

GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN SİTRİK ASİT, ASKORBİK ASİT VE SODYUM SİTRATIN İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİNDE GENOTOKSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GENOTOXICITY EVALUATION OF CITRIC ACID, ASCORBIC ACID AND SODIUM CITRATE USED AS FOOD ADDITIVES IN HUMAN LYMPHOCYTES

Dilek AŞCI ÇELİK¹, Vehbi Atahan TOĞAY¹, Gülçin YAVUZ TÜREL¹, Nurten ÖZÇELİK¹

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

Cite this article as: Aşci Çelik D, Toğay VA, Yavuz Türel G, Özçelik N. Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sitrik Asit, Askorbik Asit ve Sodyum Sitratın İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksitesinin Değerlendirilmesi. Med J SDU 2022; 29(3): 486-492.

Öz

Amaç

Gıda katkı maddelerinin kullanımı endüstriyel gelişmeyle birlikte sürekli artmaktadır. Bu çalışmada sık kullanılan sitrik asit, askorbik asit ve sodyum sitratın insan lenfosit hücrelerinde DNA üzerine olan etkilerinin comet metodu ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Herhangi bir bilinen hastalığı ya da sürekli ilaç kullanımı olmayan, son 6 ayda radyolojik muayene geçirmemiş ve sigara içmeyen 18 – 45 yaş aralığında 4 erkek ve 4 kadın gönüllüden kan alınmış ve lenfositler izole edilerek 50, 150, 300 ve 600 µg/mL dozlarında sitrik asit, askorbik asit ve sodyum sitrat ile 1 s inkübasyona bırakılmıştır. Ardından comet metodu uygulanmış ve kuyruk DNA yüzdesi parametresi DNA hasarının göstergesi olarak Tek-yönlü Anova ile değerlendirilmiştir.

Bulgular

Sodyum sitrat 300 ve 600 µg/mL dozlarında DNA hasarında kontrol grubuna kıyasla sınırlı artış görülmektedir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir

($p>0,05$). Sitrik asit 600 µg/mL dozu ise kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek DNA hasarına sebep olmuştur ($p<0,001$). Aynı oranda doz uygulanan askorbik asit ve sodyum sitrat ile karşılaştırıldığında da yüksek DNA hasarına sebep olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Diğer gruplarda DNA hasarında anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Sonuç

Çalışma sonucunda, denenen dozlarda askorbik asitin herhangi bir DNA hasarına sebep olmadığı, sitrik asitin yüksek dozlarda DNA hasarına sebep olduğu ve sodyum sitratın ise yüksek dozlarda DNA hasarına sebep olabileceği tespit edilmiştir. Bazı katkı maddeleri her ne kadar antioksidan olarak sınıflandırılrsa da, yüksek dozlarda DNA hasarına sebep olabilir. Dolayısıyla bu katkı maddelerini içeren gıdaların tüketiminde bilinçli ve kontrollü olunması gerekmektedir. Ancak kesin bir yargıya varmadan önce gıda katkı maddeleri ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Comet Metodu, DNA Hasarı, E300, E330, E331

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: D.A.Ç. / dilekasci@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 17.08.2022 • Kabul tarihi/Accepted Date: 02.09.2022

ORCID IDs of the authors: D.A.Ç: 0000-0002-2914-4695; V.A.T: 0000-0003-4722-3845;

G.Y.T: 0000-0001-9481-4475; N.Ö: 0000-0003-2326-6090

Abstract

Objective

The use of food additives is constantly increasing with industrial development. In this study, we aimed to determine the effects of commonly used citric acid, ascorbic acid, and sodium citrate on DNA in human lymphocytes by the comet assay.

Material and Method

Blood samples were collected from 4 male and 4 female volunteers, aged 18 to 45 years, who had no known disease or continuous drug use, had not undergone radiological examination in the past 6 months, and were nonsmokers. Lymphocytes were isolated and incubated for 1 h with citric acid, ascorbic acid, and sodium citrate at doses of 50, 150, 300, and 600 µg/mL. Subsequently, the Comet assay was applied and the tail DNA percentage was evaluated as evidence of DNA damage using One-way Anova.

Results

A limited increase in DNA damage was observed at sodium citrate doses of 300 and 600 µg/ml compared

to the control group. This increase was not statistically significant ($p>0.05$). The dose of 600 µg/mL citric acid caused significantly higher DNA damage compared to the control group ($p<0.001$). Likewise, when compared to the same dose of ascorbic acid and sodium citrate, dose of 600 µg/mL citric acid caused significantly higher DNA damage ($p<0.001$). No significant change in DNA damage was observed in any other groups.

Conclusion

As a result, it was found that ascorbic acid did not cause DNA damage at all doses, citric acid caused DNA damage at high doses, and sodium citrate might cause DNA damage at high doses. Although some additives are classified as antioxidants, they may cause DNA damage at high doses. Therefore, it is necessary to be aware and controlled when consuming foods containing these additives. However, more detailed studies on food additives are needed before a definitive conclusion can be drawn.

Keywords: Comet Assay, DNA Damage, E300, E330, E331

Giriş

Gıda katkı maddeleri ilk zamanlarda sadece gıdanın bozulmasını önlemek için kullanılmıştır. Daha sonraları ise gıdanın üretilmesi, işlenmesi, paketlenmesi ve depolanması (1) sırasında tadını, kokusunu, görünümünü, yapısını ve mikrobiyolojik güvenliğini sağlamak için uygulanmaya başlanmış olan doğal, yarı sentetik, sentetik veya biyoteknolojik ürünler haline gelmiştir (1-3). Endüstriyel gelişmeyle birlikte kullanımları artmakta (2) ve insanlar tüketilen birçok gıdada katkı maddelerine maruz kalmaktadır (3, 4).

Avrupa Birliği gıda katkı maddelerini gıdalardaki işlevlerine göre 26 işlevsel sınıfa ayırırken, Amerika Birleşik Devletleri koruyucular, besin katkı maddeleri, renklendirici maddeler, tatlandırıcılar, tekstüre edici maddeler ve diğer maddeler olmak üzere 6 gruba ayırmıştır. Koruyucular grubu antimikrobialer, antioksidanlar ve kararmayı önleyici ajanlardan oluşmakta ve E numaraları E200 ile E399 arasında değişmektedir (1).

Sitrik asit (SA, E330), alkolsüz içecekler, jöle, fırınlanmış besinler, reçel, marmelat, peynir ve peynir ürünleri, konserve sebze ve meyve gibi gıda ve içecek endüstrisinde asit düzenleyici, lezzet artırıcı, koruyucu

ve antioksidan sinerjisti olarak yaygın kullanılan bir gıda katkı maddesidir (4-6).

Askorbik asit (ASA, E300) antioksidan ve stabilize edici özelliğe sahip olup gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ASA'nın diğer elementleri ve temel beslenme faktörlerini oluşturma yeteneği ve güçlü antioksidan aktivitesi, bu maddenin farklı gıda ürünlerinde kullanımına neden olmuştur. ASA bazlı katkı maddeleri, alkollü içecekler, reçel, şekerleme, ekmek ve unlu mamuller, meyve suları, et ve balık ürünleri gibi birçok gıdanın üretim ve dönüşüm aşamalarında kullanılmaktadır (7).

Sodyum sitrat (SS, E331), genellikle tatlandırıcı veya koruyucu olarak kullanılan hem ekşi hem de tuzlu tatlar verebilen, alkolsüz içeceklerde, reçel, jöle, et ürünleri, bebek maması ve süt tozunda kullanılan gıda katkı maddesidir (5, 8, 9).

Modern gıda teknolojisi ile kullanımları son derece artan bu maddelerin insan sağlığına olumsuz etkileri de olabilmektedir (10). Bazı katkı maddelerinin zararlı etkilere sahip olduğu gösterilmiş olsa da düşük uygulama konsantrasyonları gerekçe gösterilerek halen kullanılmaktadır (2) ve tüketici sağlığı üzerindeki dolaylı veya doğrudan etkileri sebebiyle hala önemli

bir araştırma konusudur (1, 11, 12). Genotoksisite, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, hiperaktivite, alerji, diyabet, obezite, üreme ve gastrointestinal sistem bozuklukları gibi hastalıkların oluşum mekanizmalarında rol aldıkları düşünülmektedir (13-15). Farklı model organizmalarda ve dokularda, genotoksik ve kanserojen olabilecek etkiler de gösterilmiştir (3, 5, 13, 15-18). Bazılarının toksisiteye sahip olduğu belirlenerek kullanımları kısıtlanmış ya da yasaklanmıştır (13). Bazılarının ise düşük toksisiteye neden olduğu belirtilse de düşük konsantrasyonlarda bile genotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (13). Dolayısı ile her gıda katkı maddesinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı dokularda toksisitesinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

Genotoksinler, DNA'nın yapısını doğrudan, hücre bölünmesi sırasında veya DNA'daki çeşitli kimyasal grupların modifikasyonlarıyla değiştirebilmektedir (19). DNA'daki modifikasyonlar tespit edilmeden nesilden nesile aktarılabilen ve sonradan ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, günümüzde bu tür maddelerin genotoksik potansiyelinin izlenmesi oldukça önemlidir (19).

In vivo ve in vitro çalışmalar bazı gıda katkı maddelerinin DNA hasarını indükleyebildiğini göstermektedir (3, 16, 18-22). DNA hasarı, hücre ve organizma için potansiyel olarak tehlike oluşturmakta, hücre ölümüne yol açabilmekte veya karsinogenezin başlamasına neden olabilmektedir. Dolayısı ile DNA hasarı, tanımlanmış bir ajanın riski değerlendirileceğinde en önemli belirteçlerden biridir (2). İnsan hücrelerinde indüklenen genotoksisitenin değerlendirilmesinde çeşitli analizler olmasına karşın, "tek hücre jel elektroforezi" veya daha yaygın adı ile "comet metodu", hassas ve hızlı sonuç verebilen, uygulanabilirliği kolay ve aynı zamanda düşük maliyetli olması nedeniyle DNA hasar tespitinde sık kullanılan ve önerilen bir yöntem haline gelmiştir (2, 11, 18). Ayrıca, diğer tekniklerin birçoğunun uygulanabilirliği zor, pahalı ve çok sayıda hücreye ihtiyaç duymaktadır (2).

Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, bu çalışmada yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinden SA, ASA ve SS'nin insan lenfosit hücrelerinde DNA üzerindeki etkisinin Comet metodu ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Dizaynı

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (13.02.2019 tarih ve 29 sayılı karar). Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüş

ve gönüllü katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Gönüllüler için katı dışlama kriterleri uygulanmış ve çalışmada herhangi bir bilinen hastalığı ya da sürekli ilaç kullanımı olmayan, son 6 ayda radyolojik muayene geçirmemiş ve sigara içmeyen 18 – 45 yaş aralığında 4 erkek ve 4 kadın yer almıştır. Gönüllülerden 10 mL kan alınmış ve çalışma dizaynında yer alan 14 grup için de tüm katılımcıların kanları ayrı ayrı kullanılmıştır (Tablo 1). Uygulanan dozlar literatür taraması sonucunda daha önceki çalışmalar ile uyumlu olarak seçilmiştir (4, 10, 20).

Çalışma için sitrik asit (E330, SA, CAS No: 77-92-9), askorbik asit (E300, ASA, CAS No: 50-81-7) ve sodyum sitrat (E331, SS, CAS No: 68-04-2) Sigma (St. Louis, MO, US)'dan yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

Comet Metodunun Uygulanması

Comet metodu, OECD In Vivo Memeli Alkalin Comet Metodu Uygulama Kılavuzuna (23) uygun olarak küçük değişikliklerle yürütülmüştür. Kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Merck (Darmstadt, Almanya) veya Sigma (St. Louis, MO, US) firmalarından yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

Kanların heparinize tüplere alınmasının ardından hemen comet prosedürüne geçilmiştir. Lenfositlerin ayrılması için kanlar 1:1 oranında histopak-1077 ile karıştırılmış ve 2000 RPM'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Ayrılan lenfositler ayrı bir tüpe alındıktan sonra PBS ile 1:1 oranında 2500 RPM'de 10 dk tekrar santrifüj edilmiştir. SA, ASA ve SS ayrı bir tüpte Tablo 1'de görülen 4 farklı dozda direkt lenfositlere uygulanmış ve 37 °C'de 1 s inkübe edilmiştir. Hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrol ve 50 µM 5 dk H₂O₂ uygulaması yapılan pozitif kontrol grupları da karşılaştırma için kullanılmıştır. Uygulamaların sonrasında lenfositler PBS ile yıkanmış ve tüm örnekler 37 °C'de 1 s daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 µL hücre süspansiyonu 100 µL % 0,7'lik düşük erime noktalı agaroz (LMA, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile karıştırılmış ve daha önceden % 1'lik normal erime noktalı agaroz (NMA, Serva Electrophoresis, Almanya) ile kaplanmış lamlara yayılmış ve lameller kapatılmıştır. Agaroz jel katılaştıktan sonra lameller çekilmiş ve lamlar taze olarak hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (pH: 10, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) karanlıkta ve +4 °C'de 90 dk bekletilmiştir. Ardından elektroforez aşamasına geçilmiştir. Lizis solüsyonundan dikkatlice çıkarılan lamlar buz soğukluğunda ve taze hazırlanmış elektroforez solüsyonunda (pH: 13, 300 M NaOH, 1 mM EDTA) karanlıkta ve +4 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 25 V (1,02 V/cm) ve +4 °C'de 25

Tablo 1

Çalışmada yer alan gruplar. Grup 1: Kontrol; Grup 2-5: Sitrik Asit uygulanmış lenfositler; Grup 6-9: Askorbik Asit uygulanmış lenfositler; Grup 10-13: Sodyum Sitrat uygulanmış lenfositler

Gruplar	N	Uygulama	Doz
1	8	Yok (Negatif Kontrol)	-
2	8	Sitrik Asit (E330)	50 µg/mL
3	8	Sitrik Asit (E330)	150 µg/mL
4	8	Sitrik Asit (E330)	300 µg/mL
5	8	Sitrik Asit (E330)	600 µg/mL
6	8	Askorbik Asit (E300)	50 µg/mL
7	8	Askorbik Asit (E300)	150 µg/mL
8	8	Askorbik Asit (E300)	300 µg/mL
9	8	Askorbik Asit (E300)	600 µg/mL
10	8	Sodyum Sitrat (E331)	50 µg/mL
11	8	Sodyum Sitrat (E331)	150 µg/mL
12	8	Sodyum Sitrat (E331)	300 µg/mL
13	8	Sodyum Sitrat (E331)	600 µg/mL
14	8	H ₂ O ₂ (Pozitif Kontrol)	50 µM/mL

dk elektroforez işlemi uygulanmıştır. 25 dk sonunda elektroforez tankından dikkatlice çıkarılan lamalar nötralizasyon solüsyonu ile 3 kez 5 dk yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sürecinin ardından örnekler preparat başına 20 µL etidyum bromür ile boyanmış ve karanlık odada floresan mikroskop (Zeiss Imager A1) altında görüntülenmiştir. Her grup için 2 adet preparat hazırlanmış ve preparat başına 50 hücrenin fotoğrafı rastgele çekilmiştir (Zeiss Axiocam Icc 1). Fotoğraflar OpenComet (24) programı aracılığı ile DNA hasarının tespit edilebilmesi için analiz edilmiştir. Kuyruk DNA yüzdesi (TDNAP) parametresi DNA hasarının göstergesi olarak seçilmiştir.

İstatistik Analiz

Hücrelerin TDNAP değerleri SPSS v20 (25) programında Tek – yönlü Anova testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuş ve p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur. Katkı maddeleri, kendi içinde farklı dozları, kontrol grupları ve aynı doza sahip farklı gıda katkı maddeleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre bazı karşılaştırmalar için anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Pozitif kontrol grubu

beklediği gibi tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek DNA hasarına sebep olmuştur (p<0,001). Farklı gıda katkıları ise doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur. ASA (Grup 6 – 9), doz bağımsız şekilde kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır (p>0,05). ASA dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

SS'de (Grup 10 – 13) 50 ve 150 µg/mL dozlarında DNA hasarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmamıştır (p>0,05). Ancak 300 ve 600 µg/mL dozlarında DNA hasarında kontrol grubuna kıyasla sınırlı artış görülmektedir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05). SS dozları da kendi aralarında karşılaştırıldığında DNA hasarında değişime gözlenirse de anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

SA dozlarında (Grup 2 – 5) ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Grup 2, 3 ve 4 kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır (p>0,05). Ancak 600 µg/mL SA dozu uygulanan grup 5 kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek DNA hasarına sebep olmuştur (p < 0,001). Benzer şekilde diğer SA grupları ile kıyaslandığında da yüksek DNA hasarına sebep olmuştur (p < 0,001). Grup 5, aynı oranda doz uygulanan grup 9 (600 µg/mL ASA) ve grup 13 (600 µg/mL SS) ile karşılaştırıldığında da yüksek

Tablo 2

Ortalama "kuyruk DNA yüzdesi" değerleri ve istatistiksel anlamlılık seviyeleri

Gruplar	Ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi (Ortalama ± Standart Sapma)
1 (Kontrol)	2.07±2.20
2 (Sitrik Asit, 50 µg/mL)	0.94±0.95
3 (Sitrik Asit, 150 µg/mL)	0.96±0.90
4 (Sitrik Asit, 300 µg/mL)	0.93±0.71
5 (Sitrik Asit, 600 µg/mL)	11.65±11.59 ^{*,**, #}
6 (Askorbik Asit, 50 µg/mL)	0.96±1.48
7 (Askorbik Asit, 150 µg/mL)	1.29±1.56
8 (Askorbik Asit, 300 µg/mL)	0.89±0.97
9 (Askorbik Asit, 600 µg/mL)	0.95±1.36
10 (Sodyum Sitrat, 50 µg/mL)	1.20±2.59
11 (Sodyum Sitrat, 150 µg/mL)	0.90±0.91
12 (Sodyum Sitrat, 300 µg/mL)	3.53±5.19
13 (Sodyum Sitrat, 600 µg/mL)	2.88±3.61
14 (H ₂ O ₂ 50 µL)	22.50±10.83 ^{##}

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p < 0.001);

** Grup 2, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p < 0.001);

Grup 9 ve 13 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p < 0.001);

Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p < 0.001);

Her grup için 2 adet preparat hazırlanmış ve preparat başına 50 hücrenin fotoğrafı rastgele çekilmiştir

DNA hasarına sebep olmuştur (p < 0,001). Buna göre yüksek doz SA uygulaması insan lenfositlerinde DNA hasarına sebep olmuştur.

Tartışma

İnsan periferik kan lenfositleri (KL), DNA hasarını tespit etmek için oldukça sık kullanılmaktadır. Tüm dokuları dolaşması ve uzun ömürlü olması nedeniyle tercih edilmektedir. Her 1 mL kanda 1–3x10⁶ lenfosit bulunmaktadır ve bireylerden düşük maliyetle kolayca tekrar elde edilebilir (26). Bu sebeple çalışmamızda DNA hasarının değerlendirilmesi için lenfositler tercih edilmiştir.

KL'de SA'nın 24 ve 48 s süreyle 50, 100, 200 ve 3000 µg/mL konsantrasyonlarda genotoksik etkileri değerlendirilmiş ve kromozomal aberasyonlarda (KA) önemli bir artışa neden olduğu belirtilmiştir. SA, 24 s 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında ve 48 s tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi azaltırken, kardeş kromatid değişimini (SCE) ve mikronükleus (MN) sıklığını da arttırmıştır (4). Çalışmamızda SA 50 – 300 µg/mL dozlarında DNA hasarına sebep olmamıştır. 600 µg/mL do-

zunda ise kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek DNA hasarına sebep olmuştur. Bu araştırma ve çalışmamız arasında ortaya çıkan farklılıklar Yılmaz vd. (2008)'de uygulanan uzun inkübasyon süreleri ile bağlantılı olabilir.

SA, fosforik asit (PA) ve bunların kombinasyonları ile benzoik asit (BA) ve kalsiyum propiyonat (CP) gibi antimikrobiyal katkı maddelerinin etkisi KL'de comet testi ile değerlendirilmiştir. SA, PA, BA ve CP sırasıyla 200, 25-200, 50-500, 50-1000 µg/mL 1 s in vitro maruziyet sonrası DNA hasarında artışa neden olmuştur. Sonuç olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin konsantrasyonlarının DNA hasarını indüklediği ve genotoksik etkinin en fazla PA'da ve en az da SA'da olduğu belirtilmiştir (27). Bir diğer çalışmada lenfositler sodyum asetat (50, 100 ve 200 mM), sodyum asit pirofosfat (25, 50 ve 100 mM/L) ve SA (100, 200 ve 300 µg/mL) için belirlenen konsantrasyonlar ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığında ve proliferasyonda konsantrasyona bağlı azalma gözlemlenirken comet testi ile doza bağlı olarak DNA hasarında artış olduğu tespit edilmiştir (20). İnsan sperm hücreleri SA, BA, brilliant blue (BB)

ve sunset yellow (SY) ile 50, 100, 200 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda 1 saat 32°C'de inkübe edilmiş ve DNA hasarı comet metodu ile değerlendirilmiştir. SA, BA, BB ve SY'nin sperm hücrelerinde doza bağlı olarak DNA hasarında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Kontrol hücrelerine göre DNA hasarında en yüksek artışa SY'nin neden olduğu ve ardından sırası ile BB, BA ve SA'nın sebep olduğu bildirilmiştir (10). Bu çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da SA doza bağlı olarak DNA hasarında artışa sebep olmuştur.

Her ne kadar SS ve ASA'nın genotoksitesinin KL'de değerlendirilmesi için yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlı olsa da benzer amaçlarla kullanılan diğer gıda katkı maddeleri KL'de DNA hasarı açısından tartışılmıştır. 100, 200, 400 ve 800 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanan sodyum sorbatın tüm konsantrasyonlarda DNA hasarına neden olduğu ve en yüksek konsantrasyonlarda KL için genotoksik olduğu bildirilmiştir (21). Aroma maddesi olarak kullanılan benzil türevlerinin (benzil alkol, benzil asetat, benzoik asit ve benzaldehit) genotoksitesitesi KL'de comet testi ile değerlendirilmiştir. Benzil alkol 25 ve 50 mM, benzil asetat 50 mM, benzaldehit 10 ve 25 mM, benzoik asit 5 mM konsantrasyonlarda DNA hasarına neden olmuştur (11). BA, potasyum sorbat (PS), klorofil, tartrazin ve bütillenmiş hidroksianisolün (BHA) hematolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve genotoksik olarak değerlendirilmiş ve BHA dışında diğer katkı maddelerinin DNA hasarına neden olduğu comet metodu ile gösterilmiştir (18). Marmur ve ark. (2010), PS'nin 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik dozlarının lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkisini MN, SCE ve comet metodu ile incelemiştir. PS'nin 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarının KA frekansını önemli derecede arttırdığı; 250, 500, 1000 µg/mL'lik dozlarının 24 s uygulamada ve 125, 250, 500, 1000 µg/mL'lik dozlarının 48 s uygulamada SCE frekansını önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca comet testi ile PS'nin tüm dozlarda DNA hasarını arttırdığı da gösterilmiştir (28). Sodyum benzoatın (SB) 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ve potasyum benzoatın 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarda genotoksik etkisi kültüre edilmiş KL hücrelerinde KA, SCE, MN ve comet testlerini kullanılarak değerlendirilmiş ve bütün uygulama dozlarında kontrol gruplarına göre KA, SCE ve MN frekansında önemli bir artış olduğu ve mitotik indeksi düşürdüğü belirtilmiştir (29). Potasyum bromatın (PB) KL'de genotoksik etkileri SCE, KA ve MN ile in vitro olarak araştırılmıştır. KL hücreleri 24 ve 48 s boyunca 400, 450, 500, 550 µg/ml PB ile muamele edilmiştir. SCE sıklığında tüm doz ve sürelerde artış tespit edilmesine karşın yalnızca 48 s uygulamada istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir. KA da 24 ve 48 saat uygulama sonrası anlamlı artış tespit edilmiştir. PB hücre

proliferasyon ve mitotik indekslerini de azaltmıştır. MN oluşumu 24 saat maruziyet sonrası doza bağlı olarak indüklenirken, 500 ve 550 µg/mL dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 48 s uygulama sonrası ise tüm dozlarda anlamlı artış bulunmuştur (30).

Sonuç

Çalışma sonucunda, denenen dozlarda ASA'nın herhangi bir DNA hasarına sebep olmadığı, SA'nın yüksek dozlarda DNA hasarına sebep olduğu ve SS'nin ise yüksek dozlarda DNA hasarına sebep olabileceği tespit edilmiştir. Bazı katkı maddeleri her ne kadar antioksidan olarak sınıflandırılrsa da DNA hasarına sebep olabilir. Dolayısı ile bu katkı maddelerini içeren gıdaların tüketiminde bilinçli ve kontrollü olunması gerekmektedir. Tükettiğimiz birçok gıdada bulunan katkı maddelerinin sürekli ve uzun süreli tüketimleri sonucunda kümülatif etkiler oluşturabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak kesin yargılara varmadan önce gıda katkı maddeleri ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (13.02.2019 tarih ve 29 sayılı karar). Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüştür.

Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Tüm veriler makalede mevcuttur.

Yazar Katkıları

DAÇ: Çalışmanın planlanması; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Makalenin Yazımı.

VAT: Çalışmanın planlanması; Formal Analizler; Makalenin düzenlenmesi.

GYT: Araştırma; Makalenin düzenlenmesi

NÖ: Kaynakların Sağlanması; Denetim; Makalenin düzenlenmesi

Kaynaklar

- Carocho M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira IC. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2014;13(4):377-99.
- Peycheva E, Alexandrova R, Miloshev G. Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;59(1):510-7.
- Abd-Elhakim YM, Hashem MM, Anwar A, El-Metwally AE, Abo-El-Sooud K, Moustafa GG, et al. Effects of the food additives sodium acid pyrophosphate, sodium acetate, and citric acid on hemato-immunological pathological biomarkers in rats: Relation to PPAR- α , PPAR- γ and tnfr α signaling pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;62:98-106.
- Yılmaz S, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D, Aksoy H. Clastogenic effects of food additive citric acid in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*. 2008;56(2):137-44.
- Türkoğlu Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007;626(1):4-14.
- Chen X, Lv Q, Liu Y, Deng W. Effects of the food additive, citric acid, on kidney cells of mice. *Biotechnic & Histochemistry*. 2015;90(1):38-44.
- Varvara M, Bozzo G, Celano G, Disanto C, Pagliarone CN, Celano GV. The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian journal of food safety*. 2016;5(1).
- Sammel L, Claus J, Greaser M, Richards M. Investigation of mechanisms by which sodium citrate reduces the pink color defect in cooked ground turkey. *Meat science*. 2006;72(4):585-95.
- Lenzi LJ, Lucchesi PM, Medico L, Burgán J, Krüger A. Effect of the food additives sodium citrate and disodium phosphate on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and production of stx-phages and Shiga toxin. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:992.
- Pandır D. DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*. 2016;68(4):725-33.
- Demir E, Kocaoğlu S, Kaya B. Assessment of genotoxic effects of benzyl derivatives by the comet assay. *Food and chemical toxicology*. 2010;48(5):1239-42.
- Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 2013;51:15-25.
- Dosay-Akbulut M. Determination of DNA Damage Caused by Food Additives Using Comet Assay Method: Food Additives DNA damage via comet assay. *Progress in Nutrition*. 2021;22(4):e2020071.
- Raya SA, Aboul-Enein AM, El-Nikeety MM, Mohamed RS, Abdelwahid WM. In Vivo comet assay of food additives' combinations and their effects on biochemical parameters in albino rats. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2020;24:9170-83.
- Ali MY, Hassan GM, Hassan AMS, Mohamed ZA, Ramadan MF. In vivo genotoxicity assessment of sunset yellow and sodium benzoate in female rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020;43(5):504-13.
- Shimada C, Kano K, Sasaki YF, Sato I, Tsudua S. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *The Journal of toxicological sciences*. 2010;35(4):547-54.
- Dorier M, Béal D, Marie-Desvergne C, Dubosson M, Barreau F, Houdeau E, et al. Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology*. 2017;11(6):751-61.
- Abo-EL-Sooud K, Hashem MM, Badr YA, Eleiwa MM, Gab-Alaha AQ, Abd-Elhakim YM, et al. Assessment of hepato-renal damage and genotoxicity induced by long-term exposure to five permitted food additives in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(26):26341-50.
- Mpountoukas P, Vantarakis A, Sivridis E, Lialiaris T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(7):2390-3.
- Abd-Elhakim YM, Anwar A, Hashem MM, Moustafa GG, Abo-El-Sooud K. Sodium acetate, sodium acid pyrophosphate, and citric acid impacts on isolated peripheral lymphocyte viability, proliferation, and DNA damage. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2018;32(8):e22171.
- Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Aksoy H. Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*. 2012;64(5):553-62.
- Ataseven N, Yüzbaşıoğlu D, Keskin AÇ, Ünal F. Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;91:8-18.
- OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris: OECD Publishing; 2016.
- Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan P, Hsu D, Clement M-V. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox biology*. 2014;2:457-65.
- IBMCorp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.; 2011.
- Lerda D, Biaggi Bistoni M, Peralta N, Ychari S, Vazquez M, Bosio G. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2005;43(5):691-8.
- Yılmaz S, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D, Celik M. DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. *Toxicology and Industrial Health*. 2014;30(10):926-37.
- Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in vitro*. 2010;24(3):790-4.
- Zengin N, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S, Aksoy H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(4):763-9.
- Kaya FF, Topaktaş M. Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007;626(1-2):48-52.