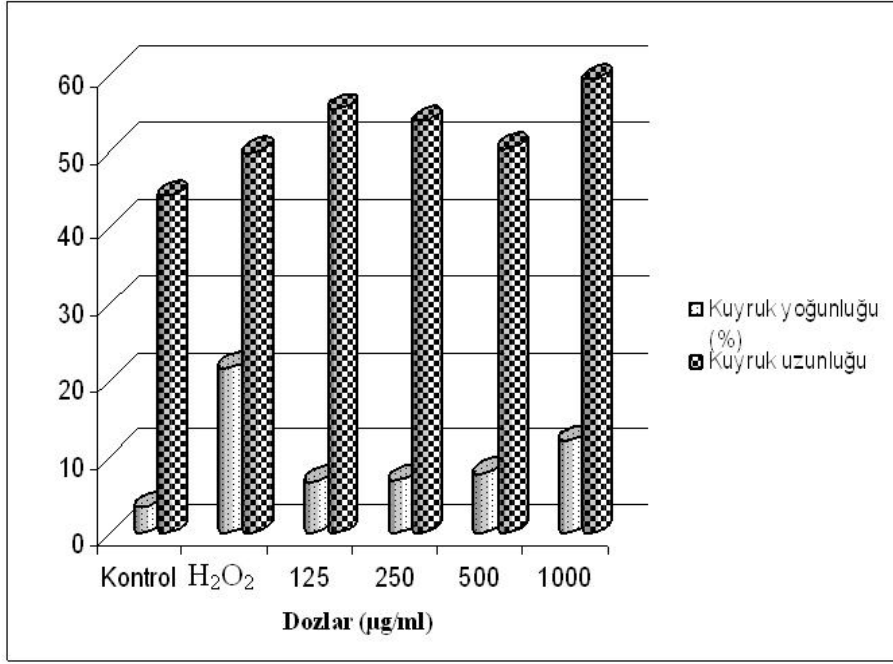
4.8. Potasyum Sorbat'ın Comet Kuyruk Yoğunluğu Ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkisi

Yapılan comet analiziyle, potasyum sorbat katkı maddesinin DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı tespit edilmiştir. 125, 250, 500, 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlardaki potasyum sorbat 1 saat süreyle insan lenfositlerine uygulandığında, kuyruktaki DNA yoğunluğu ve comet kuyruk uzunluğu, kontrole göre önemli oranda ve doza bağlı olarak artmıştır ($r=0.96$ ve $r=0.69$, sırasıyla). Potasyum sorbatın tüm uygulamalarda kuyruk uzunluğu üzerinde pozitif kontrolden (hidrojen peroksit) daha fazla DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.9, Resim 4.10).

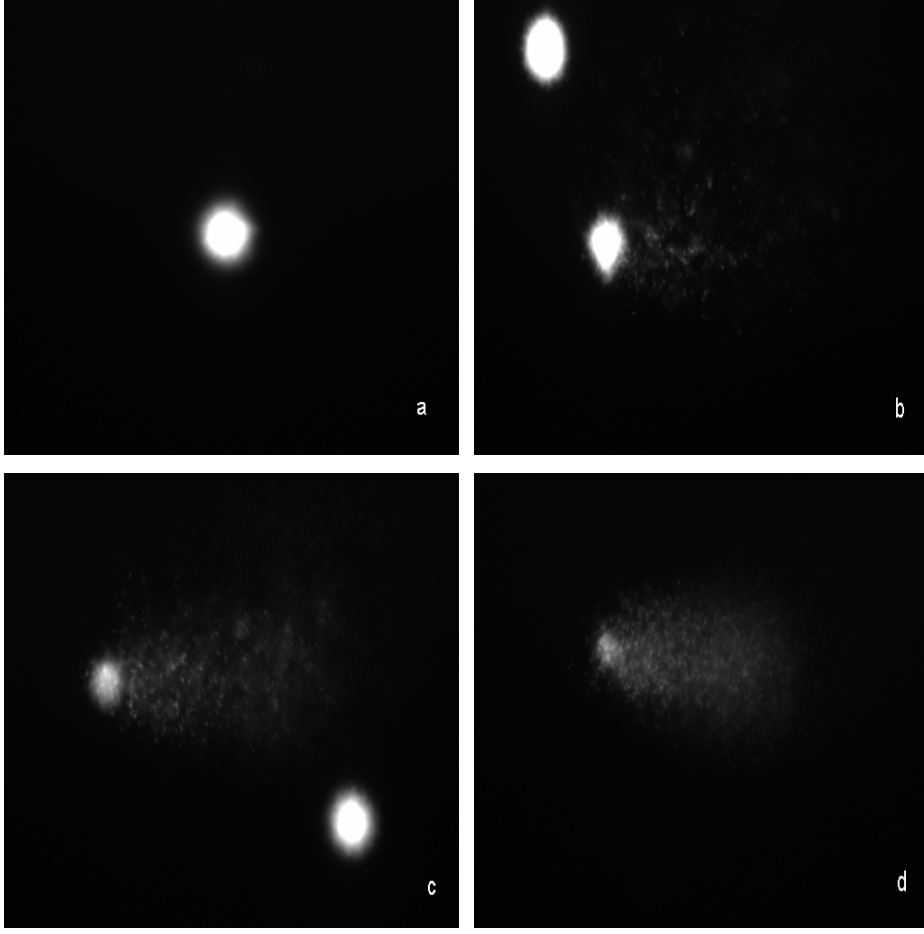
Çizelge 4.8. Potasyum sorbat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
Kontrol	0.00	3.39±0.41	44.18±0.71
Poz. Knt. (H ₂ O ₂)	40 µM	21.65±1.70	49.84±1.47
Potasyum Sorbat	125	6.71±0.91 a	55.48±1.68 a
	250	6.88±0.96 a	53.96±1.33 a
	500	7.91±0.95 a	50.42±1.69 a
	1000	12.08±1.15a	59.38±1.52 a

a Kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.9. Potasyum sorbat uygulamasıyla insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı



Resim 4.10. Potasyum sorbat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

5. TARTIŞMA

Günümüz koşullarında insanların gıda katkı maddelerine artan maruziyeti sonucunda; genetik etkileri tam olarak kontrol edilmemiş gıda katkı maddelerinin genotoksik olup olmadıklarının değerlendirilmesi insanların sağlığı bakımından önem taşımaktadır. Teknik alanda yapılan bütün çalışma ve buluşlar, her ne kadar insanları daha yüksek düzeyde sağlıklı bir yaşama kavuşturmak ve onların daha iyi beslenmesini sağlamak amacı ile yapılyorsa da sayısız sorunları da beraberinde getirmektedir. Gıda katkı maddeleri uygun miktarlarda kullanılsalar da, bu maddeler besinler yoluyla hemen her gün alınmaları ve maruz kalınan sürenin çok uzun olması nedeniyle zamanla vücut içerisinde birikmektedirler. Bu birikim, vücutta toksik etki göstererek çeşitli hasarların meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu hasarların kalıtım materyali üzerinde meydana gelmesi genotoksik etkilerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bir kimyasal maddenin genotoksik etkili olup olmadığının kısa süreli genotoksisite test sistemleri ile belirlenmesinde insan lenfosit kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır [Çelik, 2003; Arslan, 2004; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Parlak, 2007; Yılmaz ve ark., 2008b; Mpountoukas ve ark., 2008].

İnsan lenfositlerinde, en yaygın kullanılan genotoksisite testlerinden biri kromozomal anormallik (KA) testidir. Yapılan çalışmalarda, kromozomal anormallik frekansları ile kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir [Sandberg, 1991; Bonassi ve ark., 1995]. Bazı araştırmacılar insan periferik lenfositlerinde KA frekansının artmasının, insanlarda kanser riski ile ilgili olduğunu ve bireysel kanser yatkınlığının veya genotoksik karsinojenlerin biyolojik etkilerinin erken bir göstergesi olduğunu açıklamışlardır [Hagmar ve ark., 1998]. Yaygın olarak kullanılan bir diğer genotoksisite testi ise kardeş kromatid değişimi (KKD) testidir. Kardeş kromatid değişim frekansında artış olması, kalıcı DNA hasarının göstergesi olarak düşünülmektedir [Palitti ve ark., 1982; Aksoy ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008]. Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların klastojenik ve aneugenik etkilerini belirlemek için kullanılan yöntemlerden bir diğeri de, sitokinezi bloklanmış hücrelerde mikronükleus oluşumunun incelenmesi metodudur. Mikronükleuslar hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom

kaybını göstermektedir. Bu nedenle *in vitro* mikronükleus testi, kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi açısından oldukça kullanışlı, hızlı ve güvenilir bir test tekniğidir [Fenech, 2000]. Son yıllarda gelişen comet tekniği, tek hücre seviyesinde DNA hasarını ölçebilen, hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir [Singh ve ark.,1988; Fairbairn ve ark., 1995; Sardaş ve ark., 1995; Tice ve ark., 2000]. Bu çalışmada, sodyum sorbat ve potasyum sorbat antimikrobiyal gıda katkı maddelerinin KA, KKD, MN ve Comet test yöntemleri ile *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir.

Yapılan analizlerin sonuçlarına göre, çalışmada kullanılan her iki katkı maddesinin de, kullanılan besiyeri ortamının pH'sını değiştirmeden, özellikle yüksek dozlarda, insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik miktarında önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Her iki katkı maddesi tarafından en sık oluşturulan anormallik tipi kromatid kırığıdır. Ayrıca her iki katkı maddesi önemli oranda gaplara neden olmuştur. Kauderer ve ark. (1991) gapları kırıklardan şu şekilde ayırt etmiştir. Gaplar, kromatid kolunda görülen boyanmamış açıklıklardır ve genişliği bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklar ise, kromozomun bir kromatidindeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatidindeki (kromozom tipi kırık) kopmuş bölgelerdir ve genişlikleri bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. Mace ve ark. (1978), gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir. Gaplar bazı araştırmacılar tarafından kromozomal anormallik olarak değerlendirilmiştir [Hasegawa ve ark., 1984; Sasiadek ve ark., 1998; Çelik, 2003]. Bu çalışmada ise kromozomal anormallik oranı gaplı ve gapsız olarak iki şekilde belirlenmiştir. Sodyum sorbat KA oranını gaplar dahil edilmediğinde yalnızca en yüksek dozda artırmıştır. Potasyum sorbatta ise, gaplı ve gapsız değerlendirmeler arasında fark yoktur. Gözlenen anormalliklerden biri de kromozom kırığıdır. Kromozom kırığı, kromozomun her iki kolunda da gözlenen tamir edilmemiş çift zincir kırığıdır [Savage, 1993]. Her iki katkı maddesinin de neden olduğu yaygın olarak gözlenen diğer bir anormallik tipi ise disentrik kromozomdur. Birbirine yakın kromozomlardaki basit kırıklarda, kırık uçlar tekrar birleşebilmekte ve kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucu iki sentromerli (disentrik) kromozomlar ortaya çıkmaktadır. Çalışmada kullanılan katkı maddeleri

nadir olarak fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, poliploidi, kromatid değişimi gibi anormalliklerin oluşumuna da sebep olmuşlardır. Fragment, kromatid ya da kromozomlardaki basit kırıklar sonucu oluşur ve belirgin bir sentromeri yoktur [Anwar ve ark., 1994; Wolf, 1998]. Kardeş kromatidlerde birleşme, çoğunlukla kromozom uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda oluşan kromozom kolları arasındaki karşılıklı birleşmedir [Murli, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Poliploidi, haploid kromozom takımının ikiden fazla katlarda görülmesidir. Kromatid değişimi, üç kollu konfirügasyonla sonuçlanan çift kromatidlerdeki triradyal kromatid değişimi, dört kollu konfirügasyonla sonuçlanan çift kromatidlerdeki kuadriradyal kromatid değişimi olan kromozomlar arası değişimlerdir [Brusick, 1987]. Giri ve arkadaşları (2002), kromozomal anormalliklerin kimyasallarda bulunan alkilleyici özellikten kaynaklandığını, alkilleyici ajanların DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir. Kimyasalın mutajenik aktivitesi molekül yapısındaki elektrofilik (alkil ve fosforil grupları) kısmın DNA'daki nükleofilik kısma bağlanabilme kapasitesine bağlı olacağı belirtilmiştir [Giri ve ark., 2002]. Kromozomal anormalliklerin oluşmasında hücre siklusunun G₂ fazı çok önemlidir. DNA hasarının büyük bir kısmı, hücre siklusunun G₂ fazında tamir edilir. Kromozomal anormalliklerin artması tamir yapılmadığını, yanlış yapıldığını veya engellendiğini göstermektedir. Sentez esnasında kimyasallarca oluşan zincir kırıkları veya G₂ fazının bloke olması kromozomal anormalliklerin oluşmasına neden olmaktadır [Rani ve Rao, 1991; Burim ve ark., 2001; Çelik, 2003].

Farklı gıda katkı maddeleri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Antimikrobiyal katkı maddesi olan sodyum bisülfid, insan lenfositlerinde tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde kromozomal anormallik frekansını artırmıştır [Meng ve Zhang, 1994]. Bir diğer antimikrobiyal katkı maddesi olan borik asitin 600, 800 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ve 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde (24 saatlik uygulamanın 400 µg/ml'lik konsantrasyonu hariç) kromozomal anormallik frekansını doza bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Borik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi ve poliploidi gibi anormalliklerin oluştuğu tespit edilmiştir [Arslan, 2004]. Gıdalarda ağartıcı madde olarak kullanılan

potasyum bromatın, insan lenfositlerinde tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde kromozom anormalliği frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığı gözlenmiştir. Potasyum bromat insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom tipi anormalliklerin oluşumunu indüklemiştir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Bir diğer antimikrobiyal katkı maddesi olan bifenilin, insan lenfositlerinde yapısal anormalliklerin oluşumunu indüklerken, sayısal anormalliklerin oluşumuna herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir [Parlak, 2007]. Yılmaz (2008), gıdalarda sıklıkla kullanılan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonatın *in vitro* genotoksik etkilerini insan periferik lenfositlerinde araştırmış ve çalışılan katkı maddelerinin tümünün kromozomal anormallik frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığını tespit etmiştir. Çalışılan her bir katkı maddesinin de yapısal ve sayısal anormalliklerin oluşumunu artırdığı belirlenmiştir [Yılmaz, 2008].

Bu çalışmada kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddeleri, insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi frekansında artışa neden olmuşlardır. Sodyum sorbat, her iki uygulama süresinde 400 ve 800 µg/ml'lik konsantrasyonlarda; potasyum sorbat ise, 24 saatlik uygulamanın 125 µg/ml'lik konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır.

Farklı gıda katkı maddeleri ile insan lenfositlerinde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Antimikrobiyal katkı maddesi olan borik asitin, insan lenfositlerinde sadece 48 saatlik uygulama süresinde kardeş kromatid değişimi frekansını artırdığı, ancak bu artış istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir [Arslan, 2004]. Un ağartıcısı olarak gıdalara eklenen potasyum bromatın 400, 450, 500 ve 550 µg/ml'lik konsantrasyonlarında 48 saatlik uygulama süresinde insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre önemli düzeyde artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Yılmaz (2008), sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonatın *in vitro* genotoksik etkilerini insan lenfositlerinde araştırmış ve her bir katkı maddesinin kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre istatistiksel

olarak önemli düzeyde artırdığını tespit etmiştir [Yılmaz, 2008]. 2008 yılında Mpountoukas ve arkadaşları antimikrobiyal katkı maddeleri olan potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitritin olası genotoksik etkilerini insan lenfositlerinde araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, potasyum nitritin uygulanan tüm konsantrasyonlarda kardeş kromatid değişimi frekansını herhangi bir şekilde etkilemediği; sodyum benzoatın ise 8 mM'lık konsantrasyonda kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre önemli oranda artırdığı belirlenmiştir [Mpountoukas ve ark., 2008]. Çalışmamızda potasyum sorbat 125-1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda (24 saatlik uygulamada 125 µg/ml hariç) kardeş kromatid değişimi frekansını artırırken, Mpountoukas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise potasyum sorbatın 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarının kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir [Mpountoukas ve ark., 2008].

Mikronükleus testi sonuçlarına göre; sodyum sorbat, 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarda mikronükleus frekansını kontrole göre anlamlı oranda ve doza bağlı olarak artırmıştır. Potasyum sorbatın ise mikronükleus oluşumunu artırdığı, fakat bu artışın önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir.

Mikronükleus metodunu kullanılarak farklı gıda katkı maddeleri ile yapılan çeşitli çalışmalar vardır. Borroto ve arkadaşları (2004), antimikrobiyal ajan olarak kullanılan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in ile yaptıkları çalışmada bu koruyucu katkı maddesinin mikronükleus oluşumunu indüklediği belirlenmiştir [Borroto ve ark., 2004]. Potasyum bromatın, 24 saatlik uygulamasının sadece 500 ve 550 µg/ml dozlarında, 48 saatlik uygulamasının ise tüm dozlarında (400, 450, 500 ve 550 µg/ml) mikronükleus frekansını önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Ayrıca bir başka araştırmada potasyum bromatın insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde mikronükleus oluşumunu doza bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir [Luan ve ark., 2007]. Yılmaz (2008), sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın mikronükleus frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığını belirlemiştir [Yılmaz, 2008].

Çalışmamızda primer DNA hasarını belirlemek için kullandığımız comet testinde, sodyum sorbat (kuyruk uzunluğu için 400 µg/ml'lik doz hariç) ve potasyum sorbat uygulanan tüm konsantrasyonlarda kuyruktaki DNA yoğunluğunda ve comet kuyruk uzunluğunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artışa neden olmuştur.

Comet test tekniği son yıllarda geliştirilen bir teknik olması nedeniyle, katkı maddelerinin *in vitro* primer DNA hasarının belirlenmesinde çok fazla kullanılmamakta ve dolayısıyla bu konuda fazla çalışma bulunmamaktadır. Sasaki ve arkadaşları (2002), potasyum sorbatın genotoksisitesini fare organlarında *in vivo* olarak incelemişlerdir. Bunun için, 8 farklı fare organında (mide, idrar kesesi, beyin, karaciğer, böbrek, akciğer, kolon, kemik iliği) çalışılmış ve potasyum sorbatın 2000mg/kg konsantrasyonda çalışılan fare organlarında DNA hasarına neden olmadığı belirlenmiştir [Sasaki ve ark., 2002]. Gıdalarda renklendirici olarak kullanılan, quinoline sarısı ve brillant siyahının izole insan lenfositlerindeki DNA hasarını kontrole göre tüm uygulamalarda artırdıkları gözlenmiştir [Macioszek ve Kononowicz, 2004]. Blaszczyk (2006), antioksidan gıda katkı maddesi olarak kullanılan ethoxyquin'in 1-250 µM'lık konsantrasyonlar arasında DNA hasarını kontrole göre önemli oranda artırdığını belirlemiştir [Blaszczyk, 2006]. Potasyum bromatın *in vitro* genotoksik etkileri insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet testiyle araştırılmıştır. Potasyum bromatın 4 saatlik uygulaması sonucunda, alkali ve nötral comet testlerinde bu maddenin DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olduğu gözlenmiştir [Luan ve ark., 2007]. Yılmaz (2008), sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonat gıda katkı maddelerinin DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla comet test tekniğini kullanmıştır. Sitrik asitin 200 µg/ml'lik konsantrasyonda DNA hasarını anlamlı düzeyde artırdığı, 3000 µg/ml'lik konsantrasyonda ise toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışılan diğer katkı maddelerinin ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda DNA hasarını kontrole göre önemli oranda artırdıkları belirlenmiştir [Yılmaz, 2008].

Çalışmada kullandığımız sodyum sorbat ve potasyum sorbat katkı maddelerinin sitotoksisitelerinin belirlenmesi amacıyla mitotik indeks (MI) değerleri de hesaplanmıştır. Sodyum sorbat, sadece 48 saatlik uygulama süresinde 200 µg/ml'lik

konsantrasyonda; potasyum sorbat ise, her iki uygulama süresinde de sadece 1000 µg/ml’lik konsantrasyonda mitotik indekste önemli oranda düşüşe neden olmuştur. Katkı maddelerinin mitotik indeks üzerine etkileri, mitotik iğ ipliklerinde etkili olan DNA polimeraz enziminin bozulmasından [Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006] veya mitoz giren hücrede G₂ aşamasının bloke edilmesinden [Van’t Hof, 1968] kaynaklanmış olabilir. Ancak çalışmamızda incelediğimiz bu iki gıda katkı maddesinden yalnızca potasyum sorbatın yüksek dozlarında sitotoksik etkiden bahsedilebilir.

Araştırmacılar farklı gıda katkı maddelerinin mitotik indeks üzerine etkilerini incelemişlerdir. Antimikrobiyal katkı maddesi olan borik asitin, 24 saatlik uygulamasında 600 ve 800 µg/ml’lik konsantrasyonlarında, 48 saatlik uygulamasında ise tüm konsantrasyonlarında (400, 600, 800, 1000 µg/ml) mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir [Arslan, 2004]. Kaya ve Topaktaş (2007), un ağartıcısı olarak kullanılan potasyum bromatın, mitotik indeksi tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde azalttığını tespit etmişlerdir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Yılmaz (2008), sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonat katkı maddelerinin mitotik indeksi tüm uygulamalarda kontrole göre anlamlı oranda düşürdüğünü belirlemiştir [Yılmaz, 2008]. Mpountoukas ve arkadaşları (2008), potasyum nitratın 0,2 mM’lik konsantrasyonda, insan lenfositlerinde mitotik indeksi istatistiksel olarak önemli oranda düşürdüğünü; sodyum benzoatın ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi etkilemediğini tespit etmişlerdir. Mpountoukas ve arkadaşlarının potasyum sorbatın sitotoksitesisiyle ilgili elde ettikleri sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlarla benzerdir. Çalışmamızda potasyum sorbatın 125-500 µg/ml’lik konsantrasyonlarda mitotik indeksi etkilemediği, sadece en yüksek doz olan 1000 µg/ml’lik konsantrasyonda anlamlı olduğu belirlenmiştir. Mpountoukas ve arkadaşları (2008) ise potasyum sorbatın 0,02; 0,2; 2mM dozlarının mitotik indeksi etkilemediğini, ancak en yüksek iki dozda (4 ve 8 mM) zayıf sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir [Mpountoukas ve ark., 2008].

Bu çalışmada kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddeleri uygulanan tüm konsantrasyonlarda replikasyon indeksini ve nükleer bölünme

indeksini herhangi bir şekilde etkilememiştir. Antimikrobiyal katkı maddesi olan borik asitin, insan lenfositlerinde replikasyon indeksini uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda düşürdüğü tespit edilmiştir [Arslan, 2004]. Diğer bir katkı maddesi olan potasyum bromatın, insan lenfositlerinde replikasyon indeksini önemli düzeyde düşürdüğü belirlenmiştir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Yılmaz (2008), gıdalarda sıklıkla kullanılan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonatın insan lenfositlerinde, replikasyon indeksini ve nükleer bölünme indeksini etkilemediklerini belirlemiştir [Yılmaz, 2008]. Mpountoukas ve arkadaşları (2008), potasyum nitritin insan lenfositlerinde replikasyon indeksi üzerinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediğini, potasyum sorbat ve sodyum benzoatın ise 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarında replikasyon indeksini kontrole göre önemli oranda düşürdüğünü belirlemişlerdir [Mpountoukas ve ark., 2008].

Sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri hakkında *in vitro* insan periferik lenfositlerinde yapılmış pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma, bu katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin eksiksiz belirlenebilmesi açısından önemlidir. Sodyum sorbat ve potasyum sorbat katkı maddeleriyle ilgili farklı hücre hatlarında yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların sonuçları ise şu şekildedir.

Sodyum sorbatın genotoksitesiyiyle ilgili yapılan çalışmalarda pozitif sonuçlar belirlenmiştir. Hasegawa ve arkadaşları (1984), kültüre alınmış Çin Hamsteri V79 hücrelerinde KA, KKD ve gen mutasyonları test yöntemlerini uygulamışlar ve sodyum sorbatın bu test yöntemlerinde pozitif etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, sodyum sorbatın potasyum sorbat ve sorbik asite göre daha fazla klastojenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [Hasegawa ve ark., 1984]. Sodyum sorbat genotoksitesini; Salmonella/memeli mikrozom testi (AMES), Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz (HPGRT) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile, Çin Hamsteri ve fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi (MN) ve Çin Hamsterinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile incelemişlerdir. Sodyum sorbatın bekletilmiş

eriyiğinin çalışılan *in vivo* testlerde zayıf klastojenik etkiye sahip olduğu ve 200 mg/kg konsantrasyonda kromozomal anormallik ve mikronükleus frekansını artırdığı gözlenmiştir [Münzner ve ark., 1990]. 120, 300, 600, 1200 mg/ml'lik konsantrasyonlardaki sodyum sorbatın stokta bekletilmiş çözeltisi, *in vitro* Suriye Hamsteri embriyo fibroblast hücrelerinde mikronükleus testi ve hücre transformasyon testleri kullanılarak pozitif etkili olduğu belirlenmiştir [Schiffmann ve Schlatter, 1992]. Schlatter ve arkadaşları (1992), sodyum sorbatın Çin Hamsteri V79 hücrelerinde 2500 µg/ml'lik konsantrasyonda mitoz bölünmeyi durdurduğunu tespit etmişlerdir [Schlatter ve ark., 1992].

Münzner ve arkadaşlarının 1990 yılında yaptıkları çalışmada ise, sodyum sorbat genotoksik etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Sodyum sorbat genotoksisitesini Salmonella/memeli mikrozom testi (AMES), Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz (HPGRT) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile, Çin Hamsteri ve fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi (MN) ve Çin Hamsterinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile incelenmiştir. Çalışılan tüm *in vitro* testlerde genotoksik etki gözlenmemiştir. *In vivo* testlerde ise, sodyum sorbatın taze hazırlanmış eriyiğinde hiçbir klastojenik etki belirlenmemiştir [Münzner ve ark., 1990].

Araştırmamızda genotoksik etkisini incelediğimiz diğer bir katkı maddesi olan potasyum sorbat ile ilgili, Ishodate ve Odashima (1977) ve Abe ve Sasaki'nin (1977) Çin Hamsteri hücrelerinde yapmış oldukları çalışmalarda potasyum sorbatın 3-4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda *in vitro* KA testinde pozitif etkili olduğunu belirlemişlerdir [Ishodate ve Odashima, 1977; Abe ve Sasaki, 1977]. Liewen ve Marth (1985) sorbik asitin *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 suşlarında mutajen olduğunu tespit etmişlerdir [Liewen ve Marth, 1985]. Sorbik asit ve potasyum sorbatın potansiyel genotoksik riskiyle ilgili yapılan diğer bir çalışmada, kültüre alınmış Çin Hamsteri V79 hücrelerinde KA, KKD ve gen mutasyonları test yöntemleri uygulanmıştır. Sorbik asit ve potasyum sorbatın 1000 ve 2000 µg/ml konsantrasyonlarda kromozomal anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir [Hasegawa ve ark., 1984].

Mukherjee ve arkadaşları (1988), sorbik asitin ve sodyum nitritin tek başlarına ve karışım halindeki olası genotoksik etkilerini fare kemik iliği hücrelerinde araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, sorbik asitin yüksek konsantrasyonlarda KKD ve MN frekanslarını artırdığı, sodyum nitritin ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını artırdığı belirtilmiştir. Karışım halindeki eriyiklerinde, maddelerin tek başlarına yapılan muamelelerine göre, KKD frekansındaki artışın iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [Mukherjee ve ark., 1988].

Potasyum sorbat ile ilgili yapılan diğer genotoksisite çalışmalarında negatif sonuçlara da rastlanmıştır. Schlatter ve arkadaşları (1992), potasyum sorbatın kültüre edilmiş Çin Hamsteri V79 hücrelerinde genotoksik etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Potasyum sorbatın Çin Hamsteri V79 hücrelerinde 2500 µg/ml'lik konsantrasyonda mitotik indeksi düşürdüğü, ancak bu düşüşün önemli oranda olmadığı belirlenmiştir. 25mM'lik konsantrasyondaki potasyum sorbatın ise *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile genotoksik etkili olmadığı gözlenmiştir [Schlatter ve ark., 1992]. Jung ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan diğer *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ise, sorbik asit ve potasyum sorbatın genotoksik etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Ancak ana oksidasyon ürünü olan 4,5-oxohexenoate'ın Ames testinde mutajenik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Jung ve ark., 1992]. Sorbik asitin, kromozomal anormallliği, kardeş kromatid değişimi ve Ames testleri sonucunda ise, genotoksik etkili olmadığı tespit edilmiştir [Walker, 1990]. Potasyum sorbatın genotoksisitesi *in vitro* Suriye Hamsteri embriyo fibroblast hücrelerinde mikronükleus testi ve hücre transformasyon testleri kullanılarak araştırılmıştır. 120, 300, 600, 1200 mg/ml'lik konsantrasyonlardaki potasyum sorbatın taze çözeltisinin her iki test yönteminde de negatif etkili olduğu tespit edilmiştir [Schiffmann ve Scahlatter, 1992].

Münzner ve arkadaşları (1990), potasyum sorbatın genotoksisitesini Salmonella/memeli mikrozom testi (AMES), Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz (HPGRT) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile (10-20 mg/kg), Çin Hamsteri ve fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi (MN) (200 mg/kg bw) ve Çin Hamsterinde kromozomal

anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) (10,000; 20,000 µg/ml) testleri ile incelemiştir. Potasyum sorbatın tüm *in vitro* testlerde genotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. *In vivo* testlerde ise, potasyum sorbatın taze hazırlanmış ve bekletilmiş eriyiklerinde hiçbir klastojenik etki belirlenmemiştir [Münzner ve ark., 1990].

Kitano ve ark. (2002), potasyum sorbatın mutajenitesini Ames testini kullanarak askorbik asit ve Fe tuzu varlığında araştırmışlardır. Bu maddeler birlikte kullanıldıklarında *Salmonella typhimurium*'un TA98 (S9 mix varlığında veya S9 mix yokluğunda) ve TA100 (S9 mix varlığında) suşlarında mutajenik etkili olmadıkları belirlenirken, TA100 (S9 mix yokluğunda) suşunda ise doza bağlı bir mutajenik etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Maddeler ayrı ayrı uygulandığında ise, herhangi bir mutajenik etki belirlenmemiştir [Kitano ve ark., 2002].

Sodyum sorbat ile ilgili yapılan çalışmalar bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur. Sonuç olarak, sodyum sorbatın insan lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Potasyum sorbat ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, hem pozitif hem de negatif sonuçlara rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise potasyum sorbatın insan lenfositlerinde genotoksik olduğu belirlenmiştir.

Sodyum sorbat ve potasyum sorbat katkı maddelerinin genotoksik etkilerini birer alkileyici ajan olarak gerçekleştirdiklerini söyleyebiliriz. Alkileyici ajanlarla etkileşim mesleki maruziyet, sigara kullanımı, gıda katkı maddeleri, deterjanlar, kozmetik ve atmosfer gibi çevresel maruziyetlerle gerçekleşebilir [Bartsch ve ark., 1990]. Alkileyici ajanlar DNA'nın nükleofilik merkezlerine ataklarda bulunma yeteneğindeki elektrofilik bileşiklerdir [Friedberg ve ark., 1995; Shibuya ve Morimoto, 1993]. Hücrede DNA çift zincirinde birden fazla noktaya kovalent bağla bağlanarak DNA molekülünü alkilerler.

Alkileyici ajanlar; DNA'da çapraz bağlanmalara, zincir kırıkları gibi kromozomal anormalliklerin oluşmasına neden olurlar [Jenkins ve ark., 2005]. Alkileyici ajanlar en çok N7G (Guaninin 7. konumundaki azotuna) ve O⁶G (Guaninin 6. konumundaki

oksijenine) bölgelerini hedef alarak burada GC ve AT mutasyonlarına sebep olurlar [Shibuya ve Morimoto, 1993]. O₆-alkilguanin (özellikle O₆-metilguanin) kromozomlarda kardeş kromatid değişimi ve kromozom kırığı gibi mutasyonlara sebep olur [Bean ve ark., 1994; Kaina ve ark., 1997]. Alkilleyici ajanların kromozomal hasar mekanizmaları tam olarak açıklanamasa da bunu destekleyen birçok mekanizma mevcuttur. O₆-alkilguanin S fazına girmeden önce uzaklaştırılırsa, lezyondan sonra DNA replikasyonu gerçekleşebilir. Fakat burada C yerine T geçerek yanlış eşleşme olur. Bunun sonucu kesip çıkarmayla tamir gerçekleşir ve bu durum gap oluşturur. Buda bir sonraki döngüde DNA replikasyonunun engellenmesine yol açar. Replikasyonun engellenmesi çift zincir kırıklarını içeren kromozomal anormalliklerinin oluşmasına neden olur [Galloway ve ark., 1995; Armstrong ve Galloway, 1997]. Baz ekzisyon tamiri hasar yapan bazı uzaklaştırırken zincir kırığı oluşturur. Bu da yine çift zincir kırığının oluşumuna ve kromozom fragmentasyonuna yol açar [Jenkins ve ark., 2005].

Çalışmamızda kullandığımız sodyum sorbat ve potasyum sorbat gıda katkı maddeleri de DNA bazlarıyla benzer nükleofilik karakteristik yapıya sahip olan ve alkilleyici ajanlar için bir yakalayıcı olarak görev yapan nükleofil-4 piridin üzerinde alkilleyici etki gösterdikleri belirlenmiştir [Pérez-Prior ve ark., 2005; Pérez-Prior ve ark., 2008]. Alkilleyici ajanların alkilasyon kapasiteleri ve karsinojeniteleri arasında bir korelasyon tespit edilmiştir [Manso ve ark., 2005]. Potasyum sorbatın alkilleyici potansiyeli ilk defa sulu hidroklorik asit ile yapılan çalışma sonucunda belirlenmiştir. Sorbik asitin potasyum hidroksit (KOH) ve sodyum hidroksit (NaOH) ile karışımı sonucunda alkilleyici potansiyelini belirlemişlerdir [Pérez-Prior ve ark., 2008]. Buradan yola çıkarak sodyum sorbat ve potasyum sorbatın genotoksik etkilerini DNA bazlarını alkilleyerek gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Sorbik asit ve tuzları tüm dünyada yaygın olarak kullanılmalarına rağmen, bu maddelerin alkilleyici potansiyelleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır [Pérez-Prior ve ark., 2005]. Antimikrobiyal katkı maddelerinin etki mekanizmalarının belirlenebilmesi için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

Bu araştırmada, sodyum sorbat ve potasyum sorbat ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar, bu maddelerin, insan periferel lenfositlerinde klastojenik, mutajenik ve genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu araştırmanın sonuçları diğer genotoksisite test sistemleri kullanılarak *in vivo* alışmalarla da desteklenmelidir. Gıda katkı maddelerine insanların birçok nedenle istemli ya da istemsiz artan maruziyeti sonucunda, bu maddelerin oluşturduğu risklerin belirlenmesi insan sağlığı açısından önemlidir. Günümüzde hala pek çok katkı maddesinin toksisite testleri yapılmamış ve ilgili kuruluşlarca gıdalara eklenecek miktarı belirlenmemiştir. Bu katkı maddelerinin gıda endüstrisinde güvenle kullanılabilmeleri için, uzun bir inceleme ve değerlendirme evresinden geçirilip, ilgili kuruluşlarca belirlenen dozlarda kullanımlarına izin verilmeli, insan sağlığı üzerinde olumsuz sonuçlar doğurduğu belirlenen katkı maddelerinin kullanımları yasaklanmalıdır. Fakat kullanımına izin verilen katkı maddelerinin de sürekli olarak alındığında ya da zamanla vücut içerisinde birikim yaparak, sağlığımızı olumsuz yönde etkiledikleri unutulmamalıdır. Gıda katkı maddelerinin etkilerini en aza indirmek için gıda üreticileri bilinçlendirerek üretimde kullanılması zorunlu olan katkı maddelerinin önerilenden fazla kullanılması engellenmelidir. Ayrıca çok fazla kimyasal işlem görmemiş doğal gıda katkı maddelerinin kullanımına dikkat edilmelidir. Fakat unutulmamalıdır ki ister doğal olsun ister yapay tüm katkı maddelerinin zararlı olup olmamasını belirleyen kullanım miktarıdır. Doğal katkı maddelerinin de fazla tüketilmesi insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Bu nedenle, insanlar, bu maddeleri sürekli tüketmekten kaçınması gerektiği ve daha çok katkı maddesi içermeyen doğal gıdalarla beslenmesi gerektiği bilincini kazanmalıdırlar. Zorunlu kalınan durumlarda ise gıdanın raf ömrüne ve içeriğine mutlaka dikkat edilmelidir. İçeriğinde sentetik katkı maddeleri yerine doğal katkı maddeleri kullanılan gıdaları tüketmek, katkı maddelerinin oluşturduğu riskleri biraz daha azaltmaktadır.

Gıda katkı maddelerinin uygun kullanımı üretici, tüketicisi ve devlet işbirliğini gerektirmektedir. Üreticiler oto kontrole, ürettikleri besinin kalitesini üretim aşamalarında, satışa sunmadan önce kontrol etmeye önem vermelidir. Tüketiciler gıda katkı maddeleri konusunda bilinçlendirilmelidir. Besin sanayi için tüketicisi

istekleri son derece önemlidir. Bilinçli tüketici hem üreticiyi doğru gıda katkı maddeleri kullanımı konusunda hem de devleti etkin kontrol yapma konusunda daha duyarlı hale getirecektir. Devlet de etkin kontrol mekanizması kurmalı, üreticilerin oto kontrol çalışmalarını teşvik etmeli, denetlemeli, analiz yöntemlerini standartlaştırmalı ve gıda katkı maddeleri analizi yapacak laboratuvarları geliştirmelidir.

KAYNAKLAR

Abe, S., Sasaki, M., “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese Hamster cells exposed to various chemicals”, *J. Natl. Cancer I.*, 58: 1635-1643 (1977).

Adams, E.J., “Nutritional Care in Food Allergy and Food Intolerance”, Mohan L.K., Arlin M. (Ed):Food Nutrition and Food Therapy. **WB Saunders Company**. Philadelphia (1992).

Akın, A., Sümer, S., “The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the Salmonella microsome test system”, *Microbiol Bul.*, 25: 94-107 (1991).

Aksoy, H., Yılmaz S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers”, *J. Appl. Toxicol.*, 26 (1): 10-15 (2006).

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norpha, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety”, *Mutat. Res.*, 463 (2): 72-111 (2000).

Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü., Demirağ, K., “Gıda Katkı Maddeleri Analiz Yöntemleri”, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, 22: 1-244 (2000).

Ames, B.N. McCann, J., Yamasaki, E., “Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity” *Mutat. Res.*, 31: 347-364 (1975).

Anwar, W.A., Salama, S.I., Serafy, M.M., Hemida, S.A., Hafez, A.S., “Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs”, *Mutagenesis*, 4: 315-317 (1994).

Armstrong, M.J., Galloway, S.M., “Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamsters cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents”, *Mutat. Res.*, 373: 167-178 (1997).

Arslan, M., “Borik asitin insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 1-62 (2004).

Aworh, O.C., Egounlety, M., “Preservation of West African soft cheese by chemical treatment”, *J. Dairy Res.*, 52: 189-195 (1985).

Bartsch, H., Ohshima, H., Shuker, D.E.G., Pignatelli, B., Calmels, S., “Exposure of humans to endogenous N-nitroso compounds: implications in cancer etiology”, *Mutat. Res.*, 238: 255-267 (1990).

Bean, C.L., Bradt, C.I., Hill, R., Johnson, T.E., Stallworth, M., Galloway, S.M., "Chromosome aberrations: persistence of alkylation damage by O6-alkylguanine-DNA transferase", *Mutat. Res.*, 307: 67-81 (1994).

Bender, M.A., Awa, A.A., Brooks, A.L., Evans, H.J., Groer, P.G., Littlefield, L.G., Pereira, C., Preston, R.J., Wachholz, B.W., "Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation", *Mutat. Res.*, 196: 103-59 (1988).

Blaszczyk, A., "DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes" *Toxicol. Lett.*, 163: 77-83 (2006).

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., Puntoni, R., "Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans?", *Cancer Genet. Cytogen.*, 79 (2): 133-135 (1995).

Borroto, J.I.G., Perez, G., Creus, A., Marcos, R., "Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes", *Food Chem. Toxicol.*, 42: 187-193 (2004).

Brusick, D., "Principles of Genetic Toxicology", 2nd Edition, *Plenum Press*, Newyork, London (1987).

Buazzi, M.M., Martt, M., Elmer, H., "Mechanisms in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate", *Food Microbiol.*, 8: 249-256 (1991).

Budayova, E., "Effects of sodium nitrite and potassium sorbate on *in vitro* cultured mammalian cells", *Neoplasma* 32 (3): 341-350 (1985).

Bullerman, L.B., "Effect of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicilium patulum* and *Penicilium roqueforti*", *J. Food Protect.*, 47 (4): 312-316 (1984).

Burim, R.V., Canalle, R., Lopes, J.L.C., Vichnewski, W., Takahashi, C.S., "Genotoxic accition of the sesquiterpene, lactone centratherin on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*", *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 21: 383-393 (2001).

Cavallo, D., Ursini, C.L., Perniconi, B., Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F.M., Marinaccio, A., Iavicoli, S., "Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees", *Mutat. Res.*, 587 : 45-51 (2005).

Cemeroğlu, B., Acar, J., "Meyve ve Sebze İşletme Teknolojisi", 1. Baskı, Ankara, 305 (1986).

Chichester, D.F., Tanner, F.W., “Antimicrobial Food Additives in/ Handbook of Food Additives”, 4rd. Ed. (Furia, T.E., Ed.), **CRC Press**, Newyork, 138-159 (1972).

Cicchetti, R., Bari, M., Argentin, G., “Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with crest staining: an *in vivo* study in mice”, **Mutat. Res.**, 439: 239–248 (1999).

Çakmak, G., “Trafik Polisi ve taksi sürücüleri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- hidroksipiren değerlerinin, periferel lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 28-107 (2000).

Çelik, M., “Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferel lenfositlerinde sitogenetik etkileri”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-102 (2003).

Davidson, M.P., Branen, A.L., (Editör), “Antimicrobials in Foods”, Second Edition, New York, 45-50 (1993).

Davidson, M.P., Juneja, V.K., “Antimicrobial Agent in Food Additives”, 4rd Ed. (Branen, A.L., Davidson, M.P., Salminen, A.), **Marcel Deccer Inc.**, Newyork, 83-92 (1990).

Eker, Ö.Ü., “Reçellere katılan benzoik asit miktarının spektroskopik yöntemle tayini üzerine bir çalışma”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara, 9-10 (1995).

Ekşi, A., “Gıda muhafazası için koruyucu madde (antimikrobiyal) uygulamaları/ Teknolojik, toksikolojik ve yasal açıdan gıda katkıları semineri”, **T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Sınai Eğitim ve Geliştirme Merkezi Genel Müdürlüğü**, Ankara, 1-8 (1988).

Emecen, G., Ünlü, H., “Memelilerde pestisitlerin sitogenetik etkilerinin mikronükleus testi ile araştırılması”, **Türk. J. Biol.**, 19: 1-9 (1995).

Evans, H.J., “Cytological Methods For Detecting Chemical Mutagens” Ed. Hollander, A., in. Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection, Newyork, London, **Pleunum Press**, 4:1-29 (1976).

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., “The comet assay: a comprehensive review”, **Mutat. Res.**, 339 (1): 37–59 (1995).

Falakalı, B., “*Drosophila* Genetiği” **Ege Üniversitesi Yayınları**, Bornova, İzmir, 64-65 (1990).

Falck, G., Catalan, J., Norppa, H., "Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin-B", *Mutat. Res.*, 392 (1-2): 71-79 (1997).

FAO/WHO, "Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives", *WHO Technical Report Series*, Geneva, 733: 1-59 (1986).

FAO/WHO, "Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents", *WHO Food Additives Series*, Rome, 5: 121-142 (1974).

Fenech, M., "The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations", *Environ. Health Persp.*, 101 (3): 101-107 (1993).

Fenech, M., "The *in vitro* micronucleus technique", *Mutat. Res.*, 455 (1-2): 81-95 (2000).

Fenech, M., Morley, A.A., "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutat. Res.*, 147 (1-2): 29-36 (1985).

Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cossand, P., Blanguat, G. de Saint., "Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products", *Toxicol. In Vitro*, 14 (5): 423-428 (2000).

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (eds), "DNA Repair and Mutagenesis", *American Society for Microbiology (ASM) Press*, Washington DC, pp. 32-33 (1995).

Frolich, A., Würzler, F.E., "Drosophila wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Mutat. Res.*, 234: 71-80 (1990).

Galloway, S.M., Greenwood, S.K., Hill, R.B., Bradt, C.I., Bean, C.L., "A role for mismatch repair in production of chromosome aberrations by methylating agents in human cells", *Mutat. Res.*, 346: 231-245 (1995).

Galloway, S.M., Wolf, S., "The relation between chemically induced sister chromatid exchanges and chromatid breaks", *Mutat. Res.*, 61 (2): 297-307 (1979).

Giri, S., Gri, A., Sharma, G.D., Prasad, S.B., "Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide", *Mutat. Res.*, 519:75-82 (2002).

Gürsoy, S., "Besinlerde katkı maddelerinin kullanımı ve sitrik asit toksisitesi", Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-21 (2001).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH)", **Cancer Res.**, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hasegawa, M., Nishi, Y., Ohkawa, Y., Inui, N., "Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese Hamster cells", **Food Chem. Toxicol.**, 22 (7): 501-507 (1984).

Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., "Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham", **Cytobios**, 57: 7-14 (1989).

Ishidate, M. Jr., Odashima, S., "Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens", **Mutat. Res.**, 48 (3-4): 337-353 (1977).

Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., Matsuoka, A., "Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan", **Food Chem. Toxicol.**, 22 (8): 623-636 (1984).

İnternet: "Gıda katkı maddeleri" <http://www.gidacilar.net> (2009).

İnternet: "Sorbik asit ve tuzları" <http://www.yilmazkimya.com.tr> (2009).

Jenkins, G.J.S., Doak, S.H., Johnson, G.E., Quick, E., Waters, E.M., Parry, J.M., "Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?", **Mutagenesis** 20 (6): 389-398 (2005).

Jung, R., Cojocel, C., Müller, W., Bottger, D., Lück, E., "Evaluation of the genotoxic potential of sorbic acid and potassium sorbate", **Food Chem. Toxicol.**, 30 (1): 1-7 (1992).

Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., Coquerelle, T., "Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex⁻ Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models", **Mutat. Res.**, 381: 227-241 (1997).

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., "Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies", **Mutat. Res.**, 463 (1): 13-31 (2000).

Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F.J., Speit, G., "Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*", **Environ. Mol. Mutagen.** 18 (1): 28-34 (1991).

Kaya, F.F., Topaktaş, M., "Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*", **Mutat. Res.**, 626: 48-52 (2007).

Kayraldız, A., Topaktaş, M., “The *in vivo* genotoxic effects of sodium metabisulfite in bone marrow cells of rats”, ***Russian J. Genet.***, 43 (8): 905-909 (2007).

Kilbey, B.J., Legotor, M., Nichols, W., Ramel, C.,” Handbook of mutagenecity test produres”, ***Elsevier Science Publishers***, Amsterdam, 28-29 (1984).

Kimura, K., Sakurada, K., Katom, N., “Inhibition by gossypol of phospholipid-sensitive Ca^{+2} dependent protein kinase from pig testis”, ***Biochim. Et Biophys. Acta.***, 839 (3): 276-280 (1985).

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., “The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction”, ***Mutat. Res.***, 392 (1-2): 19–30 (1997).

Kitano, K., Fukukawa, T., Ohtsuji, Y., Masude, T. and Yamaguchi, H., “Mutagenicity and DNA-damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt”, ***Food Chem. Toxicol.***, 40 (11): 1589-94 (2002).

Latt, S.A., Schreck, R.R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P., Shuler, C.F., “Sister chromatid exchange”, ***Hum. Genet.***, 267-331 (1980).

Liewen, M., Marth, E.H., “Evaluation of 1,3-pentadiene for mutagenecity by the Salmonella/mammalian microsome assay”, ***Mutat. Res.***, 157 (1): 49-52 (1985).

Lu, P., Ho, I., Lee, T., “Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells”, ***Mutat. Res.***, 414 (1-3): 15-20 (1998).

Luan, Y., Suzuki, T., Palanisamy, R., Takashima, Y., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Saito, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Yamaguchi, T., Hayashi, M., and Honma, M., “Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC > TA transversion in human cells” ***Mutat. Res.***, 619 (1-2): 113-123 (2007).

Luca, D., Luca, V., Cotor, Fl., Răileanu, L., “*In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite”, ***Mutat. Res.***, 189 (3): 333-339 (1987).

Lück, E., “Chemische Lebensmittelkonservierung: Stoffe-Wirkungen-Methoden”, ***Springer-Verlag***, Berlin, 145-158 (1986).

Mace, M.L. Jr., Daskal, Y., Wray, W., “Scanning electron microscopy of chromosome aberrations”, ***Mutat. Res.***, 52 (2): 199–206 (1978).

Macioszek, V.K., Kononowicz, A.K., “The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: quinoline yellow (E 104) and brilliant black BN (E 151)”, *Cell. Mol. Biol. Let.*, 9 (1): 107-122 (2004).

Manso, J.A., Pérez Prior, M.T., García Santos, M.P., Calle, E., Casado, J., “A kinetic approach to the alkylating potential of carcinogenic lactones”, *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 1161–1166 (2005).

Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A., “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay)”, A European Review, *Mutat. Res.*, 288 (1): 47-63 (1993).

Meng, Z., Zhang, L., “Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced human lymphocytes by sodium bisulfite (sulfur dioxide)”, *Acta. Genet. Sin.* 21(1): 1-6 (1994).

Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E., Lialiaris, T., “Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives”, *Food Chem. Toxicol.*, 46 (7): 2390-2393 (2008).

Mukherjee, A., Agarwal, K., Chakrabarti, J., “Genotoxicity studies of the food additive ester gum”, *Food Chem. Toxicol.*, 30 (7): 627-630 (1992).

Mukherjee, A., Giri, A.K., Talukder, G., Sharma, A., “Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite *in vivo* in mice”, *Toxicol. Let.* 42 (1): 47-53 (1988).

Murli, H., “Screening assay for chromosomal aberrations in Chinese Hamster ovary (CHO) cells with argentyn 23”, *Final Report*, 1-15 (2003).

Münzner, R., Guigas, C., Renner, H.W., “Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential”, *Food Chem. Toxicol.*, 28(6): 397-401 (1990).

Natarajan, A.T., “Chromosome aberrations: past, present and future”, *Mutat. Res.*, 504 (1-2): 3-16 (2002).

Oğan, H., “Gıda, İnsan Sağlığı, Yasalar”, *İstanbul Yayınevi*, İstanbul, 191-265 (1996).

Ostling, O., Johanson, K.J., “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 123 (1): 291-298 (1984).

Palitti, F. C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., “Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice”, *Mutat. Res.*, 103: 191-195 (1982).

Parlak, Ş., “Gıda koruyucu maddesi olan bifenil’in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana (2007).

Peace, B.E., Succop, P., “Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values?”, **Mutat. Res.** 425 (2): 225-230 (1999).

Pérez-Prior, M.T., Manso, J.A., García-Santos, M. Del P., Calle, E., Casado, J., “Alkylating potential of potassium sorbate”, **J. Agr. Food Chem.**, 53 (26): 10244–10247 (2005).

Pérez-Prior, M.T., Manso, J.A., García-Santos, M. Del P., Calle, E., Casado, J., “Sorbic acid as an alkylating agent”, **J Solution Chem.**, 37: 459–466 (2008).

Perry, P., Evans, H.J., “Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange”, **Nature**, 258 (5531): 121-125 (1975).

Perry, P.E., Thomson, E.J., “The Methodology of Sister Chromatid Exchanges, Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., (Eds.) **Handbook of Mutagenecity Test Produres**, 2 nd Edition, Elsevier, Amsterdam, 495-529 (1984).

Perry, P.E., Wolff, S., “New giemsa method for the differential staining of sister chromatids”, **Nature**, 251 (5471): 156-158 (1974).

Rani, M.V.U., Rao, M.S., “In vitro effect of fenthion on human lymphocytes”, **B. Environ. Contam. Tox.**, 47: 316-320 (1991).

Robach, M.C., “Use of Preservatives to Control Microorganisms in Food”, Fourth Edition, **Food Technology**, 81-84 (1980).

Rydberg, G., Johanson, K.J., “DNA Repair Mechanism”, **Academic Press**, Newyork, 465-468 (1978).

Saldamlı, İ., “Gıda Katkı Maddeleri ve İçeriyentler”, **Önder Matbaası**, Ankara, 1-197 (1985).

Saldamlı, İ., Uygun, Ü., “Gıda Kimyası/Gıda Katkı Maddeleri”, **Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları**, Ankara, 533-547 (2005).

Sandberg AA., “Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia”, **Mutat. Res.**, 247 (2): 231-240 (1991).

Sardaş, S., “Micro gel electrophoresis assay (comet test) for detecting DNA damage in individual cells”, **J. Fac. Pharm.**, Gazi, 13 (1): 65-73 (1996).

Sardaş, S., Karakaya, A.E., “Clastogenicity test; sister chromatid exchange”, **J. Fac. Pharm.**, Gazi, 7 (2): 91-104 (1990).

Sardaş, S., Walker, D., Akyol, D., Karakaya, A.E., “Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers newborn infants using the single cell gel electrophoresis technique”, **Mutat. Res.**, 335: 213-217 (1995).

Sarıkaya, R., “Sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat’ın genotoksik etkisinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-110 (2005).

Sarıkaya, R., Çakır, Ş., “Genotoxicity of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test”, **Environ. Toxicol. Phar.** 20 (3): 424-430 (2005).

Sarıkaya, R., Solak, K., “Benzoik asitin *Drosophila melanogaster*’ de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksitesinin araştırılması”, **Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi**, 23 (3): 19-32 (2003).

Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., “The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives”, **Mutat. Res.**, 519 (1-2): 103–119 (2002).

Sasiadek, M., Schlade, K., Busza, H., Czemarmazowicz, H., Stembalska, A., “Classical and molecular cytogenetics in analysis of diepoxybutane-induced chromosome aberrations”, **Mutat. Res.**, 419 (1-3): 155-161 (1998).

Savage, J.R.K., “Update on target theory as applied to chromosomal aberrations”, **Env. Mol. Mutagen.**, 22 (4): 198-207 (1993).

Schiffmann, D., Schlatter, J., “Genotoxicity and cell transformation studies with sorbates in Syrian Hamster embryo fibroblasts”, **Food Chem. Toxicol.**, 30 (8): 669-672 (1992).

Schlatter, J., Wurgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Holliger, E., Graf, U., “The potential genotoxicity of sorbates: Effects on cell cycle *in vitro* in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*”, **Food Chem. Toxicol.**, 30 (10): 843-851 (1992).

Shibuya, T., Morimoto, K., “A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea”, **Mutat. Res.**, 297: 3–38 (1993).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, **Exp. Cell Res.**, 175: 184-191 (1988).

Sofos, J.N., “Antimicrobial activity and functionality of reduced sodium chloride and potassium sorbate in uncured poultry products”, **J. Food Sci.**, 51(1): 16-19 (1986).

Speit, G., Haupter, S., "On the mechanism of differantial giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted Chromosome, II. Differences between the demonstration of sister chromatid differantiation and replication patterns", *Hum. Genet.*, 70: 126-129 (1985).

TC. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, "Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği", *T.C. Resmi Gazete*, Sayı: 20541 (1990).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., "Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3): 206–221 (2000).

Tucker, J.D., Preston, R.J., "Chromosome aberations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assesment", *Mutat. Res.*, 365 (1-3): 147-159 (1996).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, *T.C. Resmi Gazete*, Sayı:23172, 1-220 (1977).

Türkoğlu, Ş., "Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*", *Food Chem. Toxicol.* 46 (6): 41-2035 (2008).

Türkoğlu, Ş., "Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.", *Mutat. Res.*, 626 (1-2): 4-14 (2007).

Van't Hof, J., "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems", *Exp. Cell. Res.*, 51 (1): 167-176 (1968).

Walker, R., "Toxicolgy of sorbic acid and sorbates", *Food Addit. Contam.*, 7 (5): 671-676 (1990).

Warth, A.D., "Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide", *J. Food Prot.*, 48 (7): 564-569 (1985).

Wolf, S., "Chromosomes in the assesmant of the effects of low levels of genotoxic agents" *Hum. Exp. Toxicol.*, 17: 625-632 (1998).

Yentür, G., Bayhan, A., "Bazı gıda maddelerinde sorbik asit ve benzoik asit miktarlarının araştırılması", *Gıda*, 15 (2): 79-82 (1990).

Yentür, G., Gürel, H., Orman, M., Bayhan, A., "Ankara piyasasından sağlanan bazı gıda maddelerinde sorbik asit ve benzoik asit miktarlarının gaz kromatografisi yöntemi ile araştırılması", *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 42: 451-455 (1995).

Yılmaz, S., “Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 36-76 (2008).

Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., “Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on *Allium* chromosomes”, **Fresen. Environ. Bulletin**, 17 (8a): 1029-1037 (2008a).

Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., “Clastogenic effects of food additive citric acid in human peripheral lymphocytes”, **Cytotechnology**, 56 (2): 137-144 (2008b).

Yurttagül, M., “Hızlı Hazır Yemek Fast Food Sisteminde Kullanılan Katkı Maddeleri”, Akdağ F., Arslan P(Ed):Hızlı Hazır Yemek Sistemi (Fast Food). **Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını**, No:6, Ankara (1993).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, **Mutat. Res.**, 604 (1-2): 53-59 (2006).

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., “Genotoxicity testing of flucanazole *in vivo* and *in vitro*”, **Mutat. Res.**, 649 (1-2): 155-160 (2008).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MAMUR, Sevcan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 22.06.1983, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 e-mail : sevcanmmr@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Dr. Şerafettin Tombuloğlu Süper Lisesi	2001

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A) Özeti Basılmış Ulusal Kongre Tebliğleri

1. **Mamur, S.**, Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. Potasyum Sorbatın Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozomal Anormallik ve Comet Testleri ile Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.