

**SODYUM BENZOAT VE POTASYUM BENZOAT'IN İNSAN
PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Nazmiye ZENGİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2009
ANKARA**

Nazmiye ZENGİN tarafından hazırlanan SODYUM BENZOAT VE POTASYUM BENZOAT'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

DOÇ.DR. DENİZ 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.

NAZMİYE ZENGİN

SODYUM BENZOAT VE POTASYUM BENZOAT' IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nazmiye ZENGİN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2009

ÖZET

Bu çalışmada, gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum benzoatın *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferik kan lenfositlerinde, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, sodyum benzoat ve potasyum benzoatın mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. Sodyum benzoatın 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonları, potasyum benzoatın 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Her iki katkı maddesi de kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansında anlamlı ve doza bağlı bir artışa neden olmuştur. Mitotik indeks tüm uygulamalarda doza bağlı düşüş göstermiştir. Replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi, çalışmada kullanılan katkı maddeleri tarafından etkilenmemiştir. Comet testi sonuçlarına göre hem sodyum benzoat hem de potasyum benzoat hemen hemen tüm dozlarda kuyruk uzunluğunu ve kuyruk yoğunluğunu kontrole göre artırmıştır. Elde edilen bulgular, çalışmada kullanılan her iki katkı maddesinin de *in vitro* insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik, anöjenik ve sitotoksik etkili

olduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048

Anahtar Kelimeler : Sodyum benzoat, Potasyum benzoat, Kromozomal anormallik (KA), Kardeş kromatid değişimi (KKD), Mikronükleus testi (MN), Comet testi

Sayfa Adedi : 82

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

**ASSESSMENT OF THE GENETOXIC EFFECTS OF SODIUM BENZOATE
AND POTASSIUM BENZOATE IN HUMAN PERIPHERAL
LYMPHOCYTES
(M.Sc. Thesis)**

Nazmiye ZENGİN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
MAY 2009**

ABSTRACT

In this study, the *in vitro* genotoxic effects of sodium benzoate and potassium benzoate, which are used as an antimicrobial agent in foods, have been determined in human peripheral blood lymphocytes using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN) and comet assay. The effects of sodium benzoate and potassium benzoate on mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index were also investigated. 6,25; 12,5; 25; 50 and 100 µg/ml concentrations of sodium benzoate and 62,5; 125; 250; 500 and 1000 µg/ml concentrations of potassium benzoate were used. Both of the additives significantly increased the frequency of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in a dose dependent manner. Mitotic index was significantly decreased at all treatments dose dependently. Replication and nuclear division indices were not effected by the additives used. According to the comet assay results both sodium benzoate and potassium benzoate increased the comet tail intensity and comet tail length at almost all concentrations. It is concluded that sodium benzoate and potassium benzoate have clastogenic, mutagenic, aneugenic and cytotoxic

effects on human lymphocytes *in vitro*.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Sodium benzoate, Potassium benzoate, Chromosomal aberration (CA), Sister chromatid exchange (SCE), Micronucleus assay (MN), Comet assay

Page Number: 82

Adviser : Assoc. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında beni her konuda destekleyen, konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile beni yönlendiren hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımları ve dostukları ile her zaman yanımda olan hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a, Dr. Serkan YILMAZ'a, Araş. Gör. Gökçe TANER'e ve laboratuvarında çalışan Yüksek Lisans öğrencisi tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda hissettiğim babam S. Zeki ZENGİN, annem Fatma ZENGİN'e ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın bir bölümü, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2008-54 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.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	.xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	3
2.2. Gıda Katkı Maddelerinde Aranan Özellikler	4
2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları	4
2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımında Dikkat Edilecek Noktalar	5
2.5. Hangi Koşullarda Katkı Maddeleri İnsan Sağlığını Tehdit Eder?.....	6
2.6.Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	7
2.7. Koruyucular (Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri)..	9
2.8. Benzoik Asit (E-210)	9
2.9. Sodyum Benzoat (E-211).....	11
2.10.Potasyum Benzoat.....	13
2.11.Mutajenite Testleri	13
2.11.1. Kromozom Anormallik (KA) Testi.....	14

Sayfa

2.11.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) Testi	15
2.11.3. Mikronükleus (MN) Testi	16
2.11.4. Comet Testi	17
2.12.Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar	18
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	24
3.1.2. Test materyali	24
3.2. Metot	25
3.2.1. Preparatların hazırlanması	25
3.2.2. Preparatların boyanması.....	27
3.2.3. Kromozomal anormalliklerin (KA) saptanması	28
3.2.4. Kardeş kromatid değişimlerinin (KKD) saptanması.....	28
3.2.5. Mitotoik indeksin (Mİ) ve replikasyon indeksinin (Rİ) saptanması	29
3.2.6. Mikronükleusların (MN) saptanması	29
3.2.7. Nükleer bölünme indeksinin saptanması (NBI)	29
3.2.8. Comet testi	29
3.2.9. İstatiksel analizler	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Sodyum Benzoat Uygulaması	32
4.2. Potasyum Benzoat Uygulaması.....	43

	Sayfa
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sodyum benzoatın genotoksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalar.....	12
Çizelge 4.1. Sodyum benzoat uygulaması ile insan periferel lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	32
Çizelge 4.2. Sodyum benzoatın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	38
Çizelge 4.3. Sodyum benzoatın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	40
Çizelge 4.4. Sodyum benzoat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	42
Çizelge 4.5. Potasyum benzoat uygulaması ile insan periferel lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	44
Çizelge 4.6. Potasyum benzoatın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	49
Çizelge 4.7. Potasyum benzoatın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	52
Çizelge 4.8. Potasyum benzoat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	53

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Sodyum benzoatın yapısal formülü.....	24
Şekil 3.2. Potasyum benzoatın yapısal formülü.....	25
Şekil 4.1. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....	33
Şekil 4.2. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı.....	33
Şekil 4.3. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişim frekansı.....	38
Şekil 4.4. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı.....	39
Şekil 4.5. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı.....	40
Şekil 4.6. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu.....	43
Şekil 4.7. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....	44
Şekil 4.8. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı.....	45
Şekil 4.9. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişim frekansı.....	50
Şekil 4.10. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı.....	50
Şeki 4.11. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı.....	52
Şekil 4.12. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu.....	54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1 Sodyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri.....	34
Resim 4.2. Sodyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....	39
Resim 4.3. Sodyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler.....	41
Resim 4.4. Sodyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	42
Resim 4.5. Potasyum benzoat ile muamele izole edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri.....	45
Resim 4.6. Potasyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....	51
Resim 4.7. Potasyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler.....	53
Resim 4.8. Potasyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış 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
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribonükleikasit
KA	Kromozoamal anormallik
KKD	Kardeş kromatid değişimi
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
Rİ	Replikasyon indeksi

Kısaltmalar**Açıklama****BrdU**

Bromodeoksiüridin

SSC

Salin sitrat tamponu

DMSO

Dimetil sülfoksit

H₂O₂

Hidrojen Peroksit

EDTA

Etilendiaminotetra asetik asit

NaOH

Sodyum Hidroksit

NaCl

Sodyum Klorür

PBS

Fosfat Tamponu

S9

Karaciğer özütü

1. GİRİŞ

Gıda üretiminin sanayileşmesi, üretim miktarının artması, üretilen gıdaların uzun süre depolanma durumları, tüketicinin beğenisindeki değişimler ve gelişmeler, gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bu zorunluluk beraberinde gıda katkı maddelerinin yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Eski çağlardan beri kullanılan baharat, tuz, sirke ve şeker gibi maddelerin tat verme ve koruyucu olarak görev yapmaları bilinen bir durumdur. Bu doğal katkı maddelerinin yanı sıra bugün kimyasal olarak elde edilen ve kendilerine özgü özellikleri olan birçok yeni madde ortaya çıkarılmıştır [Oğan, 1996].

Gıda katkı maddeleri toplumun her kesimini beslenme ve sağlık açısından ilgilendirmektedir. Gıda katkılarının kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. M.Ö. 50 yılında, eski Romalılar tarafından sağlanan baharatların İngiltere’de ‘aroma’ verici olarak kullanıldığı bilinmektedir. 3500 yıl önce Mısırlılar gıda katkı maddesi olarak ‘renk maddelerini’ kullanmışlar ve ‘Khand’ adı verilen boyanmış şeker, ilk kez Büyük İskender’e Hindistan’dan Avrupa’ya döndüğünde hediye olarak sunulmuştur. Gıda katkı maddelerinin ticari anlamda ve endüstriyel biçimde kullanılışı 1945-1950’li yıllara rastlamaktadır. İzleyen yıllarda ise, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1956 yılında 40 ülkeyi kapsayan ve 114 yapay renk maddesi ile 50 doğal renk maddesini içeren listeleri yayınlarak kullanımına izin vermiş ve gıda sektöründe uygulamaya alınmasına yol açmıştır. Toplumların bilinçsiz ve teknolojiden yoksun olduğu dönemlerde bile gıdaları uzun süre saklamak, tat- koku ve görünümelerini daha çekici hale getirmek amacıyla gıda katkı maddeleri her zaman bir isteme bağlı olarak tüketilmişlerdir. Buna göre gıda katkı maddelerinin kullanılmasında üç temel kural yer almaktadır; birincisi, bilimsel araştırmalarda saptanan ve serbest listelerde yer alan dozlarda kullanılmalıdır. İkincisi, kullanımında mutlaka teknolojik gereklilik bulunmalıdır. Son olarak da tüketiciyi yanıltmamalı, ona bir takım yararlar sağlamalıdır [Saldamlı, 1998].

Gıda katkı maddeleri konusu son derece dinamik, gelişmelere açık, zaman içinde konuyla ilgili verilerin hızla değişebildiği bir kapsama sahiptir. Bu nedenle katkı

maddelerinin çağdaş teknoloji uygulayan, bilgili, bu konuda yetişmiş insan gücüne sahip endüstriler tarafından kullanılması insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından önemlidir [Saldamlı, 1998].

Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek miktarda kullanılsalar bile, bu maddelerin zaman içerisinde vücutta birikerek dokularda tahribata neden olabileceği, dolayısıyla insan sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit edebileceği göz önünde bulundurulması gereken önemli hususlardır. İşte bu risk nedeniyle gıda katkı maddeleri de dâhil olmak üzere çeşitli maddelerin mutajenik, klastojenik, aneugenik etkileri *in vivo* ve *in vitro* testlerle araştırılmaktadır. Yapılan bir çok araştırmada kimyasalların mutajenik etkileri ile kanser oluşturma riski arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır [Kaderlik ve ark., 1992]. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin kısa süreli genotoksisite testleriyle genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir.

İnsan periferik kan lenfosit kültürlerinde yapılan genotoksik incelemelerde, Uluslararası Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Teşkilatı (OECD) tarafından da kabul edilen ve yayınlanan kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile son yıllarda yaygınlaşmaya başlayan comet testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin tamamı, kimyasalların olası genotoksisitesinin belirlenmesinde güvenilir metodlar olarak bilinmektedir. Bu tez kapsamında sodyum benzoat ve potasyum benzoat gıda katkı maddelerinin *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferik kan lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet testleri kullanılarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri gıdaları hoş, çekici, lezzetli, besleyici, dayanıklı hale getirmek için katılan maddelerdir. Gıdalarda oluşturacağı bu etkilerin yanı sıra üretimde birçok kolaylık ve fayda sağlaması yönünden, gıda katkı maddeleri vazgeçilmez durumdadır. Ancak gıda maddeleri olanaklar elverdiği müddetçe doğal ve katkı içermeyen yapıda olması gerekir. Bu insan sağlığı açısından genel prensiptir [Oğan, 1996].

Gıda katkı maddelerinin birçok tanımı olmakla birlikte bu tanımların ortak noktası gıdaların raf ömrünü uzatması, daha dayanıklı hale getirilmesi, albenisinin artırılması daha lezzetli ve çekici kılınması sayılabilir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Kuruluşunun (FAO) tanımına göre, besine amaçlı olarak, az miktarda ilave edilen ve besin maddesinin görünüş ve depolama özelliklerini geliştirmek için kullanılan beslenme değeri olmayan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Altuğ ve arkadaşları 1990'da yapmış oldukları tanımda; tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama ve depolama aşamalarında gıdalara teknolojik amaçla katılan veya bu gıdaların içinde ya da yan ürünlerinde doğrudan veya dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddelerdir, şeklinde ifade etmişlerdir. En son şekliyle 16 Kasım 1997 ve 23172 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren “Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde” yer alan ifadesi ile katkı maddesi, tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul madde bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir [Bulduk, 2003].

Gıda katkı maddeleri ürüne olumlu yönde etki sağlarken bu kullanım amacı, hatalı ürünleri gizleme, başka bir gıdayı taklit etme, tüketiciyi aldatma yönünde kullanılamaz. Uygun miktarlarda ve alanlarda kullanılmadığı takdirde birçok olumsuzluklara yol açabilir. Bu olumsuzluklar gıdada oluşabileceği gibi insan sağlığını bozucu yönde de olabilir. Gıda katkı maddelerinin insanlarda alerjik, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri ortaya çıkabilir. Hatta doğal katkı maddelerinin fazla miktarda tüketilmesi de insan sağlığı üzerinde olumsuzluklara yol açabilmektedir. Bundan dolayı ilgili yönetmeliklerde belirtilen alan ve kullanım dozunun dışına çıkılmamalıdır [Oğan, 1996].

2.2. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Özellikler

Gıda katkı maddelerinin ticari amaçlı kullanılabilmesi için bazı nitelikleri taşıması gereklidir. Gıda katkı maddelerini tam olarak tanıyabilmek ve onlardan istenilen amaca yönelik yararlanabilmek için bu niteliklerinin de bilinmesi gerekir. Bu nitelikler;

- a) Tüketici açısından zararsız olduğunun bilinmesi ve kullanılma miktarının yasalarla belirtilmiş olması gerekir.
- b) Gıda maddesinin besleyici değerini ve kalitesini düşürmemelidir.
- c) Yetkili kurumlarca saptanmış olan bütün teknik özellikleri yapısında taşınmalıdır.
- d) Kompleks olmayıp basit yapıda olmalıdır.
- e) İmalatçı tarafından rahatlıkla satın alınabilmesi için pahalı olmamalıdır.
- f) Reaksiyon alanı geniş olmalı ve içine konduğu gıdanın yapısına homojen olarak dağılabilmelidir [Bulduk, 2002].

2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları şu şekilde sıralanabilir:

- 1-Gıda maddesinin besin değerini yerinde tutarak, korumak ve kalitesini yükseltmek,
- 2-Gıda maddesinin görünüşünü güzelleştirmek, düzeltmek ve korumak,

- 3-Özel beslenmek durumunda olan tüketicilere yönelik gıdalar için gerekli bileşimleri elde etmek,
- 4-Gıda maddesinin işlenmesi, üretimi, hazırlanması, ambalaj, depolama ve taşıma aşamalarına yardımcı olmak,
- 5-Gıda maddelerinin her türlü biyolojik değişimlere uğramasına engel olmak ve dayanıklılığını artırmak,
- 6-Gıda maddesinin organoleptik (renk, koku vb. duyuşsal) özelliklerini hileye kaçmadan düzelterek kullanım değerini artırmaktır [Bulduk, 2003].

2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımında Dikkat Edilecek Noktalar

Gıda katkı maddelerinin kullanımında şu noktalara dikkat edilmesi gereklidir:

- 1-Kullanılacak katkı maddeleri, yetkili kurumlarca hazırlanan ve insan sağığına zararlı olmadığı kesinlikle ifade edilen listelerden seçilmiş olmalıdır.
- 2-Saptanan ve belirtilen miktarlar dışında kullanılmamalıdır.
- 3-Herhangi bir gıda katkısının kullanılmasına izin verilmeden önce, eklenmesinin mutlaka zorunlu olup olmadığı belirlenmeli, meydana getireceğı etkinin ne olduğunu açıkça bilinmelidir.
- 4-Tüketiciyi yanlış bir düşünceye sevk edecek gıda katkı maddelerinin kullanılmamasına dikkat edilmelidir.
- 5-Her gıda katkı maddesinin en fazla kullanılabilecek miktarının bilinmesi ve zararsız dahi olsa gerekenden fazlasının kullanılmamasına dikkat edilmesi gerekir.
- 6-Zorunluluk olmadıkca katkı maddesi kullanılmamalıdır. Özellikle risk grupları ve çocuklar için üretilen gıdalarda daha da dikkatli davranılmalıdır.
- 7-Gıda katkı maddeleri, içinde yer aldığı gıdanın doğal besleyici niteliklerini bozmamalıdır.
- 8-Gıda katkı maddeleri, gıdanın görünüşünü ve özelliklerini tüketiciyi aldatacak derecede değiştirmemelidir.
- 9-Katkı maddesinin, gıdanın işlenmesi sırasında ürünü iyi yönde etkileyip etkilemediğine dikkat edilmelidir.

10-Katkı maddesinin kullanıldığı hallerde, gıda maddesinin çok sıkı bir kontrole tabi tutulması ve mevzuatta belirtilen koşullara uymayan imalatçıların cezalandırılması gerekir.

11-Tüketici olarak bileşim ve niteliği kesin olarak bilinmeyen gıdaların kullanılmasında çok dikkatli davranılması gerekir.

12-Gıda katkı maddelerinin herhangi bir gıdada kullanılması için, bu maddelerin gıda yasalarında onaylanmış olmasına, pozitif listede kullanımları ile ilgili noktaların ve miktarının belirtilmiş olmasına dikkat edilmelidir.

13-Pozitif listeye alınmamış katkı maddeleri, sağlığa zararsız olsalar ve kullanılmalarında teknolojik zorunluluk bulunsalar dahi kullanılmamalıdır.

14-Gıda katkı maddelerine ait pozitif listeler uluslararası gıda mevzuatında yer almasının dışında ulusal mevzuatlarda da kabul edilmiş olmalıdır [Bulduk, 2002].

2.5. Hangi Koşullarda Katkı Maddeleri İnsan Sağlığını Tehdit Eder?

Aşağıdaki koşullar altında katkı maddeleri sağlığı tehdit eder:

1-Pozitif listede veya GRAS (Generally Recognized As Safe-Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen) listesinde yer almıyorsa,

2- Belirlenen limitlerin üzerinde kullanılıyorsa,

3-ADI (Acceptable Daily Intake-Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) değeri dikkate alınmıyorsa,

4-Etiketinde uyarıcı bilgi taşımayan ve belli katkıları içeren bazı gıdaların bazı risk gruplarınca tüketilmesi halinde,

5-Katkı maddesi bazı safsızlıkları ve bulaşları içeriyorsa,

6-Eğitimsiz kişilerce teknolojisine uygun kullanılmaması halinde,

7-Bir ülkede bu konudaki kontrol mekanizmalarının iyileştirilememesi durumunda tüketiciler risk altındadır.

Bazı bilim adamları gıda katkı maddelerinden kaynaklanabilecek kanser riskinin çok az olduğu ya da olmadığı görüşündedir. Ancak bazı katkı maddeleri hakkında kuşku vardır. Belli katkıların tüketiminden sonra baş ağrısı, allerjik reaksiyonlar,

hiperaktivite gibi semptomlar rapor edilmektedir. Bu reaksiyonlar ile katkı maddeleri tüketimi arasında bir ilişki bilimsel olarak henüz kanıtlanamamıştır. Bu nedenle zaman içinde sağlık üzerinde olumsuz etkileri saptanan bazı gıda katkı maddeleri yasaklanmış hatta kullanımdan kaldırılmıştır [<http://undp.un.org.tr>].

2.6. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddelerine ilişkin çalışmalar ve bunların sınıflandırılmaları kronolojik bir sıralama içinde incelendiğinde, bu konu ile ilgili kavram, tanım ve sınıflandırmaların zaman içinde değişikliğe uğradığı ve sürekli bir gelişme içinde olduğu görülür. Bunun başlıca nedeni, gelişen teknoloji, bulunan yeni formülasyonlar ve üretimde kullanılan yeni hammadde gruplarıdır. Yapılmış olan sınıflandırmalarda gıda katkı maddeleri bazen kullanılma amacına göre, bazen de üretimde kullanıldığı gıdaya göre gruplandırılmaktadır.

Bu sınıflandırmaların bazıları aşağıda özetlenmiştir. Bunlardan OSER (1960)'e göre yapılan sınıflandırmada gıda katkı maddelerinin kullanılış amaçları hedef alınmıştır. Buna göre gıda katkı maddeleri;

- 1 - Besleyici nitelikte olanlar,
- 2 - Tazeliği koruyanlar,
- 3 - Duyusal nitelikliler,
- 4 - İmalat teknolojisinin gereğini yerine getiren maddeler.

Bir başka sınıflandırmada ise gıda katkı maddeleri;

- 1 – Renk maddeleri (renk verenler, renk koruyanlar, renk kuvvetlendiriciler)
- 2 – Aroma maddeleri (tat vericiler, tuz tadı verenler, baharat ve çeşni vericiler, asitler ve bazlar, koku verenler, aromayı geliştiriciler)
- 3 – Koruyucu maddeler (antimikrobiyaller, antioksidanlar, tütsü maddeler, kaplama maddeleri)

4 – Gıdanın yapı ve görünüşünü etkileyen maddeler (stabilizörler, emülgatörler, tamponlar, yüzey aktif maddeler, topaklaşmayı önleyici maddeler, olgunlaştırıcı tuzlar, kalınlaştırıcı maddeler, köpük yapıcı ve köpük tutucular, tutucu ve birleştirici maddeler, yumuşatıcı ve plastik yapı kazandıran maddeler, kristalleşmeyi önleyici maddeler, nemlendiriciler, berraklaştırma ve durultma maddeleri)

5 – Biyolojik değeri arttırıcı maddeler (vitaminler, mineral maddeler, aminoasitler)

Günümüzde FAO/WHO Birleşik Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesinin onayladığı listelerde ise gıda katkı maddeleri ait olduğu grubun adı alınarak sınıflandırılmaktadır.

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Renk maddeleri | 2. Olgunlaştırıcılar |
| 3. Tat koku maddeleri | 4. Tutucular ve birleştiriciler |
| 5. Koruyucular | 6. Berraklaştırıcı ve durultucular |
| 7. Asitler, bazlar, tuzlar | 8. Köpük yapıcı ve tutucular |
| 9. Kelatlar | 10. Plastifiyenler ve yumuşatıcılar |
| 11. Antioksidanlar | 12. Kabartıcı ajanlar |
| 13. Emülgatörler | 14. Polihidrik alkoller |
| 15. Tatlılaştırıcılar | 16. Gaz ve propellantlar |
| 17. Stabilizörler | 18. Enzimler |
| 19. Kalınlaştırıcılar | 20. Dolgu maddeleri |
| 21. Yüzey Aktif Maddeleri | 22. Vitaminler, mineraller, aminoasitler |
| 23. Nemlendiriciler | 24. Kristallenmeyi önleyenler |
| 25. Topaklaşmayı önleyiciler | 26. Tamponlayıcılar |
| 27. Kaplama maddeleri | 28. Yağla yer değiştiren maddeler |
| 29. Tütsü maddeleri | 30. Kontrollü salınım ajanları |
| 31. Ağartıcılar | 32. Mikrodalga esmerleşme ajanları |

[Saldamlı, 1998]

2.7. Koruyucular (Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri)

Gıda endüstrisinde uygulanan gıda işleme ve saklama yöntemleri birbirini izleyen sürekli bir gelişim göstermiştir. Birbirinden farklı ısı işlemleri ile dondurma, kurutma ve ışınlama gibi tekniklerin ortaya çıkışı bu gelişmenin örnekleridir. Bu olanaklara sahip gıda teknolojisinin temel amacı gıda bozulmalarını önlemek, gıda güvenliğini sağlamak böylece gıdada yer alan mikroorganizmaları kontrol altına almaktır. Bilindiği gibi ısı işlemleri mikroorganizmaların vejetatif formları ve sporları öldürülerek steriliteye ulaşılmaktadır. Ancak yüksek sıcaklıkta gıdanın besleyici öğeleri önemli oranda kayba uğramaktadır. Bu nedenle ürüne katkı maddeleri eklenerek mikrobiyal aktivitenin azaltılmasının en büyük avantajı, ambalajı açıldıktan sonra bozulmadan uzun süre kullanılabilmesidir [Saldamlı,1998].

Sıkça kullanılan antimikrobiyal maddeler; benzoik asit ve Na, K tuzları (E210), sorbik asit ve Na, K ve Ca tuzları (E200), kükürt dioksit (E220) ve diğer kükürtlü bileşikler (sodyummetabisüfit, E223 gibi), sodyum nitrit, sodyum nitrat gibi maddeler sayılabilir [Bulduk,2003].

2.8. Benzoik Asit (E-210)

Benzoik asit beyaz renkli, katı ve kendisine has kokusu olan bir maddedir. Sinonimleri Benzenecarboxylic acid ve Phenylcarboxylic acid'dir. Kimyasal formülü $C_7H_6O_2$ olup moleküler ağırlığı 122,13 gr'dır. Benzoik asit meyva suları, şuruplar, gazlı içecekler, ketçap, turşu, margarin, sofralık zeytin, kakaolu mamuller, bisküvi, gofret, kek ve kremler gibi bir çok üründe küf, maya ve bakteri faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkan bozulmaları önlemek amacıyla kullanılır. Benzoik asidin gıdalarda kullanıldığı doz aralığı 150-1000 mg/kg'dır [Sarıkaya ve Solak, 2003].

Benzoik asitin genotoksik etkilerini inceleyen çeşitli araştırmalar vardır. Tohda ve ark. (1980), benzoik asitin insan lenfoblastoid hücrelerindeki etkisini araştırmışlardır. 30 mM'lık konsantrasyonda benzoik asitin sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir [Tohda ve ark., 1980].

Ishidate ve arkadaşları (1984), benzoik asitin genotoksik etkilerini *Salmonella*/mikrozom testi ve *in vitro* Çin hamsteri fibroblast hücrelerinde kromozom anormalliği testini kullanarak belirlemişlerdir. Benzoik asitin AMES testinde (maksimum doz 10 mg/plate) negatif sonuç verdiğini kromozom anormalliği testinde (maksimum doz 1.5 mg/ml) ise zayıf genotoksik etkili bir madde olduğunu tespit etmişlerdir [Ishidate ve ark., 1984]. Zeiger ve ark. (1988) *Salmonella. typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537'lik suşlarında benzoik asitin genotoksik etkilerini araştırmışlar ve benzoik asitin 5000 µg/petri üzerinde sitotoksik etkili olduğunu saptamışlardır [Zeiger ve ark., 1988].

Sasaki ve arkadaşları (2002), benzoik asitin (2000 mg/kg) genotoksik etkisini comet testi ile 8 farklı fare organında (mide, idrar kesesi, beyin, karaciğer, böbrek, akciğer, kolon, kemik iliği) incelemişlerdir. Araştırma sonucunda benzoik asitin çalışılan fare organlarında DNA hasarına neden olmadığını saptamışlardır [Sasaki ve ark., 2002].

Sarıkaya ve Solak (2003), SMART testi ile *Drosophila melanogaster*'de benzoik asitin genotoksik etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, benzoik asitin 50, 75 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarında *Drosophila melanogaster*'de mutasyonlarda artışa neden olduğu, yaşam süresi üzerinde önemli oranda etkili olduğu ve kontrole göre yaşam süresini kısalttığını belirtmişlerdir [Sarıkaya ve Solak, 2003].

Özdemir (2006), benzoik asitin mutajenik etkisini *in vitro* mikronükleus testi ile incelemiştir. Benzoik asitin her iki dozunun (0,1 mg/ml; 0,3 mg/ml) kontrolden farkı görülmediğini, ancak bu iki doz kendi içinde değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlendiğini bildirmiştir [Özdemir, 2006].

Yılmaz ve ark. (2008a), benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 mg/L konsantrasyonlarının sitogenetik etkilerini *A. sativum* kök ucu hücrelerinde incelemişlerdir. Bu amaçla *A.sativum*'un kök ucu hücreleri benzoik asit ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiş ve 48 saatlik muamele edilen gruba 24 saatlik iyileştirme periyodu uygulanmıştır. Sonuç olarak benzoik asitin 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde kromozomal ve mitotik anormallik frekansını arttırdığını

saptamışlardır. Bu anormallikler C-mitoz, yapışıklık, kalgın kromozom, fragment, köprü, dağınık profaz, düzensiz metafaz ve multipolar anafazdır. İyileştirme periyodunda benzoik asitin oluşturduğu anormalliklerin düzelmediği, mitotik indeksin ise iyileştirme grubunda kontrolle aynı seviyeye yükseldiği belirlenmiştir [Yılmaz ve ark., 2008a].

Yılmaz (2008), kültüre alınmış insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA) testi, kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, mikronükleus (MN) testi ve izole edilmiş lenfositlerde comet testini kullanarak benzoik asitin etkisini incelemiştir. Sonuç olarak benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında; kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus frekansı ve primer DNA hasarını hemen hemen tüm dozlarda kontrole göre anlamlı oranda arttırdığını saptamıştır [Yılmaz, 2008].

2.9. Sodyum Benzoat (E211)

Sodyum benzoat gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan benzoik asitin sodyum tuzudur. Gıda katkıları listesinde E211 olarak kodlanmıştır. Gazlı içeceklerde, meşrubatlarda, turşularda, ketçap ve çeşitli soslarda, marmelat ve reçellerde, margarinde, zeytin üretiminde, işlenmiş balık ürünlerinde, şekerlemelerde ve diş macununda sıklıkla kullanılan bir koruyucu katkı maddesidir. Araştırmamızda genotoksik etkilerini belirlemeyi amaçladığımız bu katkı maddesinin canlılar üzerindeki etkileri çeşitli test sistemlerinde incelenmiştir. Çizelge 2.1.'de bu araştırmalar ve sonuçları verilmiştir. Bu araştırmaların dışında sodyum benzoatın (100 mg/kg) fare dermal ve ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon etkisi transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. Hem dermal bağ dokusu mast hücrelerinde, hem de ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon tespit edilmiştir [Kalender, 1997]. Sodyum benzoat ile muamele edilen sıçan ve ratlarda yapılan çeşitli çalışmalarda bu maddenin üreme ve gelişim toksisitesine sebep olmadığı belirlenmiştir [Nair, 2001].

Bateman ve ark. (2004), üç yaşındaki çocukların diyetlerine katılan kimyasal renklendirici ve koruyucuların (sodyum benzoat) hiperaktif davranışa yol açıp açmadığını belirlemek amacıyla araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada çocuklar dört gruba ayrılmıştır. Çocuklara başlangıçta bir hafta kimyasal renklendirici ve koruyuculardan arındırılmış gıda uygulanmış ve sonra üç hafta boyunca rastgele seçilen gruplara ayrı ayrı günlük 20 mg renklendirici, 45 mg koruyucu (sodyum benzoat) verilmiştir. Çalışmanın sonunda kimyasal renklendirici ve koruyucuların diyetten çekilmesiyle hiperaktif davranışlarda anlamlı bir azalma, bu maddelerin verilmesiyle yine anlamlı bir artış ortaya çıktığını açıklamışlardır [Bateman ve ark., 2004].

Çizelge 2.1. Sodyum benzoatın genotoksitesiyle ilgili yapılan çalışmalar

Araştırma	Sonuç	Kaynak
Rat kemik iliği/KA 50, 500 and 5000 mg/kg	-	Litton Bionetics, 1974
Çin hamsteri/KKD 1, 2, 5 ve 10 mM	+ (≥ 2 mM)	Abe ve Sasaki, 1977
Çin hamsteri/KA 2.00 mg/ml (138.8×10^{-4} M)	+	Ishidate ve Odashima, 1977
<i>Vicia faba</i> kök ucu hücrelerinde/KA ve MI	+	Njagi ve Gopalan, 1982
AMES ve Çin hamsteri/KA (3 mg/plate) ve (2 mg/ml)	-/+	Ishidate ve ark., 1984
AMES TA97, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 5000 µg/plate	+	Zeiger ve ark., 1988
<i>Vicia faba</i> kök ucu hücrelerinde ve İnsan lenfosit hücrelerinde/KKD 10^{-2} M	+	Xing ve Zhang, 1990
AMES TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538; <i>E.coli</i> WP2 0,0033-10 mg/plate	-	Prival ve ark., 1991
Fare organları/Comet testi >2000 mg/kg	-	Sasaki ve ark., 2002
<i>In vitro</i> /MN 0,1; 0,3 ve 0,8 mg/ml	-	Özdemir, 2006
<i>A. cepa</i> / CA 20-100 µg/mL	+	Türkoğlu, 2007
İnsan lenfositlerinde/KKD 8 -0,02mM	+ (8 mM)	Mpountoukas ve ark. 2008

AMES: *Salmonella* mikrozom testi, KA: Kromozomal anormallik, KKD: Kardeş kromatid değişimi, MN: Mikronükleus, MI: Mitotik indeks

Bütün bu verilerin ışığında sodyum benzoatın genotoksik etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar olduğu anlaşılmaktadır. Araştırmamızda bu katkı maddesinin genotoksik etkileri ile ilgili detaylı bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır.

2.10. Potasyum Benzoat (E212)

Benzoik asitin diğer bir tuz hali olan potasyum benzoat da sodyum benzoat gibi antimikrobiyal gıda katkı maddesidir. Gıda katkıları listesinde E212 olarak kodlanmıştır. Meyve sularında ve asitli içeceklerde yaygın olarak kullanılır. Potasyum benzoatın sodyum benzoattan farkı, çözünürlüğünün düşüklüğü ve aynı antimikrobiyal etkinin alınması için iki katı kadar dozda kullanılması gerekliliğidir.

Bu katkı maddesinin genotoksik etkileri ile ilgili çok az çalışmaya rastlanmıştır. Vernole ve ark. (1987), benzoik asitin potasyum tuzunun *in vitro* sitogenetik etkilerini incelemişlerdir. 2'den 500 mikrogram/ml 'ye kadar olan konsantrasyon aralığı test edilmiştir. Çalışma sonucunda doza bağlı olarak kromozom kırıklarının arttığı belirlenmiştir [Vernole ve ark., 1987].

Vernole ve ark. (1988), yapmış oldukları diğer bir çalışmada benzoik asitin potasyum tuzunun insan lenfosit hücrelerinde klastojenik potansiyeli incelenmiştir. 2 ile 500 µg/ml konsantrasyonlar uygulanmıştır. KKD değerleri 200 µg/ml'lik dozdan sonra anlamlı bir biçimde ve doza bağlı olarak artmıştır. Ayrıca KKD frekanslarının kromozom kırıklarında olduğu kadar belirgin şekilde artış göstermediğini saptamışlardır [Vernole ve ark., 1988].

2.11. Mutajenite Testleri

Çevremizdeki çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlerin meydana getirdiği genetik hasarın düzeyi ve insan sağlığı üzerine etkileri bakteri, *Drosophila*, *in vivo* ve *in vitro* memeli hücreleri veya bitkilerin kullanıldığı çeşitli test sistemleriyle belirlenebilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri, insan lenfosit

kültürleridir [Krishnaja ve ark., 2003; Maurich ve ark., 2004; Bhattacharya ve ark., 2004].

İnsan lenfositlerinde, kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimi analizleri ve mikronükleus testi en sık kullanılan mutajenite testleridir. Kromozomal aberasyonlar, insanların genotoksik ajanlara maruziyetinin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir [Obe ve ark., 2002]. Genotoksisite çalışmaları, kromozomal anormalliklerin kanser oluşumunun erken ve dikkat çekici bir habercisi olabileceğini göstermektedir [Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark. 1998]. Kardeş kromatid değişimi analizleri de hızlı ve hassas bir test olması bakımından tercih edilmektedir. Kardeş kromatid değişim frekansında artış olması, kalıcı DNA hasarının göstergesi olarak düşünülmektedir [Palitti ve ark., 1982]. Mikronükleus testi de genotoksik kimyasalları saptamada kullanılan metotlardandır. Mikronükleuslar hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kaybını göstermektedir. Bu nedenle *in vitro* mikronükleus testi, mutajenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir [Fenech, 2000]. Genlerde DNA molekülleri ile toksik ajanların etkileşmesi sonucu oluşan genotoksisiteyi belirlemede kullanılan diğer bir yöntem ise comet tekniğidir. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet tekniği, memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek amacıyla kullanılan hızlı, basit ve duyarlı bir tekniktir. Bu teknik, genetik toksikolojide birçok alanda kullanılmaktadır [McKelvey-Martin ve ark., 1993].

2.11.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallikler, kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Kromozomal anormalliklerin çoğu hasar görmüş olan kromozomların tamir edilememesi veya yanlış tamiri ya da mitoz veya mayozda kutuplara göç sırasında oluşan anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda, insanlarda kromozomal anormallik frekansındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir [Hagmar ve ark., 1998; Ji ve ark, 2001; Bolognesi, 2003].

Kromozomal değişimler ilk 1930'larda Karl Sax ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Hsu'nun hipotonik solusyon uygulaması insan kromozomlarının kusursuz şekilde analiz edilmesini sağlamıştır. İlk kullanımı klinik teşhis amacıyla olmuştur. Birkaç yıl içinde, kromozomlardaki yapısal anomalilerin, iyonizan radyasyona maruziyetin ölçülmesinde, kısa süre sonra da kimyasalların klastojenik aktivitesini değerlendirmede kullanılmaya başlanmıştır [Tucker ve Preston, 1996]. Kullanılan fiziksel ve kimyasal ajanların etkisine göre kromozom sayısında ve yapısında değişimler meydana gelmektedir. Bunlar kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar gibi yapısal ve poliploidi gibi sayısal kromozom anormallikleridir [Dean ve Danford, 1984; Natarajan, 2002; Mateuca ve ark., 2006]. Kültüre alınmış periferik kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon sıklıklarının belirlenmesi mesleki ya da şüphelenilen genotoksik maddelere maruziyeti ya da maruziyetin biyolojik etkilerini değerlendirmede en fazla kullanılan yöntemdir. Genetik hasarın boyutunu saptar [Forni, 1994; Sivikova ve Dianovsky 1999].

2.11.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimi mutajenite ve karsinojenitenin saptanmasında kullanılan en etkili metotlardan biridir. Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinde kromatidlerin kırılan parçaları yer değiştirdikten sonra yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır [Carrono ve Natarajan, 1988]. Bir kimyasalın KKD frekansında artışa neden olması, onun replikasyon mekanizmasını etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir. Klastojenlerin ve klastojenik aktivitenin belirlenmesinde KKD testi hassas bir metottur [Stanimirovic ve ark., 2005]. KKD ilk kez McClintock tarafından 1938'de keşfedilmiş ve DNA replikasyonunun semikonservatif (yarı saklı) dublikasyonunu tanımlayan Taylor ve arkadaşları tarafından (1957) klasik deneyler kullanılarak gösterilmiştir [Raposo ve ark., 2004]. Timidin analoğu olan BrdU'nin, kardeş kromatidler arasında farklı boyanmaya neden olduğunun belirlendiğı 1970'li yıllarda, KKD çalışmalarında büyük artış olmuştur. Mitoz bölünme sırasında oluşan kardeş kromatid

değişimlerinin frekansında meydana gelen artışlar, genotoksisitenin değerlendirilmesinde ve DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan sitogenetik belirleyicilerden biridir [Bolognesi, 2003].

2.11.3. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleuslar, spontan olarak ya da genotoksik maruziyete yanıt olarak, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da bütün kromozomların hücre bölünmesi sırasında yavru çekirdek şeklinde ana çekirdek dışında kalmasından oluşmaktadır [Flack ve ark., 1997]. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, klastojenik aktivite sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara çekilmeyerek, hücre bölünmesi sonunda aynı sitoplazma içinde, hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar [Högstedt, 1984; Fenech, 1993].

Mikronükleus yöntemi ilk olarak 1886 yılında Howell'ın anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde gözlemesiyle ortaya çıkmıştır. 1907'de Jolly mikronükleusun varlığını doğrulamıştır. Bu yüzden mikronükleuslar Hematolojide Howell-Jolly cisimleri olarak bilinirler [Anwar ve ark., 1994]. 1976 yılında Countryman ve Heddle insan lenfositlerinde mikronükleus yöntemini genotoksik hasarın belirlenmesi için metafaz analizine alternatif olarak önermiştir. Yöntemin kabul görmesi yavaş olmuştur, çünkü değerlendirmeye alınan hücrelerin bölünme geçirip geçirmediğini saptamak güçtür. Mikronükleus yönteminde sitokinezi durdurmak amacıyla sitokalsin B (Cyt B) adlı kimyasalın 1985'de Fenech ve Morley tarafından kullanılmasıyla ilk bölünmesini geçirmiş mitotik hücrelerin binükleer görüntülerinin tanınabilmesi bu zorluğun üstesinden gelinmesini sağlamıştır [Parry ve ark., 1997]. Mikronükleuslar hem klastojenik hem de anöjenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir [Radack ve ark., 1995]. Günümüzde mikronükleus metodu; genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin basit morfolojik

ölçütler kullanılarak değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır [Fenech, 2000 ve 2006].

2.11.4. Comet testi

Tek hücre jel elektroforez testi (SCGE) (comet testi), DNA hasarını ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metottur [Singh ve ark., 1988; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Garry ve ark., 2003; Poletta ve ark., 2008]. Bu metodun özelliği, kırılan DNA moleküllerinin, bir elektrik alanında, bozulmamış DNA moleküllerine nazaran daha hızlı hareket etmelerine dayanmaktadır. Hücreler bir agaroz jele gömülür ve daha sonra proteinleri uzaklaştırmak için lize edildiğinde, küçük DNA molekülleri, ana çekirdeği geride bırakarak ileri doğru hareket eder. DNA, floresan bir boya (örn, etidium bromür, propidium iodür veya DAPI) ile boyanıp, floresan bir mikroskop altında incelendiğinde, gözlenen objeler, baş kısmında hasar görmemiş DNA ve kuyruk kısmında kırık DNA'ları taşıyan bir kuyruklu yıldıza benzemektedir. İleriye gidebilen DNA miktarı ve göçün mesafesi, bu hücrede bulunan DNA ipliğindeki kırıkların sayısı ile orantılıdır. DNA hasarı yüksek olan hücrelerde, kromozomal DNA, hücre çekirdeğinden anoda doğru büyük göç göstermektedir. Comet testinin alkalın versiyonunda, DNA tek zincir kırıkları, alkali labile bölgeleri (apürinik ve apürimidinik bölgeler), DNA-DNA/DNA-protein çapraz bağları ve çıkarmayla yapılan tamirler sırasında oluşan tek zincir kırıkları ayırt edilmektedir. Burada, DNA göçünün uzunluğu, hücredeki DNA hasarını göstermektedir [Singh ve ark., 1988]. Bu testin, diğer genotoksisite testlerine nazaran önemli avantajları, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını bile ayırt edebilmesi, her bir uygulamada az sayıda hücreye ihtiyaç göstermesi, değişik hücre ve dokulara uygulanıyor olması, hızlı sonuç elde edilebilmesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenmesidir [Olive ve ark., 1990; Fairbairn ve ark., 1995; Tice ve ark., 2000].

2.12. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar

Gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *in vitro* insan periferik lenfositleri yanında farklı test sistemleri de kullanılmaktadır. Bazı gıda katkı maddeleri ile yapılan genotoksisite çalışmaları aşağıdaki gibi özetlenebilir.

Kitano ve ark. (2002), potasyum sorbatın mutajenik etkisini askorbik asit ve Fe tuzu varlığında AMES testini kullanarak incelemişlerdir. Bu üç madde beraber kullanıldığında *Salmonella typhimurium*'un TA98 (S9 mix varlığında veya S9 mix yokluğunda) ve TA100 (S9 mix varlığında) suşlarında mutajenik etkili olmadığı, buna rağmen TA100 (S9 mix yokluğunda) suşunda doza bağlı bir mutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Fakat bu maddeler ayrı ayrı kullanıldığında herhangi bir mutajenik etki göstermediğini tespit etmişlerdir [Kitano ve ark. 2002].

Ferrand ve ark. (2000), gıdalarda koruyucu bir madde olarak kullanılan kalsiyum sorbatın HeLa hücreleri ve AMES ile yapılan genotoksisite çalışmaları bu maddenin mutajenik olmadığını göstermiştir [Ferrand ve ark., 2000].

Akın ve Sümer (1991), gıda katkı maddesi olan sodyum nitritin mutajenik etkisini AMES testini kullanarak sıçan karaciğer fraksiyonunun (S9) bulunduğu ve bulunmadığı ortamlarda incelemişlerdir. Bu maddenin *Salmonella typhimurium*'un TA1535 suşu için mutajen, TA100 suşu için zayıf mutajen olduğu tespit etmişlerdir [Akın ve Sümer, 1991].

Münzner ve ark. (1990), potasyum sorbat ve sodyum sorbatın genotoksik etkilerini, *Salmonella*/mikrozom testi, Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde HGPRT (hipoksantin guanin fosforibozil transferaz) ve KKD, fare ve Çin hamsteri kemik iliği hücrelerinde MN ve Çin hamsterinde KA ve KKD test yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Her iki maddenin de *in vitro* testlerde herhangi bir etki göstermediği görülmüştür. Potasyum sorbatın taze hazırlanmış ve bekletilmiş çözeltileri *in vivo* çalışmalarda herhangi bir etki göstermezken, sodyum sorbatın bekletilmiş solüsyonu

zayıf klastojenik etki göstermiştir. Bununla birlikte taze hazırlanmış sodyum sorbat çözeltisi herhangi bir etki göstermemiştir [Münzner ve ark., 1990].

Basler ve ark. (1987) tarafından, propionik asit ile yapılan bir çalışmada, bu maddenin *E. coli*'de DNA tamir testleri dışında, SOS chromo testi, *Salmonella*/mikrozom testi, *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi ve *in vivo* mikronükleus testinde negatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir [Basler ve ark. 1987]. Ohara ve ark. (1988), propionik asitin 160 µg/petri konsantrasyonunda, AMES'de mutasyon frekansını artırdığını belirtmişlerdir [Ohara ve ark. 1988]. Surjan (1989), bu maddenin *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğunu belirlemiştir [Surjan, 1989].

Ishidate ve ark. (1984), 190 sentetik, 52 doğal kaynaklı olmak üzere toplam 242 tane gıda katkı maddesinin genotoksik etkilerini, AMES ve *in vitro* Çin hamsteri fibroblast hücrelerinde KA testini kullanarak tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışılan katkı maddelerinden 3 tanesinin sadece AMES testinde, 43 tanesinin sadece Çin hamsteri fibroblast hücrelerinde ve 11 tanesinin ise her iki test yönteminde de pozitif etkili olduğu saptanmıştır [Ishidate ve ark., 1984].

Gıda katkı maddeleri olarak kullanılan sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitratın genotoksik etkileri *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile incelenmiştir. Bu dört gıda katkı maddesinin 50, 75 ve 100 mM'lık dozlarının genotoksik etkili olduğunu saptamışlardır. Çalışmada en çok rastlanılan mutasyon tipinin small single spots tipi mutasyonlar olduğu ve doz artışına bağlı olarak mutasyon frekansının arttığı açıklanmıştır [Sarıkaya ve Çakır, 2005].

Bir başka çalışmada, sodyum propiyonat, kalsiyum propiyonat ve potasyum propiyonatın genotoksik etkileri *A. cepa* kromozomlarında incelenmiştir. Bu maddelerin 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg/mL'lik konsantrasyonları kök uçlarına 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulamıştır. Araştırmacı bu maddelerin üçünün de mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğünü, kromozomal anormallik frekansını da

önemli oranda artırdığını belirlemiştir. Bu maddelerin etkisiyle c-mitoz, anafaz köprüleri, mikronükleus, yapışıklık, kalgın kromozomlar ve kromozom kırıklarına rastlanmıştır [Türkoğlu, 2008].

Borik asit, potasyum sorbat, sitrik asit ve sodyum sitratın genotoksik etkileri *A. cepa* kök ucu hücrelerinde incelenmiştir. Bu maddelerin 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları kök uçlarına 5, 10 ve 20 saat süre ile uygulanmıştır. Mitotik indeksteki düşüş, genel olarak uygulanan maddenin konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak gerçekleşmiştir. Anormallik frekansları, uygulanan maddenin dozu ve süresi arttıkça artış göstermiştir. Çalışmada uygulanan maddeler anafaz köprülerine, C-mitoza, mikroçekirdek oluşumuna, geri kalmış kromozomlara, yapışıklığa, çeşitli kırıklara ve eşit olmayan dağılımlara neden olmuştur [Türkoğlu, 2007].

Jos ve ark. (2005), bütillendirilmiş hidroksi anisolün *A. cepa*'da büyüme ve mitotik indeks üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da, bu maddenin 194 µM'lık konsantrasyonunun 72 saatlik uygulamasında *A. cepa*'nın gelişimini %50 oranda azalttığı ve 283 µM'lık konsantrasyonunun 48 saatlik uygulamasında, mitotik indeksi önemli düzeyde düşürdüğü saptanmıştır [Jos ve ark., 2005].

Macioszek ve Kononowicz (2004), quinoline sarısı ve brilliant siyahının *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde uygulanan tüm dozlarda (8,67; 86,7 ve 867 mg ml⁻¹) mikronükleus frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığını ve mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğünü saptamışlardır. Ayrıca bu iki maddenin, primer DNA hasarını önemli oranda artırdığı comet tekniği kullanılarak belirlenmiştir [Macioszek ve Kononowicz, 2004].

Roychhoudhury ve Giri (1989) Fast green FCF, indigo karmin, oranj G, tartrazin ve metanil sarısının genotoksik etkilerini *A. cepa* kromozomlarında incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan gıda boyalarının tamamının poliploid hücre oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu maddelerin yüksek dozlarının kromozom kırıklarına ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Kullanılan bu

maddelerin arasında en fazla etkinin metanil sarısı ve Fast green FCF tarafından oluşturulduğu gözlenmiştir [Roychoudhury ve Giri, 1989].

Njagi ve Gopalan (1982), *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde yapmış oldukları inceleme sonucunda sodyum sülfidin doza bağlı olarak mitotik indekste azalmaya, dozun artmasına bağlı olarak kromozomal anormalliklerde artışa sebep olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca anafaz safhasında köprü oluşumunu indüklediği ve interfaz nükleusunda kromatin erozyonuna neden olduklarını saptamışlardır [Njagi ve Gopalan, 1982].

Farombi ve Onyema (2006), gıdalarda aroma arttırıcı olarak kullanılan monosodyum glutamatın, ratlarda genotoksik etkilerini ve C vitamini, E vitamini ve quercetin'in koruyucu rolünü araştırmışlardır. Monosodyum glutamat 4 mg/g dozda karaciğer, böbrek ve beyinde oksidatif hasara neden olmuştur fakat C ve E vitaminleri ve quercetin bu hasarın oluşumunu inhibe etmişlerdir. Yine bu madde kemik iliğinde mikronükleus frekansını önemli düzeyde artırmış, fakat C vitamini ve quercetin bu oluşumu inhibe etmiştir. E vitamini, monosodyum glutamatın etkisi sonucu oluşan genotoksik etkiyi inhibe edememiştir [Farombi ve Onyema, 2006].

Kayraldız (2005), gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan sodyum metabisülfidin sıçan kemik iliği hücrelerinde *in vivo* genotoksik etkilerini kromozom aberasyon testi ile araştırmıştır. Sodyum metabisülfidin intraperitoneal uygulamada anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen anormallik sayısını genel olarak tüm muamele sürelerinde (6, 12, 24 saat) ve konsantrasyonlarda (250, 500, 750 ve 1000 mg/kg) kontrole göre önemli ölçüde arttırdığını saptamıştır [Kayraldız, 2005].

39 gıda katkı maddesinin genotoksik etkileri, 8 farklı fare organında (mide, idrar kesesi, beyin, karaciğer, böbrek, akciğer, kolon, kemik iliği) comet test yöntemi ile incelenmiştir. Araştırmalar sonucunda, gıda boyalarından allura kırmızısı, new coccine, tartrazin, erythrozin, filoksin ve rose bengal mide, kolon ve idrar kesesi hücrelerinde DNA hasarını doza bağlı olarak artırdığı saptanmıştır. Ayrıca gıda

boyaları dışında BHA (bütillendirilmiş hidroksi anisol), BHT (bütillendirilmiş hidroksi toluen), bifenil, sodyum o-fenilfenol, thiabendazol, sodyum siklomat, sakkarin, sodyum sakkarin ve sükraloza da gastrointestinal organlarda DNA hasarını arttırdığı açıklanmıştır [Sasaki ve ark., 2002].

Mukherjee ve Chakrabarti (1997), tatlandırıcı olarak kullanılan acesulfame-K'nın fare kemik iliği hücrelerinde 15, 30, 60, 450, 1500 and 2250 mg/kg dozlarda, doza bağlı olarak klastojenik etkide önemli bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir [Mukherjee ve Chakrabarti, 1997]. Lu ve ark. (1998), gıdada renklendirici olarak kullanılan titanyum dioksidin 0, 1, 2 ve 5 µM dozlarının etkilerini Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde KKD ve MN testleri ile incelemişlerdir. Araştırmacılar bu maddenin KKD ve MN frekanslarını önemli düzeyde arttırdığını gözlemlemişlerdir [Lu ve ark., 1998].

Mukherjee ve ark. (1992), ester gümün 50, 100 ve 150 mg/kg'lık konsantrasyonlarında genotoksik ve klastojenik etkilerini *in vivo* olarak farede kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi test yöntemlerini kullanarak incelemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, ester gümün zayıf klastojenik etkili bir madde olduğunu saptamışlardır [Mukherjee ve ark, 1992].

Schlatter ve ark. (1992), sodyum sorbatın çin hamsteri V79 hücrelerinde 2.5 mg/ml'lik konsantrasyonda mitoz bölünmeyi durdurduğunu tespit etmişlerdir. [Schlatter ve ark., 1992].

Sodyum nitritin mutajenik etkileri *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle araştırılmıştır. *In vivo* deneylerde, sodyum nitritin 1,72; 5,18; 15,55 ve 46,66 mg/kg'lık dozları uygulanan canlıların tamamında (rat, fare ve tavşan) kromozom anormalliği frekansını önemli oranda arttırdığı, ayrıca farede mikronükleus oluşumunu da önemli oranda indüklediği belirlenmiştir. *In vitro* testler, BSC-1 ve HeLa hücrelerinde sodyum nitritin 265 ve 530 µg/ml'lik dozları kullanılarak yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda da bu maddenin kromozom anormalliği frekansını önemli oranda arttırdığı saptanmıştır [Luca ve ark., 1987].

Hasegawa ve ark. (1984), sorbik asit, sodyum sorbat ve potasyum sorbatı, Çin hamsteri V79 hücrelerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve GT6 dirençli mutasyonlarda incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, sodyum sorbatın KKD, KA ve GT6 dirençli mutasyonlarda artışa, sorbik asit ve potasyum sorbatın ise en yüksek dozlarda (1000 ve 2000 µg/ml) anormalliklere sebep olduğu açıklanmıştır. Ayrıca araştırmacılar sodyum sorbatın potasyum sorbat ve sorbik asite oranla daha fazla klastojenik etkili bir madde olduğunu saptamışlardır [Hasegawa ve ark., 1984].

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan potasyum bromatın *in vitro* genotoksik etkisi, insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet, mikronükleus ve timidin kinaz (TK) gen mutasyon testleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, 4 saatlik uygulama sonucunda, alkali ve nötral comet testlerinde bu maddenin DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına sebep olduğunu, ayrıca mikronükleus oluşumunu ve TK mutasyonlarını doza bağlı olarak artırdığını saptamışlardır [Luan ve ark., 2007].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

Bu araştırmada sodyum benzoat ve potasyum benzoatın genotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferel kanından elde edilen lenfositler kullanılmıştır. Kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı saptanmamış ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 25 yaşında bir bayan ve bir erkek donörden temin edilmiştir.

3.1.2. Test materyali

Sodyum Benzoat

Bu araştırmada kullanılan gıda katkı maddelerden biri sodyum benzoattır

Yapısal Formülü : Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Kimyasal Formülü : $C_6H_5CO_2Na$ ($C_7H_5NaO_2$)

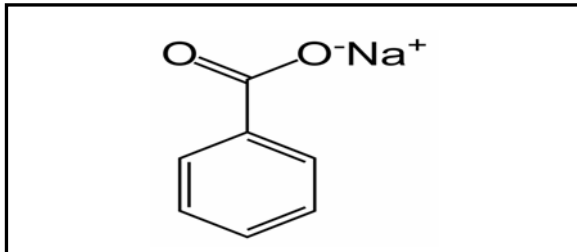
Molekül Ağırlığı : 144,11 g/mol

Görünüş : Kristal, beyaz, katı

Erime Noktası : 330.6°C

Kaynama Noktası : 464.9°C

CAS NO : 532-32-1



Şekil 3.1. Sodyum benzoatın yapısal formülü

Potasyum Benzoat

Bu araştırmada kullanılan diğerk gıda katkı maddesi potasyum benzoattır.

Yapısal Formülü : Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Kimyasal Formülü : C_6H_5COOK ($C_6H_5KO_2$)

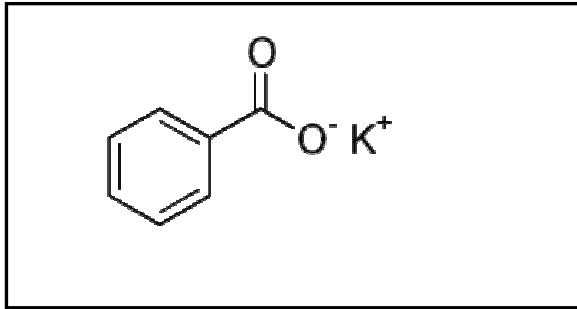
Molekül Ağırlığı : 160.21

Görünüş : Kristal, beyaz, katı

Erime Noktası : 330.6°C

Kaynama Noktası : 464.9°C

CAS NO : 582-25-2



Şekil 3.2. Potasyum Benzoatın yapısal formülü

3.2. Metot

3.2.1. Preparatların hazırlanması

Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için preparatların hazırlanması

Her iki gıda katkı maddesi ile yapılan çalışmalarda, hücre kültürlerinin hazırlanması amacıyla, 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 ml'si (6 damla) steril şartlarda 2,5 ml'lik besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Daha önce sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5-Bromo-2-deoksiüridin=Bromodeoksiüridin) çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve tüpler alt üst edilerek karışmaları sağlanmıştır. Ardından kültür tüpleri 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübasyona alınmıştır.

Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra sodyum benzoatın 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ve 100 µg/ml'lik, potasyum benzoatın 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 ve 1000 µg/ml'lik dozları ilave edilmiştir. Ayrıca her iki kimyasal için bir kontrol ve bir pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) kullanılmıştır. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe steril saf su içinde hazırlanmış kolkisin çözeltisinden 0,06 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Bu şekilde hücreler 2 saat boyunca 37°C'deki inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

Kültür süresi bitiminde tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibindeki lenfositleri içeren 0,5-0,7 ml'lik kısım otomatik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılarak, hücrelerin kalan sıvı içinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Ardından bu tüplere, 0,075M KCl hipotonik çözeltisinden, otomatik karıştırıcıda damla damla (5'er ml) ilave edilerek 30-60 saniye karışmaları sağlanmış, daha sonra tüpler tekrar kapatılarak, 37°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatif otomatik karıştırıcıda 5'er ml yavaş yavaş eklenmiştir. İlk fiksatifin eklenmesinden sonra tüpler 1 saat süreyle +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Fiksatifle yıkama işlemi iki kez daha tekrarlanarak tüpte kalan sıvının tamamen berraklaşması sağlanmıştır. Tüpler her yıkama işleminden sonra santrifüj edilmiş, son fiksatifle muamele sonunda dipte 0,5-0,7 ml kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan sıvı, pipetaj yapılarak içindeki hücreler homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu süspansiyon, önceden 1N HNO₃ (Nitrik Asit)'te bekletilerek temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen lamalar üzerine, 15-20 cm yükseklikten, farklı alanlara birer damla damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir [Jonasson, 1986].

Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması

Mikronükleus testi için insan periferik lenfosit kültürlerinin hazırlanması amacıyla, alınan periferik kanın 0,2 ml'si (6 damla) steril şartlarda 2,5 ml'lik besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Bu tüpler 37°C'deki etüve yerleştirilmiştir. Kültür başlangıcından 24 saat sonra, sodyum benzoatın 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml'lik, potasyum benzoatın 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/ml'lik dozları ekilmiştir.

Hücrelerin sitokinezini engellemek amacıyla tüm tüplere 44. saatte 5,2 µg/mL sitokalsin-B eklenmiştir. Kültür süresi dolduğunda tüpler, 10 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, ardından üstte kalan süpernatant atılmıştır. Geriye kalan 0,5-0,7 ml'lik kısım otomatik karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra, tüplere 0,075 M KCl çözeltisinden 5ml damla damla otomatik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ilave edilmiş ve sonra buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler etüvden çıkarılarak, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra, tüplere, 5'er ml 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 kez uygulanmış ve tüpler her fiksatiften sonra 5 dk buzdolabında bekletilmiştir. 3. fiksatifte %1'lik formaldehit ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetle yavaşça homojenize edilmiştir. Önceden 1N HNO₃ (Nitrik asit)'de temizlenmiş ve %70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamlar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla damlatılarak süspansiyonun yayılması sağlanmıştır. Preparatlar, kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır.

3.2.2. Preparatların boyanması

Mitotik indeks, kromozomal anormallikler ve mikronükleusların gözlenmesi amacıyla hazırlanmış olan preparatlar % 5'lik Giemsa boyasında 15-20 dakika homojen olarak boyanmıştır. Bir kromozomdaki kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak için floresan+Giemsa boyama yapılmış, bu amaçla Speit ve

Haupter'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır [Speit ve Haupter, 1985]. Bu uygulamaya göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6.8) ile kapatılmıştır. Preparatlar, 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile karanlık ortamda 13 dakika ışınlanmıştır. Işınlama bitiminin ardından preparatlar, önceden 60  C sıcaklığa getirilen 2xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak preparatlar, fosfat tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa ile (pH 6.8) 20 dakika boyanmıştır.

Boyama süresinin dolmasından sonra, her iki yöntemde de boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın akması için saf sudan geçirilerek yıkanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra preparatlara DPX damlatılıp lamelle kapatılarak daimi hale getirilmış ve kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskopik incelemeye alınmıştır.

3.2.3. Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanması

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, kadın ve erkek bireye ait preparatlarda kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz (toplam 200 metafaz) incelenmiştir. İncelenen toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir.

3.2.4. Kardeş kromatid değişiminin (KKD) saptanması

Kardeş kromatid değişimi sayısı, her bir gıda katkı maddesi için, kadın ve erkek bireylere ait preparatların her birisinden mitoz 2 (M2) safhasındaki 25 hücrede (toplam 50 hücrede) saptanmıştır. 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, üçlü vb. değişimler olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Mitotik indeks (Mİ) ve replikasyon indeksinin (Rİ) saptanması

Mitotik indeksin tespit edilmesi amacıyla bütün uygulamalar için kadın ve erkek bireye ait preparatların her birinden 1000'er hücre olmak üzere toplam 2000 hücre incelenmiştir. Bu hücreler içinde metafaz evresindeki hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı, yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Replikasyon indeksini hesaplamak amacıyla erkek ve dişi için hazırlanan KKD preparatlarının her birinden 100'er hücre, toplamda 200 hücre incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) metafaz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi $Rİ = \frac{1x(M1) + 2x(M2) + 3x(M3)}{N}$ (N=incelenen toplam hücre sayısı) formülü yardımıyla hesaplanmıştır [Gomez-Arroya ve ark., 2000].

3.2.6. Mikronükleusların (MN) saptanması

Bu çalışmada erkek ve dişi bireye ait her bir preparattan 1000 tane, toplam 2000 tane iki çekirdekli hücre, mikronükleus içerip içermediği yönünden incelenmiştir. 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.

3.2.7. Nükleer bölünme indeksinin (NBİ) saptanması

Nükleer bölünme indeksi belirlenirken her bir uygulama grubunda (her bir bayan ve erkekten 500 adet) toplam 1000 hücre değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) hücreler şeklinde sayılmış nükleer bölünme indeksi $1x(1N) + 2x(2N) + 3x(3N + 4N)/n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır [Holland ve ark., 2002; Fimognari ve ark., 2005].

3.2.8. Comet testi

Çalışmamızda iki farklı gıda katkı maddesinin insan periferik lenfositlerinde meydana getirdiği DNA hasarı, comet testi ile araştırılmıştır. Bu test tekniğinde her

iki gıda katkı maddesi için alınan periferik kanın 100 µl'si, önceden PBS konulan ependorflara eklenmiştir. Kan ve PBS süspanse edilmiş ve buz dolu kap içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Kan ve PBS karışımlarına 100'er µl lenfosit izolasyon solüsyonu (Biocoll) ilave edilmiş ve 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorfların içerisinde eritrositlerin üzerinde oluşan şeffaf katmanın 100 µl'si alınarak ayrı ependorflara aktarılmıştır. Daha sonra stok haline getirilmiş izole lenfositlerin 100'er µl'si kullanılacak her bir doz için ayrı ependorflara alınmıştır. Lenfositler, 100'er µl test maddesinin çeşitli dozları ile (sodyum benzoatın 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/mL'lik ve potasyum benzoatın 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL'lik, pozitif kontrolün 0,30 µg/mL'lik dozları) süspanse edilmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona alınmıştır. İzole edilen lenfositlerde, trypan blue ile hücrelerin canlılıklarının $\geq$ % 97 olduğu tespit edilmiştir.

İnkübasyon süresinin bitiminde ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak her bir doz için 100'er µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Erime ısısı düşük agardan 100 µl alınarak, lenfositlerle karıştırılmış ve önceden erime ısısı yüksek agar ile kaplanan lamalar üzerine yayılmış ve üzeri 24X60mm'lik lamelle kapatılmıştır. Bu şekilde kapatılan preparatlar kapalı kutu içerisinde 20-25 dak. buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra lam üzerindeki lameller kaldırılmış ve içerisinde lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde buzdolabında en az 1 saat bekleyen preparatlar şaleden çıkarılarak elektroforez tamponu bulunan tankın içerisine yerleştirilmiştir. DNA sarmalının çözülmesi için 20 dak. bekletildikten sonra 25 V, 300 mA'da 20 dak. elektroforez yapılmıştır. Bu işlemten sonra lamalar nötralizasyon tamponunda (0.4 M Tris, pH=7.5) 5'er dak. toplam 3 kez uygulanmıştır. İşlemlerin sonunda her bir lama 50 µl EtBr damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır. Boyanan preparatlar 15-20 dak. buzdolabında bekletilmiştir. Her bir konsantrasyon için 200 hücrede (100 hücre erkekten 100 hücre bayandan) flöresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin hasar dereceleri % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, mitotik indeks, replikasyon indeksi, KKD/Hücre sayısı, anormal hücre frekansı, KA/Hücre sayısı, MN/Hücre sayısı, nükleer bölünme indeksi ve % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır. Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus frekansı sonuçları z-testi ile, kardeş kromatid değişimi ve comet testi sonuçları t-testi ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Sodyum Benzoat Uygulaması

Sodyum benzoat uygulaması ile insan lenfosit kültürlerinde altı tip yapısal, bir tip de sayısal olmak üzere toplam yedi tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlardan yapısal anormallikler kromatid (%68) ve kromozom kırıkları (%18), kardeş kromatidlerde birleşme (%2,2), kromatid değişimi (%5,3), fragment (%1,4) ve disentrik kromozomlar (%4,9)'dır. Sayısal anormallik ise poliploidi (%0,2)'dir (Çizelge 4.1, Resim 4.1). Yapılan analizler, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,99$, 48 saatlik uygulamada $r=0,97$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Sodyum benzoat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

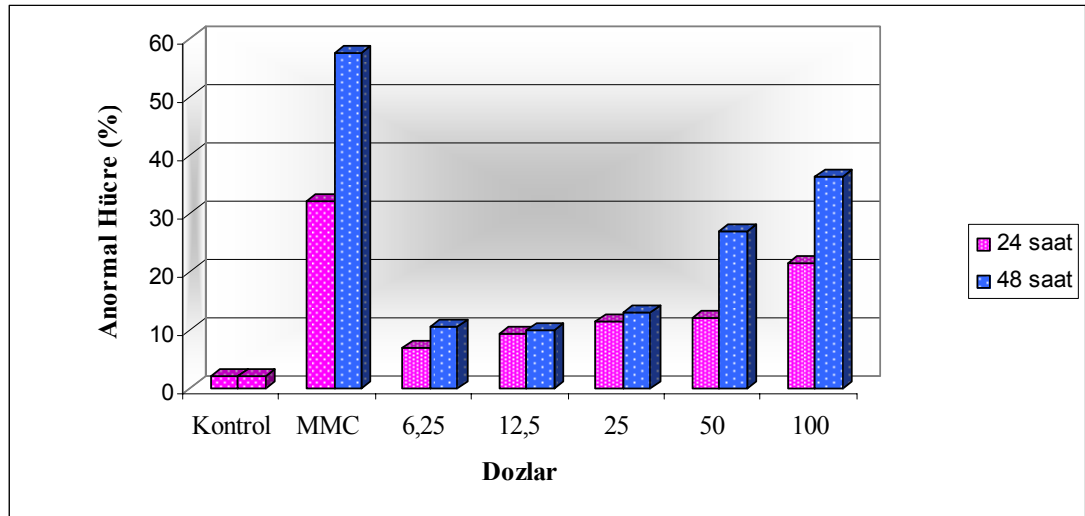
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (Saat)	Doz µg/ml	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	ktd	f	kbb	ds	p		
Kontrol	24	0,00	4	-	-	-	-	-	-	2,00±0,10	0,020±0,001
MMC	24	0,20	44	14	7	2	1	5	-	32,00±3,29	0,365±0,034
S.benzoat	24	6,25	11	1	1	-	-	1	-	7,00±1,80*	0,070±0,018*
		12,5	13	4	1	-	-	1	-	9,50±2,07**	0,095±0,020**
		25	19	2	1	-	-	1	-	11,50±2,25***	0,115±0,022***
		50	19	4	-	1	2	2	-	12,00±2,29***	0,140±0,024***
		100	28	10	-	1	3	3	-	21,50±2,90***	0,225±0,029***
MMC	48	0,20	90	36	20	2	2	7	-	57,50±3,49	0,785±0,029
S.benzoat	48	6,25	17	3	-	2	-	-	1	10,50±2,16***	0,115±0,022***
		12,5	19	2	-	-	-	-	-	10,00±2,12***	0,105±0,021***
		25	23	4	-	-	1	2	-	13,00±2,37***	0,145±0,024***
		50	48	9	-	-	2	2	-	27,00±3,13***	0,305±0,032***
		100	60	18	-	-	1	4	-	36,50±3,40***	0,415±0,034***
KA (%)			%68	%18	%5,3	%1,4	%2,2	%4,9	%0,2		

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

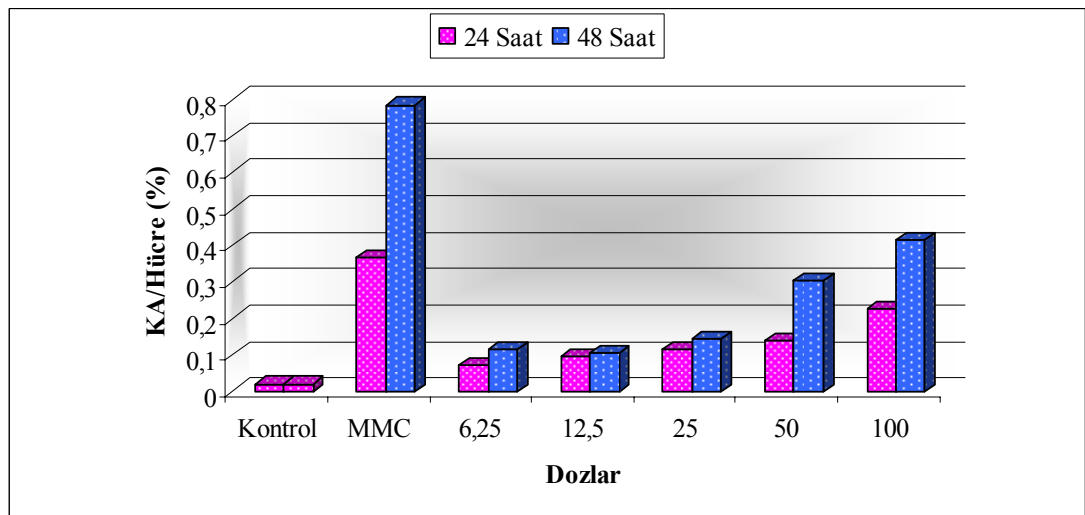
* Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

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

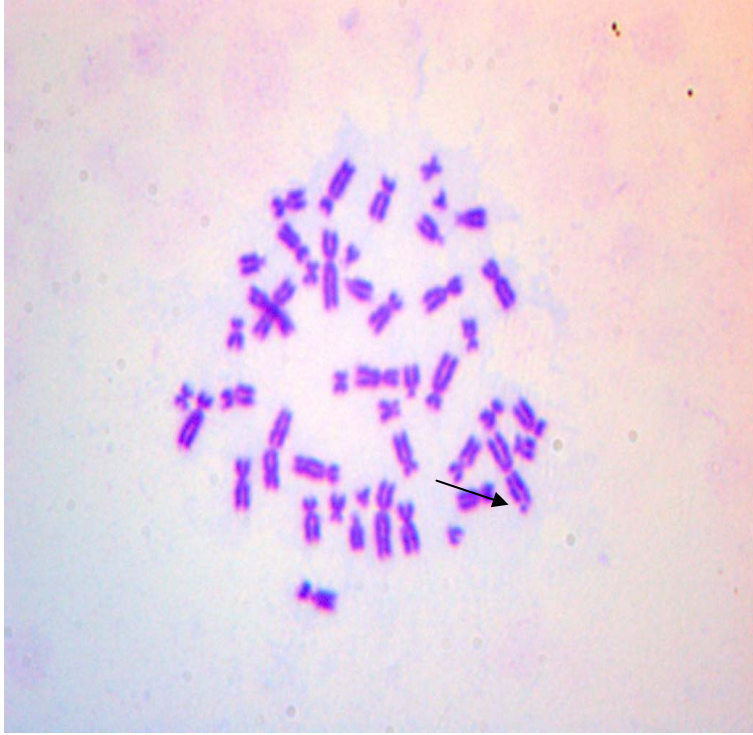
*** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



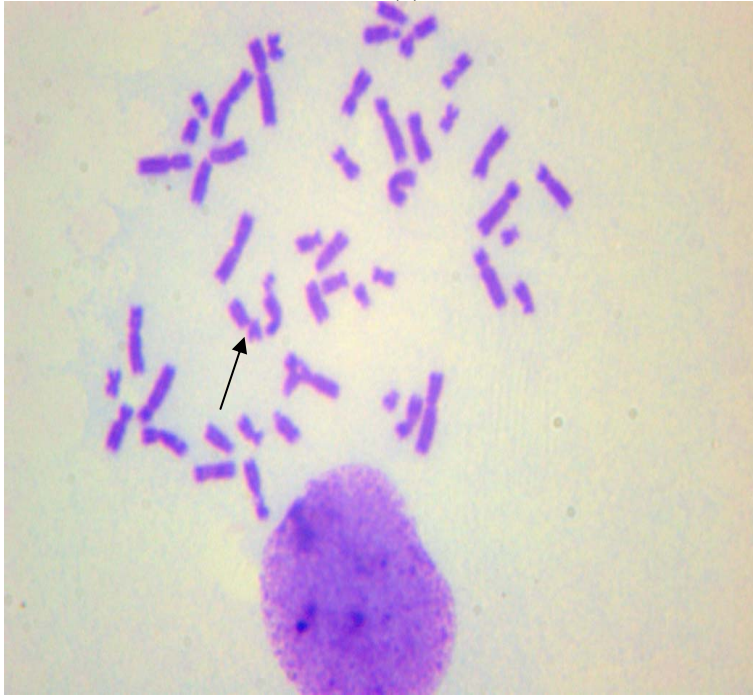
Şekil 4.1. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı



Şekil 4.2. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı



(a)

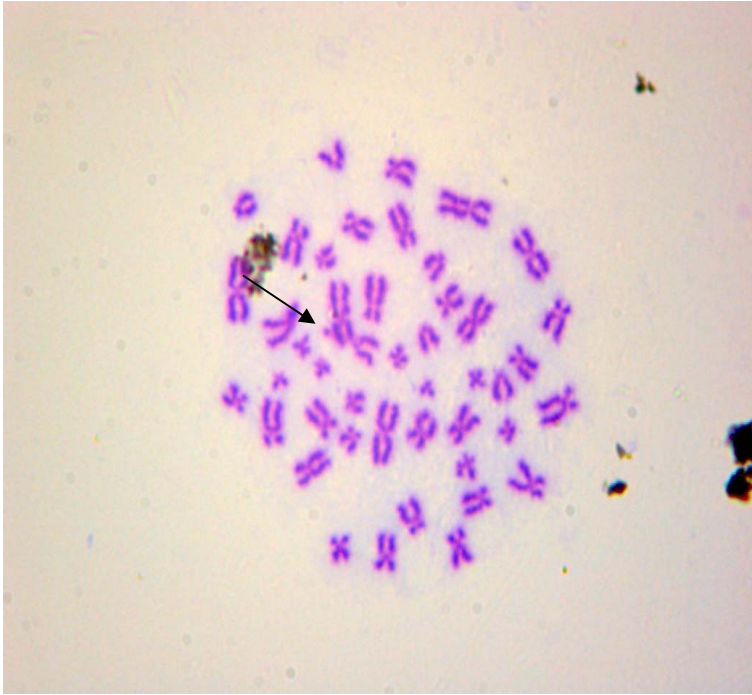


(b)

Resim 4.1. Sodyum benzoatla ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi

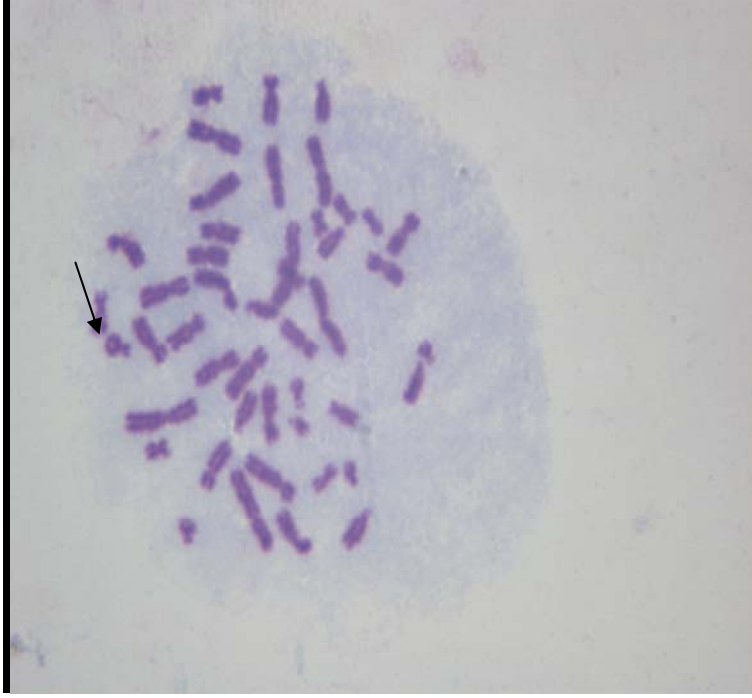


(c)

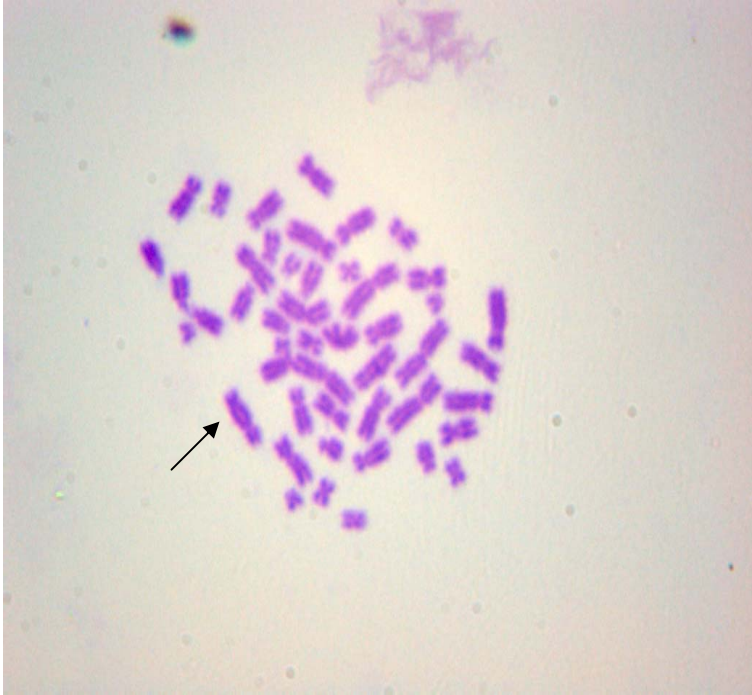


(d)

Resim 4.1. (Devam) Sodyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi



(e)



(f)

Resim 4.1. (Devam) Sodyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi



(g)

Resim 4.1. (Devam) Sodyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi

Sodyum benzoat uygulaması sonucunda, tüm süre ve dozlarda, kardeş kromatid değişimi frekansı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiş olup, bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,95$, 48 saatlik uygulamada $r=0,94$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Resim 4.2). Sodyum benzoat ile muamele edilen hücrelerde minimum 1 ve maksimum 17 arasında kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Bu uygulamada, mitotik indeks, 24 saatlik sürede, en düşük doz dışında diğer tüm sürelerde ve konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiş olup, bu düşüş doza bağlı olarak gerçekleşmiştir. (24 saatlik uygulamada $r=0,97$, 48 saatlik uygulamada $r=0,89$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.4). Yapılan çalışmalarda sodyum benzoatın replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Sodyum benzoatın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

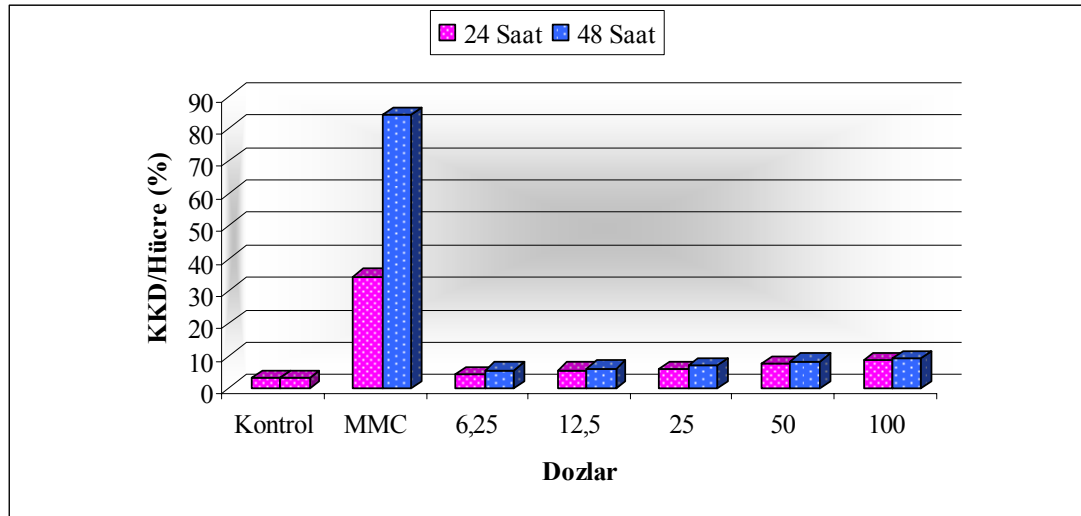
Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Doz (μ g/ml)							
Kontrol	24	0,00	0-6	3,28 $\pm$ 0,27	43	54	103	2,30 $\pm$ 0,05	7,55 $\pm$ 0,59
MMC	24	0,20	10-75	34,42 $\pm$ 2,67	44	70	86	2,21 $\pm$ 0,05	4,35 $\pm$ 0,45
S. benzoat	24	6,25	2-8	4,34 $\pm$ 0,22+	35	60	105	2,35 $\pm$ 0,05	6,20 $\pm$ 0,53
		12,5	2-12	5,58 $\pm$ 0,28+	40	48	112	2,36 $\pm$ 0,05	5,95 $\pm$ 0,52*
		25	1-13	5,78 $\pm$ 0,33+	41	48	111	2,35 $\pm$ 0,05	5,80 $\pm$ 0,52*
		50	2-14	7,34 $\pm$ 0,38+	39	58	103	2,32 $\pm$ 0,05	5,70 $\pm$ 0,51*
		100	3-16	8,46 $\pm$ 0,40+	37	54	109	2,36 $\pm$ 0,05	5,00 $\pm$ 0,48***
MMC	48	0,20	48-115	84,02 $\pm$ 2,37	74	45	81	2,03 $\pm$ 0,05	3,75 $\pm$ 0,42
S. benzoat	48	6,25	2-10	5,50 $\pm$ 0,32+	33	53	114	2,40 $\pm$ 0,05	5,45 $\pm$ 0,50**
		12,5	2-12	6,10 $\pm$ 0,33+	43	47	110	2,33 $\pm$ 0,05	5,00 $\pm$ 0,48***
		25	2-14	6,94 $\pm$ 0,39+	35	46	119	2,42 $\pm$ 0,05	4,80 $\pm$ 0,47***
		50	3-16	8,26 $\pm$ 0,47+	43	57	100	2,28 $\pm$ 0,05	4,60 $\pm$ 0,46***
		100	3-17	8,96 $\pm$ 0,53+	54	67	79	2,12 $\pm$ 0,05	4,30 $\pm$ 0,45***

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

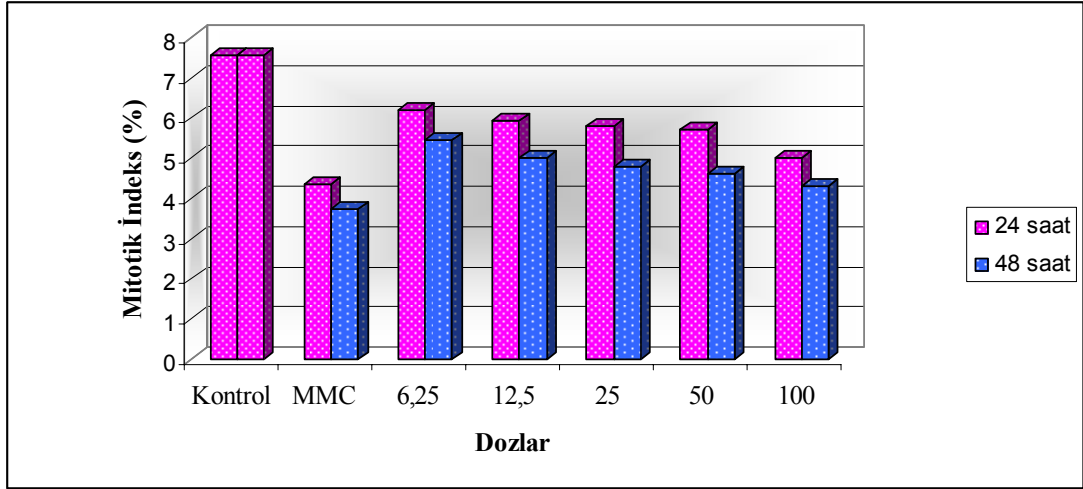
* Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

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

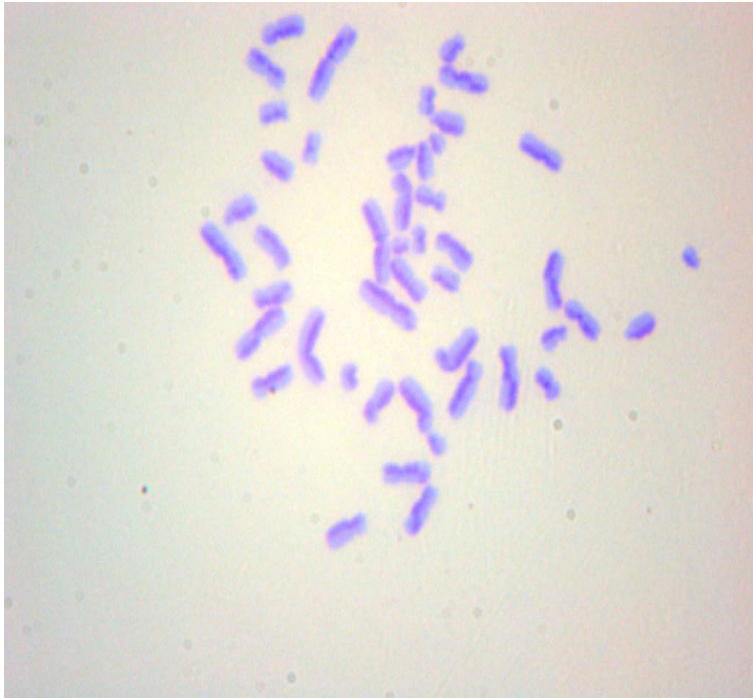
*** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.3. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişim frekansı



Şekil 4.4. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı



Resim 4.2. Sodyum benzoat ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

Sodyum benzoat uygulamasıyla, mikronükleus taşıyan binükleat hücrelerin frekansında da artışlar meydana gelmiştir. Bu artış, kontrole göre, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ve 12,5 $\mu\text{g/ml}$ hariç, tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olup, doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,97$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.5). Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde bir, iki ve üç mikroçekirdekli binükleatlara

rastlanmıştır (Resim 4.3). Sodyum benzoat uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3)

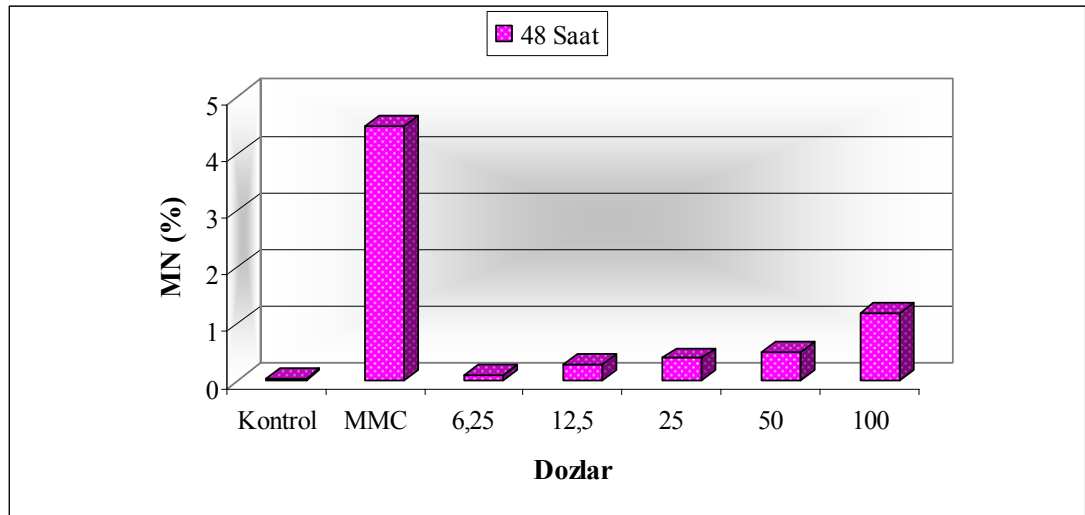
Çizelge 4.3. Sodyum benzoatın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi $\pm$ SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (μ g/ml)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0,00	2000	1	-	-	0,05 $\pm$ 0,05	1,42 $\pm$ 0,37
MMC	48	0,10	2000	76	4	2	4,50 $\pm$ 0,46	1,17 $\pm$ 0,34
Sodyum Benzoat	48	6,25	2000	2	-	-	0,10 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,35
		12,5	2000	6	-	-	0,30 $\pm$ 0,12	1,40 $\pm$ 0,37
		25	2000	8	-	-	0,40 $\pm$ 0,14*	1,39 $\pm$ 0,37
		50	2000	8	1	-	0,50 $\pm$ 0,15**	1,37 $\pm$ 0,36
		100	2000	17	2	1	1,20 $\pm$ 0,24***	1,35 $\pm$ 0,36

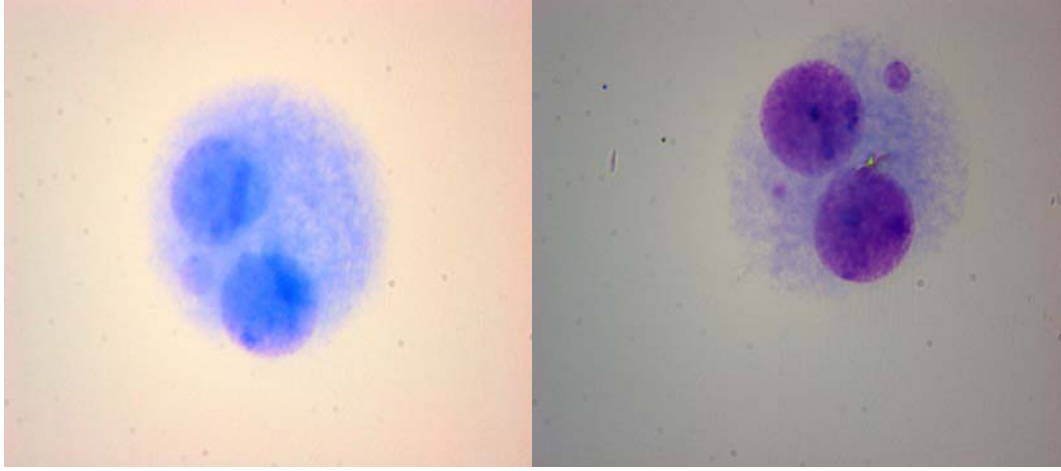
* Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

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

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

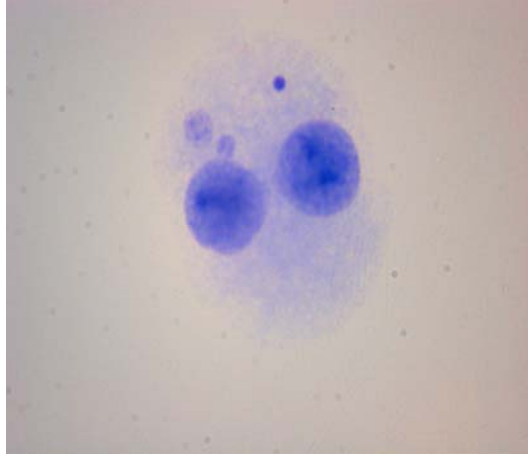


Şekil 4.5. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



(a)

(b)



(c)

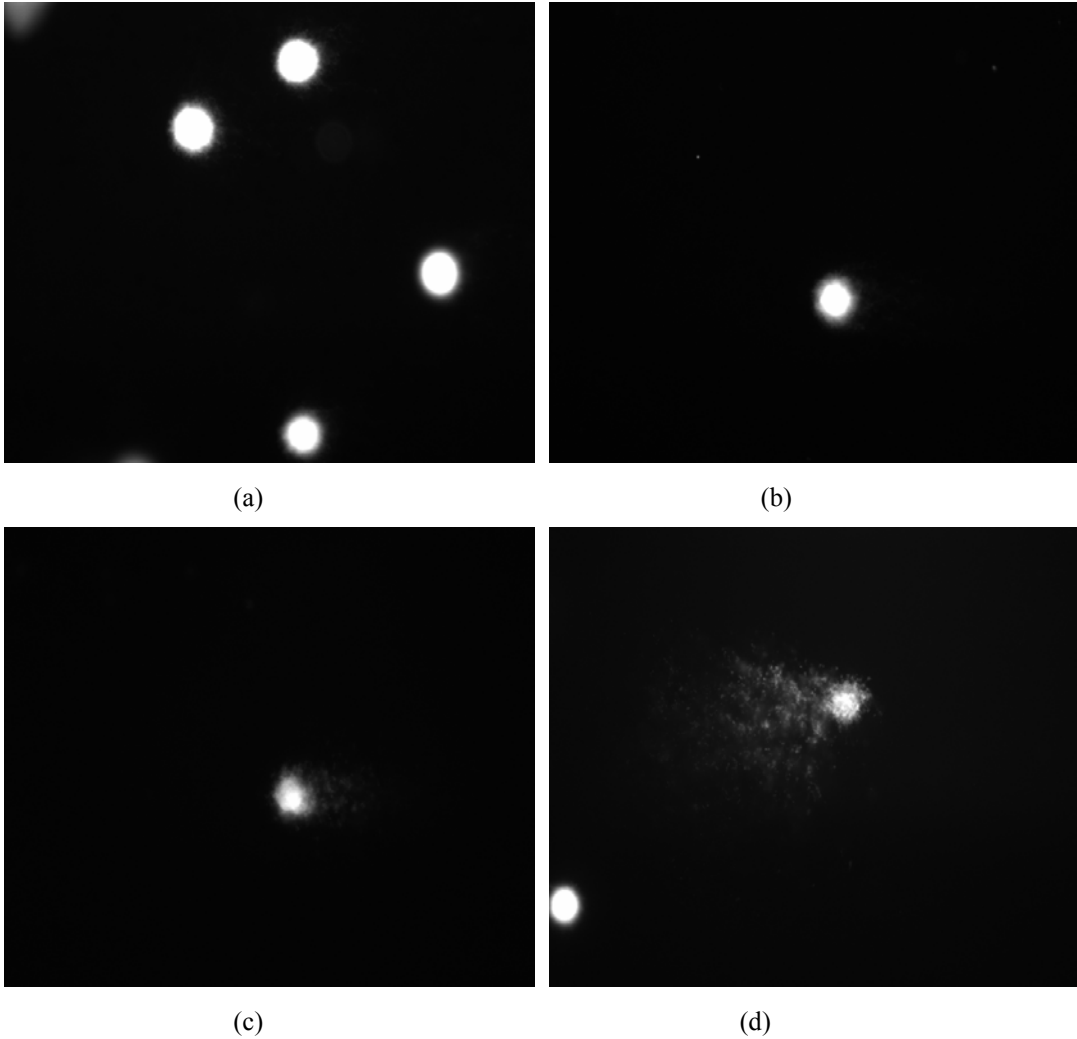
Resim 4.3. Sodyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat b) iki mikronükleuslu binükleat c) üç mikronükleuslu binükleat

Sodyum benzoat ile yapılan comet testi sonuçlarına göre, kuyruk yoğunluğu 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış göstermiştir. Kuyruk uzunluğunda ise 6,25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre artış gözlenmiş olup, istatistiksel olarak sadece 25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda anlamlı düzeyde artış belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Resim 4.4, Şekil 4.6).

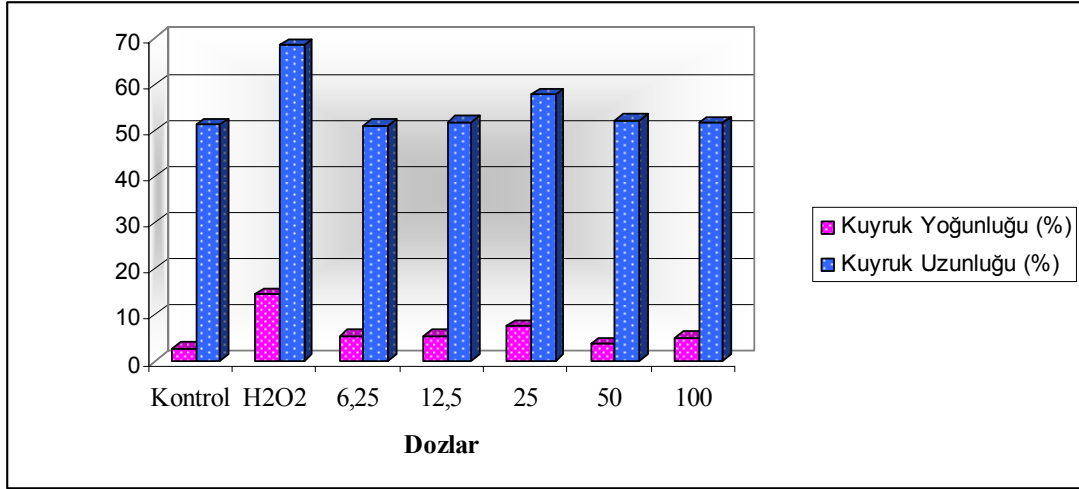
Çizelge 4.4. Sodyum benzoat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	$2,74 \pm 0,21$	$51,42 \pm 0,95$
H ₂ O ₂	0,30	$20,04 \pm 1,65$	$59,17 \pm 1,19$
Sodyum Benzoat	6,25	$5,44 \pm 0,86^*$	$51,13 \pm 0,98$
	12,5	$5,50 \pm 0,88^*$	$51,90 \pm 0,98$
	25	$7,62 \pm 1,24^*$	$57,81 \pm 1,41^*$
	50	$3,73 \pm 0,66$	$52,21 \pm 1,10$
	100	$5,07 \pm 0,71^*$	$51,78 \pm 1,31$

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



Resim 4.4. Sodyum benzoat 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



Şekil 4.6. Sodyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu

4.2.Potasyum Benzoat Uygulaması

Potasyum benzoat uygulaması ile insan lenfosit kültürlerinde altı tip yapısal, bir tip de sayısal olmak üzere toplam yedi tip anormalliğin oluştuğu saptanmıştır. Bunlardan yapısal anormallikler kromatid (%58) ve kromozom kırıkları (%28), kardeş kromatidlerde birleşme (%1,7), kromatid değişimi (%4.2), fragment (%2) ve disentrik kromozomlar (%6)'dır. Sayısal anormallik ise poliploidi (%1)'dir (Çizelge 4.5, Resim 4.5). Bu anormalliklerden en sık rastlanılanları kromatid ve kromozom kırıklarıdır. Yapılan analizler sonucunda, potasyum benzoat 24 saatlik uygulamanın 62,5 µg/mL'lik konsantrasyon haricinde, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarında anormallik frekansında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artışa neden olduğu ve bu artışın doza bağlı olduğu belirlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,97$, 48 saatlik uygulamada $r=0,97$). Hücre başına düşen anormallik oranı tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. Potasyum benzoat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

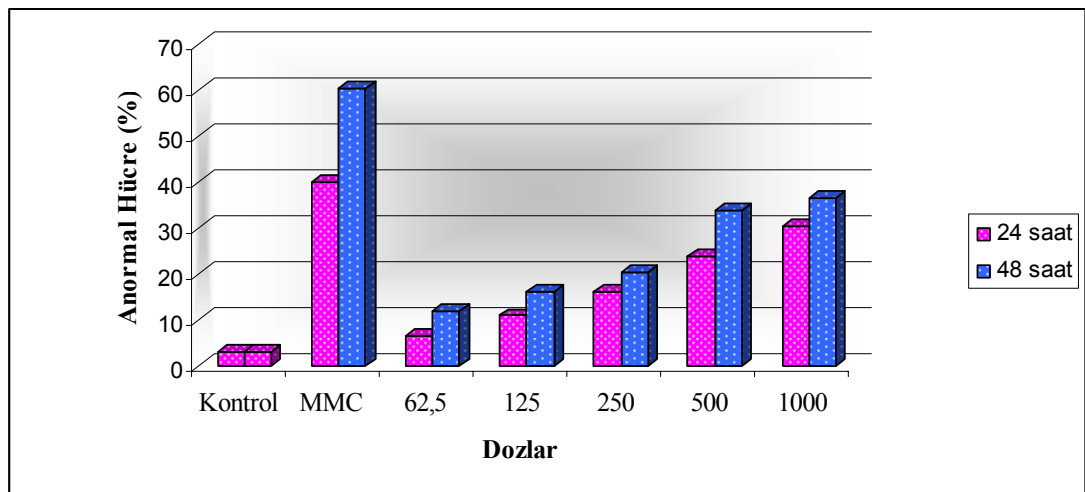
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (Saat)	Doz µg/ml	Yapısal				Sayısal				
			ktk	kzk	ktd	f	kbb	ds	p		
Kontrol	24	0,00	2	4	-	-	-	-	-	3,00±1,20	0,030±0,01
MMC	24	0,20	52	29	8	2	2	5	-	40,00±3,46	0,490±0,03
P.benzoat	24	62,5	11	4	-	-	-	1	-	6,50±1,74	0,080±0,02*
		125	15	4	-	-	1	2	1	11,00±2,21**	0,115±0,02***
		250	21	9	-	-	-	4	-	16,00±2,59***	0,170±0,03***
		500	29	19	1	2	2	3	-	24,00±3,01***	0,280±0,03***
		1000	44	25	-	1	1	5	-	30,50±3,25***	0,380±0,03***
MMC	48	0,20	86	28	22	4	1	4	-	60,50±3,45	0,795±0,03
P.benzoat	48	62,5	16	7	1	1	-	1	-	12,00±2,30***	0,130±0,02***
		125	24	13	-	-	1	1	-	16,00±2,59***	0,195±0,03***
		250	33	14	-	1	-	7	-	20,50±2,85***	0,275±0,03***
		500	50	25	-	3	1	3	-	34,00±3,34***	0,410±0,03***
		1000	59	32	1	2	4	10	-	36,50±3,40***	0,540±0,03***
KA (%)			%58	%28	%4,2	%2,0	%1,7	%6,0	%0,1		

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

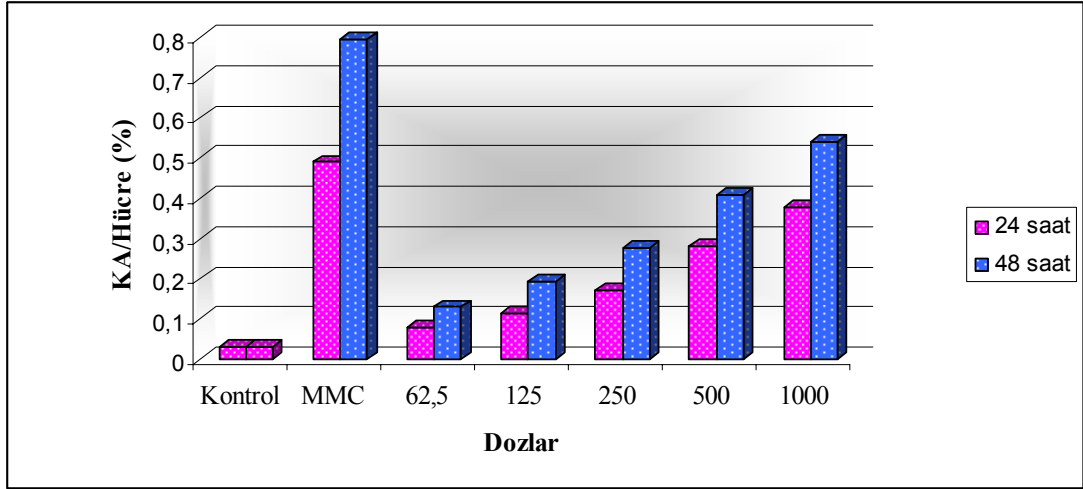
* Kontrolle göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

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

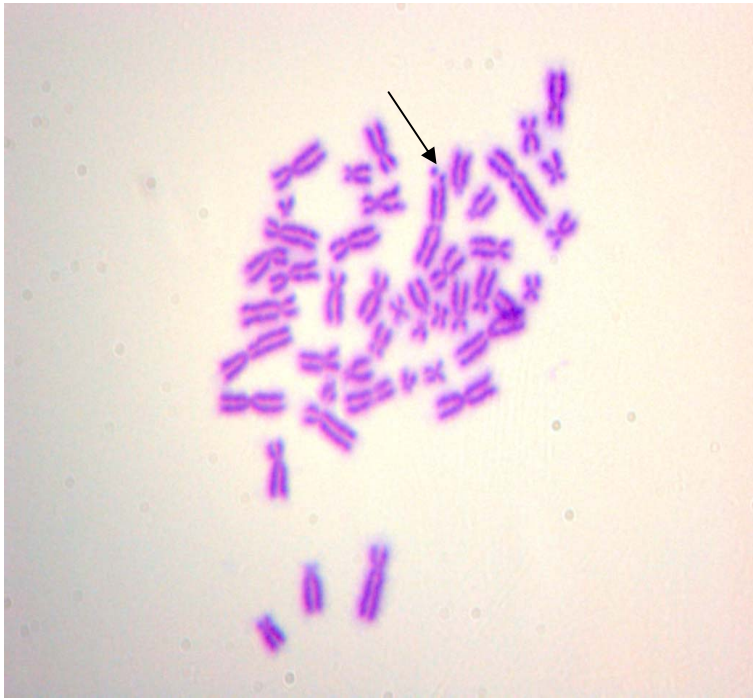
*** Kontrolle göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.7. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı

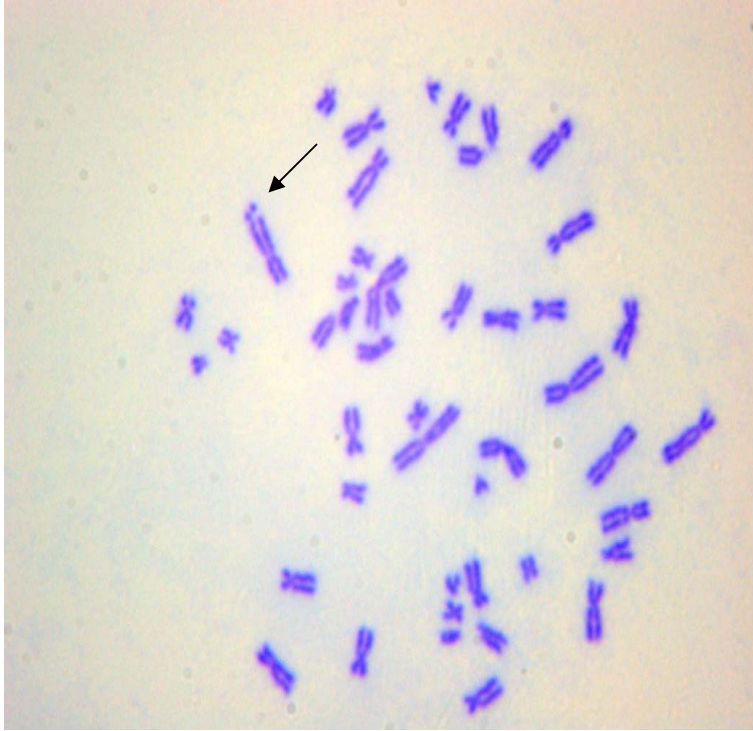


Şekil 4.8. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı

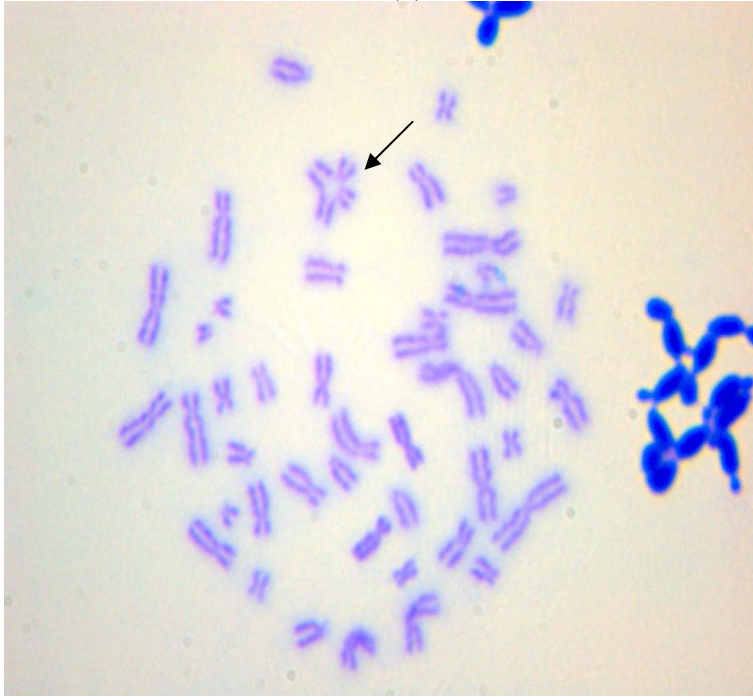


(a)

Resim 4.5. Potasyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi

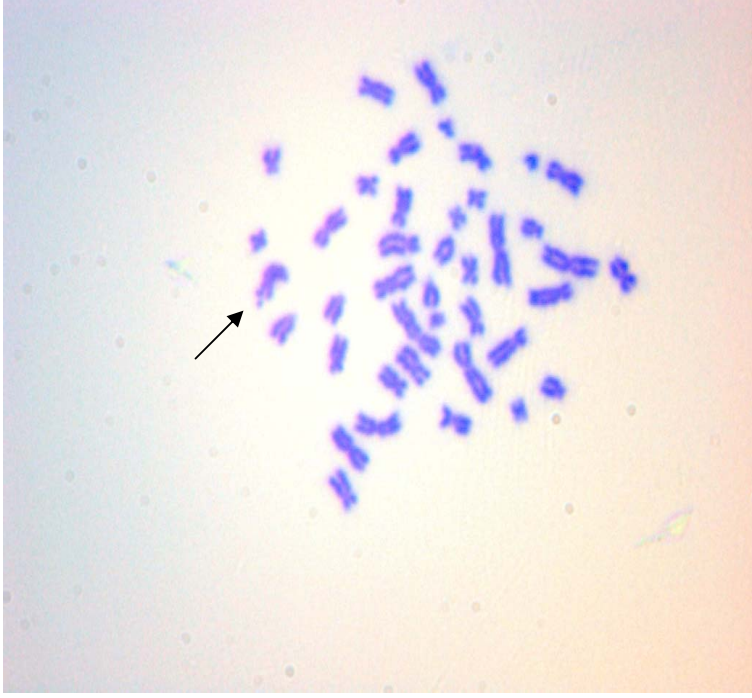


(b)

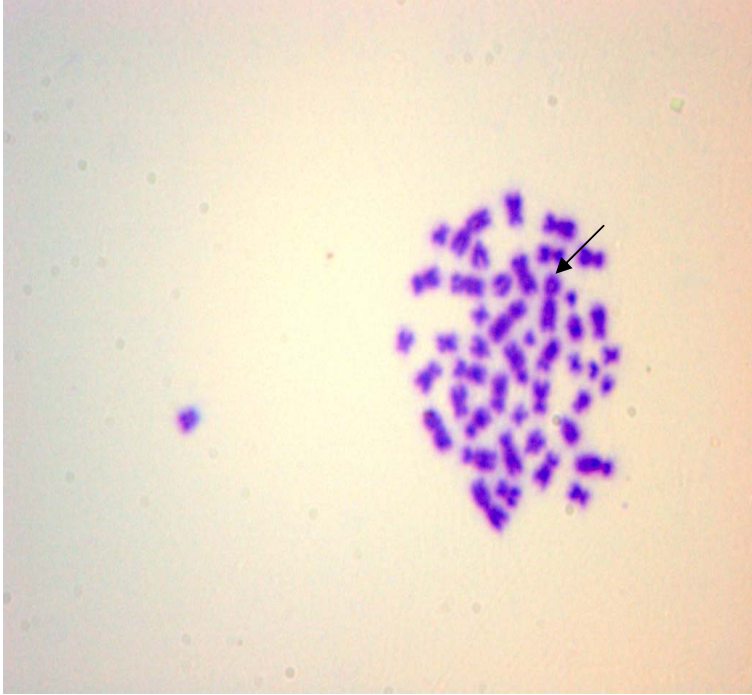


(c)

Resim 4.5. (Devam) Potasyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi

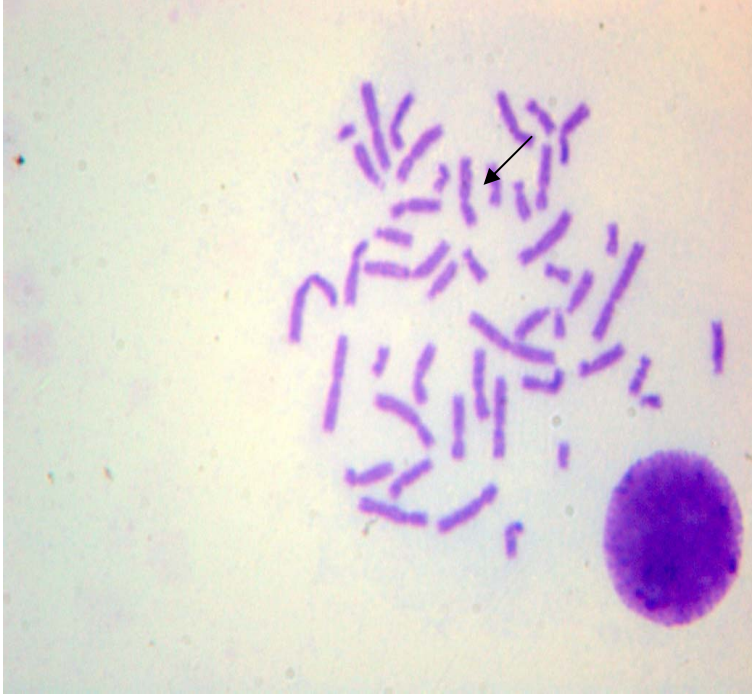


(d)



(e)

Resim 4.5. (Devam) Potasyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi



(f)



(g)

Resim 4.5. (Devam) Potasyum benzoate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b) kromozom kırığı c) kromatid değişimi d) fragment e) kardeş kromatidlerde birleşme f) disentrik kromozom g) poliploidi

Kardeş kromatid değişim frekansı 62,5 µg/ml'nin 24 saatlik uygulaması hariç tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde artış göstermiştir ve bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,98$, 48 saatlik uygulamada $r=0,99$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.9, Resim 4.6). Potasyum benzoat uygulaması sonucu hücrelerde minimum 1 ve maksimum 25 arasında kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Bu uygulamada, mitotik indeks, 24 saatlik uygulamada 62.5 µg/ml ve 125 µg/ml'lik doz dışında diğer tüm süre ve konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.10). Potasyum benzoatın replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Potasyum Benzoat insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

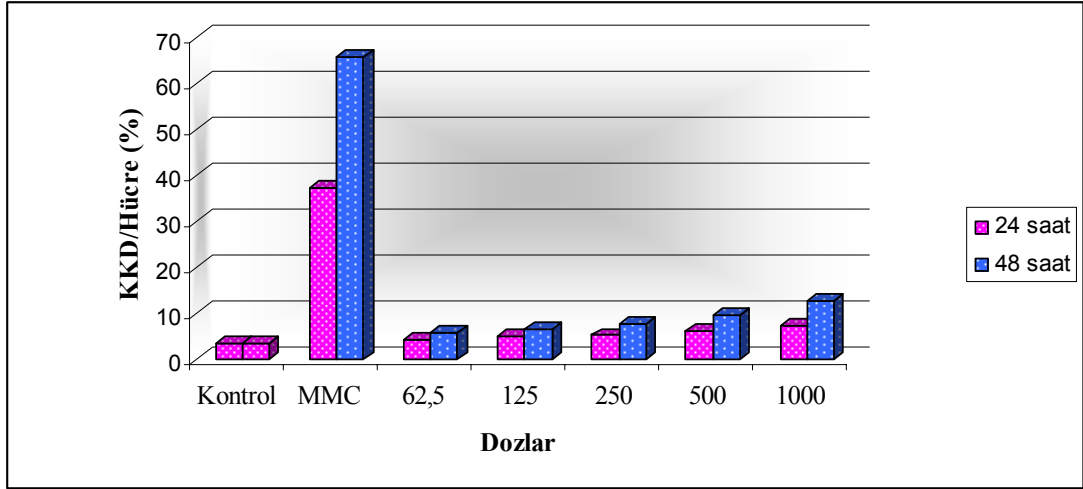
Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0.00	0-8	3,42 ± 0,25	41	64	95	2,27 ± 0,055	7,55 ± 0,59
MMC	24	0,20	10-75	37,16 ± 2,58	51	77	72	2,10 ± 0,055	3,75 ± 0,42
Potasyum Benzoat	24	62,5	1-11	4,18 ± 0,29	30	60	110	2,40 ± 0,052	6,90 ± 0,56
		125	1-10	4,98 ± 0,29+	52	47	101	2,24 ± 0,059	6,35 ± 0,54
		250	2-10	5,22 ± 0,25+	38	58	104	2,33 ± 0,054	5,65 ± 0,51*
		500	2-10	6,04 ± 0,27+	43	56	101	2,29 ± 0,056	4,85 ± 0,48***
		1000	4-12	7,46 ± 0,29+	54	71	75	2,10 ± 0,056	4,30 ± 0,45***
MMC	48	0,20	24-115	65,76 ± 4,47	62	66	72	2,05 ± 0,057	3,60 ± 0,41
Potasyum Benzoat	48	62,5	2-11	5,70 ± 0,31+	44	52	104	2,31 ± 0,057	5,80 ± 0,52*
		125	3-12	6,70 ± 0,30+	55	65	90	2,12 ± 0,055	5,30 ± 0,50**
		250	3-12	7,62 ± 0,30+	57	81	62	2,02 ± 0,054	5,00 ± 0,48***
		500	3-18	9,62 ± 0,49+	75	86	39	1,82 ± 0,052	4,30 ± 0,45***
		1000	5-25	12,56 ± 0,63+	98	68	34	1,68 ± 0,053	3,75 ± 0,42***

+ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

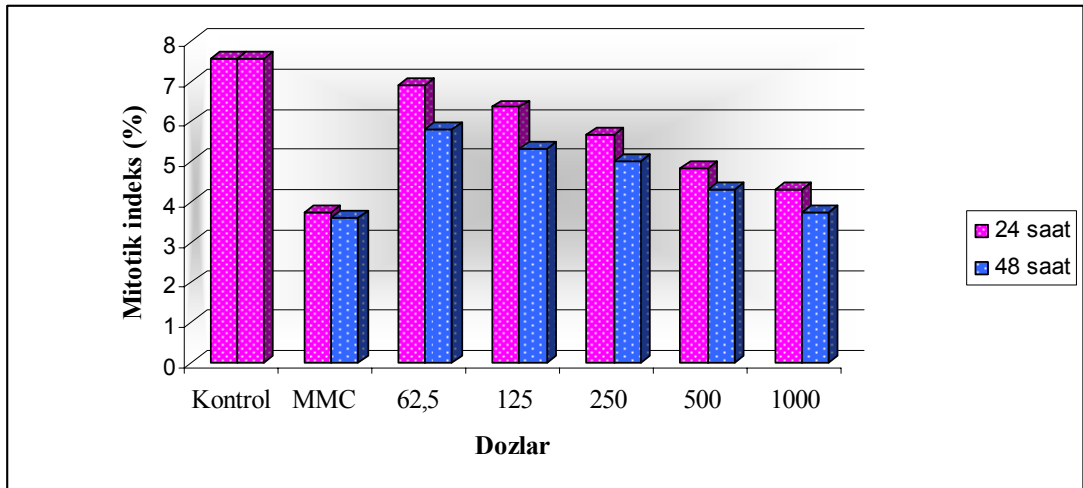
* Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

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

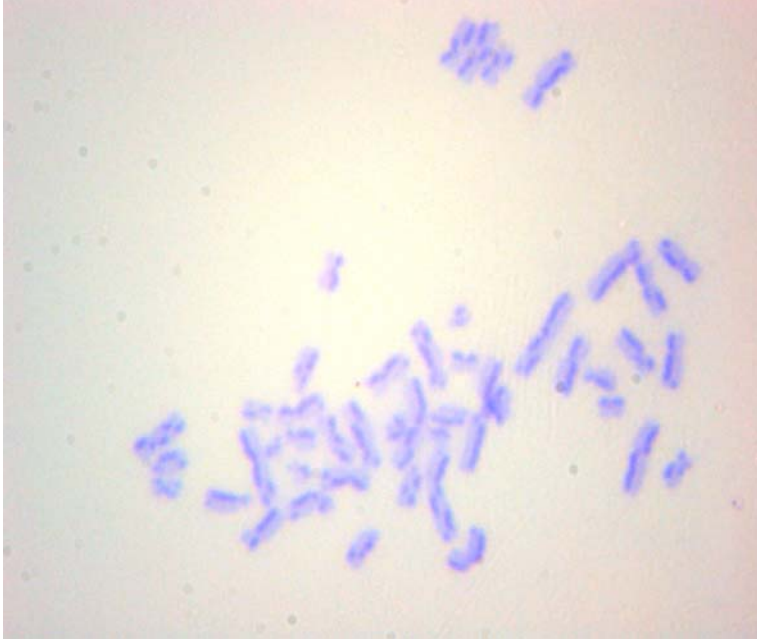
*** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişim frekansı



Şekil 4.10. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı



Resim 4.6. Potasyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri

Potasyum benzoat uygulamasıyla, mikronükleus taşıyan binükleat hücrelerin frekansında da artışlar meydana gelmiştir. Bu artış, kontrole göre, 62,5 µg/ml hariç, tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olup, doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,91$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.11). Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde, bir ve iki mikroçekirdekli binükleatlara rastlanmıştır (Resim 4.7). Potasyum benzoat uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

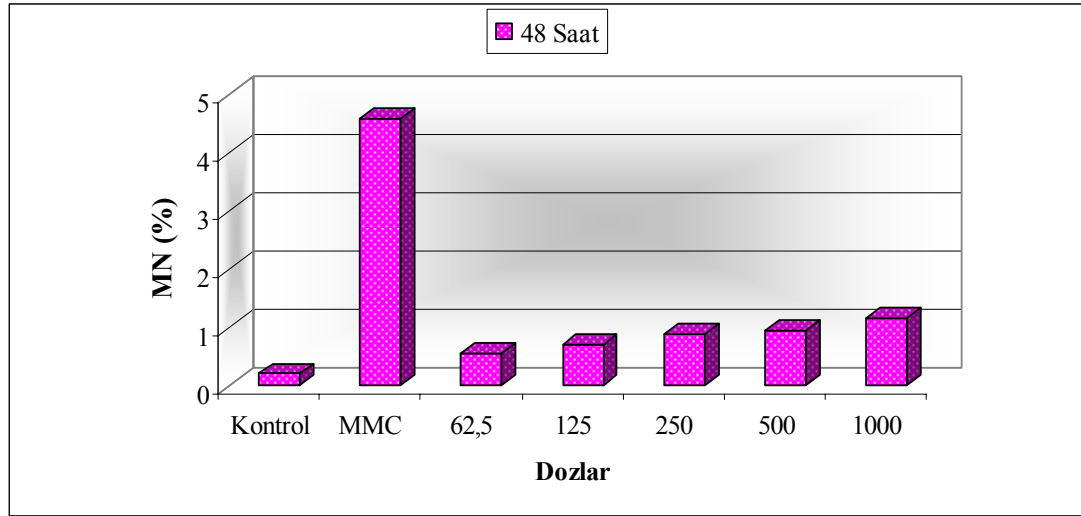
Çizelge 4.7. Potasyum Benzoat'ın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi $\pm$ SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (μ g/ml)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0,00	2000	4	-	-	0,20 $\pm$ 0,10	1,68 $\pm$ 0,40
MMC	48	0,20	2000	81	4	1	4,60 $\pm$ 0,46	1,29 $\pm$ 0,36
Potasyum Benzoat	48	62,5	2000	7	2	-	0,55 $\pm$ 0,16	1,71 $\pm$ 0,41
		125	2000	10	2	-	0,70 $\pm$ 0,18*	1,52 $\pm$ 0,39
		250	2000	12	3	-	0,90 $\pm$ 0,21**	1,37 $\pm$ 0,37
		500	2000	17	1	-	0,95 $\pm$ 0,22**	1,25 $\pm$ 0,35
		1000	2000	17	3	-	1,15 $\pm$ 0,24***	1,24 $\pm$ 0,35

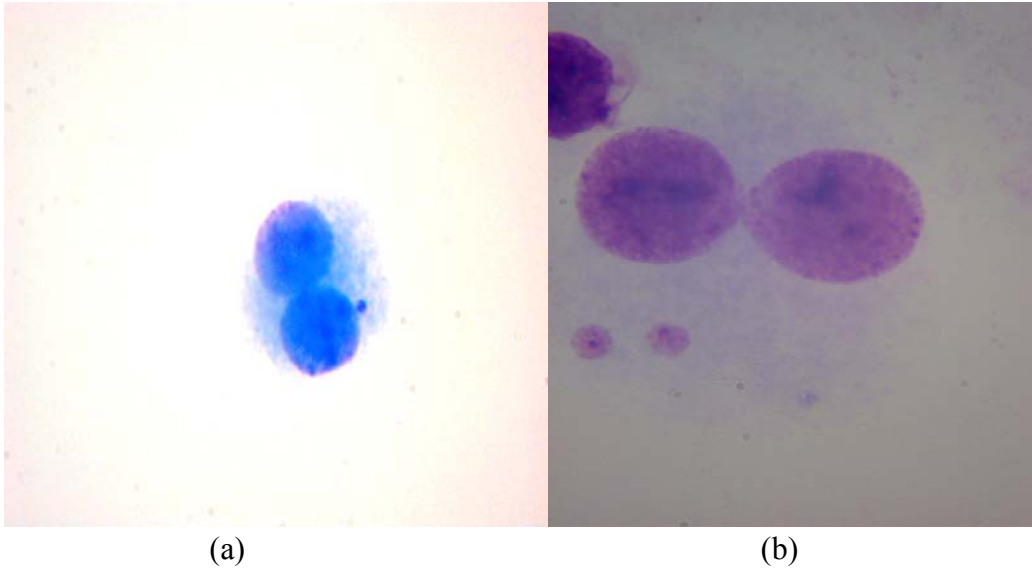
* Kontrole göre $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre $P < 0.01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

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



Şekil 4.11. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



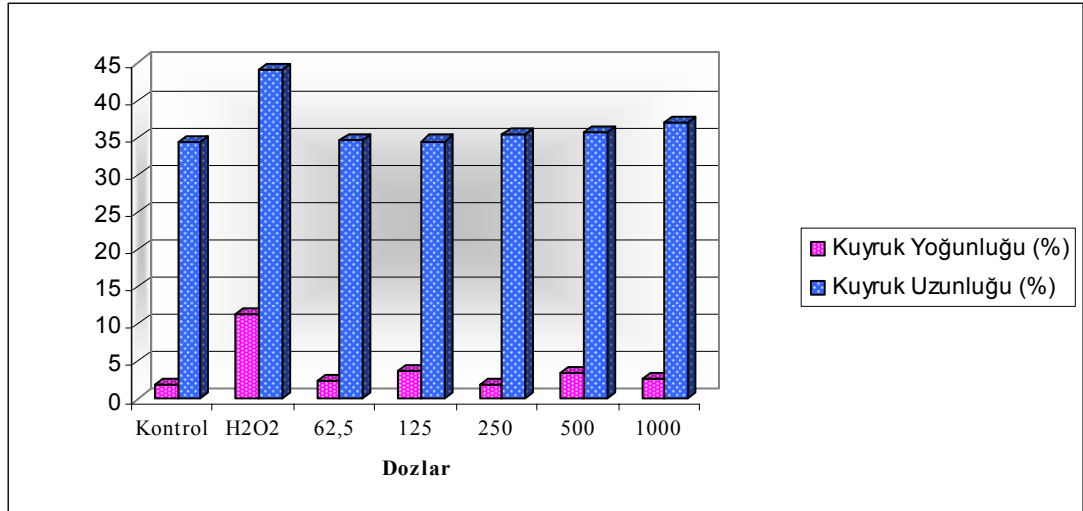
Resim 4.7. Potasyum benzoat ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat b) iki mikronükleuslu binükleat

Potasyum benzoat ile yapılan comet testi sonuçlarına göre, kuyruk yoğunluğunda 250 µg/mL’lik doz hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre artış gözlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kuyruk uzunluğunda ise istatistiksel olarak sadece en yüksek dozda (1000 µg/mL) anlamlı düzeyde artış gerçekleşmiş olup, bu artış doza bağlıdır ($r = 0.98$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.12, Resim 4.8).

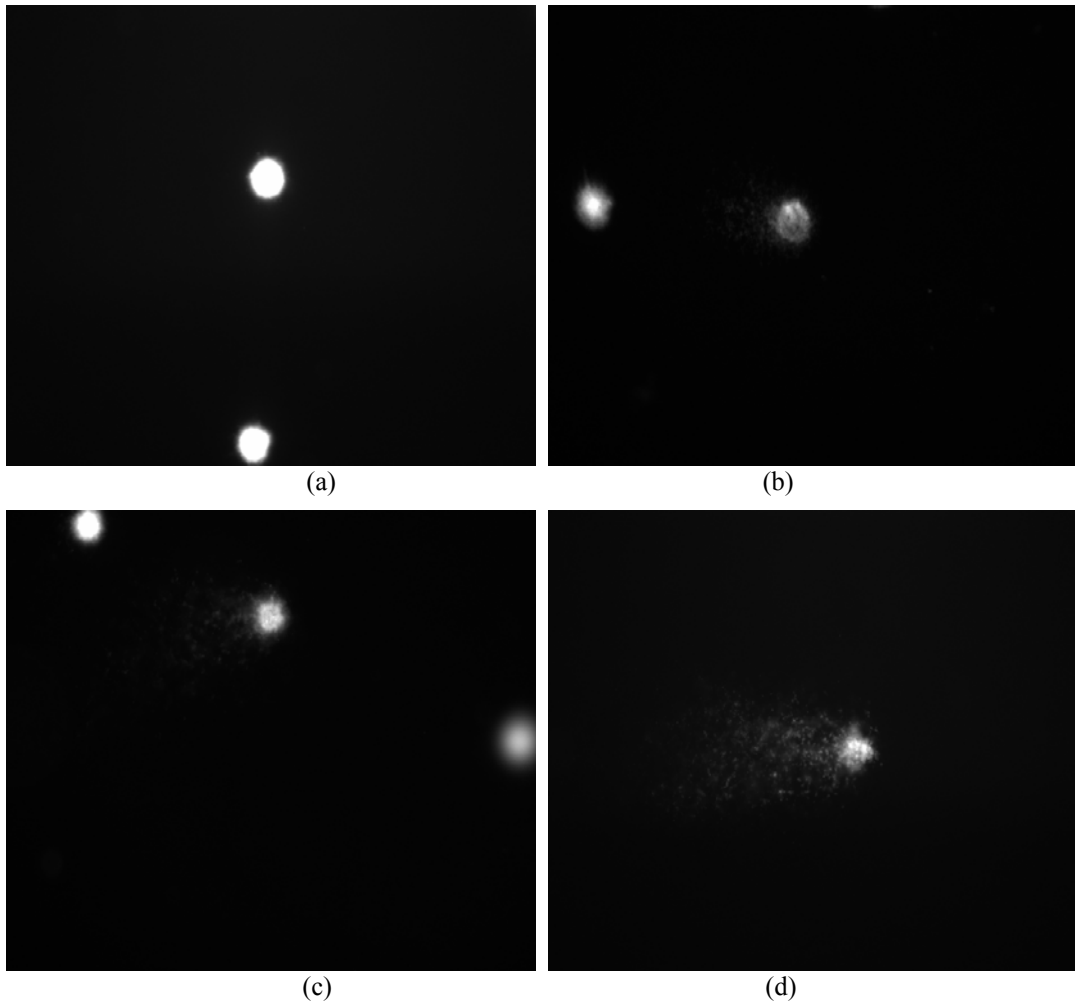
Çizelge 4.8. Potasyum Benzoat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
Kontrol	0,00	1,95 ± 0,29	34,56 ± 0,47
H ₂ O ₂	0,30	11,35 ± 1,80	44,07 ± 1,36
Potasyum Benzoat	62,5	2,42 ± 0,52	34,65 ± 0,66
	125	3,73 ± 0,92	34,59 ± 0,56
	250	1,84 ± 0,29	35,39 ± 0,60
	500	3,39 ± 0,89	35,81 ± 0,95
	1000	2,61 ± 1,59	37,18 ± 0,67+

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi),



Şekil 4.12. Potasyum benzoat ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu



Resim 4.8. Potasyum benzoat 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 VE SONUÇ

Gıda katkı maddeleri, besinlerimizin bizlere ulaşması ve onlardan daha fazla ölçüde faydalanabilmemiz için kullanılmakta olan maddelerdir. Gelişen teknoloji yaşam standartlarını doğrudan etkilemiş ve bu gelişme tüm sektörleri olduğu gibi gıda sektörünü de etkisi altına almıştır. Günümüzde pek çok amaçla fazla sayıda gıda katkı maddesi kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanılması gerekli olduğu kadar, titizlik isteyen bir iştir. Çünkü gıda katkı maddeleri fazla kullanıldığında alerjik ve kanserojenik etki göstermekte hatta ölümlerle sonuçlanabilecek durumlar ortaya çıkarabilmektedir [Bulduk, 2003].

Gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri egzema, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, ishal, hiperaktivite ve aşırı duyarlılık vb.'dir [Güneşli, 2000].

Kullanılmasına izin verilen maddelerin sürekli olarak alındığında toksik etkiler gösterdikleri bilinmektedir [Briggs, 1997]. Gıda katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı zaman halk sağlığı açısından zararlı olabilir. Son zamanlarda kimyasal karsinojenlere maruz kalma, önemli bir sorun hâline gelmiştir. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek dozlarda kullanılsalar dahi, bu maddelerin bir süre sonra vücutta birikerek insan sağlığını tehdit edebilecek miktarlara ulaşabileceği, dokularda hasar meydana getirebileceği göz ardı edilmemelidir [Sarıkaya ve Solak, 2003].

Bazı katkı maddelerinin kullanımına, toksik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle çeşitli yasal sınırlamalar getirilmiştir. Örneğin, son yıllara kadar gıdalarda koruyucu olarak kullanılan kükürt dioksitin toksik etkisi olmadığı düşünülmekteyse de izin verilen maksimum dozlar özellikle astımlı hastalarda çok şiddetli alerjik astımlara yol açmaktadır. Bu nedenle pek çok ülkede izin verilen miktarlar oldukça azaltılmış olup GRAS listesinden çıkarılmıştır [Saldamlı, 1997]. Ayrıca gıdalarda yapay antioksidant olarak kullanılan BMT (Butil-hidroksitoluene)'de ancak sınırlı düzeyde

kullanılır. Çünkü bazı araştırmacılar yüksek miktarlarının farelerde kanser insidansını arttırdığını ileri sürmektedir [Özkaya, 2004].

Çeşitli kimyasalların karsinogenik özelliklerinin belirlenmesinde genotoksisite çalışmaları çok fazla tercih edilmektedir. DNA'da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA'daki hasarın saptanması kanser riskinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir [Salama ve ark., 1999].

Bu çalışmada, gıdalarda koruyucu olarak kullanılan katkı maddelerinden sodyum benzoat ve potasyum benzoatın insan periferik kan lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), mikronükleus (MN), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve comet testleri kullanılarak genotoksik etkileri incelenmiştir. Bu dört farklı testin kullanılması gıda katkı maddelerinin genotoksik risklerinin belirlenmesi açısından daha güvenilir sonuçlara ulaşmamıza yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda kullandığımız gıda katkı maddelerinden biri olan sodyum benzoat, uygulanan tüm doz ve sürelerde kromozomal anormallik frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmıştır. Sodyum benzoat insan lenfositlerinde yedi tip anormalliğe neden olmuştur. Bu anormalliklerden en sık rastlanan kromatid kırıklarıdır. Çalışmamızda kullandığımız diğer gıda katkı maddesi olan potasyum benzoat, 24 saatlik uygulamanın 62,5 µg/mL'lik konsantrasyonu hariç, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarında, anormallik frekansında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlara sebep olmuştur. Bu anormalliklerden en sık rastlanan yine kromatid kırıklarıdır.

İnsanlarda genotoksik ajanlara maruziyetin önemli bir neticesi olan kromozomal anormallikler, kromozomal DNA'ya hasar veren çeşitli ajanlar tarafından oluşturulabilmektedir [Antunes ve ark., 2005]. Kimyasalların birçoğu tarafından indüklenen yapısal aberasyonlar kromatid tipidir ve bunlar genellikle kimyasal muamelenin ardından, DNA sentezinden sonraki ilk metafazda belirlenir [Satoh ve ark., 2002]. Kromozomal anormallikler yapısal ya da sayısal anormallikler olarak

ortaya çıkarabilmektedir. Kromozomlarda meydana gelen yapısal anormallikler, DNA'da tek ya da çift zincir kırıkları ile oluşmaktadır. Özellikle çift zincir kırıkları primer DNA lezyonları olarak kabul edilmektedir [Morgan ve ark., 1998]. Yapısal anormallikler morfolojik kriterlere göre kromatid ve kromozom tipi anormallikleri olarak iki gruba ayrılmaktadır. Kromatid ve kromozom kırıkları, kromozomlarda tek bir koldaki çift zincir kırıkları veya her iki koldaki kırılmalar olarak gözlenmektedir [Savage, 1975]. Çift zincir kırıklarının yanlış tamir edilmesi veya tamir edilememesi sonucunda oluşan kromozom tipi anormallikler, çoğunlukla S fazından bağımsız olan klastojenler tarafından *in vivo* olarak G₀ ve G₁ lenfositlerinde oluşturulmaktadır. DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonundan sonra, G₀ ve G₁'deki anormallikler iki kromatitte de gözlenecek olup metafazda kromozom tipi kırıklar ve kromatid değişimleri ortaya çıkacaktır. Kromatid tipi kırıklar, S fazına bağlı klastojenler tarafından oluşturulan tek zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarıyla da oluşmaktadır [Albertini ve ark., 2000; Hagmar ve ark., 2004].

Çalışmamızda gözlenen bir anormallik de kardeş kromatidlerde birleşmedir. Kardeş kromatidlerde birleşme, kromozom kollarında terminal delesyon sonucunda karşılıklı birleşme şeklinde ortaya çıkmaktadır [Murli, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Araştırmamızda fragmentlere, disentrik kromozomlara, kromatid değişimlerine de rastlanmıştır. Fragmentler kromozomlardaki basit kırıklar sonucu meydana gelmektedir [Anwar ve ark., 1994]. Disentrik kromozomlar ise, iki kromozom kolu arasındaki füzyon sonucu oluşan traslokasyonlarla meydana gelmektedir. Disentrik kromozomlar, non-homolog kromozom kolları arasındaki füzyon veya homolog kromozomların iki kısa yada iki uzun kolu arasındaki füzyon ile gerçekleşebilmektedir. Kromatid değişimi, tipik olarak triadiyal veya quadriadiyal olarak gözlenmekte olan kromozomlar arası değişimlerdir [Satoh ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 2008b]. Yapmış olduğumuz çalışmada yapısal anormalliklerin yanı sıra sayısal anormallik de ortaya çıkmıştır. Poliploidi sayısal anormallik olarak değerlendirilmektedir. Bazı kimyasallar, topoizomera II enziminin aktivitesini engeller ve sonuçta poliploidiye neden olur. Bu enzim normalde, kardeş kromatidlerin ayrılmasında gerekli olan bir enzimdir [Sumner, 1995; Cummings ve ark., 1995; Sumner, 1998]. Topoizomera enzimi, mitoz bölünme sırasında

kromozomların karşılıklı kutuplara çekilmesinde çok önemli bir rol oynar. Kromozom kondensasyonundan sonra, topoizomeraaz fonksiyonu engellenirse, hücreler metafazda kalır ve kromatidler kutuplara ayrılamaz ve sonuçta kromozom artışı olur [Clarke ve ark., 1993].

Farklı gıda katkı maddeleri ile yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer sonuçlara rastlanmıştır.

Yılmaz (2008), sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/ml'lik, fosforik asitin 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/ml'lik ve kalsiyum propiyonatın 50, 100, 200 ve 1000 µg/ml'lik dozlarının genotoksik etkilerini insan lenfosit hücrelerinde kromozom anormalliği (KA) testi ile araştırmıştır. Bu maddelerin kromozomal anormallik frekansını kontrole göre önemli oranda arttırdığı ve kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme ve poliploidi gibi anormalliklerin oluşmasına neden olduğu açıklanmıştır [Yılmaz, 2008].

Bifenilin 10, 30, 50 ve 70 µg/ml konsantrasyonlarının genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği testi ile incelenmiştir. Araştırma sonucunda bifenilin 50 ve 70 µg/ml'lik konsantrasyonlarda yapısal kromozom anormalliği sayısını çözücü kontrole göre arttırdığı, kromatid ve kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi ve halka kromozom gibi anormalliklerin oluşmasına neden olduğu saptanmıştır [Parlak, 2007].

Ağartıcı olarak kullanılan potasyum bromatın, insan lenfositlerinde tüm sürelerde ve konsantrasyonlarda (400, 450, 500, 550 µg/ml) kromozom anormalliği frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. Bu artış pozitif kontrol olarak kullanılan MMC'nin neredeyse 2 katı kadar gözlenmiştir. Potasyum bromatın insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom tipinde anormalliklerin artışına neden olduğu gözlenmiştir [Kaya ve Topaktaş, 2007].

Unda beyazlatma maddesi olarak kullanılan benzoil peroksitinin insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkisi kromozom anormallik (KA) testi ile

araştırılmıştır. Hücreler 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki benzol peroksit ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Benzol peroksitin insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen kromozom anormallik sayısını doza bağlı bir şekilde arttırdığı açıklanmıştır [Yavuz, 2005].

Arslan (2004), gıda katkı maddesi olarak kullanılan borik asitin 24 saatlik uygulamasının 400 µg/ml'lik dozunun dışında 600, 800 ve 1000 µg/ml'lik dozlarda ve tüm uygulama sürelerinde kromozomal anormallik frekansını doza bağlı olarak artırdığını vurgulamıştır. Borik asit, insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi ve poliploidi gibi anormalliklerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur [Arslan, 2004].

Antioksidan bir katkı maddesi olan ethoxyquin'in 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 ve 0,5 mM'lik konsantrasyonlarında genotoksik etkileri insan lenfosit hücrelerinde kromozom anormalliği (KA) testi ile incelenmiştir. Araştırmalar sonucunda ethoxyquin'in insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom gapları, kromatid ve kromozom kırıkları, disentrik, atipikal translokasyon ve poliploidi gibi anormalliklerin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir [Błaszczuk, 2003].

Yapılan araştırmalarda sodyum bisülfidin (Meng ve Zhang, 1994), sülfirik asitin (Meng ve Zhang, 1990) ve benzoik asitin (Vernole ve ark., 1987) kromozomal anormallik oranını artırdığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan gıda katkı maddeleri insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimlerinin frekansında artışlara neden olmuştur. Sodyum benzoat KKD frekansını tüm doz ve sürelerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttırmıştır. Potasyum benzoat ise 24 saatlik uygulamada 62,5 µg/mL hariç diğer tüm doz ve sürelerde KKD frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmıştır.

Kardeş kromatid değişiminin yüksek sıklıkta olduğu hücrelerin saptanması, mutajenik ve karsinojenik ajanların belirlenmesinde hassas bir göstergedir. KKD, yeni eşleşmiş kromatid ve bunun kardeş kromatidi arasında karşılıklı değişimlerle sonuçlanan S fazıyla ilişkili bir tamir işlemidir [Bozkurt ve ark., 2004]. KKD'nin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, DNA'daki hataların ve yalnız DNA onarımlarının KKD'ye neden olduğu düşünülmektedir. Buradaki tamir işlemi, homolog rekombinasyon yoluyla yapılmaktadır, fakat burada homolog olmayan uçların birleşmesiyle onarım mekanizması da görev yapmaktadır. Bu ikinci mekanizma, yüksek düzeyde sekans (DNA dizisi) homolojisi gerektirmeden kırık olan komşu DNA uçlarını tamir ederken, homolog rekombinasyon mekanizması, tamir işlemini gerçekleştirebilmek için tam bir homolog sekansa ihtiyaç göstermektedir [Bozkurt ve ark., 2004; Aydemir ve ark., 2005]. Ayrıca kardeş kromatid değişimi, çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan ve duyarlılığı yüksek olan sitogenetik bir testtir. Özellikle DNA'da çapraz bağlanmalara yol açan ajanlar, kardeş kromatid değişimi frekansını artırmaktadır. Kardeş kromatid değişiminin oluşum mekanizmasında, DNA tek zincir kırıkları etkin bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, DNA tek zincir kırıklarının önlenmesinde görev alan XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerde meydana gelen anormallikler de kardeş kromatid değişimine neden olabilmektedir [Wilson III ve Thompson, 2007].

Bir çok gıda katkısının KKD oranını anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Yılmaz (2008), gıda katkı maddelerinden sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/ml'lik, fosforik asitin 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/ml'lik ve kalsiyum propiyonatin 50, 100, 200 ve 1000 µg/ml'lik dozlarının genotoksik etkilerini insan lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ile incelemiştir. Sitrik asit (24 saatlik uygulamada, 50 µg/ml hariç), fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatin KKD frekansını tüm doz ve sürelerde kontrole göre önemli oranda arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca sitrik asitin 3000 µg/ml'lik dozu 24 ve 48 saatlik uygulamada, kalsiyum propiyonatin ise 1000 µg/ml'lik dozu 48 saatlik uygulamada toksik etki göstermiştir [Yılmaz, 2008].

Mpountoukas ve ark. (2008), potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitritin 8 mM, 4mM, 2mM, 0.2mM ve 0.02 mM'lık konsantrasyonlarındaki sitogenetik etkilerini, insan lenfositlerinde araştırmışlardır. Potasyum sorbatın 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarda, sodyum benzoatın ise 8 mM'lık konsantrasyonda KKD frekansını kontrole göre önemli miktarda artırdığını saptamışlardır. Ancak potasyum nitritin kullanılan konsantrasyonlarda KKD frekansına herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir [Mpountoukas ve ark., 2008].

Gıdalarda koruyu olarak kullanılan bifenilin insan periferik lenfositlerindeki genotoksik etkileri kardeş kromatid değişim testi ile incelenmiştir. Bifenilin 10, 30, 50 ve 70 µg/ml konsantrasyonlarında hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde KKD oranını doza bağlı olarak arttırdığı fakat bu artışın pozitif kontrol kadar olmadığı belirlenmiştir [Parlak, 2007].

Yavuz (2005), benzoil peroksitin 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki genotoksik etkisini kardeş kromatid değişim testi ile araştırmıştır. Bu katkı maddesinin genel olarak KKD'yi arttırdığı, ancak bu artışın sadece en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) ve 48 saatlik muamele süresinde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır [Yavuz, 2005].

Yapılan KKD testi sonuçlarına göre sodyum bisülfidin (Meng ve Zhang, 1994) ve sülfirik asitin (Meng ve Zhang, 1990) KKD oranını artırdığı belirlenmiştir.

Çeşitli gıda katkı maddelerinin kromozom düzeyinde meydana getirdikleri hasarlar, ya kromozom anormallikleri testi ya da mikronükleus testi ile değerlendirilmektedir. Sitokinezin bloke edildiği mikronükleus testi (CBMN), insan lenfositlerinde mikronükleus frekansını belirlemek için son yıllarda yaygın şekilde kullanılan bir metottur. Bu test ile ilgili protokol Fenech (2000) tarafından detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Araştırmamızda kullanılan gıda katkı maddelerinin, mikronükleus oluşumunu da tetiklediği belirlenmiştir. Sodyum benzoat, en düşük iki doz (6,25 µg/ml ve 12,5 µg/ml) haricinde diğer tüm dozlarda MN frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmıştır. Potasyum benzoat ise en düşük doz

(62,5 µg/ml) haricinde diğer tüm dozlarda MN frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır.

Mikronükleuslar, çekirdek bölünmesi sırasında ana çekirdeğe katılmayan kromozom fragmentlerinden ya da bütün kromozomlardan köken almaktadır. Bu yapılar, interfaz sırasında, sitoplâzmada küçük ve ekstra çekirdekler şeklinde gözlenirler. Bölünen hücrelerde MN oluşumu, tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş DNA hasarlarından veya iç ipliği, kinetokor, ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından kaynaklanır. Bu tür hasarlar, oksidatif stres, klastojen veya anöjenlere maruziyet sonucunda, hücre bölünmesinde görev yapan genetik kontrol noktalarında ve/veya DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalardan ya da DNA metabolizması ve kromozom segregasyonu için gerekli kofaktörlerdeki eksiklikten de kaynaklanabilir. Bütün bu olaylar, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, değişmiş gen ekspresyonları veya anöploidi gibi yollarla MN oluştururlar [Fenech, 2000]. Bütün bu yapılar, kanser vakalarında görülen kromozom düzensizlikleri ile bir ilişki oluşturmaktadır [Umegaki ve Fenech 2000; Fenech, 2002; Ames ve Wakimoto, 2002; Fenech ve ark., 2003; Rajagolpan ve ark., 2004; Bonassi ve ark., 2007]

Mikronükleus testi, gıda katkı maddelerinin genotoksik özelliklerinin belirlenmesinde başka araştırmacılar tarafından da kullanılmışlardır.

Yılmaz (2008), gıda katkı maddeleri olarak kullanılan sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/ml'lik, fosforik asitin 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/ml'lik ve kalsiyum propiyonatın 50, 100, 200 ve 1000 µg/ml'lik dozlarının genotoksik etkilerini insan lenfosit hücrelerinde mikronükleus (MN) testi ile araştırmıştır. Bu maddelerin mikronükleus frekansını tüm doz ve uygulamalarda kontrole göre arttırdığını belirtmiştir. Ayrıca sitrik asitin 3000 µg/ml'lik dozunda ve kalsiyum propiyonatın 1000 µg/ml'lik dozunda insan lenfosit hücrelerinde toksik etki gösterdiğini bildirmiştir [Yılmaz, 2008].

Parlak (2007), bifenilin 10, 30, 50 ve 70 µg/ml konsantrasyonlarının genotoksik etkilerini insal periferik lenfositlerinde mikronükleus testi ile incelemiştir. Araştırma sonucunda bifenilin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde mikronükleuslu binükleer hücre sayısını doza bağlı olarak arttırdığı ancak bu artışın pozitif kontrol kadar olmadığı vurgulanmıştır [Parlak, 2007].

Gıda katkı maddeleri olan sodyum benzoat (0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,8 mg/ml), potasyum sorbat (0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml), sitrik asit (1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml), benzoik asit (0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml) ve sodyum nitritin (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml), mutajenik etkisi *in vitro* mikronükleus testi kullanılarak incelenmiştir. Sodyum benzoatın ve potasyum sorbatın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği açıklanmıştır. Ancak bu araştırmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla uyuşmamaktadır. Araştırmamızda daha düşük dozların bile MN oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Sodyum nitritin 0,001 mg/ml, 0,01 mg/ml ve 0,1 mg/ml'lik dozlarında kontrole göre anlamlı olduğu saptanmıştır. Benzoik asitin ise her iki dozunun kontrolden farkı görülmemiştir ancak bu iki doz kendi içinde değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlenmiştir [Özdemir, 2006].

Yavuz (2005), benzol peroksit ile yapmış olduğu araştırma sonucunda bu maddenin insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumunu arttırdığını, ancak bu artışın yüksek iki konsantrasyonda (75 µg/ml ve 100µg/ml) ve 48 saatlik muamele süresinde kontrole göre önemli düzeyde olduğu saptanmıştır [Yavuz, 2005].

Gıdalarda renklendirici olarak kullanılan brillant siyahı ve quinoline sarısının 8,67; 86,7 ve 867 mg ml⁻¹ konsantrasyonları insan lenfositlerinde kontrole göre tüm uygulamalarda MN frekansını artırdığı belirlenmiştir. Bu iki maddeden Brillant siyahının quinoline sarısına göre daha fazla MN oluşumuna sebep olduğu saptanmıştır [Macioszek ve Kononowicz, 2004]. Meng ve Zhang (1994), 5x10⁻⁵ M'dan 2x10⁻³M konsantrasyona kadar çeşitli dozlarda sodyum bisülfidin insan periferik lenfositlerde mikronükleus frekansını arttırdığını belirtmişlerdir [Meng ve

Zang, 1994]. Gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in ise mikronükleus oluşumunu indüklediği saptanmıştır [Borrito ve ark. 2004].

In vivo ve *in vitro* koşullarda, kimyasal maruziyete bağlı olarak oluşan en önemli hücresel cevap, hücre siklusunun gecikmesi ya da engellenmesidir. Mitotik indeks, hücre proliferasyonunun ve sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan önemli göstergelerden biri olup, sitogenetik bir test olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Anderson ve ark., 1988; Scott ve ark., 1991, Eroğlu ve ark., 2007]. Sitotoksitenin bir göstergesi olan mitotik indeksteki düşüş, bu çalışmada kullanılan maddelerde farklı derecede ortaya çıkmıştır. Sodyum benzoat 24 saatlik uygulamada 6,25 µg/mL hariç diğer tüm doz ve sürelerde mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı oranda düşürmüştür. Potasyum benzoat ise 24 saatlik uygulamada en düşük iki doz haricinde (62,5 µg/mL ve 125 µg/mL) diğer tüm doz ve sürelerde mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı oranda düşürmüştür. Mitotik indeksteki azalma, hücrelerin mitotik girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesine ya da ATP seviyesinde azalma ve enerji üretim merkezindeki bozukluğa bağlanmaktadır. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iğ oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması ve G2 periyodunun uzaması da gösterilmektedir [Jain ve Andsorbhoy, 1988; Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006].

Çeşitli gıda katkılarının mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir. Sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonat (Yılmaz, 2008), potasyum bromat (Kaya ve Topaktaş, 2007), benzol peroksit (Yavuz, 2005), borik asit (Arslan, 2004) ve sodyum bisülfid (Meng ve Zhang, 1994) insan periferik lenfositlerinde mitotik indekste düşüşe neden olmuşlardır. Bifenilin ise (Parlak, 2007) mitotik indeksi etkilemediği açıklanmıştır.

Yaptığımız çalışma sonucunda Sodyum benzoat ve Potasyum benzoat'ın replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (Nİ) üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Replikasyon indeksinde herhangi bir değişiklik olmaması, bu maddelerin

hücre bölünmesinde daha ziyade, sentez safhasından sonra etkili maddeler olduğunu göstermektedir [Soloneski ve ark., 2002, Çelik ve ark., 2004]. Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi, genotoksik maruziyete bağlı olarak oluşan immün cevabın belirlenmesinde kullanılan önemli bir biyomarkır olan mitojen cevabın ölçülmesini sağlar [Fenech, 2007]. Bu indeksler, farklı çevre koşullarında, çeşitli ajanların, kısa süre içinde, genotoksik ve mutajenik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır [Eroğlu ve ark., 2007].

Replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksini bizim çalışmamızdaki gibi bazı gıda katkı maddeleri de etkilememiştir. Sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonat (Yılmaz, 2008) insan periferik lenfositlerinde replikasyon ve nükleer bölünme indeksini etkilemeyen katkı maddeleridir. Bununla birlikte replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksini düşüren gıda katkı maddeleri de vardır. Bunlar Bifenil (Parlak, 2007), 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (Borrotto ve ark., 2004)'dir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir test metodu olan comet testi tek hücre alkali jel elektroforezi olarak da bilinmektedir. Bu test DNA hasarını ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metottur [Singh ve ark., 1988; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Garry ve ark., 2003; Poletta ve ark., 2008]. Comet testi sadece DNA hasarlarını değil, çıkarmayla yapılan DNA onarımı sırasında, DNA ipliğinde meydana gelen kırıklardan kaynaklanan migrasyonu ölçmede de kullanılmaktadır [Green ve ark., 1992].

Sodyum benzoat, comet testinde kuyruk yoğunluğunda 50 µg/mL'lik doz hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artışa neden olmuştur. Kuyruk uzunluğunda ise sadece 25 µg/mL'lik dozda anlamlı düzeyde artış sağlamıştır. Potasyum benzoat, kuyruk uzunluğunu tüm dozlarda kontrole göre arttırmıştır ancak istatistiksel olarak sadece en yüksek doz anlamlıdır.

Bazı gıda katkı maddelerinin DNA hasarını indükleyip indüklemedikleri comet testi ile analiz edilmiştir. Yılmaz (2008), sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum

propiyonatin *in vitro* genotoksik etkilerini comet testini kullanarak araştırmıştır. Sitrik asitin (50, 100, 200 ve 3000 µg/ml) sadece en yüksek konsantrasyonda DNA hasarını anlamlı düzeyde arttırdığı ve 3000 µg/ml'lik dozun toksik etki gösterdiği; fosforik asitin (25, 50, 100 ve 200 µg/ml) DNA hasarını tüm dozlarda kontrole göre anlamlı oranda artırdığı ve en yüksek doz olan 200 µg/ml'deki DNA hasarının miktarının kontrolün yaklaşık 9 katı olduğu ; benzoik asit (50, 100, 200 ve 500 µg/ml) uygulanan tüm dozlarda DNA hasarını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığı ve kalsiyum propiyonatin (50, 100, 200 ve 1000 µg/ml) kuyruk yoğunluğunu en düşük doz hariç, kuyruk uzunluğunu ise tüm dozlarda kontrole göre önemli miktarda arttırdığı açıklanmıştır [Yılmaz, 2008]. Blaszczyk (2006), antioksidan bir katkı maddesi olan ethoxyquin'in 1-250 µM'lık dozlar arasında DNA hasarını kontrole göre ve doza bağlı olarak önemli miktarda artırdığını belirlemiştir [Blaszczyk, 2006]. Macioszek ve Kononowicz (2004), renklendirici olarak kullanılan brillant siyahı ve quinoline sarısının 8,67; 86,7 ve 867 mg ml⁻¹ konsantrasyonlarının izole insan lenfositlerindeki DNA hasarını, kontrole göre tüm uygulamalarda artırdığını comet test yöntemiyle gözlemişlerdir [Macioszek ve Kononowicz, 2004].

Bu çalışmada kullanılan sodyum benzoat ve potasyum benzoat gıdalarda sıklıkla kullanılan antimikrobiyal maddelerdir. Yaptığımız araştırma sonucunda bu maddeler belirlenen dozlarda insan lenfositlerinde genotoksik etki göstermiştir. Bu maddelerin genotoksik etki mekanizması tam olarak bilinmemekte olup, yapılan çalışmalarda XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların, DNA'da tek zincir kırıklarına neden olduğu saptanmıştır [Wang ve ark., 2005]. DNA devamlı olarak endogenik ve ekzogenik mutajenler ve karsinojenlerle hasara uğramakta olup bu hasarlar baz-kesip çıkarma tamiri, yanlış eşleşme tamiri, nükleotit kesip-çıkarma tamiri ve çift iplik tamiri ile onarılabilir [Goode ve ark. 2002]. Onarılmamış DNA hasarı olan hücreler apoptosize veya kötü huylu tümör olma yoluna doğru ilerler. DNA hasar tamirinde bir deformasyon veya etkinlik düşüşü kanser gelişiminde önemli rol oynar. Son on yıl içerisinde DNA tamir genlerindeki bazı yaygın polimorfizimlerin DNA tamir kapasitesi ile, bir kişinin karsinojenlere karşı hassasiyetini belirlediği öne sürülmüştür [Goode ve ark., 2002; Patel ve ark., 1997] . XRCC1 proteini, parçalanmış lezyonlar ve önemli

olmayan küçük DNA hasarlarının onarımında büyük bir öneme sahiptir [Goode ve ark. 2002]. PARP-1 enzimi DNA tamirinden sorumlu olup, aşırı aktive olduğunda apoptoz ve nekroza sebep olan nükleer bir enzimdir [Roy ve Cordone, 2002]. PARP-1 aktivitesinin eşik düzeyine göre, DNA tamiri, apoptoz veya nekroz oluşur [Cory ve Adams, 2002]. Bu araştırmada kullanılan gıda katkı maddeleri bu enzimlerin fonksiyonlarına etki ederek DNA' da tek zincir kırıklarına neden olduğu düşünülebilir.

Alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan mutajenik hasar, hücrenin alkilleyici ajanla maruziyeti ve hasarın biyolojik olarak ortaya çıkışı arasında çeşitli mekanizmalardan etkilenmektedir. *In vivo* veya *in vitro* da DNA lezyonunun oluşumunda kimyasalın kendisinin veya metabolitinin kimyasal veya enzimatik modifikasyonuna yol açan bir etkileşim olabilir. Daha sonra bu lezyon DNA tamiri ile modifiye edilebilir veya replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasına devam edebilir. Bunun sonucunda hücresel seviyede hücre ölümüne veya mutasyonlara yol açarak DNA bütünlüğünün bozulmasına sebep olabilir [Friedberg, 1985; Sanderson ve Shiled, 1995]. Alkilleyici ajanlar çeşitli organizmalarda hem mutajenik hem de karsinojenik etki gösterirler. Bu kimyasalların makromoleküllerle doğrudan reaksiyonu mutajenite mekanizmalarının çalışılmasını kolaylaştırmaktadır. Araştırmalar sonucunda preklatojenik DNA lezyonlarının alkilleyici ajanlar ve özellikle metilleyici bileşikler tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Bu ajanlar yaygın olarak kullanılan çevresel karsinojenlerdir. N- ve O-alkilasyon lezyonları klatojenik ve rekombinojenik olarak kabul edilmektedir. Bu DNA lezyonları hem KA hem KKD'ye neden olmaktadır [Peto ve ark., 1985, Beranek, 1990; Teicher, 1997; Kaina, 1998].

Sodyum benzoat ve potasyum benzoat *in vitro* koşullarda insan lenfositlerinde klatojenik, mutajenik, aneujenik ve sitotoksik etki göstermiştir. Bu katkı maddelerinin kullanımında çok dikkatli olunması gerektiği açıktır. *In vivo* çalışmalarla bu sonuçlar desteklenirse bu maddelerin kullanımının sınırlanması sağlanabilir. Gıda katkıları konusunda hem üreticilerin hem de tüketicilerin bilinçli

olması şarttır. Üreticiler doğal katkı maddelerini sınırlı miktarda kullanmaya özen göstermeli, tüketiciler ise daha çok taze gıdaları tercih etmelidir. Bu konudaki kontrol mekanizmaları daha etkili olmalıdır. Elbette bütün bunlar yapılsa bile kimyasal gıda katkılarından etkilenmenin önüne geçilemez. Ancak maruz kaldığımız kimyasal sayısını ve oranını ne kadar azaltabilirsek sağlığımızı o kadar korumuş oluruz.

Gıda endüstrinin gelişmesine paralel olarak; besin üretiminin, işlenmesinin, çeşitliliğinin ve tüketiminin artması gıdalarda GKM'nin kullanımını oldukça yaygınlaştırmış, adeta bir zorunluluk haline getirmiştir. Gıda katkı maddelerinin kullanımında görülen bu hızlı artış insan sağlığına yönelik bazı riskleri de beraberinde getirmektedir. Dünya nüfusunun hızla artması, çevre kirliliği, ekonomik yetersizlik ve eğitim eksikliği beslenme sorunlarını olumsuz etkilemekte ve güvenli gıda teminini zorlaştırmaktadır. Tüketim alışkanlıklarındaki genel değişim, gıda üretim merkezlerine gerekli yatırımların yapılamaması, yetersiz mevzuat, denetim uygulamalarının eksikliği gibi nedenler de gıda üretiminde riskleri oluşturmaktadır. Buna ilaveten gıda güvenliğine ilişkin uygun standartların konmaması ya da uygulanmaması, üretim aşamasındaki risk değerlendirmesinin yapılamaması, kişisel hijyen kurallarının yeterince uygulanmaması da diğer risk faktörlerini oluşturmaktadır. GKM'lerin insan sağlığını tehdit etmesini engellemek amacıyla alınması gereken tedbirlerin başında, bu maddelerin yönetmeliklerde izin verilen dozların üzerinde kullanılmasının denetlenmesi gelmektedir. GKM'lerin uzun süre ve yüksek dozlarda kullanılmaları durumunda bazı alerjik reaksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. Bu tür katkı maddelerinin oluşturdukları olumsuz etkilerin önlenmesi için yasal çerçeve içerisinde belirtilen dozlarda kullanılmaları, gıdaların etiketlerinin üzerinde tüketiciyi bilgilendirici ve uyarı amaçlı içerik bilgileri bulunması gerekmektedir. Ayrıca yasal kontrol organlarının gıda üretiminin değişik aşamalarında ve son üründen örnek alarak katkı maddelerinden gelebilecek sağlık risklerine karşı üreticileri uyarmaları, tüketicileri korumaları ve bilinçlendirmeleri gerekir. Özellikle gerek hammadde

gerekse ilave edilecek yardımcı madde ve katkı maddeleri, üretime alınmadan gerekli denetimden ve genotoksisite testlerinden geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abe, S., Sasaki, M., “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals”, *J. Natl. Cancer I.*, 58(6): 1635-1641 (1977).
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, 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): 111–172 (2000).
- Akın, A., Sümer, S., “The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the *Salmonella* microsome test system”, *Microbiyol Bul.*, 25(1): 94-107 (1991).
- Anderson, D., Jenkinson, P.C., Dewdeney, R.S., Franis, A.J., Godbert, P., Butterworth, K.R. “Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of U.K. population”, *Mutat. Res.*, 204: 407–420 (1988).
- Antunes, L.M.G., Pascoal, L.M., Bianchi, M.L.P., Dias, F.L., “Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures”, *Mutat. Res.*, 585(1-2): 113-119 (2005).
- Anwar, W.A., Salama, S.I., El 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).
- Ames, B.N., Wakimoto, P. “Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? ”, *Nat. Rev. Cancer*, 2: 694-704 (2002).
- Arslan, M., “Borik asit’in 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).
- Aydemir, N., Çeliker, S., Bilaloğlu, R., “*In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 582: 35-41 (2005).
- Basler, A., Von der Hude, W., Scheutwinkel, M., “Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties”, *Food Chem. Toxicol.*, 25(4): 287-290 (1987).
- Bateman B, Warner JO, Hutchinson E, Dean T, Rowlandson P, Gant C, Grundy J, Fitzgerald C, Stevenson J., “The effects of double blind, placebo controlled, artificial food colorings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children”, *Arch Dis Child.*, 89(6): 506-511 (2004).

Beranek D.T., "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents", *Mutat. Res.*, 231: 11-30 (1990).

Bhattacharya, K., Yadava, S., Papp, T., Schiffmann, D., Rahman, Q., "Reduction of chrysotile asbestos-induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes by garlic extract", *Toxicol. Lett.*, 153(3): 327-332 (2004).

Blaszczyk, A., "DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes", *Toxicol. Lett.*, 163(1): 77-83 (2006).

Blaszczyk, A., Osiecka, R., Skolimowski, J., "Induction of chromosome aberrations in cultured human lymphocytes treated with ethoxyquin", *Mutat. Res.*, 542(1-2): 117-128 (2003).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", *Mutat. Res.*, 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degraffi, 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).

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans", *Carcinogenesis*, 28(3): 625-631 (2007).

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(2): 187-193 (2004).

Bozkurt, G., Abay, E., Ateş, İ., Karaboğaz, G., Türe, M., Savran, F.O., Palandüz, S., Temocin, K., Algüneş, Ç., "Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors", *Mutat. Res.*, 558(1-2): 137-144 (2004).

Briggs DR. Food Additives. Wahlgvist ML(Ed)., Food and Nutrition, *Allen & Unwin Pty Ltd.*, Australia, (1997).

Bulduk, S., "Gıda Teknolojisi", *Detay Yayıncılık*, Ankara, 243-267 (2002).

Bulduk, S., "Gıda ve Personel Hijyeni İnsan Sağlığı İlgili Yasalar", *Detay Yayıncılık*, Ankara, 111-127 (2003).

Carrono, A.V., Natarajan, A.T., "Considerations for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques", *Mutat. Res.*, 204: 379-406 (1988).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Ergün, M.A., Arslan, O., Kasap, R., “*In vitro* effects of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes”, ***Mutagenesis***, 20(2): 101-104 (2004).

Clarke, D.J., Johnson, R.T., Downes, C.S., “Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks”, ***J. Cell Sci.***, 105(2): 563-569 (1993).

Cory S, Adams JM., “The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch”, ***Nat. Rev. Cancer*** 2(9): 647-656 (2002)

Cummings, J., Sumner, A.T., Slavotinek, A., Meikle, I., Macpherson, J.S., Smyth, J.F., “Cytogenetic evaluation of the mechanism of cell death induced by the novel anthracenyl-amino acid topoisomerase II catalytic inhibitor NU/ICRF 500”, ***Mutat. Res.***, 344(1-2): 55-62 (1995).

Dean, B.J., Danford, N., “Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells”, in: S. Venitt, J.M. Parry (Eds.), *Mutagenicity Testing-a Practical Approach*, ***IRL Press***, Oxford, 187–232 (1984).

Eroğlu, Y., Eroğlu, H.E., Ilbas, A.I., “Gamma ray reduces mitotik index in embriyonic roots of *Hordeum vulgare* L.”, ***Advan. Biol. Res.***, 1(1-2): 26-28 (2007).

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

Farombi, E.O., Onyema, O.O., “Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin”, ***Hum. Exp. Toxicol.***, 25 (5): 251-259 (2006).

Fenech, M., “The cytochinesis-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., “Chromosomal biomarkers of genomic instability relavent to cancer”, ***Drug Discov. Today***, 7(22): 1128-1137 (2002).

Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death”, ***Mutat. Res.***, 600(1-2): 58-66 (2006).

Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, ***Nat. Protoc.***, 2 (5): 1084-1104 (2007)

Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cossand, P., DeSaint Blanguat, G., “Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid”, *Toxicol. In vitro.*, 14 (5): 423-428 (2000).

Fimognari, C., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., “Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures”, *Mutat. Res.*, 582(1-2): 1-10 (2005).

Flack, 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)

Forni, A., “Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans”, *Toxicol. Lett.*, 72(1-3) 185-190 (1994).

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (eds), “DNA Repair and Mutagenesis”, *American Society for Microbiology (ASM) Press*, Washington DC, pp. 32–33 (1985).

Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., “Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay”, *Mutat. Res.* 534(1-2): 33-43 (2003).

Gomez-Arroyo S, Diaz-Sanchez Y, Meneses-Perez MA, Villalobos-Pietrini R, De Leon-Rodriguez J., “Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides”, *Mutat. Res.*, 466(1): 117-124 (2000).

Goode, E.L., Ulrich, C.M. and Potter J.D., “Polymorphism in DNA repair genes and associations with cancer risk”, *Cancer Epidem. Biomar.*, Prev, 11: 1513-1530 (2002).

Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V., Arlett, C.F., “UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique”, *Mutat. Res.*, 273(2): 137-144 (1992).

Güneşli, A., “Bazı Gıda Boyalarının Toksikolojik Etkileri”, Seminer, *A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı*, Ankara, (2000).

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).

Hagmar, L., Stromberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Lindholm, C., Norppa, H., “Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts”, *Cancer Res.*, 64(6): 2258–2263 (2004).

Hasegawa, M.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).

Holland, N.T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L.W., Blair, A., Hubbard, A., Smith, M.T., “Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo*”, **Mutat. Res.**, 521(1-2): 165-178 (2002).

Högstedt, B., “Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: A method for assessment of cytogenetic damage in man”, **Mutat. Res.**, 130(1): 63-72 (1984).

Ishidate, M. Jr., Odashima, S., “Chromosome test 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).

Internet: UNDP “Gıda ve Beslenme Bülteni”

[http://undp.un.org.tr/who/nutrition/beslenmevegidacover.htm/\(2002\)](http://undp.un.org.tr/who/nutrition/beslenmevegidacover.htm/(2002))

Jain, A.K., Andsorbhoy, R.K. “Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. III. Concluding Remarks”, **Cytologia**, 53: 427-436 (1988).

Ji, B. T., Silverman, D. T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G. M., Baris, D., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., Brown, L. M., Lillemoe, K. D., Schoenberg, J. B., Pottern, L. M., Schwartz, A. G., Hoover R. N., “Occupational Exposure to Pesticides and Pancreatic Cancer” **Am. J. Ind. Med.**, 39 (1): 92-99 (2001).

Jonasson, J.A., “Analysis and Interpretation of Human Chromosome Preparations, Rooney”, D.E., Czepulkowski, B.H., (Ed), **Human Cytogenetics Oilpress**, Oxford-Washington DC , 55-71 (1986).

Jos, A., Repeto, G., Rios, J.C., Del Peso, A., Salguero, M., Hazen, M.J., Molero M.L., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, J.M., Labrador, V., Camean, A., “Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints”, **Aquat. Toxicol.**, 71(2): 183-192 (2005).

Kaderlik, R.K., Lin, D.X., Long, N.P., “Advantages and limitation of laboratory methods for measurement of carcinogen DNA adducts for epidemiological studies”, *Toxicol. Let.*, 64: 469-475 (1992).

Kaina, B., “Critical steps in alkylation-induced aberration formation”, *Mutat. Res.*, 404(1-2): 119-124 (1998).

Kalender, S., “Sodyum Benzoat ve Tatrazinin Fare Dermal ve İnce Bağırsak Bağ Dokusu Mast Hücrelerinde Degranülasyon Etkileri”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, 1-74, (1997).

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

Kayraldız, A., “Sodyum metabisülfitin sıçan kemik iliği hücrelerinde *in vivo* genotoksik etkileri”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-67, (2005).

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).

Krishnaja, A.P., Sharma, N.K., “Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*”, *Teratog Carcinog Mutagen.*, Suppl 1: 99-122 (2003).

Litton Bionetics, Inc. Mutagenic evaluation of compound FDA 71-37, sodium benzoate. *NTIS Report* No. PB-245-453 (1974)

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., 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).

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).

Maurich, T., Pistelli, L., Turchi, G., “Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpanes purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes”, **Mutat. Res.**, 561(1-2): 75-81 (2004).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”, **Biochimie**, 88 (11): 1515–1531, (2006).

McKelvey-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: 47–63 (1993).

Meng, Z.Q., Zhang, L.Z., “Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide”, **Mutat. Res.**, 241(1), 15-20 (1990).

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).

Morgan, W.F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M.I., Limoli, C.L., Ponnaiya, B., “DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability”, **Mutat. Res.**, 404(1-2): 125-128 (1998).

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., Chakrabarti, J., “In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K-a non-nutritive sweetener”, **Food Chem. Toxicol.**, 35 (12): 1177-1179 (1997).

Murli, H., “Screening assay for chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells with Argentin 23”, **Final Report**, (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).

Nair, B., “Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid and sodium benzoate”, **Int. J. Toxicol.**, 20(3): 23-50 (2001).

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

Njagi, G.D., Gopalan, H.N., “Cytogenetic effects of the food preservatives sodium benzoate and sodium sulphite on *Vicia faba* root meristems”, **Mutat. Res.**, 102 (3): 213-219 (1982).

Obe, G., Preiffer, P., Savage, K.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folle, G.A., Drets, M.E., “Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution”, **Mutat. Res.**, 504(1-2): 17-36 (2002).

Oğan, H., “Gıda İnsan Sağlığı İlgili Yasalar”, **İstanbul Yayınevi**, İstanbul, 259-267 (1996)

Ohara, A., Mizuno, M., Danno, G., Kanazawa, K., Yoshioka, T., Nataka, M., “Mutagen formed from tryptophan reacted with sodium nitrite in acidic solution”, **Mutat. Res.**, 206 (1): 65-71 (1988).

Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., “Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay”, **Radiat. Res.**, 122: 69–72 (1990).

Özdemir, H., “ Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat, Sitrik Asit, Benzoik Asit ve Sodyum Nitrit’in Mutajenik Etkilerinin *In Vitro*’da Mikronükleus Tekniği Kullanılarak İncelenmesi ”, Yüksek Lisans Tezi, **Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Konya, 1-55, (2006)

Özkaya, İ., “ Gıda Katkı Maddeleri ve Toksinler ”, Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme, **İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri**, Sempozyum Dizisi, İstanbul, 41: 39-44 (2004).

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 bifenilin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 1-72, (2007).

Parry, E.M., Ballantine, J.A., Ellard, S., Evans, W.E., Jones, C., Kılıc, N., Lewis, R.I., “Biomonitoring Study of a Group of Workers Potentially Exposed to Traffic Fumes”, **Environ. Mol. Mutagen.**, 30: 119-130 (1997).

Patel R.K., Trivedi A.H., Arora D.C., Bhatavdeka, J.M, Patel, D.D., “DNA repair proficiency in breast cancer patients and their first degree relatives”, **Int. J. Cancer**, 73(1): 20-24 (1997).

Peto, R., Gray, R., Bantom, P., and Grosso, P., “N-nitroso compounds: occurrence, biological effects and relevance to human cancer”, *IARC Sci. Publ.*, 57: 627–655 (1985).

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., “*Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay”, *Mutat. Res.*, 650(2): 202-209 (2008).

Prival, M.J., Simmon, V.F., Mortelmans, K.E., “Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results”, *Mutat. Res.*, 260(4), 321-329 (1991).

Radack, K.L., Pinney, S.M., Livingston, G.K., “Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population-based study. ”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 26(1): 26-36 (1995).

Rajagolpan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C. “Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability”, *Nature*, 428(6978): 77-81 (2004).

Raposo, A., Carvalho, C.R. and Otoni, W.C. “Statistical and image analysis of sister chromatid exchange in maize”, *Hereditas*, 141(3): 318-322 (2004).

Roy N, Cardone MH., “The caspases: consequential cleavage. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death”, *Oxford: Oxford University Pres.*, p. 93-135 (2002).

Roychoudhury, A., Giri, K., “Effects of certain food dyes on chromosomes of *Allium cepa*”, *Mutat. Res.*, 223: 313-319 (1989).

Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., “Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment”, *Mutat. Res.*, 436(1): 99-112 (1999).

Saldamlı, İ., “Gıda Kimyası”, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 487-522 (1998)

Sanderson, B.J.S., Shield, A.J., “Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents”, *Mutat. Res.*, 355: 41-57 (1996).

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

Sarikaya, 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).

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).

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., Sofuni, T., “Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes”, *Mutat. Res.*, 504(1-2): 57-65 (2002).

Savage J.R.K., “Classification and relationships of induced chromosomal structural changes”, *J. Med. Gen.*, 12: 103–122 (1975).

Schlatter, J., Wurgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Halliger, 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).

Scott, D., Galloway, S., Marshall, R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., Myhr, B. “Genotoxicity under extreme culture conditions”, *Mutat. Res.*, 257: 147–205 (1991).

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).

Sivikova, K., Dianovsky, J., “Genotoxic activity of the commercial herbicide containing bifenox in bovine peripheral lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 439(2): 129-135 (1999).

Soloneski, S., Gonzales, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., “Effects of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. III. genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells”, *Mutat. Res.* 514: 201-212 (2002).

Speit, G. and Houptter, S., “On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted Chromosome, II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns, *Hum. Genet* , 70: 126-129 (1985).

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M., “ Evaluation of genetic effects of Apitol *in vitro* by measurement of sister chromatid exchange”, *Mutat. Res.*, 588: 152–157 (2005).

Sumner, A.T. “Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II”, *Chromosoma*, 107: 486-490 (1998).

Sumner, A.T.. “Inhibitors of topoisomerase II delay progress through mitosis and induce doubling of the DNA content in CHO cells”, *Exp. Cell Res.*, 217: 440-447 (1995).

Surjan, A., "Analysis of genotoxic activity of 16 compounds and mixtures by the *Drosophila* mosaic test" *Ann. Ist. Super Sanita.*, 25(4): 569-572 (1989).

Teicher, B.A., "Antitumor Alkylating Agents, in: V.T. De Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds) ", *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th edn., Lippincott-Raven, Philadelphia- New York, pp. 405-417 (1997).

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: guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221 (2000).

Tohda, H., Horaguchi, K., Takahashi, K., Oikawa, A., Matsushima, T., "Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cells for study of sister chromatid exchange and their evaluation as a test system", *Cancer. Res.*, 40(12): 4775-4780 (1980).

Tucker, J.D., Preston, R.J., "Chromosomes aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment ", *Mutat. Res.*, 365(1-3): 147-159 (1996).

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

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).

Umegaki, K., Fenech, M. "Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL-2 NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils", *Mutagenesis*, 15(3): 261-269 (2000).

Vernole, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Melino, G., Porfirio, B., Bonmasar, E., Nicoletti, B., "Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to 1-p-(3-methyltriazeno) benzoic acid potassium salt", *Mutat. Res.*, 208(3-4): 233-236 (1988).

Vernole, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Porfirio, B., Melino, G., Bonmasar, E., Nicoletti, B., "Cytogenetic effects of 1-p-(3-methyltriazeno) benzoic acid potassium salt on human lymphocytes *in vitro*", *Mutat. Res.*, 189(3): 349-356 (1987).

Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., Iliakis, G., "DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining", *Cancer. Res.*, 65(10): 4020-4030 (2005).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., "Molecular mechanism of sister chromatid exchange", *Mutat. Res.*, 616(1-2): 11-23 (2007).

Xing,W., Zhang, Z., “A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens”, *Mutat. Res.*, 241: 109-113 (1990).

Yavuz, A., “ Benzol peroksitin insan periferel lenfositlerinde *in vitro* genotoksik etkileri ”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-132, (2005).

Yılmaz, S., “Bazı Gıda Maddelerinin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-112, (2008).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., “Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*”, *Russ. J. Genet.*, 44(3): 273-278 (2008b)

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).

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).

Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., “*Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals”, *Environ Mol. Mutagen.*, 11(12): 1-158 (1988).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ZENGİN, Nazmiye
 Uyruğu : T.C.
 Doğum yeri ve tarihi : Trabzon, 1982
 Medeni hali : Bekar
 e-mail : nazozengin@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Eryaman Süper Lisesi	2000

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Görev
2005–2006	Türk Patent Enstitüsü	V.H.K.İ.
2006-2008	Anatolia Tüp Bebek Merkezi	Biyolog
2008-	Ankara Valiliği	V.H.K.İ.

Yabancı Dil

İngilizce

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Sodyum benzoat'ın genotoksik etkisinin belirlenmesi, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu 05/2008-54, **Yardımcı Araştırmacı**, 2008.