
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

GIDA KATKI MADDELERİNDEN D-SORBİTOL VE D-SORBİTOL-XYLITOL KARIŞIMININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Büşra GÜNEŞ
19/04/2024

GIDA KATKI MADDELERİNDEN D-SORBİTOL VE D-SORBİTOL-XYLITOL KARIŞIMININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Büşra GÜNEŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2024

ÖZET

D-Sorbitol (DS) ve D-Sorbitol ile Xylitol (DSX) karışımı gıdalarda tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanılan şeker alkolleridir. Bu çalışmada, sıklıkla tercih edilen bu iki tatlandırıcının insan periferal kan lenfositlerinde olası *in vitro* genotoksik etkileri Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatit Değişimi (KKD), Sitokinez Blok Mikronükleus Sitom (CBMN-Cyt) ve Comet testi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu tatlandırıcı maddelerin mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. DS'ün 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL'lik, DSX'in 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 1:1 ve 3:1; oranında karışımları kullanılmıştır. Her iki tatlandırıcı da yüksek konsantrasyonlarda kromozom anormallik frekansını önemli ölçüde artırmıştır. Hem DS (62,5 µg/mL hariç) hem de DSX tüm konsantrasyonlarda ve tüm uygulama sürelerinde kardeş kromatit değişimlerini artırmıştır. CBMN-Cyt testinde, iki madde de mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) görülme sıklığını kontrole kıyasla artırmıştır. Ancak bu artış sadece yüksek konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemlidir. Tüm muamelelerde mitotik indeks anlamlı olarak azalmış olup bu azalış sadece yüksek konsantrasyonlarda ve uzun uygulama sürelerinde anlamlıdır. Replikasyon ve nükleer bölünme indekslerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Comet testi sonuçlarına göre D-Sorbitolün tüm konsantrasyonları (kuyruk momentinde en düşük iki konsantrasyon hariç), DSX'de ise hemen hemen tüm konsantrasyonlarda (1:1 oranında sadece 1000/1000 µg / mL) comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini önemli düzeyde artırmıştır. DS ve DSX'in *in vitro* insan lenfositlerinde yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : Gıda katkı maddesi, Tatlandırıcı, D-Sorbitol, Xylitol, Genotoksisite, Kromozomal anormallikler, Kardeş kromatit değişimi, Mikronükleus-sitom, Comet testi
Sayfa Adedi : 119
Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF D-SORBITOL AND D-SORBITOL-XYLITOL MIXTURE USED AS FOOD ADDITIVES

(M. Sc. Thesis)

Büşra GÜNEŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2024

ABSTRACT

D- sorbitol (DS) and a mixture of D- sorbitol and Xylitol (DSX) are sugar alcohols used as sweetening additives in foods. In this study, possible *in vitro* genotoxic effects of these two frequently preferred sweeteners on human peripheral blood lymphocytes were investigated. Genotoxic effects were determined using Chromosomal Abnormality (CA), Sister Chromatid Exchange (SCE), Cytokinesis Block Micronucleus Cytome (CBMN-Cyt) and Comet tests. In addition, the effects of these sweeteners on the mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index (NDI) were also examined. Concentrations of DS at 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL and DSX at concentrations of 500 and 1000 µg/mL in 1:1 and 3:1 ratio mixtures were used. Both sweeteners significantly increased the frequency of chromosome abnormalities at high concentrations. Both DS (except 62.5 µg/mL) and DSX increased sister chromatid exchanges at all concentrations and all treatment periods. In the CBMN-Cyt assay, both substances increased the frequency of micronucleus (MN), nuclear bud (NBUD) and nucleoplasmic bridge (NPB) compared to the control. However, this increase was statistically significant only at high concentrations. Mitotic index was significantly decreased in all treatments and this decrease was significant only at high concentrations and long treatment times. No significant change was observed in replication and nuclear division indices. According to the results of the comet assay, all concentrations of D-Sorbitol (except for the two lowest concentrations in tail moment) and almost all concentrations of DSX (only 1000/1000 µg/mL at 1:1 ratio except) significantly increased comet tail density, tail length and tail moment. It was concluded that DS and DSX have genotoxic and cytotoxic effects in human lymphocytes *in vitro* at high concentrations.

Science Code : 20316
Key Words : Food additive, Sweetener, D-Sorbitol, Xylitol, genotoxicity, Chromosomal abnormalities, Sister chromatid exchange, Micronucleus-cytome, Comet test
Page Number : 119
Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini hiç esirgemeyen, değerli katkıları ile beni yönlendiren, sahip olduğu tecrübe, bilgi ve görüşleri ile bana yol gösteren, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a ve tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç.Dr. Sevcan MAMUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tecrübelerinden faydalandığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, Sayın Dr. Esra ERİKEL'e ve Sayın Arş. Gör. Ece AKBAŞ'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Sultan YILDIRIM'a ve yanı sıra tüm lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca beni her fırsatta hatırlayan, cesaretlendiren, yanımda olan can dostum ve ablam Ela Nilda AKDUMAN'a, her konuda destekçim olan, desteklerini her şekilde bana ulaştıran hayatıma katkı sağlayan tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

Her şeyden önce hayatım boyunca çok büyük destek gördüğüm, maddi ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim, bana insan olmanın hakikatini öğreten, varlıklarından onur ve gurur duyduğum sevgili annem Meryem GÜNEŞ ve sevgili babam Harun GÜNEŞ'e, her koşulda yanımda olup benim destekçim olan abim Emre GÜNEŞ'e ve en önemlisi varlığıyla sevgisini hissettirip neşesiyle hayatımı güzelleştiren kıymetli yeğenim Emir Harun GÜNEŞ'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Gıda Katkı Maddeleri 5

2.2. Gıda Katkı Maddelerin Kullanım Amaçları 5

2.3. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Düzenlemeler ve Standartları Oluşturan Kuruluşlar 6

2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Yasal Düzenlemesi ve Besinlere Katılacak Miktarların Belirlenmesi 9

2.4.1. Gıda katkısının maddelerinin kullanımı 11

2.5. Gıda Katkısının Uluslararası Sınıflandırma Sistemi (INS) ve E Kodu 12

2.6. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması 14

2.7. Tatlandırıcılar 14

2.7.1. Şeker alkolleri 16

2.8. Genetik Toksisite Testleri 20

2.8.1. Kromozomal anormallik (KA) testi 21

2.8.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi 23

2.8.3. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom / MN testi 24

Sayfa

2.8.4. Comet testi 29

2.9. D-Sorbitol (DS) ve Xylitol ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları 31

3. MATERYAL VE METOD 33

3.1. Materyal 33

3.1.1. Test materyalleri 33

3.2. Metod 35

3.3. Preparatların Hazırlanması 37

3.3.1. Kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) testleri 37

3.3.2. Kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi için preparatların hazırlanması .. 40

3.3.3. İzole edilmiş insan periferal lenfositlerinde comet testi 42

3.3.4. İstatistiksel analizler 44

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 47

4.1. DS (D-Sorbitol) Uygulaması 47

4.1.1. Kromozomal anormallik (KA) testi bulguları 47

4.1.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi bulguları 51

4.1.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi bulguları 54

4.1.4. Comet testi bulguları 58

4.2. DSX (D-Sorbitol ile Xylitol) Karışım Uygulaması 61

4.2.1. Krozomal anormallik (KA) testi bulguları 61

4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi bulguları 66

4.2.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi bulguları 69

4.2.4. Comet testi bulguları 72

5. TARTIŞMA 77

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 97

KAYNAKLAR 99

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ 119

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. D-Sorbitol'ün LD_{50} dozları 36

Çizelge 3.2. D-Sorbitol ile xylitol karışım dozları ve oran 36

Çizelge 3.3. DSX karışımında kullanılan oran ve konsantrasyonlar..... 37

Çizelge 4.1. DS'ün 24/48 saatlik uygulama sürelerinde insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları 48

Çizelge 4.2. DS uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi 52

Çizelge 4.3. DS'ün insan lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 55

Çizelge 4.4. DS uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı 58

Çizelge 4.5. DSX uygulamasının insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları üzerine etkisi 63

Çizelge 4.6. DSX'in insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi ... 67

Çizelge 4.7. DSX uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı, ve Nükleer bölünme indeksi, Nükleer tomurcuk ve Nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 70

Çizelge 4.8. DSX uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı 73

Çizelge 5.1. D- sorbitol ve DSX gıda tatlandırıcıları ile yapılan KA ve KKD test sonuçları 88

Çizelge 5.2. D- sorbitol ve DSX gıda tatlandırıcıları ile yapılan MN ve Comet test sonuçları 89

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflaması ve E kodları	13
Şekil 2.2.	Tatlandırıcıların sınıflandırılması	15
Şekil 2.3.	D-Sorbitolün kimyasal yapısı	17
Şekil 2.4.	Xylitol'ün kimyasal yapısı	18
Şekil 2.5.	Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki ve sonuçları	21
Şekil 2.6.	BrDU'nun katılımı ile mitoz bölünmeyi geçiren kardeş kromatidlerde görülen değişiklikler	24
Şekil 2.7.	Binükleat hücrede MN oluşumu	26
Şekil 2.8.	Hücrelerdeki MN oluşumu	26
Şekil 2.9.	CBMN **(**Cytokinesis Block MicroNucleus) testinde gözlenen MN, NPK dağılımları	27
Şekil 3.1.	D-Sorbitol'ün yapısal formülü	34
Şekil 3.2.	Xylitol'ün yapısal formülü	35
Şekil 4.1.	DS uygulamasında insan periferal lenfositlerinde oluşan anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi	49
Şekil 4.2.	DS uygulamasındaki insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkisi	49
Şekil 4.3.	DS ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı	53
Şekil 4.4.	DS ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri	54
Şekil 4.5.	DS'ün insan lenfositlerinde mikronükleus frekans üzerine etkisi	56
Şekil 4.6.	DS'ün insan lenfositlerinde, nükleer tomurcuk (%) üzerine etkisi	56
Şekil 4.7.	DS uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan Comet Kuyruk Yoğunluğu (%)	59
Şekil 4.8.	DS muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Uzunluğu (μm)	59
Şekil 4.9.	DS muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Momenti	60

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10. DSX uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi 64

Şekil 4.11. DSX uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi 64

Şekil 4.12. DSX ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki KKD frekansı 68

Şekil 4.13. DSX uygulaması ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri..... 69

Şekil 4.14. DSX'in 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi 71

Şekil 4.15. DSX'in insan lenfositlerinde nükleer tomurcuk (%) ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 71

Şekil 4.16. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Yoğunluğu (%)..... 74

Şekil 4.17. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Uzunluğu (μm)..... 74

Şekil 4.18. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Momenti 75

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Comet analizinden bir görüntü 44

Resim 4.1. DS uygulamasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik kromozom e) halka kromozom f) fragment g) poliploidi 50

Resim 4.2. DS uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri 53

Resim 4.3. DS uygulaması ile insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) iki mikronükleuslu binükleatlı hücre c) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre d) bir mikronükleslu iki nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre e) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre 57

Resim 4.4. DS uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA 61

Resim 4.5. DSX uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik e) halka kromozom f) kromatit değişimi g) fragment h) poliploidi 65

Resim 4.6. DSX uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri 68

Resim 4.7. DSX uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) iki mikronükleus binükleat hücre c) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre d) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre 72

Resim 4.8. DSX uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c1-c2) Çok hasarlı DNA 76

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
µM	Mikromolar
° C	Santigrat derece
g/mL	Mikrogram/ Mililitre
L	Mikrolitre
LD_{50}	Letal doz 50 ve/veya öldürücü doz
mA	Miliamper
mg/kg	Miligram/kilogram
mL	Mililitre
mM	milimolar
rpm	Devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ADI	Günlük alım miktarı
BN	Binükleat
BrdU	5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
CAS	Chemical Abstract Service
CBMN-Cyt	Sitokinez-blok Mikronükleus Sitom
CCFAC	Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi

Kısaltmalar	Açıklamalar
CHL	Çin hamsteri akciğer
CHO	Çin Hamsteri Ovaryum
CVD	Kardiyovasküler Hastalık
Cyt-B	Sitokalasin-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
DS	D-Sorbitol
DSX	D-Sorbitol-Xylitol Karışımı
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi Europen Food Safety Authority
EtBr	Etidyum bromür
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GKM	Gıda Katkı Maddesi
GMP	Uygun Üretim Teknolojisi
GRAS	Genelde güvenli kabul edilenler
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$HepG_2$	İnsan Karaciğer Kanser Hücresi
INS	Gıda Katkısının Uluslararası Sınıflandırma Sistemi The International Numbering System
JECFA	Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi
KA	Kromozomal anormallik
KA/Hücre	Hücre başına düşen kromozom anormalliği
KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LD50	Letal Doz
Mİ	Mitotik İndeks

Kısaltmalar	Açıklamalar
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
MN/Hücre	Hücre başına düşen mikronükleus sayısı
NaCl	Sodyum klorür
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NOAEL	Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon
NPK	Nükleoplazmik Köprü
NT	Nükleer Tomurcuk
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PBS	Fosfat tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
SCE	Sister chromatid Exchange
SCGE	Tek hücreli jel elektroforezi Single cell gel electrophoresis
SH	Standart hata
SSC	Salin sitrat tamponu Tri-Sodyum sitrat + Sodyum klorür
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü/ World Health Organization
XYL	Xylitol

1. GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri gıdalarda, işlemede kaybedilen tadı, dokuyu veya görünümü iyileştirmek, raf ömrünü uzatmak, lezzeti arttırmak, ekstra tat vermek ve daha çekici hale getirmek için kullanılır. Ayrıca bunlar modern gıda endüstrisinde gıda kalitesini sürdürmenin yanı sıra gıda güvenliğini sağlamak için de tercih edilir (Dikilitaş, Aksoy, 2018; Abdelmigid 2019).

Hazır gıda üretiminin ayrılmaz bir parçası olan gıda katkı maddelerinin önemli bir alt grubunu da tatlandırıcılar oluşturur. Tatlandırıcıların kullanımı yeniçağın başlangıcıyla birlikte giderek yaygınlaşmış ve son 30 yıl boyunca gelişmiş ülkeler başta olmak üzere kullanımlarındaki yükselişte belirgin bir artış gözlenmiştir. Yüksek oranda karbonhidrat tüketimi, özellikle de işlenmiş gıdalardan alınan şeker tüketimi insanlarda kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerinden biri olarak görülmekle birlikte; bu tür bir beslenme alışkanlığı obezite (şişmanlık), diabetes mellitus (şeker hastalığı), insülin direnci gibi sağlık sorunlarına katkıda bulunduğundan şekerler dışındaki tatlandırıcıların kullanımına olan ilgi giderek artmıştır (Altuğ, Elmacı, 2001; Moriconi, Feraco, Marzolla, Infante, Lombardo, Fabbri, Caprio, 2020; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022; Manuela Silva, Henrique Reboredo, Cebola Lidon, 2023; Eissa, Sebaei, Mohamed, 2024). Aroma verici, lezzet artırıcı ya da lezzetlendirici olmak üzere toplamda yaklaşık 6000 kadar farklı katkı maddesi bulunmakta ve bunlardan önemli bir grubunu tatlandırıcılar oluşturmaktadır (Danyer, Yörük, 2016). Tatlandırıcılar (aspartam, d-sorbitol, asesülfam K, xylitol, sakkarin vb.) aroma vermek ve tadı daha cazip hale getirmek, tatlı tadını (düşük kalorili veya kalorisiz alternatifler) sağlamak amacı ile şekere alternatif olarak kullanılır. Gıdaya şeker gibi tatlı bir lezzet veren ve şeker olmayan maddeler olarak da tanımlanan tatlandırıcılar, şekerin kimyasal yapısına benzemeyen farklı kimyasal yapılar içermesi nedeni ile çeşitli fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Örneğin, bazı tatlandırıcılar suda kolayca çözünebilirken bazıları suda çözünmeyebilir veya belirli sıcaklıklarda çözünme özellikleri gösterebilir. Kimyasal yapıları, çözünürlük, ısıya dayanıklılık ve tatlandırma yoğunluğu gibi özelliklerini belirler (Mortensen 2006; Larsen 2012).

Günümüzde besleyici olmayan tatlandırıcılar, sakkaroz gibi besleyici tatlandırıcıların yerine geçen gıda katkı maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Besleyici olmayan, düşük kalorili ancak tatlılığı koruyan çok sayıda tatlandırıcı, manuel olarak sentezlenmiş

veya doğrudan doğal bitkilerden ekstrakte edilmiştir. Böylece düşük veya sıfır kalorili olmaları nedeniyle güçlü bir tatlı hissi uyandırabilmekte ve yiyecek-içecek endüstrisinde besleyici şekerin yerini alarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Fernstrom, 2015; Zheng, Chang, Xu, Xu, Lin, 2019; Teysseire, Bordier, Beglinger, Wlnerhanssen, MeyerGerspach, 2024; García-Cordero, Ibarra, Ferreira, Rodriguez, Pateiro, Santos, 2024).

Günümüzde şekere alternatif olarak görülen tatlandırıcılar zayıflamak için diyetlerde kullanılarak aşırı kilo ve obeziteye karşı korunmak amacıyla, ya da diyabet hastalarınca ve hatta diş sağlığını korumak amacı ile de tercih edilmektedir (Tuncer 2011; Baines, y Seal., 2012; Carocho, Morales, Ferreira 2017; Manuela Silva, Henrique Reboredo, Cebola Lidon, 2023; Mahato, Magriplis, Sharma, Gamlath, 2024). Diyet reçetelerinin kullanımının artması piyasada bu tip düşük kalorili tatlandırıcı katılmış ürünlere ilgiyi ve üretimini artırmıştır (Altuğ, Elmacı, 2001; Hill, Belsito, 2003; Breiteneder, 2004; Hegde, Venkatesh, 2004; Koskela, Hyvarinen, Brannan, Chan, Anderson, 2004; Singh, Rasane, Kaur, Kumar, Dhawan, Mahato, Bhattacharya, 2020). Ancak bu tatlandırıcıların bazıları insanlar için potansiyel sağlık riski oluşturabilmektedir (Rezaei, Abadi, Sharifi, Karimi, Alimohammadi, Roostaei**,** 2015; Zahra, Nisa, Kalim, Fatima, Khan, Akhlaq, Butt, Hina, 2016; Naik, Pradhan, Sobhana, Shakappa, 2024).

Tatlandırıcıların gıdalarda gelişi güzel miktarda, tüzük dışı olarak kullanılmasının halk sağlığı açısından tehdit olabileceği düşünülür. Bu maddelerin kullanımı ve tüketimi çoğaldıkça bu bileşenlerin dağılım özellikleri, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmaya başlamıştır. Bunun yanında tatlandırıcıların normal tüketim miktarından daha yüksek miktarlarda tüketildiklerinde toksik olabilecekleri bildirilmektedir. Sağlığa zarar vermeyecek miktarda kullanılsa dahi, bu maddeler uzun vadeli kullanıldığında bir süre sonra vücutta birikerek sağlık sorunlarına yol açabilir, dokularda hasar oluşturabilir veya genotoksik etkileri olabilir (Özdemir, Turhan, Arıkoğlu, 2012; Ataseven, Yüzbaşıoğlu, Çelebi-Keskin, Ünal, 2016; Linke, Casagrande, Cardoso, 2018; Moriconi, Feraco, Marzolla, Infante, Lombardo, Fabbri, Caprio, 2020; Hedrick, Nieto, Grilo, Sylvetsky, 2023). Bu nedenle de gıdalardaki yapay tatlandırıcıların olası toksik etkilerinin kontrol edilmesinin gerektiği belirtilmektedir (Fındıklı, Turkoglu, 2014; Rezaei, Abadi, Sharifi, Karimi, Alimohammadi, Roostaei**,** 2015; Zahra, Nisa, Kalim, Fatima, Khan, Akhlaq, Butt, Hina, 2016; Mohammed, Abdelrazik, Anwar, Abdelgayed, 2024).

Genetik toksikoloji, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların insan sağlığı üzerindeki potansiyel risklerini anlamak için önemli bir alandır. Genotoksik ajanların genetik materyalle etkileşimlerinin tespit edilmesi genellikle kısa süreli genotoksisite testlerinin geliştirilmesine ve değerlendirilmesine neden olmuştur. Bu testler; potansiyel olarak zararlı maddelerin DNA'ya nasıl etki ettiğini anlamanın yanı sıra hasara tepki mekanizmasını ve organizmalar üzerindeki etkilerini de anlamayı sağlar. Çağımızda artık tüm dünyanın geçerliğini kabul ettiği, rutin olarak tercih edilen bu testler gıda katkı maddelerinin genotoksisite ve karsinojenik risklerininin tespitinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Böylece bu testler ile hücresel düzeydeki etkileri gözlemlenebilir ve potansiyel zararlı etkileri anlamak mümkün olabilir (Rodriguez-Garraus, Azqueta, Vettorazzi, Lopez de Cerain, 2020; Groff, Evans, Doak, Pfuhler, Corvi, Saunders, Stoddart, 2021; Ünal, Yüzbaşıoğlu, 2022; Mamur, 2022). Bu testler arasında en yaygın kullanılanları ise; kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronukleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleridir (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Bülbül, Ünal, 2022; Yüzbaşıoğlu, Mahmoud, Mamur, Ünal, 2022; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022; Yuzbasioglu, Dilek, Erikel, Unal, 2023).

Bu çalışmanın amacı, gıdalarda, kozmetik sektöründe ve ilaç endüstrisinde çok kullanılmasına rağmen genotoksisite verileri yönünden sınırlı sayıda araştırma olan tatlandırıcılardan D-sorbitol ve D-sorbitol/xylitol karışımının insan lenfositlerinde genotoksik etkilerini değerlendirmektir. Bu çalışma kapsamında kültüre alınmış insan periferal lenfositlerinde KA, KKD, CBMN-Cyt test yöntemleri ve izole edilmiş lenfositlerde comet testi kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Katkı maddesi terimi, Latince ‘addere’ olarak ifade edilen katmak kelimesinden türetilmiştir (Arslan 2011; Arkan 2020). Katkı maddesi genel anlamda, yalnız başına gıda olmayan, besleyici ya da takviye edici değeri olan ve/veya olmayan, seçilen teknoloji sebebiyle kullanılan, ancak gıdalara depolama esnasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, bakteriyel bozulmaya karşı mikrobiyolojik güvenliği sağlamak, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek, işleme, üretim ve ambalajlama gibi aşamalarda kasıtlı olarak eklenilen madde veya madde karışımı olarak ifade edilmektedir (Gallo 2020; Miao, Chen, Li, Xie, 2020). Amerika Birleşik Devleti’nde 1958 yılında onaylanan Gıda İlaç ve Kozmetik Yasası, Gıda Katkı Maddelerinin tanımını; “gıda ürünlerinin üretim süreçlerinde belirli bir amaçla kullanılan gıda içeriğine doğrudan veya dolaylı olarak dahil olan böylece gıdanın ürünü haline gelen ve karakteristikleri ile birlikte özelliklerini değiştiren maddeler” olarak tanımlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization/WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization/FAO) tarafından ortak olarak Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu ya da diğer adıyla Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission/CAC) tarafından, gıda katkıları için verilen tanım ise oldukça ayrıntılı ifade edilmektedir. Söz konusu tanımda; gıda katkı maddesi; "yalnız başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıda ürünlerinin tipik bir parçası olmayan (yardımcı yan madde olamayan), besleyici değeri olsun ya da olmasın, imalatı, işlenmesi, hazırlanması, uygulanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması ve saklanması gibi çeşitli koşulları, yiyeceklere teknolojik olarak sağlanan katılma ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak parçası haline gelen veya bunların özelliklerini içererek kalitesini değiştiren maddeler" olarak ifade edilmektedir (Altuğ, 2009; TGK 30 Haziran 2013 (sayı:28693); Kılıç-Altun, Aydemir, 2021; Gül, Öztürk, Güneş-Bayır, 2023; TGK 13 Ekim 2023(sayı:32338)).

2.2. Gıda Katkı Maddelerin Kullanım Amaçları

Gelişen teknoloji ile birlikte gıda sektöründe verim kaybının düşmemesi, ürün kalitesinin arttırılması veya standartlara uyumun sağlanması, dayanıklılık süresinin uzatılması ve ürün

çeşitliliğinin sağlanmasında gıda katkı maddeleri devreye girmektedir. Kullanım amaçları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Biçer ve Uçar, 2016; Yörük, Danyer, 2016; Yiğit, Uçar, 2023);

- Gıdaların tüketiciye ulaşıncaya kadar raf ömrünün uzatılması ve besin değerinin korunması
- Gıdaların duyusal (tat, koku, lezzet, görünüm) özelliklerini geliştirmek ve tüketiciler için daha cazip hale getirerek albenisini arttırmak,
- Hastalık nedeniyle özel diyetlere veya obeziteden korunmak amacı ile diyete ihtiyaç duyan bireylere özel gıda üretmek,
- Gıdaların dayanıklığını artırmak, sağlığa yararlı halini muhafaza etmek,
- Gıdalarda hastalığa neden olan mikroorganizmaların gelişimini önleyerek kalite karakteristiklerini korunmak
- Gıda çeşitliliğini farklı damak tatlarına uygun hale getirmek
- Gıdanın daha kısa sürede az maliyetle hazırlanmasını sağlamak
- İç besleyici değerini korumak

2.3. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Düzenlemeler ve Standartları Oluşturan Kuruluşlar

Gıda katkı maddeleri, besinlere bilinçli olarak eklenen maddeler olup bu maddelerin karakteristik özellikleri ve gıdalarda kullanım sınırları, dünya çapında uluslararası gıda güvenliği politikaları düzeyinde yapılan araştırmalarla ele alınan bir konudur. Günümüzde çok fazla sayıda kuruluş insan sağlığına uygunluğunu belirlemek için çeşitli araştırmalar yapmaktadır. Bu amaçla Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (FAO)'nün oluşturduğu Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) ve bu komisyonun gıda katkı maddeleri ile ilgili alt komitesi olan Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi (JECFA), gıda katkılarının depolanması, kullanım miktarı insan sağlığı açısından riskleri veya etkilerini değerlendirme ve de güvenilirliği konusunda çalışmalar yapmakta ve belirli miktarlarda kullanımında tehlike oluşturmadığı belirlenen maddelerle ilgili listeler hazırlamaktadır. Bu listelerde, tamamlayıcı ürün olarak kullanılan katkı maddelerinin kullanımında uyulması gereken standartlar belirlenmektedir (Karabal, 2022; Karle, Waghchaure, Rane, Kalamkar, Keservani, Shirode, 2024).

Gıdalar söz konusu olduğunda gıda katkı verimliliği, etkinliği ve kullanımıyla ilgili düzenlemeler yaparak tüketicileri korumayı amaçlayan uluslararası düzeyde kabul gören kuruluşlardan bazıları şunlardır (Karabal, 2022):

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)

Gıdalarla ilgili olması gereken gıda güvenliği ve fiyatlarının uluslararası standartlarını, normlarını oluşturarak düzenleme yapan ve ilgili yönerge veya dökümanların hazırlanmasında görev alan kuruluştur (Duru, Gül, Hayran 2019; Karabal, 2022).

Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi (CCFAC)

Katkı maddelerin kullanım sınırlarını ya da limitlerini belirler ve gıdalarda kullanılmasına izin verilebilecek maksimum miktarları belirleyen kuruluştur (Boğa, Binokay, 2010).

Birleşik (FAO/WHO) Gıda Katkıları Uzman Komitesi Komitesi (JECFA)

Katkı maddelerin insanlar için toksikolojik açıdan potansiyel tehlike oluşturabilecek olanları belirlemek için yürütülen analizlerle ilgili metotları tespit eder, yöntemlerini geliştirir ve bunların listelerini hazırlar (Luetzow, 2003; Sezgin, Ayyıldız, 2017; Gültekin, 2017). Yapılan çalışmalar FAO ve WHO tarafından, incelenen maddelerin sağlık üzerine etkilerini içeren analiz raporlarıyla açıklanır ve INS 'The International Numbering System-Uluslararası Numaralandırma Sistemi' adı verilen ve dünya genelinde kategorize etmek için kullanılan standart bir sisteme dahil edilir. WHO ve FAO, tarafından oluşturulan katkı maddeleri üzerinde çalışmalar yapan ortak uzmanlar komisyonu JECFA gıda katkılarıyla ilgili, güvenli kullanım sınırlarını belirleme ve değerlendirmede A, B, C listelerini oluşturur (Topçu, Yurttagül, Yücecan, 2005; Boğa, Binokay, 2010; Ekenci, Köksal, 2024). FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) gıda katkı maddeleri için GRAS (Genelde güvenli kabul edilen) listelerini oluşturur. Günlük alım miktarı (ADI), genellikle geniş kapsamlı toksikolojik çalışmaların sonuçlarına dayanarak belirlenen, ancak güncel bilgilere bağlı olarak değişebilen bir değerdir. Yapılan yeni bilimsel araştırmaların verilerine bağlı olarak günlük güvenli olarak tüketilebilecek miktar olan ADI değerinde değişiklikler yapılabilmektedir (Arslan, 2011; Sezgin, Ayyıldız, 2017).

JECFA'nın görevleri aşağıda belirtilen şekilde listelenebilmektedir (Pifferi, Restani, 2003; Arslan, 2011; Sezgin, Ayyıldız, 2017):

Gıda katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmeleri için standart yöntemleri belirleyen kuruluşları tayin eder.

Toksikolojik değerlendirmeleri özellikle bu maddelerin süreçlerini, etkilerini takip eden ve sonuçlarını değerlendirerek katkı maddelerinin günlük tüketimde alınabilecek güvenilir miktarı (ADI) belirler ve bir katkı maddesinin insanlar tarafından tüketilen gıdalardaki toplam alım miktarını belirlemede ve günlük alım miktarını belirlemede temel oluşturur.

Bu şüreçlerde katkı maddelerini ayrıntılı tanımlama ya da etiketleme yapılmasını, saflık kriterlerinin ve analiz metot yöntemlerinin oluşturulmasına katkı sağlar.

Yaygın olarak yapılan gıda tüketim taramaları sayesinde çeşitli toplumlarda, katkı maddelerinin günlük, haftalık veya yıllık olarak ne kadar tüketim yapıldığını belirler ve olası risklerin değerlendirilmesini yapar.

JECFA A Grubu

A kategorisi pozitif listedir ve bu listede gıda katkı maddelerin günlük alım miktarı oranları belirlenmiştir. Gıda katkı maddelerinden güncel olarak kullanılanlardır (Arslan, 2011; Gültekin, 2017).

a. Tüm incelemeler yapılarak günlük alınabilecek güvenli alım limitleri belirlenmiş ve kullanımı yasal olan,

b. İncelemeleri bitmemiş devam eden ancak günlük güvenilir alım limiti belirlenerek belirli bir süre geçici olarak kullanımına izin verilmiş olan maddeler bu kategoridedir (Boğa, Binokay, 2010).

JECFA B Grubu

B kategorisindeki katkı maddeleri değerlendirme aşamasında olup değerlendirme süreci tamamlanmamış olanlardır. Bu gıda katkı maddelerinin incelemeleri tamamen bitmemiştir (Gültekin, 2017; Çalışkan, 2021).

a. Maddeler için değerlendirme başlamış ancak günlük güvenilir alım düzeyleri henüz belirlenmemiştir.

b. Değerlendirilmeye alınma sürecinde bekletilen gıda katkı maddeleri bu grup içinde bulunmaktadır (Boğa, Binokay, 2010).

JECFA C Grubu

C kategorisi, katkı maddelerin kullanımına izin verilmeyen bir negatif listeyi ifade etmektedir (Gültekin, 2017). Bu kategoriye dahil olan maddeler, insan sağlığı açısından zarar oluşturabilme tehtidi nedeniyle veya toksikolojik araştırmalar sonucunda potansiyel tehlike olarak düşünüldüğünden yasal olmayan veya sınırlı ve özel şartlarda ve de dozlarda tüketilmesine izin verilen sakıncalı olan gıda katkılarıdır (Boğa, Binokay, 2010; Çalışkan, 2021).

2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Yasal Düzenlemesi ve Besinlere Katılacak Miktarların Belirlenmesi

Günümüzde toplum yapısı ve beraberinde tüketim alışkanlıklarının hızlı değişimesi sonucunda gıda katkılarının üretimi, çeşitliliği ve miktarında artışlar söz konusudur. Gıda katkı maddelerinin, hem doğal hem de yapay çeşitlerinin yanlış, bilinçsiz, kontrolsüz ve amacı dışında kullanılması ile insan sağlığı olumsuz etkilenebilmektedir (Carocho, Morales, Ferreira, 2015). Böylece kullanılan miktar, bir maddenin zehirlilik ve faydalılık durumunu belirler. WHO, FAO ve ilgili kuruluşlar tarafından ortaklaşa yürütülen çalışmalar ve bilimsel verilerden faydalanan her ülkenin yetkili kurum ve kuruluşları, katkı maddelerini ve kullanım miktarlarını kendi ülkelerinin şartlarına göre belirler (Atman, 2004). Türkiye'de, diğer ülkelerdeki gibi, gıda ile ilgili uygulamalar tamamen uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen düzenlemeler ve standartlar doğrultusunda yürütülerek denetlenmektedir. Bu süreç, "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği" tarafından açıklanmaktadır (Küşümler, Özgün,

2020). Bu maddelerin sağlık üzerindeki etkileri, güvenilir katkı maddelerinin tanıtılması ve güvenliği, çelişkili ya da şüpheli olanların yasaklanması amacı ile ilgili katkı maddeleri konusunda bir çok disiplini içeren uzun vadeli, kapsamlı, detaylı ve maliyetli testler kullanılmaktadır. Bu aşamada uygulanmakta olan prosedür 4 aşamadan oluşmaktadır (Boğa, Binokay, 2010; Küşümler, Özgün, 2020; Peterson, 2024):

1. aşama; Deney hayvanlarında kullanılan öldürücü doz (letal doz ya da LD_{50}): Katkı maddesi deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne sebep olacak miktarda madde verilir.

a. Doz miktarı kademeli olarak düşürülerek doz~yanıt ilişkisinin incelenmesi. Uygulanan farklı doz seviyelerindeki etkileri anlamak için; katkı maddesinin emilimlerini, metabolik etkileri ve atılımı araştırılır.

b. Deney hayvanlarının hücreleri, dokuları ve organları incelenerek, katkı maddesinin karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve alerjik etkileri sayesinde maddenin vücutta hangi düzeyde etkili olduğu, hangi dokuları etkilediği araştırılır.

2. aşama; Katkı maddesinde güvenli ve belirli bir doz seviyesinde etkisinin olmaması mümkün değilse, o katkı maddesinin gıdalara katılmasına izin verilmez.

3. aşama; hiçbir etkinin gözlemlenmediği bir doz bulunursa buna NOAEL (Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon) adı verilmektedir. NOAEL dozu belirlendikten sonra deney hayvanının ömrünün yüzde 85'ni kapsayan bir süre boyunca hayvanın vücudundaki çeşitli organlarda mutajenik, kanserojen, alerjik ve teratojenik etki oluşturmayan günlük doz, mg/kg (hayvanın kilogram cinsinden ağırlığı) cinsinden hesaplanır. Bu deney, etik nedenlerden dolayı insanlar üzerinde yapılamadığından, insanların kullanımında güvenlik faktörü kullanılır. İnsanlar için güvenli doz, laboratuvar hayvanlarında herhangi bir olumsuz etkiye neden olmayan dozun 1/100'ü olarak kabul edilmektedir.

ADI (Kabul edilen günlük alım)= NOAEL / 100. ADI insanın vücut ağırlığına göre miligram olarak hesaplanır. Günlük maksimum alım miktarı, ADI değeriyle vücut ağırlığının çarpımı ile hesaplanabilir. Bu hesaplama, bir kişinin alabileceği günlük olarak güvenli kabul edilen gıda katkı maddesi miktarını belirlemek için kullanılır.

4. aşama; Gıdaya eklenilecek katkı maddesinin maksimum miktarının saptanmasında Uygun Üretim Teknolojisi (GMP): bir gıda maddesinin üretim aşamasında kullanımının gerektirdiği miktarın ADI çerçevesinde belirlenmesidir. Bir gıda katkı maddesinin belirli bir gıdada kullanımının uygunluğunu değerlendirirken, ADI- değeri ile bu 'GMP' dikkate alınır.

Eğer GMP miktarı ile ADI değeri aşıyorsa, bu durumda katkı maddesinin gıdaya eklenmesi uygun görülmez. Bu, katkı maddesinin gıda üretimi aşamasında belirlenen maksimum kabul edilebilir seviyeyi aştığı anlamına gelmektedir (Boğa, Binokay, 2010; Küşümler, Özgün, 2020; Peterson, 2024).

2.4.1. Gıda katkısının maddelerinin kullanımı

Gıda katkı maddelerinde uyulması gereken genel kurallar vardır. Bu kurallar şu şekilde sıralanabilir (Martins, Sentanin, De Souza, 2019; Gül, Öztürk, Güneş-Bayır, 2023):

- Gıdaya eklenmesi planlanan, maddelerin özellikleri hakkında bilgi sahibi olunmalı ve canlı hücrelerde veya hücre dışında çalışmalar düzenlenmelidir. Gıda katkısı olarak tercih edilen maddeler spesifik özelliklerine göre tercih edilmeli ve tercih edilen gıda maddesinden başkası besine katılmamalıdır.
- Gıda katkısı olarak tercih edilen maddeler, spesifik özelliklerine göre seçilmeli ve bu maddeler yalnızca tercih edilen gıda maddesine katılmalıdır.
- Eklenen gıda maddesinin miktarı, güvenilir test yöntemleri kullanılarak belirlenmeli ve kontrolü yürütecek kurumlar tarafından denetlenmelidir.
- Katkı maddesi, besleyici niteliğine zarar vermeden besin değerinde kayıplara neden olmamalı veya besin değerini değiştirmemelidir.
- Gıda katkı maddelerinin hangi besine, ne kadar düzeyde ve hangi amaçlarla eklenebileceği, gıda katkı maddeleri kodeksi tarafından belirlenmiş olmalıdır. Belirlenen miktarlardan fazlası eklenmemeli ve üretim aşamasında düzenli olarak kontrol edilmelidir.
- Eklenen gıda katkı maddesinin adı, düzeyi ve miktarı, gıdanın üzerinde bulunan etikette net ve anlaşılır bir şekilde belirtilmelidir.
- Gıda katkı maddesi, eklendiği besinde eşit bir şekilde dağıtılmalı ve ürünün maliyetini etkilememelidir.

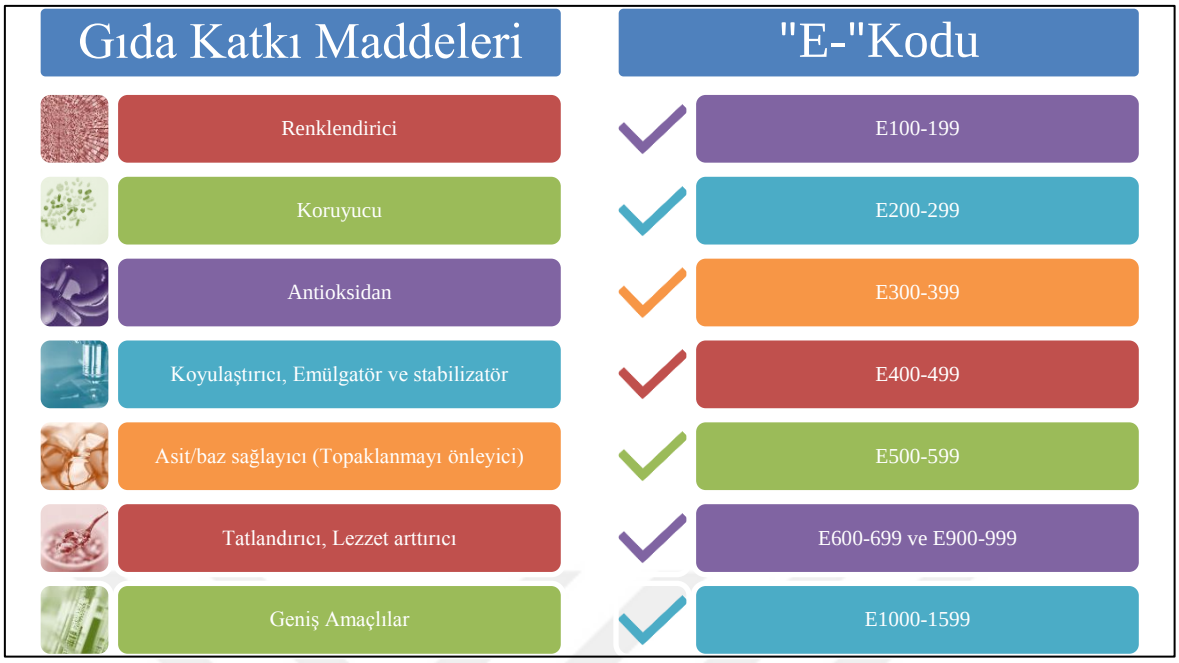
- Gıda katkı maddesi, besinin bozuk olmasını örtbas etmemeli ve tüketicinin aldatılmasına yönelik olarak kullanılmamalıdır.

Belirli gıda katkılarının; özellikle çocuk mamaları ve hastalık nedeniyle kullanılan özel diyet ürünleri gibi belirli besinlere eklenmesi için özel izinlere tabi olması gerekmektedir. Bu izinler, eklenme şartları ve düzeyleri konusunda belirlenmelidir (Martins, Sentanin, De Souza, 2019; Gül, Öztürk, Güneş-Bayır, 2023).

2.5. Gıda Katkısının Uluslararası Sınıflandırma Sistemi (INS) ve E Kodu

Ülkemizde kullanımına onay verilen gıda katkı maddeleri CAC ile EC (Avrupa Topluluğu) tarafından birlikte yapılan listelerden oluşmaktadır. Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen katkıların numaraları önünde Avrupa Birliği'ni temsil eden “European” kelimesinin baş harfi olan "E " yer almaktadır. Bu kod Avrupa Birliği'ne bağlı bir komitesi olan Gıda Bilimsel Komite "Scientific Committee on Food" tarafından belirlenmektedir. Güvenilirliği onaylanmış ve toksikolojik olarak güvenli kabul edilen gıda katkı maddeleri listesinde yer alan tüm katkılar "E" kodunu taşımaktadır. Bu sebep ile "E" harfi sağlık bakımından tüketicinin güvencesini simgelemektedir. "E-" numaralarının hazır gıda ve\veya besin paketleri üzerinde, kullanım amaçlarına göre maddelerinin sınıflandırma kategorileri, Avrupa Birliği ülkelerinde katkı maddelerinin kullanışlı, pratik bir kodlama ya da barkotlama yöntemi olarak geliştirilmiştir (Küçüköner, 2011; Gültekin, 2017; Yiğit, Uçar, 2023).

"E" numara sistemi ile Avrupa Birliği'nin gıda katkı maddelerinin işlevlerine göre kullandığı sınıflandırma (Şekil 2.1) şöyledir (Boğa ve Binokay, 2010; Küçüköner, 2011; Anand ve Sati, 2013; Gherezgihier, Mahmud, Admassu, Shui, Fang, Tsighe, Mohammed, 2017; Yiğit ve Uçar, 2023);



Şekil 2.1. Gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflaması ve E kodları

Ayrıca gıda katkı maddeleri gıda ambalajları üzerinde farklı biçim-şekillerde belirtilebilirler.

Örneğin; D-Sorbitol'ün numarası E420'dir. Herhangi bir yiyecek ambalajında D-Sorbitol içerdiği belirtiliyorsa, bu, aşağıdaki ifadelerin biriyle belirtilebilir (Gültekin, 2017):

"tatlandırıcı olarak D-Sorbitol (E420) kullanılmıştır"
" tatlandırıcı olarak D-Sorbitol kullanılmıştır"
" tatlandırıcı olarak E420 kullanılmıştır"

"E" kodu alan katkı maddelerinin kullanım miktarı sürekli güncellenmektedir. Gıda etiketinde bu kodların bulunması; toksikolojik araştırmaları tamamlanmış ve zarar vermeyen dozu belirlenmiş bir gıda katkı maddesine işaret eden uluslararası bir göstergedir. E-kodunun, sağladığı temel faydalar ise; isimleri uzun olan katkı maddelerinin gıda etiketlerinde daha kısaca belirtilmesi, birden fazla aynı anlama gelen isme sahip olan gıda katkı maddelerinin anlam karışıklığına neden olmasının engellenmesi, böylece E-kodları sayesinde standartlaşması ve uluslararası gıda ticaretini kolaylaştırılmasını sağlamaktadır (Yörük ve Danyer, 2016; Ekşi, 2017; Gültekin, 2017; Özgen ve Hazarhun, 2019).

Bu şekilde, hala kullanılan maddelerinin olası zararları tespit edilip iptal edilebilmekte, aynı zamanda güvenirliği kanıtlanmış yeni katkı maddeleri eklenerek gıda güvenirliği

artırılabilmektedir. ‘E kodu’ dışında, kullanılan uluslararası geçerliliği olan daha kapsamlı numaralandırma sistemleri de bulunmaktadır. Bunlar; INS (The International Numbering System) ve CAS (Chemical Abstract Service) numarası gibi daha genel numaralandırma sistemleridir (Korkmaz, 2022).

2.6. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddeleri, FDA, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (Europen Food Safety Authority - EFSA) ve Kodex Allimentarius’ bulunduğu dünya çapında çeşitli kurum ve kuruluşlar tarafından yakından takip edilmekte ve düzenlenmektedir (Gültekin, 2017). Türkiye’de ise Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, gıda katkılarını kapsamında dört temel grup altına toplamaktadır. Bunlar;

- Koruyucular (besin değerini koruyarak raf süresini uzatanlar),
- Yapıyı ve hazırlanma/pişirme özelliğini geliştirenler,
- Aroma/renk artırıcılar ve
- Koruyucular/besin değerini artırıcılar şeklindedir (Boğa ve Binokay, 2010; Yörük ve Danyer, 2016; Alan ve Öksüztepe, 2020; Körkoca ve Bahşi, 2021).

Ülkemizde gıda katkı maddeleri fonksiyonel sınıf ve kullanım amaçlarına göre 27 gruba ayrılmaktadır. Antioksidanlar, Asitliği düzenleyiciler, Hacim artırıcılar, Koruyucular, Lezzet Artırıcılar, Renklendiriciler, Modifiye nişastalar, Aroma Artırıcılar ve tatlandırıcılar bu gruplardan bazılarıdır (Avuloğlu-Yılmaz, 2018; Resmi Gazete 13 Ekim 2023 (sayı: 32338)).

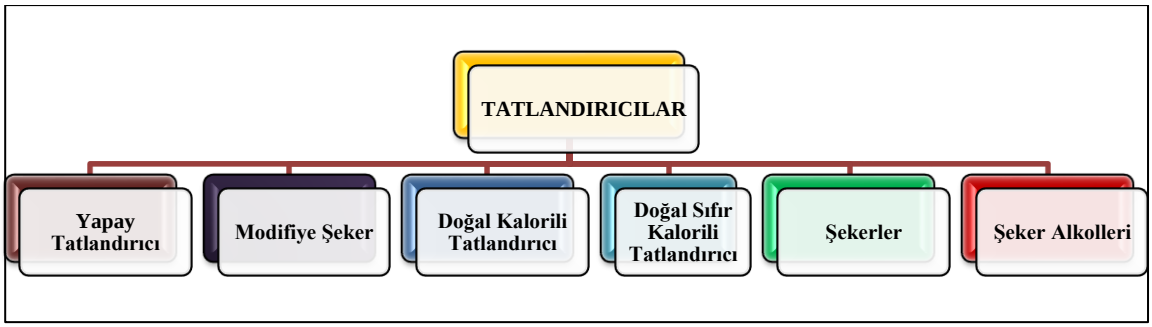
2.7. Tatlandırıcılar

Kalorisiz veya yüksek yoğunlukla tat veren besleyici olmayan tatlandırıcılar, ilk kez 1800'lerin sonlarında gıda katkı maddelerine dahil edilmiş (örneğin sakarin, maltoz, früktoz vb.) ve ilk kez gıda katkı maddesi olarak kullanımları onaylanmıştır. Şeker yerine kullanılabilen ve şekere kıyasla oldukça yüksek tatlılığa sahip, kalori içeriğini artırmadan yiyecek ve içeceklere lezzet kazandıran bileşikler grubudur (Sezgin, 2016; Baker-Smith, de Ferranti, Cochran, Abrams, Fuchs, Kim, Heitlinger, 2019; Eissa, Sebaei, Mohamed, 2024).

Birleşmiş Milletler düzeyinde WHO ve FAO tarafından ortaklaşa oluşturulan Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)'na göre tatlandırıcı, "gıdaya tatlı bir tat veren, şeker yapısında olmayan madde" olarak tanımlamaktadır (Kızılaslan, 2017). Bu, yalnızca glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi doğal ve de besin değeri olan tatlandırıcıları değil, aynı zamanda herhangi bir besin değeri olmayan yapay tatlandırıcıları da kapsamaktadır (Carocho, Barreiro, Morales, Ferreira, 2014).

Tatlandırıcılar sıklıkla meyve suları, alkolsüz içecekler, reçeller, marmelatlar, sofralık tatlandırıcı formülasyonlarında, dondurmalar, şekerlemeler, sakızlar, süt ürünleri, unlu mamuller, kozmetik ürünleri ağız hijyenini ilgilendiren ağız gargaraları, diş macunları ve ilaçlarda kullanılmaktadır (Yılmaz, 2007; Kıvanç, Soylu, Özdemir, Şişik, Tayfur, 2017; Muslu, Kermen, 2020; Javi, Torabi, Dadmohammadi, Tiwari, Prakash, Abbaspourrad, 2024). Bu maddeler, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler göstermektedir (Yılmaz, 2007).

Genel olarak tatlandırıcılar altı ana gruba ayrılabilmektedir. Bu gruplar Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Tatlandırıcıların sınıflandırılması (Hernández-Pérez, Jofre, de Souza Queiroz, de Arruda, Chandel, de Almeida Felipe, 2020)

Klinik araştırmalar, tatlandırıcıların glikoz metabolizmasında, bağırsak mikrobiyotasında ve iştah kontrolü üzerinde insanlarda olumsuz etkileri olabileceğini bildirmektedir (Suez, Korem, Zeevil, Zilberman-Schapira, Shapiro, Halpern, Segal, Elinav, 2014; Daly, Darby ve Shirazi-Beechey, 2016; Schiano, Grimaldi, Scognamiglio, Costa, Soricelli, Nicoletti, Napoli, 2021). Ayrıca tatlandırıcıların deri, sindirim sistemi ve kardiyovasküler hastalıklara, toksik ve alerjik reaksiyonlara, kanser ve tümör oluşumuna neden olabilecekleri belirtilmiştir

(Erkmen, 2010; Moriconi, Feraco, Marzolla, Infante, Lombardo, Fabbri, Caprio, 2020; Gebremichael, Lassi, Begum, Mittinty, Zhou, 2023).

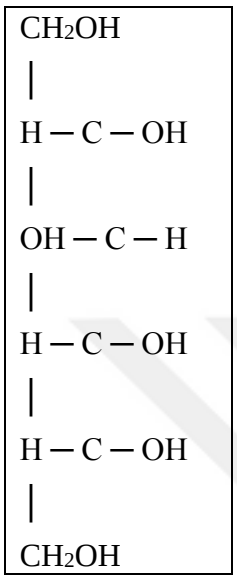
Şeker ve yapay tatlandırıcıların doğrudan veya işlenmiş gıdalar ile beraber kullanımı dünyada ve ülkemizde ciddi artış göstermektedir. Meydana gelen bu artışın çeşitli sağlık sorunları ile ilişkili olduğu konusunda çeşitli çalışmalar olmakla birlikte halen tartışmalı bir konudur (İşgören, Sungur, 2019).

2.7.1. Şeker alkolleri

Çok tercih edilen tatlandırıcı grubu olup, besin değeri olan, doğal olarak gıda ve besin yapısında bulunan veya endüstriyel olarak şekerlerden üretilebilen, gıdalarda kristal yapıda ya da toz halde olan beyaz, suda çözünen organik şeker ikameleridir. Polihidrik alkoller, polioller veya polialkoller olarak da adlandırılmaktadır (Bhise ve Kaur, 2013; Karataşoğlu, Demirel, Şahin, Berktaş, Çam, 2021). Şeker alkollerinin sukroz/sakkarozla benzer fonksiyon ya da işleve sahip olması ve hem tatlandırıcı hem de hacim verici etkileri önem taşımaktadır. Kimyasal olarak şeker alkolleri, aldehit veya keton grubunun bir hidroksil grubu ile değiştirildiği sakkarit türevleri olarak tanımlanmaktadırlar. Sakkaritler birçok şeker molekülünün bir araya gelmesiyle oluşan karbonhidrat molekülleri olup, içerdikleri şeker birimlerinin sayısına göre isimlendirilmektedir. Bunlar mono- (eritritol, ksilitol (xylitol), sorbitol, mannitol), di- (laktitol, izomalt, maltitol) veya polisakkaritlerin (maltitol ve sorbitol şurupları) hidrojen formlarıdır (Zumbe, Lee, Storey, 2001; İşgören ve Sungur, 2019). İlk hidrojen şeker olan sorbitol 1930 senesinde elde edilmiştir. Bunu sırası ile mannitol ve 1970 senesinin başlarında xylitol izlemiştir. Glukoz, mannoz ve ksiloz vb. tatlandırıcılar bazı meyve ve sebzelerde az miktarlarda doğal olarak bulundukları gibi ticari ve endüstriyel süreçlerde hidrojenasyon gibi kimyasal işlemler ile üretilmektedirler. Tüketiciler ve üreticiler tarafından tercih edilmelerinin sebepleri arasında, sakarozun tatlılığıyla karşılaştırılabilir daha düşük kalori değeri ve düşük glisemik indeks bulunmaktadır (Bhise ve Kaur, 2013; Kızılaslan, 2017; Kıvanç, Soylu, Özdemir, Şişik, Tayfur, 2017). Laksatif etkilerine sahip olmalarından dolayı da şeker alkollerin günlük kullanım miktarı kontrol altına alınmalıdır (Önder ve Aydar 2022).

D-Sorbitol (DS)

Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$), birden fazla hidroksil (-OH) grubu bulunan düz zincirli yapıda 6 karbonlu polihidrik şeker alkolüdür. Sorbitolün kimyasal yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



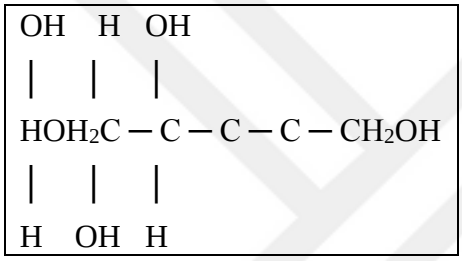
Şekil 2.3. D-Sorbitolün kimyasal yapısı (Le ve Mulderrig, 2001; Mutlu, Erbaş, 2020)

Sorbitol, çeşitli isimlerle adlandırılabilir; bunlar arasında D-sorbitol, D-glusitol ve sorbol gibi isimler bulunmaktadır (Sigma Aldrich, 2024a; Grembecka, 2015). Sorbitol, ilk kez 1872 yılında Fransız kimyacı Joseph Boussingault tarafından üvez ağacı (*Sorbus aucuparia*) meyvesinin suyundan izole edilerek keşfedilmiştir (Le ve Murderrig, 2001; Mutlu ve Erbaş, 2020). Sorbitol, ticari olarak şurup veya kristal halinde üretilmekte olup, doğal olarak da oluşabilmektedir (Kearsley ve Deis, 2006; Mishra, Dabbawala, Park, Jhung, Hwang, 2014). Gıdalarda, şekerlemelerde, ağız bakımında, kimya, ilaç, kozmetik sektörlerinde ve endüstriyel uygulamalarda farklı amaçlarla yararlanılmaktadır (Ghosh ve Sudha, 2012). GRAS gıda katkı maddelerinin listesinde bulunan sorbitolün kodu E420'dir (Deis ve Kearsley, 2012). Sorbitol, ayrıca diyet ve diyabetik gıdalarda diğer tatlandırıcılarla birlikte istenilen aroma ve tatlılığı ayarlamaya yardımcı olarak da kullanılmaktadır. Besinlere ilave edilmesinin yanı sıra tabletler halinde üretilerek satışa sunulmaktadır. Sorbitol, tatlılık verici özelliğinin yanı sıra gıdalarda nem çekici madde, hacim ve kıvam artırıcı ve stabilizatör olarak da kullanılmaktadır (Le ve Mulderrig, 2001; Grembecka, 2015).

Sorbitolün aşırı kullanımının çocuklarda ishal, mide bulantısı, kas kasılmaları ve gaz oluşumu gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarına neden olduğu açıklanmıştır. Sorbitolün ADI değeri vücut ağırlığının %0.5'ini geçmemelidir (Payne, Chassard, Lacroix, 2012).

Xylitol

Xylitol, beş karbonlu $C_5H_{12}O_5$ kimyasal formülüne sahip doğal bir şeker alkolü olup yapısı Şekil 2.4'de gösterilmektedir. Gıda sektöründe tatlandırıcı olarak yaygın kullanılmakta olup Avrupa Birliği kod numarası E967'dir. Xylitol (XYL), ksilitol, Ksilit olarak adlandırılmaktadır (Le ve Murderrig, 2001; Mutlu ve Erbaş, 2020; Sigma Aldrich, 2024b).



Şekil 2.4. Xylitol'ün kimyasal yapısı

Xylitol katı-sıvı ekstraksiyonu, kimyasal üretim ve biyoteknolojik üretim yoluyla üç şekilde üretilmektedir (Parajo, Dominguez, Dominguez, 1998). Ticari olarak üretimi kimyasal yolla elde edilmektedir (Aminoff, Vanninen, Doty, 1978). Büyük miktarda doğada bulunmasına rağmen özellikle glukoz gibi diğer karbonhidratlardan ayrılmasındaki zorlukları nedeni ile üretilmesi güçtür. Bitkilerden ksilozun elde edilmesi ve daha sonra hidrojenizasyon işlemi, xylitol üretiminin gerçekleştirilebilmesini sağlamaktadır. En yaygın olarak, ağaç ve bitkilerin selüloz içeren kısımlarından çıkarılmaktadır. Xylitol 'odun şekerinin (ksiloz)' katalitik hidrojenasyonu ile üretilmekte olup ağaç ve bitkilerin ksilandan zengin hemiselüloz içeren hücresel duvarlarında bulunan bir polisakkarittir. Kullanılan bitki materyali genellikle kayın gibi sert ağaçlar, mısır koçanı, yulaf ve pamuk kabuğu, saman, şeker pancarı posası ve fındık kabuklarıdır. Xylitol şeker alkollerinin en tatlı olanıdır (Olinger ve Pepper, 2001; Zacharis, 2012; Carocho, Morales, Ferreira, 2017; Kıvanç, Soylu, Özdemir, Şişik, Tayfur, 2017). Tatlılık yönünden sukroza eş (%70) bir tatlandırıcıdır (İşgören ve Sungur, 2019). Su içinde kolay çözünen, beyaz, kristalize olan bir şeker alkolüdür. Aynı zamanda sorbitolden iki kat daha fazla tatlılık potansiyeline sahip ve mannitolden de yaklaşık üç kat daha fazla tatlıdır. Bu özellik, daha az miktar xylitol kullanılarak aynı tatlandırma etkisinin elde

edilebileceği anlamına gelmektedir. Buna ek olarak Sukroza (geleneksel şeker) benzer bir tat profiline sahip olmasına rağmen, kalorisi sukroza göre yüzde kırk daha düşüktür. Birçok meyve ve sebzede (kayısı, çelik, marul ve kırmızı böğürtlen) az miktarda bulunmaktadır (Aminoff, Vanninen, Doty, 1978). Xylitol şu gruplarda kullanılmaktadır (Goncalves, Del Bel Cury, Simoes, Hara, Rosalen, Cury, 2006; Tuncer, 2011; Kıvanç, Soylu, Özdemir, Şişik, Tayfur, 2017: 201-202):

Sakız ve şekerlemeler: Xylitol, özellikle diş sağlığı açısından faydalı olması nedeniyle sakız ve diğer şekerlemelerde yaygın olarak kullanmaktadır. Diğer şeker alkollerinden farklı olarak, xylitol bakteriler tarafından fermente edilememekte, bu da diş çürüklerine neden olan bakterilerin çoğalmasını azaltabilmektedir.

Diş macunu ve ağız bakım ürünleri: Xylitol, diş macunu ve diğer ağız bakım ürünlerinde bulunan bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Diş çürüklerini azaltma potansiyeli ve ağızdaki bakteri sayısını kontrol etme özellikleri nedeni ile tercih edilmektedir.

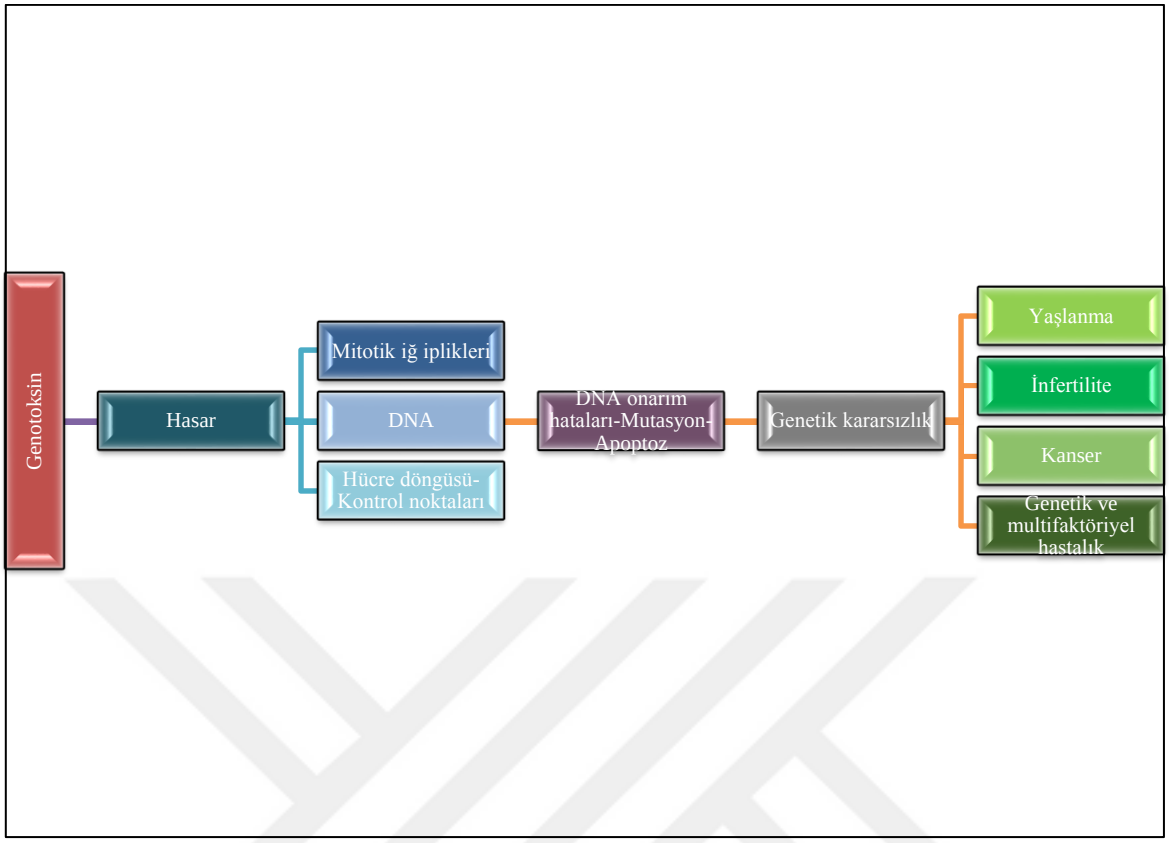
Eczacılık ürünleri: Xylitol, bazı özel eczacılık ürünlerinde, özellikle şuruplar ve diğer oral ilaçlarda bir yardımcı madde olarak ve ayrıca, şekeri azaltmak veya tatlandırmak için kullanılabilmektedir.

Xylitol aldo ve keto gruplarını içermediği için Maillard reaksiyonlarına (esmerleşme reaksiyonu) katılmaz ve sıcaklığın yükselmesiyle karamelize olmaz. Bu özelliği, yüksek sıcaklıkta işleme tabi tutulan gıda ürünlerinde istenmeyen renk ve tat değişikliklerini önlemeye yardımcı olabilmektedir. Xylitolün bu özellikleri, onu birçok durumda diğer şekerlere göre daha avantajlı bir besin bileşeni haline getirmektedir (Parajo, Dominguez, Dominguez, 1998; Akyüz-Begeç, 2022:243-245). Xylitol ve sorbitol gibi şeker alkollerinin bir arada, tatlılık profillerini iyileştirerek ve düşük kalorili ürünlerde tatlandırma etkisini artırarak mükemmel bir sinerjik tatlılık oluşturmaktadır (Olinger ve Pepper, 2001). Xylitol ile ilgili çalışmalarda AB Gıda Bilimsel Komitesi, diğer poliollerde olduğu gibi günlük tüketimine ilişkin önerilerde bulunmaktadır. Bu komite, tolere edilebilir dozda kullanıldığında genellikle güvenli olan şeker alkollerinin, özellikle hassas bireyler dışında, günlük tüketiminin 20 g'dan az olması gerektiğini ve aksi takdirde laksatif etkiye neden olduğu sonucuna varmıştır (Kıvanç, Soylu, Özdemir, Şişik, Tayfur, 2017).

2.8. Genetik Toksisite Testleri

Genotoksinler, genetik materyali (DNA'yı) doğrudan etkileyerek çeşitli hasarlara neden olabilmektedir. Böylece, hücre bölünmesi sırasında veya DNA'nın çeşitli kimyasal modifikasyonları sonucunda genetik materyalde değişikliklere yol açabilmektedir. Bu değişikler, nesilden nesile aktarılabileceği gibi, sonradan da ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle genotoksinler genetik materyalde DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, gen mutasyonları, yapısal (yapısal kromozom mutasyonları) ve sayısal (genom mutasyonları) kromozom anormallikleri gibi hasarlara sebep olabilen ajanlardır (Şen, Beceren, Aksoy, 2018).

Fiziksel (Ultraviyole-UV, radyasyon) ve kimyasal (ilaçlar, gıda katkı maddeleri, çevre kirleticileri) ajanların etkileri, genotoksisite testleri kullanılarak incelenmektedir. Bu maddeler, sadece kansere değil, aynı zamanda çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen kalıtsal etkilere ve çoklu mutasyonlara neden olabilmektedir. Genetik materyalde meydana gelen hasar, ökaryotik organizmalarda somatik hücrelerde malignitelere ve/veya neoplazma aracılığı ile kansere kadar uzanan zararlara yol açabilmektedir. Bu hasarlar, germ hücrelerinde meydana geldiğinde üremeyi olumsuz yönde etkileyebilmekte veya kalıtsal mutasyonlara neden olabilmektedir. Somatik hücrelerdeki mutasyonlar, kanserin yanı sıra kronik inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklara, kardiyovasküler hastalıklara, diyabet ve çeşitli patolojik durumları içeren hastalıklara yol açabilmektedir (Şekil 2.5). Bu sebeple, genetik toksikoloji araştırmaları yeni bir bileşiğin insan sağlığı bakımından güvenirliğinin tespit edilmesinde kullanılan mutajenite ya da kanserojeniteye sebep olup olmadığını gösteren önemli araştırmalardır (Singh, Khanna, Pant, 2018; Toğay, Sevimli, Sevimli, Çelik, Özçelik, 2018; Kazancı, Şahin, 2022; Çelik, Toğay, Türel, Özçelik, 2022; Türkoğlu, 2022; Okus, Yuzbasioglu, Unal, 2024).



Şekil 2.5. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki ve sonuçları (Şen, Beceren, Aksoy, 2018)

Ayrıca, genetik toksisite çalışmaları, tarımsal, farmasötik ve endüstriyel kullanımına yönelik ürünlerin geliştirilmesi ve pazarlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Phillips ve Arlt, 2009; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Khan, 2014; Yüzbaşıoğlu, Ünal, Zengin, 2014; Ren, Atyah, Chen, Zhou, 2017; Tuenter, Creylman, Verheyen, Pieters, Van Miert, 2020). İnsanlar sürekli olarak çevrelerindeki çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların etkisi altında kalmaktadır. Bu nedenle, bu maddelerin potansiyel risklerinin incelenmesinde kullanılan bu testler insan sağlığı açısından da giderek önem kazanmaktadır. Günümüzde yaygın bir şekilde tercih edilen *in vivo* ve *in vitro* genetik toksisite testleri arasında kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve Comet testleri bulunmaktadır (Patra, Das, Das, Thatoi, 2019; Avuloglu-Yilmaz, Yuzbasioglu, Unal, 2020; Mamur, Yüzbaşıoğlu, Bülbül, Ünal, 2022).

2.8.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Sıkça tercih edilen testlerden biri olan kromozom anormallikleri testi, kromozomal aberasyon testi olarak da adlandırılabilmektedir. Bu yöntem, 1975 yılında bilinen mutajen

ve kanserojenlerin Çin Hamsteri Ovaryum (CHO) hücrelerinde ve Çin hamsteri akciğer (CHL) hücreleri ile insan lenfosit kültürleri kullanılarak incelenmesiyle geliştirilmiştir (Perry ve Evans, 1975; Registre ve Proudlock, 2016). Bu test, OECD (1997) tarafından yayınlanan yönergeye göre *in vitro* memeli hücreleri insan ve kemirgenlerden köken alan hücre hatları veya primer hücre kültürleri (Çin hamster fibroblast kökenli hücreler ve insan periferal kan lenfositleri) (OECD-473), *in vivo* memeli kemik iliği hücreleri (OECD- 475) ve memeli spermatogonial (OECD- 483) hücrelerine uygulanabilmektedir. Bu test, *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere çeşitli kimyasalların potansiyel genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak tercih edilebilmektedir (Cartus, Schrenk, 2017; Hori, Shimoyoshi, Tanaka, Momonami, Masumura, Yamada, Fujii, Kitagawa, Hayashi, 2020; OECD, 2023). KA testi genomik kararsızlığın, karsinogenez veya kanserojen maruziyetinin öncül biyolojik göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu test ile genomik kararsızlık, tek nükleotid mutasyonlarıyla birlikte çeşitli yapısal (kromozom kırığı, kromatit kırığı, fragment, asentrik, halka kromozom, disentrik kromozom ve kardeş kromatitlerde birleşme, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar gibi) ve sayısal (anöploidi=monozomi ve trizomi gibi, öploidi=poliploidi ve endoredublikasyon gibi) kromozom anormalliklerini kapsayan çeşitli genetik değişiklikler tespit edilebilmektedir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Özçelik, Ersan, Ünal, 2017; Şen, Beceren, Aksoy, 2018; İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

KA testi, genetik materyal düzeyindeki bir hasarın sonucunu, sitogenetik hasarın varlığının hızlı bir şekilde saptanmasını veya değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu test, proliferasyon ya da hücre döngüsü sırasında hücre ölümüne neden olabilecek hataları taşıyan hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır (Hu, Maurais ve Ly, 2020).

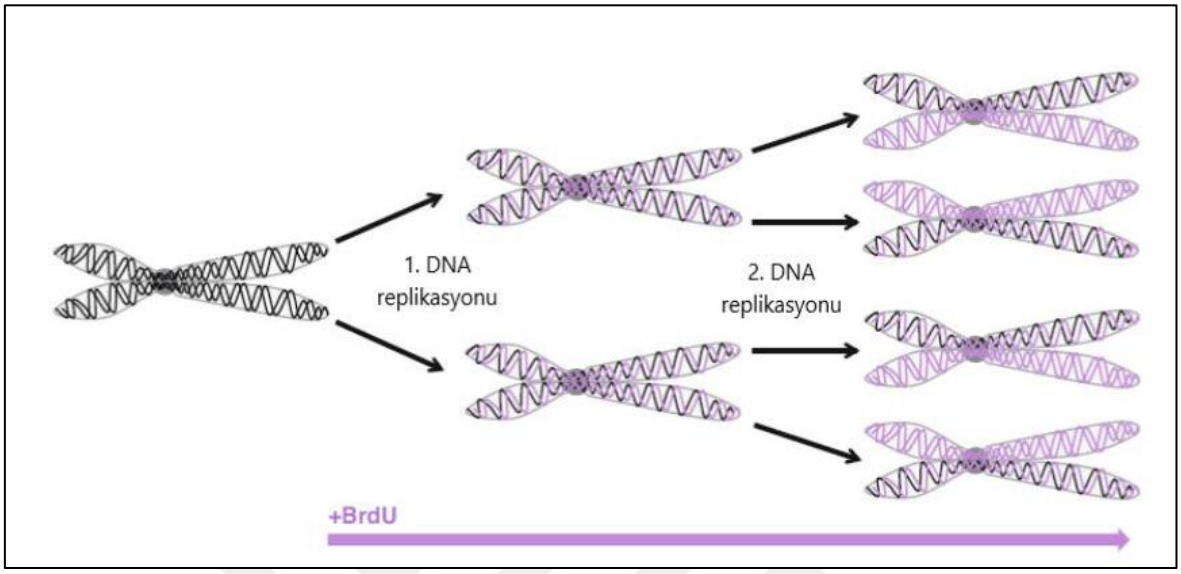
Kromozomal aberasyonlar, genellikle DNA düzeyindeki hasarların sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ancak bu hasarlar, çeşitli faktörlerden kaynaklı oluşabilirken, DNA hasarların oluşum mekanizması ve hasarların kromozom anormalliklerine dönüşüm mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu değişikliklerin hücre homeostazisini bozduğu, bunun da genomik kararsızlıkta, mutagenez ve kanserogenez olaylarının gelişimi üzerinde önemli etkileri olduğu açıklanmaktadır. Kromozomal kırıklar, DNA'daki çift zincir kırıklarının oluşması sonucunda meydana gelirken, hücrenin bu kırıkları onarmak için başvurduğu onarım mekanizmalarının yetersiz kalması, kırıkların hatalı veya eksik onarımı sonucunda yapısal olarak anormal kromozomların oluşmasına yol açmaktadır. Yapılan araştırmalara göre, genotoksik maddelere maruz kalma ile insan lenfositlerinde meydana gelen

kromozomal aberasyonların artışı ve kanser riski arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kromozomdaki hasarlar infertilite, farklı evrelerde gebelik kaybına ve yenidoğanlarda gelişimsel bozukluklara neden olabilmektedir (Avuloglu-Yilmaz, Yuzbasioglu, Unal, 2020; Hu, Maurais, Ly, 2020; Dhillon, Deo, Bonassi, Fenech, 2021; Akbas, Unal, Yuzbasioglu, 2023).

2.8.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimi *in vitro* mutajenik çalışmalar içinde tercih edilen diğer sitogenetik test tekniğidir. Kimyasal ajanların potansiyel 'kromozomal mutajenisitesini' belirleme sebebi ile 1970'lerden bu zamana kadar kullanılan kardeş kromatid değişim testi, 2 Nisan 2014 tarihinde, test tarafından tespit edilen etkiye ait hareket mekanizmaların anlaşılmasındaki eksiklikler nedeniyle OECD test klavuzundan (OECD 479) çıkarılmıştır (OECD, 1986-*Test No. 479* ; Steiblen, van Benthem, Johnson, 2020). Buna karşın, halen fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalarda tercih edilen yöntemlerden biridir (Yüzbaşıoğlu, Engüzel-Alperen, Ünal, 2018; Avuloglu-Yilmaz, Yuzbasioglu, Unal, 2020; Purushothaman, Sufiya, Meenatchi, Sundaram, Saravanan, 2020). KKD, kromozom morfolojisinde (yapısında) veya sayısında herhangi bir değişiklik olmadan kromatidler arasında eş bölgelerin karşılıklı olarak kırılıp yer değiştirmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (Velickova ve Milev, 2020; Dimici, 2020; Çelik, 2022: 185,217). Metafaz kromozomlarında bu olayları görsel olarak incelemek için, kromatidlerin farklı şekilde boyanması gerekmektedir. KKD'nin gözlenebilmesi amacı ile, DNA replikasyonunun yarı korunumlu mekanizmasından, kültür ortamına 5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin (BrdU) eklenerek iki hücre döngüsü boyunca kültüre edilmektedir. Böylece metafaz evresindeki kromozomların DNA'sında BrdU içeren ve içermeyen bölgelerin oluşması sağlanır. Sonrasında hücreler ultraviyole (UV-morötesi) ışık uygulamasının ardından Giemsa boyası (%5'lik) ile boyanır. BrdU, hücre döngüsünün S fazında DNA eşleşmesi esnasında timin (T) nükleotidinin analoğu olarak yapıya katılır ve yeni sentezlenen DNA komplementer zincirine yerleşir. DNA foton maruziyeti (foto degradasyonu) sonucu kardeş kromatidlerde görülen boyanma farklılıkları KKD'lerin sitogenetik düzeyde saptanmasına izin verir (Tumini ve Aguilera, 2021) (Şekil 2.6). Bu sayede BrdU içeren bölgeler açık renk, içermeyen bölgeler koyu renk görülmektedir. Kardeş kromatidlerin farklı boyanması, DNA'nın hangi evrede olduğunu belirlemede önemli bir araç olmaktadır. Böylece replike DNA'nın birinci, ikinci, üçüncü ve sonraki metafazlarının da tanınmasını sağlamaktadır. Bu

sayede replikasyon indeksinin (Rİ) de belirlenmesinde kullanılabilmektedir (Mourelatos, 2016; Akbas, Unal, Yuzbasioglu, 2023).



Şekil 2.6. BrDU'nun katılımı ile mitoz bölünmeyi geçiren kardeş kromatidlerde görülen değişiklikler (Tumini ve Aguilera, 2021)

2.8.3. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom / MN testi

Hematolojik açıdan dolaşımdaki eritrositlerde gözlenen, nükleer artıklar (DNA yıkıntıları tıp terimi olarak Howell–Jolly cisimcikleri) olarak da bilinen mikronukleuslar, genellikle nükleer kromatidin yuvarlak kalıntılarıdır. Mikronükleus testi, 1950'lerde bitkilerde kromozom hasarının belirlenmesinde, 1970'lerde hayvan hücresinde, daha sonra 1976 senesinde ise insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemek amacı ile kullanılmaya başlanmıştır (Krishna ve Hayashi, 2000; Kirsch-Volders, Sofuni, Aardema, Albertini, Eastmond, Fenech, Ishidate, Kirchner, Lorge, Morita, Norppa, H., Surrallés, Annelies Vanhauwaert, Wakata, 2003; Hayashi, 2016). Mikronükleus test sistemi, memelilerdeki test sistemleri arasında hem maddi açıdan hem de zaman açısından en hesaplı, kullanışlı bir yöntem olması sebebiyle genotoksisite araştırmalarında oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249; Ünal, Yüzbaşıoğlu, 2022).

Mikronukleuslar (MN), hücre mitozu sırasında ortaya çıkan ve ana çekirdekten ayrılmış, tüm kromozom ya da asentrik kromozom fragmentlerinden veya anafazda geride kalan kromozomlardan köken alan nükleer bir zarla çevrili küçük kromatin yapılardır (Cao, Zhang,

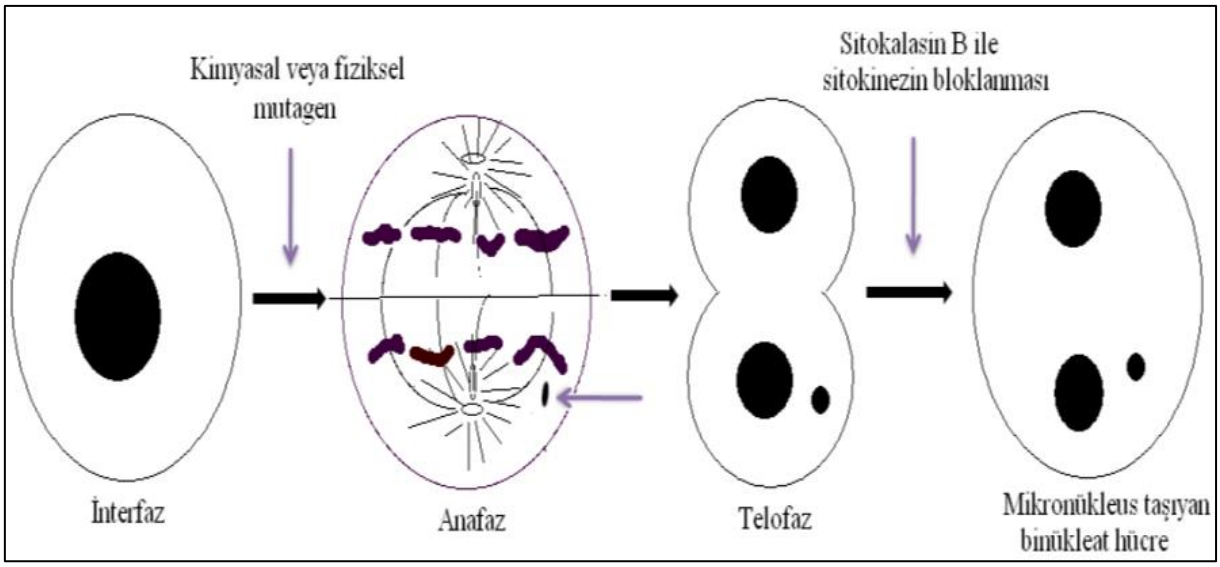
Wang, Du, Xu, Wang, Liu, Su, Fan, Liu, Fan, 2013; Hintzsche, Hemmann, Poth, Utesch, Lott, Stopper, 2017; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249).

Mikronükleuslar;

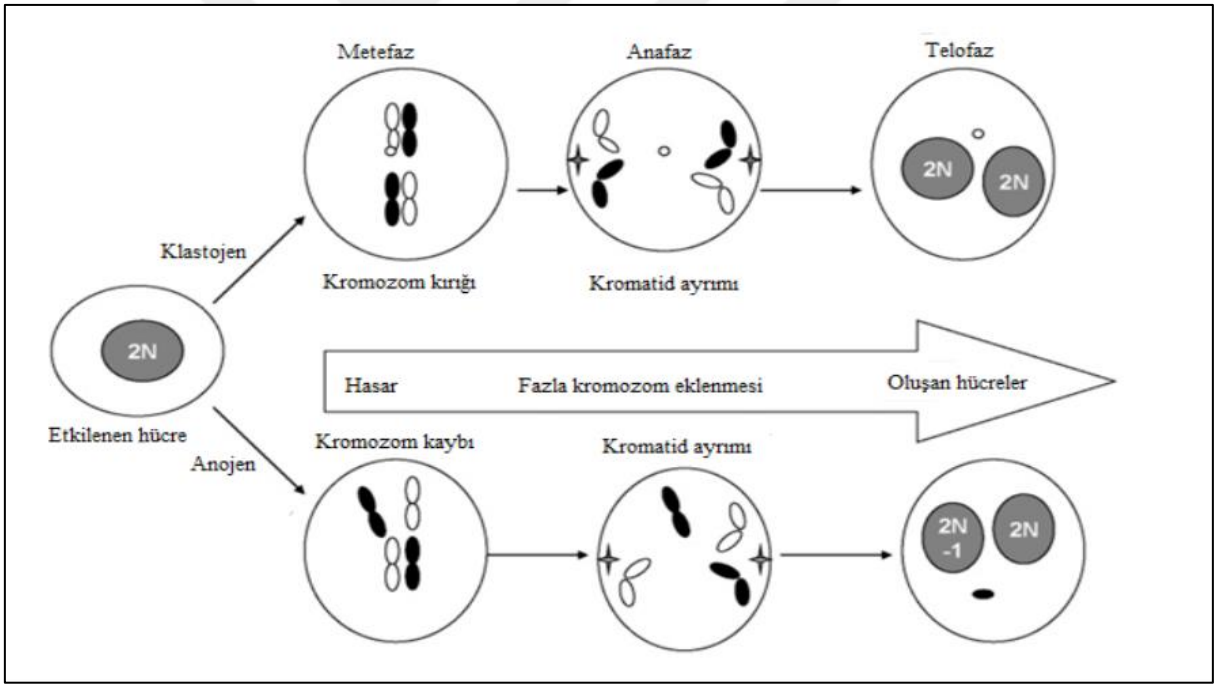
- hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksiklerden,
- mitotik iğdeki hatalardan,
- kardeş çekirdeklerin düzgün ayrılmamasından,
- kinetokordan ya da kromozomun diğer parçalarından,
- kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır.

Mikronükleusun değerlendirileceği hücrelerin, maruziyet sonrası birinci mitozlarını geçirmiş ve ikinci bir bölünmeye başlamamış olması gerekmektedir. Bu da 1985'te Fenech ve Morley tarafından sitokalasin-B (Cytochalasin B ve/veya Cyt-B) adlı aktin polimeraz inhibitörü bir maddenin kültüre eklenerek nükleer bölünmeyi durdurmaksızın, sitoplazma bölünmesini bloke etmesiyle gerçekleştirilmiştir (Fenech ve Morley, 1985; Falck, Catalan, Norppa, 1997).

Bu yöntemde, kültürlere uygun konsantrasyonda sitokalasin-B eklenerek, sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş ancak çekirdek bölünmesini tamamlamış çift çekirdekli hücrelerin oluşumu sağlanır (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8). Böylece hücre çekirdek bölünmesi geçirdiği zaman oluşan hasarlar sitoplazma içerisinde mikro çekirdek şeklinde görülebilmektedir (Ren, Atyah, Chen, Zhou, 2017; Bolognesi ve Fenech, 2019). İki çekirdekli (binükleat) hücreleri tespit etme ve kültürdeki tek bir mitotik hücredeki mikronükleusları değerlendirme özelliği, yöntemin duyarlılığını önemli ölçüde artırmaktadır (Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249; Ünal, Yüzbaşıoğlu, 2022).



Şekil 2.7. Binükleat hücrede MN oluşumu (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011)

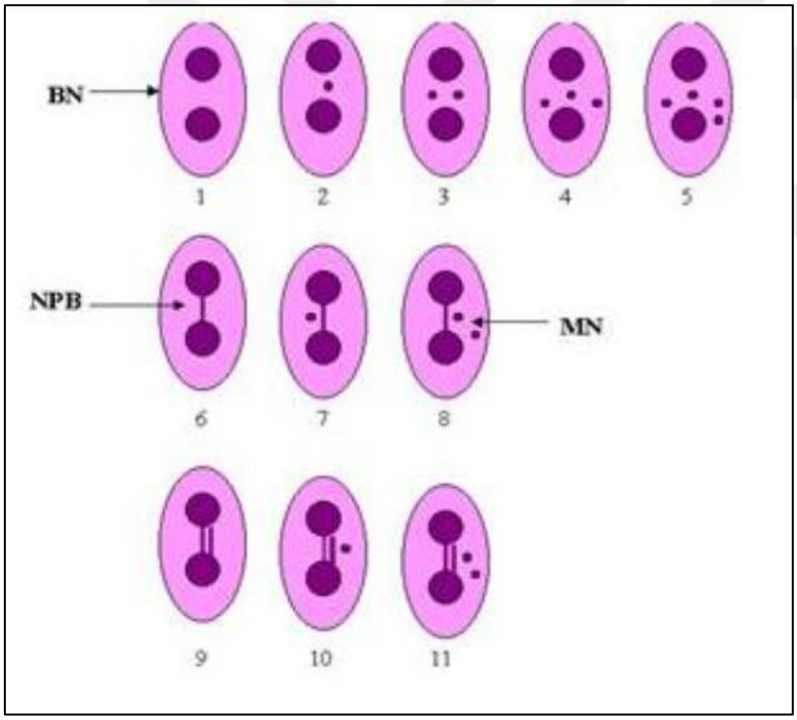


Şekil 2.8. Hücrelerdeki MN oluşumu (Ren, Atyah, Chen, Zhou, 2017; Nicolette, 2017)

Bu mikroçekirdeklerin MN olarak tespit edilmesinde bazı kriterler vardır. Bunlar (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz 2022: 219-249) (Şekil 2.9);

1. Hücreler bir bölünme geçirmiş, çift çekirdeğe sahip, düzgün ve belirgin bir sitoplazması olmalıdır.

2. MN'ler morfolojik olarak ana çekirdeklerle özdeştir ancak onlardan daha küçük olmalıdır.
3. İnsan lenfositlerindeki MN'nin çapı, genellikle ana çekirdeklerin ortalama çapının 1/3'ü ve 1/16'sı arasında olmalıdır.
4. MN, ana çekirdeklere bağlı olabilir veya bağlı olmayabilir.
5. MN ana çekirdeklere dokunabilir ancak üst üste gelmemeli ve mikronükleer sınır nükleer sınırdan ayırt edilebilir olmalıdır.
6. MN genellikle ana çekirdeklerle aynı boyanma yoğunluğuna sahiptir ancak bazen boyanma daha yoğun olabilir.
7. MN ışığı kıramaz ve bu nedenle boya partikülleri gibi suni yapılardan kolaylıkla ayırt edilebilir.



Şekil 2.9. CBMN **(**Cytokinesis Block MicroNucleus**)** testinde gözlenen MN, NPK dağılımları (Üstüner, 2011)

MN yöntemi, genellikle kromozom kırıklarına neden olan (klastojenik) ve kromozom kırıkları oluşturmayan ancak mikronukleus oluşumuna yol açan (anojenik) etkiler gösteren bileşikler tarafından oluşan kromozomal hasarların belirlenmesinde yaygın olarak tercih edilen standart genetik toksisite testlerindendir (Yüzbaşıoğlu, Mamur, Yılmaz, Erikel, Çelebi Keskin, Ünal, 2021; Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249).

Çeşitli kimyasalların genotoksik etkilerinin incelendiği, epidemiyolojik araştırmalar insan periferal lenfositlerindeki MN frekansındaki artışın, kanser insidansı ile arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (Kirsch-Volders, Sofuni, Aardema, Albertini, Eastmond, Fenech, Ishidate Jr, Kirchner, Lorge, Morita, 2003; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Bolognesi ve Fenech, 2019; Ünal, Yüzbaşıoğlu, 2022).

Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus testi (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay; CBMN Assay), hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan kromozomal anormallikleri, genom değişiklikleri, sitostatik etkileri ve hücresel sitotoksisiteyi değerlendirmek için kullanılan yöntemdir. Sitokinez blok mikronükleus (MN) sitom testi;

- Hem kromozom kaybını hem de kromozom kırılmasını belirlenmesini sağlayan mikronükleusların (MN),
- DNA tamiri, esnasındaki hatalar ya da telomer uçlarındaki kırıkların belirteci olan nükleoplazmik köprülerinin (NPK) (Şekil 2.9),
- Çoğaltılmış DNA ya da DNA tamirinde görevli komplekslerin inaktive edildiğinin göstergesi olan nükleer tomurcuklar (NT)

belirlenmesini sağlar (Hovhannisyan, 2010; Hintzsche, Hemmann, Poth, Utesch, Lott, Stopper, 2017; Avuloğlu-Yılmaz, 2018; Franzke, Schwingshackl, Wagner, 2020; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,249).

Ayrıca genotoksisite çalışmaları, genotoksik ajanlara maruz kalan popülasyonlarda, moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarları inceleyerek genetik materyaldeki değişikleri anlamak için kullanılan önemli bir *in vitro* ve *in vivo* testtir. Herhangi bir ökaryotik hücreye geniş uygulanabilirlik sağlayan, karyotip analizi gerektirmeyen, hızlı ve kolay bir yöntemdir (Cao, Zhang, Wang, Du, Xu, Wang, Liu, Su, Fan, Liu, Fan, 2013; Araldi, de Melo, Mendes, de Sá Júnior, Nozima, Ito, Carvalhoa, Souzac, de Cassia Stocco, 2015). Test OECD tarafından yayınlanan klavuzunda genetik toksikoloji testlerinde "Test Yönergesi 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test" başlığı altında, yayınlanmıştır (Cao, Zhang, Wang, Du, Xu, Wang, Liu, Su, Fan, Liu, Fan, 2013).

Birçok bilimsel çalışma; kanser, kardiyovasküler (CVD) hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaları anlamaya yönelik olarak

gerçekleştirilmektedir. Bu hastalıklar genellikle genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin kompleks etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan durumlar olarak kabul edilmektedir. Bu durumda mikronükleusun daha yüksek olduğu kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların, hücre siklusu kontrol noktaları bozulmuş hücreler, DNA tamir mekanizmalarında hasar bulunan hücreler ve tümör hücreleri ile ilişkisi kurulmaktadır. Ayrıca sağlıklı donörlerin, periferik lenfositlerdeki yüksek mikronükleus frekanslarının, genomik kararsızlık ve yaşamın ilerleyen evrelerinde kansere yakalanma riskinin öngörücüsü olduğu bilinmektedir (Bolognesi, Bonassi, Knasmueller, Fenech, Bruzzone, Lando, Ceppi, 2015; Erikel, Yuzbasioglu, Unal, 2019; Cavalcanti, Neto, Silva, Barreto, Ferreira, Magalhães, da Silva, Vieira, Ricardo, Júnior, Moraes, 2021; Jagetia, 2021].

Bu test yöntemi kısaca; lenfositler, eritrositler, bronş epitelyumu, kemik iliği, damak, dil, idrar kesesi, dudakların iç kısmı dahil olmak üzere teknik açısından mümkün olan tüm çeşitli doku türlerinde uygulanabilir niteliktedir (Tucker ve Preston, 1996). Bununla birlikte, periferal lenfositlerde mikronükleus yöntemi ile hedef doku toksikolojisinin yerine total vücut maruziyetini değerlendirebilmektedir (Fenech, 1993). Bu tür teknikler, kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi, genetik hasarın türünü ve şiddetini belirleme ve de çevresel etkilerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini anlamak açısından oldukça kullanışlıdır (Börçek-Kasurka, 2019).

2.8.4. Comet testi

Comet metodu, genetik hasarı belirleme amacıyla kullanılan tek hücreli jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis / SCGE) tekniğidir. Bu yöntem, OECD *In Vivo* Memeli Alkali Comet Metodu Uygulama Kılavuzu'na uygun olarak uygulanmaktadır. Comet, ilk olarak 1984'de pH'nın nötr olduğu koşullar altında tek hücre seviyesinde Ostling ve Johanson tarafından DNA hasarını tespit etmek amacıyla bir mikrojel elektroforez tekniği ile gerçekleştirilmiştir. 1988 senesinde ise Singh ve ekibi tarafından bu yöntem modifiye edilerek alkali pH (pH >13) şartlarında yöntemin özgünlüğü ve tekrarlanabilirliğini önemli ölçüde artırarak gerçekleştirilmiştir. Comet testinin nötr versiyonu, DNA molekülü çift sarmallı yapısını koruduğu için DNA çift zincir kırıkların belirlenmesini sağlarken, DNA-DNA / DNA-proteininin çapraz bağlanması, DNA göçünde azalmaya neden olduğundan mevcut tek zincir kırıklarının tespit edilememesine sebep olmaktadır. Alkali comet testi, hem

DNA tek ve çift zincir kırıklarının hem de eksik eksizyon tamir bölgeleri ile ilişkili DNA tek zincir kırıkların tespit edilmesini sağlamaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh, McCoy, Tice, Schneider, 1988; Calini Urani, Camatini, 2002; Hovhannisyan, 2010; Karlsson, Di Bucchianico, Collins, Dusinska, 2015; Lu, Liu, Yang, 2017; Cordelli, Bignami, Pacchierotti, 2021; Ünal, Saygılı, Akbaş, 2022: 313,335).

Comet test yöntemi, eukaryotik-prokaryotik canlılarda genetik hasarı değerlendirmek amacıyla kullanılan çok yönlü bir yöntemdir. Bu test, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda uygulanabilme ve her hücre biçiminde kullanılabilme, güvenilir, hızlı, ekonomik ve kolay olması gibi avantajlara sahiptir. Comet testi, genetik hasar ve onarım mekanizmalarını araştırmak, çevresel toksikoloji ve genetik toksikoloji çalışmalarını yürütmek, biyoizleme, moleküler epidemiyoloji, radyasyon etkilerini incelemek gibi birçok alanda kullanılarak DNA hasarına sebep olan süreçleri araştırmaktadır (Langie, Azqueta, Collins, 2015; Augustyniak, Gladysz, Dziewięcka, 2016; Glei, Schneider, Schlörmann, 2016; Cordelli, Bignami, Pacchierotti, 2021). Bu test OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development-Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) tarafından "Test Yönergesi 489" olarak 2014'de onaylanarak dahil edilmiş ve son versiyonu 29 Temmuz 2016 da kabul olmuştur (Singh, 2016).

Testin prensibi, maruz bırakılan hücrelerin mikroskop lamı üzerinde DNA'nın agaroz jel içerisinde göç etmesi ile gerçekleşir. Buna göre;

- Agaroz jel gömme: maruz bırakılan hücreler, mikroskop lamı üzerine yerleştirilen bir agaroz jel içine gömülür. Bu adım, hücreleri sabitlemenin ve daha sonraki analizler için hazırlamanın bir parçasıdır.
- Lizis solüsyonu: hücreler, solüsyonda bekletilir. Bu solüsyon, hücre zarının, sitoplazmanın, histonların ve diğer çözünür proteinlerin parçalanmasını amaçlar.
- Elektroforez tamponu: DNA'nın çözülmesini ve elektroforez için hazırlanmasını sağlamak için bekletilerek uygun koşulları sağlar ve DNA'nın hareketini destekler.
- Alkali koşullarda elektroforez: Elektroforez işlemi alkali koşullarda gerçekleştirilir. Bu koşullar altında, DNA çift sarmalları açılarak tek zincirli DNA'nın daha serbest bir şekilde hareket etmesine izin vermektedir.
- Elektrik akımı ve Comet oluşumu: elektroforez sırasında, elektrik akımı negatif yüklü hasarlı DNA'nın anoda (+) doğru hareket etmesine neden olur. Hasarlı DNA, jel üzerinde

daha uzun bir "kuyruk" oluşturarak, sağlam DNA'dan ayrılır. Başı (sağlam DNA-comet başı) ve kuyruğu (hasarlı DNA-comet kuyruğu) oluşur ve böylece hasarın derecesini yansıtan bir gösterge oluşturur ve test sonucunu "kuyruklu yıldıza" benzeyen bir görüntü ile görselleştirir. Nötralizasyondan sonra, DNA'ya özgü bir boya olan etidyum bromür (EtBr) ile boyanır ve floresan mikroskobu kullanılark görüntü analiz sistemi ile analiz edilir. Görüntü analizindeki veri, her comet 'kuyruklu yıldız' için farklı parametreleri hesaplamaktadır. Kullanılan parametreler; kuyruk uzunluğu (μm), kuyruk yoğunluğu (% kuyruk DNA'sı) ve kuyruk momentidir. Bu parametreler, genetik hasarın türü ve şiddeti hakkında bilgi sağlamak üzere kullanılmaktadır (Gyori, Venkatachalam, Thiagarajan, Hsu, Clement, 2014; Araldi, de Melo, Mendes, de Sá Júnior, Nozima, Ito, Carvalhoa, Souzac, de Cassia Stocco, 2015; Karlsson, Di Bucchianico, Collins, Dusinska, 2015; Lu, Liu, Yang, 2017).

2.9. D-Sorbitol (DS) ve Xylitol ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

DS'ün genotoksik potansiyelinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan biri Cardoso ve arkadaşları (2016) tarafından yapılmıştır. *S. typhimurium* suşları (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 ve TA1535) ile AMES testi; HepG2 (Hepasellular karsinoma hücre hattı) hücre hattında MN testi ve hamile Wistar ratlarının yavrularının periferal lenfosit hücrelerinde Comet testi ile DS'ün 0.5, 50.0 ve 5000.0 μg/mL'lik konsantrasyonları çalışılmıştır. S9 (Metabolik aktivasyon) varlığında ve yokluğunda AMES testinde mutajenite veya sitotoksisiteye neden olmadığı ancak MN testinde ve rat yavrularının lenfositleri ile yapılan Comet testinde doza bağlı olarak genotoksik etkinin arttığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada fare kemik iliği hücrelerine 1, 10, 20, 45 ve 90 mg/kg/gün konsantrasyonlarda uygulama yapılarak mikronükleus testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar DS'ün doza bağlı olarak mikronükleus oluşumuna neden olmadığını göstermiştir (Alabi ve ark. 2019).

Fındıklı ve arkadaşları (2014)'nın yaptığı çalışmada ise DS'ün 1.25; 2.50; 5.00 ppm'lik konsantrasyonları ile insan periferal lenfosit hücreleri 3 saat muamele edilerek Comet testi gerçekleştirilmiştir. 2.50 ppm'lik konsantrasyonda kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu verilerine göre DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir.

Xylitol'ün genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmada, Avuloğlu-Yılmaz ve arkadaşları (2022), xylitol'ün 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 µg/mL'lik konsantrasyonları ile insan periferal lenfosit hücrelerinde KA, KKD, CBMN-Cyt ve Comet testleri gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen veriler *in vitro* insan lenfositlerinde yüksek konsantrasyonlarda mutajenik, sitotoksik, anöjenik ve klastojenik etkileri olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

1978 yılında, JECFA'nın yayınladığı raporda XYL ile ilgili bazı mutajenite test sonuçları verilmiştir. S9 varlığında *Salmonella typhimurium*'un (TA 1535, TA 1537 ve TA 1538) suşları ile AMES testi, *Salmonella typhimurium* TA1530, TA 1532 ve TA 1964 suşları ile fareler kullanılarak konak aracılı test, Fullinsdorf albino fareleri ile MN testi ve kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KA testi gerçekleştirilmiştir. XYL'ün, bu testlerden herhangi birinde mutajenik etkiye neden olmadığı görülmüştür. Ayrıca raporda testlerde kullanılan konsantrasyon ve süre ile ilgili önemli bilgiler açıklanmamıştır (Gallandre, 1978; JECFA, 1978).

Bunun dışında lezzet artırıcı ve tatlandırıcı olan D-Sorbitol ve Xylitolün karışımından oluşan DSX'in genotoksik etkilerinin incelendiği hiç bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Kromozom incelemesi için materyal

Bu çalışmada, gıdalarda kullanılan tatlandırıcılar olan D-Sorbitol ve D-Sorbitol ile Xylitol (DSX) karışımının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için kültüre edilmiş insan periferal lenfositleri ve izole lenfositler kullanılmıştır. Araştırmanın amacı, bu tatlandırıcıların insan genetik materyali üzerinde olası zararlı etkilerini belirlemektir. Bu değerlendirme için kromozom aberasyonları (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma için periferik kan, sağlıklı bir kadın ve bir erkek donörden alınmıştır. Donörlerin seçiminde belirli özelliklere dikkat edilmiştir. Bu özellikler şunlardır;

a) Son altı ayda sigara, alkol ve ilaç kullanmamak
b) Genel sağlık durumu: herhangi bir sağlık problemi bulunmamak
c) Genetik geçmiş: genotoksik ajanlara (en az 3 ay) maruz kalma öyküsü olmamak
d) Yaş: 18-30 yaşlarında olmak
f) Cinsiyet: Bir kadın, bir erkek donör dahil edilmiştir.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.04.2022 – 261 ve 05.12.2022 – 886 tarih ve sayılı izinleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Test materyalleri

D – Sorbitol

Bu çalışmada test materyali olarak kullanılan D-Sorbitol'ün (≥ %99) saf formu Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Yapısal formülü ile tüm özellikleri Şekil 3.1'de aşağıda verilmiştir.

Bilinen Kimyasal adlandırması: D-sorbitol, D-glucitol, Sorbit, Sorbol ve Glucitol
Molekül ağırlığı: 182,17 g/mol
Molekül formülü: $C_6H_{14}O_6$

CAS No: 50-70-4 (Sigma-Aldrich)

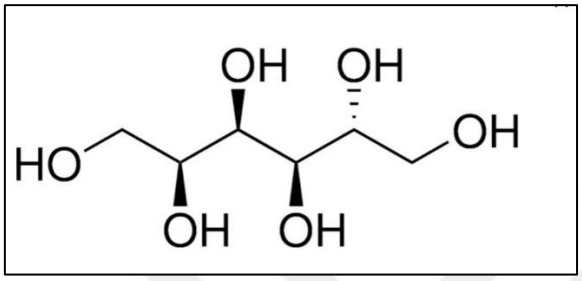
IUPAC adı: (2S,3R,4R,5R)-Hexane-1,2,3,4,5,6-hexol

Saflığı: ≥ 0,99

E Kodu: E-420

Fiziksel durumu: beyaz renkte kristal toz formda ve kokusuzdur.

ADI ve GKM: Yok-Tatlandırıcı



Şekil 3.1. D-Sorbitol'ün yapısal formülü (Chen, Huang, Yao, Benmore, Yu, 2021; Sigma Aldrich, 2024c)

Xylitol (XYL)

Çalışmada diğer bir test materyali olarak kullanılan Xylitol (≥ %99) saf formu Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Yapısal formülün tüm özellikleri Şekil 3.2'de aşağıda verilmiştir.

Bilinen Kimyasal adlandırması: Xylitol (Xylite), Ksilit ve Ksilitol

Molekül ağırlığı: 152,15 g/mol Molekül formülü: $C_5H_{12}O_5$

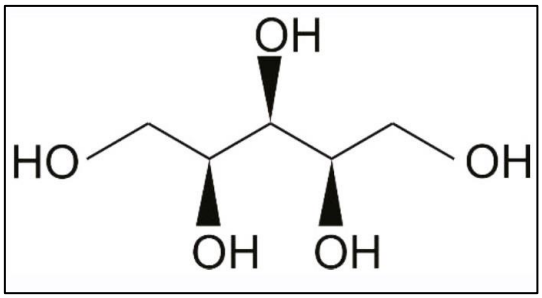
CAS No: 87-99-0 (Sigma-Aldrich) Saflığı: ≥ 0,99

IUPAC adı: (2R,3r,4S)-Pentane-1,2,3,4,5-pentol

E Kodu: E-967

Fiziksel durumu: beyaz kristal ve kokusuz bir madde

ADI ve GKM: Yok-Tatlandırıcı



Şekil 3.2. Xylitol'ün yapısal formülü (Salli, Lehtinen, Tiihonen, Ouwehand, 2019; Chen, Huang, Yao, Benmore, Yu, 2021)

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

LymphoPlus Medium (CAS No: CY100-100), Entellan (CAS No: 1079610500), Glasiyal asetik asit (CAS No: 64-19-7), Giemsa (CAS No: HX947066) ve Metil alkol (CAS No: 67-56-1) Merck'ten, Mitomisin C (CAS No: 200-008-6), Sitokalasin B (CAS No: 14930-96-2), Bromodeoksiüridin (CAS No: 59-14-3), NaCl (CAS No: 7647-14-5) Kolkisin (CAS No:64-86-8), Sigma-Aldrich (USA)'den alınmıştır. Formaldehit (Katalog No: 50-00-0) Carlo Erba'dan, Etilendiamintetraasetik asit (CAS No: 6381-92-6), NaOH (CAS No: 1310-73- 2), Tris (CAS No: 77-86-1), Triton X-100 (CAS No: 9002-93-1), dimetil sülfoksit (CAS No: 67-68-5), Low-Melting Agar (CAS No: 9012-36-6) Normal-Melting Agar (CAS No: 9012-36-6), ve Etidyum bromid (CAS No:1239-48-8) ise AppliChem (Germany)'den temin edilmiştir. Diğer kimyasallar teknik formda bulunmaktadır.

3.2. Metod

Bu araştırmada bir lezzet tatlandırıcısı ve koruyucu olarak kullanılan gıda katkı maddesi olan d-sorbitol ve d-sorbitol ile xylitol (DSX)'ün karışımının olası genotoksik etkileri değerlendirilirken, dört farklı genotoksisite testi kullanılmıştır. Çalışmada kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Sitokinez Blok Mikronükleus Sitom (CBMN-Cyt) testleri uygulanmış olup izole insan lenfositleri ile de Comet testi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi:

Çalışmada test materyali olarak kullanılacak olan d-sorbitol ve xylitolün, insan lenfositleri üzerinde uygulanacak konsantrasyonlarının belirlenmesinde LD_{50} dozları ve insanlarda önerilen kullanım dozları dikkate alınmıştır (Çizelge 3.1).

DS ve DSX'in JECFA tarafından ADI değeri belirtilmemiştir. LD_{50} dozları ve literatür taramasından elde edilen doz aralıklarından hareketle, çalışma için kullanılacak konsantrasyonları belirlemek amacı ile insan lenfositlerinde mitotik indeks analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece ön denemeler yapılmış uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. D-Sorbitol'ün LD_{50} dozları

Gıda Katkısı	Canlı türü	Uygulama Şekli	Miktar	Kaynaklar
D-Sorbitol	Fare	Oral	15900 mg/kg	PubChem (ChemIDplus)
D-Sorbitol	Fare	Oral	17800 mg/kg	PubChem (ChemIDplus)

"D- Sorbitol'ün 31,25; 62,50; 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 ve 2000,00 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda denenmiş ve yapılan bu ön denemelerin sonuçlarına göre 62,50; 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 µg/mL'lik konsantrasyonları seçilmiştir." Xylitol'ün ise Avuloğlu-Yılmaz ve ark. yaptığı çalışmada kullanılan insan lenfositlerinde uygulanan en yüksek iki konsantrasyon (500,00; 1000,00 µg/mL'lik) seçilmiştir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022). Ayrıca literatür araştırmalarından belirlenen kontsantrasyonlar ve oranlar belirlenerek (Çizelge 3.2) DS'le karışımı gerçekleşmiştir. DSX karışımın oranı ise literatür incelemesi sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. D-Sorbitol ile xylitol karışım dozları ve oran

Gıda Katkısı	Canlı türü	Uygulama Şekli	Değer	Kaynaklar
D-Sorbitol Xylitol	Insan Dişi	Oral	% 70 xylitol, % 35 xylitol+ % 35 sorbitol, % 17,5 xylitol+% 52,5 sorbitol % 70 sorbitol	Wennerholm ve diğ. (1994)

Çizelge 3.2. (devam) D-Sorbitol ile xylitol karışım dozları ve oran

Gıda Katkısı	Canlı türü	Uygulama Şekli	Değer	Kaynaklar
D-Sorbitol Xylitol	Insan Diş minesi	Oral	X:S (xylitol:sorbitol 1:3; nihai konsantrasyon)	Gonçalves ve diğ. (2006)
Xylitol	İnsan periferal kan lenfositleri	*In vitro* kültür	➢ 125,00 µg/mL'lik, ➢ 250,00 µg/mL'lik, ➢ 500,00 µg/mL'lik, ➢ 1000,00 µg/mL'lik,	Avuloğlu-Yılmaz ve ark., (2018); Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, (2022)
1- Ksilitol 2- Sorbitol 3- Ksilitol-Sorbitol	Insan Diş Minesi	Oral	xylitol (First Ice), sorbitol (Trident Splash) xylitol-sorbitol (Vivident Xylit)	Tuncer (2011)

Çizelge 3.3. DSX karışımında kullanılan oran ve konsantrasyonlar

Karışım Oranı	Konsantrasyonlar (µg/mL)		
1:1	DS		XYL
	500	/	500
	500	/	1000
	1000	/	500
	1000	/	1000
3:1	DS		XYL
	500	/	500
	500	/	1000
	1000	/	500
	1000	/	1000

3.3. Preparatların Hazırlanması

3.3.1. Kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) testleri

İnsan periferal lenfosit hücrelerinde genotoksik etkilerin belirlenmesi için OECD'nin 473 numaralı yönergesinde açıklanmış olan yöntem olan Kromozal Anormallik testi Evans ve ark. (1984) yönteminde bazı farklılıklar ile (Yüzbaşıoğlu, Mahmoud, Mamur, Ünal, 2022) yapılmıştır. Kardeş kromatid değişimi testinde ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemi bazı farklılıklar (Speit ve Haupter, 1985) ile kullanılmıştır. Buna göre uygun donörlerden heparinli tüplere alınan periferik kanın 0,2 ml'si steril şartlarda 2,5 ml'lik besi ortamına (LymphoPlus Medium) ekilmiş ve 37ºC'deki inkübatörde 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Her tüpe 10 µl BrdU (5-Bromo-2- deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonu ilave

edilerek kültür başlangıcından 24 ve 48 saat olacak şekilde 72 saat 37 ºC'lik etüvde bekletilmiştir. Her bir kültür örneğine, kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saati), 10 µl kolkisin çözeltisi eklenerek iğ ipliklerinin oluşumu inhibe edilmiştir.

Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atılmış ve tüplere 0,075 M KCl (Potasyum klorür) ilave edilmiştir. İşlem sonunda tüpler tekrar santrifüj edilmiş, süpernatant atıldıktan sonra 3:1 oranında karıştırılmış metanol: asetik asit karışımı tüplere ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve santrifüjden sonra tüpün dibinde kalan hücre süspansiyonundan preparatlar hazırlanmıştır. Tüpde kalan pelet pipetaj yapılarak, homojen hale getirilmiş ve önceden temizlenmiş soğuk lamlar üzerine farklı bölgelere gelecek şekilde damlatılmıştır. Bir gün boyunca oda sıcaklığında preparatlar bekletilerek kurumaları sağlanmıştır.

Preparatların boyanması

Preparatlar kuruduktan sonra bazıları kromozomal anormalliklerin belirlenmesi ve mitotik indeks parametrelerinin değerlendirilmesi için % 5'lik Giemsa boyası (pH=6,8) ile 15-23 dakika boyamaya tabi tutulmuştur. Geriye kalan preparatlar ise Kardeş kromatid değişim testi için değerlendirilmiştir. Bu preparatlardan kardeş kromatit değişimleri ve replikasyon indeksi belirlenmiştir. Çalışmada Speit ve Haupter'in (1985) metodundaki boyama işleminde geliştirdikleri yöntem esas alınarak bazı değişiklikler yapılarak Giemsa+floresan boyaması uygulanmıştır. Kurumuş olan preparatları düzgün bir zemine yerleştirilerek, üzerlerine ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6,8) ilave edilmiştir. Hemen arkasından kapalı bir ortamda UV lambası kullanılarak (dalga boyu 254 nm) 13-15 dakika boyunca ışınlanmıştır. UV ışınlarına maruz kalmış olan preparatlar, saf suda 3 kere yıkanmış ve daha önceden 60 ºC'ye getirilmiş 1xSSC (Tri-Sodyum sitrat + Sodyum klorür) çözeltisinde 1 saat (60 dakika) boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından preparatların, fosfat tamponu ile hazırlanan ve %5'lik Giemsa boyasında (pH=6,8) 19-23 dakika boyaması gerçekleştirilmiştir. Işınlama ve boyama aşamalarının ardından preparatlar saf suda temizlendikten sonra, 25 ºC'de kurutulmuş ve entellan ile daimi hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin hesaplanması

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi amacı ile donörlere ait preparatların her birinde her bir konsantrasyon için 100'er metafaz incelenmiştir (iki donör birlikte konsantrasyon başına toplam 200 metafaz). Bu metafaz hücrelerinde kromozomların homojen dağılmış olmasına dikkat edilmiştir. Daha sonra aşağıdaki veriler hesaplanmıştır;

1. Anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre): İncelenen toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi hesaplanarak incelenen hücre popülasyonunun ne kadarının anormal olduğu belirlenmiştir.
2. Hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre): Hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenerek bir hücrenin içerdiği ortalama kromozom anormalliği sayısı tespit edilmiştir.

Mitotik indeks (Mİ) belirlenmesinde; konsantrasyonlardaki, her iki donör için hazırlanan ve daimi hale getirilen preparatlardan 1000'er hücre (toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir.

Mitotik indeks hesaplanırken, aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Mitotik indeks (Mİ) = (Bölünen Hücre Sayısı / Toplam Hücre Sayısı) x 100

Kardeş kromatid değişimlerinin (KKD) ve Replikasyon indeks (Rİ) değerlerinin hesaplanması

Kardeş kromatid değişimlerini saptamak amacı ile, her bir donörlerden konsantrasyon başına ikinci mitoz bölünmeyi geçiren yirmibeşer hücrenin (bir konsantrasyon için toplam 50 hücre) homojen olarak dağılmış ve kromatitleri farklı renkte boyanmış kromozomları incelenmiştir.

Kardeş kromatid değişimi testinde besi ortamına (LymphoPlus Medium) ek olarak tüplere kan ile beraber timin bazlarının analoğu olarak bilinen 10 µg/mL BrdU (Bromodeoksi ürüdin) ekilmiştir. Işınlama sonrasında boyanan kromozomlarda, BrDU içeren bölgelerin açık renkte, BrDU içermeyen bölgelerin ise nispeten daha koyu renkte gözüktüğü görülmektedir. Bu durum, BrDU'nun DNA'nın belirli bölgelerine entegre olduğunu göstermektedir. Oluşan bu renk farklılığı sayesinde DNA'da kardeş kromatidlerdeki

değişimler sayılmıştır. Kardeş kromatid değişimlerini, yeterli güvenilirlikle hesaplayabilmek için hücrenin en az iki replikasyon döngüsü geçirmesi gereklidir. Kromozomlarda oluşan bu boyanma farklılığı bir kromozomun açık renkte boyalı kromatiddeki koyu boyalı parçaların veya koyu renkte boyalı kromatiddeki açık boyalı parçaların sayılmasına olanak sağlamaktadır. Böylece, kromozomdaki kırılmalar (birli, ikili ve üçlü değişimler) sayılmıştır.

Replikasyon indeks (Rİ)'ni hesaplamak için preparatların her birinden 100 hücre (bir konsantrasyon için 200 hücre) incelenerek hücreler arasında boyanma farkına göre birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz evresindeki hücre sayıları kaydedilmiştir. Daha sonra aşağıda yer alan formül kullanılarak replikasyon indeksi hesaplanmıştır:

$$RI = \frac{[1X(M1)+2X(M2)+3X(M3)]}{N}$$

M1: Birinci metafaz evresindeki hücre sayısı

M2: İkinci metafaz evresindeki hücre sayısı

M3: Üçüncü metafaz evresindeki hücre sayısı

N : İncelenen toplam hücre sayısı

3.3.2. Kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi için preparatların hazırlanması

OECD'nin 487. kılavuzunda (OECD, 4 Temmuz 2023) açıklanan Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testinin uygulanması için Fenech ve arkadaşlarının (Fenech 2000, 2006 ve 2007) metodu bazı modifikasyonlar uygulanarak kullanılmıştır (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249). Bunun için öncelikle her donörden, heparinle yıkanmış enjektörler kullanılarak alınan periferik kanın 0,2 mL'si, içerisinde 2,5 mL besi ortamı (LymphoPlus Medium) bulunan tüplere aktarılmıştır. 72 saatlik inkübasyon 37ºC'deki inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Kültürün başlangıcından 24 saat sonra DS'ün ve DSX karışımının belirlenen konsantrasyonları besiyerine eklenmiştir. Aynı zamanda bir negatif, bir pozitif (MMC, 0,20 µg/mL) kontrol kullanılmıştır. Sitokinezi engellemek amacı ile inkübasyon sürecinin 44. saatinde, ortama 5,2 µg/mL sitokalasin-B eklenmiştir. Daha sonra 72 saat sonunda kültür

süresi tamamlanmasının ardından, kültür tüpleri 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüplerden süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet kısmına soğuk 0,075 M KCI (Potasyum klorür) hipotonik solüsyonu eklenerek +4 ºC'de bekletilmiştir. Ardından 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlemden sonra tüplere ise 3:1 oranı oluşturularak metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatif çözeltisinden ilave edilen tüpler buzdolabında bekletilmiştir. Ardından satrifüj yapılarak süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 kez daha gerçekleşmiştir. Son fiksatif uygulanmasında son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit eklenerek fiksasyon aşaması tamamlanmış ve son kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibinde kalan hücre süspansiyonu pipetajlama yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu süspansiyon daha önceden temizlenmiş soğuk lamlar üzerine farklı bölgelere gelecek şekilde damlatılmış ve preparatların kuruması için düzgün bir alanda oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması

Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi için, hazırlanan kurumaya bırakılan preparatlar mikronükleusların, nükleer tomurcukların, nükleoplazmik köprülerin (NPK) incelenmesi, frekanslarının ve nükleer bölünme indeksinin (NBİ) saptanması amacıyla, Sorensen tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa boyasında (pH=6,8) boyanmıştır.

Daha sonra saf suda 3 kez yıkanan preparatlar, 24 saat oda sıcaklığında kurutulmuş ve entellan ile kalıcı hale getirilmiştir. Bir gece kurutulan preparatlar ışık mikroskobunda incelemeye alınmıştır.

Mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü (NPK) frekanslarının ve nükleer bölünme indeksinin (NBİ) saptanması

Mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekanslarını belirlemek için 'binükleat' denilen çekirdek bölünmesi tamamlamış, ancak sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmediği, çift çekirdekli (binükleat) hücreler değerlendirilmiştir.

Binükleat hücreler, sitokinezi bloke etmesi amacı ile, inkübasyon süresinin 44. saatinde sitokalasin-B eklenmesi ile elde edilmektedir. Binükleat hücreler, genotoksisitesi araştırılmak istenilen belirli bir kimyasalın eklenmesinden sonra ya da test edilen materyallerin eklentisinden sonra bölünen hücrelerdir. Bu nedenle, her bir donöre ait

preparatların her birinden 1000 adet binükleat hücre olmak üzere toplamda 2000 adet binükleat hücreleri değerlendirmeye dahil edilmiştir.

Hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$MN=\frac{(1X[1.MN]+2X[2.MN]+3X[3.MN]+4X[4.MN])}{N}$$

1MN: 1 mikronükleuslu hücre sayısı	2MN: 2 mikronükleuslu hücre sayısı	3MN: 3 mikronükleuslu hücre sayısı	4MN :4 mikronükleuslu hücre sayısı	N : İncelenen toplam hücre sayısı

Ayrıca nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücrelerin yüzdesi de bu formül yardımı ile belirlenmiştir.

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) belirlenirken muamele edilen konsantrasyonların her bir donörden alınan preparatlardan, donör başına 500 adet olmak üzere toplam 1000 hücre incelenmiştir. Nükleer bölünme indeksi (NBİ) şu formül ile hesaplanmıştır:

$$NBİ=\frac{(1X[1.N]+2X[2.N]+3X[3.N+4.N])}{N}$$

1N: 1 nükleuslu hücre sayısı	2N: 2 nükleuslu hücre sayısı	3N: 3 nükleuslu hücre sayısı	4N: 4 veya daha fazla nükleuslu hücre sayısı	N: İncelenen toplam hücre sayısı

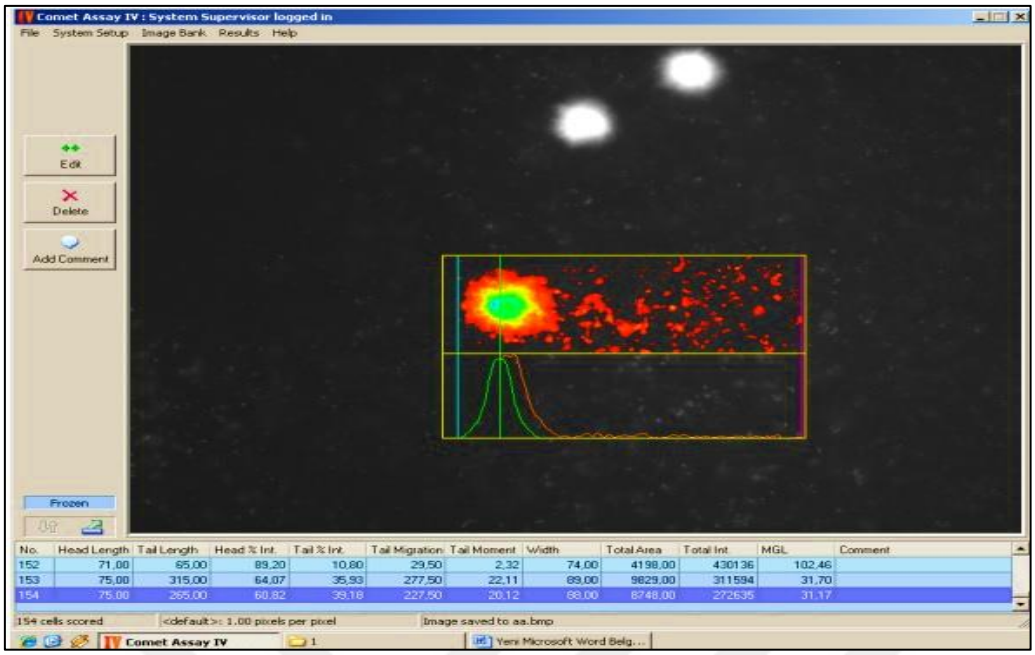
3.3.3. İzole edilmiş insan periferal lenfositlerinde comet testi

Bu çalışma için Comet (Tek Hücre Jel Elektroforezi) tekniğinde Singh ve diğerlerinin (Singh, McCoy, Tice, Schneider, 1988) uyguladığı metoda bazı modifikasyonlar ilave edilerek gerçekleştirilmiştir (Ünal, Saygılı, Akbaş, 2022: 313,335). Çalışma kriterlerine uygun donörlerden alınan periferik kanların 100'er µL'si, soğuk ortamda PBS (Fosfatlı Salin Çözeltisi) ile karıştırılmış ve yine soğuk ortamda lenfositler biocoll çözeltisi kullanılarak izole edilmiştir. İzole lenfositlerdeki hücre canlılığı için canlılık testi yapılmıştır. Trypan

blue testi ile yapılan canlılık değerlendirmesi, hücre canlılığının ≥ %97 olduğunu göstermiştir. Gıda katkı maddeleri, belirtilen konsantrasyonlarda 37°C sıcaklıkta bir saat boyunca izole lenfositlere uygulanmıştır. Çalışmada distile su negatif kontrol olarak, 100 µM H_2O_2 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, santrifüj işlemi yapılarak elde edilen üst sıvı tabakası olan süpernatant uzaklaştırılmış ve tampon çözeltisi olan PBS ile resüspanse edilmiştir. Bu işlem, hücreleri çözelti içinde homojen bir şekilde dağıtılmasını sağlamaktadır. Lenfositler steril bir ependorfta düşük erime ısılı agar ile karıştırılmış ve daha önceden hazırlanan (yüksek ısılı agar ile kaplanmış) lamlar üzerine yayılmıştır. Lamalle kapatılan preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra bir sonraki işlem için lameller kaldırılarak 1 saat lysing solüsyonunda inkübe edilmiştir. Preparatlar sonrasında elektroforez tamponunda da bekletilmiş ve ardından 20 dakika, 300 mA'de, 25 V da elektroforez uygulanmıştır. Tüm bu işlemler sonunda lamlar nötralizasyon tamponunda (0,4 M Tris, pH=7,5) bekletilmiş ve ardından bir floresan boyama maddesi olan etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak floresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz programında değerlendirilmiştir.

Comet testi ile DNA hasarının belirlenmesi

Comet testi analiz sonuçların hesaplanabilmesi için her bir konsantrasyon için, her bir donörden 100 hücre olmak üzere toplamda her konsantrasyon için 200 hücre değerlendirilmiştir. Hücresel hasar düzeyinin ölçümü 546 nm ve 590 nm'lik dalga boyları filtresine sahip olan Olympus BX51 floresan mikroskopta, Comet ölçüm analiz programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak (Resim 3.1) gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda DNA hasarı kuyruk yoğunluğu (%) ve kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu (µm) olmak üzere üç farklı comet parametresi cinsinden belirlenmiştir.



Resim 3.1. Comet analizinden bir görüntü

3.3.4. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada; Kromozom anormallikleri (KA), Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve Mikronükleus (MN) testlerine yönelik verilerin değerlendirilmesi, bu testlere özgü hazırlanan veri takip çizelgeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Comet testine ait veriler ise Perceptive Instruments Ltd., UK tarafından geliştirilen yazılım programı olan "Comet Assay IV" programı aracılığıyla kayıt altına alınmıştır. Uygulamalardan elde edilen sonuçlar, istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiş ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Bu adım, elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığını ve güvenilirliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

- Kromozomal anormallik (KA) testinde, hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) ve anormal hücre yüzdesi (% anormal hücre) sonuçları,
- Kardeş kromatid değişimi testinde KKD/hücre oranında kontrole kıyasla farklılığı
- Sitokinez blok mikronükleus sitom testinde mikronükleus (hücre başına düşen MN sayısı=MN/hücre değerleri), nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansının kontrole kıyasla değerlendirilmesi,
- Tüm Comet parametrelerinde kontrole kıyasla oluşan değişiklikler

ONE-WAY ANOVA ile analiz edilmiştir.

Diğer yandan replikasyon indeksi (Rİ), mitotik indeks (Mİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) sonuçları z-testi ile analiz edilmiştir.

Ayrıca doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacı ile SPSS 23.0 bilgisayar programıyla Regresyon analizi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DS (D-Sorbitol) Uygulaması

4.1.1. Kromozomal anormallik (KA) testi bulguları

DS'ün insan lenfosit kültüründeki genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla, 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucu her bir konsantrasyonda saptanan "anomallik tipleri", "anormal hücre frekansları" ve hücre başına düşen anormallik oranları belirlenmiştir. Bu tatlandırıcı insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı (%40,98), kromozom kırığı (%12,50), kromatidlerde birleşme (%27,62), disentrik kromozom (%2,03), halka kromozom (%1,45), kromatit değişimi (%1,45), fragment (%8,14) ve poliploidi (%5,81) tipi aberasyonlara neden olmuştur (Çizelge 4.1).

Her iki muamele sürelerinde en yüksek iki konsantrasyona bağlı olarak anormal hücre yüzdesinin artış gösterdiği gözlemlenmiştir (24 saatlik uygulama için r=0,94, 48 saatlik uygulama için r=0,92) (Çizelge 4.1, Resim 4.1).

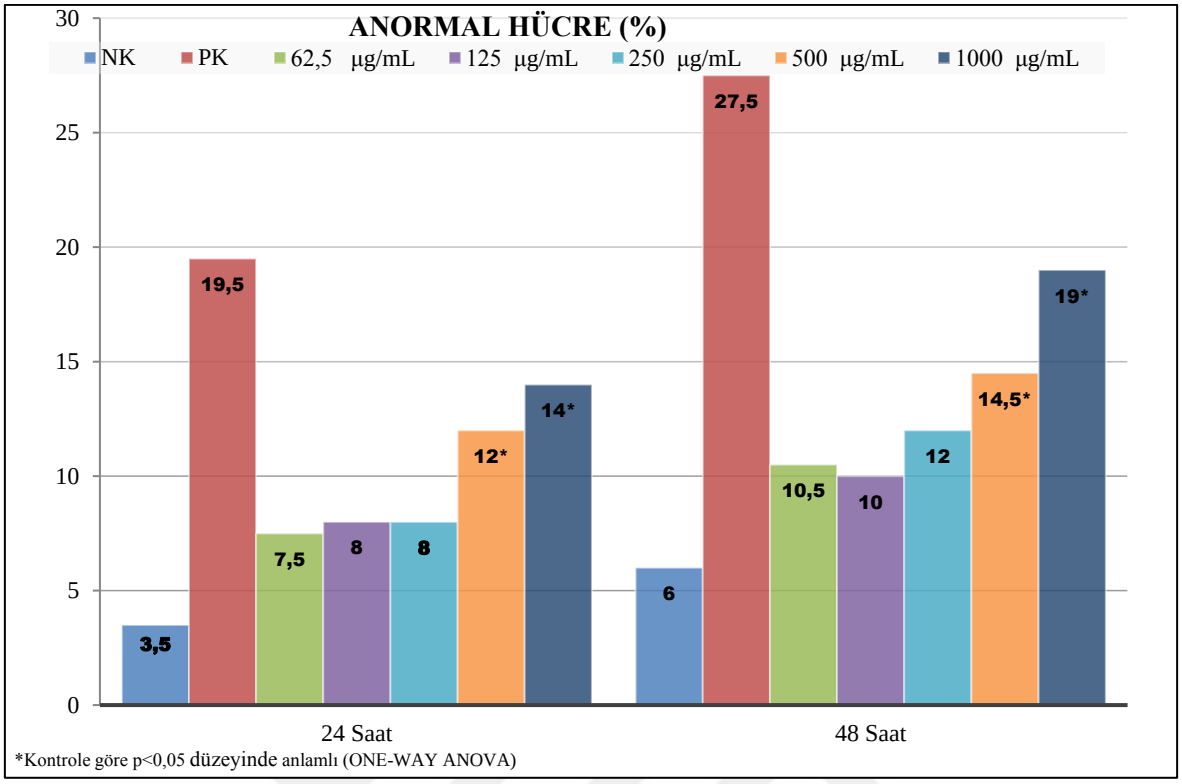
Benzer şekilde 24 ve 48 saat muamele sürelerinde hücre başına düşen anormallik frekansının artış gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu artış 24 saatlik uygulama süresinde DS'ün en yüksek iki konsantrasyonunda (500,00 ve 1000,00 µg/mL) anlamlı iken 48 saatlik uygulama süresinde en yüksek üç konsantrasyonda (250,00; 500,00 ve 1000,00 µg/mL) anlamlıdır. Bu artışlar, konsantrasyona bağlıdır (24 saatlik uygulama için r=0,94, 48 saatlik uygulama için r=0,92) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2)

Çizelge 4.1. DS'ün 24/48 saatlik uygulama sürelerinde insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları

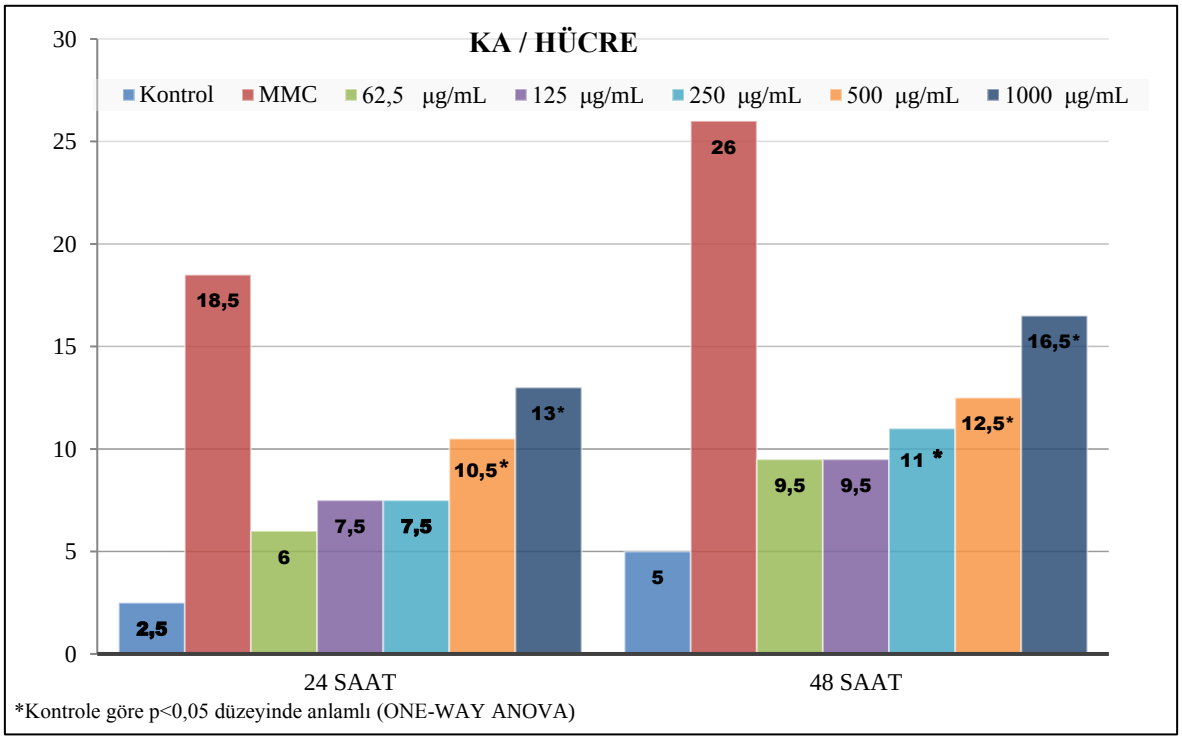
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	kkb	ds	h	ktd	f	p		
Kontrol	24	0,00	3	-	2	-	-	-	1	1	3,50±0,500	2,500±0,500
MMC	24	0,20	20	4	8	-	-	1	4	2	19,50±1,500	18,500±1,500
DS	24	62,50	6	1	4	-	1	-	2	1	7,50±1,500	6,000±0,000
		125,00	6	2	5	1	-	-	2	-	8,00±1,000	7,500±1,500
		250,00	8	1	5	-	-	-	-	2	8,00±0,000	7,500±0,500
		500,00	9	2	8	-	-	-	3	2	12,00±0,000*	10,500±1,500*
		1000,00	12	3	8	1	-	-	4	-	14,00±,000*	13,000±1,000*
Kontrol	48	0,00	2	1	6		-	-	-	3	6,00±1,000	5,000±0,000
MMC	48	0,20	27	7	10	-	-	4	3	4	27,50±1,500	26,000±0,000
DS	48	62,50	8	3	5	-	1	-	2	2	10,50±1,500	9,500±1,500
		125,00	8	4	5	-	-	-	1	2	10,00±0,000	9,500±0,500
		250,00	9	4	8	1	1	-	1	-	12,00±0,000	11,000±0,000*
		500,00	9	5	10	2	-	-	3	-	14,50±1,500*	12,500±1,500*
		1000,00	14	6	11	2	2	-	2	1	19,00±1,000*	16,500±0,000*
Kromozomal anormallik yüzdesi			40,98	12,50	27,62	2,03	1,45	1,45	8,14	5,81		

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

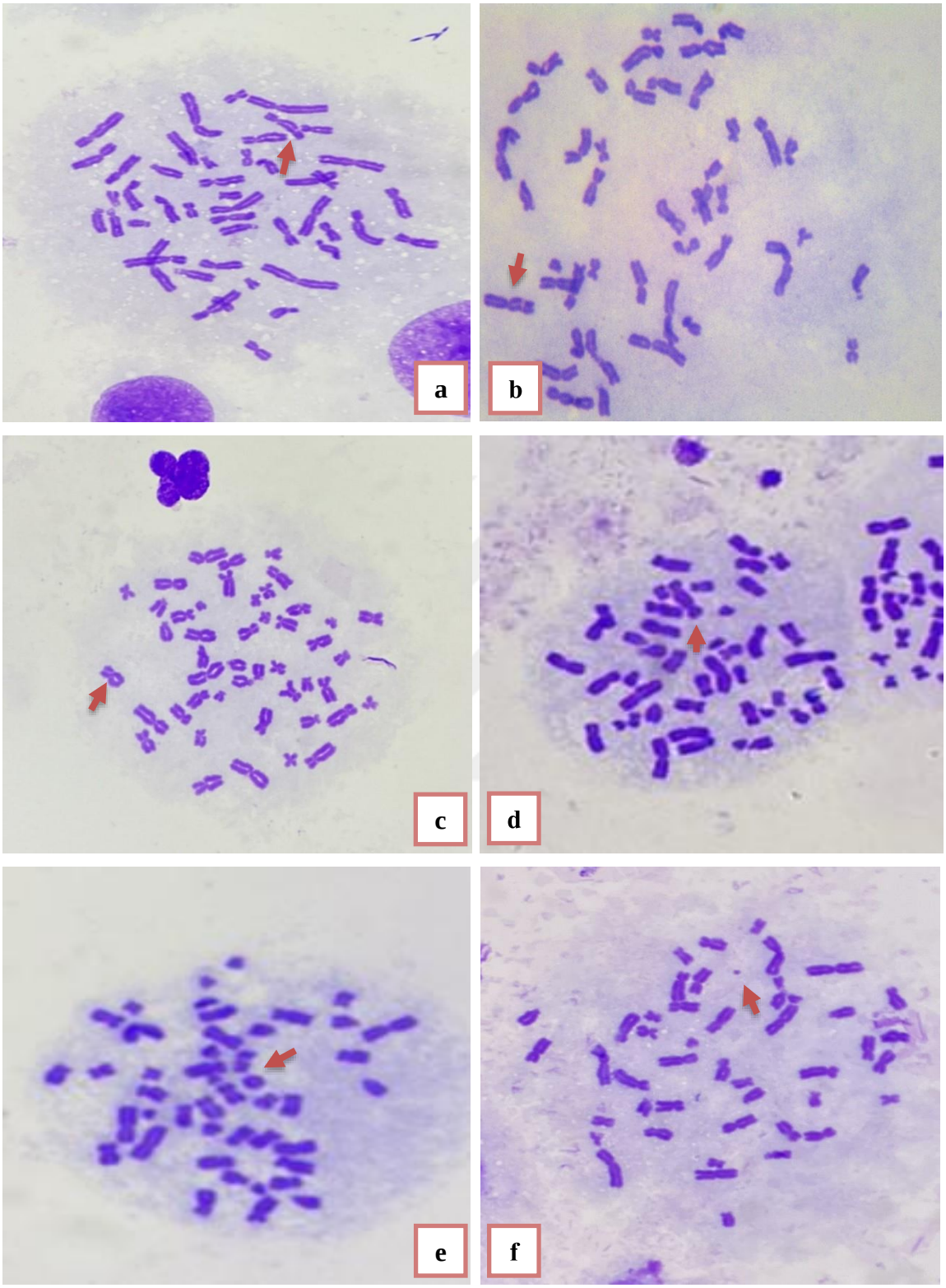
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)



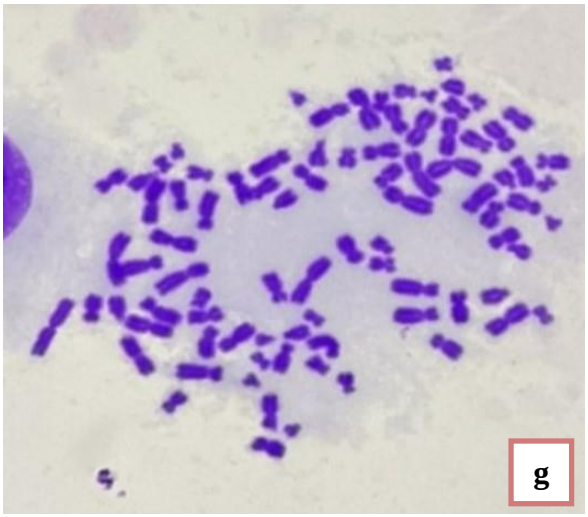
Şekil 4.1. DS uygulamasında insan periferal lenfositlerinde oluşan anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.2. DS uygulamasındaki insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkisi



Resim 4.1. DS uygulamasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik kromozom e) halka kromozom f) fragment g) poliploidi



Resim 4.1. DS uygulamasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik kromozom e) halka kromozom f) fragment g) poliploidi

4.1.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi bulguları

DS'ün 24 ve 48 saatlik muamele süresindeki KKD frekansı, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerine etkisi Çizelge 4.2'de verilmiştir. 24 ve 48 saat DS'e tüm konsantrasyonlarda KKD oluşumu kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda artırmıştır (yalnızca 24 saatlik muamele süresindeki en düşük 62,50 µg/mL'lik konsantrasyon hariç). Ayrıca bu artışlar 48 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı iken (r=0,76), 24 saatlik muamelesinde konsantrasyonla korelasyonu orta derecededir (r=0,63) (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Resim 4.2).

24 saatlik uygulamada mitotik indeks değeri en yüksek iki konsantrasyonda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş göstermiştir. Diğer yandan 48 saatlik muamelede ise en yüksek üç konsantrasyonda önemli bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Mitotik indekste tespit edilen bu düşüşler 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde ise konsantrasyona bağlıdır (24h r=-0,94 ve 48h r=-0,97). Ayrıca DS'ün replikasyon indeksini anlamlı bir düzeyde etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. DS uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

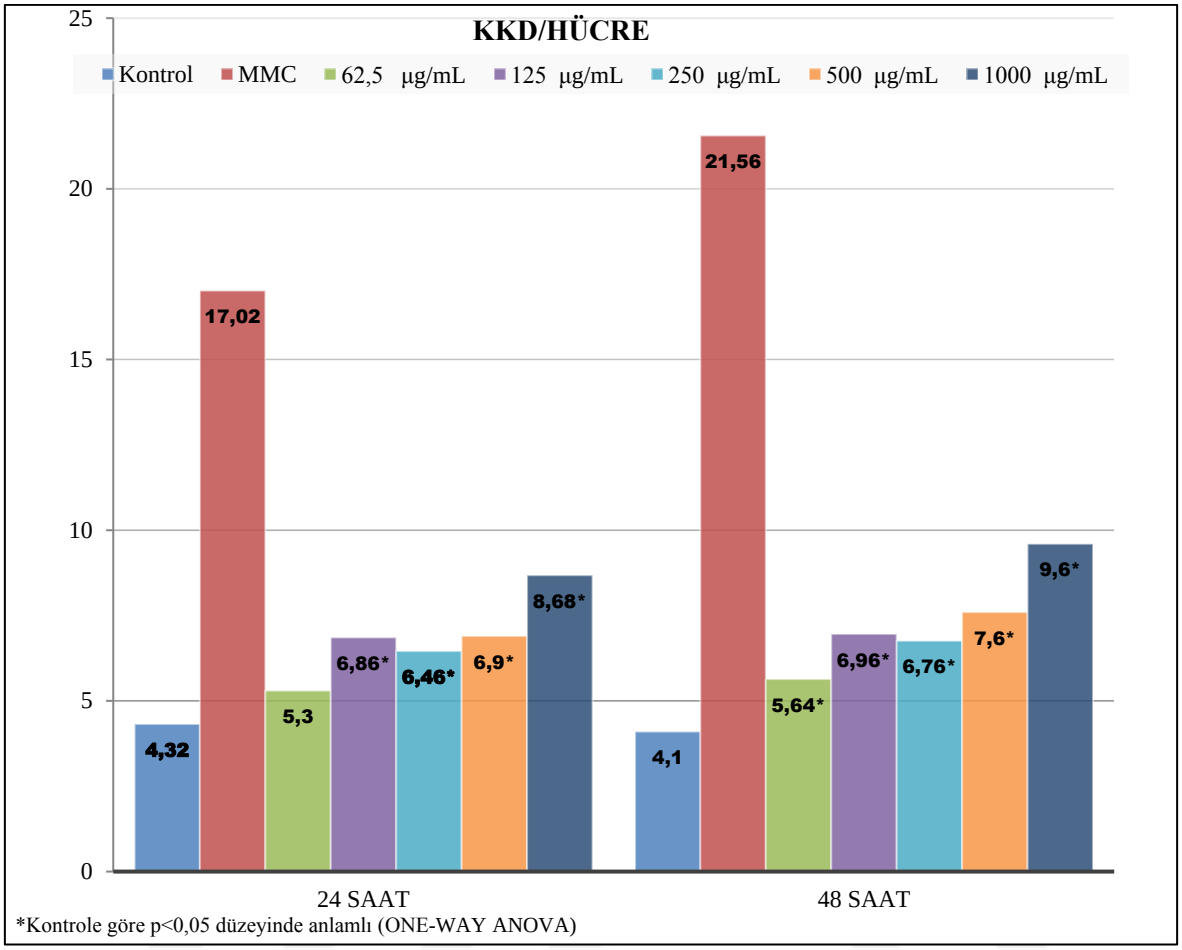
Test maddesi	Uygulama: Süre (saat)	Uygulama: Konsantrasyon (µg/mL)	Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
Kontrol	24	0,00	0-10	4,32±0,353	50	69	81	2,16±0,056	7,25±0,57
MMC	24	0,20	8-32	17,02±0,788	44	82	74	2,15±0,053	3,550±0,41
DS	24	62,50	2-10	5,30±0,321	40	61	99	2,30±0,055	6,00±0,53
		125,00	3-12	6,86±0,372*	44	68	88	2,22±0,055	5,80±0,52
		250,00	3-15	6,46±0,374*	29	69	102	2,37±0,051	5,30±0,50
		500,00	4-15	6,90±0,335*	33	78	89	2,28±0,052	4,95±0,49++
		1000,00	4-17	8,68±0,508*	36	77	87	2,26±0,053	4,40±0,49++
Kontrol	48	0,00	1-9	4,10±0,314	56	63	81	2,13±0,058	7,30±0,58
MMC	48	0,20	11-40	21,56±0,993	60	86	54	1,97±0,053	3,30±0,40
DS	48	62,50	2-11	5,64±0,315*	42	76	82	2,20±0,054	6,20±0,54
		125,00	3-15	6,96±0,372*	42	77	81	2,20±0,054	5,80±0,52
		250,00	3-17	6,76±0,43*	40	71	89	2,25±0,054	5,25±0,50++
		500,00	5-19	7,60±0,468*	42	70	88	2,23±0,055	4,85±0,48++
		1000,00	6-20	9,60±0,497*	46	72	82	2,18±0,053	4,05±0,44+++

*Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)

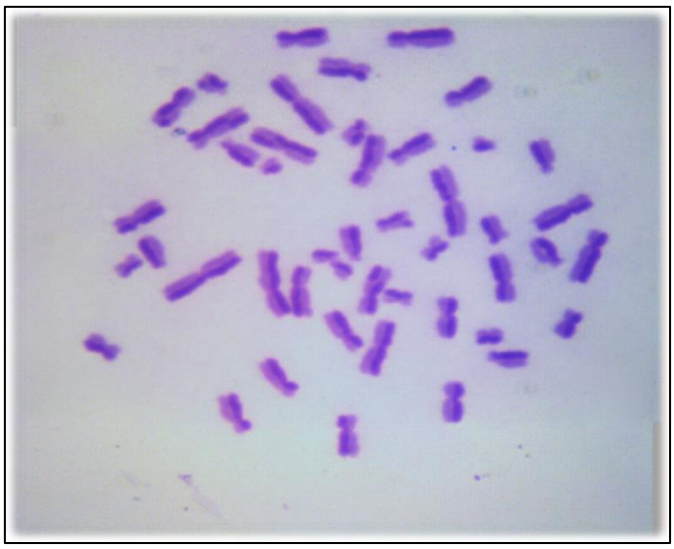
+Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

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

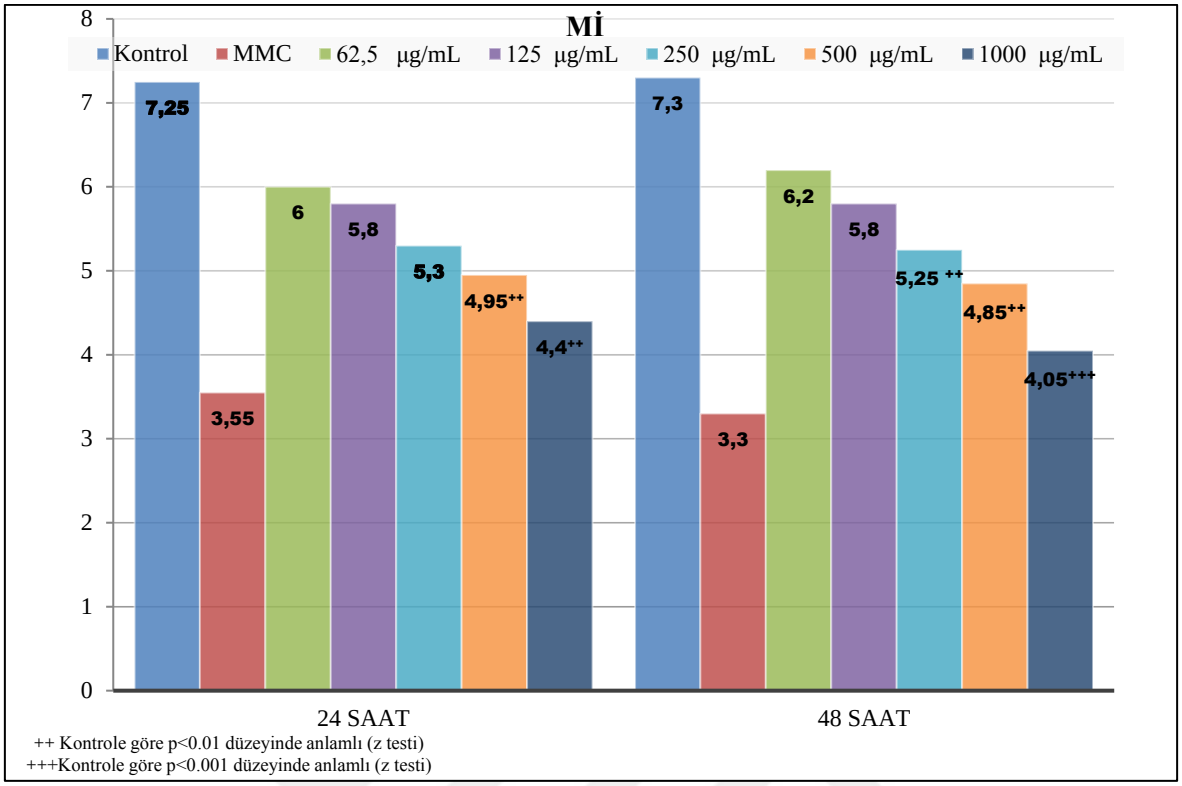
+++Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.3. DS ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı



Resim 4.2. DS uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri



Şekil 4.4. DS ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri

4.1.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi bulguları

48 saat boyunca DS'le muamele edilen kültürlerde, binükleat hücrelerde oluşan mikronükleus yüzdesinde artış Çizelge 4.3, Şekil 4.5, Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu artış en yüksek iki konsantrasyonda, istatiksel olarak anlamlı düzeyde ve konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (r=0,90). Öte yandan, DS'ün yalnızca en yüksek konsantrasyonda nükleer tomurcuk frekansını anlamlı düzeyde artırdığı gözlemlenirken, nükleoplazmik köprü yüzdesini ise etkilemediği tespit edilmiştir (Resim 4.3). Bu artışlar konsantrasyona bağlı olarak paralellik gerçekleşmiştir (Nükleer tomurcuk için r=0,95) (Şekil 4.6). Nükleer bölünme indeksinin DS uygulamasından etkilenmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. DS'ün insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer bölünm indeksi ve nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi

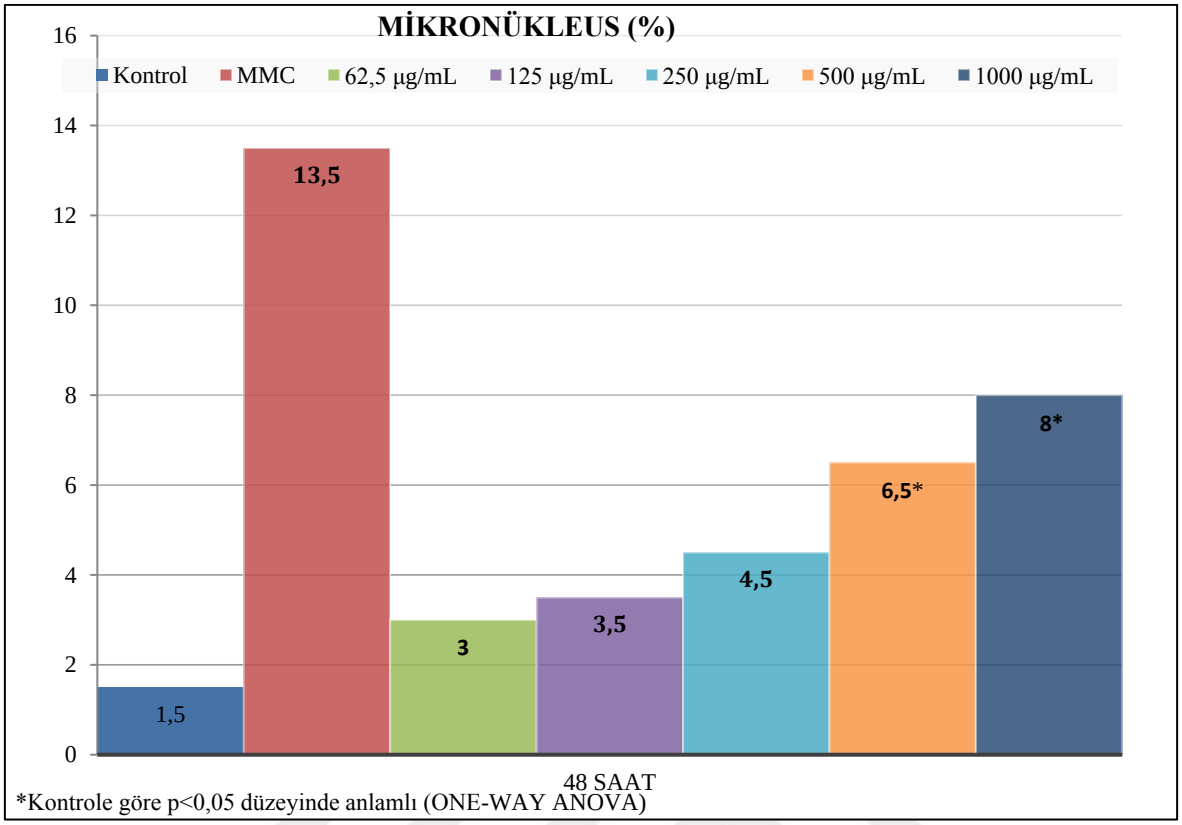
Test maddesi	Uygulama: Süre (saat)	Uygulama: Konsantrasyon (µg/mL)	Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları (1)	(2)	(3)	MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH	Nükleer Tomurcuk (NT)± SH (%)	Nükleoplazmik Köprü (NPK) ± SH (%)
Kontrol	48	0,00	2000	3	-	-	1,500 ± 0,500	2,01 ± 0,45	2,50 ± 0,50	1,00±1,00
MMC	48	0,20	2000	23	3	-	13,500 ± 1,000	1,70 ± 0,41	13,00 ± 2,00	5,50±3,50
DS	48	62,5	2000	6	-	-	3,000 ± 1,000	1,78 ± 0,42	5,50 ± 0,50	1,00±1,00
		125	2000	7	-	-	3,500± 0,500	1,59± 0,40	6,00 ± 0,00	2,00±1,00
		250	2000	9	-	-	4,500 ± 0,500	1,71± 0,41	6,50 ± 0,50	2,50±0,50
		500	2000	12	1	-	6,500 ± 0,500*	1,54 ± 0,39	7,50 ± 0,50	3,00±2,00
		1000	2000	16	2	-	8,000 ± 0,000*	1,89± 0,42	8,50± 0,50*	3,50±0,50

* Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)

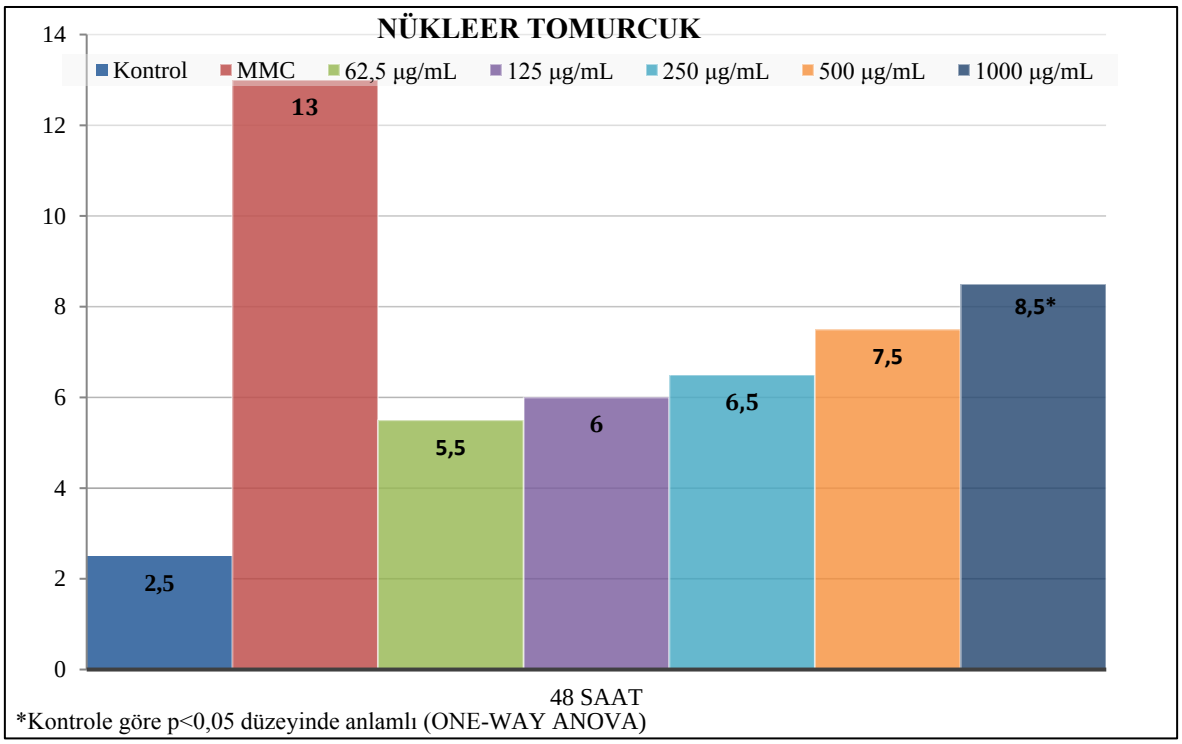
+Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

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

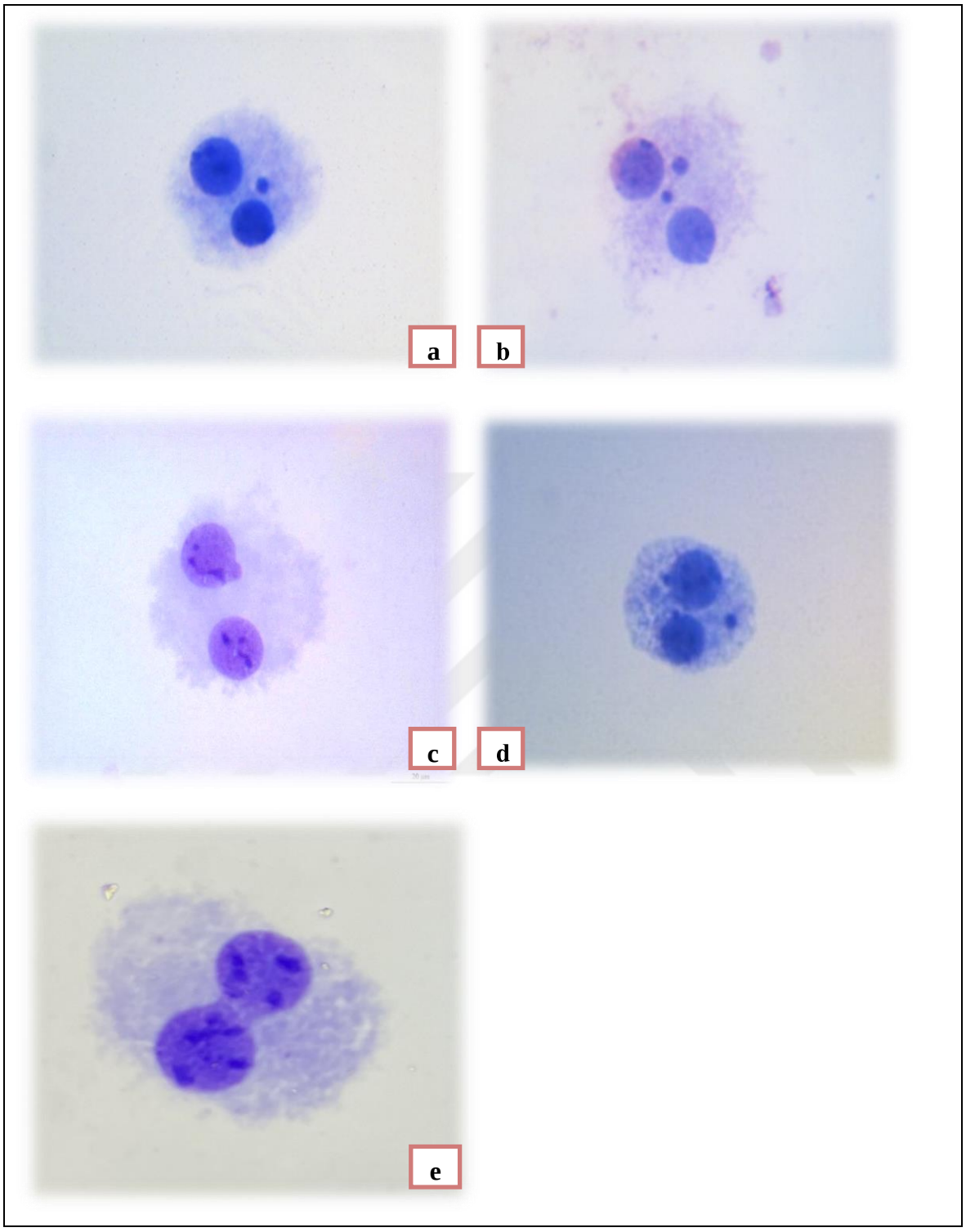
+++Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.5. DS'ün insan lenfositlerinde mikronükleus frekans üzerine etkisi



Şekil 4.6. DS'ün insan lenfositlerinde, nükleer tomurcuk (%) üzerine etkisi



Resim 4.3. DS uygulaması ile insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) iki mikronükleuslu binükleatlı hücre c) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre d) bir mikronükleslu iki nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre e) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre

4.1.4. Comet testi bulguları

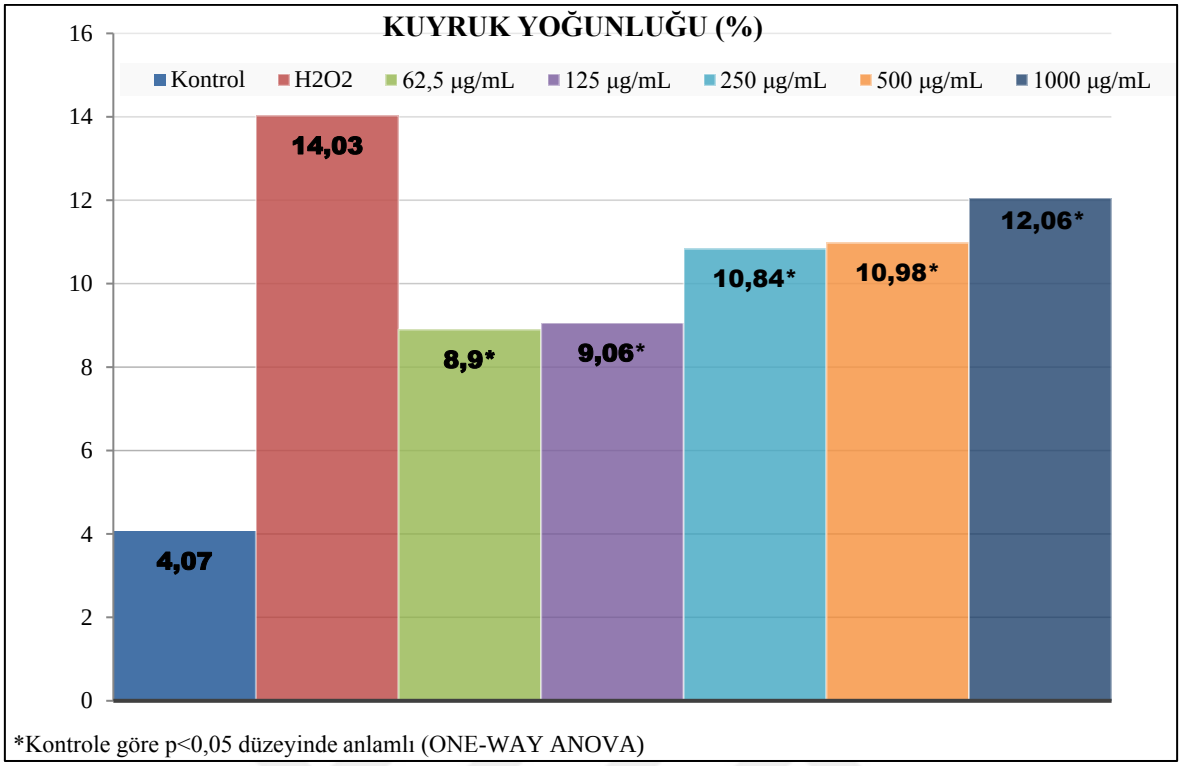
DS'ün izole lenfositlerle muamelesi sonucunda comet testi kullanılarak DNA hasarı üzerine etkileri üç farklı parametre kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu parametreler; comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti olup elde edilen değerler Çizelge 4.4'te verilmiştir. Resim 4.4'te ise comet testinde görülen DNA hasarı örnekleri verilmiştir.

DS'ün izole lenfositlere 1 saat süre boyunca uygulanmasının kontrole kıyasla DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca istatistiksel olarak bakıldığında DS'ün tüm konsantrasyonları tarafından (kuyruk momentinde en düşük iki konsantrasyonu hariç) meydana getirilen DNA hasarının kontrole kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu artış kuyruk uzunluğunda (r=0,46) zayıf korelasyon ile, kuyruk yoğunluğu (r=0,26) ve kuyruk momentinde (r=0, 21) ise konsantrasyona bağlı olmaksızın gerçekleşmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

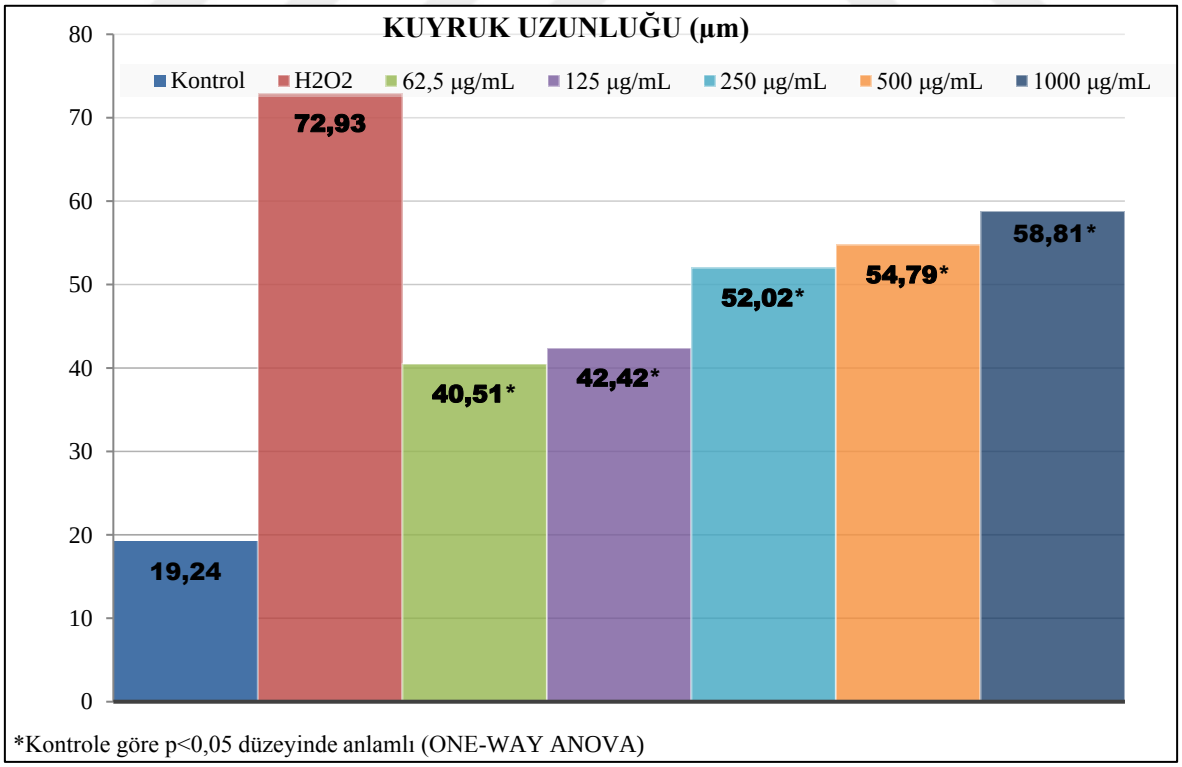
Çizelge 4.4. DS uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (μm)	Kuyruk Moment
	Süre (saat)	Konsantrasyon			
Kontrol	1	0,0 μg/mL	4,07 ± 0,54	19,24 ± 0,48	0,59 ± 0,09
H_2O_2	1	100 μM	14,03 ± 1,34	72,93 ± 6,09	3,08 ± 0,33
DS	1	62,50 μg/ml	8,90 ± 0,99*	40,51 ± 1,57*	0,91 ± 0,17
		125 μg/ml	9,06 ± 0,56*	42,42 ± 1,03*	0,95 ± 0,98
		250 μg/ml	10,84 ± 0,87*	52,02 ± 0,98*	1,85 ± 0,19*
		500 μg/ml	10,98 ± 0,96*	54,79 ± 0,94*	2,38 ± 0,36*
		1000 μg/ml	12,06 ± 1,44*	58,81 ± 1,05*	2,61 ± 0,46*

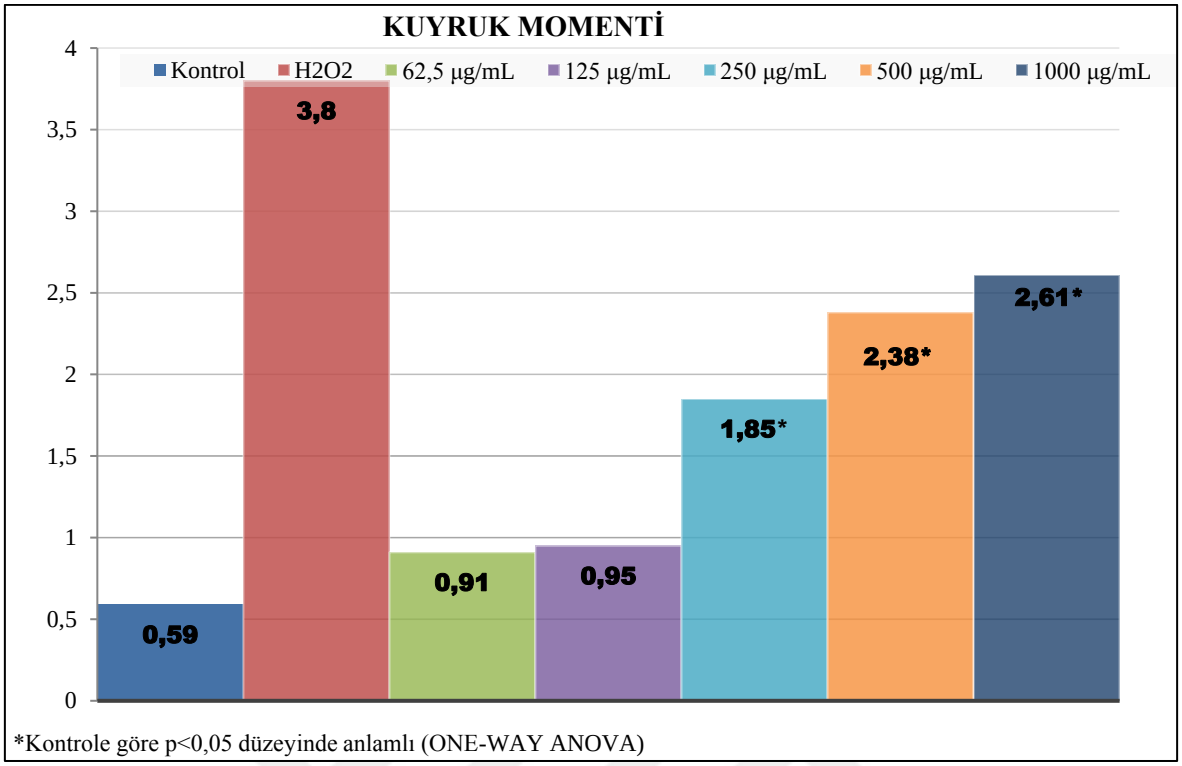
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)



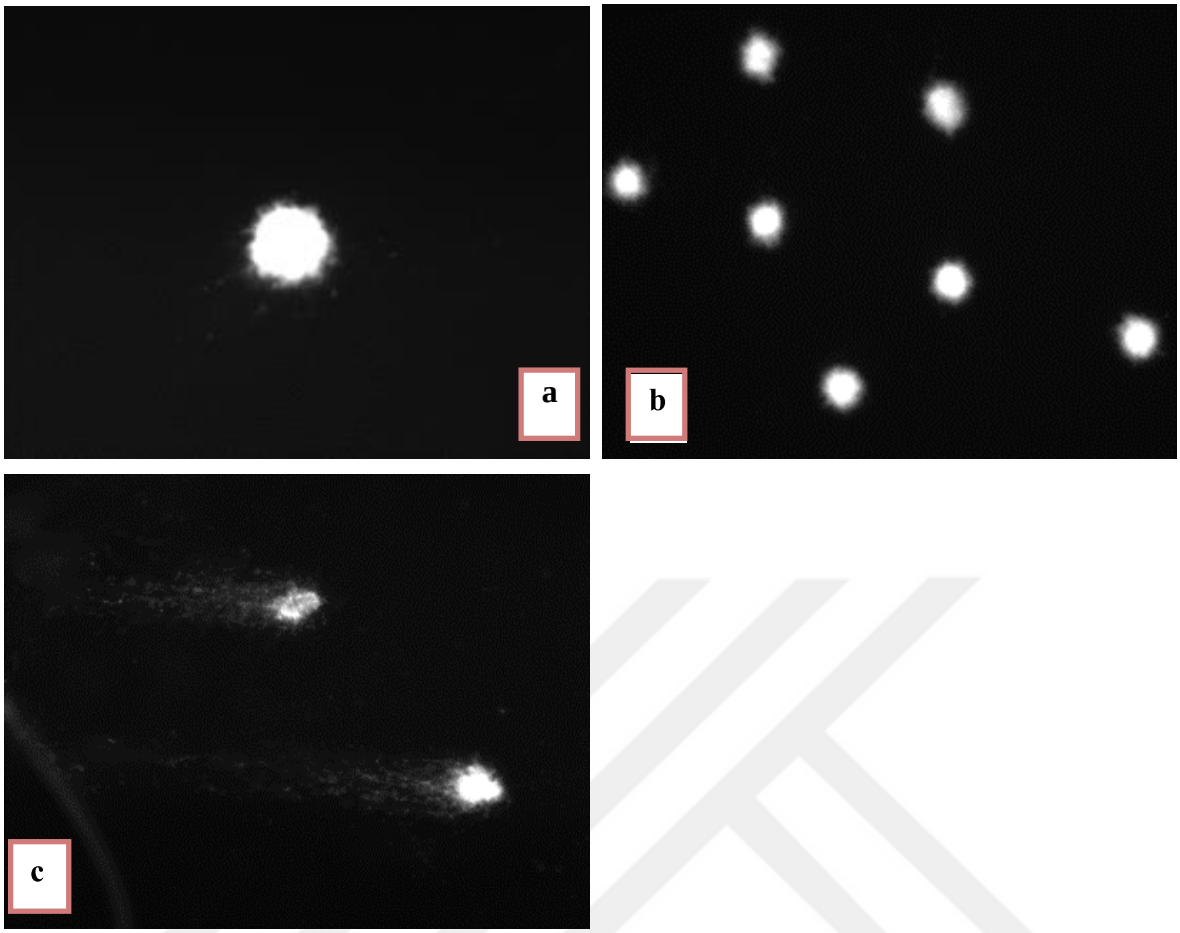
Şekil 4.7. DS uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan Comet Kuyruk Yoğunluğu (%)



Şekil 4.8. DS muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Uzunluğu (µm)



Şekil 4.9. DS muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Momenti



Resim 4.4. DS uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA

4.2. DSX (D-Sorbitol ile Xylitol) Karışım Uygulaması

4.2.1. Krozomal anormallik (KA) testi bulguları

DSX'in konsantrasyonlarının insan lenfositlerine 24 ve 48 saat süre ile uygulanması sonucunda, belirlenen anormallik tipleri, anormal hücre frekansları, hücre başına düşen anormallik değerleri Çizelge 4.5, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. DSX ile muamale sonucunda meydana gelen yapısal anormallikler; kromatit kırığı (% 34,85), kromozom kırığı (% 6,47), kardeş kromatitlerde birleşme (% 29,18), disentrik kromozom (% 5,84), halka kromozom (% 5,36), kromatit değişimi (% 1,58), ve fragmenttir (% 13,41). Gözlenen sayısal anormallik ise poliploididir (% 3,1) (Resim 4.5). DSX'in, anormal hücre frekansı (%) ve hücre başına düşen anormallik oranını (24 saatlik uygulamalarda 1:1 oranında en düşük üç konsantrasyon ve 48 saatlik uygulamada 1:1 oranında en düşük iki konsatrasyonları hariç) sadece 1:1 oranında en yüksek konsantrasyonda ve 3:1 oranında tüm

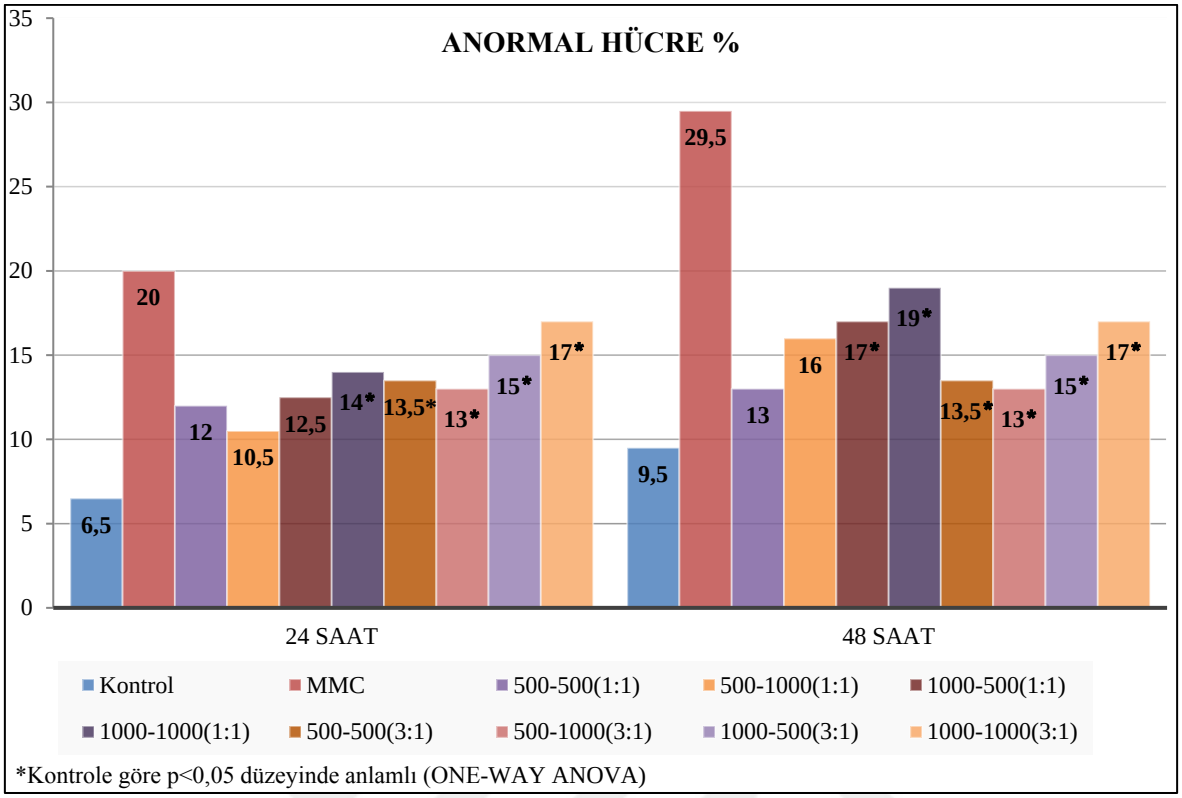
konsatrasyonlarda kontrole göre anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.10, Şekil 4.11). Anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik oranındaki bu artışlar konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için r=0,88 ve hücre başına düşen anormallik sayısı için r=0,83; 48 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için r=0,83; hücre başına düşen anormallik sayısı için r=0,75).

Çizelge 4.5. DSX uygulamasının insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları üzerine etkisi

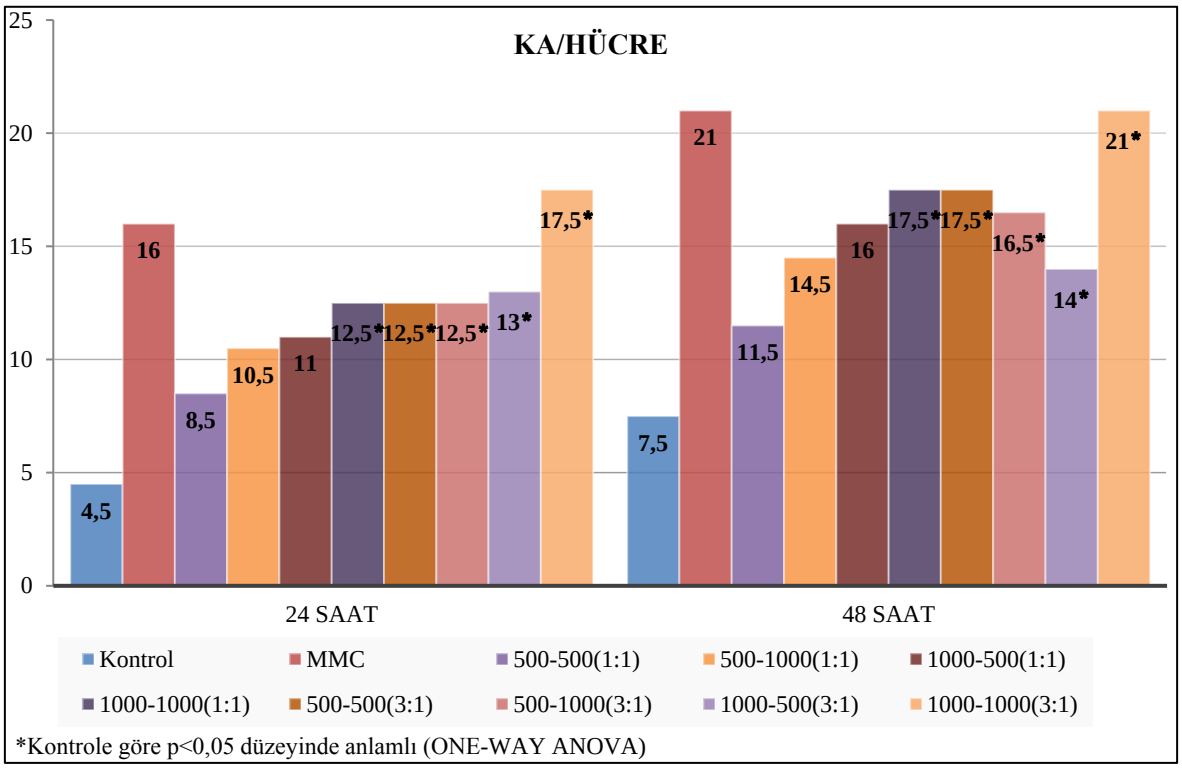
Test maddesi	Süre (saat)	Uygulama Konsantrasyon (µg/mL)	Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			ktk	kzk	kkb	ds	h	ktd	f	p		
Kontrol	24	0,00	4	-	7	-	-	-	-	1	6,50 ± 0,500	4,500 ± 0,500
MMC	24	0,20	17	5	8	-	1	2	6	1	20,00 ± 1,000	16,000 ± 1,000
DSX	24	500/500	9	-	8	2	2	-	3	-	12,00 ± 1,000	8,500 ± 0,500
	(1:1)	500/1000	6	-	10	2	2	-	2	-	10,50 ± 1,500	10,500 ± 1,500
		1000/500	8	-	9	-	2	-	6	-	12,50 ± 0,500	11,000 ± 0,500
		1000/1000	8	2	11	1	3	-	3	-	14,00 ± 1,000*	12,500 ± 2,500*
		500/500	10	2	8	2	3	-	4	-	13,50 ± 1,500*	12,500 ± 0,500*
	(3:1)	500/1000	7	3	8	1	2	-	3	2	13,00 ± 0,000*	12,500 ± 1,000*
		1000/500	10	1	10	-	-	-	7	2	15,00 ± 0,000*	13,000 ± 1,500*
		1000/1000	10	3	11	1	1	-	7	1	17,00 ± 0,500*	17,500 ± 0,500*
Kontrol	48	0,00	6	1	8	-		-	3	1	9,50 ± 3,000	7,500 ± 0,500
MMC	48	0,20	27	4	11	3	-	5	6	3	29,50 ± 1,500	21,000 ± 4,000
DSX	48	500/500	9	1	10	-	2	-	4	-	13,00 ± 3,000	11,500 ± 0,500
	(1:1)	500/1000	13	1	9	2	2	-	4	1	16,00 ± 2,000	14,500 ± 0,500
		1000/500	12	4	9	3	1	1	4	-	17,00 ± 0,000*	16,000 ± 1,000
		1000/1000	11	4	11	3	3	2	4	-	19,00 ± 1,000*	17,500 ± 0,500*
		500/500	10	5	11	3	3	-	5	3	13,50 ± 1,500*	17,500 ± 0,500*
	(3:1)	500/1000	14	1	10	3	2	-	4	2	13,00 ± 0,000*	16,500 ± 0,500*
		1000/500	13	2	6	3	2	-	7	1	15,00 ± 0,000*	14,000 ± 1,000*
		1000/1000	17	2	10	8	3	-	3	3	17,00 ± 0,000*	21,000 ± 1,000*
Kromozomal anormallik yüzdesi			34,85	6,47	29,18	5,84	5,36	1,58	13,41	3,31		

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

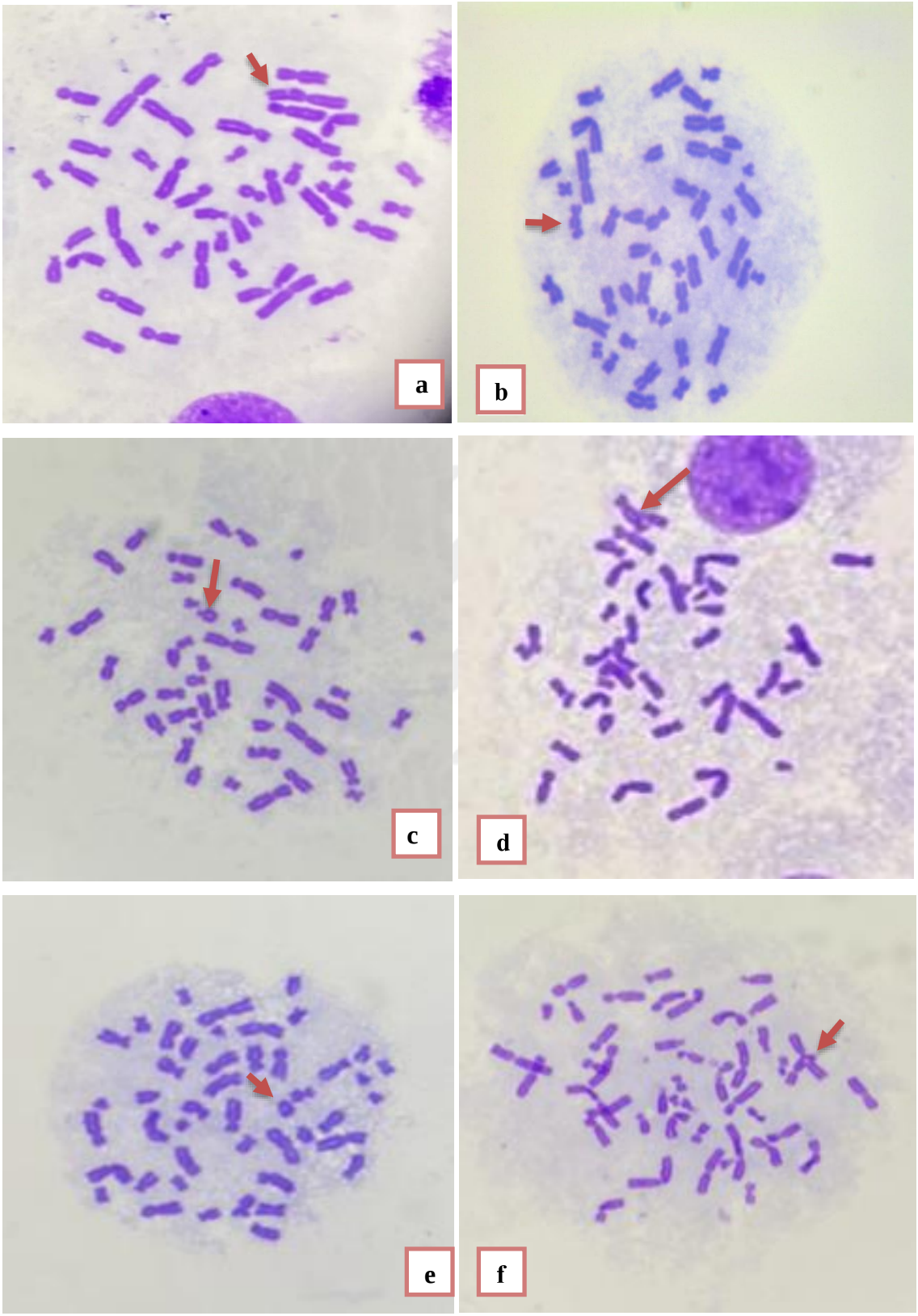
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)



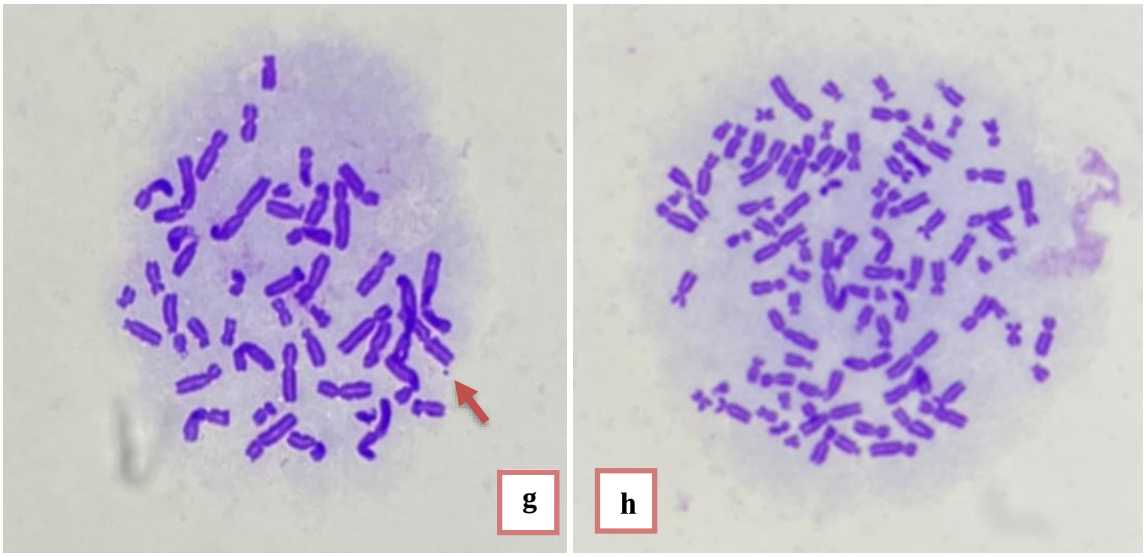
Şekil 4.10. DSX uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.11. DSX uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi



Resim 4.5. DSX uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik e) halka kromozom f) kromatit değişimi g) fragment h) poliploidi



Resim 4.5. (devam) DSX uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik e) halka kromozom f) kromatit değişimi g) fragment h) poliploidi

4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi bulguları

D-Sorbitol ile xylitol karışımının (DSX'in) sekiz farklı konsantrasyonunun 24 ve 48 saatlik süre ile insan periferal lenfositlerine uygulanması sonucunda Kardeş kromatid değişimi (KKD), Replikasyon indeksi (Rİ) ve Mitotik indeksi (Mİ) üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.6'te gösterilmiştir.

DSX'in gerçekleştirilen 1:1 ve 3:1 oranın uygulamasında 24 saatlik muamelede en az 3, en fazla 19 KKD oluşumu gözlenmiştir. 48 saatlik muamele uygulamalarında ise en az 5, en fazla 23 KKD oluşumu saptanmıştır. DSX tarafından oluşturulan 1:1 ve 3:1 oranında uygulanan karışımın KKD frekansını 24 ve 48 saatlik uygulamada ve tüm konsantrasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu anlamlılık 24 saatlik sürede tüm uygulamalarda konsantrasyona bağlı (r= 0,31) olarak gerçekleşmemişken 48 saatlik sürede tüm uygulamalarda ise düşük oranda doza bağlı olduğu görülmüştür (r = 0,44, zayıf düzeyde). Her iki muamele süresinde Mİ değerinde negatif kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş 24 saatlik muamele süresinde Mİ değeri hem 1:1 hem de 3:1 oranında en yüksek iki konsantrasyonında anlamlı iken 48 saatlik muamele süresinde 1:1 ve 3:1 oranında tüm konsantrasyonda anlamlıdır. Bu anlamlılık istatistiksel olarak konsantrasyona bağlı olarak düşüş göstermiştir. Buna karşın DSX'in Rİ'ni etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.12 ve Resim 4.6).

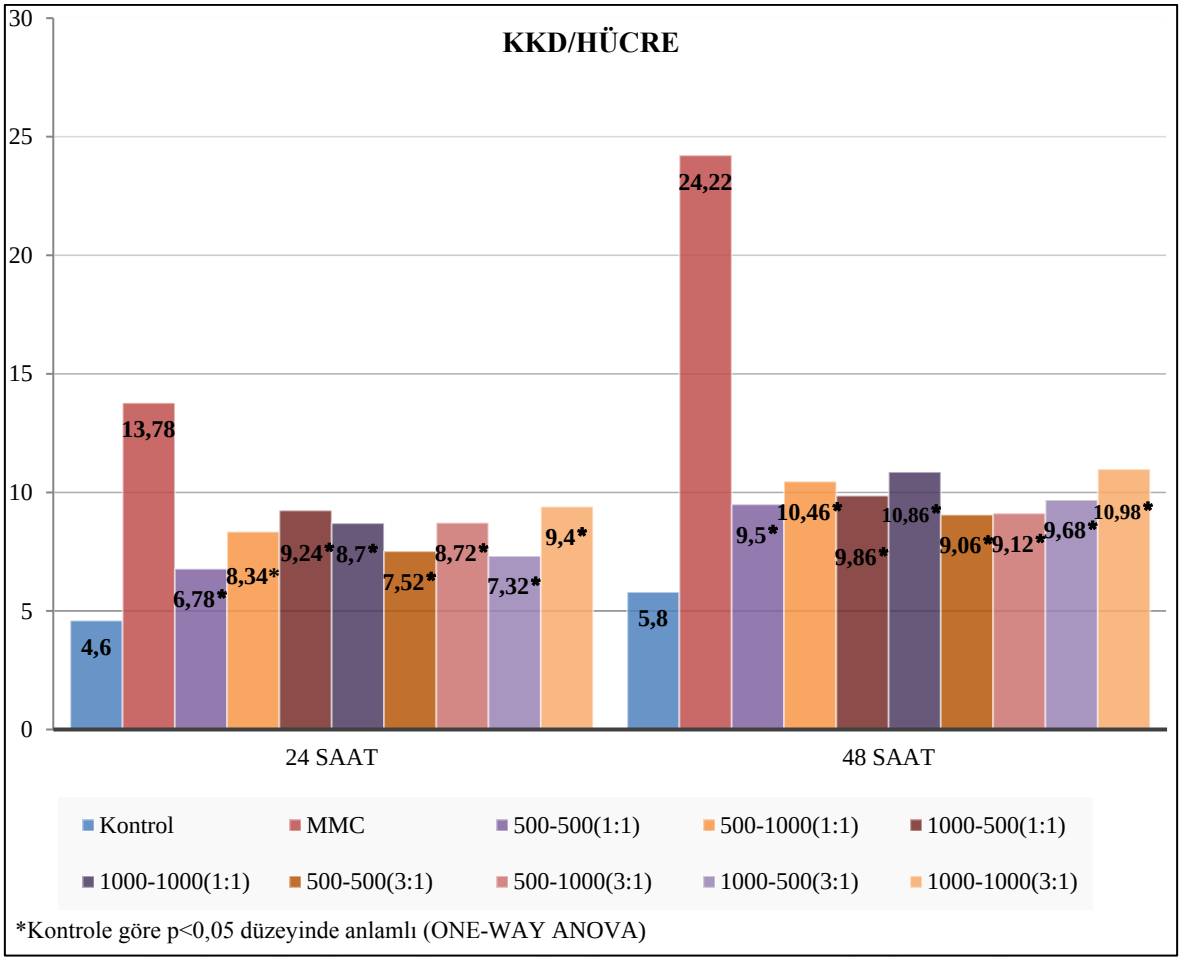
Test maddesi	Uygulama Süre (saat)	Konsantrasyon (μg/mL)	Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
Kontrol	24	0.00	1-9	4,60 ± 0,296	33	59	108	2,38 ± 0,053	6,60 ± 0,572
MMC	24	0.20	8-28	13,78 ± 0,757	24	88	88	2,32 ± 0,026	3,70 ± 0,422
DSX	24	500/500	3-15	6,78 ± 0,371*	21	64	115	2,47 ± 0,058	5,55 ± 0,512
	(1:1)	500/1000	5-19	8,34 ± 0,364*	28	72	100	2,36 ± 0,038	5,70 ± 0,518
		1000/500	4-14	9,24 ± 1,002*	20	75	105	2,42 ± 0,026	5,50 ± 0,509^{+}
		1000/1000	4-16	8,70 ± 0,421*	17	75	108	2,46 ± 0,052	5,35 ± 0,503^{+}
		500/500	5-12	7,52 ± 0,313*	26	70	102	2,36 ± 0,013	5,60 ± 0,514
	(3:1)	500/1000	5-13	8,72 ± 0,339*	32	74	94	2,31 ± 0,046	5,75 ± 0,520
		1000/500	3-13	7,32 ± 0,338*	18	70	112	2,47 ± 0,058	5,50 ± 0,509^{+}
		1000/1000	4-18	9,04 ± 0,506*	19	73	108	2,45 ± 0,045	5,15 ± 0,495^{+}
Kontrol	48	0.00	2-10	5,80 ± 0,315	23	62	115	2,46 ± 0,049	8,00 ± 0,607
MMC	48	0.20	11-45	24,22 ± 1,606	11	75	114	2,51 ± 0,032	3,25 ± 0,397
DSX	48	500/500	7-16	9,50 ± 0,360*	22	63	115	2,47 ± 0,000	5,20 ± 0,496^{+++}
	(1:1)	500/1000	8-20	10,46 ± 0,405*	12	70	118	2,53 ± 0,003	5,25 ± 0,499^{+++}
		1000/500	5-19	9,86 ± 0,384*	18	68	114	2,48 ± 0,013	5,20 ± 0,496^{+++}
		1000/1000	9-20	10,86 ± 0,351*	12	79	109	2,48 ± 0,013	5,10 ± 0,492^{+++}
		500/500	6-19	9,06 ± 0,306*	12	61	127	2,58 ± 0,076	5,20 ± 0,496^{+++}
	(3:1)	500/1000	7-16	9,12 ± 0,325*	15	61	124	2,54 ± 0,051	5,10 ± 0,492^{+++}
		1000/500	5-16	9,68 ± 0,357*	22	68	110	2,44 ± 0,002	5,10 ± 0,492^{+++}
		1000/1000	7-23	10,98 ± 0,514*	10	67	123	2,57 ± 0,070	4,85 ± 0,480^{+++}

* Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)

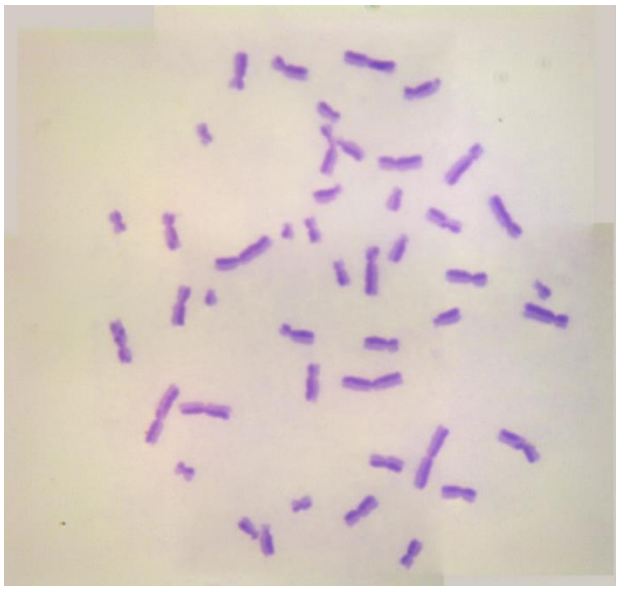
+Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

++ Pozitif kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

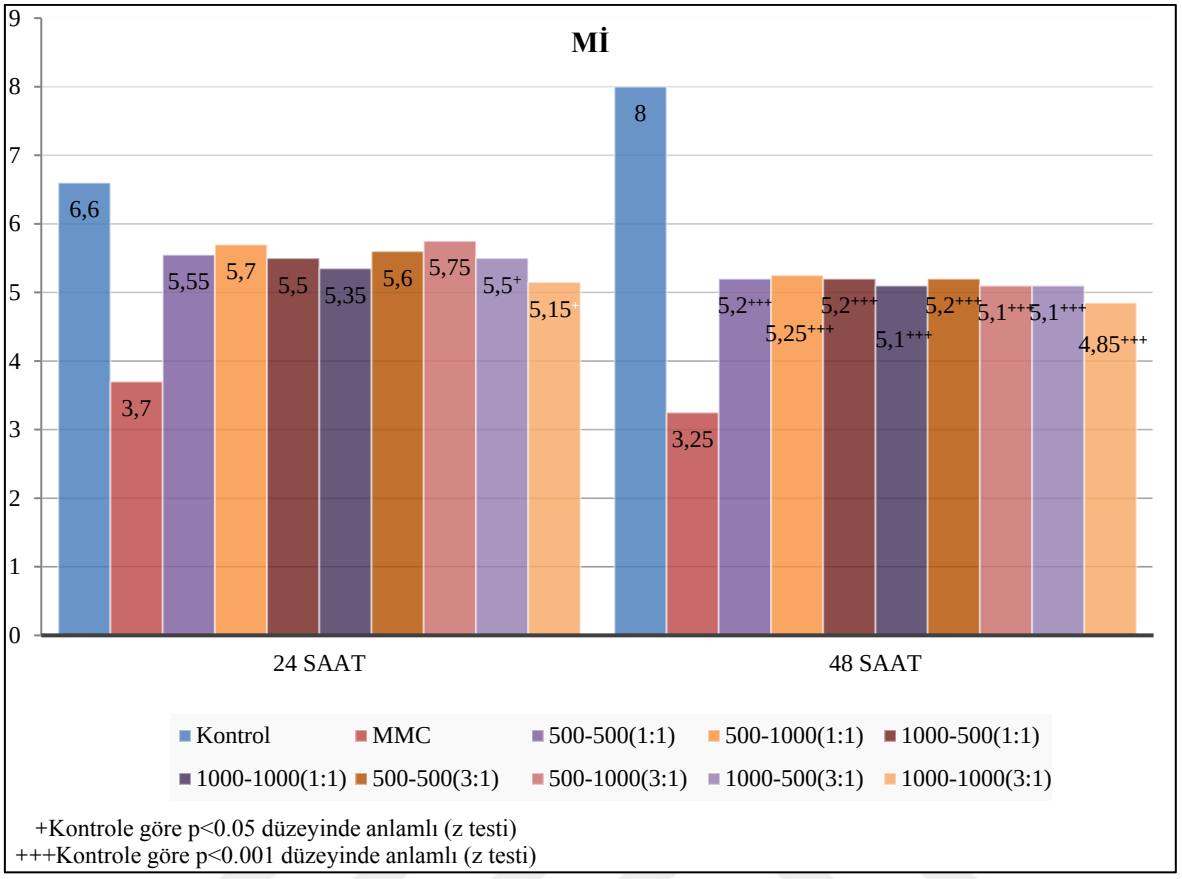
+++ Pozitif kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.12. DSX ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki KKD frekansı



Resim 4.6. DSX uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri



Şekil 4.13. DSX uygulaması ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri

4.2.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi bulguları

DSX ile insan lenfositlerinde 48 saat muamele edilerek yapılan MN analizi sonucunda; DSX'in MN frekansını tüm konsantrasyonlarda artırdığı, bu artışın tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.14). Mikronükleus frekansında meydana gelen bu artış konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (r=0,73). İnsan lenfosit hücrelerinin DSX ile muamelesi sonucunda; her bir konsantrasyon için sayılan 2000 binükleat hücre içinde birli ve ikili mikronükleuslara, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü içeren binükleatlara da rastlanılmıştır (Resim 4.7). DSX'in nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerinde herhangi bir anlamlı etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Ayrıca DSX uygulaması sonucu nükleer tomurcuk (r=0,80) ve nükleoplazmik köprü (r=0,77) içeren binükleat hücrelerin frekansında da konsantrasyona bağlı artış meydana gelmiştir. Ancak bu artış nükleer tomurcukda yalnızca en yüksek konsantrasyonda önemli iken nükleoplazmik köprü frekansında ise en yüksek iki konsantrasyonda önemlidir (Şekil 4.15).

Çizelge 4.7. DSX uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı, Nükleer bölünme indeksi, Nükleer tomurcuk ve Nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi

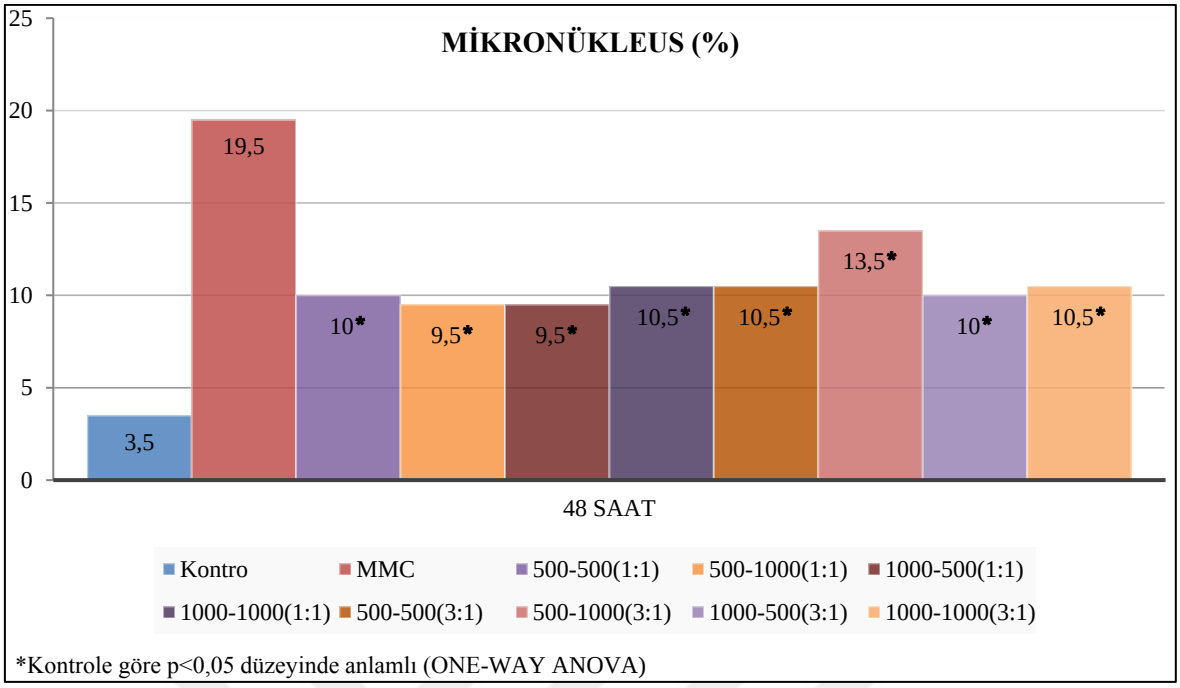
Test maddesi	Uygulama: Süre (saat)	Uygulama: Konsantrasyon (µg/mL)	Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları (1)	(2)	(3)	MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH	Nükleer Tomurcuk (NT)± SH (%)	Nükleoplazmik Köprü (NPK)± SH (%)
Kontrol	48	0,00	2000	7	-	-	3,500 ± 0,500	1,74 ± 0,414	1,50 ± 0,500	0,00 ± 0,000
MMC	48	0,20	2000	29	9	1	19,500 ± 1,500	1,80 ± 0,421	12,50 ± 2,500	11,00 ± 2,000
DSX	48	500/500	2000	17	3	-	10,000 ± 0,000*	1,92 ± 0,435	6,00 ± 1,000	4,50 ± 0,500
	(1:1)	500/1000	2000	17	2	-	9,500 ± 0,500*	1,75 ± 0,172	6,50 ± 1,500	6,00 ± 1,000
		1000/500	2000	15	2	-	9,500 ± 0,500*	1,80 ± 0,420	6,50 ± 1,500	7,00 ± 2,000
		1000/1000	2000	17	4	-	10,500 ± 0,1500*	1,90 ± 0,432	7,50 ± 1,500	6,00 ± 1,000
		500/500	2000	18	3	-	10,500 ± 0,500*	1.68 ± 0.407	7,50 ± 1,500	6,50 ± 0,500
	(3:1)	500/1000	2000	19	4	-	13,500 ± 0,500*	1,62 ± 0,399	9,00 ± 1,000	7,00 ± 2,000
		1000/500	2000	16	4	-	10,000 ± 2,000*	1,76 ± 0,416	8,00 ± 1,000	8,00 ± 1,000*
		1000/1000	2000	16	5	-	10,500 ± 0,5000*	2,00 ± 0,443	9,50 ± 0,500*	8,00 ± 2,000*

* Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)

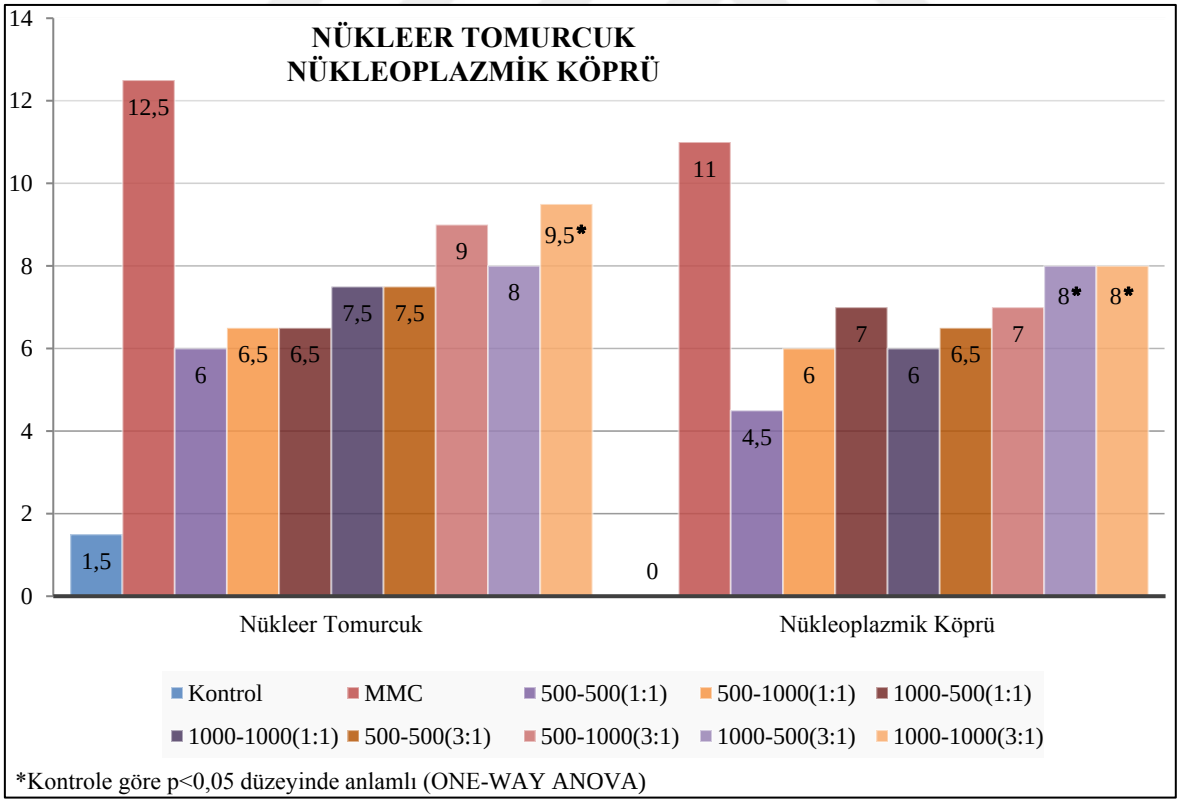
+Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

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

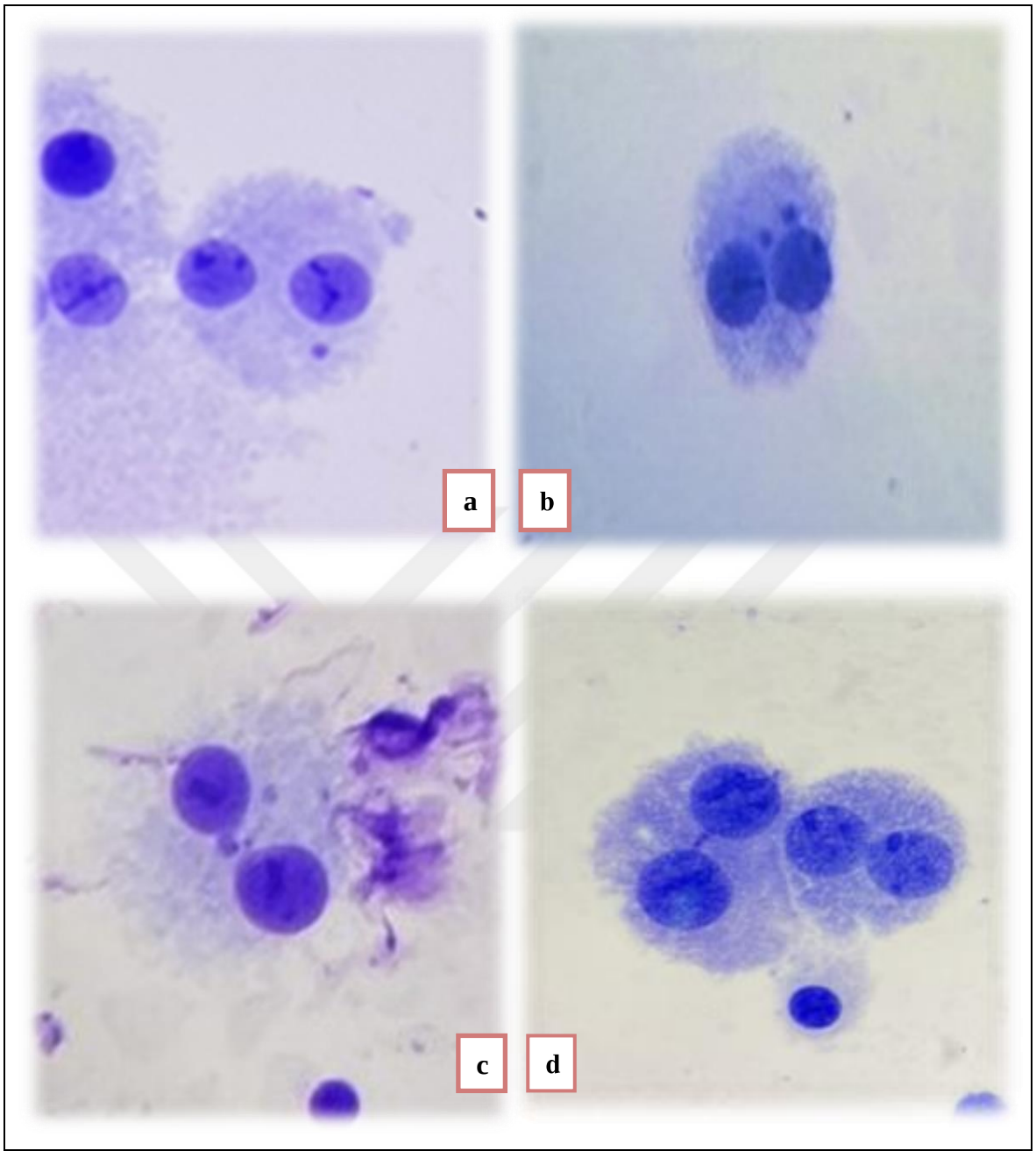
+++Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.14. DSX'in 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi



Şekil 4.15. DSX'in insan lenfositlerinde nükleer tomurcuk (%) ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi



Resim 4.7. DSX uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) iki mikronükleuslu binükleat hücre c) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre d) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre

4.2.4. Comet testi bulguları

D-Sorbitol'ün Xylitol ile birlikte karışım halinde (DSX) muamelesi sırasında DNA üzerinde olası etkilerini değerlendirmek amacı ile comet testi kullanılmış ve bu testle üç farklı parametre değerlendirilmiştir. Kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti

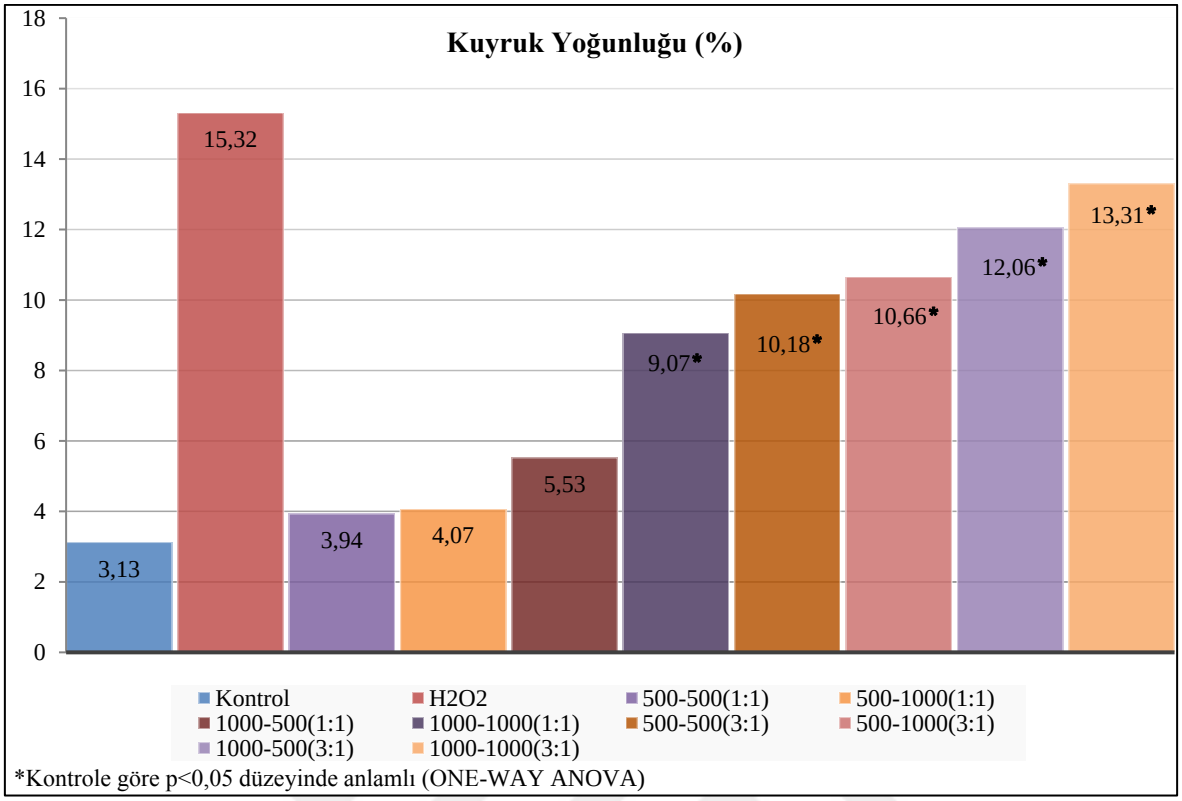
bakımından elde edilen veriler Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Ayrıca comet testinde görülen DNA hasarı örnekleri Resim 4.8'de verilmiştir.

İzole edilen lenfositlerle DSX'in 1 saat süre boyunca muamelesi sonucunda comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin özellikle 3:1 oranındaki muamelesinde tüm konsantrasyonlar için kontrole kıyasla anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte 1:1 oranındaki muamelesinde en yüksek konsantrasyon olan 1000/1000 muamelesinden tüm parametreler etkilenirken 1000/500 uygulaması sadece kuyruk momentinde etki göstermiştir. Artışlar comet kuyruk uzunluğunda (r=0,64) düşük korelasyon gösterirken kuyruk yoğunluğu (r=0,26) ve kuyruk momenti (r=0,18) için konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmemiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

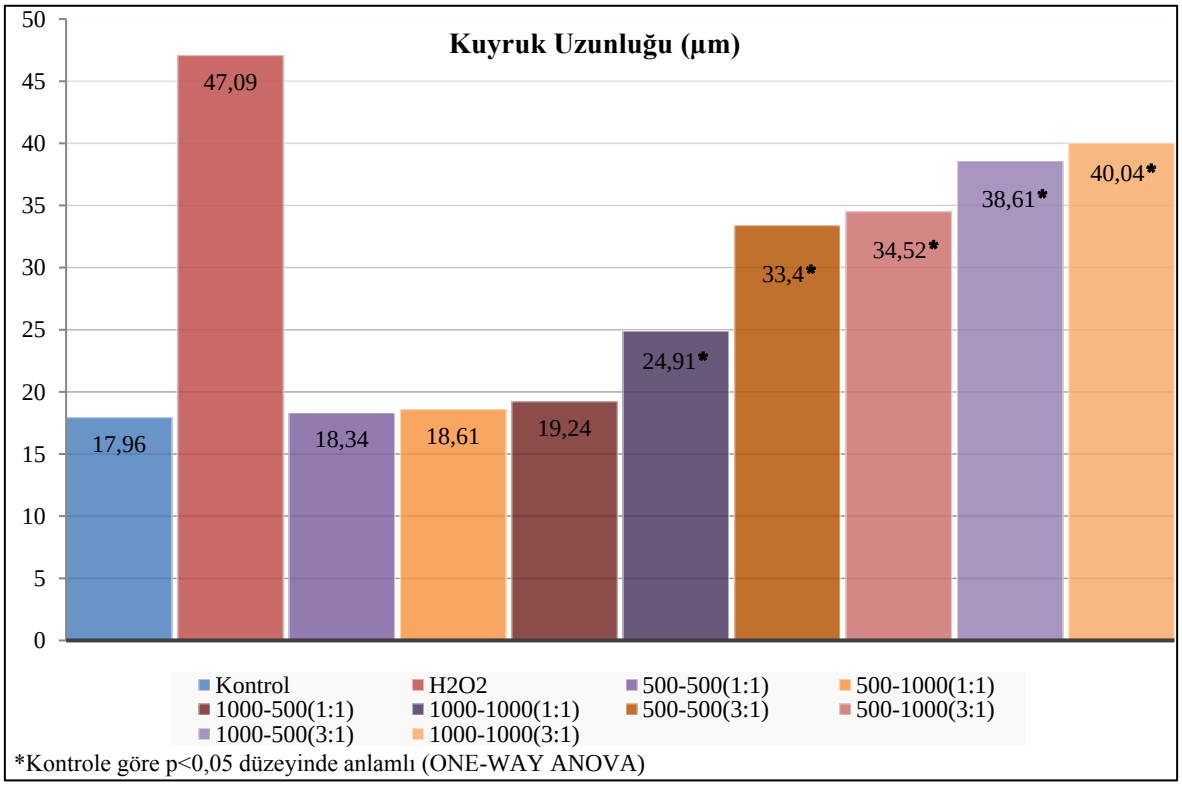
Çizelge 4.8. DSX uygulaması sonucunda insan perifal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon			
Kontrol	1	0,0 µg/mL	3,13 ± 0,31	17,96 ± 0,46	0,59 ± 0,09
H_2O_2	1	100 µM	15,32 ± 1,14	47,09 ± 0,68	3,17 ± 0,42
DSX	1	500/500 µg/mL	3,94 ± 0,74	18,34 ± 0,51	0,81 ± 0,20
	(1:1)	500/1000 µg/mL	4,07 ± 0,54	18,61 ± 0,46	0,95 ± 0,23
		1000/500 µg/Ml	5,53 ± 1,13	19,24 ± 0,48	1,26 ± 0,33*
		1000/1000 µg/mL	9,07 ± 1,20*	24,91 ± 0,88*	1,97 ± 0,42*
		500/500 µg/ml	10,18 ± 1,10*	33,40 ± 1,06*	1,99 ± 0,35*
		500/1000 µg/mL	10,66 ± 0,87*	34,52 ± 0,71*	2,17 ± 0,30*
	(3:1)	1000/500 µg/mL	12,06 ± 1,44*	38,61 ± 1,03*	2,38 ± 0,36*
		1000/1000 µg/ml	13,31 ± 1,36*	40,04 ± 0,97*	2,97 ± 0,20*

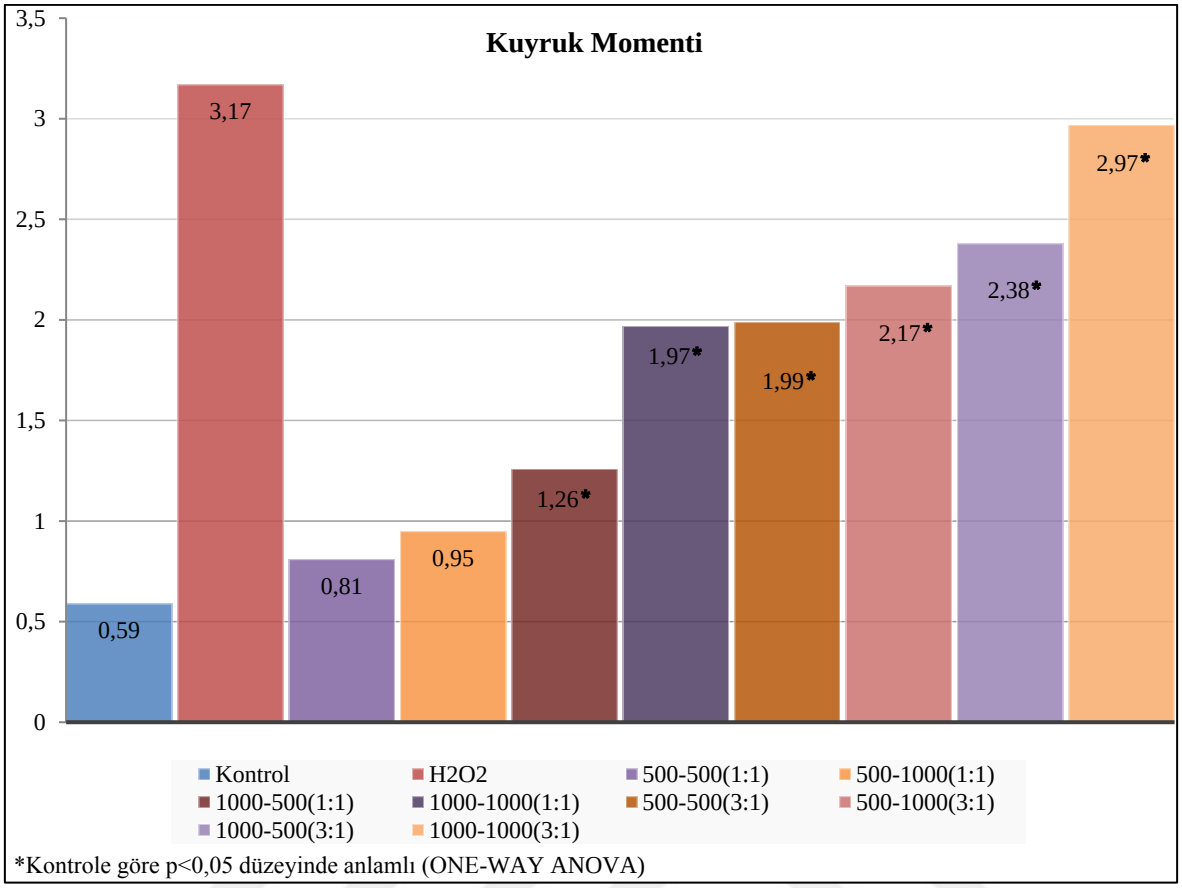
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (ONE-WAY ANOVA)



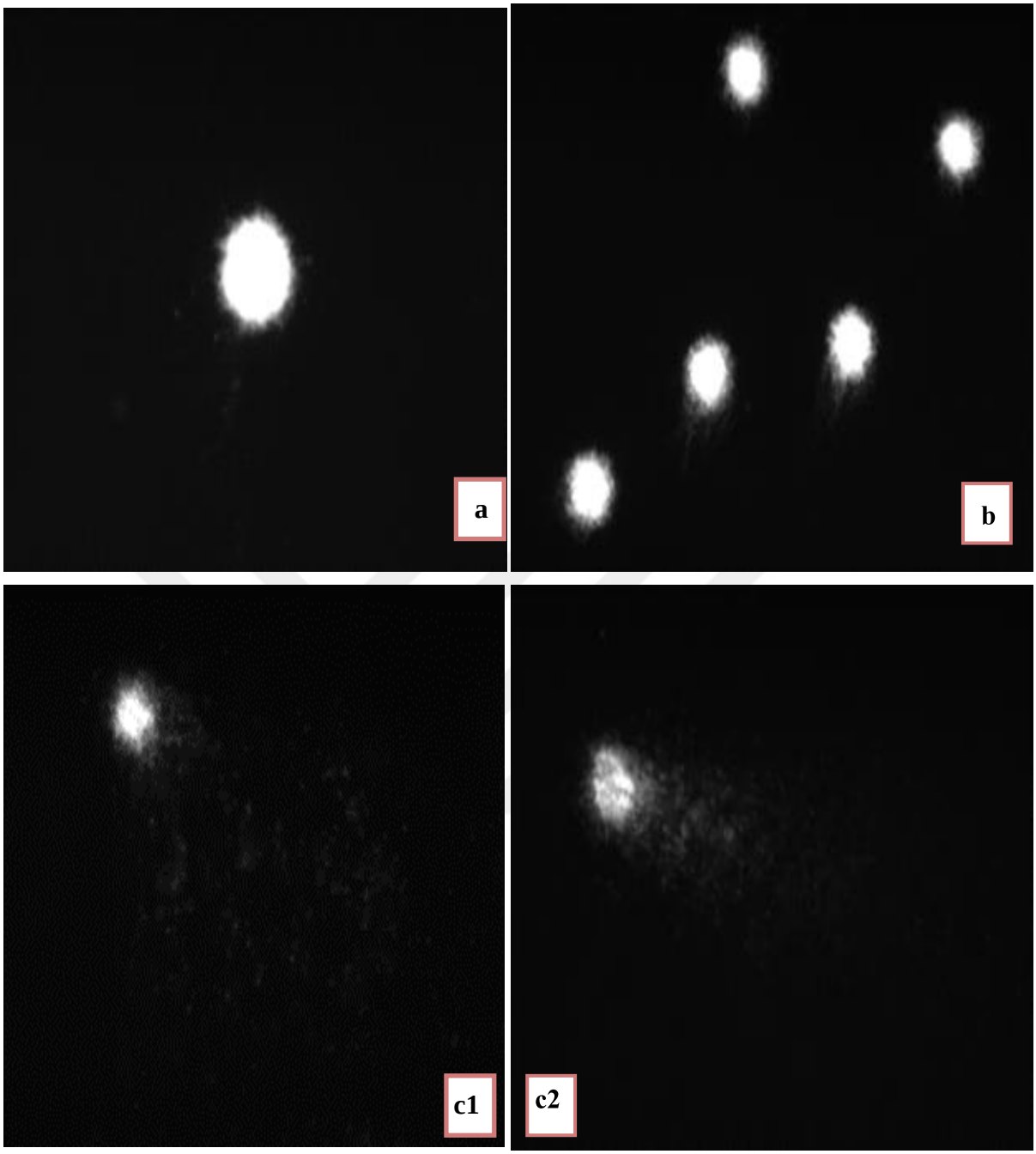
Şekil 4.16. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Yoğunluğu (%)



Şekil 4.17. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Uzunluğu (µm)



Şekil 4.18. DSX muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde Comet Kuyruk Momenti



Resim 4.8. DSX uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c1-c2) Çok hasarlı DNA

5. TARTIŞMA

Gıda katkı maddeleri, gıdanın görünümünü, lezzetini, dokusunu, tazeliğini veya saklama özelliklerini geliştirmek amacıyla genellikle belli miktarlarda gıdaya kasıtlı olarak eklenen, besleyici olmayan maddelerdir. Gıda katkı maddeleri gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamakta ve gıdalarda çeşitli işlevler gerçekleştirmektedir. İşlevlerine göre; renklendiriciler, koruyucular, antioksidanlar, tatlandırıcılar, emülgatörler, stabilizatörler, koyulaştırıcılar, jelleştirici gibi sınıflandırılmaktadırlar (Awuchi, Twinomuhwezi, Igwe, Amagwula, 2020; Wu, Zhang, Long, Chen, Zhang, Liu, 2022; Liang, 2022).

Tatlandırıcılar gıda katkı maddeleri içerisinde önemli kullanım alanına sahip olan sınıflardan biridir. Tatlı bir tada sahip olan gıda ürünleri karakteristik olarak, hızlı bir şekilde enerji üretmek üzere metabolize edilen fruktoz, glikoz ve sukroz formundaki basit karbonhidratların yanı sıra uzun süreli enerji ve depolama için nişasta formundaki kompleks karbonhidratları içermektedir. Bal, insan beslenmesindeki ana tatlandırıcı olmasıyla birlikte, 18. Yüzyıldan itibaren şeker pancarı ve şeker kamışından sakaroz çıkarma işlemi katlanarak artmaktadır. Günümüzde sakaroz veya sofra şekeri, geleneksel olarak en çok kullanılan tatlandırıcı olmaya devam etmektedir ve çeşitli rafine formlarda da üretimi mevcuttur. Son birkaç yılda aşırı şeker tüketiminin yaygın hale gelmesi ile insan sağlığı açısından kaygılar oluşmuştur. Çok fazla tatlandırıcı tüketmenin diş çürüklerine neden olmasının yanı sıra tip II diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu ve hatta genotoksik etkiler oluşturduğuna dair araştırmalar bulunmaktadır (Saraiva, Carrascosa, Raheem, Ramos, Raposo, 2020; Eissa, Sebaei, Mohamed, 2024; Tang, Mars, James, Appleton, 2024).

Tatlandırıcılarda, tatlılık gücü son derece önemlidir ve tatlandırıcılar kendi içsel özelliklerine (besleyici değeri, tatlandırma gücü) ve kökenine (sentetik, yarı sentetik ve doğal) göre sınıflandırılabilmektedir. Son yıllarda alternatif bir tatlandırıcı türü olarak kullanılmakta olan tatlandırıcılar sınıfındaki polioller ‘şeker alkolleri’ sakkarozla benzer veya daha fazla tatlandırma gücüne sahip olup tipik olarak düşük kalorili gıda ürünlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca şeker alkolleri, düşük kalorili tatlandırıcıların sağlayamadığı hacimliliği verirken, yoğun tatlandırıcılarla birlikte, bunların kötü tatlarını maskelemek için kullanımları da mevcuttur (Saraiva, Carrascosa, Raheem, Ramos, Raposo, 2020; Karataşoğlu, Demirel, Şahin, Berktaş, Mustafa, 2021).

Tatlandırıcı madde olarak en çok tercih edilen gıda katkı maddelerinden biri D-sorbitol (DS)'dür (Chen, Huang, Yao, Benmore, Yu, 2021). Kozmetik ürünlerinde (diş macununda, makyaj ürünlerinde), ilaç (öksürük şuruplarında, gargarada) ve bazı gıdalarda sakız gibi ürünlerde nem tutucu, tatlandırıcı, doku oluşturucu, hacim artırıcı ve bağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Mutlu, Erbaş, 2020). Ayrıca sorbitol, elma, kiraz, erik, armut ve şeftali gibi meyvelerde yaygın olarak bulunan bir şeker alkolü ve düşük kalorili tatlandırıcıdır. Glikoz veya sükrozdan çok daha düşük bir glisemik indekse sahiptir. Bu nedenle, kilo vermeye veya kilo kaybını sürdürmeye çalışan diyabetik hastalar, sorbitol almayı tercih edebilirler. Gıdalardan sorbitol alımına ek olarak bu madde, hiperglisemi (yüksek kan şekeri) koşulları sırasında endojen olarak da üretilebilir. Özellikle önceki çalışmalar, sorbitolün böbreklerde, retinada ve sinirlerde uzun süreli birikiminin organ hasarına yol açabileceğini göstermiştir. Sorbitol birikimi ayrıca nefropati (gözlerin hasar görmesi), retinopati (böbreklerin hasar görmesi) ve nöropati (sinirlerin hasar görmesi) dahil olmak üzere diyabet komplikasyonlarıyla da ilişkilendirilmiştir (Gültekin, Öner, Savaş, Doğan, 2017; Li, Wang, Lin, Kuo, Wu, Hong, Wu, 2022; Chandrasekaran, Nithiyanantham, 2023). DS yaygın olarak gıda katkı maddesi olarak kullanılsa da bu çalışmalar sorbitol tüketiminin güvenliği konusunda önemli sorunları gündeme getirmektedir (Gültekin, 2017; Gültekin, Öner, Savaş, Doğan, 2017; Li, Wang, Lin, Kuo, Wu, Hong, Wu, 2022; Chandrasekaran, Nithiyanantham, 2023).

Gıda endüstrisinde yaygın olarak tercih edilen bir diğer gıda tatlandırıcısı xylitol (XYL)'dür. Poliol olarak sınıflandırılan doğal bir bileşik olan xylitol, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Gıdada, farmasötik ürünlerde ve alternatif tatlandırıcı olarak geniş uygulamaları nedeniyle kullanılmasının yanı sıra ilaç endüstrilerinde de yapay tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Anti-karyojenik özelliğinden dolayı sakız ve diş macunu üretiminde kullanılmaktadır. Birçok çalışma, xylitolün solunum yolu ve orta kulak enfeksiyonlarının görülme sıklığını azaltmadaki rolünü göstermektedir. Xylitol kalsiyum emilimini arttırır ve böylece osteoporozla mücadelede yardımcı olmaktadır. AB Gıda Bilimi Komitesi, günlük tüketiminde hassas kişiler dışında 20 g'dan az tüketilmesi gerektiğini belirtmiştir. Aşırı tüketiminde müshil etkisine ve laksatif etkiye sebep olabileceği belirtilmektedir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022; Umai, Kayalvizhi, Kumar, Jacob, 2022).

Bu sebeple bu iki tatlandırıcının yaygın kullanımı, genetik materyal üzerine etkilerinin tam olarak anlaşılamamasından dolayı büyük bir endişe kaynağıdır. İnsanların daha sağlıklı ve

tatmin edici bir beslenme şekline ulaşmaları amaçlansa da belirli katkı maddelerinin uzun süreli maruziyeti sonucunda vücutta birikerek toksik etkiler oluşturabileceği bir gerçektir. Genetik hasarların ortaya çıkmasına ve kalıtım materyali üzerinde olumsuz etkilere neden olabilirler. Bu bağlamda, genetik toksisite testlerinin kullanılması, bir kimyasal maddenin genetik etkilerini değerlendirmek için önemli bir araçtır (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Bülbül, Ünal, 2022; Okus, Yuzbasioglu, Unal, 2024).

Genotoksisite, belirli bir maddenin DNA'da mutasyonlara ya da kromozomal hasara neden olarak geri dönüşümü olmayan genetik değişiklikler oluşturmasını ifade etmektedir (Luan ve Honma, 2022). Böylece hücrelerin taşıdığı, genetik materyalin bütünlüğünü bozma kapasitesi belirlenebilir. Kanserojenite (kanser oluşturma potansiyeli), birincil olarak DNA hasarı ve ikincil olarak da mutasyon birikimi ile ilişkilidir. DNA, bir dizi endojen (hücresel iç) ve eksojen (dış ortamdan kaynaklanan) etkilerle sürekli olarak hasar görebilir. Bu nedenler arasında oksidatif stres, genotoksik etkenler, metabolik stresler, telomer erozyonu ve onkojenik mutasyonlar bulunmaktadır. Bu faktörler, DNA hasarını onarma süreçlerinin başarısız olması durumunda genetik materyalin bütünlüğüne zarar vererek metabolik fonksiyonlarının bozulmasıyla, bir dizi sağlık sorununa yol açabilir. Bu sorunlar arasında kanser, yaşlanma ve metabolik hastalıklar sayılabilir (Mohammadi, Jafarzadeh, Bhandi, Patil 2015; Choudhuri, Kaur, Jain, Sharma, Asthana, 2021; Musto, Schiano, Iannuzzo, Tenore, Novellino, Stornaiuolo, 2023; Uzen, Bayram, Dursun, Kardas, Altın-Celik, Cakir, Eken, Cucer, Donmez-Altuntas, 2023).

Genotoksisite testleri genellikle belirli bir tür genetik hasarı belirleme konusunda özelleşmiştir ve gen mutasyonu, yapısal kromozomal hasar ve anöploidi gibi farklı genetik hasar tiplerini aynı anda tespit etmek zor olabilir. Bu nedenle, genetik hasarın çeşitli yönlerini değerlendirmek, kısa sürede sonuç almak için farklı testlerin kullanılması yaygındır. En yaygın kullanılan *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri arasında AMES, Kromozomal anormallikleri (KA), Mikronükleus (MN), Kardeş kromatidlerde değişimi (KKD), Comet (Single Cell Gel Electrophoresis), gibi test yöntemleri bulunmaktadır (Beyan ve Demiral, 2021; Munakata, Watanabe, Takahashi, Kimuro, Ishimori, Hashizume, 2023).

Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlara (mutajen ve kanserojenler) maruz kalmak, genotoksisite, kısırlık (infertilite) ve kanser gibi insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Genetik hasara neden olan maddeler kanser riskini artırabilir ve böylece genotoksisite

karsinojenite ile ilişkilidir. Karsinojenler genellikle genotoksik etkilere neden olan maddelerdir (Choudhuri, Kaur, Jain, Sharma, Asthana, 2021; Nayar, Sanan, Sethi, Miglani, Kant, Nayar, 2023).

Karsinojenler, kanserojenezis olarak bilinen süreçte hücrelerde genetik hasara yol açarak kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Bütün bu ajanların neden olduğu hastalıkları ve genetik materyal üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için genotoksisite testleri uygulanarak bu etkilerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Genotoksisite testleri, genellikle *in vivo* ya da *in vitro* olarak uygulanabilen yöntemlerdir ve özellikle gıda katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasalların genotoksik ve karsinojenik potansiyellerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, Ünal 2016; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2023).

Bu çalışmada, gıda katkı maddelerinden tatlandırıcı grubundan poliol "şeker alkolü" olan D-Sorbitol (E-420) ve DSX (E-967)'in; *in vitro* koşullarda dört farklı genotoksisite testi (KA, KKD, CBMN-Cyt (MN) ve Comet testleri) kullanılarak genotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada DS'ün 62,5; 125; 250; 500; 100 μg/mL'lik konsantrasyonları kullanılırken DSX de 1:1 ve 3:1 oranını sağlayarak 500 ve de 1000 μg/mL'lik [500-500, 500-1000, 1000-500, 1000-1000 (1:1); 500-500, 500-1000, 1000-500, 1000-1000 (3:1)] konsantrasyonları kullanılmıştır. D- sorbitol ve DSX gıda tatlandırıcıları ile yapılan bu çalışmada KA, KKD, MN ve Comet testlerini içeren parametlerin sonuçları topluca Çizelge 4.9 ve 4.10'da özetlenmiştir.

Bu çalışmada DS'ün 24 saat süre ile uygulanması KA oranını yalnızca en yüksek iki konsantrasyonda artırmıştır. DSX ise 1:1 karışımında yalnızca en yüksek konsantrasyonda, 3:1 karışımında tüm konsantrasyonlarda KA oranını artırmıştır. 48 saatlik muamelede ise DS anormal hücre yüzdesini en yüksek iki konsantrasyonda, DSX karışımı ise tüm konsantrasyonlarda (1:1 oranında en düşük iki konsantrasyon hariç) artırmıştır. Hücre başına düşen anormallik frekanslarında ise DS en yüksek üç konsantrasyonda artışa neden olmuş, DSX karışımında ise 1:1 oranında en düşük üç konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, oluşan kromozomal hasarları yüksek konsantrasyon ve uzun süreli uygulamalarda genel olarak arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle DS ve DSX'in genotoksik potansiyeli üzerinde konsantrasyon ve sürenin etkili olduğu söylenebilir. Gözlenen kromozomal anormallik tipleri her iki

tatlandırıcının da yüksek konsantrasyonlarda hem klastojenik hem de anojenik etki yaratabileceğini göstermektedir. Kanser oluşumu (karsinojenezle) ile doğrudan bağlantı olduğu bilinen bir testten böyle sonuçların elde edilmiş olması, DS ve DSX'in *in vitro* koşullarda genetik risk taşıdığını düşündürmektedir (Çizelge 5.1).

DS ve DSX uygulamalarında en çok görülen anormallik tipi, yapısal anormalliklerden kromatit kırığıdır (DS, %40,98; DSX, %34,85). En düşük düzeyde görülen yapısal anormallikler %1,45 oranı ile halka kromozom ve %2,03 oranı ile disentrik kromozom iken DSX uygulamasında %1,58 oranında tespit edilen kromatid değişimidir. Görülen diğer anormallik tipleri; kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozom, halka kromozom, kromatit değişimi ve fragmenttir. Ayrıca sayısal anormalliklerinden olan poliploidi de gözlenmiştir. Bu iki maddenin sayısal kromozom anormallikleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, DS uygulamasında %5,81, DSX uygulamasında ise %3,31 oranında sayısal anormallik oluşturduğu tespit edilmiştir. DS'den farklı olarak DSX uygulamasında kromotit değişimi de belirlenmiştir.

Kromozomal anormallikler farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilmektedir. Hücre döngüsü sırasında ortaya çıkan DNA çift zincir kırıkları, kromozomal anormalliklere sebep olmaktadır. Hücre, G2 fazında DNA hasarını neredeyse tamımını onarabilmektedir. Bu süreçler genellikle "hücre döngüsü kontrol noktaları" olarak bilinen mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Bu kontrol noktaları, DNA hasarının tespiti durumunda hücrenin bölünmeyi ertelemesine veya durdurmasına izin verir, böylece hasar onarılabilmektedir. Dolayısıyla, burada meydana gelen ve onarılamayan hasarlar kromozom ve kromatit kırıklıkları gibi aberasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Xue, Zhao, Qiao, Lu, Yu, Wang, 2020; Yüzbaşıoğlu, Mahmoud, Mamur, Ünal, 2022; van Gulik, Sluydts, Vervoort, Kockx, Kortman, Ylstra, Finn, Bubendorf, Bahce, Sie, Radonic, Lissenberg-Witte, Thunnissen, 2023). Aberasyonların üretimi DNA sentezinin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu inhibisyon, doğrudan DNA'ya saldırmayan, ancak metabolizmasında yer alan enzimleri inhibe eden veya nükleosid dengesini değiştiren kimyasallardan da kaynaklanabilmektedir. Hücre döngüsü sırasında meydana gelen DNA çift zincir kırıkları, genetik materyalin bütünlüğünü tehdit eder ve kromozomal anormalliklere sebep olmaktadır. Bu lezyonlar onarılmazsa kromozom ve kromatitlerin terminal bölgelerinde meydana gelen translokasyonlar ve delesyonlar, genellikle fragmentlerin oluşmasına neden olmaktadır. Fragmentler ise, kromozom kırılmalarının sonucunda oluşmaktadır. Kardeş

kromatitlerde birleşme, kromozomların uç bölgelerinde meydana gelen delesyonlar sebebi ile oluşmakta ve bu oluşan kırık uçların birbirleri ile birleşmesiyle gerçekleşmektedir. Kromatit değişimi ise, iki farklı şekilde oluşabilmektedir. Kromozomlar arasında üçlü değişimler oluşturarak, triradial olarak ya da dörtlü değişimler ise quadriradial olarak ortaya çıkmaktadır. Sentromere sahip iki kromozomdaki (homolog veya homolog olmayan) çift kırılma yanlış onarılabilir veya iki kırık kromozomun birleşmesiyle, disentrik kromozomların oluşumuna yol açmaktadır. Halka kromozomu, uçları birleşerek bir halka oluşturan bir kromozom anormalliğidir. Bir halka oluşturmak için kromozomun iki ucu kırılır ve kırık uçlar birleşir. Poliploidi ise, normal haploid kromozom sayısının katları şeklindeki artışlardır (Chacón, González, Poletta, 2021; Yahaya, Oladele, Anyebe, Obi, Bunza, Sulaiman, Liman, 2021; Gömürgen, 2022; van Gulik, Sluydts, Vervoort, Kockx, Kortman, Ylstra, Finn, Bubendorf, Bahce, Sie, Radonic, Lissenberg-Witte, Thunnissen, 2023). Sayısal anormallik, genellikle mitoz sırasında anormal mitotik ipliklerden, kardeş kromatid birleşme kusurlarından, uygunsuz mikrotübül-kinetokor bağlanmalarından, kromozom yoğunlaşma kusurlarından veya anormal sitokinezden kaynaklanan kromozom ayrışma hatalarıyla ilişkilidir. Öte yandan, yapısal anormallikler genellikle replikasyon stresi (kopyalama çatallarının durması veya çökmesi), telomer disfonksiyonu ve çift iplik kopmalarının (DSB'ler) onarımındaki hatalarla ilişkilidir. Görünüşte farklı kökenlerine rağmen, hem sayısal hem de yapısal anormallikler tümörlerde bir arada bulunma eğiliminde olduğu ve her birinin diğerinin kaynağı olabileceği belirtmektedir. Kromozomal anormalliklerdeki artış, bir test materyalinin karsinojenik potansiyelini değerlendirmek için kullanılan önemli bir faktördür (Siri, Martino, Gottifredi, 2021; Holmannova, Borsky, Andrys, Hamakova, Cermakova, Poctova, Fiala, Smejkalova, Blaha, Borska, 2022).

Kromozom anormallik testinde belirlenen tüm anormallikler, genomik kararsızlığa yol açan genetik materyalin hem yapısal (klastojenik) hem de sayısal (anöjenik) değişikliklerini tespit ederek kullanılan test maddelerinin karsinojenik risklerinin belirlenmesinde rol almaktadır (Kou, Wu, Ren, Yang, 2020; EFSA Scientific Committee, More, Bampidis, Bragard, Halldorsson, Hernández- Jerez, Benford, 2021; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2023). Bazı araştırmacılar, insan lenfositlerindeki kromozomal anormallik frekansındaki artışın, bireylerde görülen kanser riski ile ilişkili olduğunu ve genotoksisite karsinojenlerinin erken bir göstergesi veya bireysel kanser yatkınlığının belirleyicisi olduğunu belirtmişlerdir. Çünkü periferik kan lenfositlerindeki genetik hasar, çoğunlukla dış etkenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (Kou, Wu, Ren, Yang, 2020; Boreiko, Rossman,

2020). Bu genetik hasar, kromozomal anormallikleri içerebilir ve lenfositlerdeki genetik hasarın, kanserojenez geçiren diğer hücre tiplerinde benzer anormalliklere yol açabileceği düşünülmektedir. Yapısal varyasyonları içeren kromozomal anormallikler, insan genetik hastalıklarının ana nedenlerinden biridir. Bu tür anormallikler, genlerin normal işlevini etkileyebilir ve genetik hastalıklara yol açabilmektedir. Kromozomal anormalliklerin sıklığının, bireylerin kansere yatkınlığını belirleyen bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu anormallikler, genetik materyalin bütünlüğüne zarar vererek hücrelerin normal fonksiyonlarını bozabilir ve kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Kou, Wu, Ren, Yang, 2020; Kassa, 2021; Mantere, Neveling, Pebrel-Richard, Benoist, van der Zande, Kater-Baats …, El Khattabi, 2021).Bu yüzden KA testinden, elde edilen sonuçlar kullanılan herhangi bir maddenin (kimyasalların, gıda maddelerin, vb.) genotoksik potansiyellerini belirmeye yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda bu maddenin güvenirliliğini belirlemeye de yardımcı olur (Mantere, Neveling, Pebrel-Richard, Benoist, van der Zande, Kater-Baats, … El Khattabi, 2021; Han, Zhang, Liu, Sheng, Waigi, Hu, Qin, Ling, 2023).

Tez çalışmasında DS ve DSX karışımın insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatit değişimi sıklığı üzerine etkileri de araştırılmıştır. DS her iki muamele süresi boyunca tüm konsantrasyonlarında (sadece 24 saatlik uygulamada 62,5 μg/mL'lik en düşük konsantrasyon hariç), DSX karışımının ise her iki uygulama süresinde tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyaslandığında KKD frekansını önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir. KKD frekansındaki artış DNA hasarı oluştuğunu ve DNA onarımının devreye girdiğini gösterdiğinden her iki tatlandırıcının da genotoksik etki gösterebileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.9). Ayrıca kullanılan iki tatlandırıcının da hem 24 hem de 48 saatlik sürede, KKD/Hücre frekanslarına bakıldığında DSX daha fazla genotoksik etkili olduğu görülmektedir. Çalışmada ikinci bir test olarak, kardeş kromatit değişimi test (KKD) yöntemi de uygulanmıştır. Kardeş kromatid değişim frekansının artmasının kalıcı DNA hasarının göstergesi olduğu düşünülmektedir (Yüzbaşıoğlu, Dilek, Erikel, Ünal, 2023). Bu test *in vitro* veya *in vivo* olarak genetik materyaldeki değişiklikleri belirlemek için hücre kültürlerinde veya canlı organizmalarda uygulanmaya devam etmektedir. DNA'daki hasarı belirlemede diğer bazı testler kadar hassas olmasa da, genetik materyaldeki belirli değişiklikleri tespit etmek açısından önemlidir. KKD oluşumunda ortaya çıkan parça değişimleri (rekombinasyon) instabilite, replikasyon mekanizması ve DNA hasarının onarımını etkileyen bir maddenin olumsuz maruziyetinin göstergesidir. Maddenin DNA'daki etkisini görsel olarak belirleyebilmek mümkün olmaktadır. Kardeş kromatidler

arasındaki homolog rekombinasyonun bir sonucu olarak kardeş kromatit değişimi oluşmaktadır. (Tarboush, Almomani, Khabour, Azzam, 2022; Çelik, 2022; Avuloglu Yilmaz, Yuzbasioglu, Unal, 2023; Yuzbasioglu, Dilek, Erikel, Unal, 2023).

Bu çalışmada aynı zamanda KA testi için hazırlanan preparatlardan mitotik indeks (Mİ), KKD testi için hazırlanan preparatlarda replikasyon indeks (Rİ) hesaplanmıştır. Bu indeksler, hücresel proliferasyonu ve kinetiğini değerlendirmede kullanılan diğer bir parametre ve sitotoksisitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir. İnsan periferik lenfositlerindeki Mİ kontrole kıyasla artarsa, hücre proliferasyonun hızlı olduğunu göstermektedir. Eğer Mİ'de azalma var ise, hücre bölünme kapasitesinin kaybolduğu, hücrenin mitoza girmesinin engellendiği veya hücre ölümünde etkili olan mekanizmaların aktive olduğu açıklanmaktadır (Çobanoğlu, 2021; Gogoi, Karabi, Dutta, 2021; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022). Replikasyon indeksi, hücre bölünme kinetiğini ölçmek için kullanılan bir diğer parametredir. Bu indeks, kültüre edilmiş hücrelerdeki sitokinetiklerin bir belirteci olması ve bir hücre popülasyonundaki mitotik hücrelerin ne sıklıkta bölündüğünü veya ne kadar sıklıkta hücre döngüsünden geçtiği etkisini değerlendirmede fayda sağlamaktadır (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Bülbül, Ünal, 2022). Tez çalışmasında, Mitotik indeks sonuçları incelendiğinde DS'ün 24 saatlik uygulamasında en yüksek iki konsantrasyonlarda (500 ve 1000 µg/mL) ve 48 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyon (62,5 ve 125 µg/mL) hariç tüm konsantrasyonda kontrole göre anlamlı düşüş olduğu tespit edilmiştir. DSX uygulaması ise mitotik indeksi, 24 ve 48 saatlik sürelerde hemen hemen tüm konsantrasyon ve oranlarda kontrole kıyasla (24 saatlik uygulamada 1:1 ve 3:1 oranında en düşük iki konsantrasyon 500-500; 500-1000 hariç) düşürmüştür (Çizelge 5.1). Bu sonuçlar her iki tatlandırıcının da sitotoksik etkileri olabileceğini göstermektedir. Ancak, hem DS hem de DSX, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde Rİ'nde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Tez çalışmasında kullanılan bir diğer test sitokinezi bloklanmış (CBMN-Cyt) hücrelerde mikronükleus (MN) testidir. Hem fiziksel hem de kimyasal ajanların klastojenik ve/veya aneugenik etkilerini belirlemek için kullanılan testlerden biridir. Bu test, hücre bölünmesi esnasında oluşan mikronükleuslar asentrik kromozom fragmentleri ve/veya tüm bir kromozomun kaybının göstergesidir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen mikronükleus (MN) test yöntemi, meydana gelen kromozom kayıplarının kesin olarak belirlenebilmesi bakımından yaygın olarak tercih edilen kullanışlı, hızlı sonuç elde edilebilen, güvenilirliliği

yüksek bir testtir (Börçek-Kasurka, 2019; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249). Genotoksik ajanlara maruz kalmanın neden olduğu sitotoksisiteyi, DNA hasarını ve sitostatik etkileri değerlendirebilmektedir. Bu yüzden MN frekansı kanser riskinin tespitinde biyogösterge olarak kullanılmaktadır (Quintana-Sosa, León-Mejía, Luna-Carrascal, Rodríguez, Acosta-Hoyos, Anaya-Romero, Henriques, 2021). CBMN-Cyt testinde sadece mikronükleuslar değil, aynı zamanda binükleat (BN) hücrelerde nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk frekansları da değerlendirilmektedir.

CBMN-Cyt testi kapsamında, DS ve DSX maddelerinin genotoksik etkileri incelendiğinde, hem DS hem de DSX MN frekansında, nükleer tomurcuk oranında ve nükleoplazmik köprü yüzdesinde artışa neden olmuştur. Bu artış, mikronükleus frekansında, DS'ün en yüksek iki konsantrasyonunda (500 ve 1000 µg/mL), DSX uygulamasında ise tüm oran ve konsantrasyonlarında anlamlı düzeydedir. Ayrıca bu artış konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir. DS sadece en yüksek konsantrasyonunda (1000 µg/mL) nükleer tomurcuk oranında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Nükleoplazmik köprü yüzdesinde anlamlı bir değişiklik kaydedilmemiştir. DSX'in 3:1 karışım uygulamasında ise, nükleer tomurcuk sadece 1000/1000 µg/mL ve nükleoplazmik köprüler 500/1000 ve 1000/1000 µg/mL uygulamalarında anlamlı bir artış göstermiştir (Çizelge 5.2). Elde edilen sonuçlar, hem DS hem de DSX'in MN testinde güçlü klastojenik ve/veya anojenik etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Mikronükleuslar, genellikle klastojenik etkisi sebebi ile kromozom kırılmasıyla oluşan asentrik fragment ya da anöjenik etkisi ile iğ iplikçileri hatalarından kaynaklanan kromozom ya da kromatidlerin kutuplara çekilememesinden kaynaklı eşit olmayan kromozom dağılımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Nükleer tomurcuklar, genetik materyallerin kaybı veya gen amplifikasyonu sebebiyle oluşurken, nükleoplazmik köprüler ise, disentrik kromozomlardan köken alır. Kısacası; mikronükleuslar kromozom kaybı ya da kromozomal kırılması, nükleoplazmik köprüler DNA iplikçik kırılması veya telomer uç füzyonlarından kaynaklanan etkiler ile oluşurken, nükleer tomurcuklar çoğaltılmış DNA veya DNA onarım komplekslerinin ortadan kaldırılması nedeni ile oluşmaktadır (Börçek-Kasurka, 2019; Göney ve Gazeloğlu, 2021; Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,249; Çavuşoğlu, 2023). Bu testde, hücre bölünmesini inhibe etmek ve bölünen hücreleri tanımlamak için Sitokalasin B kullanılmaktadır. Sitokalasin B, aktin polimerizasyonunu engeller ve sitokinezi engeller. Böylece nükleer bölünmesini tamamlayan hücrelerin ikiye ayrılmasını

engelleyerek iki çekirdekli (binükleat) hücreler meydana getirir. Böylece, periferik kan lenfositlerinde artmış MN frekansı, potansiyel olarak kanser gelişimi ile ilişkilendirilir (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Ünal, Yılmaz, 2010; Börçek-Kasurka, 2019; Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022).

CBMN-Cyt testi ile, ayrıca sitotoksik etkinin tespiti amacı ile nükleer bölünme indeksi (NBİ) de belirlenebilmektedir. Hem DS hem de DSX NBİ'ni etkilememiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik kaydedilmemiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.7).

NBİ, hücre bölünme anormalliklerini de yansıttığı için sitotoksisitenin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Hücre döngüsündeki inhibisyon veya hücre proliferasyon kapasitesindeki kayıp, proliferasyon indeksinde bir azalmaya neden olur. Böylece genellikle hücrelerin bölünme yeteneklerinde bir düşüşü veya hücre döngüsünün belirli aşamalarında gecikmeleri yansıtabilir. Bu belirteç, kimyasal maddelerin hücrelerdeki etki mekanizmalarını anlamak ve değerlendirmek için kullanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,249).

Son olarak gerçekleştirilen test yöntemi ise Comet testidir. Comet yöntemi; diğer bir adıyla Tek hücreli jel elektroforez yöntemi, tek hücre düzeyinde DNA hasarını analiz edebilen, hassas, hızlı sonuç elde edilebilen, uygun maliyetli olan güvenilir bir test yöntemidir. Comet testi DNA hasarını tespit etmek ve DNA onarımını belirlemek böylece yaşlanma ve kanseri anlamak için büyük öneme sahiptir (Singh, McCoy, Tice, Schneider, 1988; Bivehed ve Hellman, 2020; Ünal, Saygılı, Akbaş, 2022:313-340; Jiang, Naz, Ma, Ullah, Khan, Wang, Basang, 2023). Comet testi, bir dizi fiziksel ve kimyasal ajanın neden olduğu DNA iplikçik kırılmalarının, çapraz bağlantıların ve alkali duyarlı bölgelerin miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikle, hücrelerde meydana gelen tek ve çift DNA zincir kırıklarını saptamak ve hücresel düzeyde ortaya çıkan DNA hasarını belirlemek mümkündür (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Ünal, Yılmaz, 2010; Mamur, Yüzbaşıoğlu, Ünal, Aksoy, 2012; Ünal, Saygılı, Akbaş, 2022).

Bu çalışmada iki gıda tatlandırıcısın da DNA hasarı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi için izole edilmiş lenfositlerde comet testi gerçekleştirilmiştir. Bu test sonuçlarına göre; hem DS hem de DSX kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momentinde negatif kontrole kıyasla artışa neden olmuştur. DS'ün tüm konsantrasyonlarında kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğunda anlamlı artış görülürken, kuyruk momentinde en düşük iki

konsantrasyon hariç (62,5 ve 125 μg/mL) diğer konsantrasyonlarda anlamlı artış gözlenmiştir. DSX ise, 1:1 oranındaki karışımda kuyruk yoğunluğunu ve kuyruk uzunluğunu sadece en yüksek konsantrasyonda (1000-1000 μg/mL) artırmıştır. Kuyruk momentinde ise en yüksek iki konsantrasyonda (1000-1000 ve 1000-500 μg/mL) artış belirlenmiştir 3:1 karışımında ise tüm Comet parametrelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bu bulgular, DS ve DSX'in özellikle yüksek konsantrasyonlarının DNA hasarına katkı sağlayabileceğini göstermektedir (Çizelge 5.2). Bu nedenle, comet testinden elde edilen pozitif sonuçların kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

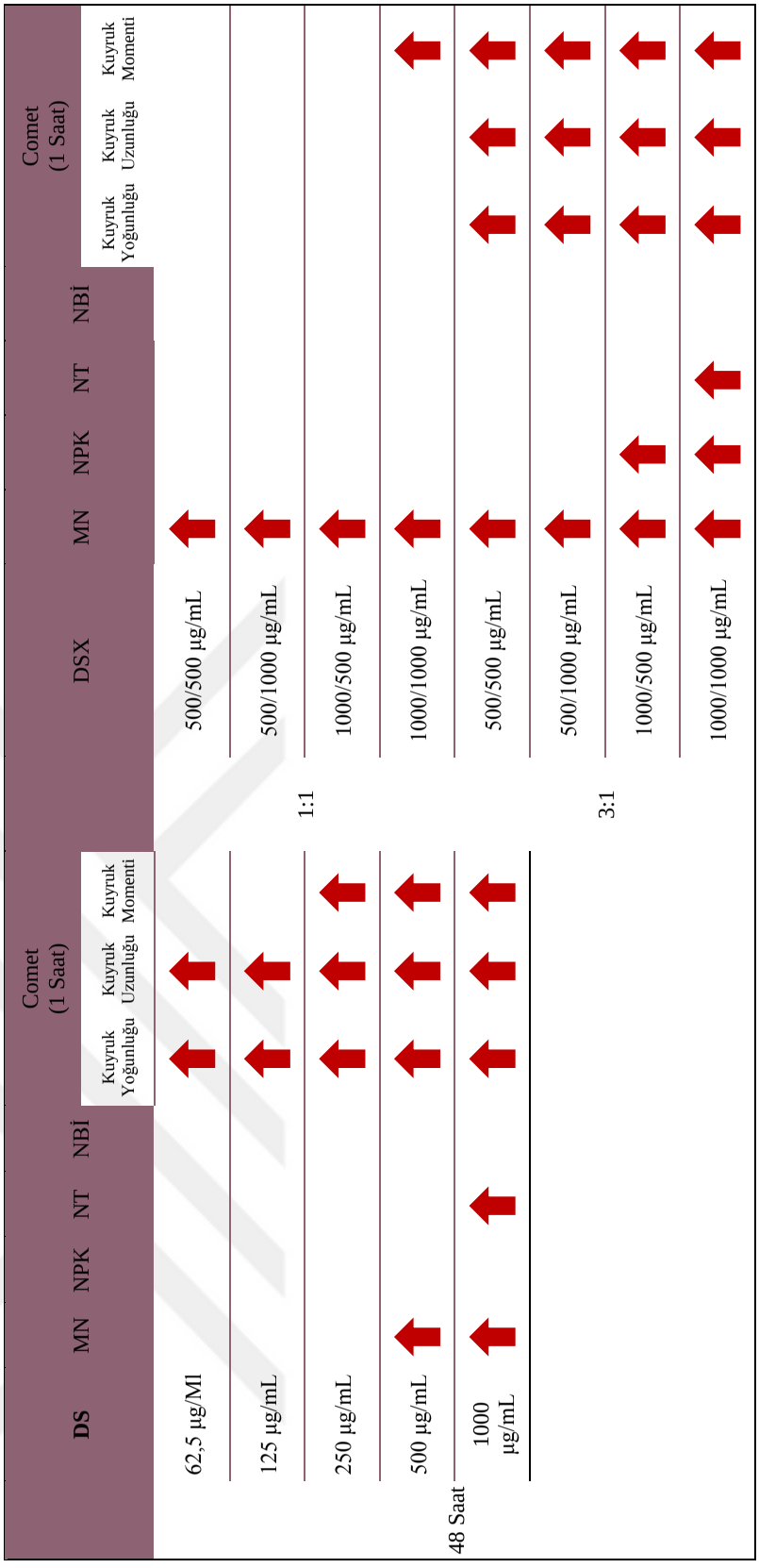
Comet parametreleri ile DNA kırılma frekansı ve DNA göçünün seviyesi görsel olarak belirlenebilmektedir. Ayrıca, comet testi, diğer test yöntemleriyle kolay değerlendirilemeyen ve kullanımının zor olduğu doku ve organlar için *in vivo* sitogenetik ve genotoksikoloji değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Az hücre sayısıyla uygulanabilirlik, hemen hemen her tür hücreyle çalışabilme esnekliği, çeşitli DNA hasarlarını yüksek doğrulukla ölçme kapasitesi gibi avantajları nedeniyle biyolojik izleme ve klinik araştırmalarda önemli bir araç olmuştur (Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313-340; Jiang, Naz, Ma, Ullah, Khan, Wang, Basang, 2023).

OECD test kılavuzu (Test No. 489: *In Vivo* Memeli Alkalin Kuyruklu Yıldız Testi), comet testinin, DNA iplikçik kırılmalarını (SB'ler) ölçen bir *in vivo* genotoksisite testi olarak kullanımını kapsadığından SB'ler potansiyel olarak kanserojen DNA hasarının geçerli bir göstergesidir. Comet testinde incelenen hücrelerdeki pozitif sonuçlar DNA hasar seviyeleri hakkında bilgi vererek kanser ve mutajenite gelişimi için bir gösterge kabul edilmektedir (Swift, Castle, McHugh, 2020; Jiang, Naz, Ma, Ullah, Khan, Wang, Basang, 2023; Dirven, Eide, Henriksson, Hjorth, Sharma, Graupner, Olsen, 2023; Glavinić, Rajković, Ristanić, Stevanović, Vejnović, Djelić, Stanimirović, 2023).

Çizelge 5.1. D- sorbitol ve DSX gıda tatlandırıcıları ile yapılan KA ve KKD test sonuçları

	DS	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	KKD	Mİ	Rİ		DSX	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	KKD	Mİ	Rİ
24 SAAT	62,5 µg/mL						1:1 3:1	500/500 µg/mL	↑	↑	↑↑		
	125 µg/mL			↑				500/1000 µg/mL	↑	↑	↑↑		
	250 µg/mL			↑				1000/500 µg/mL	↑	↑	↑↑	↓	↓
	500 µg/mL	↑	↑	↑	↓			1000/1000 µg/mL	↑	↑↑	↑↑	↓	↓
	1000 µg/mL	↑	↑	↑	↓								
48 SAAT	62,5 µg/Ml			↑			1:1 3:1	500/500 µg/mL	↑	↑	↑↑	↓	↓
	125 µg/mL			↑				500/1000 µg/mL	↑	↑	↑↑	↓	↓
	250 µg/mL		↑	↑	↓			1000/500 µg/mL	↑	↑	↑↑	↓	↓
	500 µg/mL	↑	↑	↑	↓			1000/1000 µg/mL	↑	↑↑	↑↑	↓	↓
	1000 µg/mL	↑	↑	↑	↓								

Çizelge 5.2. D- sorbitol ve DSX gıda tatlandırıcıları ile yapılan MN ve Comet test sonuçları



D-Sorbitol (E-420)'ün genotoksik etkilerinin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma olsa da DSX karışımımı ile ilgili genotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır.

2014 yılında Fındıklı ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada D-Sorbitol'ün 1,25; 2,50; 5,00 ppm'lik konsantrasyonları, insan periferal lenfosit hücrelerine 3 saat uygulanarak Comet testi gerçekleştirilmiştir. Kuyruk yoğunluğu ve momentini yalnızca 2,50 ppm'lik konsantrasyon artırmıştır. Bu nedenle DNA hasarına neden olduğu ve genotoksik etki sergilediği açıklanmıştır. DS'ün genotoksik etkilerinin incelendiği diğer çalışmada ise HepG2 (İnsan Karaciğer Kanser Hücresi) hücre hattında MN testi (0,5; 50,0 ve 5000,0 µg/mL), *S. typhimurium* suşlarında (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 ve TA1535) ile AMES testi (0,5; 50,0 ve 5000,0 µg/mL) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hamile Wistar ratlarının (14 gün süre ile 0,15; 1,5 ve 150 mg/kg) yavrularından elde edilen periferal lenfositlere Comet testi uygulanmıştır. MN testinde genotoksik etkili olduğu ve Comet testinde konsantrasyona bağlı olarak genotoksik etkisinin arttığı bildirilmiştir. Buna karşı AMES testinde mutajeniteye sahip olmadığı açıklanmıştır (Cardoso, Araujo-Lima, Aiub ve Felzenszwalb, 2016). Bu çalışmadan farklı olarak fare kemik iliği hücrelerine 1, 10, 20, 45 ve 90 mg/kg/gün şeklindeki uygulamalar sonucunda gerçekleştirilen MN testi DS'ün doza bağlı olmayan genotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Farelerde kemik iliği hücrelerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada mikronükleus (MN), sperm morfolojisi ve sperm sayısı üzerine etkileri incelenmiştir. Yaklaşık olarak 70 kg'lık bir insan tarafından sırasıyla 1,5 g; 750 mg; 330 mg; 165 mg ve 16 mg günlük sorbitol tüketimine karşılık gelen 90, 45, 20, 10 ve 1 mg/kg/günlük beş doz kullanılmıştır. MN analizi, muamele grupları arasında mikro çekirdekli polikromatik eritrositlerin ve diğer nükleer anormalliklerin doza bağlı bir indüksiyonunu göstermiştir. Sperm şeklinin değerlendirilmesi, muamele gruplarında sperm anormalliklerinde anlamlı ($p < 0.05$) artışı ve ortalama sperm sayısında anlamlı ($p < 0.05$) azalmayı ortaya koymuştur. Oksidatif stres biyobelirteçleri de incelenmiştir. Maruz kalan farelerde karaciğerde katalaz, MDA (malondialdehit), serum ALT (Alaninaminotransferaz) ve AST (aminotransferaz) aktivitelerinde anlamlı ($p < 0.05$) artışın indüklendiği ve bununla birlikte SOD aktivitelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrolle karşılaştırıldığında, maruz kalan farelerin ağırlığında önemli bir artış kaydedilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları sorbitolün genotoksisitesini ve üreme etkilerini göstermiştir (Alabi, Oladimeji, Sorungbe, Adeoluwa, 2019).

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, DS ile gerçekleştirilen genotoksik çalışmalarının sonuçları ile uyumludur. Bu tatlandırıcının genotoksik potansiyeli ilk kez *in vitro* insan lenfosit kültüründe birbirini tamamlayan dört farklı genotoksik testiyle incelenmiştir. Tüm testlerin sonuçları bu tatlandırıcıların yüksek konsantrasyon ve uzun uygulama süresinin *in vitro* koşullarda genotoksik etkisini ortaya koymaktadır.

DSX karışımı içerisinde bulunan xylitol ile ilgili yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. 2022 yılında Avuloğlu-Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Xylitol'ün 125, 250, 500, ve 1000 μg/mL konsantrasyonlarının, insan lenfositlerindeki potansiyel genotoksisitesini değerlendirmek için dört farklı genotoksisite test yöntemi gerçekleştirilmiştir. Bu testler, KA, KKD, CBMN-Cty ve Comet testleridir. Bu araştırma sonucunda; XYL'nin 48 saatlik muamelesinde anormal hücre ve KA/Hücre frekansını arttırdığı ve ancak bu artışın yalnızca en yüksek iki konsantrasyonda anlamlı olduğu açıklanmıştır. XYL KKD testinde, her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) en yüksek iki konsantrasyonda KKD/hücre oranını önemli ölçüde artırdığı ve benzer şekilde MN, NT ve NPK, parametrelerinin yalnızca yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. Comet test parametrelerinin (kuruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti) ise en yüksek iki konsantrasyonda yükselttiği gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, XYL'nin yalnızca yüksek konsantrasyonlarda insan lenfositleri üzerinde genotoksik etkiye sahip olabileceği bu nedenle düşük konsantrasyonlarda kullanımının DNA veya kromozomal hasara neden olmayabileceği sonucuna varılmıştır (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu, Ünal, 2022).

DS'ün biyokimyasal parametrelere etkisinin incelendiği bir çalışmada Al-Salih ve arkadaşları (2021) , uzun süreli aşırı dozda Sorbitol ve Aspartam uygulamasının dişi sıçanlarda serum lipid profili düzeylerine etkisini araştırmışlardır. 100 g/gün sorbitol ve aspartam 18 yetişkin dişi sıçana 30 gün boyunca verilmiş ve kan örnekleri alınmıştır. Bu çalışmadaki sonuçlar, aspartam uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla (TC), (TG), (HDL), (LDL), (VLDL) seviyelerinde anlamlı bir fark olmadığını ($p \leq 0.05$) gösterirken, Sorbitol ile muamele edilen grupta serum (TG) ve (LDL) değerlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış ($p \leq 0.05$) gösterdiği belirlenmiştir. Sorbitol ile muamele edilen grupta Aspartam ile muamele edilen gruba kıyasla serum (TG) ve (LDL) düzeylerinde anlamlı bir fark ($p \leq 0.05$) bulunmamıştır. Sonuç olarak araştırmacılar Sorbitol ve aspartamın yüksek dozlarda uzun süre kullanımının lipid profili düzeylerinde bozulmalara yol açtığını, ancak bu durumun istatistiksel olarak fark oluşturmadığını belirtmişlerdir.

Eker-Kartal ve Avuloğlu-Yılmaz'ın (2023) gerçekleştirdiği çalışmada, tatlandırıcı gıda katkı maddesi olarak kullanılan poliollerden mannitol ve laktitolün *in vitro* genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde kromozomal aberasyonlar (KA) ve mikronükleus (MN) analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu tatlandırıcıların mitotik indeks (Mİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Mannitol için 500, 1000, 2000, 4000 ve 8000 µg/mL, laktitol için ise 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuçlar, her iki poliolün de KA ve MN frekansını etkilemediğini ve tüm konsantrasyonlarında NBİ'de önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Ancak mannitol (500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları hariç) ve laktitol (250 µg/mL hariç) hemen hemen tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde kontrole kıyasla MI'yi önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuç olarak mannitol ve laktitolün *in vitro* insan lenfositlerinde kullanılan konsantrasyonlarda önemli bir genotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Eker-Kartal ve Avuloglu-Yilmaz, 2023).

Canimoglu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, şeker alkolü (poliol) olan düşük kalorili yapay tatlandırıcı maltitolün ratların kemik iliği hücrelerinde KA testi kullanılarak genotoksik ve sitotoksik etkileri ile teratojenisitesi ve embriyotoksisitesi de araştırılmıştır. Ratlara 6, 12 ve 24 saatlik süre boyunca maltitolün 2,5; 5 ve 10 g/kg/vücut ağırlığı şeklindeki dozları intraperitonal olarak uygulanmıştır. Maltitol'ün teratojenitesini araştırmak amacıyla ise hamile ratlara gebeliğin ilk 7 günü (ilk trimester) boyunca 1, 2 ve 4 g/kg vücut ağırlığı/gün konsantrasyonlarında maltitol intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak maltitolün, KA'yı etkilemediği ve tüm konsantrasyonlarda ve sürelerde ratların kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi azaltmadığı ayrıca maltitolün teratojenik olmadığı açıklanmıştır. Ancak fetüsün ağırlığını azalttığı ve en yüksek dozda (4 g/kg canlı ağırlık) büyüme geriliğine neden olduğu vurgulanmıştır. Yine başka bir çalışmada, maltitolün insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus oluşumu (MN) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Maltitolün, tüm konsantrasyonlarda (1,25; 2,5 ve 5 mg/mL) ve muamele sürelerinde (24 ve 48 saat) KKD'yi etkilemediği ancak KA'i istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırdığı belirtilmiştir. Maltitol, MN frekansını konsantrasyona bağlı olmadan 24 ve 48 saat sürelerinde etkilemiştir. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde replikasyon indeksini ve mitotik indeksi azaltmadığı, ortamın pH'ını ve ozmolalitesini değiştirmediği bildirilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakılarak, maltitolün zayıf bir genotoksik potansiyele sahip olduğu ve *in vitro* insan periferik lenfositleri için sitotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır (Canimoğlu,

Rencüzoğulları, 2006). 2013 yılında yapılan bir çalışmada Chung ve arkadaşları, eritritolün potansiyel genotoksik etkilerini değerlendirmek için kısa süreli genotoksisite testleri yapmıştır. OECD test yönergelerine göre bakteriyel ters mutasyon testlerinde maksimum test dozu, 5.000 µg/plaka olarak, hücre bazlı analizlerde 5.000 µg/ml ve *in vivo* testler için 5.000 mg/kg olarak belirlenmiştir. AMES testinde pozitif sonuç elde edilmemiştir. CHL hücreleriyle yapılan kromozomal aberasyon testinde veya L5178Y *tk* +/- hücreleriyle yapılan *in vitro* mikronükleus testinde klastojenisite gözlenmediği açıklanmıştır. L5178Y *tk* +/- hücreleri kullanılarak yapılan Comet testinde iki yüksek konsantrasyonda DNA hasarında artışa neden olduğu açıklanmıştır. Ek olarak, *in vivo* mikronükleus testleri, eritritolün oral uygulamasının, erkek ICR farelerinin kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumunu etkilemediğini göstermiştir. Tüm bu test sonuçları birlikte ele alındığında, sonuçların eritritolün bakteri hücreleri için mutajenik olmadığını ve memeli hücrelerinde *in vitro* veya *in vivo* kromozomal hasara neden olmadığı görülmüştür.

Allium cepa L. bitkisindeki sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri araştırmak için üç yapay tatlandırıcının (aspartam, sorbitol ve sukraloz) farklı konsantrasyonları ve iki farklı maruz kalma süresi (24 ve 48 saat) uygulanarak araştırma yapılmıştır. Sonuçlar, tüm 24 ve 48 saatlik uygulamalarında bölünmeyen hücrelerde (interfaz) ve farklı mitotik aşamalarda farklı tipte kromozomal anormalliklere neden olduğunu göstermiştir. İnterfazda gözlenen anormallik mikronükleusdur. Profaz aşamasında küçük veya büyük mikronükleuslar ortaya çıkmıştır. Metafaz aberasyonları en dikkat çekici anormallik türünü temsil etmektedir. Anafaz ve telofazda köprüler, diyagonal, bozulmuş ve geç ayrılma gibi bir dizi anormallik fark edilmiştir. Sonuç olarak, insan sağlığı üzerindeki mutajenik etkilerinden kaçınmak için dar sınırlar içinde ve çok düşük konsantrasyonlarda kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (Rizk, Soliman, Rashed, 2016).

Bir diğer çalışmada, aspartam, asesülfam-potasyum (0,0063 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,2 mM ve 0,815 mM'dir) ve siklamat (önceki analizlere göre 0,0125 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,4 mM ve 1,6 mM) olmak üzere üç yapay tatlandırıcısının, toksisite, antitoksisite, genotoksisite değerlendirmesi *in vivo* model olarak *Drosophila'da* SMART testi ile gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, sitotoksik etkiyi belirleyen kemopreventif aktiviteyi ve internükleozomal fragmantasyon veya DNA iplikçik kırılmalarına bağlı olarak DNA hasarı üretme kapasitesini değerlendirmek için *in vitro* HL-60 (Promiyelositik insan lösemi) hücre hattı kullanılmıştır. Klastojenisite Comet testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak toksisite

analizleri, asesülfam-potasyum en yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde toksik olmasına karşın, aspartam ve siklamatın *D. melanogaster* larvalarına karşı toksik olmadığını göstermiştir. HL-60 hücre muamelesinde; asesülfam-potasyum ve aspartamın 0,08 mM'de konsantrasyonunun sitotoksik olduğu ve siklamatta etki görülmediği belirlenmiştir. SCGE testi ise, aspartamın test edilen en yüksek konsantrasyonda önemli ölçüde DNA hasarını tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca siklamat, test edilen tüm konsantrasyonlarda DNA iplikçik kırılmalarını tetikleyebilmiş ve aksine, asesülfam-potasyumun, en düşük konsantrasyon dışında, eşzamanlı kontrolle karşılaştırıldığında hiçbir konsantrasyonda incelenen parametreleri önemli ölçüde artırmadığı anlaşılmıştır (Mateo-Fernández, González-Jiménez, Celestino, Font, Alonso-Moraga, Merinas-Amo, 2022).

Mamur ve arkadaşlarının (2022) yaptığı bir çalışmada, birçok gıdada yaygın olarak kullanılan yapay bir tatlandırıcı olan Asesülfam potasyum (ACE-K)'un 7,5, 15, 30, 60, 120 ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılarak insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücre hattında MTT testi ile sitotoksik etkisi ve insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler, mikronükleus ve comet testlerini kullanılarak genotoksik etkisi değerlendirilmiştir. ACE-K'nin özellikle yüksek konsantrasyonlarda insan lenfositlerinin yanı sıra $HepG_2$ hücrelerinde de sitotoksik etki gösterdiği ve bu tatlandırıcının, uzun süreli muamelede KA'ların sıklığını artırarak hafif bir genotoksik etki sergilediği belirtilmiştir. Özellikle Comet testi kullanılarak 15 µg/mL'de DNA hasarına sebep olduğu açıklanmıştır. Yapay tatlandırıcıların sağlık üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmediğinden bu maddeleri içeren besinlerin aşırı tüketilmemesi gerektiği ve bu bağlamda daha fazla *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Mamur, Yüzbaşıoğlu, Bülbül, Ünal, 2022).

Tez kapsamında genotoksik etkilerinin incelendiği DSX karışımına benzer bir araştırma olan ve iki maddenin kombinasyonunun incelendiği çalışmada, bitki (*Allium cepa*) ve hayvanlarda (*Mus musculus*) sodyum sakarin ve/veya sodyum siklamat tatlandırıcıların sitotoksik ve mutajenik potansiyellerini *Allium cepa* ve MN testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tatlandırıcılar hem bireysel olarak; sodyum sakkarin (10 mg/ 100 g/ml, 15 mg/ 100 g/ml, 30 mg/ 100 g/ml) ve Sodyum Siklamat (20 mg/ 100 g/ml, 40 mg/ 100 g/ml, 80 mg/ 100 g/ml) ayrıca kombinasyon olarak Sodyum Sakarin+Sodyum Siklamat (10 mg/100 g/ml+20 mg/100 g/ml, 15 mg/100 g/ml+40 mg/100 g/ml, 30 mg/100 g/ml+80 mg/100 g/ml) şeklinde uygulanmıştır. 2:1 oranındaki sodyum siklamat ve sodyum sakarin, bazı ürünlerin acı tadını maskelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. *A. cepa*'da hem

tatlandırıcılar ayrı ayrı hem de bunların kombinasyonlarının konsantrasyonu ve maruz kalma süresine (48, 72 ve 168 saat) bağımlı olarak sitotoksik ve mutajenik etkiler belirlenmiştir. Benzer şekilde farelerde periferik kan hücrelerinde mikronükleus oluşumunda da artış gözlenmiş ve 168 saatlik kombinasyon dozlarında daha fazla toksik etki gözlenmiştir. Artan konsantrasyon ve muamele süreleri ile sinerjistik bir etki nedeniyle DNA hasarında artış meydana gelebildiği gözlenmiştir (de Oliveira, alves de Oliveira, de Oliveira, Damasceno, de Oliveira Silva, Medeiros, Soares, da Silva, de Aguiar, Islam, Melo-Cavalcante, Peron, Sousa, 2017).

Bu tez çalışmasında, DS ve DSX'in genotoksik potansiyeli karşılaştırıldığında DSX karışımının genotoksik potansiyelinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Karışım halinde sinerjistik bir etki sergilemektedir. Sinerjistik etki, iki veya fazla sayıdaki kimyasal maddenin tek tek etkilerinden farklı olan, birlikteki etkilerinden daha güçlü ya da bütünüyle farklı bir etki gösterme eğilimlerinden oluşmaktadır. DSX karışımında iki tatlandırıcıda görülmeyen ama karışımda oluşan farklı bir kromozom anormallik de (kardeş kromotidlerde değişim) görülmüştür. Bu nedenle tek başına veya karışım halinde kombinasyon olarak tercih edilen tatlandırıcıların gıda ve ilaç endüstürisinde kullanımına dikkat edilmelidir.

Yapay tatlandırıcıların kullanımı konusundaki tartışmalar, kanserojenik ve genotoksik riskler ile dolaylı ve/veya doğrudan bağlantılı olabileceği endişelerini içermektedir. Tatlandırıcılar ve metabolitlerinin DNA kırıklarını nasıl uyardığına dair mekanizmalar konusunda bilimsel araştırmalar sınırlı olup bu alanda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Özellikle genotoksisite testlerinde olumsuz sonuçlar bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Genotoksik etkili maddeler, DNA ve/veya DNA ile ilişkili hücresel bileşenlerle (iğ iplikleri) veya enzimlerle (topoizomerazlar) etkileşime girebilmektedir (Robinson 2010; Jouyban ve Parsa 2012). Bu etkileşim DNA eklentilerine, DNA tek ve çift sarmal kırıklarına, DNA-protein çapraz bağlarına sebebiyet vererek DNA hasarına yol açabilir (Barnes, Zubair, John, Poirier ve Martin, 2018).

Tatlandırıcı kullanımı sonucunda oluşabilecek DNA hasarlarının, DNA replikasyonu, DNA transkripsiyonu, DNA rekombinasyonu ve DNA'nın onarımında rol oynayan proteinlerde geri dönüşü olmayan hasarlar olabileceği bildirilmiştir. Bu hasarların kaynağının serbest radikaller tarafından oluşturulan reaktif oksijen türleri (ROS) olduğu belirtilmiştir (Lin, Zhang, Chen ve Qing, 2007; Fındıklı ve Türkoğlu, 2014; Bulbul, Mamur, Yuzbasioğlu,

Unal, 2024). Tatlandırıcıların tüketimiyle birlikte, vücutta serbest radikal üretiminde artış ve antioksidan seviyesinde azalmalar meydana gelerek, oksidatif dengeyi bozdukları ve oksidatif strese sebep oldukları söylenebilir. Reaktif oksijen türleri vücutta aşırı üretildiklerinde veya hücresel savunma onları metabolize edemediğinde oksidatif stres düzeyi artarak hasar meydana gelmektedir (Sies, Belousov, Chandel, Davies, Jones, Mann, Winterbourn, 2022). Oksidatif stresin indüklenmesi, DNA dahil olmak üzere hücresel biyomoleküllere ve proteinlere zarar verebilen bir durumdur (Juan, Pérez de la Lastra, Plou, Pérez-Lebeña, 2021). DNA'da ROS, azotlu bazlar ve deoksiriboz ile reaksiyona girerek önemli oksidatif reaksiyonlara neden olarak mutageneze yol açan hatalara neden olabilir (Juan, Pérez de la Lastra, Plou, Pérez-Lebeña, 2021). DNA'nın oksidasyonu, diğer mutajenik değişikliklerin yanı sıra DNA bazlarında da değişikliklere veya çift sarmal kırılmalarına yol açabilir (Poetsch, 2020; Juan, Pérez de la Lastra, Plou, Pérez-Lebeña, 2021). ROS, DNA bazlarını oksitlemenin yanı sıra, DNA şeker-fosfat omurgasına serbest radikal saldırıları nedeniyle DNA'nın iplikçiklerinin kırılmasına da neden olabilir (Juan ve ark. 2021). Tatlandırıcıların tüketimiyle DNA sarmalında meydana gelebilecek kırılmaların, mutajenik veya klastojenik etkilere yol açtığı söylenebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüz, koşullarında insanların gıda katkılarına artan maruziyeti sonucunda: genetik etkileri tam olarak kontrol edilmemiş gıda katkı maddelerinin genotoksik olup olmadıklarının değerlendirilmesi insanların sağlığı açısından önem taşımaktadır. Teknik alanda yapılan bütün çalışma ve/veya değerlendirmeler, her ne kadar insanları daha kaliteli ve sağlıklı bir yaşama kavuşturmak ve onların daha iyi beslenmesini sağlamak amacıyla yapılıyorsa da sayısız problemleri de beraberinde getirmektedir. Katkı maddeleri uygun miktarlarda ya da dozlarda kullanılsa da, bu maddelerin gıdalarla hemen her gün alınmaları ve maruz kalma süresinin uzun olması nedeni ile zamanla vücut içerisinde birikebilmektedir. Bu birikim; vücutta toksik etki oluşturarak çeşitli hasarların oluşmasına yol açabilmektedir. Hasarın kalıtım materyali üzerinde oluşması genotoksisiteye sebep olmaktadır. Bir kimyasal maddenin genotoksik olup olmadığı kısa süreli genetik toksisite test yöntemleriyle belirlenmektedir.

Gıda katkı maddelerinin güvenliği, sağlık üzerindeki potansiyel etkilerine ilişkin devam eden tartışmalar nedeniyle uzun yıllardır araştırmaların ana odağı olmuştur. Tatlandırıcıların çok sayıda yan etkisi rapor edilmiştir. Dikkatsiz ve aşırı kullanımlarının alerjik reaksiyonlar, obezite, mide bulantısı, bilişsel sorunlar, kas kasılmaları ve gaz oluşumu gibi etkilere, kalp-damar hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olabileceği görülmektedir. Hatta bazı tatlandırıcılar üzerine yapılan araştırmalarda, yüksek dozlarda ve uzun süreli maruziyet durumlarında genotoksik etkilerini ortaya koyan bazı bulgular da sunulmuştur. Bundan dolayı, gıda katkı maddesi olan tatlandırıcıların dikkatli kullanılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, gıdalarda kullanılan katkı maddelerinden DS ve DSX'in *in vitro* genotoksik etkileri, insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, mikronükleus, comet test yöntemleriyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, uygulanan testlerde pozitif sonuçlar elde edildiği için, DS ve DSX'in genotoksik risk oluşturabileceği ön görülmektedir. Bu nedenle üretimde kullanım miktarlarının sıkı bir şekilde denetlenmesi önemlidir.

Gıdalarda katkı maddelerinin farklı gruplarının ya da aynı gruptan farklı katkı maddelerinin kombinasyonlarının kullanıldığı unutulmamalıdır. Bu katkı maddeleri tek başlarına yaptıkları etkiler ile bir arada oluşturdukları etkiler farklı olabilmektedir. Bu maddeler

sinerjistik etkiler sergileyebilmekte ve daha zararlı sonuçlara yol açabilmektedirler. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin koktely etkisini gözlemleyebilmek adına karışımların genotoksik potansiyellerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile DS ve DSX karışımının güvenlik değerlendirme bilgilerine katkı sağlanacak ve daha sonra yapılacak çalışmalara temel sağlayacak bilgilere ulaşılmıştır. Ancak DS ve DSX'in etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi için, daha farklı test sistemleri ile *in vitro* özellikle de *in vivo* şartlarda incelenmeleri gerekmektedir. Böylece, bir yandan gıdalarda kullanımındaki sınırların belirlenmesi sağlanabilir, hem de insan sağlığı bakımından zararlı olmayan miktarlarının tüketilmesi yönünde düzenlemeler yapılabilir.

KAYNAKLAR

Abdelmigid, H. M. (2019). Risk assessment of food coloring agents on DNA damage using RAPD markers. *Journal of Applied Biological Sciences,* 3(2), 127-134.

Akbas, E., Unal, F., Yuzbasioglu, D. (2023). Cellular toxicities of gadolinium- based contrast agents used in magnetic resonance imaging. *Journal of Applied Toxicology, 43*(7), 958-972.

Akyüz-Begeç, Ö. (2022). Şeker, şeker değişkenleri ve dental çürük ilişkisi. *Sağlık Bilimlerinde Araştırma ve Değerlendirmeler-I*, 243-245.

Alabi, O. A., Oladimeji, L. R., Sorungbe, A. A., Adeoluwa, Y. M. (2019). Oxidative stress induced DNA damage and reproductive toxicity in male albino mice orally exposed to sorbitol. *Annals of Science and Technology,* 4 (2): 46-58.

Alan, S., Özksüztepe, G. (2020). Gıda katkı maddeleri ve süt endüstrisinde kullanılan antimikrobiyaller. *Bozok Veterinary Science,* 1(2), 44-50.

Al-Salih, R. M., & Abbas, R. K. (2021). Effect of prolonged overdose sorbitol and aspartame administration on serum lipid profile: experimental finding. *Medico-Legal Update, 21*(2), 967.

Altuğ, T. (2009). Gıda Katkı Maddeleri., T. Altuğ (Editör). *Gıda Katkı Maddeleri*. Üçüncü Baskı. İzmir. Kan Yılmaz Matbaacılık, 1-16.

Altuğ, T., Elmacı, Y. (2001). *Gıda Katkı Maddeleri* – Tatlandırıcılar. Altuğ, T. (Editör). İzmir: Meta Basım, s.286.

Aminoff, C., Vanninen, E., Doty, T. E. (1978). *The Occurrence, Manufacture and Properties of Xylitol.* Counsell, J.N. (editör). Xylitol, London: Applied Science Publishers, 1-9.

Anand, S. P. & Sati, N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4*(7), 2496- 2501.

Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., Carvalhoa, R. F., Souzac, E. B., de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72, 74-82.

Arkan, Z. M. (2020). *The analysis of food additives and inorganic anions in bread by ion chromatographic method with conductivity detector.* M. Sc. Thesis. İstanbul Technical University Graduate School of Science Engıneerıng And Technology. İstanbul.

Arslan, G. (2011). *Gıda katkı maddeleri ve yeni yapılan dioksimlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliliğinin incelenmesi*. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.

Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Çelebi-Keskin, A., Ünal, F. (2016). Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*, 91: 8-18.

Atlı-Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.

Atman, Ü. C. (2004). Gıda katkı maddeleri ve gıda kontrolü. *Sted*, *13*(3), 86-88.

Augustyniak, M., Gladysz, M., Dziewięcka, M. (2016). The comet assay in insects-Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 67-76.

Avuloglu Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2023). Investigation of genotoxic effect of octyl gallate used as an antioxidant food additive in *in vitro* test systems. *Mutagenesis*, *38*(3), 151-159.

Avuloglu-Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2020). *In vitro* genotoxicity assessment of monopotassium glutamate and magnesium diglutamate. *Toxicology In Vitro*, 65, 104780.

Avuloğlu-Yılmaz, E. (2018). Gıda katkı maddeleri olarak kullanılan monopotasyum glutamat, magnezyum diglutamat ve xylitol'ün genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., Özçelik, A. B., Ersan, S., Ünal, F. (2017). Evaluation of genotoxic effects of 3-methyl-5-(4-carboxycyclohexylmethyl)-tetrahydro-2H-1, 3, 5-thiadiazine-2-thione on human peripheral lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1228-1233.

Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. (2022). Investigating *in vitro* genotoxic effects of sweetener xylitol. *Kahramanmaraş Sütçü İmam University Journal of Agriculture and Nature*, 25 (6): 1315-1325.

Awuchi, C. G., Twinomuhwezi, H., Igwe, V. S., Amagwula, I. O. (2020). Food additives and food preservatives for domestic and industrial food applications. *Journal of Animal Health*, *2*(1), 1-16.

Baines, D., Seal., R. (2012). Natural Food Additives Ingredients and Flavourings. *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge, UK.

Baker-Smith, C. M., de Ferranti, S. D., Cochran, W. J., Abrams, S. A., Fuchs, G. J., Kim, J. H., Heitlinger, L. A. (2019). The use of nonnutritive sweeteners in children. *Pediatrics.* 144 (5).

Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., and Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213-1224.

Beyan, A. Ç., Demiral, Y. (2021). Mesleksel uçucu organik bileşik maruz kalımı ve genototoksisite. *Çalışma ve Toplum*, *3*(70), 1901-1916.

Bhise, S., Kaur, A., (2013). "Polyols to improve quality and shelf life of baked products: A review". *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 3 (1), 262-272.

Biçer, Y., Uçar, G. (2016). Gıda katkı maddeleri ve raf ömrü ilişkisi. *Turkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(2), 30-39.

Bivehed, E., Hellman, B. (2020). Flash-comet assay. *Methodsx*, *7*, 101161.

Boğa, A. Binokay, S. (2010). Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *19*(3), 141-154.

Bolognesi, C., Bonassi, S., Knasmueller, S., Fenech, M., Bruzzone, M., Lando, C., Ceppi, M. (2015). Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 20-31.

Bolognesi, C., Fenech, M. (2019). *In genotoxicity assessment.* New York: Humana Press, 147-163.

Boreiko, C. J., Rossman, T. G. (2020). Antimony and its compounds: Health impacts related to pulmonary toxicity, cancer, and genotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 403, 115156.

Börçek-Kasurka, C. (2019). Geno-Sitotoksisite çalışmalarına sitom yaklaşımı. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji*, *8*(2), 261-269.

Breiteneder, H. (2004). Thaumatin-like proteins-a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*. 59: 479-481.

Bulbul, S. N., Mamur, S., Yuzbasioglu, D., & Unal, F. (2024). Safety assessment of high fructose corn syrup and fructose used as sweeteners in foods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1-12.

Calini, V., Urani, C., Camatini, M. (2002). Comet assay evaluation of DNA single-and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 18(6), 369-379.

Canimoglu, S., & Rencuzogullari, E. (2013). The genotoxic and teratogenic effects of maltitol in rats. *Toxicology and Industrial Health*, *29*(10), 935-943.

Canimoğlu, S., Rencüzoğulları, E. (2006). The cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(3), 269-278.

Cao, J., Zhang, J., Wang, Y., Du, L. Q., Xu, C., Wang, Q., Liu, J. X., Su, X., Fan, F. Y., Liu, Q., Fan, S. J. (2013). Cytogenetic abnormalities in lymphocytes from victims exposed to cobalt-60 radiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17525-17535.

Cardoso, F. S., Araujo-Limaa, C. F., Aiubb, C. A. F., Felzenszwalba, I. (2016). Exposure to sorbitol during lactation causes metabolic alterations and genotoxic effects in rat offspring. *Toxicology Letters*, 260, 36–45.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 13(4), 377-399.

Carocho, M., Morales, P. ve Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends in Food Science and Technology, 45*(2), 284-295.

Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: a review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology,* 107: 302-317.

Cartus, A., Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food and Chemical Toxicology,* 106, 574-582.

Cavalcanti, B. C., Neto, J. B. D. A., Silva, A. A. D. S., Barreto, F. S., Ferreira, J. R. D. O., Magalhães, H. I. F., da Silva, C. R., Vieira, I. G. P., Ricardo, N. M. P. S., Júnior, H. V. N. and Moraes, M. O. (2021). Chemopreventive effect of troxerutin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human leukocytes through modulation of glutathione-dependent enzymes. *Journal of Toxicology and Environmental Health,* Part A, 84(4), 137-151.

Chacón, C. F., González, E. C. L., Poletta, G. L. (2021). Biomarkers of geno-and cytotoxicity in the native broad-snouted caiman (Caiman latirostris): Chromosomal aberrations and mitotic index. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *867*, 503353.

Chandrasekaran, J. R., Nithiyanantham, S. (2023). Solvation number, thermochemical parameter, and viscosity study of sweeteners in aqueous and non-aqueous media through ultrasonic measurements. *ChemPhysMater*. 2(4): 303-314.

Chen, Z., Huang, C., Yao, X., Benmore, C. J., & Yu, L. (2021). Structures of glass-forming liquids by x-ray scattering: glycerol, xylitol, and d-sorbitol. *The Journal of Chemical Physics*, *155*(24).

Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C., Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-Biological Interactions, 345*, 109531.

Chung, Y. S., & Lee, M. (2013). Genotoxicity assessment of erythritol by using short-term assay. *Toxicological Research*, *29*, 249-255.

Cordelli, E., Bignami, M., Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research,* 10 (1), 68–78.

Çalışkan, A. (2021). *Gıda Üreticisinin Hukuki Sorumluluğu.* Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul.

Çavuşoğlu, D. (2023). 4-Metil umbelliferon'un allium testi kullanılarak; fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science*, *18*(2), 110-128.

Çelik, D. A., Toğay, V. A., Türel, G. Y., Özçelik, N. (2022). Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sitrik asit, askorbik asit ve sodyum sitratın insan lenfosit hücrelerinde genotoksisitesinin değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *29*(3), 486-492.

Çelik, M. (2022). Kardeş Kromatit Değişimi Testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 185-217.

Çobanoğlu, H. (2021). Gadoterik asit'in *in vitro* koşullarda kardeş kromatid değişimi ve mitotik indeks üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(3), 1803-1808.

Daly, K., Darby, A. C. and Shirazi-Beechey, S. P. (2016). Low calorie sweeteners and gut microbiota. *Physiology and Behavior*, 164, 494–500.

Danyer, E., Yörük, N. G. (2016). General informations and definitions of food ingredients. *Turkiye Klinikleri Journal of Food Hygiene and Technology-Special Topics*, 2-2:1-10.

de Oliveira, V. A., alves de Oliveira, V. M., de Oliveira, T. W. N., Damasceno, A. N. C., de Oliveira Silva, C. E., Medeiros, S. R. A., Soares, B. M., da Silva, F. C. C., de Aguiar, R. P. S., Islam, M. T., Melo-Cavalcante, A. A. D. C., Peron, A. P., Sousa, J. M. D. C. (2017). Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of two artificial sweeteners by using eukaryotic test systems. *African Journal of Biotechnology*, *16*(11), 547-551.

Deis, R.C. & Kearsley, M.W. (2012). *Sorbitol and Mannitol*. Chapter 15. In: Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. Second Edition, Wiley Online Library.

Dhillon, V. S., Deo, P., Bonassi, S., Fenech, M. (2021). Lymphocyte micronuclei frequencies in skin, haematological, prostate, colorectal and esophageal cancer cases: a systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 1-10.

Dikilitaş, S., Aksoy, Ö. (2018). The genotoxic effects of some food colorants on Zea mays L. var. saccharata Sturt. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 71(4), 438–445.

Dimici, E. (2020). Manyetik rezonans görüntülemede kullanılan gadobutrol ve gadoversetamid etken maddelerinin insan periferal lenfositlerinde genotoksik etkisi. Yüksek lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Dirven, Y., Eide, D. M., Henriksson, E. W., Hjorth, R., Sharma, A. K., Graupner, A., Olsen, A. K. (2023). Assessing testicular germ cell DNA damage in the comet assay; introduction of a proof- of- concept. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *64*(2), 88-104.

Duru, S., Gül, A., Hayran, S. (2019). Gıda kodekslerinin tarım ve gıda ürünleri dış ticareti bakımından incelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9*(2), 1177-1185.

EFSA Scientific Committee (SC), More, S. J., Bampidis, V., Bragard, C., Halldorsson, T. I., Hernández- Jerez, A. F., Benford, D. (2021). Guidance on aneugenicity assessment. *EFSA Journal*, *19*(8): 6770.

Eissa, F., Sebaei, A. S., & Mohamed, M. E. B. (2024). Food additives and flavourings: analysis of EU RASFF notifications from 2000 to 2022. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106137.

Ekenci, K. D., & Köksal, E. (2024). Dietary exposure assessment to food additives: a critical review of food consumption surveys. *Nutrire*, *49*(1), 10.

Eker-Kartal, E., Avuloglu-Yilmaz, E. (2023). Determination of the genotoxic effects of sweeteners, mannitol and lactitol. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, *41*(3-4), 135-149.

Ekşi, A. (2017). Gıda katkıları ve başlıca işlevleri., M. Tayfur. (Editör). *A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri*. İkinci Baskı. Ankara. Detay Yayıncılık, 5-7.

Erikel, E., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2019). *In vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal of Ethnopharmacology*, 237, 171-181.

Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi,* 53(3), 220-35.

Evans, H. J., In Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Amsterdam, Elsevier Sciences, 2nd ed.,* 405–424.

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

Fenech, M. (1993). The cytochinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101 (3): 101-107.

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

Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 58-66.

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

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

Fernstrom, J. D. (2015). Non-nutritive sweeteners and obesity. *Annual Review of Food Science and Technology,* 6, 119–136. doi: 10.1146/annurev-food-022814-015635.

Fındıklı, Z., Turkoglu, S. (2014). Determination of the effects of some artificial sweeteners on human peripheral lymphocytes using the comet assay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 6(8), 147-153.

Franzke, B., Schwingshackl, L., Wagner, K. H. (2020). Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity-A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 108343.

Gallandre, F. (1978) Mutagenicity studies with xylitol using various methods for HoffmanLa Roche Laboratories. Submitted to the World Health Organization by F. Hoffman La Roche Co., Ltd., Basel, Switzerland.

Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D., Naviglio, D. (2020). Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. *Food Research International, 137*, 109414.

García-Cordero, A. L., Ibarra, I. S., Ferreira, A., Rodriguez, J. A., Pateiro, M., & Santos, E. M. (2024). Sugar reduction and sweeteners to improve foods. *In Strategies to Improve the Quality of Foods* (pp. 87-120). Academic Press.

Gebremichael, B., Lassi, Z. S., Begum, M., Mittinty, M., & Zhou, S. J. (2023). Patterns and predictors of low-calorie sweetener consumption during pregnancy: findings from a national survey. *Nutrients, 15*(19), 4196.

Gherezgihier, B. A., Mahmud, A., Admassu, H., Shui, X. W., Fang, Y., Tsighe, N., Mohammed, J. K. (2017). Food additives: functions, effects, regulations, approval and safety evaluation. *Journal of Academia and Industrial Research, 6*(4), 62-68.

Ghosh, S., & Sudha, M. L. (2012). A review on polyols: New frontiers for healthbased bakery products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition,* 63 (3), 372-379.

Glavinić, U., Rajković, M., Ristanić, M., Stevanović, J., Vejnović, B., Djelić, N., Stanimirović, Z. (2023). Genotoxic potential of thymol on honey bee DNA in the comet assay. *Insects*, 14(5), 451.

Glei, M., Schneider, T., Schlörmann, W. (2016). Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology*, 90(10), 2315-2336.

Gogoi, J. Y. O. T. C. H. N. A., Karabi, D., Dutta, P. A. (2021). Effect of preservatives and pesticides on mitotic index of Allium cepa roots-biological model experiment for genotoxicity. *Pollution Research Journal. 40*(3), 777-781.

Goncalves, N.C., Del Bel Cury, A.A., Simoes, G.S., Hara, A.T., Rosalen, P.L., Cury, J.A. (2006). Effect of xylitol:sorbitol on fluoride enamel demineralization reduction in situ. *Journal of Dentistry*, 34 (9), 662-667.

Gömürgen, A. N. (2022). Evaluatıon of cytotoxic and genotoxic potential of aqueous extracts of medicinal plant helichrysum mill. using allium cepa chromosome assay: cytotoxic and genotoxic effects of helichrysium. *Research Journal of Biology Sciences*, *15*(2), 50-57.

Göney, G., Gazeloğlu, C. (2021). Aşırı kilolu bireylerde mikroçekirdek deneyi ile olası genotoksik hasarın istatiksel analizi: kesitsel çalışma. *KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, *2*(3), 109-118.

Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols-their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, 241(1): 1-14.

Groff, K., Evans, S. J., Doak, S. H., Pfuhler, S., Corvi, R., Saunders, S., Stoddart, G. (2021). *In vitro* and integrated *in vivo* strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, *36*(6), 389-400.

Gül, E. Öztürk, M. Güneş-Bayır, A. (2023). Gıda katkı maddelerinin sağlık üzerine etkisi. *Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi*, (6), 44-57.

Gültekin, F. (2017). *Fark Etmeden Yediklerimiz: A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri*. F. Gültekin. (Editör). Birinci Baskı. İstanbul. Server Yayınları, 27-32.

Gültekin, F., Öner, M. E., Savaş, H. B., Doğan, B. (2017). Tatlandırıcılar, glikoz intoleransı ve mikrobiyota. *Biyoteknoloji ve Stratejik Sağlık Araştırmaları Dergisi,* 1, 34-38.

Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., Clement, M. V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.

Han, M., Zhang, Z., Liu, S., Sheng, Y., Waigi, M. G., Hu, X., Qin, C., Ling, W. (2023). Genotoxicity of organic contaminants in the soil: A review based on bibliometric analysis and methodological progress. *Chemosphere*, 313, 137318.

Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(1), 18.

Hedrick, V. E., Nieto, C., Grilo, M. F., & Sylvetsky, A. C. (2023). Non-sugar sweeteners: helpful or harmful? The challenge of developing intake recommendations with the available research. *The BMJ: Leading Medical Research*, *383*.

Hegde, V. L., Venkatesh, Y. P. (2004). Anaphylaxis to excipient mannitol: evidence for an immunoglobulin E-mediated mechanism. *Clinical and Experimental Allergy*. 34:1602-1609.

Hernández-Pérez, A. F., Jofre, F. M., de Souza Queiroz, S., de Arruda, P. V., Chandel, A. K., de Almeida Felipe, M. D. G. (2020). Biotechnological production of sweeteners. *In Biotechnological Production of Bioactive Ompounds* (pp. 261-292). Elsevier.

Hill, A. M., Belsito, D. V. (2003). Systemic contact dermatitis of the eyelids caused by formaldehyde derived from aspartame?. *Contact Dermatitis*. 49:258-259.

Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J. & Stopper, H. (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 85-98.

Holmannova, D., Borsky, P., Andrys, C., Hamakova, K., Cermakova, E., Poctova, G., Fiala, Z., Smejkalova, J., Blaha, V., Borska, L. (2022). Chromosomal aberrations and oxidative stress in psoriatic patients with and without metabolic syndrome. *Metabolites*, 12(8), 688.

Hori, H., Shimoyoshi, S., Tanaka, Y., Momonami, A., Masumura, K., Yamada, M., Fujii, W., Kitagawa, Y., Hayashi, M. (2020). Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 849, 503130.

Hovhannisyan, G. G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*, 3(1), 17.

Hu, Q., Maurais, E. G., Ly, P. (2020). Cellular and genomic approaches for exploring structural chromosomal rearrangements. *Chromosome Research*, 1-12.

İla, H. B., Hüsunet, M. T. (2022). Kromozom Anormallikleri Testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 153-184.

İnternet: JECFA. 1978. http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.inchem.org%2Fdocuments%2Fjecfa%2Fjecmono%2Fv13je11.

İnternet: OECD (2024). OECD Test Guidelines For Testing Of Chemicals: Introduction To The Oecd Guıdelines On Genetic Toxicology Testing, OECD (1986), *Test No. 479: Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-479-genetic-toxicology-in-vitro-sister-chromatid-exchange-assay-in-mammalian-cells_9789264071384-en =erişim: 27 Mart 2024.

İnternet: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2023). https://www.oecd.org/general/searchresults/?q=oecd%20Chromosome%20Aberration&cx=012432601748511391518:xzeadub0b0a&cof=FORID:11&ie=UTF-8. 25 Mart 2024 tarihinde alınmıştır.

İnternet: PubChem. Sorbitol (Compound). Toxicity - Acute Effects. 29-03-2024URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5780#section=Ingestion-Symptoms=29-03-2024, Son erişim tarihi: 29-03-2024.

İnternet: Sigma Aldrich. D-sorbitol yapısal formülü. 04-03-2024 c. URL: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/d-sorbitol?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=d-sorbitol&type=product=04-03-2024, Son erişim tarihi: 04-03-2024.

İnternet: Sigma Aldrich. Sorbitol eş anlamlı(lar). 11-04-2024 a. URL: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/sorbitol?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=sorbitol&type=product=11-04-2024, Son erişim tarihi: 11-04-2024.

İnternet: Sigma Aldrich. Xylitol eş anlamlı(lar) ve yapısal formülü. 11-04-2024 b. URL: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/xylitol?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=xylitol&type=product=11-04-2024, Son erişim tarihi: 11-04-2024.

İnternet: Türk Gıda Kodeksi. (TGK). (2013, 30 HAZİRAN). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Resmî Gazete (Sayı:28693) Erişim adresi: https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm, Son erişim: 03.04.2024.

İnternet: Türk Gıda Kodeksi. (TGK). Tarım ve Orman Bakanlığı (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü). (2023, 13 EKİM). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Resmî Gazete (Sayı: 32338) Erişim adresi: https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2023/10/20231013M1-1-1.pdf https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Haber/632/Turk-Gida-Kodeksi-Gida-Katki-Maddeleri-Yonetmeligi-Guncellendi, Son erişim: 23.04.2024.

İnternet: JECFA. 1978. http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.inchem.org%2Fdocuments%2Fjecfa%2Fjecmono%2Fv13je11.htm&date=2018-04-12. Son Erişim Tarihi: 05.04.2024.

İşgören, A., Sungur, S. (2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific,* 3(1), 19-33.

Jagetia, G. C. (2021). Antioxidant activity of curcumin protects against the radiation-induced micronuclei formation in cultured human peripheral blood lymphocytes exposed to various doses of γ-radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 1-16.

Javi, F., Torabi, H., Dadmohammadi, Y., Tiwari, R., Prakash, I., & Abbaspourrad, A. (2024). Quantification of diffusion coefficients of commonly used high-intensity sweeteners through mucin. *Food Research International*, 183, 114185.

Jiang, N., Naz, S., Ma, Y., Ullah, Q., Khan, M. Z., Wang, J., Basang, W. D. (2023). An overview of comet assay application for detecting dna damage in aquatic animals. *Agriculture*, *13*(3), 623.

Jouyban, A., Parsa, H. (2012). *Toxicity and Drug Testing*- Genotoxic impurities in pharmaceuticals, Prof. Bill Acree (ed). Iran: IntechOpen, 387-415.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4642.

Karabal, A. (2022). Ulusal ve uluslararası gıda standardizasyonu. *Academic Knowledge*, *5*(1), 64-90.

Karataşoğlu, E., Demirel, E., Şahin, T., Berktaş, S., Mustafa, Ç. A. M. (2021). Kalorisi azaltılmış mor reyhan soğuk çayı üretimi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi,* 25(2), 163-171.

Karle, A. A., Waghchaure, P. S., Rane, B. R., Kalamkar, R. V., Keservani, R. K., & Shirode, P. R. (2024). Regulatory guidance on food supplement and dietary fiber. *In Food Supplements and Dietary Fiber in Health and Disease*. Apple Academic Press, pp. 425-453.

Karlsson, H. L., Di Bucchianico, S., Collins, A. R., Dusinska, M. (2015). Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle- induced genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 82-96.

Kassa, B. A. (2021). Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of municipal wastewater discharged into the head of blue nile river using the allium cepa test. *Scientific African*, 13, e00911.

Kazancı, F., Şahin, F. İ. (2022). Jinekolojik onkoloji pratiğimizde risk azaltıcı cerrahi yönetimi gerektiren genetik değişiklikler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *31*(2), 132-146.

Kearsley, M. W., Deis, R. C. (2006). Sorbitol and mannitol. *Sweeteners and Sugar Alternatives In Food Technology*. Mitchell, H. (editor). Oxford UK: Blackwell Publishing Limited, 249-261.

Khan, M. S. (2014). Genotoxicity: *In Vivo* Cytogenetic Assays. *International Journal of Pharmamedix India*, 2(3), 792-803.

Kılıç-Altun, S. Aydemir, M. E. (2021). Analysis of e-coded food additives in delicatessen product labels within the status of halal food. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. 6(1), 29-34.

Kıvanç, P., Soylu, P., Özdemir, M. B., Şişik, N., Tayfur, M. (2017). Gıda katkı maddelerinin üretimi, özellikleri ve kullanımları., Tayfur, M. (Editör). *A'dan Z'ye Gıda Katkı Maddeleri.* İkinci Baskı. Ankara: Detay Yayıncılık, 201-202.

Kızılaslan, N. (2017). The relationship between sweeteners and metabolic diseases. *Turkish Journal of Agriculture:Food Science and Technology*, 5(2), 191-198.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Annelies Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163.

Korkmaz, M. (2022). Gıda Katkı Maddeleri ve Moleküler Gastronomi Alanındaki Kullanımları. (Uzun, M., Serbest-Yılmaz, B. Editör). *INSAC New Trends in Social and Education Sciences.* Birinci Basım. Ankara: Gece Kitaplığı, 296-321.

Koskela, H. O., Hyvarinen, L., Brannan, J. D., Chan, H. K., Anderson, S. D. (2004). Coughing during mannitol challenge is associated with asthma. *Chest*, 125(6):1985-1992.

Kou, F., Wu, L., Ren, X., Yang, L. (2020). Chromosome abnormalities: new insights into their clinical significance in cancer. *Molecular Therapy-Oncolytics*, *17*, 562-570.

Körkoca, A., Bahşi, Ş. (2021). Gıda katkı maddeleri ve sağlık. *Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,* 1(1), 26-32.

Krishna, G., Hayashi, M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166.

Küçüköner, E. (2011). Helal Gıda Sertifikasyonunda Gıda Katkı Maddelerinin yeri, Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri. *1. Ulusal ve Sağlıklı Gıda Kongresi,* Ankara, ss. 13-17.

Küşümler, A. S. Özgün, D. (2020). Gıda katkı maddelerinin sağlık üzerine etkileri. *Sağlık ve Yaşam Bilimleri Dergisi*, *2*(1), 22-26.

Langie, S. A., Azqueta, A., Collins, A. R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6, 266.

Larsen, J. C. (2012). Artificial sweeteners: a brief review of their safety issues. *Nutrafoods.* 11:3-9.

Le, A. S., Murderrig, K. B. (2001). Sorbitol and Mannitol. (ed: L.O. Nabors), *Alternative Sweeteners*, New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 315-335.

Li, C. H., Wang, C. T., Lin, Y. J., Kuo, H. Y., Wu, J. S., Hong, T. C., Wu, H. T. (2022). Long-term consumption of the sugar substitute sorbitol alters gut microbiome and induces glucose intolerance in mice. *Life Sciences*, *305*, 120770.

Liang, J. (2022). Food Additives. *In Nutritional Toxicology*. Singapore: Springer Nature Singapore. pp. 167-180.

Lin, A. J., Zhang, X. H., Chen, M. M., and Qing, C. A. O. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*, 19(5), 596-602.

Linke, B. G., Casagrande, T. A., and Cardoso, L. I. A. (2018). Food additives and their health effects: a review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10): 306-310.

Lu, Y., Liu, Y., Yang, C. (2017). Evaluating *in vitro* DNA damage using comet assay. Journal of visualized experiments. *Journal of Visualized Experiments*, 128, 1-6.

Luan, Y., Honma, M. (2022). Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability and Disease*, *3*(1), 1-21.

Luetzow, M. (2003). Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective. *Toxicology Letters*, *140-141*, 419-425.

Mahato, D. K., Magriplis, E., Sharma, N., & Gamlath, S. (2024). Sugar reduction strategies in foods: sensory, nutritional and safety evaluation. *Frontiers in Nutrition*, *11*.

Mamur, S., (2022). Bölüm 2: Sitotoksisite Testleri. *Genetik Toksikoloji*, (Ünal, Fatma; Yüzbaşıoğlu, Deniz Editör). Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık. 31-55.

Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Bülbül, S. N., Ünal, F. (2022). Investigation of cyto-genotoxic effects of a food sweetener Acesulfame potassium. *Food and Health*, *8*(4), 273-283.

Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Aksoy, H. (2012). Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro*. *Cytotechnology*, *64*, 553-562.

Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. (2010). Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?. *Toxicology In vitro*, *24*(3), 790-794.

Mantere, T., Neveling, K., Pebrel-Richard, C., Benoist, M., van der Zande, G., Kater-Baats, E., Baatout, I., van Beek, R., Yammine, T., Oorsprong, M., Hsoumi, F., Olde-Weghuis, D., Majdali, W., Wermeulen, S., Pauper, M., Lebbar, A., Stevens-Kroef, M., Sanlaville, D., Dupont, J. M., Smeets, D., El Khattabi, L. (2021). Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection. *The American Journal of Human Genetics*, 108(8), 1409-1422.

Manuela Silva, M., Henrique Reboredo, F., Cebola Lidon, F. (2023). Sweetener food additives: a synoptical overview on their chemical properties, applications in food products and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture (EJFA)*, *35*(12).

Martins, F. C. O. L. Sentanin, M. A. ve De Souza, D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, *272*, 732-750.

Mateo-Fernández, M., González-Jiménez, M. J., Celestino, M. D. R., Font, R., Alonso-Moraga, Á., Merinas-Amo, T. (2022). Toxicological and Nutraceutical Screening Assays of Some Artificial Sweeteners. *Processes*, *10*(2), 410.

Miao, P., Chen, S., Li, J., Xie, X. (2020). Decreasing consumers' risk perception of food additives by knowledge enhancement in China. *Food Quality and Preference*, *79*, 103781.

Mishra, D. K., Dabbawala, A. A., Park, J. J., Jhung, S. H., Hwang, J. S. (2014). Selective hydrogenation of d-glucose to d-sorbitol over HY zeolite supported ruthenium nanoparticles catalysts. *Catalysis Today*, *232*, 99-107.

Miyoshi, M., Yoshihara, A., Mochizuki, S., Kato, S., Yoshida, H., Matsuo, T., & Akimitsu, K. (2023). Safety evaluation and maximum use level for transient ingestion in humans of allitol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *87*(10), 1193-1204.

Mohammadi, Z. S.S., Jafarzadeh. H., Bhandi, S., Patil, S. (2015). Genotoxicity of endodontic materials: a critical review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(8): 692-696.

Mohammed, F. F., Abdelrazik, E. G., Anwar, A., & Abdelgayed, S. S. (2024). Hepatic P53 upregulation and the genotoxic potential of acesulfame-K treatment in rats with a special emphasis on *in vitro* lymphocyte and macrophage activity testing. *Human and Experimental Toxicology*, *43*, doi: 09603271241236900.

Moriconi, E., Feraco, A., Marzolla, V., Infante, M., Lombardo, M., Fabbri, A., & Caprio, M. (2020). Neuroendocrine and metabolic effects of low-calorie and non-calorie sweeteners. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 525620.

Mortensen, A. (2006). Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50-3,104-116.

Mourelatos, D. (2016). Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 803, 1-12.

Munakata, S., Watanabe, T., Takahashi, T., Kimuro, S., Ishimori, K. and Hashizume, T. (2023). Development of a micronucleus test using the EpiAirway organotypic human airway model. *Genes and Environment*, 45(1), 14.

Muslu, M., Kermen, S. (2020). Çocuk ve adölesanlarda şeker ilaveli içeceklerin tüketimi ve sağlık üzerine etkileri. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *7*(2), 225-230.

Musto, G., Schiano, E., Iannuzzo, F., Tenore, G. C., Novellino, E., and Stornaiuolo, M. (2023). Genotoxicity assessment of nutraceuticals extracted from thinned nectarine (*Prunus persica* L.) and grape seed (*Vitis vinifera* L.) waste biomass. *Foods*, 12(6), 1171.

Mutlu, C., ve Erbaş, M. (2020). D-glikozdan D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi: bu bileşiklerin özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, 45 (1): 92-102.

Naik, R., Pradhan, S. R., Sobhana, P. P., & Shakappa, D. (2024). Examining the artificial sweeteners in commonly consumed beverages, chewing gums, chocolates, and mouthwashes using HPLC and TLC methodology. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 15(1).

Nayar, K. D., Sanan, S., Sethi, A., Miglani, S., Kant, G., Nayar, K. D. (2023). The role of genotoxicity in infertility and cancer development. *Fertility Science and Research*, 10(1), 9-14.

Nicolette, J. (2017). Genetic toxicology testing. *In a Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development.* (Faki, A.S. editor). ABD: Academic Press, 129-154.

OECD (2023), *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Parishttps://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm

Okus, F., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2024). Molecular docking study of frequently used food additives for selected targets depending on the chromosomal abnormalities they cause. *Toxicology*, 502, 153716.

Olinger, P. M., Pepper, T. (2001). Xylitol, (ed: O.L. Nabors), Alternative Sweeteners, New York: Mercel Dekker, Inc., 335-365.

Ostling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radi¬ation- induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.

Önder, H., Aydar, A. Y. (2022). Şekerleme üretiminde kullanılan hammaddeler ve fonksiyonel yumuşak şekerleme üretimi. *Aydın Gastronomy,* 6(1), 65-78.

Özdemir, H., Turhan, A. B., ve Arıkoğlu, H. (2012). Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodium nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması. *European Journal of Basic Medical Science*, 2(2): 34-40.

Özgen, I. Hazarhun, E. (2019). Investigation of e-coded food additives in food labels within the context of halal food. *Balıkesir University The Journal of Social Sciences Institute.* 22(41), 481-502.

Parajo, J. C., Dominguez, H. and Dominguez, J. M., (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65, 191-201.

Patra, J. K., Das, S. K., Das, G., Thatoi, H. (2019). Genotoxicity and toxicological studies. *A Practical Guide to Pharmacological Biotechnology*. Springer, Singapore, 55-75.

Payne, A. N., Chassard, C. and Lacroix, C. (2012). Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host–microbe interactions contributing to obesity. *International Association for the Study of Obesity*, 13, 799-809.

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

Perry, P., Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen–carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531), 121-12.

Peterson, N. (2024). List of sweeteners. *Diabetes*.

Phillips, D. H., Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. (Lunch, A. Editor). *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Switzerland: Birkhäuser Basel, 88- 110.

Pifferi, G. Restani, P. (2003). The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco, 58*(8), 541-550.

Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 207–219.

Purushothaman, A., Sufiya, P., Meenatchi, P., Sundaram, R., Saravanan, N. (2020). Antigenotoxic and antimutagenic effects of andrographis paniculata, a traditional medicinal herb against genotoxicity of cyclophosphamide: an *ın vitro* study on human peripheral lymphocytes. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(3), 246-253.

Quintana-Sosa, M., León-Mejía, G., Luna-Carrascal, J., Rodríguez, I. L., Acosta-Hoyos, A., Anaya-Romero, M., Henriques, J. A. P. (2021). Cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN-CYT) assay biomarkers and telomere length analysis in relation to inorganic elements in individuals exposed to welding fumes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 111935.

Registre, M., Proudlock, R. (2016). The *In Vitro* Chromosome Aberration Test. (Proudlock, R. Editor). *Genetic Toxicology Testing, USA: Academic Press*, 207-267.

Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y., Zhou, C. H. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 110.

Rezaei, M., Abadi, F. S., Sharifi, Z., Karimi, F., Alimohammadi, M., Roostaei, H. (2015). Assessment of synthetic dyes in food stuffs produced in confectioneries and restaurants in arak, Iran. *Thrita*, 4(1): e22776.

Rizk, R. M., Soliman, M. I., & Rashed, A. A. (2016). Potential mutagenicity of some artificial sweeteners using allium test. *Asian Journal of Advanced Basic Sciences*, 4(2), 27-40.

Robinson, D. I. (2010). Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: a review and perspective. *Organic Process Research and Development*, 14:946–959. doi: 10.1021/op900341a.

Rodriguez-Garraus, A., Azqueta, A., Vettorazzi, A., Lopez de Cerain, A. (2020). Genotoxicity of silver nanoparticles. *Nanomaterials*, 10(2), 251.

Salli, K., Lehtinen, M. J., Tiihonen, K., Ouwehand, A. C. (2019). Xylitol's health benefits beyond dental health: a comprehensive review. *Nutrients*, 11(8), 1813. doi:10.3390/nu11081813.

Saraiva, A., Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Raposo, A. (2020). Natural sweeteners: the relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 17*(17), 6285.

Schiano, C., Grimaldi, V., Scognamiglio, M., Costa, D., Soricelli, A., Nicoletti, G. F. and Napoli, C. (2021). Soft drinks and sweeteners intake: possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners?. *Food Research International*, 142, 110220.

Sezgin, A. C. Ayyıldız, S. (2017). Food additives: Colorants. *Science within Food: Up-to-Date Advances on Research and Educational Ideas*, 87- 94.

Sezgin, B. (2016). İşlenmiş gıdaların lezzetini değiştirmek için kullanılan bazı katkı maddelerinin eşzamanlı analizi. Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., ... & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515.

Singh, J., Rasane, P., Kaur, S., Kumar, V., Dhawan, K., Mahato, D. K., & Bhattacharya, J. (2020). Nutritional interventions and considerations for the development of low calorie or sugar free foods. *Current diabetes reviews*, *16*(4), 301-312.

Singh, N. P. (2016). The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* 767, 23-30.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B. (2018). Development of *in vitro* toxicology: a historic story. (Dhawan, A. and Kwon, S. Editor). *In Vitro Toxicology*. London: Academic Press, 1-19.

Siri, S. O., Martino, J., Gottifredi, V. (2021). Structural chromosome instability: types, origins, consequences, and therapeutic opportunities. *Cancers*, *13*(12), 3056.

Speit, G., Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.

Steiblen, G., van Benthem, J., & Johnson, G. (2020). Strategies in genotoxicology: acceptance of innovative scientific methods in a regulatory context and from an industrial perspective. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *853*, 503171.

Suez, J., Korem, T., Zeevil, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E. and Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), 181–186.

Suspiro, A., Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: A minireview. *Toxicology Letters*, 207(1), 42-52.

Swift, L. P., Castle, L., McHugh, P. J. (2020). Analysis of DNA interstrand cross-links and their repair by modified comet assay. *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, 79-88.

Şekeroğlu, Z. A., ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi, 4(3*), 221-229.

Şen, S., Beceren, A., Aksoy, H. (2018). The importance of genotoxicity tests in new drug development process. *Journal of Human Sciences*, *15*(3), 1634–1649.

Tang, C. S., Mars, M., James, J., & Appleton, K. M. (2024). Associations between attitudes towards and reported intakes of sugars, low/no-calorie sweeteners, and sweet-tasting foods in a UK sample. *Appetite*, *194*, 107169.

Tarboush, N. A., Almomani, D. H., Khabour, O. F., & Azzam, M. I. (2022). Genotoxicity of glyphosate on cultured human lymphocytes. *International Journal of Toxicology*, 41(2), 126-131.

Teysseire, F., Bordier, V., Beglinger, C., Wölnerhanssen, B. K., & Meyer-Gerspach, A. C. (2024). Metabolic effects of selected conventional and alternative sweeteners: a narrative review. *Nutrients*, *16*(5), 622.

Toğay, V. A., Sevimli, T. S., Sevimli, M., Çelik, D. A., Özçelik, N. (2018). DNA damage in rats with streptozotocin-induced diabetes; protective effect of silibinin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 825, 15-18.

Topçu, A. A. Yurttagül, M. Yücecan, S. (2005). Üniversite öğrencilerinin gıda katkı maddeleri ile ilgili bilgi ve davranışları. *Beslenme ve Diyet Dergisi, 33*(2), 39-50.

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

Tuenter, E., Creylman, J., Verheyen, G., Pieters, L., Van Miert, S. (2020). Development of a classification model for the antigenotoxic activity of flavonoids. *Bioorganic Chemistry*, 98, 1-7.

Tumini, E., Aguilera, A. (2021). The sister-chromatid exchange assay in human cells. (Aguilera, A. and Carreira, A. Editor). *Homologous Recombination*. New York: Humana Press, 383-393.

Tuncer, D. (2011). *Ksilitollü, sorbitollü, ksilitol-sorbitollü çikletlerin mine lezyonlarındaki remineralizasyona etkisinin ın situ olarak araştırılması.* Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Türkoğlu, Ş. (2022). Kromozom anormalliklerine dayalı genotoksik testler. (Akçay, M. E. Editör). *Matematik ve Fen Alanında Uluslararası Araştırmalar Vıı*, İstanbul: Eğitim Yayınevi, 169.

Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., Jacob, S. (2022). Xylitol: bioproduction and applications-a review. *Frontiers in Sustainability, 3*, 826190.

Uzen, R., Bayram, F., Dursun, H., Kardas, F., Altın-Celik, P., Cakir, M., Eken, A., Cucer, N. Donmez-Altuntas, H. (2023). Oxidative and chromosomal DNA damage in patients with type I Gaucher disease and carriers. *Clinical Biochemistry*, 111, 26-31.

Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. (2022). *Genetic Toxicology*. (Ünal, Fatma; Yüzbaşıoğlu, Deniz Editör). Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.

Ünal, F., Saygılı, Y., Akbaş, E. (2022). Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. (Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 313-340.

Üstüner, D. (2011). Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz bağlantısı. *TÜBAV Bilim Dergisi*, *4*(1), 64-69.

van Gulik, A. L., Sluydts, E., Vervoort, L., Kockx, M., Kortman, P., Ylstra, B., Finn, S. P., Bubendorf, L., Bahce, I., Sie, D., Radonic, T., Lissenberg-Witte, B. and Thunnissen, E. (2023). False positivity in break apart fluorescence *in-situ* hybridization due to polyploidy. *Translational Lung Cancer Research (TLCR)*, 12(4), 676-688.

Velickova, N., Milev, M. (2020). Genotoxicity test methods - a tool for DNA and chromosome damage biomonitoring. *Serbian Archives of Medicine*, 148(9-10), 626-630.

Wennerholm, K., Arends, J., Birkhed, D., Ruben, J., Emilson, C.G., Dijkman, A.G. (1994) Effect of xylitol and sorbitol in chewing-gums on mutans streptococci, plaque pH and mineral loss of enamel. *Karger Caries Research,* 28 (1), 48-54.

Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., Liu, G. (2022). Food additives: from functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(30), 8497-8517.

Xue, Y., Zhao, G., Qiao, L., Lu, J., Yu, B. and Wang, T. (2020). Sequencing shorter cfDNA fragments decreases the false negative rate of non-invasive prenatal testing. *Frontiers in Genetics*, 11, 280.

Yahaya, T. O., Oladele, E. O., Anyebe, D., Obi, C., Bunza, M. D. A., Sulaiman, R., Liman, U. U. (2021). Chromosomal abnormalities predisposing to infertility, testing, and management: a narrative review. *Bulletin of the National Research Centre*, *45*(1), 1-15.

Yılmaz, N. (2007). Yapay tatlandırıcılar ve gıda sanayiinde kullanımları. Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Yiğit, M. F., Uçar, M. (2023). Gıda Katkı Maddeleri. H. Baygut. (Editör). *Sağlık & Bilim 2023: Beslenme-I*. Birinci Baskı. İstanbul: Efe Akademi Yayınları. 157.

Yörük, N.G., Danyer, E. (2016). Gıda katkı maddeleri genel bilgiler ve tanımlar. *Turkey Clinics Food Sciences-Special Topics*, 2(2),1-10.

Yuzbasioglu, D., Dilek, U. K., Erikel, E. and Unal, F. (2023). Antigenotoxic effect of hyperoside against Mitomycin C and hydrogen peroxide-induced genotoxic damage on human lymphocytes. *Toxicology In Vitro*, *90*, 105604.

Yüzbaşıoğlu D., Avuloğlu-Yılmaz, E. (2022). Mikronukleus Testi. (Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 219-249.

Yüzbaşıoğlu, D., Enguzel-Alperen, C., Ünal, F. (2018). Investigation of *in vitro* genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 245-241.

Yüzbaşıoğlu, D., Mahmoud, J. H., Mamur, S., Ünal, F. (2022). Cytogenetic effects of antidiabetic drug metformin. *Drug and Chemical Toxicology*, *45*(2), 955-962.

Yüzbaşıoğlu, D., Mamur, S., Yılmaz, E., Erikel, E., Çelebi Keskin, A., Ünal, F. (2021). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870, 503391.

Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, E. A., Fatma, Ü. (2016). Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *TÜBAV Bilim Dergisi*, *9*(1), 17-28.

Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *The Journal of Food*, 39(3), 179-186.

Zacharis, C. (2012). Xylitol. In K. O'Donnell, M.W. Kearsley (Eds) Sweeteners and sugar alternatives in food technology (p. 331–346). Chichester: Wiley- Blackwell.

Zahra, N., Nisa, A., Kalim, I., Fatima, S., Khan, H., Akhlaq, F., Butt, İ. F., Hina, S. (2016). Identification of synthetic food dyes in various candies. *Pakistan Journal Biochemistry Moleculer Biology.* 49(1): 09-17.

Zheng, S., Chang, W., Xu, W., Xu, Y., Lin, F. (2019). e-Sweet: a machine-learning based platform for the prediction of sweetener and its relative sweetness. *Frontiers in Chemistry*, *7*, 35.

Zumbe, A., Lee, A., Storey, D., (2001). Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. *British Journal of Nutrition*, 85, 31-45.



Gazili olmak ayrıcalıktır