



**YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU VE FRUKTOZUN *IN VITRO*
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Sabire Nur BÜLBÜL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2021

ETİK BEYAN

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

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

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

Sabire Nur BÜLBÜL

29/12/2021

YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU VE FRUKTOZUN *IN VITRO* SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sabire Nur BÜLBÜL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Bu çalışmada, gıdalarda tatlandırıcı olarak sıklıkla tercih edilen Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (YFMS) ve Fruktoz'un (FR) insan karaciğer karsinoma HepG2 hücre hatlarında olası sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile insan periferik kan lenfositlerinde olası genotoksik etkileri Kromozomal anormallik (KA), Kardeş kromatit değişimi (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet testi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu tatlandırıcı maddelerin mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. YFMS'nun (% 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30) ve FR'un (62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL'lik) altı farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. YFMS, % 5 (48 h hariç) ile % 30 arasındaki konsantrasyonlarda HepG2 hücre hattında hücre canlılığını önemli ölçüde ve konsantrasyona bağlı olarak azaltmıştır. FR'un HepG2 hücrelerinde 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda tüm konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. YFMS'nun % 30 konsantrasyonunun insan lenfositlerinde toksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca YFMS her iki uygulama süresinde en yüksek iki konsantrasyonda (% 15 ve 20) KA frekansını önemli ölçüde artırmıştır. FR ise sadece 48 saat uygulamada 250, 1000 ve 2000 konsantrasyonlarında KA frekansını önemli düzeyde artırmıştır. Her iki tatlandırıcı tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını anlamlı oranda yükseltmiştir. YFMS (% 15 ve 20) ve FR (250, 1000 ve 2000 µg/mL) yüksek konsantrasyonlarda MN frekansında artışa neden olmuştur. YFMS ve FR'un tüm uygulamalarında Mİ azalmış olup bu azalış sadece yüksek konsantrasyonlarda önemlidir. Ancak Rİ ve NBİ'inde değişikliğe neden olmamışlardır. Comet test sonuçlarına göre YFMS kuyruk yoğunluğunu (% 7,5 hariç) tüm konsantrasyonlarda, kuyruk uzunluğunu % 7,5 - 30, kuyruk momentini ise % 10 - 30'luk konsantrasyonlarda önemli düzeyde artırmıştır. FR ise kuyruk yoğunluğunu (62,5 µg/mL hariç) tüm konsantrasyonlarda, kuyruk uzunluğunu 250 ve 500 µg/mL, kuyruk momentini ise 125-2000 µg/mL konsantrasyonlarında önemli düzeyde artırmıştır. Bu sonuçlar, YFMS ve FR'un özellikle yüksek konsantrasyonlarında genotoksik ve sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : Yüksek fruktozlu mısır şurubu, Fruktoz, Sitotoksisite, Genotoksisite
Sayfa Adedi : 96
Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Sevcan MAMUR

IN VITRO CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP AND FRUCTOSE

(M. Sc. Thesis)

Sabire Nur BÜLBÜL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

This investigation was carried out to determine the potential cytotoxic effect of HFCS (High Fructose Corn Syrup) and Fructose (FR) which are frequently preferred as sweeteners in foods, with 3- (4,5-dimethylthiazole-2) -2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line and their genotoxic effect was examined using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronucleus (MN) and comet assays in human peripheral blood lymphocytes. The effects of these sweeteners on mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index (NDI) were also investigated. Six different concentrations of HFCS (5 %; 7.5; 10; 15; 20; 30) and FR (62.5; 125; 250; 500; 1000 and 2000 µg/mL) were used. HFCS significantly and concentration-dependently reduced the cell viability in the HepG2 cell line at concentrations between 5 % (except 48 h) and 30 %. It has been determined that FR had a cytotoxic effects in HepG2 cells at all concentrations in 24-h and 48-h applications. HFCS caused a toxic effect in human lymphocytes at a concentration of 30 %. In addition, HFCS significantly increased CAs frequency at the two highest concentrations (15 % and 20) in both treatment periods. FR significantly increased the frequency of CAs at 250, 1000 and 2000 µg/mL concentrations in only 48 h administration. Both sweeteners increased the frequency of SCEs at all concentrations. HFCS (15 % and 20) and FR (250, 1000, and 2000 µg/mL) caused an increase in MN frequency at higher concentrations. The MI significantly decreased at all treatments and this decrease was only significant at high concentrations. However, they did not cause any significant change in RI and NBI. According to comet assay results, HFCS significantly increased the comet tail intensity at all concentrations (except 7.5 %), and tail length at the concentrations of 7.5 % -30. It increased the tail moment at the concentrations of 10 % -30. On the other hand, FR significantly increased tail intensity at all concentrations (except 62.5 µg/mL), tail length at 250 and 500 µg/mL, and tail moment at 125-2000 µg/mL concentrations. These results showed that HFCS and FR have cytotoxic and genotoxic effects, especially at higher concentrations.

Science Code : 20316

Key Words : High fructose corn syrup, Fructose, Cytotoxicity, Genotoxicity

Page Number : 96

Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Co-Supervisor : Lec. Dr. Sevcin MAMUR

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; çalışmamda bana bilgi birikimiyle yön gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen, insaniyeti ve bilim insanı kişiliğiyle yoluma ışık tutan saygıdeğer hocam Öğr. Gör. Dr. Sevcan MAMUR'a, bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında gerek yardımları gerek dostlukları ile her zaman yanımda olan tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca lise yıllarımdan beri her zaman yanımda olan ve her fırsatta beni cesaretlendiren dostlarım Cansu KAPLAN, Nazmiye ÇALIŞ, Bahar KILIÇ, Sibel SARIKAYA ve Ayşenur GÖKTAŞ'a teşekkür ederim. Diğer yandan hayatım boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini üzerimde hissettiğim annem Muazzez BÜLBÜL'e ve babam Faruk BÜLBÜL'e ve en değerlim olan kardeşim Sude Nur BÜLBÜL'e teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bir bölümü, Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 64/2020-01 No'lu proje ile desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

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. Tatlandırıcılar.....	5
2.2. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (YFMS).....	7
2.3. Fruktoz (FR).....	8
2.4. Sitotoksisite Testleri.....	10
2.4.1. MTT testi.....	11
2.5. Genotoksisite Testleri.....	13
2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi.....	15
2.5.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi.....	16
2.5.3. Mikronükleus (MN) testi.....	18
2.5.4. Comet testi.....	19
2.6. YFMS ve FR İle İlgili Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	21
3. MATERYAL VE METOT.....	23

	Sayfa
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Test materyalleri.....	23
3.2. Metot.....	25
3.2.1. HepG2 hücrelerinde MTT testi.....	25
3.2.2. Kültüre edilmiş insan periferel lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) testleri.....	26
3.2.3. Kültüre edilmiş insan periferel lenfositlerinde mikronükleus (MN) testi..	28
3.2.4. İzole edilmiş insan periferel lenfositlerinde comet testi.....	30
3.2.5. İstatistiksel analizler.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubunun Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi...	31
4.1.1. MTT testi sonuçları.....	31
4.2. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubunun Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi..	32
4.2.1. Kromozom anormallik (KA) testi sonuçları.....	32
4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları.....	36
4.2.3. Mikronükleus (MN) testi sonuçları.....	39
4.2.4. Comet testi sonuçları.....	41
4.3. Fruktozun Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	45
4.3.1. MTT testi sonuçları.....	45
4.4. Fruktozun İnsan Lenfositlerinde Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	46
4.4.1. Kromozom anormallik (KA) testi sonuçları.....	46
4.4.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları.....	49
4.4.3. Mikronükleus (MN) testi sonuçları.....	52
4.4.4. Comet testi sonuçları.....	54

	Sayfa
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Yüksek fruktozlu mısır şurubu içeriği.....	23
Çizelge 4.1. YFMŞ'nun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	31
Çizelge 4.2. YFMŞ'nun insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları üzerine etkisi.....	33
Çizelge 4.3. YFMŞ'nun insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi.....	37
Çizelge 4.4. YFMŞ uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı ve NBİ üzerine etkisi.....	40
Çizelge 4.5. YFMŞ'nun izole insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı.....	42
Çizelge 4.6. Fruktozun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	45
Çizelge 4.7. Fruktozun insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları üzerine etkisi.....	47
Çizelge 4.8. Fruktozun insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi.....	49
Çizelge 4.9. Fruktoz uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı ve NBİ üzerine etkisi.....	53
Çizelge 4.10. Fruktozun izole insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı.....	55
Çizelge 4.11. YFMŞ ve FR'un 24 ve 48 saat'lik muamele genel sonuçları.....	58
Çizelge 4.12. YFMŞ ve FR'un izole lenfosit hücrelerinde 1 saat muamelesinin genel sonuçları.....	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tatlandırıcıların sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.2. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi.....	13
Şekil 2.3. DNA yapısına katılan BrdU ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırımı.....	17
Şekil 2.4. Mikronükleus oluşumunda klastojenik ve anojenik etkiler.....	19
Şekil 3.1. Fruktozun yapısal formülü.....	24
Şekil 4.1. YFMŞ'nun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde (%) hücre canlılığı değerleri.....	32
Şekil 4.2. YFMŞ uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.3. YFMŞ uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.4. YFMŞ ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki KKD frekansı.	38
Şekil 4.5. YFMŞ ile muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde Mİ değerleri.....	38
Şekil 4.6. YFMŞ'nun 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.7. YFMŞ'nun 48 saatlik uygulamasında NBİ üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.8. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu.....	43
Şekil 4.9. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu.....	43
Şekil 4.10. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk momenti.....	44
Şekil 4.11. Fruktozun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde (%) hücre canlılığı değerleri.....	45

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. Fruktoz uygulamasının insan periferel lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.13. Fruktoz uygulamasının insan periferel lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.14. Fruktoz ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerindeki KKD frekansı.....	51
Şekil 4.15. Fruktoz ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Mİ değerleri..	51
Şekil 4.16. Fruktozun 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.17. Fruktozun 48 saatlik uygulamasında NBI üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.18. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu.....	55
Şekil 4.19. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu.....	56
Şekil 4.20. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk momenti.....	56

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. YFMŞ uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler.....	35
Resim 4.1. (Devam) YFMŞ uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler.....	36
Resim 4.2. YFMŞ uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri.....	39
Resim 4.3. YFMŞ uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	41
Resim 4.4. YFMŞ ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	44
Resim 4.5. Fruktoz uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler.....	48
Resim 4.6. Fruktoz uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri.....	51
Resim 4.7. Fruktoz uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	53
Resim 4.8. Fruktoz ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/kilogram
mL	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
rpm	Devir sayısı
mA	Miliamper
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
AB	Avrupa Birliği
AS	Aspartam
ASE-K	Asesülfam Potasyum
BrdU	Bromodeoksiüridin
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
CBMN-Cyt	Sitokinez-Blok Mikronükleus Sitom
CHO	Çin Hamster Ovaryum
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

Kısaltmalar**Açıklamalar**

FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HNO₂	Nitröz Asit
HT-29	Kolon Hücre Hattı
HEK-293	Böbrek Hücre Hattı
HepG2	İnsan Karaciğer Karsinoma Hücre Hattı
KA	Kromozomal Anormallik
KKD	Kardeş Kromatit Değişimi
KCl	Potasyum Klorür
Mİ	Mitotik İndeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür
NSC-34	Fare Motor Nörom Hücre Hattı
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PBS	Fosfat Tamponu
Rİ	Replikasyon İndeksi
RNA	Ribonükleik asid
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
YFMŞ	Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu
WIL2-NS	İnsan Dalak B Lenfoblast Hücre Hattı

1. GİRİŞ

Beslenme, tüm canlıların yaşamlarını devam ettirebilmesi için ihtiyaç duydukları en temel gereksinimlerden birisidir. Değişmekte olan yaşam koşulları, gündelik alışkanlıklarda meydana gelen farklılaşmalar, beslenme alışkanlıklarında ve gıdaya ulaşım koşullarında değişimlere neden olmaktadır. Dünya nüfusunda meydana gelen artışla birlikte günümüzde daha kolay ulaşılabilen ürünlere talep hızlı bir şekilde artış göstererek gıda endüstrisinde farklı uygulamalara neden olmuştur.

Gıdalarda yaygın kullanılan tatlandırıcılar, insanlar tarafından tüketilen içecek ve yiyeceklerde, yarı veya tam işlenmiş her türlü gıdada şeker yerine kullanılan ve kullanımı günümüzde gittikçe artan maddelerdir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün bir araya gelerek oluşturdukları Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission, CAC), tatlandırıcı ibaresini "gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan bir madde" olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak kıtlık zamanlarında ve gıda sanayisinde maliyeti düşürmek için ortaya çıkmışlardır. Ülkemizde 19 farklı tatlandırıcının gıdalarda kullanımına izin verilmektedir (İnan-Eroğlu ve Ayaz, 2018). Tatlı tadı, insan yaşamı boyunca tecrübe edildiği en hoş deneyim olarak kabul etmektedir. Bu deneyim, insanların enerji bakımından yoğun gıdaları seçmesini teşvik edebilir ve aynı zamanda vücutta fazladan kalori depolanmasına neden olarak obezite gibi çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilir. Tatlandırıcılar, farklı kimyasal yapılara sahip olmaları sebebi ile değişik fiziksel ve kimyasal özellikler göstermektedirler. Tatlandırıcıların istenilen özellikleri; tatlandırma etkisinin yüksek, glisemik indeksi ve kalori değerlerinin düşük olmasıyla birlikte; kokusuz ve renksiz olması, asidik ve bazik çözeltilerde stabil olması, ağızda kalıcı ve acımsı tat bırakmaması, ısıya karşı dayanıklı olmasıdır (İşgören ve Sungur, 2019). Bu maddeler, alkolsüz içecekler, meyveli içecekler, şekerleme ve sakızlar, unlu mamuller, tatlılar, dondurmalar, marmelatlar ve süt ürünleri olmak üzere işlenmiş çoğu gıda da kullanılmaktadır. Gıdalarda bu denli yaygın kullanımları tatlandırıcıların insan sağlığı üzerindeki etkileri hakkında bazı endişeleri de beraberinde getirmiştir. Doğrudan ya da işlenmiş besin ürünleri ile birlikte tüketimi tüm dünyada her yıl artış göstermekte olan tatlandırıcıların, sağlık üzerindeki etkisi ile ilgili yapılmış geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Araştırmalara göre, aşırı kilo alımı ve obezite başta olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarında meydana gelen bu artışın tatlandırıcı maddelerin kullanımı ile

bağlantısı konusunda sonuçlar mevcuttur (Bellisle ve Drewnowski, 2007; Lin ve Curhan, 2011; Malik, Pan, Willett ve Hu, 2013; Sheiham ve James, 2014). Yapılan çalışmalarda yapay tatlandırıcıların tip-2 diyabet (de Koning, Malik, Rimm, Willett ve Hu, 2011; Pepino, 2015), obezite (Fowler, 2016), glukoz intoleransı (Suez ve diğerleri, 2014), metabolik sendrom (Nettleton ve diğerleri, 2009), koroner kalp hastalığı (Fung ve diğerleri 2009; Duffey, Steffen, Van-Horn, Jacobs ve Popkin, 2012) ve böbrek fonksiyonlarının bozulması (Lin ve Curhan, 2011) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Son yıllarda gıda endüstrilerinde tatlılığı, raf ömrünü artırma yeteneği ve düşük maliyeti nedeniyle alternatif tatlandırıcılara olan ilgi büyük ölçüde artmıştır (Zargaraan, Kamaliroosta, Yaghoubi ve Mirmoghtadaie, 2016; Mai ve Yan, 2019). Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan Yüksek fruktozlu mısır şurubunun (YFMS) düşük maliyeti ve tatlılık oranının sükroza göre yüksek olmasından dolayı popülerliği giderek artmıştır (Zargaraan ve diğerleri, 2016). Gıdalara eklenen ilave şekerlerin ve özellikle YFMS' nun aşırı tüketiminin doğrudan veya dolaylı olarak obezite, tip 2 diyabet ve çeşitli metabolik bozukluklara yol açacağına dair artan bir endişe vardır (Raatz, Johnson ve Picklo, 2015). Şeker alımının aşırı vücut ağırlığı ve kardiyometabolik hastalık riski oluşturmaya bağlı olarak meydana gelen ölüm oranları ile ilişkili araştırmalarla bu görüşler desteklenmektedir (Raatz ve diğerleri, 2015; Ko, Kim, Kim ve Lee, 2017). YFMS'nun insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisini kanıtlamış birçok araştırmaya rağmen GRAS " Generally Recognized As Safe - Genellikle Güvenli Kabul Edilir" statüsüne sahiptir (Siedlecka, Micał, Krzewicka-Romaniuk ve Romaniuk, 2020). Yüksek şeker alımı genel olarak obezite ve hipertansiyon gelişimi ile ilişkilendirilirken, YFMS ve sükroz gibi tatlandırıcılar yoluyla alınan Fruktoz (FR) tüketiminin bu hastalıkların patogeneğinde bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (Hou, Pandave ve Voruganti, 2019; Mai ve Yan, 2019). FR, gıda endüstrisinde doğal bir tatlandırıcı olarak kullanılan ve tatlandırıcı etkisi glikozdan 2 kat daha fazla olan bir monosakkarittir (Zargaraan ve diğerleri, 2016). Yüksek FR tüketimi ile obezite ve metabolik sendrom gibi sağlık sorunları arasında doğrudan bir ilişki olabileceği bildirilmesi nedeniyle son zamanlarda çok fazla ilgi çekmektedir (Khorshidian ve diğerleri, 2021). YFMS ile ilgili endişelerin temel sebebi ise içeriğinde bulunan FR'dan kaynaklanmaktadır (Aşıcı ve diğerleri, 2020).

Günümüzde birçok maddenin olası *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmaktadır. Hücre

canlılığı ve mitokondriyal aktivitenin, hızlı ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayan bir yöntem olması nedeniyle sitotoksosite çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadığının belirlenmesinde, kısa süreli genotoksosite testleri olan kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri insan periferallenfositlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca izole edilmiş lenfositlerde comet testi kullanılarak kimyasalların primer DNA hasarını indükleyip indüklediği belirlenmektedir (Buranaamnuay, 2021). Kanserojenlerin birçoğu klastojenik etkiye neden olduğundan KA testi ile kanser oluşumunun risk değerlendirilmesi yapılmaktadır. Çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlar tarafından onarılmamış DNA hasarı KKD testi ile değerlendirilmektedir. MN testinin uygulanması, kanser riskinin belirlenmesi haricinde diğer hastalıkların teşhisi için de önem göstermektedir. Comet testi DNA hasarı ve onarımına ilişkin çalışmalarda sıklıkla kullanılan çok yönlü bir yöntemdir. Her türlü kimyasal ve mutajenlerin neden olabileceği kanser ve diğer çeşitli kalıtsal hastalıkların değerlendirilmesine olanak sağlayan bu test yöntemleri genotoksosite çalışmalarında tercih edilmektedir. Tek bir genotoksosite testi ile genotoksinlerin tespiti mümkün olmayacağından birbirini tamamlayan testler bir arada gerçekleştirilmekte ve farklı mekanizmalarda ortaya çıkabilecek genotoksosite belirlenebilmektedir.

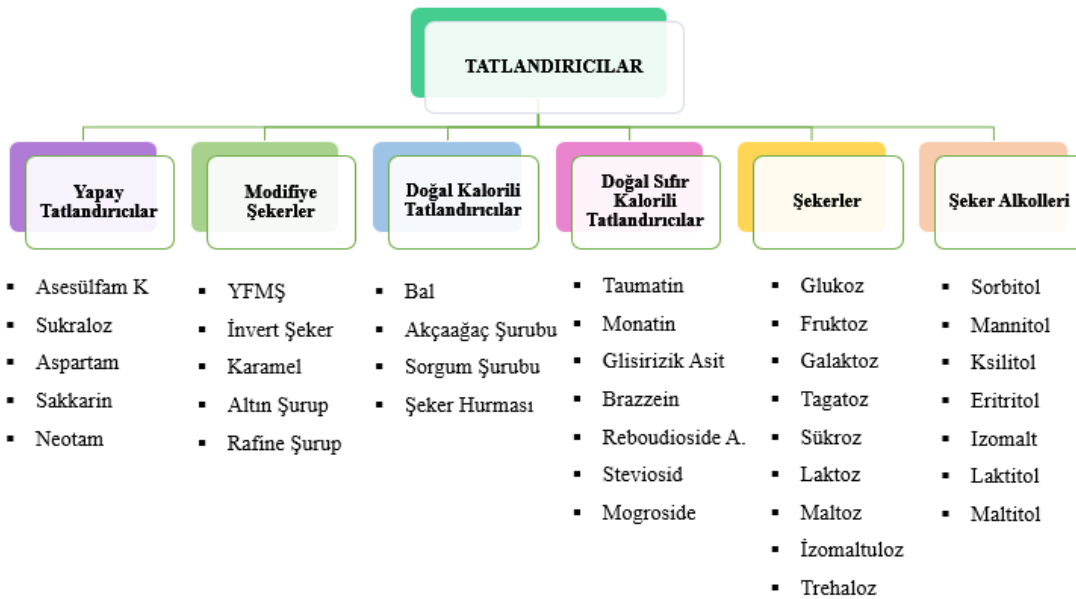
Bu çalışmanın amacı, birçok gıdada tatlandırıcı olarak kullanılan Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) ve Fruktoz'un (FR) olası sitotoksik etkilerini, insan karaciğer karsinoma HepG2 hücrelerinde MTT testi ile belirlemektir. Ayrıca genotoksik etkilerini, kültüre alınmış insan periferallenfositlerinde kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) testleri ile ve izole edilmiş insan lenfositlerinde ise comet testi (SCGE) kullanarak *in vitro* test yöntemleri ile incelemektir. Bu çalışma, YFMS ve FR tatlandırıcılarının insan sağlığı üzerinde hem genotoksik hem de sitotoksik bir risk oluşturup oluşturmayacağına açıklık getireceğinden sağlık açısından önemli sonuçlar ortaya koyabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tatlandırıcılar

Tatlandırıcılar, şekerin tatlı tadını taklit eden daha az enerji içeren ve şeker yerine gıdaya eklenen maddeleridir (Ruiz-Ojeda, Plaza-Díaz, Sáez-Lara ve Gil, 2019). 18. yüzyılda şeker kamışından elde edilen sükrozun (sofra şekerinin) bulunmasından önce, bal tatlı tadın ana kaynağıydı (Chéron, Marchal ve Fiorucci, 2019). Tatlandırıcılar ilk olarak kıtlık dönemlerinde gıda endüstrisinde maliyeti düşürmek için ortaya çıkmış (Özdemir, Başer ve Çakır, 2014) ve daha sonra düşük kalorili özellikte olmaları ve doğal sofr şekerinden daha yüksek tatlılık içermeleri nedeniyle, şekersiz tatlılar ve gazlı içecekler gibi birçok yiyecek ve içeceklerde kullanımları giderek artmıştır (Cao ve diğerleri, 2020). Zamanla değişen günlük yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları ile birlikte insanlar tatlı tadını alabileceği doğal veya yapay olmak üzere birçok madde keşfetmiş ve kullanmaya başlamışlardır.

Tatlandırıcıların farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle çeşitli sınıflandırmaları bulunmaktadır. Genel olarak tatlandırıcılar; yapay tatlandırıcılar, modifiye şekerler, doğal kalorili tatlandırıcılar, doğal sıfır kalorili tatlandırıcılar, şekerler ve şeker alkolleri olmak üzere altı ana gruba ayrılabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tatlandırıcıların sınıflandırılması (Hernández-Pérez ve diğerleri, 2020; Li ve diğerleri, 2020)

Modifiye şekerler, nişastanın çeşitli enzimler kullanılarak dönüştürülmesiyle üretilen şekerlerdir ve işlenmiş gıdalarda kullanılmaktadırlar (Hernández-Pérez ve diğerleri, 2020). Şeker alkoller, düşük kalorili, yüksek sıcaklık ve pH değişimlerine karşı kararlı doğal olarak oluşan karbonhidrat türevleridir (İşgören ve Sungur, 2019; Hernández-Pérez ve diğerleri, 2020). Bitkilerin yaprak, çiçek, kabuk ve kökleri gibi çeşitli kısımlarından elde edilen, basit şekerler olan mono ve disakkaritler doğal tatlandırıcı sınıfına girmektedir (İşgören ve Sungur, 2019). Doğal tatlandırıcılar, şeker alkollerini, doğal şekerleri, terpenoid glikozitleri ve polifenoller içerir. Hidrolize nişasta ve yüksek fruktozlu mısır şurupları, sukroz, glukoz, ve fruktoz tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır (Erkmen, 2010).

Son yıllarda aşırı şeker tüketimi ve gıdalarda yapay katkı maddelerinin kullanımıyla ilgili endişeler nedeniyle tüketicilerin doğal yüksek etkili tatlandırıcılara olan ilgisi de artmıştır (Chéron ve diğerleri, 2019). Yapay tatlandırıcılar, besleyici değeri olmayan kimyasal sentezle elde edilen yüksek tatlandırma gücüne sahip ve en yaygın kullanılan gıda katkı maddelerinden biridir (Cao ve diğerleri, 2020; Schiano ve diğerleri, 2021). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından besleyici değeri olmayan yapay tatlandırıcılardan asesülfam K, sukraloz, aspartam, sakkarin ve neotam maddelerinin kullanımı onaylanmıştır (Cong ve diğerleri, 2013).

Prelinik ve klinik araştırmalar, tatlandırıcıların glikoz metabolizması, bağırsak mikrobiyotası ve iştah kontrolü üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini bildirmektedir (Daly, Darby ve Shirazi-Beechey, 2016; Suez ve diğerleri, 2014; Schiano ve diğerleri, 2021). Ayrıca tatlandırıcıların deri, sindirim sistemi ve kardiyovasküler hastalıklara, toksik ve alerjik reaksiyonlara, kanser ve tümör oluşumuna neden olabilecekleri belirtilmiştir (Erkmen, 2010). 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 ve Sungur, 2019).

Tatlandırıcıların sağlık açısından önemi

Günümüzde kullanım oranında ciddi artış göstermekte olan tatlandırıcılar ve emülsifiyerler bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek bağırsak inflamasyonuna ve metabolik sendromun gelişimine neden olabilmektedir (İnan-Eroğlu ve Ayaz, 2018; Bayram ve Öztürkcan, 2020).

Bağırsak mikrobiyotası zararlı mikroorganizmaların baskılanması, amino asit ve vitaminlerin sentezlenmesi, karbonhidrat sindirimi ve ilaç metabolizması gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişikliklerin % 12'sinden genetik faktörler sorumluyken, % 57'sinin de diyet kaynaklı olduğu savunulmaktadır (Ayyıldız ve Yıldırım, 2019). Ayrıca yapılan bir dizi çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda, tatlandırıcı tüketimi ile aşırı kilo alımı ve obezite, Tip 2 diyabet, metabolik sendrom ve özellikle yetişkinlerde kardiyovasküler hastalık riskinin artması dahil olmak üzere çeşitli olumsuz sağlık sonuçları arasında bir bağlantı olduğu belirtilmiştir (Swithers, 2013). Bunların dışında tatlandırıcı tüketiminin oksidatif stres ve karaciğer enzimleri üzerinde de olumsuz etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Pehlivan ve Köksal, 2020).

Yapılan önceki araştırmalarda, tatlandırıcıların metabolizma üzerinde bir etkileşime sahip olmadığı düşünülüyordu ancak son çalışmalar tatlandırıcıların ya metabolizma ile ya da tatlı tat reseptörlerinin önemli bir rol oynadığı bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, tatlandırıcıların doğal, yapay, kalorili ve kalorisiz özelliklerine göre vücutta farklı şekilde metabolize edildiği de belirtilmiştir. Düşük kalorili doğal tatlandırıcılar, kommensal bakteriler tarafından kalın bağırsakta metabolize edilirken, kalorili olmayan yapay tatlandırıcılar ise peptidazlar gibi gastrointestinal enzimler tarafından metabolize edilir ve kalan ürünleri ince bağırsakta emilerek idrar yoluyla atılır. Kalorisiz doğal tatlandırıcılar ince bağırsakta emilir veya bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilerek ardından karaciğerde metabolize olmaktadır (Gómez-Fernández, Santacruz ve Jacobo-Velázquez, 2021).

2.2. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (YFMS)

Nişasta bazlı şeker (NBŞ) olarak da adlandırılan Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS), mısır nişastasının α -amilaz ve glikoamilaz enzimleri kullanılarak önce glukozu parçalanıp ardından glukozun enzimatik izomerizasyonu ile Fruktosa (FR) dönüştürülmesiyle elde edilen, tat, içerik ve kalori bakımından sükröza alternatif olan sıvı bir tatlandırıcıdır (Kızılaslan, 2017; Örek ve Mertoğlu, 2020). Marshall ve Kooi adlı iki araştırmacının 1957 yılında izomeraz enzimini keşfetmelerinden sonra mısır şurubundaki glukozu FR'a dönüştürerek FR oranı yüksek olan daha tatlı bir YFMS'nun elde edilmesi mümkün olmuştur (Ardebili, 2015). Dünyada kişi başına düşen YFMS tüketimi 1,9 kg'dır ve en büyük

üretici ülke 8,3 milyon ton ile ABD (Amerika Birleşik Devletleri) dir. Sonra Japonya ve Kanada gelmektedir (Kaya-Cebioğlu ve Önal, 2017). YFMŞ farklı formülasyonlarda tüketiciler tarafından satın alınmaktadır. 1960' ların sonlarına doğru çorba, sos, fırınlanmış ürünler baharat ve tahıllarda kullanılan içeriğinde; % 42 fruktoz ve % 53 glukoz olan YFMŞ-42 üretilmiştir. 1970' lere geçildiğinde daha çok dondurma, meyve suyu ve gazlı içeceklerde tercih edilen YFMŞ-55 (% 55 fruktoz, % 42-44 glukoz, % 1-3 polisakkarit) üretilmiştir. YFMŞ-90 ise % 90 fruktoz ve % 10 glukoz içermektedir (Örek ve Mertoğlu, 2020). YFMŞ uygun fiyatı, sıvı formda oluşu, koruyuculuk özelliği ve yoğun tatlılığı nedeniyle gıda üreticileri tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. ABD'de mısır YFMŞ'nun elde edildiği ana bileşeni iken, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde ana bileşeni mısır, buğday ve patatestir. Bakanlar Kurulu tarafından oluşturulan 4634 sayılı Şeker Kanunu kapsamı kararı neticesinde Türkiye'nin yıllık şeker ihtiyacının % 5'nin nişasta bazlı şekerden karşılanması kararına varılmıştır. Daha önceden % 10 olan YFMŞ kotasının % 5'e düşürülerek 2017 yılında 267.000 ton olan YFMŞ kotası, 2018 yılında 133.500 tona düşürülmüştür (Aşıcı, Oturak ve Ekerbiçer, 2020). Resmi Gazetede 5 Haziran 2021 tarihinde yayımlanan 31502 sayılı Şeker Kotalarının Düzenlenmesi ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmeliğe göre NBS için belirlenecek toplam kota ülke toplam kotasının % 5'ini geçemez şeklinde açıklanmıştır. Doğal kaynaklardaki FR; vitaminler, yağ asitleri, mineraller ve diğer şekerlerle kompleks bir yapıdayken, YFMŞ' nun içeriğindeki FR modifiye yapıdadır ve serbest halde bulunmaktadır (Karaoğlu, 2011). Son zamanlarda birçok gıdanın bileşimine giren bu tatlandırıcının sağlık üzerinde meydana getirdiği etki sorgulanmaya başlanmış ve bu konuda yapılan araştırmaların sayısı artmıştır. YFMŞ'nun aşırı tüketimine bağlı olarak, insülin direncinde artış, organ içi yağlanma, ürik asit artışı, obezite ve hipertansiyon gibi patolojik durumların oluşumunda artış görülmektedir (Bray, Nielsen ve Popkin, 2004; Boyunağa, Badem ve Mortaş, 2018). Ayrıca YFMŞ üretim ve izolasyon aşamalarında karbonil bileşikleri ve civa kontaminasyonu da farklı patolojilere neden olabilmektedir (Boyunağa ve diğerleri, 2018). YFMŞ'nun potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır.

2.3. Fruktoz (FR)

Fruktoz çoğu meyvenin bileşiminde ve balda bulunan, suda çok kolay çözünen, katı, beyaz bir görünüme sahip altı karbonlu bir monosakkarittir (İşgüzar ve Akbulut, 2016). FR, aynı miktardaki sükroz ya da glukozu göre tatlılık derecesi fazla olan ve çoğunlukla şekerli

gıdalarda ve içeceklerde kullanılan doğal bir şekerdir (Rizkalla, 2010; İşgüzar ve Akbulut, 2016; Chéron ve diğerleri, 2019). En önemli kaynakları besinlere eklenen sükroz ve YFMS' dur (Arslan ve Şanlıer, 2016; Kızılaslan, 2017). FR'un beslenmemizde giderek önemli yer alması, gıdalara YFMS ve sükroz eklenmesiyle olmuştur (Bray, 2010). Birçok yiyecek ve içecekte kullanılmasının en önemli sebebi maliyetinin düşük olmasıdır. Ayrıca diğer şekerlere göre her türlü ortam koşullarında fazla nem tutma özelliğine sahip olmasından dolayı içinde kullanıldığı besin maddelerinde uzun raf ömrü, kalite ve yumuşaklık sağlamaktadır (Yılmaz ve Yabancı-Ayhan, 2015).

FR ilk olarak karaciğerde metabolize olur ve metabolizma sonucunda ürik asit ve serbest yağ asidi sentezi artar ve ATP oluşumu azalır. Bağırsak hücresine spesifik bir FR taşıyıcısı olan glukoz transporter (GLUT)-5 aracılığı ile alınan FR sonrasında enterositin basolateralindeki GLUT-2 taşıyıcıları üzerinden kana verilir. Kana geçen FR daha sonra GLUT-2 tarafından hepatositlere alınmaktadır (Arslan ve Şanlıer, 2016). FR'un glukozdan farklı bir şekilde metabolize olduğu ve glukozla oranla daha düşük girelin, insülin, leptin ve enteroendokrin hormon cevabı oluşturduğu belirlenmiştir (Örek ve Mertoğlu, 2020). Sindirim yoluyla kana geçen glukoz, leptin salınımını artıran insülin salınımını etkileyerek hipotalamus bölgesinde bulunan tokluk merkezi uyarılmaktadır (Boyunağa ve diğerleri, 2018; Yılmaz ve Yılmaz, 2019). FR ise glukoz metabolizmasına kıyasla yetersiz leptin (doyma hormonu) salgılanması ve girelin (açlığı teşvik eden hormon) baskılanması ile dolaşımdaki insülin salınımı üzerinde düşük bir etki göstererek doyumluk hissi oluşturmamaktadır (Merino, Fernández-Díaz, Cózar-Castellano ve Perdomo, 2020).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yüksek FR tüketiminin doku ve organ fonksiyonlarını dolaylı olarak etkileyebileceği belirtilmiştir (Aslankoç ve Özmen, 2019). Yüksek FR'lu besinlerin tüketimi özellikle yüksek enerji alımı ve düşük fiziksel aktivite ile beraber, obezite, hipertansiyon, böbrek hastalığı ve metabolik sendrom gibi kronik hastalıkların gelişiminde önemli bir etken olabileceği ileri sürülmüştür (Johnson ve diğerleri, 2007; Sánchez-Lozada ve diğerleri, 2010; Yılmaz ve Yabancı-Ayhan, 2015). FR insülin salınımını uyarmadığından kişide aşırı yeme isteğinin devam etmesine yol açarak organ içi yağlanma, obezite, insülin direnci, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi birçok patolojiyi tetikleyebilmektedir (Boyunağa ve diğerleri, 2018). Ayrıca yüksek FR alımının kanser, özellikle hepatosellüler karsinoma gelişiminden sorumlu olabileceği de düşünülmektedir (Healy ve diğerleri, 2015; Arslan ve Şanlıer, 2016).

2.4. Sitotoksisite Testleri

Herhangi bir maddenin hücreler üzerindeki biyolojik etkilerinin anlaşılabilmesi için toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gerekmektedir. Sitotoksisite, çeşitli bileşiklerin kültürde yetiştirilen hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkilerinin test edilmesinde potansiyel toksik etkilerin bir öngörücüsü olarak kabul edilmektedir. Bu değerlendirme insanlarda belirli sağlık riskleri oluşturabilecek bileşiklerin tanımlanmasında çok önemli bir araç olarak görülmektedir (Riss, Moravec ve Niles, 2011: 103, 114). Kimyasal ve biyolojik ajanlar ya da fiziksel etkenler, hücreleri değişik düzeylerde etkileyerek sitotoksositeye neden olabilirler. Bu durum hücrelerin proliferasyon özelliklerini kaybetmelerine veya apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölmelerine neden olabilir (Galluzzi ve diğerleri, 2009; Tokur ve Aksoy, 2017). Hücre bazlı sitotoksisite araştırmaları, uygulama kolaylığı ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar için bir öngösterge olması nedeniyle, toksikoloji laboratuvarlarında çok fazla tercih edilmektedir (Riss ve Moravec, 2004; Tokur ve Aksoy, 2017; Iancu ve diğerleri, 2021).

In vitro sitotoksisite testleri, toksik etkisi araştırılan herhangi bir kimyasalın ya da ilaç niteliği taşıyan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla özellikle kanser ve aşı çalışmalarında hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm yöntemleridir (Gilbert ve Boutros, 2016: 75, 84; Tokur ve Aksoy, 2017). Bu testler sayesinde çok sayıda maddenin kısa sürede analizi yapılarak sonraki hayvan denemeleri için de temel veriler elde edilebilmektedir (Riss ve Moravec, 2004; Tokur ve Aksoy, 2017). Farklı hassasiyetlere ve mekanizmalara sahip çeşitli sitotoksisite testleri bulunmaktadır. Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri genel olarak boyama, kolorimetrik, luminometrik ve florometrik yöntemler olmak üzere sınıflandırılabilir. Boyama yöntemleri, kongo kırmızısı eozin, tripan mavisi, ve eritrosin B kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Kolorimetrik yöntemlerde, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT), 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfo fenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak ve de kristal viyole, nötral kırmızısı gibi farklı boya maddeleriyle hücrelerin spesifik olarak boyanması esasına göre ölçüm yapılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017). Luminometrik yöntemlerden, ATP testi hücre sitotoksitesini ve proliferasyonunu basit ve hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. Alamar mavisi testi en sık kullanılan florometrik

yöntemlerdendir ve hücre proliferasyonunun belirlenmesini sağlar. Yöntem çeşitliliği, kullanılan hücre tipi ve uygulanan test maddesinin hangi mekanizma ile hücre ölümüne yol açtığını (apoptoz, otofaji, nekroz gibi) belirlemek ve ölçülmek istenilen noktaları (sitotoksosite, proliferasyon, canlılık gibi) değerlendirmek için uygun yöntemin tercih edilmesine olanak sağlamaktadır (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

2.4.1. MTT testi

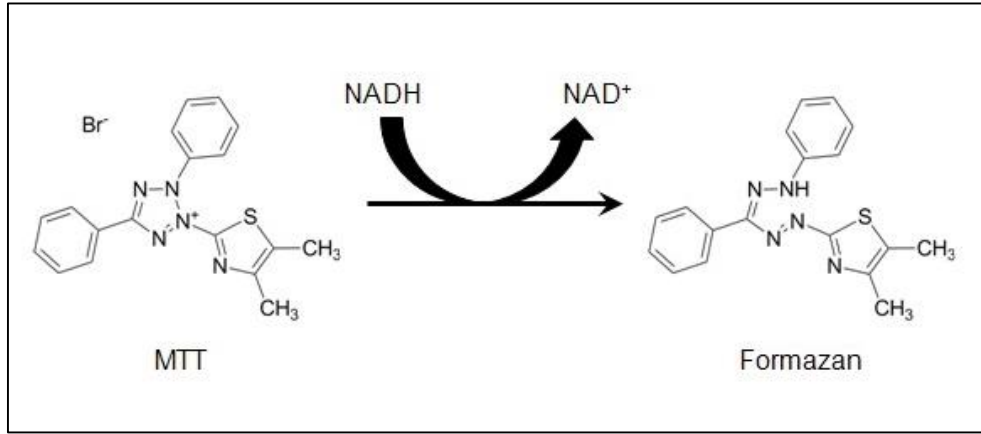
Günümüzde yaygın olarak kullanılan Mosmann tarafından 1983 yılında geliştirilen MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] testi; sitotoksosite, proliferasyon, mitokondriyal aktivite ve hücre canlılığı belirleme yöntemlerinin başında gelmektedir (Mazloum-Ardakani, Barazesh, Moshtaghioun ve Sheikhha, 2019; Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Hücre kültüründe ilk olarak ve en yaygın kullanılan tetrazolyum tuzudur (Mossman, 1983). MTT testinin avantajı, sitotoksitenin hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesidir. Bu teknik, hücre canlılığı testlerinin “altın standardı” olarak nitelendirilmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Test hücre proliferasyonunu/canlılığını, ilaç sitotoksitesini ve hücrelerin mitokondriyal/metabolik aktivitesini ölçmek için ortak bir araç olarak yaklaşık kırk yıldır uygulanmaktadır (Stockert, Horobin, Colombo ve Blázquez-Castro, 2018; Ghasemi, Turnbull, Sebastian ve Kempson, 2021). Potansiyel tıbbi ajanların ve toksik materyallerin sitotoksik aktivitelerini ölçmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Mazloum-Ardakani ve diğerleri, 2019). MTT testi birçok prokaryot ve ökaryot hücrelere; memeli hücre hatlarına (ör: fare fibroblast, insan meme kanseri, hayvan ve insan sperm hücreleri), bakterilere (ör: Escherichia coli) ve mantarlara yaygın olarak uygulanmaktadır (Wang, Cheng, Wang, Wei ve Wang, 2010; Yılmaz, Doğan, Özdemir ve Serper, 2012; Grela, Kozłowski ve Grabowiecka, 2018; Ali ve diğerleri, 2021; Buranaamnua, 2021). MTT testinin prensibi; canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz enziminin (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, NADH) sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalaması ile mor renkte suda çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesi esasına dayanmaktadır (Mossman, 1983). MTT reaktifi, dört nitrojen atomu içeren pozitif yüklü bir kuaterner tetrazol halka çekirdeğinden oluşan bir mono-tetrazolyum tuzudur. Tetrazolium halkası iki fenil parçası ve bir tiyazolil halkası içeren üç aromatik halka ile çevrilidir. MTT'nin azalması, çekirdek tetrazol halkasının bozulması ve mor-mavi suda çözünmeyen bir molekül olan formazanın oluşması ile sonuçlanır (Berridge, Herst ve Tan, 2005; Ghasemi ve diğerleri, 2021). MTT reaktifi muhtemelen pozitif yükü ve

lipofilik yapısı nedeniyle canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarından ve hücre zarından da geçebilir ve metabolik olarak aktif hücreler tarafından formazana indirgenir. Bu redoks kimyasal reaksiyonu MTT testinde kolorimetrik tabanlı bir hücre içi formazan üretiminin ölçümünü sağlamaktadır (Berridge ve diğerleri, 2005; Stockert ve diğerleri, 2018; Ghasemi ve diğerleri, 2021). Üretilen suda çözünmeyen formazan daha sonra Dimetil sülfoksit (DMSO) gibi bir çözücü ile çözülür (Stockert ve diğerleri, 2018; Ghasemi ve diğerleri, 2021). Ölçülen optik yoğunluk değerleri, formazan konsantrasyonunun belirteci ve dolayısıyla MTT'nin hücre içi azalmasını ifade eder (Berridge ve diğerleri, 2005; Stockert ve diğerleri, 2018; Ghasemi ve diğerleri, 2021). Buna göre, proliferasyona uğrayan canlı hücreler MTT'yi artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürür (Şekil 2.2) (Mossman, 1983; Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Ölü hücrelerde ise hücre canlılığının kaybolmasıyla birlikte mitokondriyal fonksiyon ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazana çevirebilme yeteneği azalmaktadır (Ökçesiz ve Ündeğer-Bucurgat, 2017). Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilceğinden, renk değişimi yalnızca canlı hücrelerde meydana gelir. Dolayısıyla canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (Bahuguna, Khan, Bajpai ve Kang, 2017). Oluşan bu renk değişimi ile 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak hücre canlılığı değerlendirilmektedir. Oluşan formazan miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılı bir şekilde değişir ve bu miktar değişimi hücre canlılığının tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Grela ve diğerleri, 2018; Kumar, Nagarajan ve Uchil, 2018; Ghasemi ve diğerleri, 2021).

MTT'nin hücre içi indirgenmesine, mitokondriyal elektron taşıma zincirine giden glikolitik yolların farklı aşamalarında oksidoredüktaz ve dehidrojenaz enzimleri ve elektron donörlerinin (esas olarak NAD(P)H) aracılık ettiği düşünülmektedir (Berridge ve diğerleri, 2005; Ghasemi ve diğerleri, 2021). MTT testi mitokondriyal aktiviteyi ölçmek için yaygın olarak kullanılsa da formazan oluşumunun yeri ve hücre içi taşınması tartışmalıdır. Hücre içi formazan granülleri endoplazmik retikulumda, sitozolik lipid damlacıklarında (Diaz ve diğerleri, 2007; Stockert, Blázquez-Castro, Cañete, Horobin ve Villanueva, 2012) plazma zarlarında (Bernas ve Dobrucki, 2000; Berridge ve diğerleri, 2005), çekirdekte ve mikrozomlarda (Liu, Peterson, Kimura ve Schubert, 1997) gözlenmiştir. Bu gözlemler ile MTT testinin mitokondriyal aktivite belirteçinden daha fazlası olduğunu göstermektedir. MTT indirgemesinde hangi moleküller, organeller ve enzimlerin yer aldığı ve hücre dışı

formazan kristallerinin kökeni gibi belirsizlikler nedeniyle mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır (Ghasemi ve diğerleri, 2021).

Son zamanlarda MTT testi, insan serviks karsinomu (HeLa) (Mamur, Ünal, Yılmaz, Erikel ve Yüzbaşıoğlu, 2021), insan meme kanseri (MCF-7) (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2021; Ali ve diğerleri, 2021) ve insan kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) (Nemes ve diğerleri, 2020), insan karaciğer karsinoma (HepG2) (Fagbohun ve diğerleri, 2020) gibi çeşitli hücre hatları ile yapılan çalışmalarda hücre canlılığının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi (Riss ve diğerleri, 2013)

2.5. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite, hücrenin genetik materyali (DNA, RNA) üzerinde yıkıcı etkisi olan ve hücre bütünlüğünü bozan, DNA zincir kırıkları, gen mutasyonları, yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir (Saks, Upreti, SV ve Dang, 2017; Şen, Beceren ve Aksoy, 2018). Mutasyonlar, kromozomal anormallikler ve kromozom sayısındaki değişiklikler sonucu ortaya çıkabilir ve bunların tümü genomik kararsızlığı indükleyerek karsinogenezi artırabilir (Wilson ve diğerleri, 2021). Günlük yaşamımızda kullandığımız gıda katkı maddeleri, ilaçlar, pestisitler, temizlik ve kozmetik maddeleri gibi insanların maruz kalabileceği birçok kimyasal madde toksik potansiyellere sahip olabilir. Bu nedenle söz konusu bu kimyasal maddenin kullanıma sunulmadan önce olası toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilmeleri gerekmektedir (Özkara ve Akyıl, 2015; Smart ve diğerleri, 2020). Genotoksisite testleri ile çeşitli mekanizmalar yoluyla somatik veya germ

hücrelerinde genetik hasarı indükleyebilen kimyasallar belirlenmektedir (Canedo ve Rocha, 2021).

Genetik toksikoloji, hücrenin DNA'sına ve kromozomlarına zarar verebilecek ajanların veya maddelerin araştırılmasıyla ilgilenen bilim dalıdır (Saks ve diğerleri, 2017). Genotoksisite çalışmaları, çeşitli mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak genetik materyale zarar verebilecek herhangi bir madde veya bileşiği belirlemek için uygulanan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testler olarak tanımlanmaktadır (Aksu-Kılıç ve Doğan, 2020). Günümüzde tanımlanmış yaklaşık olarak yirmi tip *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri kullanılmaktadır. *In vitro* testler, genellikle yeni farmasötiklerin, tıbbi malzemelerin, zehirlerin, kimyasal ve fiziksel faktörlerin potansiyel genotoksik etkisini araştırmak için kullanılmaktadır. *In vivo* testler ise, çevresel faktörlerin insanlar ve biyota üzerindeki etkisini belirleyerek çeşitli hastalıkların gelişimi ile ilişkili genetik değişikliklerin araştırılmasına olanak sağlar (Sommer, Buraczewska ve Kruszewski, 2020). Genotoksik ve mutajenik açıdan incelenen maddelerin etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından onaylanan kromozomal anormallik (KA), mikronükleus (MN) ve comet testleri ile OECD kılavuzunda yer almasada kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sıklıkla kullanılan testlerdir (Jain ve diğerleri, 2018a: 45, 65; Börçek-Kasurka, 2019). Kısa süre içerisinde yapılabilen genotoksisite testleri ile kimyasal maddelerin çeşitli mutasyonlara sebep olup olmadıklarının belirlenmesi mümkün olabilmektedir (Aksu-Kılıç ve Doğan, 2020). Genotoksisite testleri, bir ilacın veya herhangi bir maddenin mutasyon ve genotoksisiteye neden olma potansiyeline sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılması nedeniyle ilaç geliştirmenin erken aşamasında olası tehlikelerin tespit edilmesine yardımcı olurlar. Ayrıca genotoksik ajanların belirlenmesi, mutasyon ve genotoksisite mekanizmasının anlaşılmasına da olanak sağlamaktadır (Saks ve diğerleri, 2017).

Genotoksinler, DNA veya kromozomların zarar görmesine neden olarak mutasyonlara sebep olabilen mutajenlerdir. Genellikle genotoksisite mutajenite ile karıştırılmaktadır. Tüm mutajenler genotoksiktir, ancak tüm genotoksik maddeler mutajenik değildir. Genotoksinler etkilerine göre kanserojenler veya kansere neden olan ajanlar, mutajenler veya mutasyona neden olan ajanlar, teratojenler veya doğum kusuruna neden olan ajanlar olmak üzere sınıflandırılabilir (Saks ve diğerleri, 2017). Genotoksik etkili ajanların insanlarda neden olduğu genetik hasarlar, bireyin kendisinde ve sonraki nesillerinde ciddi sağlık

problemlerine neden olmaktadır. Özellikle, genotoksisite ile kanser arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve insanlarda karsinogen etkisi olan ajanların % 90'ının genotoksik etkili olduğu belirtilmiştir (Şen ve diğerleri, 2018).

2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik testi, *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere çeşitli kimyasalların potansiyel genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Hori ve diğerleri, 2020). *In vitro* KA testinde; fibroblast, kültüre edilmiş sperm, periferik kan lenfositleri veya kemik iliği gibi memeli hücreleri kullanılırken *in vivo* KA çalışmalarında ise, çoğunlukla kemik iliği hücreleri kullanılmaktadır (Şen ve diğerleri, 2018).

Kromozomal anormallikler sayısal ve yapısal olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Yapısal kromozomal anormallikler; kromatit kırığı, kromozom kırığı, disentrik kromozom, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme, kromatit değişimi ve halka kromozomdur (Erol ve Budak-Diler, 2011). Sayısal kromozomal anormallikler ise öploid (monoploid, haploid ve poliploid) ve anöploid (monozomi, trizomi ve tetrazomi) olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Jain, Singh, Dubey, Maurya ve Pandey, 2018b: 69, 92). Kromozomal anormallik testi yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerinin tespit edilmesinde kullanılan bir yöntem olmasından dolayı test edilen maddenin klastojenik ve anojenik etkilerinin belirlenmesinde rol oynar (Mosesso ve Cinelli, 2019: 79, 104). Genotoksin maruziyeti ile ilişkili olan klastojenite (kromozom kırılması) DNA metilasyonu (N-metilasyon lezyonları) ve topoizomeraz inhibisyonları gibi çeşitli etki mekanizmalarından kaynaklanan yapısal kromozomal hasarlardır (Kaina, 2004; Snyder, 2010; Hasselgren ve diğerleri, 2019). Anöjenite, genellikle bölünme sırasında kromozomların düzenli bir şekilde ayrılmasını sağlayan mikrotübül yapısının bozulmasıyla anormal sayıda kromozomun olduğu sayısal kromozomal anormalliklerdir (Hasselgren ve diğerleri, 2019). Metafaz evresinde gözlenen aberasyon tipleri, muamelenin uygulandığı hücre döngüsünün fazına ve kullanılan mutajenik ajanlara bağlıdır. Çeşitli genotoksik ya da mutajenik ajanlara maruz kalma durumunda hücre döngüsünün G0 ve G1 evrelerinde kromozom tipi, S veya G2 evrelerinde ise kromatit tipi anormallikler ortaya çıkmaktadır (Evans, 1984; Mosesso ve Cinelli, 2019: 79, 104). Kimyasal ajanların çoğu, kromatit tipi anormalliklere neden olmaktadır. Meydana gelen kromozomal anormallikler, DNA hasarının "tamir edilmemesi" veya "yanlış tamir edilmesinin" bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Mosesso ve Cinelli, 2019: 79, 104).

Kromozomal anormallik testinden elde edilen negatif bir sonuç, klastojenik etki görülmediğinin güçlü kanıtıdır (Mishima, 2017).

Yapılan araştırmalarda, periferel kan lenfositlerinde belirlenen kromozomal anormallik sıklığının, genotoksik karsinojenlere maruz kalma ve kanser riski ile bağlantılı biyolojik bir belirteç olduğu saptanmıştır (Kadlcikova ve diğerleri, 2020; Farkas ve diğerleri, 2021). İnsanlarda kanserojenlerinin çoğu klastojenik olduğundan kromozomal anormalliklerdeki artış ile kanser oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (Bonassi ve diğerleri, 2008; Patel, Patel ve Bakshi, 2017; Şen ve diğerleri, 2018; Bolzán, 2020).

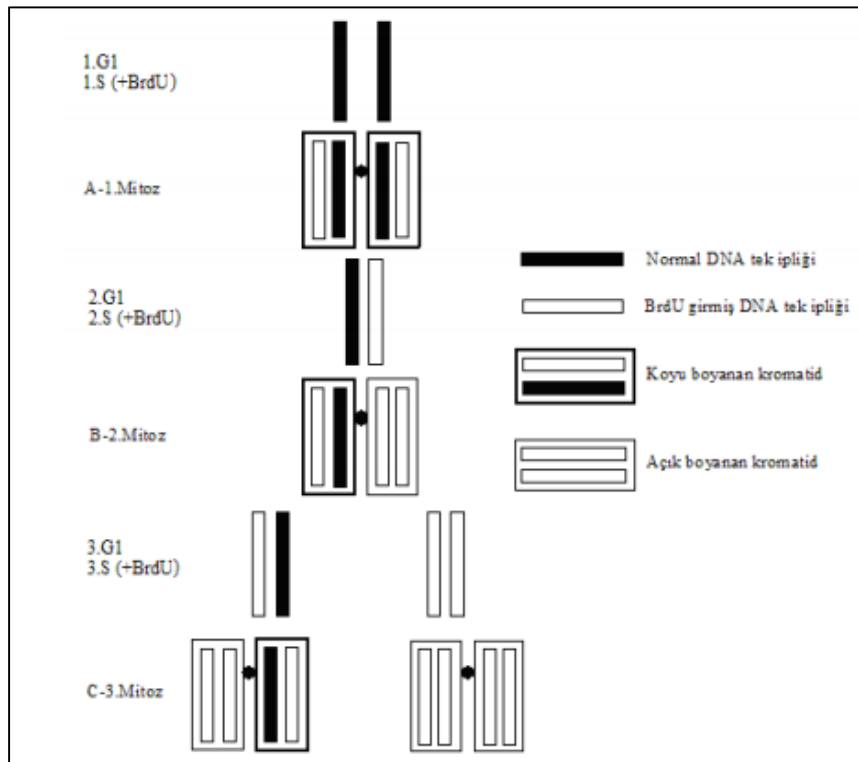
2.5.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kimyasal ajanların potansiyel “kromozomal mutajenitesini” belirlemek amacıyla kardeş kromatit değişimi testi 1970'lerden beri kullanılmaktadır (Stults, Killen, Marco-Casanova ve Pierce, 2020). KKD testi, kardeş kromatitler arasındaki DNA'nın fiziksel değişimini görsel olarak tespit etmek için kullanılan güçlü bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda KKD'lerin DNA'ya zarar veren ajanlar tarafından indüklendiği gösterilmiştir (Tumini ve Aguilera, 2021: 383, 393). KKD'ler kanser kemoterapötikleri dahil olmak üzere fiziksel, biyolojik ve kimyasal ajanlar tarafından onarılmamış DNA hasarının hassas biyobelirteçleridirler (Mourelatos, 2016; Veličkova ve Milev, 2020).

KKD, bir kromozomun homolog bölgelerinden kırılan iki kromatidinin, kırılan parçalarının yer değiştirmesinden sonra kırılma bölgelerinden tekrar birleşmesiyle oluşmaktadır (Wilson III ve Thompson, 2007). İnsan lenfosit hücrelerinde KKD sayımı esas olarak *in vitro* çalışmalarla belirlenmektedir. *In vivo* insan lenfositlerinde KKD oluşumunu sitostatik alkilleyici ajanlar önemli derecede artırmaktadır. KKD oluşumları, tek ve çift zincir kırılmalarına yanıt olarak replikasyon çatalının durması nedeniyle replikasyon işlemi sırasında ortaya çıkan hataların sonucudur. Kohezyondan kaynaklanan kardeş kromatitler arasındaki yakın mesafe nedeniyle, kromozomdaki özdeş DNA parçaları arasında değişim olmaktadır (Mourelatos, 2016; Wójcik ve Sokół, 2020). KKD sıklığı, hücrenin DNA hasarını doğru bir şekilde onarma ve DNA replikasyonundan önce lezyonları ortadan kaldırma potansiyeli ile bağlantılıdır. DNA hasarı KKD oluşumuna neden olmadan önce hücrelerin S fazından geçmesi bir zorunluluktur ve hücreler S fazına girmeden önce üretilen lezyonlar

tamamen onarılırsa, KKD frekansında bir artış görülmemektedir (Mourelatos, 2016). Bu teknikte, DNA kırıklarının görünür duruma getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu olan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesi kullanılmaktadır (Sezginer ve Dane, 2016). Kardeş kromatitlerin farklı şekilde boyanması sebebiyle bu yöntem, kültürleme işleminden sonra birinci mitoz, ikinci mitoz, üçüncü mitoz ve sonraki bölünme evrelerinde hücrelerin ayırımına olanak sağlamaktadır (Şekil 2.3). Bu nedenle, hücre proliferasyon indeksini hesaplamak için de KKD testinden yararlanılmaktadır (Mourelatos, 2016).

KKD frekansı, karsinojenik ve mutajenik etkisi olduğu bilinen ajanlara maruz kalan hücrelerde ve çeşitli kalıtsal hastalıklarda arttığı bildirilmiştir (Sezginer ve Dane, 2016). KKD frekansında artışa sebep olan herhangi bir maddenin, replikasyon mekanizmasını etkilediği ve DNA'da hasar meydana getirebileceğinin göstergesidir (Mourelatos, 2016; Veličkova ve Milev, 2020). KKD testinin mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi nedeniyle 2 Nisan 2014 tarihinde genetik toksikoloji test klavuzundan OECD kararı (Test no: 479) ile çıkarılmıştır (OECD, 2015).



Şekil 2.3. DNA yapısına katılan BrdU ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırımı (Kontaş, Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011)

2.5.3. Mikronükleus (MN) testi

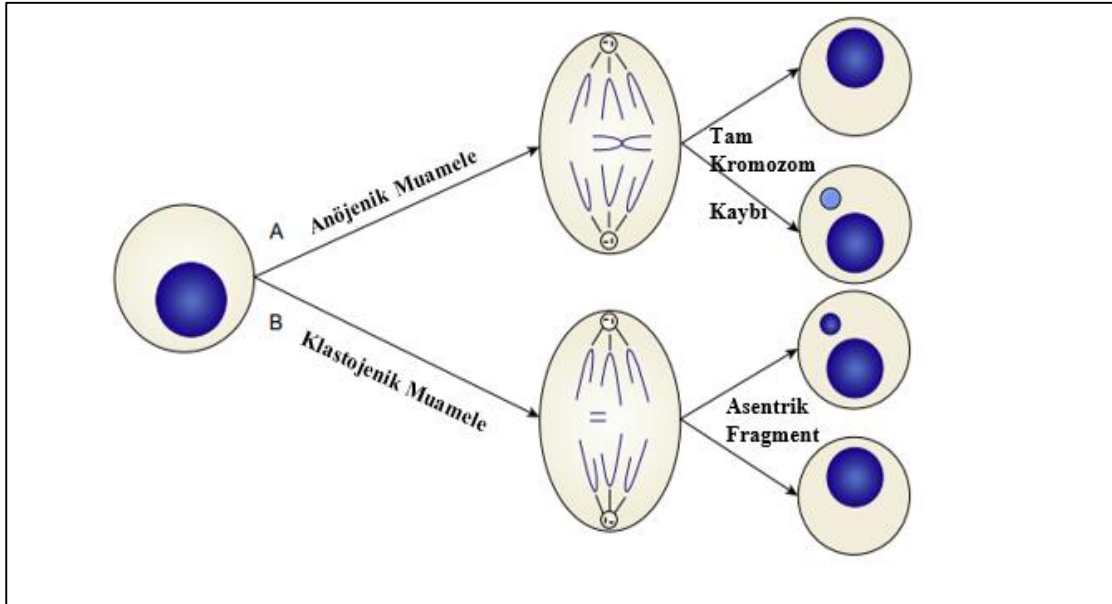
Mikronükleus testi ilk olarak 1950 yıllarında bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra 1970'li yıllarda hayvan hücrelerinde ve akabinde kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenlerinin etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Özkara ve Akyıl, 2015). İnsan lenfosit hücrelerinde kimyasal ve radyolojik genotoksinlere maruz kalmaktan kaynaklanan kromozomal hasarı belirlemek ve ölçmek için en yaygın olarak kullanılan *in vitro* yöntemlerden biridir (Rodrigues, Beaton-Green, Wilkins ve Fenech, 2018). Mikronükleus testi, çekirdek bölünmesini tamamlayan ancak sitoplazma bölünmesi sitokalsin-B ile engellenmiş hücrelerde çekirdek dışında kalmış genetik materyallerin belirlenmesine dayanır. DNA hasarının bir göstergesi olarak kullanılan basit, hassas ve kolay sonuç alınan bir tekniktir (Börçek-Kasurka, 2019; Setayesh ve diğerleri, 2020).

Mikronükleuslar esas çekirdeğe dahil olmayan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, tam kromozom veya asentrik kromozomdan oluşan yapılar olarak tanımlanmaktadır (Fenech ve diğerleri, 2020). Meydana gelen bu oluşumlar genellikle mitotik iğdeki hatalardan, hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, kromozomal hasarlardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından kaynaklanmaktadır (Özkara ve Akyıl, 2015). MN testi sadece kimyasallara ve radyasyona maruz kalmanın neden olduğu kanser risklerinin tespiti için değil, aynı zamanda kanser ve diğer hastalıkların teşhisi için de önemli bir belirteçtir (Bonassi ve Fenech, 2019). Yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerine sahip kişilerin lenfositlerinde yüksek oranda MN bulunmuştur (Milošević-Djordjevic, Grujicic, Vaskovic ve Marinkovic, 2010; George ve diğerleri, 2014; Setayesh ve diğerleri, 2020).

Kimyasal ajan kaynaklı olan mikronükleus oluşumları, klastojenik veya anöjenik etki göstermektedir (Benvindo-Souza, Assis, Oliveira, Borges ve de Souza Santos, 2017). Araştırmacılar tarafından geliştirilen modifiye yöntemlerle anöploidiye neden olan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkını kullanmışlardır. Klastojenik etki gösteren hücrelerde asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük boyutlu MN'ler oluşurken, anöjenik maddeler ile uyarılan hücrelerde ise tam kromozom içeren daha büyük boyutlu MN'ler meydana gelmiştir (Şekil 2.4) (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011; Russo ve Degraasi, 2018). MN içeriğinde oluşan kromozomal fragmentler, DNA sentez

hatalarından yada DNA zincir kırıklarından kaynaklanabilmektedir (Fenech ve diğerleri, 2016).

MN, metabolizma veya yaşlanma gibi doğal süreçlerin bir sonucu olarak veya birçok çevresel faktörler tarafından tetiklenebilir (Sommer ve diğerleri, 2020). Artan MN sıklığının DNA hasarı ve bazı hastalıkların oluşumunda yüksek riski göstermesi sebebiyle, normal populasyonlar ile çeşitli çevresel genotoksik ajanlara maruz kalan populasyonlar arasında kanser ve diğer hastalıklar için meydana gelen bu riskin değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında mikronükleus testi önemli rol oynamaktadır (Börçek-Kasurka, 2019).



Şekil 2.4. Mikronükleus oluşumunda klastojenik ve anojenik etkiler (D'Costa, Kumar ve Shyama 2019)

2.5.4. Comet testi

In vitro ve *in vivo* olarak çeşitli hücre ve dokularda birtakım ajanlar tarafından indüklenen DNA hasarı ve onarımını tespit etmek için yaygın olarak kullanılan comet testi, düşük maliyetli, güvenilir ve çok yönlü bir yöntemdir (Møller, 2018; Møller ve diğerleri, 2020). Özellikle lenfosit hücrelerinin comet testinde kullanımı altın standart olarak kabul edilmektedir (Souza ve diğerleri, 2019). Bu yöntem kimyasal ve fiziksel ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir tekniktir (Göney, 2016; Kılıç-Toprak ve diğerleri, 2019). 2014 yılında comet testi OECD tarafından kabul edilerek test yönergeleri (Test no: 489) içeriğine dahil edilmiştir (OECD, 2015). Tek hücreli jel

elektroforezi (SCGE) olarak da adlandırılan comet testinin günümüzde elektroforez tamponunun pH'ına göre değişiklik gösteren üç farklı versiyonu bulunmaktadır. Bunlar; ilk olarak 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından uygulanan nötr yöntem olup, esas olarak DNA çift-sarmal kırıklarını saptamaktadır. Daha sonra 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali comet versiyonu basit ve çift-sarmal kırıklarını ortaya koymaktadır. Yüksek pH (>13) yöntemi ise, çoğunlukla, denatürasyonu ve açılmayı kolaylaştırmak için kullanılır ve tek sarmal kırılmalarının dışında yalnızca alkaliye maruz kaldıktan sonra daha belirgin hale gelen DNA kırıklarını (alkaliye dayanıksız lezyonlar) ortaya çıkarmaktadır (Kalefetoğlu-Macar ve Macar, 2020: 96, 114).

DNA, metabolizma tarafından üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri veya eksojen ajanlar tarafından zarar görebilir. Hasarlı bir DNA düzgün tamir edilemezse; mutasyonlar, hücre ölümü veya yaşlanmanın neden olabileceği kanser ve kronik hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, DNA hasarının belirlenmesi belirli bileşiklerin genotoksik ve karsinojenik potansiyelini saptamak için önemlidir. DNA hasarını değerlendirmek için birkaç yöntem olmasına rağmen DNA zincir kırılmalarını tespit etmek için yüksek duyarlılığı nedeniyle comet testi yaygın kullanılmaktadır (Hong ve diğerleri, 2020). Comet tekniği, hücrelerin agaroz içerisine gömülüp proteinler uzaklaştırıldıktan sonra farklı elektrik yük ve molekül ağırlıklarında olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda anoda doğru göç etmeleri esasına dayanmaktadır (Bivehed, Söderberg ve Hellman, 2020). Elektroforez sırasında, hasarlı DNA zincir kırıkları ortaya çıkarken, süper sarmal haldeki hasarsız DNA bozulmadan kalır. Hasarlı DNA'nın bu gevşemiş yapıları baş ve kuyruk içeren bir kuyruklu yıldız şeklinde yapı oluşturmak için anoda doğru uzanmaktadır (Gyori, Venkatachalam, Thiagarajan, Hsu ve Clement, 2014). Comet metodu ile DNA hasarının kantitatif olarak tespit edilmesi için; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri çoğunlukla kullanılmaktadır. Kuyruk uzaması meydana gelen hasar ile doğru orantılı olup, kuyruktaki floresan yoğunluğu ve kuyruk momenti de DNA hasarı ile paralel olarak değişkenlik göstermektedir (Kılıç-Toprak ve diğerleri, 2019).

DNA'da artan hasar seviyeleri ve DNA onarımının mekanizmalarındaki hatalar kanserin patogenezi ve ilerlemesini başlatan temel moleküler olaylardır ve bu nedenle kanser ve diğer kronik hastalıkların anlaşılması açısından, comet testi ile DNA hasarı ve onarım mekanizmalarının araştırılması büyük önem taşımaktadır (Gunasekarana, Raj ve Chand, 2015). Yapılan birkaç çalışmada comet testinin, kanser gelişiminin prognozunda bir

biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Islam ve Kabir, 2019; Vodicka, Vodenkova, Opattova ve Vodickova, 2019; Bonassi ve diğerleri, 2021).

2.6. YFMS ve FR İle İlgili Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları

Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan YFMS (Yüksek fruktozlu mısır şurubu)'nun HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkisinin ve insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. YFMS'nun genotoksik etkilerinin incelendiği sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Elseehy, (2015) Allium testi kullanarak YFMS'nun beş farklı (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 mL/L) konsantrasyonunun genotoksik etkisini incelemiştir. YFMS ile muamele edilen kök uçlarında en yüksek 1 ve 2 mL/L olan iki konsantrasyonun mitotik bölünmeyi engellediği saptanmış ve konsantrasyon artışına (0,25 ve 0,5 mL/L) bağlı olarak mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli kromozomal anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir (Elseehy, 2015).

FR'un HepG2 hücrelerinde sitotoksik ve insan lenfositlerinde genotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. FR'un farklı hücreler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Lodha, Rajasekaran, Jayavelu ve Subramaniam (2020), FR'un fare motor nöron hücre hattında (NSC-34) % 0,5-5 konsantrasyon aralığında MTT testi ile sitotoksik etkisini araştırmışlardır. FR' un % 4 ve 5 konsantrasyonlarının hücre canlılığını azaltarak sitotoksik etkiye neden olduğunu saptamışlardır (Lodha ve diğerleri, 2020). Bir diğer çalışmada ise; FR'un 2,5; 5; 10; 20 ve 40 mM konsantrasyonlarında WIL2-NS (insan dalak B lenfoblast) hücre hattında sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi kullanılarak genotoksik etkisi incelenmiştir. FR'un konsantrasyon artışına bağlı olarak mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekanslarını anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir (Deo ve diğerleri, 2020). Hansen ve diğerleri (2008), ratların kolon ve karaciğeri üzerinde FR'un genotoksik etkilerini araştırmışlardır. FR'un belirlenen % 30 konsantrasyonu ile muamele sonucunda DNA zincir kırıklarına neden olmadığı buna karşın, kolon ve karaciğerde DNA eklenti seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir (Hansen ve diğerleri 2008). Başka bir çalışmada, FR'un % 10 ve 20' lik konsantrasyonları Swiss farelerin hamilelik ve emzirme dönemlerinde uygulanarak comet ve MN testleri ile genotoksik etkileri incelenmiştir. FR'un uygulanan tüm konsantrasyonları DNA hasarını artırarak genotoksik etki ve % 10 konsantrasyonu MN sıklığını artırarak klastojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Magenis ve diğerleri, 2020).

Isıtılmış 0,67 M FR ve 0,67 M lisin (şeker/aminoasit) karışımını pH: 7 ve pH: 10 olmak üzere ayarlayarak 0,5 ml/30 g vücut ağırlığı konsantrasyonunun fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi ile klastojenik etki araştırılmıştır. Ayrıca pH: 7 için 3,12; 6,25; 12,50 ve 25,00 mM ve pH: 10 için 1,60; 3,12; 6,25 ve 12,50 mM konsantrasyonları kullanılarak Ames testi ile mutajenik etki ve Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde kromozomal anormallik testi ile genotoksik etki incelenmiştir. Isıtılmış FR ve lisin karışımının klastojenik etkiye neden olmadığı belirlenmiş olup diğer uygulamada FR'un yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve mutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Macgregor ve diğerleri, 1989).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu araştırmada, gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) ve Fruktozun (FR) insan karaciğer karsinoma HepG2 hücre hatlarında olası sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile incelenmiştir. Ayrıca, YFMS ve FR'un olası genotoksik etkileri insan periferik kan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda Kromozomal anormallik (KA), Kardeş kromatit değişimi (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet test yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

İnsan karaciğer karsinoma HepG2 hücreleri Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hücre Kültürü Laboratuvar'ından temin edilmiştir (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu-ATTC, HB-8065). Periferik kan, ilaç, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü bulunmayan 23-27 yaşlarında iki kadın ve bir erkek donörden alınmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Etik Kurulu'nun 11.11.2019-144 ve 22.03.2021-283 sayılı izinleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Test materyalleri

Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS)

YFMS (% 55'lik), Adana'dan bir firmadan temin edilmiştir. Firmadan temin edilen Yüksek fruktozlu mısır şurubun içeriği Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Yüksek fruktozlu mısır şurubu içeriği

Kuru madde (%77)	Su (% 23)				
% 55-YFMS	Fruktoz (% 55)	Glikoz (% 40)	Maltoz % 2,5		+ yüksek şekerler
			maltotrioz (DP3)	maltotetroz (DP4)	

Fruktoz (FR)

Kimyasal adlandırması: D-(–)-Fructose

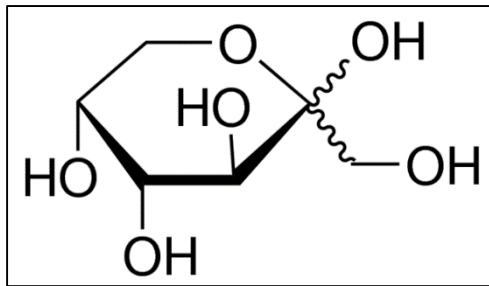
Molekül ağırlığı: 180,16 g/mol

Molekül formülü: C₆H₁₂O₆

CAS No: 57-48-7 (Sigma-Aldrich)

Safılık: ≥ 0,99

Yapısal Formülü: Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Fruktozun yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2021)

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Fruktoz (Katalog No: 57-48-7), Sitokalsin B (CAS No: 14930-96-2), Metil alkol (CAS No: I624608208), Glisial asetik asit (Katalog No: 64-19-7), Giemsa (Katalog No: HX947066), Mitomisin C (Katalog No: 200 008-6), KH₂PO₄ (Katalog No: A585477452), Entellan (Katalog No: 1079610500), Bromodeoksiüridin (Katalog No: 59-14-3), LymphoPlus Medium (Katalog No: CY100-100), NaCl (Katalog No: 7647-14-5), Kolkisin (Katalog No: 64-86-8), Dulbecco's Modified Eagle Medium without phenol red (DMEM) (Katalog. No. F0475), Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (DMEM) (Katalog. No. F0445), fetal bovine serum (FBS) (Katalog. No. S0613), PBS (Katalog No. L1825), L-glutamine (Katalog. No. K0283), penicillin/streptomycin (Katalog. No. A2213), trypsin (Katalog. No. L2163) Biochrome'den, *In Vitro* Toxicology Assay Kit-MTT based (Sigma Tox-1) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Formaldehit (Katalog No: 50-00-0) Carlo Erba'dan, KCl (Katalog No: 7447-40-7), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), Low-Melting Agar (Katalog No: 9012-36-6), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1),

Dimetil sülfoksit (Katalog No: 67-68-5), Normal-Melting Agar (Katalog No: 9012-36-6) ve etidyum bromid (Katalog No:1239-48-8) ise AppliChem'den temin edilmiştir.

3.2. Metot

Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan YFMS ve FR'un potansiyel sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile ve sitotoksik ve genotoksik etkileri ise Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatit Değişimi (KKD), Mikronükleus ve Comet test yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi:

Bu çalışmada, Bakanlar Kurulu tarafından oluşturulan, gıdalarda kullanımına izin verilen % 5 YFMS kota değeri dikkate alınarak laboratuvar koşullarında HepG2 hücrelerinde MTT testi ve insan lenfositlerinde mitotik indeks analizleri ile gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda konsantrasyonlar belirlenmiştir. YFMS'nun % 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30 konsantrasyonları denenmiş ve bu ön denemelerin sonuçlarına % 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30 konsantrasyonları belirlenmiştir. FR maddesinin tüm testlerde kullanılan konsantrasyonların belirlenmesinde literatürde geçen ratlarda oral LD₅₀ (4000 mg/kg) dozu referans değeri dikkate alınarak HepG2 hücrelerinde MTT testi ve insan lenfositlerinde mitotik indeks analizleri ile gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda FR'un 62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonları seçilmiştir.

3.2.1. HepG2 hücrelerinde MTT testi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi Mossman (1983)'ün metoduna göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Testin gerçekleştirilmesinde In Vitro Toxicology Assay Kit, MTT based (Sigma Tox-1) kiti kullanılmıştır. İnsan karaciğer karsinoma HepG2 hücre hattı standart ortamda (nemlendirilmiş, % 5 CO₂/ % 95 hava, 37° C) 75 cm⁻¹ kültür flasklarında % 10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren ve 2 mM L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içerisinde hücreler istenilen sayıda çoğaltılmıştır. Geliştirilen HepG2 hücreleri her bir kuyucuğa 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara aktarılmıştır ve burada hücrelerin kuyucuklara tutunması için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. YFMS' nun % 5; 7,5; 10; 15;

20 ve 30 konsantrasyonları; FR'un ise 62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonları hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ayrıca çalışılacak kimyasal ile muamele edilmemiş kontrol kuyucuğu da bulundurulmuştur. YFMS ve FR distile suda çözünmüştür. İnkübasyon süresi bitiminde her bir kuyucuğa MTT çözeltisinden ilave edilip mor formazan kristalleri oluşuncaya kadar yaklaşık 3 saat CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa kitteki çözücü çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra plak kuyucuklarının absorbans değerleri (Abs) Elisa Reader (Molecular Devices Spectramax M5) mikroparka okuma cihazında 570 nm dalga boyunda okutularak belirlenmiştir. Tüm bu işlemler farklı zamanlarda üç defa tekrarlanmıştır.

Deney sonucunda, çalışılan her bir konsantrasyon için elde edilen üç farklı absorbans değerinin ortalaması alınıp, ortalama absorbans (ABS ortalama) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlere göre YFMS ve FR maddelerinin canlılık (% canlılık) değerleri aşağıdaki formüle göre takip edilmiştir.

% Canlılık= [Test Maddesi Absorbans (ortalama) / Kontrol Absorbans (ortalama)] x 100
(Meky, Hardie, Evans ve Wild, 2001).

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

Periferik insan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) testi Evans ve arkadaşlarının (1984: 405, 424) metoduna göre bazı modifikasyonlarla (Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal ve Aksoy, 2006), Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemine göre bazı değişikliklerle (Speit ve Haupter, 1985) uygulanmıştır. Buna göre heparinize edilmiş gönüllü donörlerden alınan kanın 0,2 mL'si, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi ortamı (LymphoPlus Medium) içeren tüplere eklenmiştir. Daha sonra, steril şartlarda hazırlanmış aynı tüplere 5-Bromo-2-deoksiüridin (Bromodeoksiüridin (BrdU)) solüsyonundan 10 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiş ve kültür tüpleri toplam 72 saat boyunca 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra YFMS % 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30 konsantrasyonları ve FR'un 62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonları ile genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla hücreler muamele edilmiştir. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce (70. saatinde) ise hücreleri ön işleme tabi tutmak amacıyla her tüpe kolkisin çözeltisinden

0,06 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Her bir uygulamada negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da 0,20 µg/mL'lik Mitomisin-C (MMC), kullanılmıştır. 72 saatlik inkübasyonun sonunda tüpler etüvden çıkarılarak 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan kısma 0,075M KCl hipotonik çözeltisinden 5'er mL eklenmiştir. Kültür tüpleri 37°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiş ve ardından 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır. Daha sonra soğuk 3:1 metanol:asetik asitten hücrelere 5'er mL hacimde ilave edilmiş ve 3 kez tespit işlemi uygulanmıştır. Bu süre sonunda pipetaj yapılarak homojen hale getirilen tüpün dibindeki hücre süspansiyonu önceden temizlenmiş lamalar üzerine farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması:

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin gözlenmesi amacıyla preparatlar Sorensen tamponuyla hazırlanmış % 5'lik Giemsa boyası ile (pH: 6,8) oda sıcaklığında 20-25 dakika boyanmıştır. Kardeş kromatit değişimlerinin gözlenmesi ve replikasyon indeksinin belirlenmesi için ise Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta bazı değişiklikler yapılarak floresan+Giemsa boyaması uygulanmıştır (Speit ve Haupter, 1985). Bu uygulamada preparatlar düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH: 6,8) ile kapatıldıktan sonra 254 nm dalga boyunda kapalı ortamda 13 dakika süreyle ışınlanmıştır. Bu süre sonunda yıkanmış olan preparatlar, 58-60°C sıcaklığa getirilen 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra % 5'lik Giemsa ile (pH: 6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Saf suda yıkanıp kurutulan preparatlar entellan ile daimi hale getirilerek mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin belirlenmesi:

Kromozom anormalliklerinin belirlenmesi için, kromozomları iyi dağılmış olan iki kadın ve bir erkek bireye ait her birinden 100 metafaz hücresi olmak üzere toplam 300 metafaz hücre incelenmiştir. İncelenen tüm hücreler için anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) belirlenmiştir. Mitotik indeksin (MI) saptanmasında ise, her uygulama grubu için her bir donörden hazırlanan preparatlardan 1000'er hücre (toplam 3000 hücre) değerlendirilmiştir.

Kardeş kromatit değişiminin ve replikasyon indeksinin belirlenmesi:

Kardeş kromatit değişimlerinin belirlenmesinde her bir uygulama grubunda iki kadın ve bir erkek donöre ait preparatlarda kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre (iki kadın ve bir erkek, toplam 75 hücre) incelenmiştir. Kardeş kromatit değişimini saptamak için, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analoğu olan BrdU kültür ortamına eklenmiştir. Böylece hücre bölünmek için DNA'sını replike ettiği aşamada yeni sentezlenmiş olan komplementer polinükleotid ipliğe timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçmiştir. UV ile ışınlama işleminden hemen sonra boyanan hücre kromozomlarında, BrdU içeren bölgeler açık renkte boyanırken, BrdU içermeyen bölgeler koyu renkte boyanır. Boyanma işleminde meydana gelen bu fark kullanılarak DNA'da kardeş kromatitler arasındaki değişimler tespit edilmiştir. Kardeş kromatit değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir.

Replikasyon indeksini ($R\bar{I}$) hesaplamak için, her bir donörden 100 hücre olmak üzere toplamda 300 hücre (2 kadın ve 1 erkek) incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi ($R\bar{I}$)= $[1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)]/N$ (N= incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle göre hesaplanmıştır.

3.2.3. Kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus testi Fenech (2000)'in metodu bazı değişikliklerle uygulanmıştır. Bu metoda göre öncelikle her donörden alınan heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kan, içerisinde 2,5 mL'lik besi ortamı bulunan (LymphoPlus Medium) tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37°C sıcaklıktaki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürdeki hücreler YFMS (% 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30) ve FR (62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL) konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiştir. Buna ilaveten bir pozitif (MMC, 0,20 µg/mL) ve bir de negatif kontrol kullanılmıştır. İnkübasyonun 44. saatinde sitokinezi engellemek için Sitokalsin-B (5,2 µg/mL) ilave edilmiştir. Kültür süresi tamamlandıktan sonra tüpler, 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Geriye kalan kısma 0,075 M soğuk KCl solüsyonundan eklenilerek buzdolabında bekletilmiştir. Takiben tüpler yine aynı

süre ve aynı rpm’de santrifüj edilip ve süpernatant atılmıştır. Bu işlemin hemen ardından 3:1 metanol: asetik asitten oluşan fiksatif ile fiksasyon işlemi uygulanmıştır. İlk fiksatitten sonra tüpler 15 dakika bekletilmiş olup fiksasyon 3 kez tekrarlanmıştır. Fiksasyon işlemi 2 kez uygulandıktan sonra üçüncü fiksatife son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant atılarak, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetle homojenize edilmiştir. Daha önceden temizlenmiş olan lamalar üzerine, farklı alanlara birer damla damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Preparatlar 24 saat kuruması için oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Preparatların boyanması:

Mikronükleus, testi için hazırlanan preparatlar % 5’lik Giemsa’da (pH=6,8) 15 dakika sürede boyanmıştır. Preparatlar, oda sıcaklığında kurutularak entellan ile daimi hale getirilmiştir. Bir gece kurutulan preparatlar mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Mikronükleus (MN) ve nükleer bölünme indeksinin (NBİ) belirlenmesi:

Mikronükleus testinde, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirilememiş binükleat (çift çekirdekli) hücreler değerlendirilmektedir. Çünkü bu hücreler genotoksitesisi test edilmek istenen materyalin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Bu çalışmada 1 erkek ve 2 kadın donöre ait her bir preparattan 1000 hücre olmak üzere toplam 3000 tane binükleat hücre değerlendirilmiştir. Mikronükleus içeren hücreler 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu olmak üzere sayılmış ve $[1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]/N$ (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) hesaplanmıştır. Nükleer bölünme indeksinin (NBİ) belirlenmesinde ise her bir uygulama ve kontrol grubu için toplam 500 hücre (1 erkek ve 2 kadın donörden toplam 1500 hücre) değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) olmalarına göre NBİ $[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)]/N$ (N= İncelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.4. İzole edilmiş insan periferik lenfositlerinde comet testi

Comet testi için Singh, McCoy, Tice ve Schneider'ın (1988) kullandıkları metot bazı değişikliklerle uygulanmıştır. İlk olarak sağlıklı donörlerden alınan periferik kan soğuk ortamda PBS ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon işleminin ardından Biocoll kullanılarak yine soğuk ortamda lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositlerde hücre canlılığı Trypan mavisi kullanılarak değerlendirilmiş ve bu değer $\geq$ % 96 olarak belirlenmiştir. İzole edilmiş olan lenfositler YFMS'un % 5; 7,5; 10; 15; 20 ve 30 konsantrasyonları; FR'un 62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları ile 37°C 'de bir saat muamele edilmiştir. Tüm uygulamalarda negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak da 100 μM H_2O_2 kullanılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda santrifüj işlemi yapılarak süpernatant atılmış ve hücreler PBS ile resüspanse edilmiştir. Lenfositler düşük erime ısıları agar ile karıştırılarak önceden yüksek erime ısıları agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır. Lamelle kapatılan preparatlar buzdolabında 1 saat lysing solüsyonunda inkübasyona alınmıştır. Ardından elektroforez tamponunda 20 dk bekletilerek ve 25 V, 300 mA'de 20 dakika elektroforez uygulanmıştır. Elektroforezin ardından nötralizasyon tamponunda (0,4 M Tris, pH=7.5) bekletilen lamalar, etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak mikroskopik incelemeye alınmıştır. Her bir konsantrasyon için her donörden 100'er hücre olmak üzere toplam 300 hücre floresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin hasar dereceleri % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu (μm) ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormallliği ve mikronükleus frekansı sonuçları z-testi ile değerlendirilirken, comet testi ve kardeş kromatit değişimi sonuçları ise SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak t-testi ile analiz edilmiştir. MTT testinin sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ise, SPSS 15.0 bilgisayar programında One Way ANOVA-Dunnet testi kullanılmıştır. Anormal hücre sıklığı, KA/ Hücre sayısı, KKD/ Hücre sayısı, replikasyon indeksi, mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi, MN/ Hücre sayısı, % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu (μm) ve kuyruk momentinin konsantrasyon-etki ilişkisini incelemek için SPSS 15.0 programı kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

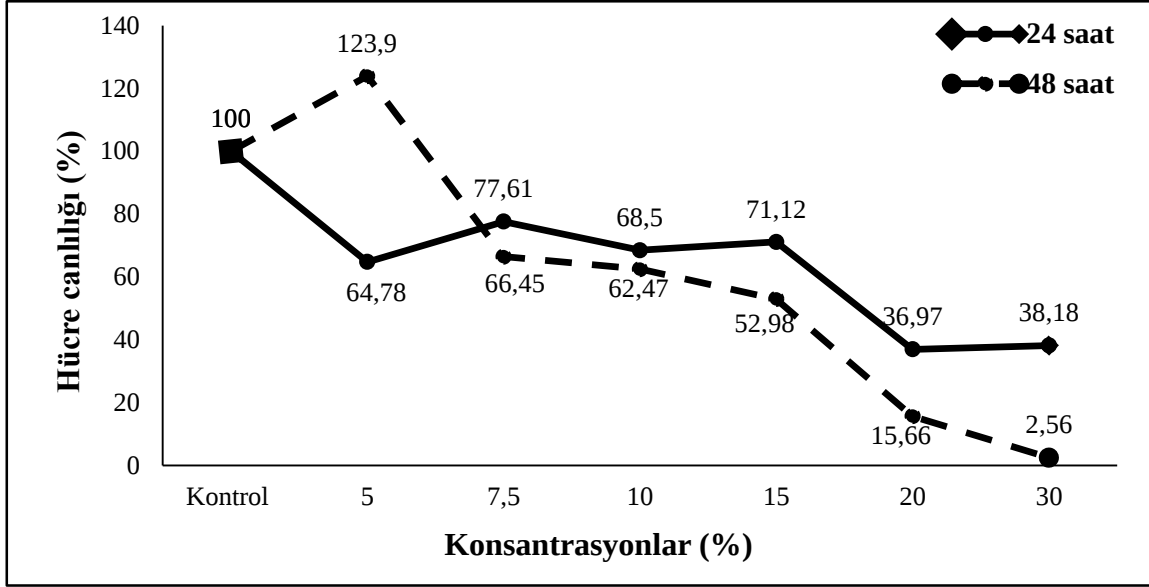
4.1. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubunun Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.1.1. MTT testi sonuçları

Yüksek fruktozlu mısır şurubunun HepG2 hücreleri ile muamelesi sonucunda 24 saatlik uygulamada çalışılan tüm konsantrasyonlarda (% 5; 7,5; 10; 15; 20; 30); 48 saatlik uygulamada ise % 7,5; 10; 15; 20; 30 konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı oranda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca YFMŞ'un HepG2 hücreleri ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucunda özellikle çalışılan yüksek konsantrasyonların (% 7,5; 10; 15; 20; 30) (%) hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı oranda düşürdüğü belirlenmiştir ($r=-0,81$; $r=-0,84$; sırasıyla). YFMŞ'un uygulanan en düşük konsantrasyonun (% 5) ise, 48 saatlik muamelede HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını (% 123,90) artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, HepG2 hücrelerinde YFMŞ'nun özellikle yüksek konsantrasyonlarının (% 20 ve 30) canlı hücre yüzdesini önemli oranda düşürdüğü ($P<0,0001$) ve bu konsantrasyonların yüksek sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. YFMŞ'un gıdalara eklenen değer olan % 5 (48 h hariç) ve % 10'luk konsantrasyonlarının kontrole göre anlamlı düzeyde sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca hücrelerin % 50'sini öldüren değer olan IC_{50} değeri 48 saatlik muamelede %15'lik konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. YFMŞ'nun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Test Maddesi	Uygulama		24 saat	48 saat
	Konsantrasyon (%)	N	Mean±SS	Mean±SS
Kontrol	0,00	3	1,849± 0,032	2,009±0,186
YFMŞ	5	3	1,198±0,175 *	2,369±0,357
	7,5	3	1,435±0,261 *	1,337±0,170 *
	10	3	1,267±0,128 *	1,276±0,151 *
	15	3	1,315±0,161 *	1,001±0,052 * #
	20	3	0,684±0,075 *	0,299±0,023 *
	30	3	0,706±0,109 *	0,324±0,013 *
YFMŞ: Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu, HepG2: İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı, SS: Standart Sapma * $p<0.05$ göre istatistiksel olarak anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Testi) # IC_{50} değeri				



Şekil 4.1. YFMS'nun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde (%) hücre canlılığı değerleri

4.2. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubunun Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Kromozom anormallik (KA) testi sonuçları

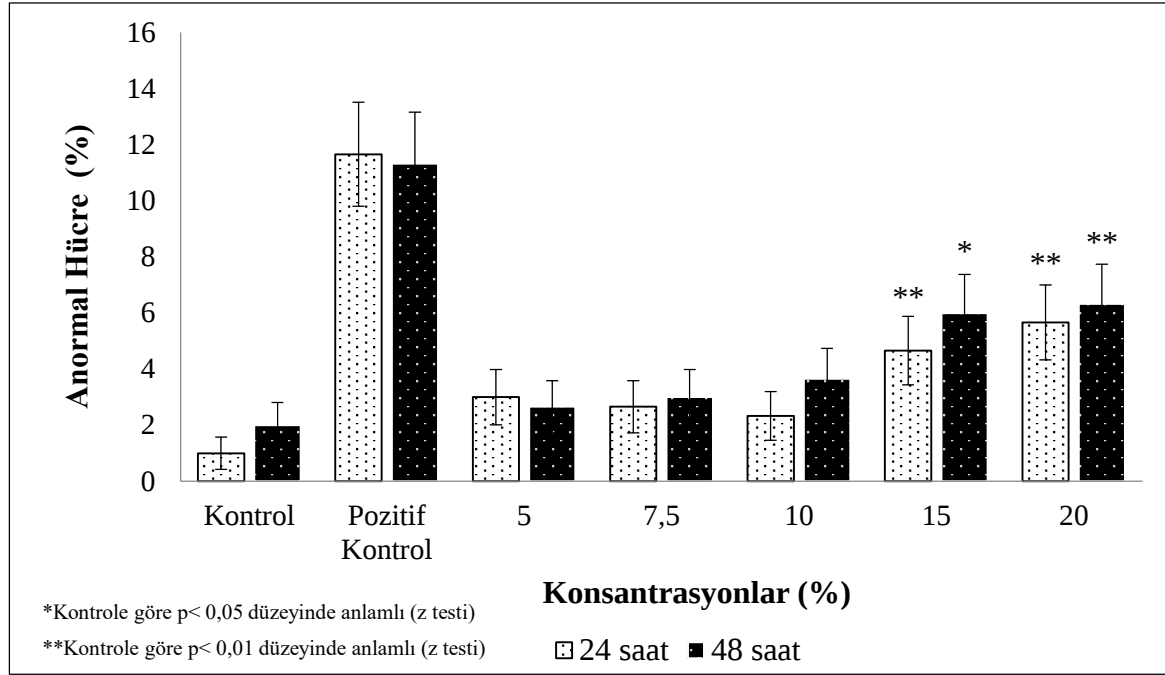
YFMS'nun altı farklı konsantrasyonunun (% 5; 7,5; 10; 15; 20; 30) insan lenfositleri ile 24 ve 48 saat süre ile muamelesi sonucunda, belirlenen yapısal ve sayısal kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansları, hücre başına düşen anormallik değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3). YFMS ile muamale sonucunda meydana gelen yapısal anormallikler; kromatit kırığı (% 37,4), kardeş kromatitlerde birleşme (% 33,4), kromozom kırığı (% 10,8), kromatit değişimi (% 5,9), disentrik kromozom (% 2,4) ve fragmenttir (% 0,4). Gözlenen sayısal anormallik ise poliploidi (% 7,8) ve endoredublikasyondur (% 1,4) (Resim 4.1).

YFMS'nun, (%) anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik oranını (24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda % 5; 7,5; 10 konsantrasyonları hariç) sadece en yüksek iki konsantrasyonda (% 15 ve 20) kontrole göre anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonun ise (% 30) toksik etki gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2, Şekil 4.3). Anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik oranındaki bu artışlar konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için $r=0,93$ ve hücre başına düşen anormallik sayısı için $r=0,91$; 48 saatlik

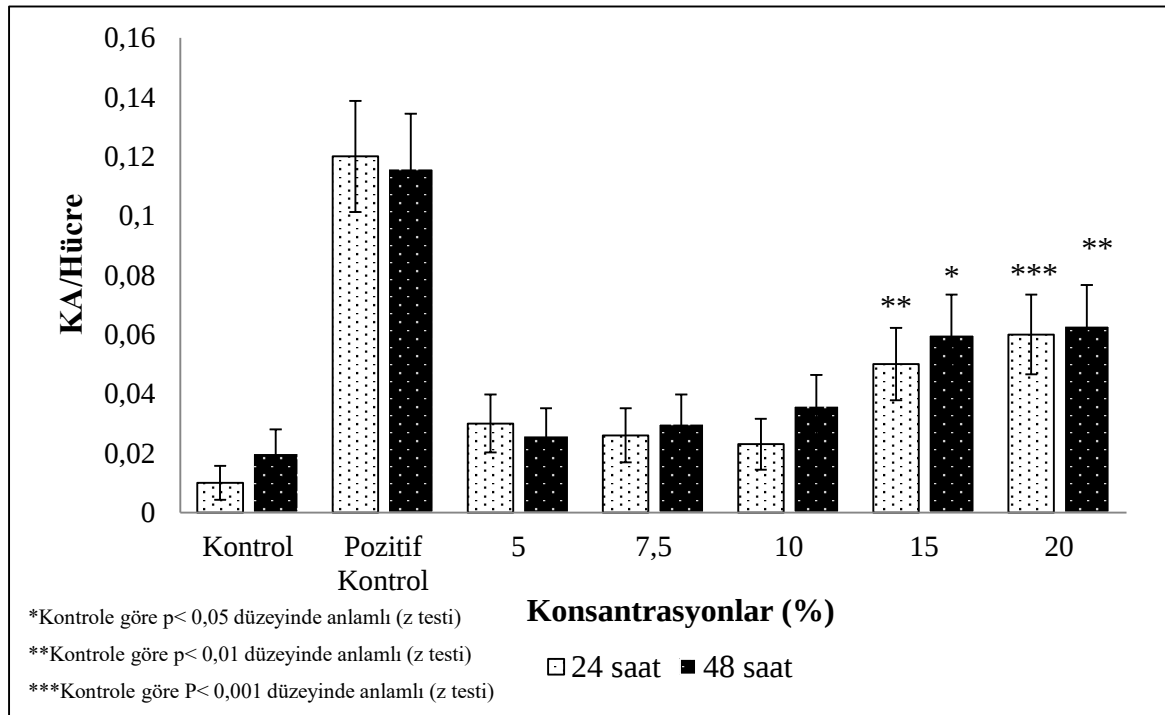
uygulamada anormal hücre yüzdesi için $r=0,96$; hücre başına düşen anormallik sayısı için $r=0,94$).

Çizelge 4.2. YFMŞ'nun insan lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları üzerine etkisi

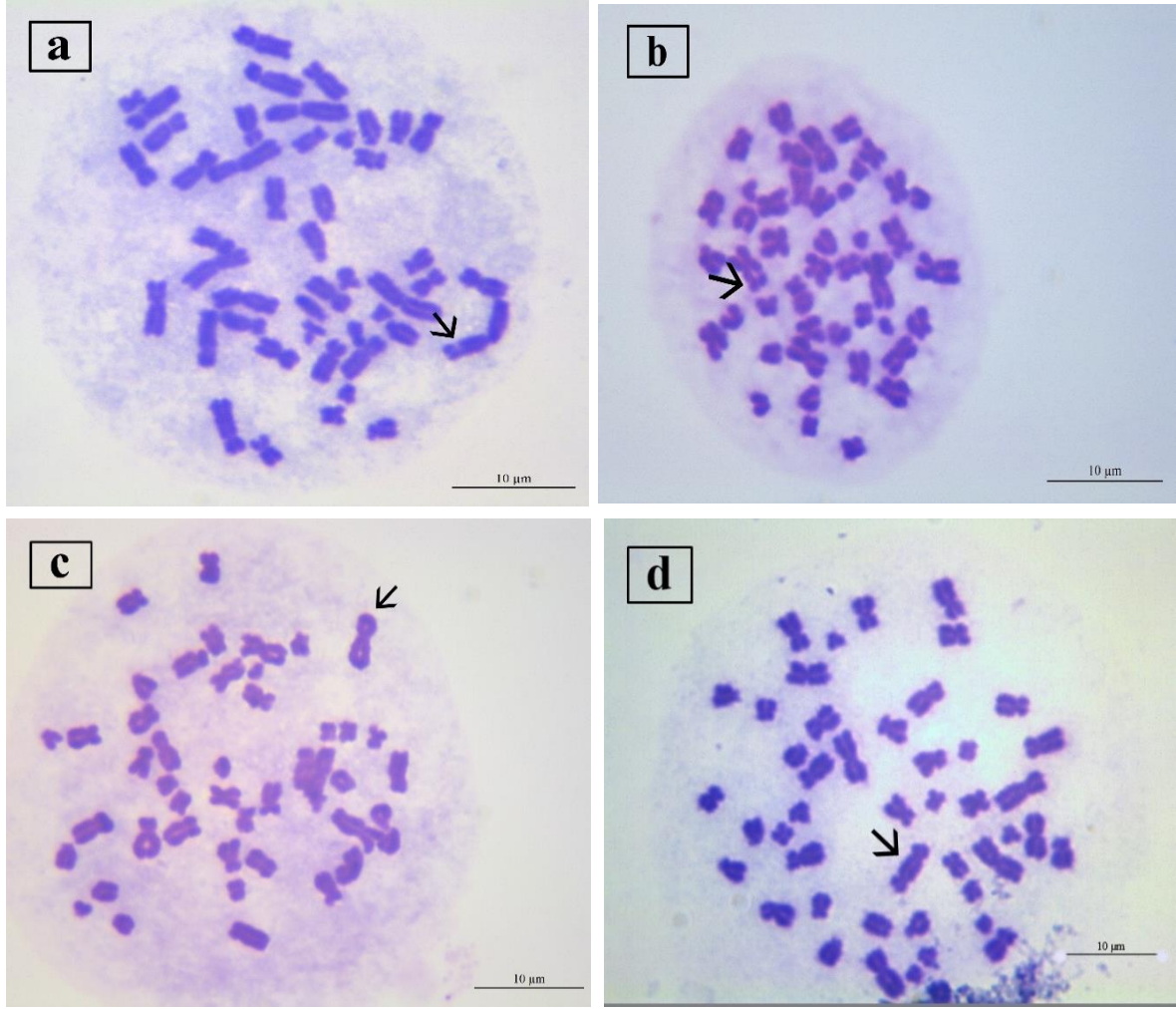
Test Maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (%)										
			ktk	kzk	kkb	ds	ktd	f	er	p		
Kontrol	24	0,00	-	1	1	-	-	-	-	1	1,00±0,57	0,010±0,005
PK(MMC)	24	0,20 (µg/mL)	13	4	12	-	3	-	-	4	11,66±1,85	0,120±0,018
YFMŞ	24	5	6	-	3	-	-	-	-	-	3,00±0,98	0,030±0,010
		7,5	1	1	6	-	-	-	-	-	2,66±0,92	0,026±0,009
		10	3	1	3	-	-	-	-	-	2,33±0,87	0,023±0,008
		15	6	2	6	1	-	-	-	-	4,66±1,21 **	0,050±0,012 **
		20	11	2	3	-	-	-	-	2	5,66±1,33 **	0,060±0,013 ***
		30	-	-	-	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik
Kontrol	48	0,00	-	1	4	-	-	-	-	1	2,00±0,80	0,020±0,008
PK(MMC)	48	0,20 (µg/mL)	11	5	8	1	6	-	1	3	11,33±1,82	0,116±0,018
YFMŞ	48	5	2	1	3	-	-	-	-	2	2,66±0,92	0,026±0,009
		7,5	4	1	2	1	-	-	-	1	3,00±0,98	0,030±0,009
		10	6	3	2	-	-	-	-	-	3,66±1,08	0,036±0,010
		15	8	-	7	1	1	-	-	1	6,00±1,37 *	0,060±0,013 *
		20	5	-	7	1	2	1	2	1	6,33±1,40 **	0,063±0,013 **
		30	-	-	-	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik
Kromozomal anormallik yüzdesi (%)			37,4	10,8	33,4	2,4	5,9	0,4	1,4	7,8		
PK (MMC): Pozitif kontrol- Mitomisin C, YFMŞ: Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu, SH: Standart Hata, ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, ktd: kromatit değişimi, f: fragment, er: endoredublikasyon, p: poliploidi *Kontrolle göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) **Kontrolle göre p< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Kontrolle göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)												



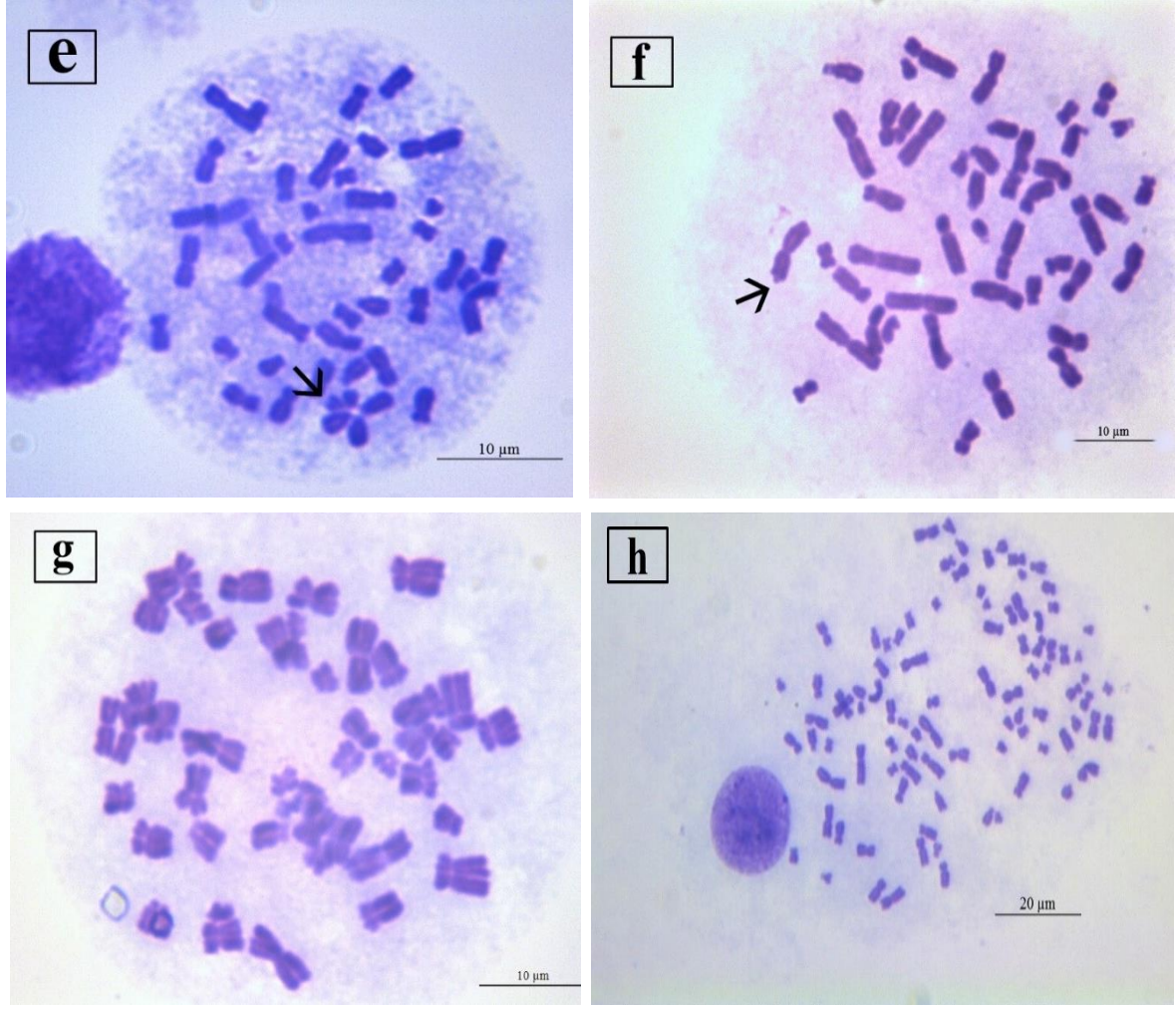
Şekil 4.2. YFMS uygulamasının insan periferel lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.3. YFMS uygulamasının insan periferel lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi



Resim 4.1. YFMŞ uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik kromozom e) kromatit değişimi f) fragment g) endoredublikasyon h) poliploidi

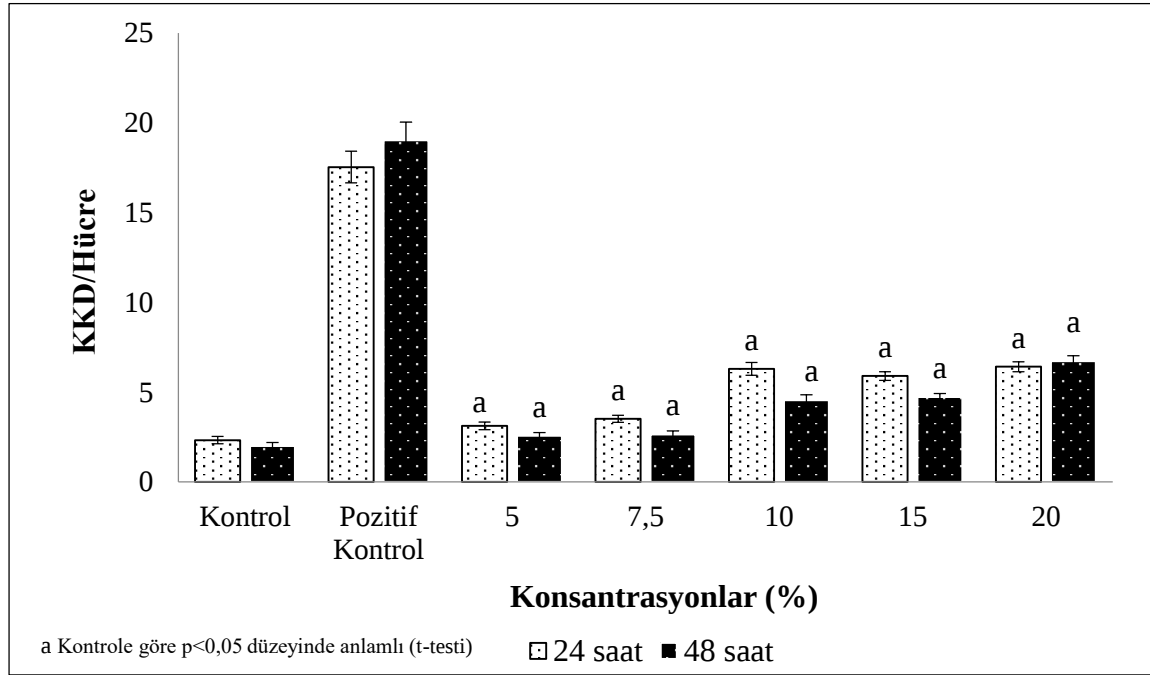


Resim 4.1. (Devam) YFMS uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) disentrik kromozom e) kromatit değişimi f) fragment g) endoredublikasyon h) poliploidi

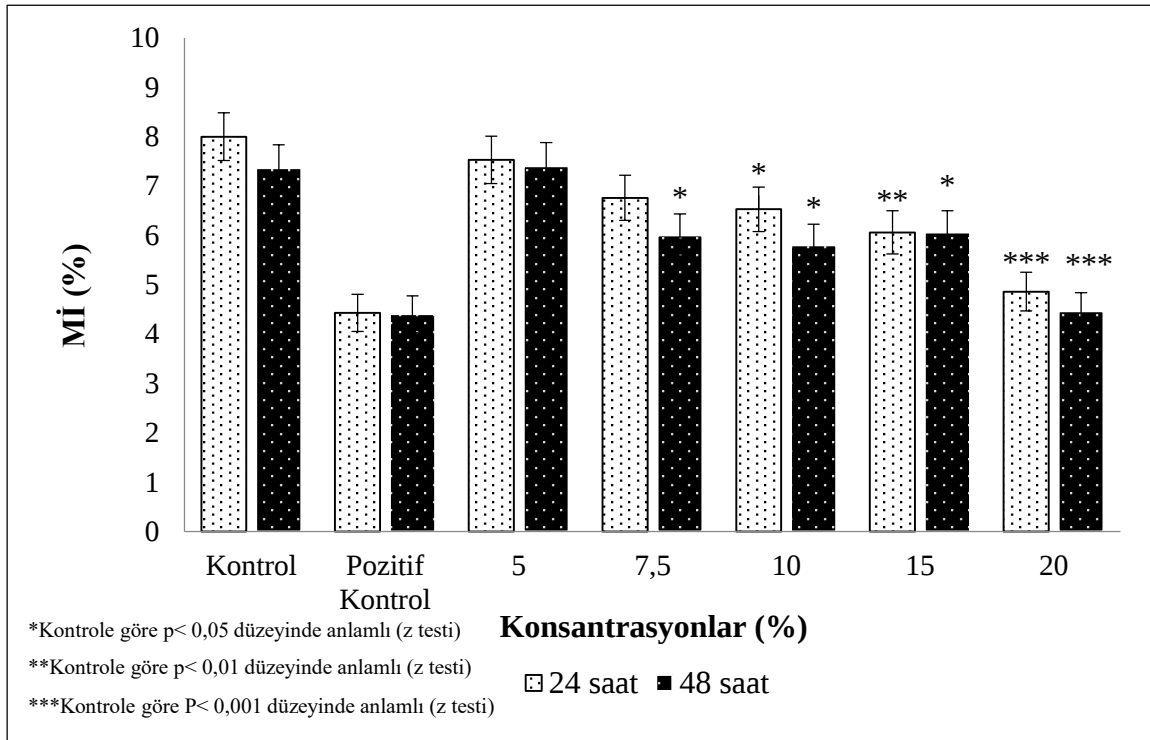
4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları

YFMS'nun insan periferik lenfosit hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamele süresindeki KKD frekansları, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkileri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu çalışmada YFMS, uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde KKD oluşumunu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda konsantrasyona bağlı şekilde ($r=0,89$; $r=0,95$; sırasıyla) artırmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.4, Resim 4.2).

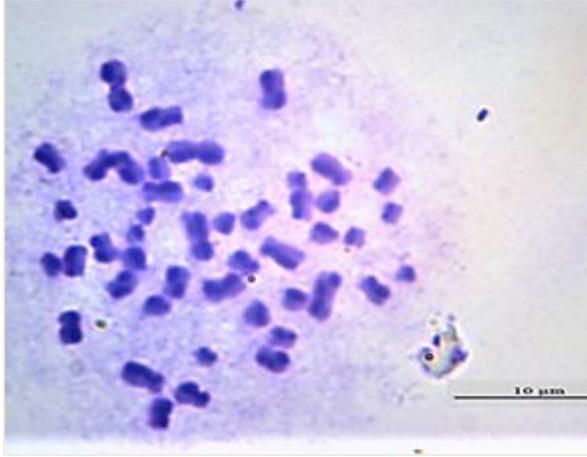
Mitotik indeks (MI) oranı, 24 saatlik uygulamada % 10; 15; 20'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamalarda ise % 7,5; 10; 15; 20'lik konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı düşüş göstermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.5). Bu düşüşün 24 saatlik uygulamada ($r=-0,98$) ve



Şekil 4.4. YFMS ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerindeki KKD frekansı



Şekil 4.5. YFMS ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde Mİ değerleri



Resim 4.2. YFMŞ uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

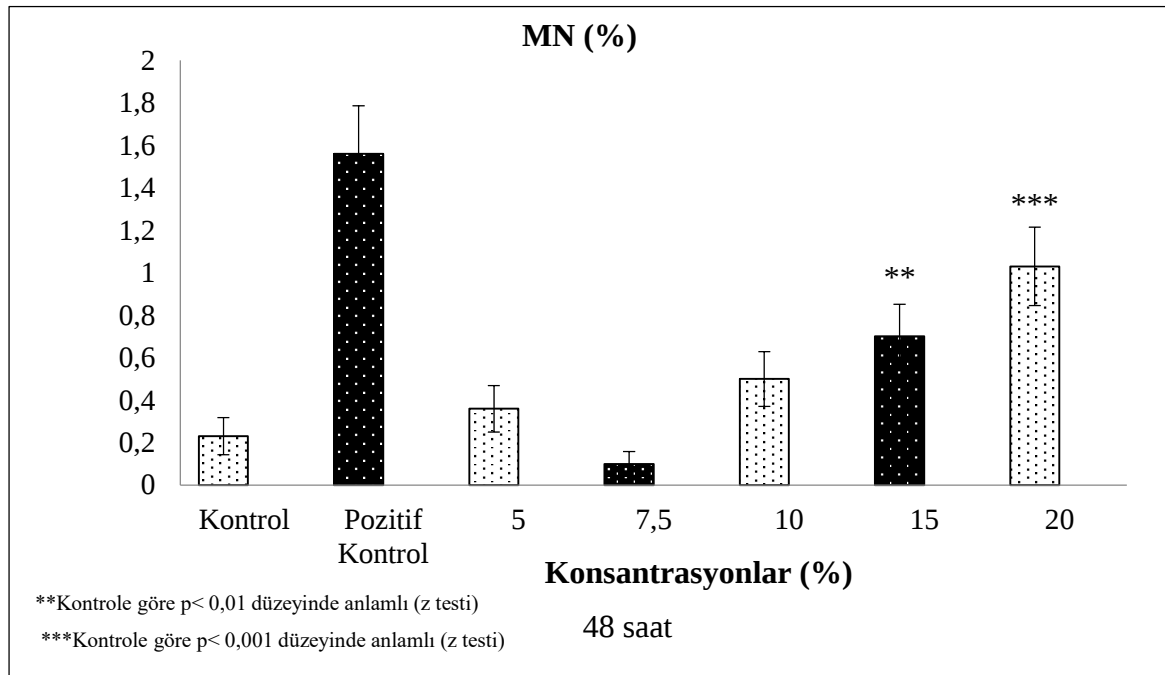
4.2.3. Mikronükleus (MN) testi sonuçları

YFMŞ ile insan lenfositlerinde 48 saat muamele edilerek yapılan MN analizi sonucunda; YFMŞ MN frekansını % 7,5 hariç, tüm konsantrasyonlarda artırdığı, fakat bu artışın, sadece % 15 ve % 20'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.6). Mikronükleus frekansında meydana gelen bu artış konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,88$). Uygulanan en yüksek konsantrasyonun ise (% 30) toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İnsan lenfosit hücrelerinin YFMŞ ile muamelesi sonucunda; her bir konsantrasyon için sayılan 3000 binükleat hücre içinde birli ve ikili mikronükleuslara rastlanılmıştır (Resim 4.3). Ayrıca YFMŞ'nun nükleer bölünme indeksi (NBI) üzerinde herhangi bir anlamlı etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.7).

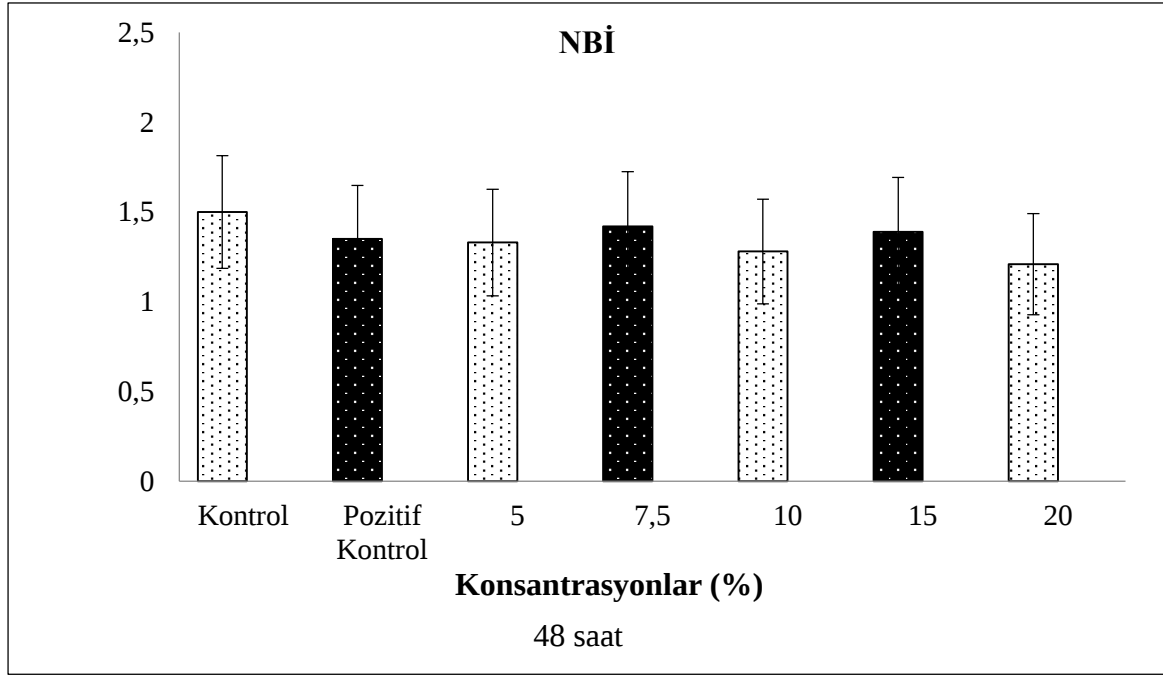
Çizelge 4.4. YFMŞ uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı ve NBİ üzerine etkisi

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (%)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0,00	3000	7	-	0,23±0,08	1,50±0,31
PK(MMC)	48	0,20 (µg/mL)	3000	33	7	1,56±0,22	1,35±0,29
YFMŞ	48	5	3000	9	1	0,36±0,11	1,33±0,29
		7,5	3000	3	-	0,10±0,05	1,42±0,30
		10	3000	15	-	0,50±0,12	1,28±0,29
		15	3000	17	2	0,70±0,15 **	1,39±0,30
		20	3000	29	1	1,03±0,18 ***	1,21±0,28
		30	-	-	-	Toksik	Toksik

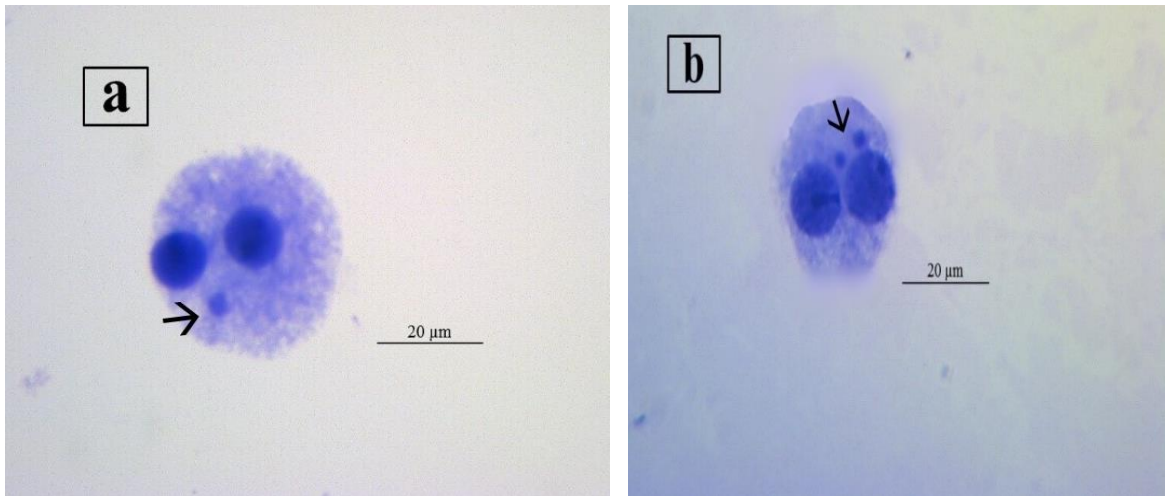
PK (MMC): Pozitif Kontrol-Mitomisin C, YFMŞ: Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu, SH: Standar Hata, MN: Mikronükleus, NBİ: Nükleer Bölünme İndeksi, BN: Binükleat
 *Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 **Kontrole göre p< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 ***Kontrole göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.6. YFMŞ'nun 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi



Şekil 4.7. YFMS'nun 48 saatlik uygulamasında NBİ üzerine etkisi



Resim 4.3. YFMS uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus

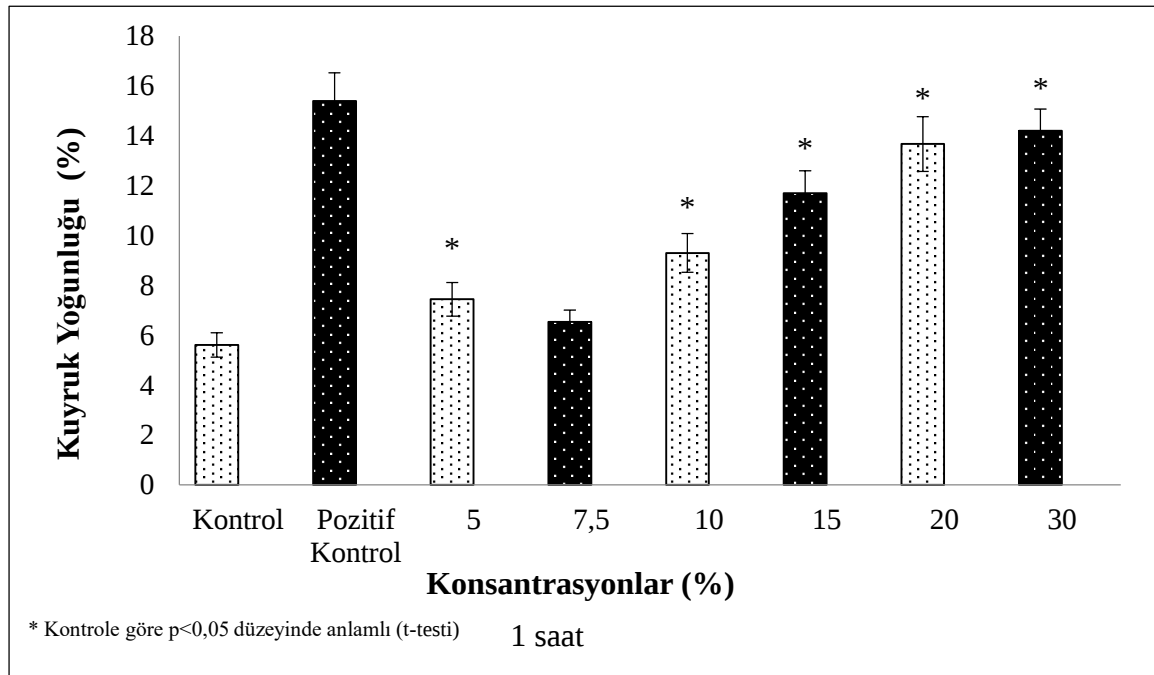
4.2.4. Comet testi sonuçları

İzole lenfosit hücrelerinde YFMS'nun DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı comet testi kullanılarak kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti olmak üzere üç farklı parametrede değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda YFMS'nun, kuyruk yoğunluğu (% 7,5 konsantrasyon hariç), kuyruk uzunluğu (% 5 konsantrasyon hariç) ve kuyruk momentini (% 5 ve 7,5 konsantrasyonları hariç) kontrole göre istatistiksel olarak

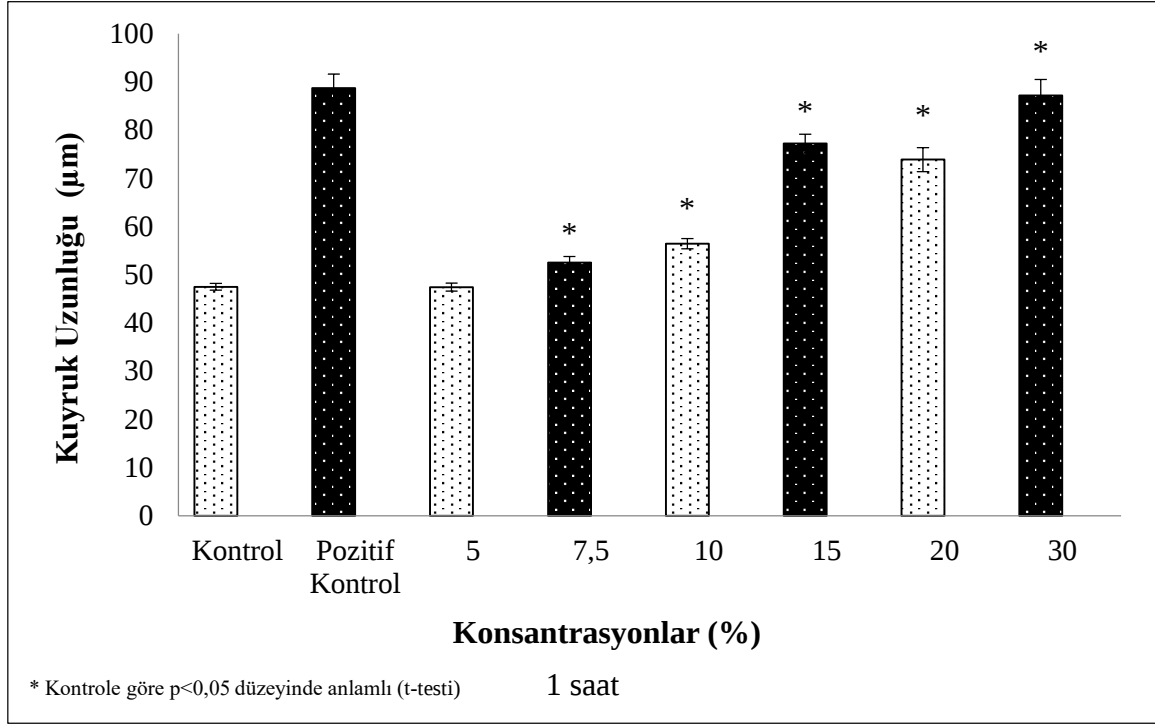
önemli oranda ve konsantrasyona bağlı olarak artırdığı tespit edilmiştir (kuyruk yoğunluğu için $r=0,89$; kuyruk uzunluğu için $r=0,90$; kuyruk momentini için $r=0,95$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Resim 4.4).

Çizelge 4.5. YFMŞ'nun izole insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı

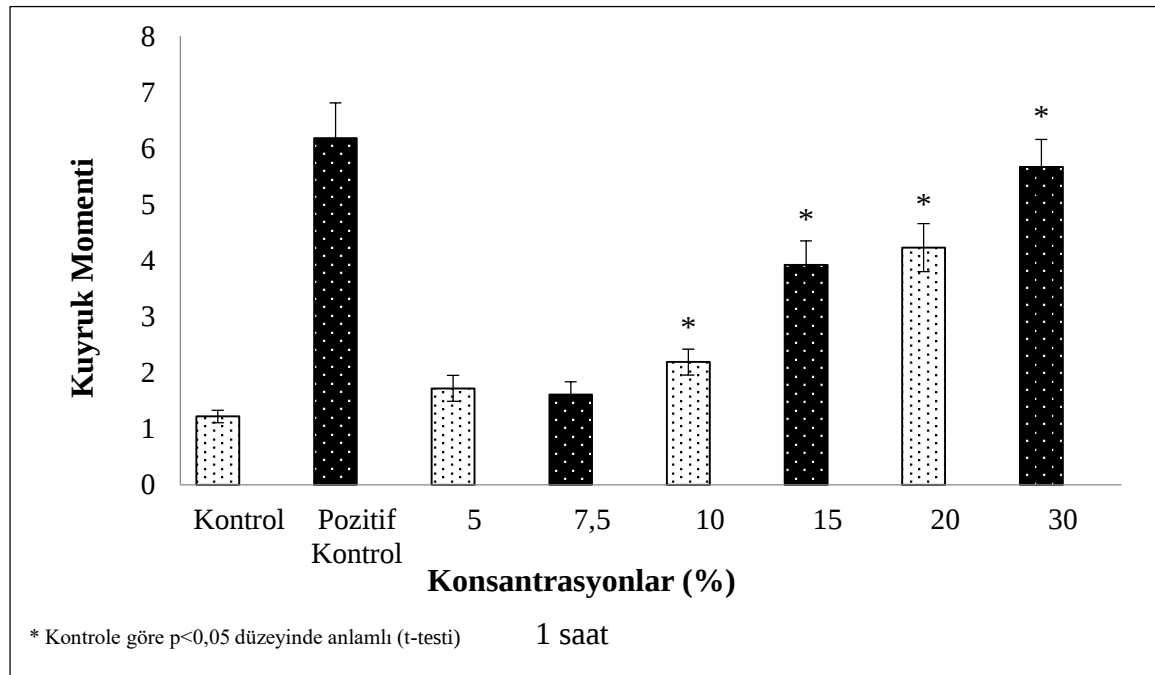
Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (μm)	Kuyruk Momenti
	Süre (Saat)	Konsantrasyon (%)			
Kontrol	1	0,00	5,61 $\pm$ 0,49	47,50 $\pm$ 0,67	1,22 $\pm$ 0,11
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 (μM)	15,39 $\pm$ 1,13	88,72 $\pm$ 2,88	6,18 $\pm$ 0,63
YFMŞ	1	5	7,44 $\pm$ 0,68 *	47,43 $\pm$ 0,84	1,72 $\pm$ 0,23
		7,5	6,54 $\pm$ 0,47	52,51 $\pm$ 1,26 *	1,61 $\pm$ 0,23
		10	9,30 $\pm$ 0,78 *	56,43 $\pm$ 1,07 *	2,19 $\pm$ 0,23 *
		15	11,69 $\pm$ 0,91 *	77,20 $\pm$ 1,95 *	3,92 $\pm$ 0,43 *
		20	13,67 $\pm$ 1,10 *	73,87 $\pm$ 2,49 *	4,23 $\pm$ 0,43 *
		30	14,20 $\pm$ 0,87 *	87,20 $\pm$ 3,31 *	5,67 $\pm$ 0,49 *
H_2O_2 : Hidrojen peroksit					
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)					



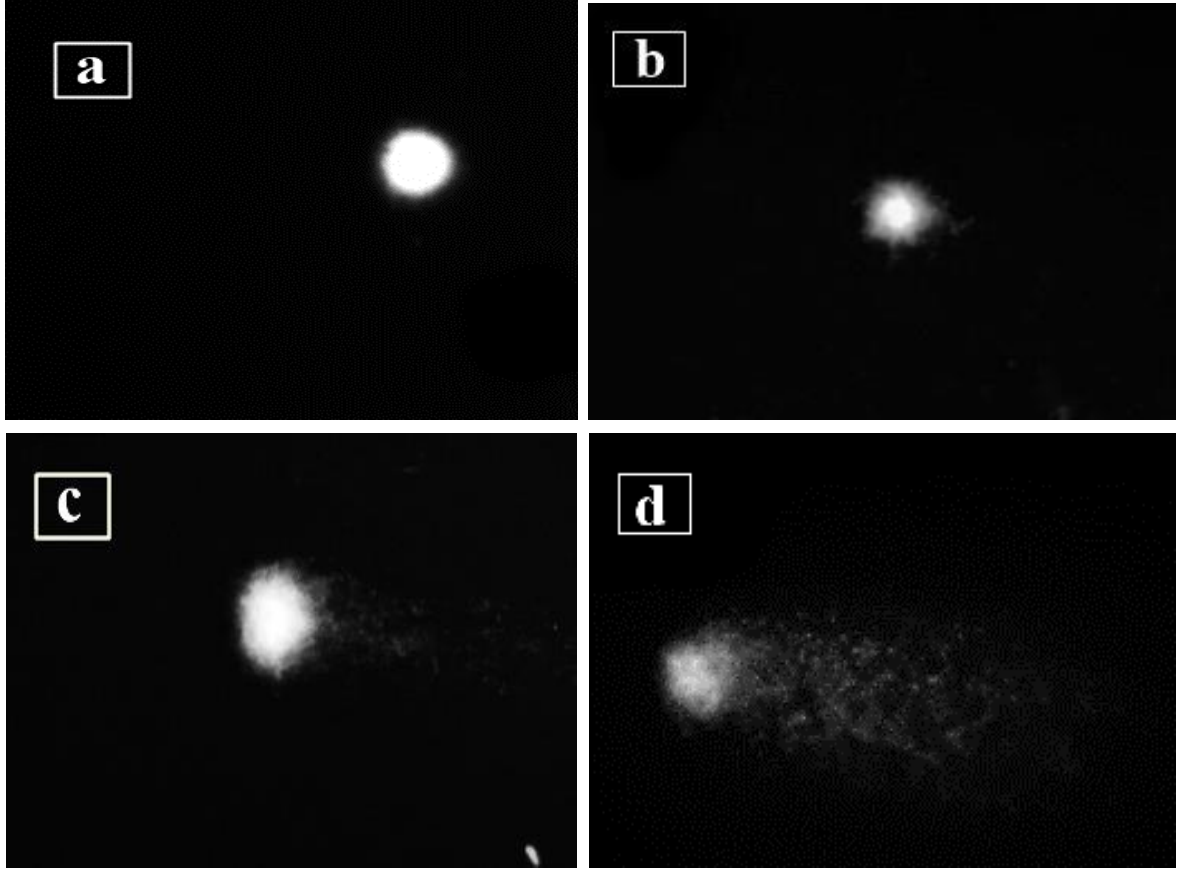
Şekil 4.8. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.9. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu



Şekil 4.10. YFMŞ uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk momenti



Resim 4.4. YFMS ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

4.3. Fruktozun Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

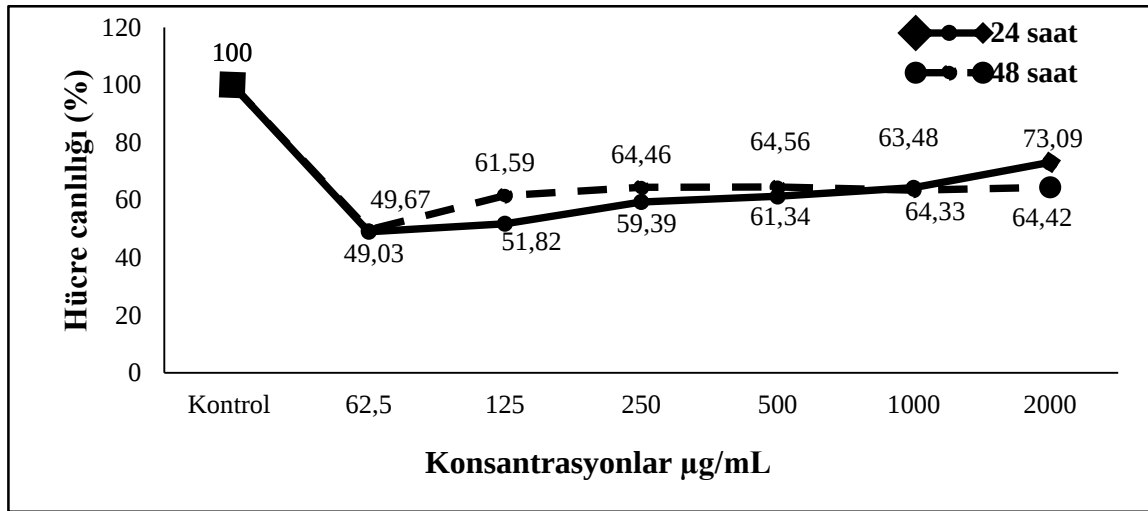
4.3.1. MTT testi sonuçları

Fruktoz'un (FR) HepG2 hücreleri ile muamelesi sonucunda 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda tüm konsantrasyonlarda kontrole göre hücre canlılığı yüzdesini anlamlı oranda düşürerek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu düşüşün konsantrasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir ($r=-0,10$; $r=-0,17$; sırasıyla). Bununla birlikte FR'un hücrelerin %50'sini öldüren değerinin 24 saatlik ve 48 saatlik muamelelerde 62,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.11).

Çizelge 4.6. Fruktozun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Test Maddesi	Uygulama		24 saat	48 saat
	Konsantrasyon (µg/mL)	N	Mean±SS	Mean±SS
Kontrol	0,00	3	2,639±0,128	3,166±0,404
Fruktoz	62,5	3	1,294±0,005 * #	1,573±0,133 * #
	125	3	1,367±0,079 *	1,950±0,355 *
	250	3	1,567±0,063 *	2,041±0,315 *
	500	3	1,618±0,115 *	2,044±0,041 *
	1000	3	1,697±0,103 *	2,009±0,215 *
	2000	3	1,929±0,157 *	2,039±0,030 *

HepG2: İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı, SS: Standart Sapma
 * p<0,05 göre istatistiksel olarak anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Testi)
 # IC₅₀ değeri

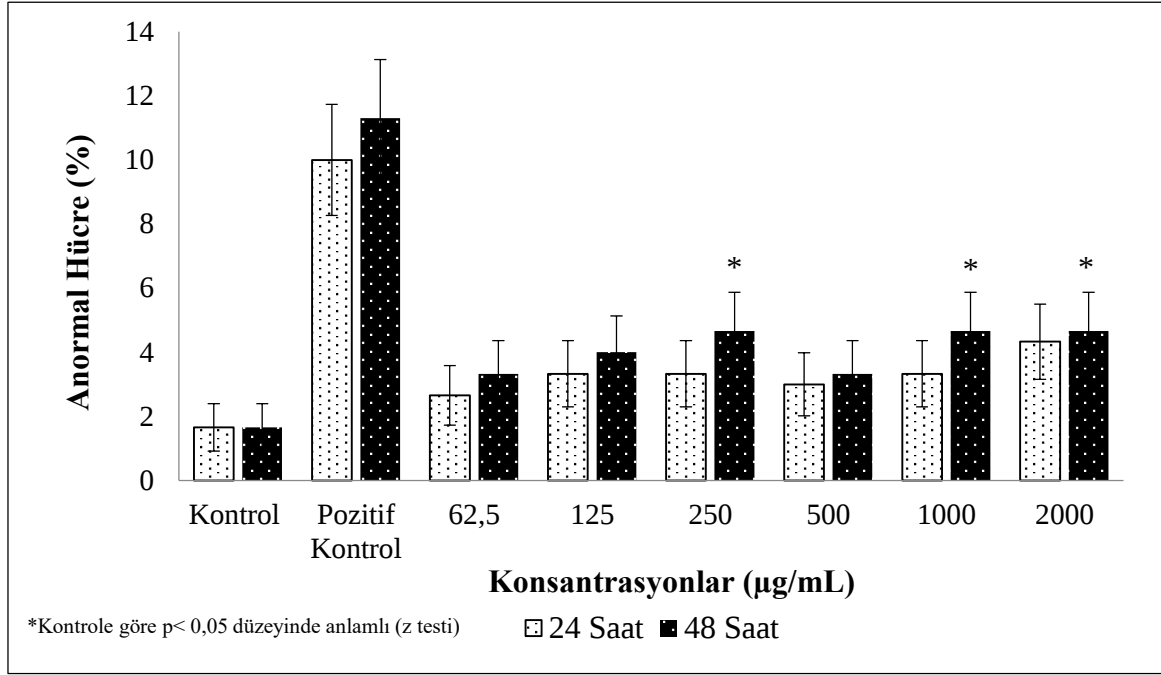


Şekil 4.11. Fruktozun insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde (%) hücre canlılığı değerleri

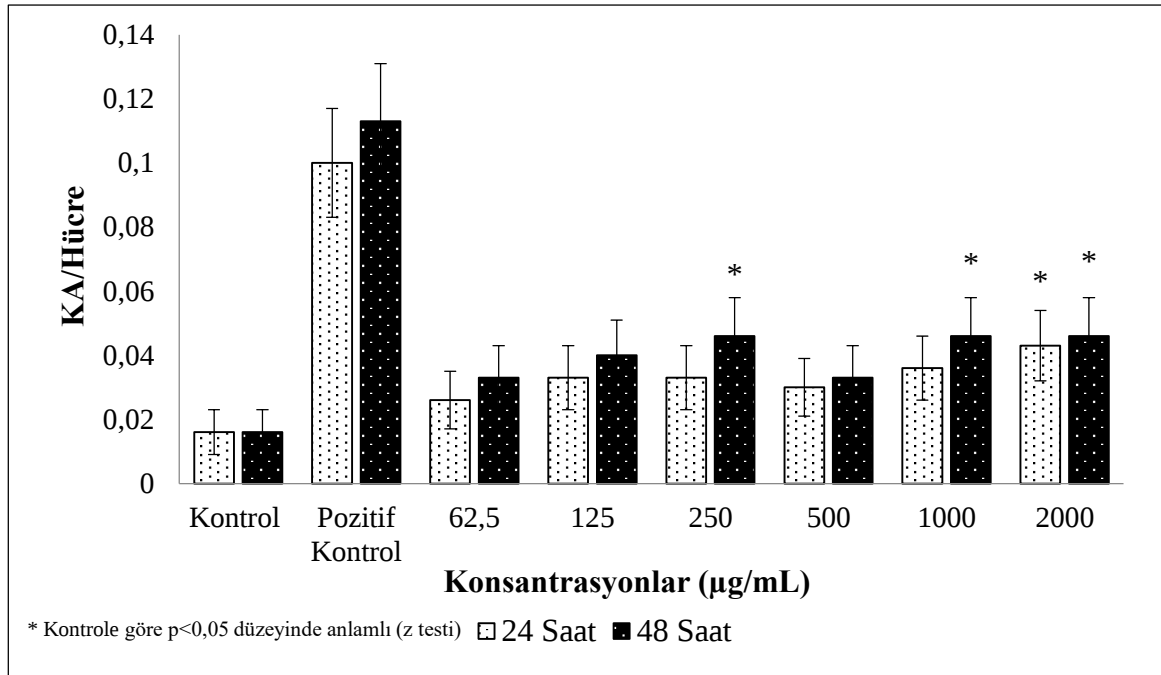
4.4. Fruktozun İnsan Lenfositlerinde Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi sonuçları

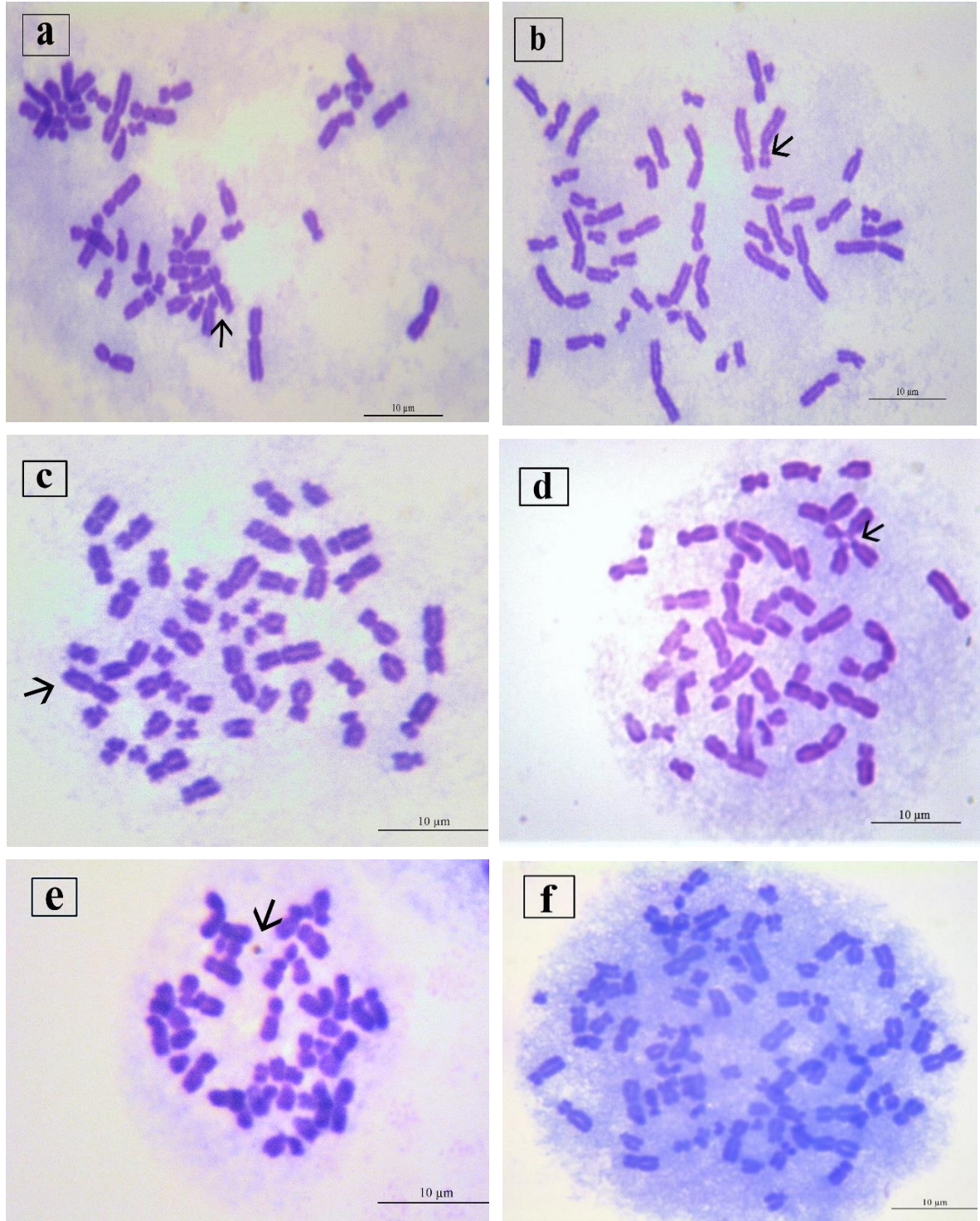
FR'un insan lenfositleri ile 24 ve 48 saat süreyle muamelesi sonucu belirlenen her bir konsantrasyonda (62,5; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL) anormal hücre frekansları (%), hücre başına düşen anormallik değerleri Çizelge 4.7, Şekil 4.12 ve 4.13'de gösterilmiştir. FR'un meydana getirdiği yapısal anormallikler; kardeş kromatitlerde birleşme (% 33,9), kromatit kırığı (% 32,5), kromozom kırığı (% 9,09), fragment (% 9,09), ve kromatit değişimidir (% 6,22). Sayısal anormallik ise poliploididir (% 9,09) (Resim 4.5).



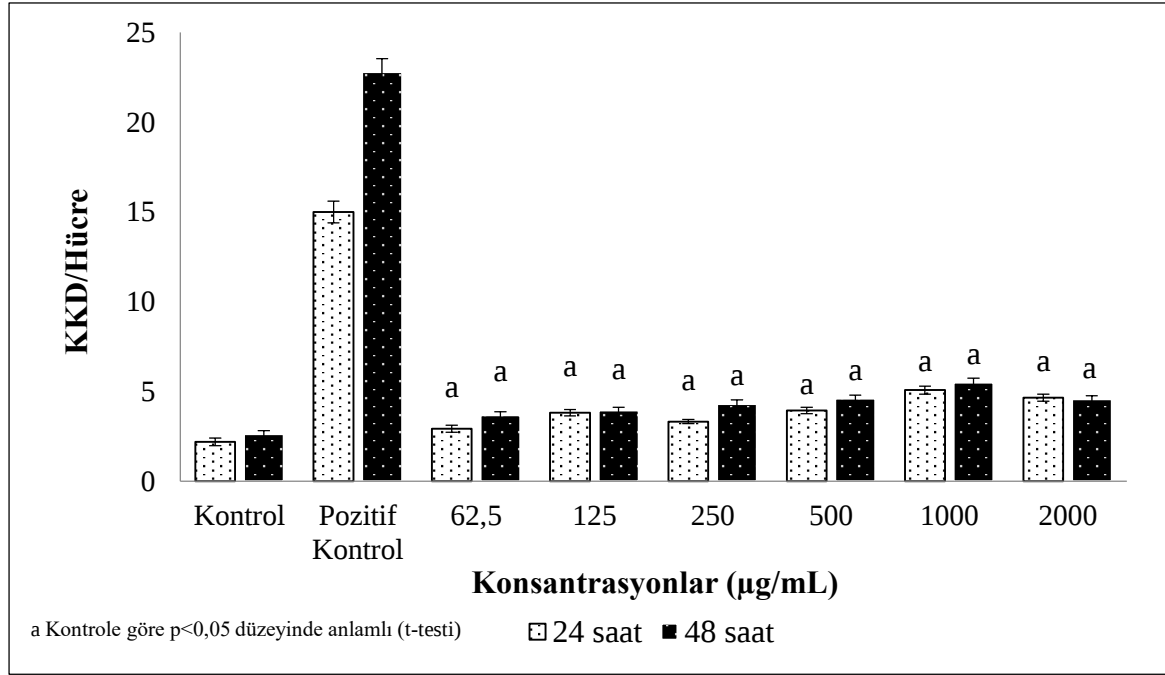
Şekil 4.12. Fruktöz uygulamasının insan periferik lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



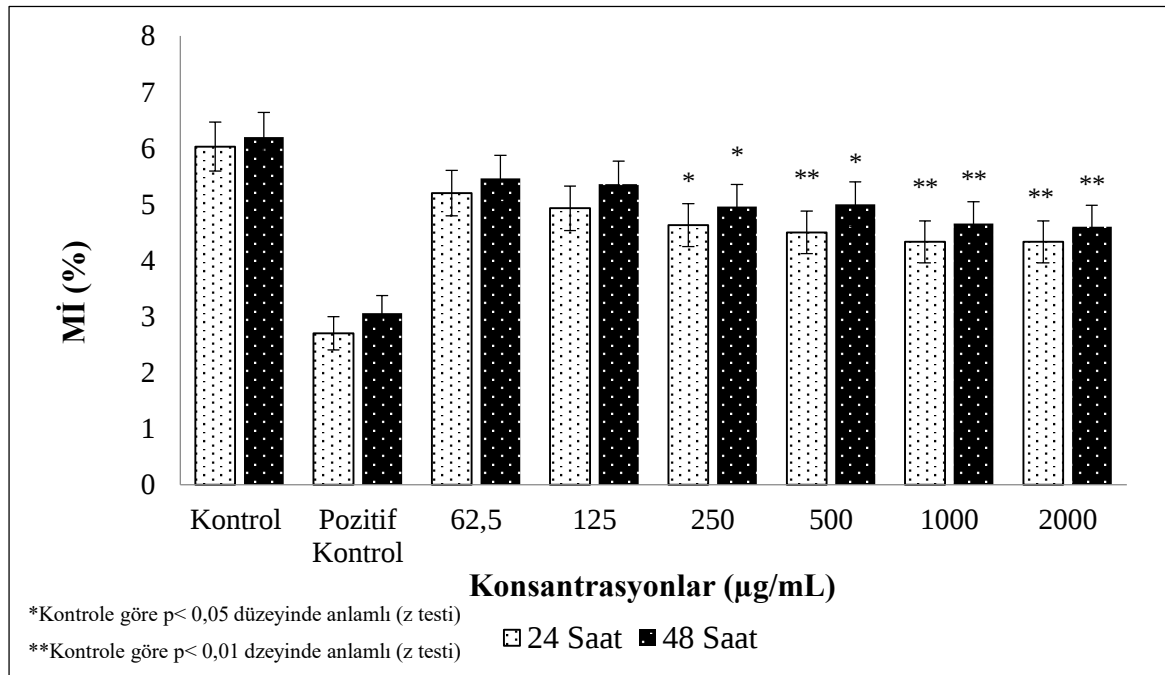
Şekil 4.13. Fruktöz uygulamasının insan periferik lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik sayısı üzerine etkisi



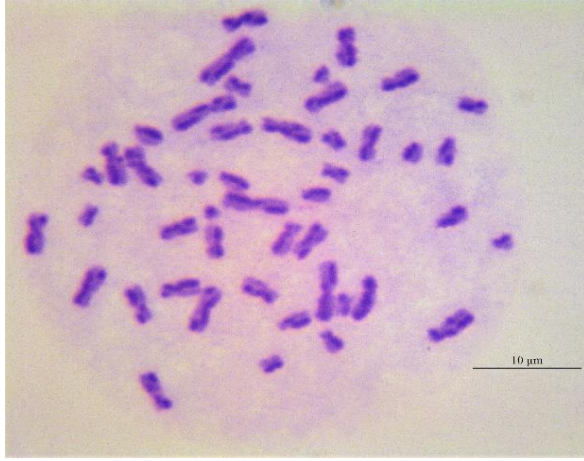
Resim 4.5. Fruktoz uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) kardeş kromatitlerde birleşme d) kromatit değişimi e) fragment f) poliploidi



Şekil 4.14. Fruktoz ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerindeki KKD frekansı



Şekil 4.15. Fruktoz ile muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde Mİ değerleri



Resim 4.6. Fruktoz uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

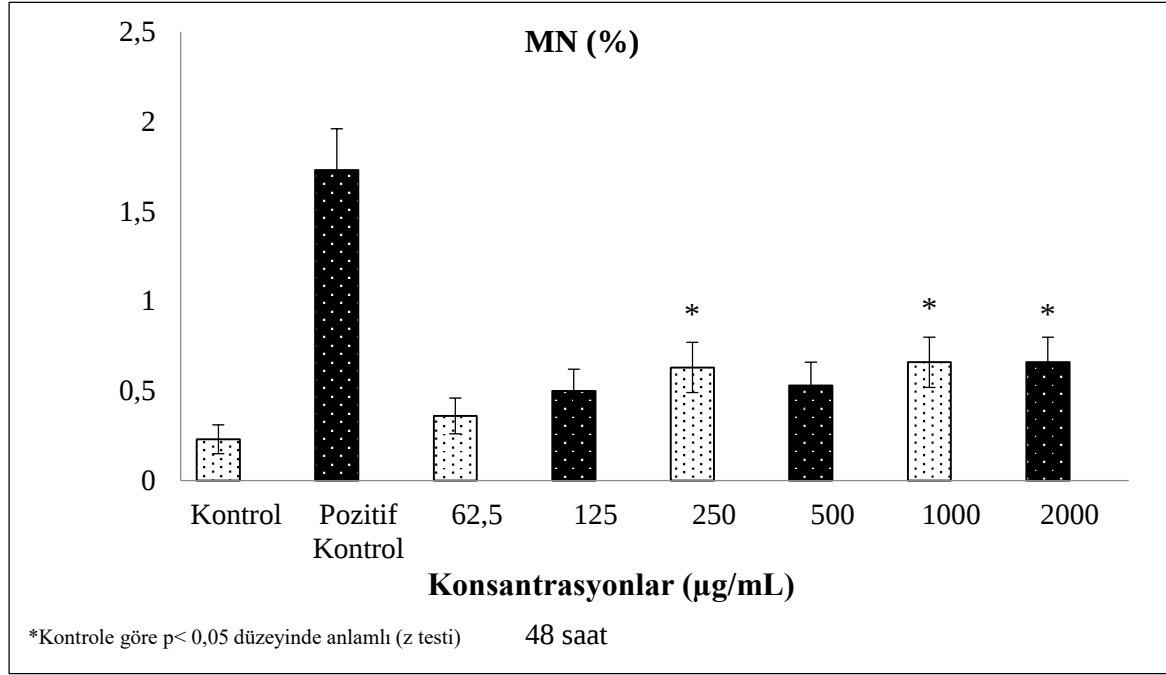
4.4.3. Mikronükleus (MN) testi sonuçları

FR ile insan lenfositlerinde 48 saat muamele edilmiş kültürlerde yapılan MN analizi sonucunda; FR'un MN frekansını tüm konsantrasyonlarda artırdığı, fakat bu artışın, sadece 250; 1000 ve 2000 µg/mL'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.16) ($r=0,67$). Her bir konsantrasyon için sayılan 3000 binükleat hücre içinde birli ve ikili mikronükleuslar gözlenmiştir (Resim 4.7). Ayrıca yapılan çalışmalarda FR uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.17).

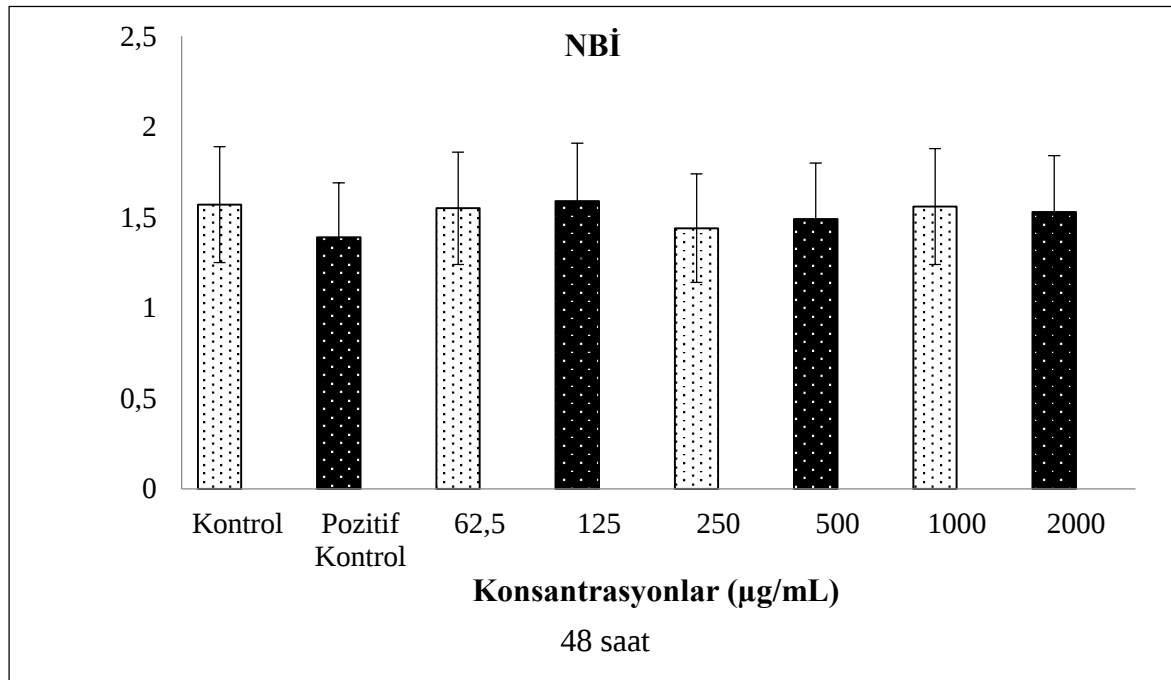
Çizelge 4.9. Fruktoz uygulaması ile insan lenfositlerinde MN (%) frekansı ve NBİ üzerine etkisi

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi NBİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0	3000	7	-	0,23 $\pm$ 0,08	1,57 $\pm$ 0,32
PK(MMC)	48	0,20	3000	50	1	1,73 $\pm$ 0,23	1,39 $\pm$ 0,30
Fruktoz	48	62,5	3000	9	1	0,36 $\pm$ 0,10	1,55 $\pm$ 0,31
		125	3000	13	1	0,50 $\pm$ 0,12	1,59 $\pm$ 0,32
		250	3000	17	1	0,63 $\pm$ 0,14 *	1,44 $\pm$ 0,30
		500	3000	16	-	0,53 $\pm$ 0,13	1,49 $\pm$ 0,31
		1000	3000	18	2	0,66 $\pm$ 0,14 *	1,56 $\pm$ 0,32
		2000	3000	14	3	0,66 $\pm$ 0,14 *	1,53 $\pm$ 0,31

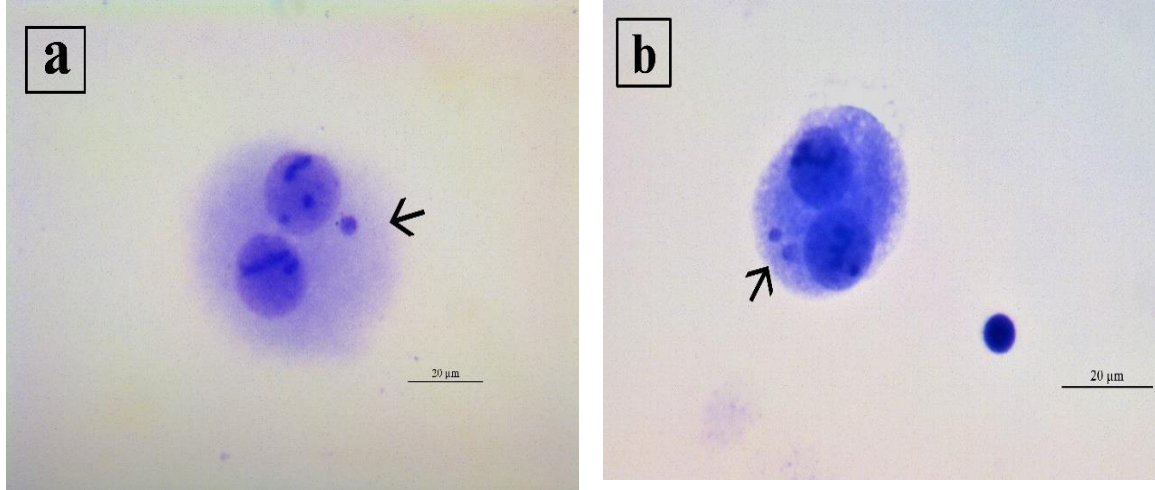
PK (MMC): Pozitif Kontrol-Mitomisin C, SH: Standart Hata, MN: Mikronükleus, NBİ: Nükleer Bölünme İndeksi, BN: Binükleat
 *Kontrolle göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.16. Fruktozun 48 saatlik uygulamasında MN (%) frekansı üzerine etkisi



Şekil 4.17. Fruktozun 48 saatlik uygulamasında NBI üzerine etkisi



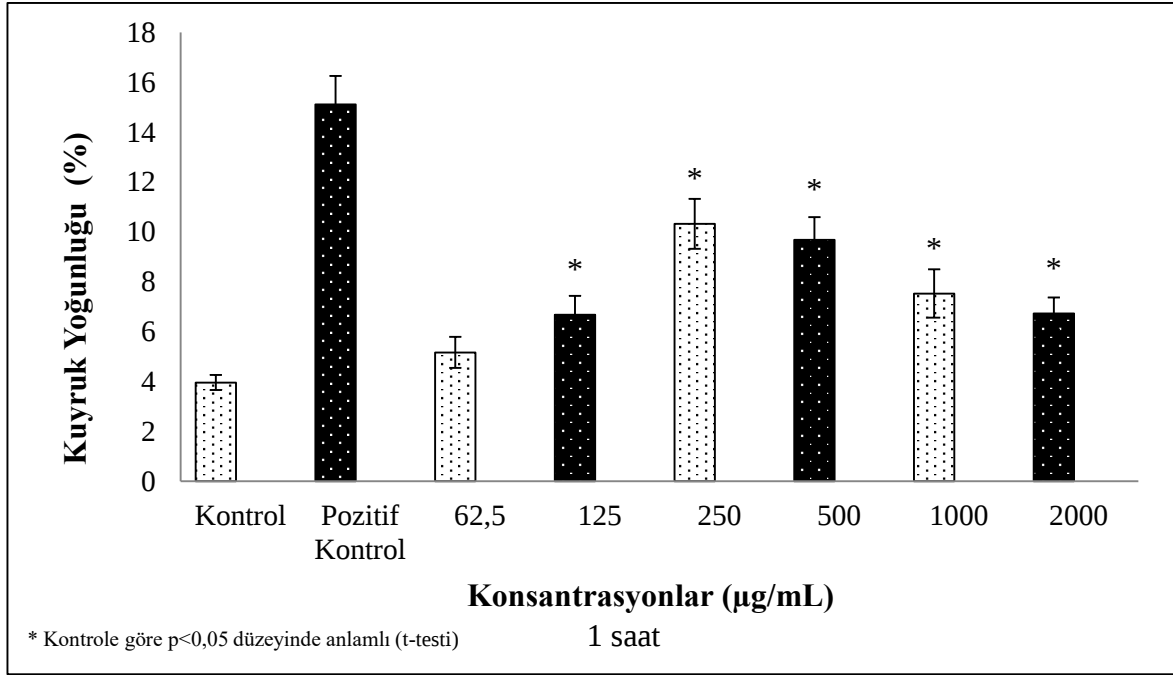
Resim 4.7. Fruktoz uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus

4.4.4. Comet testi sonuçları

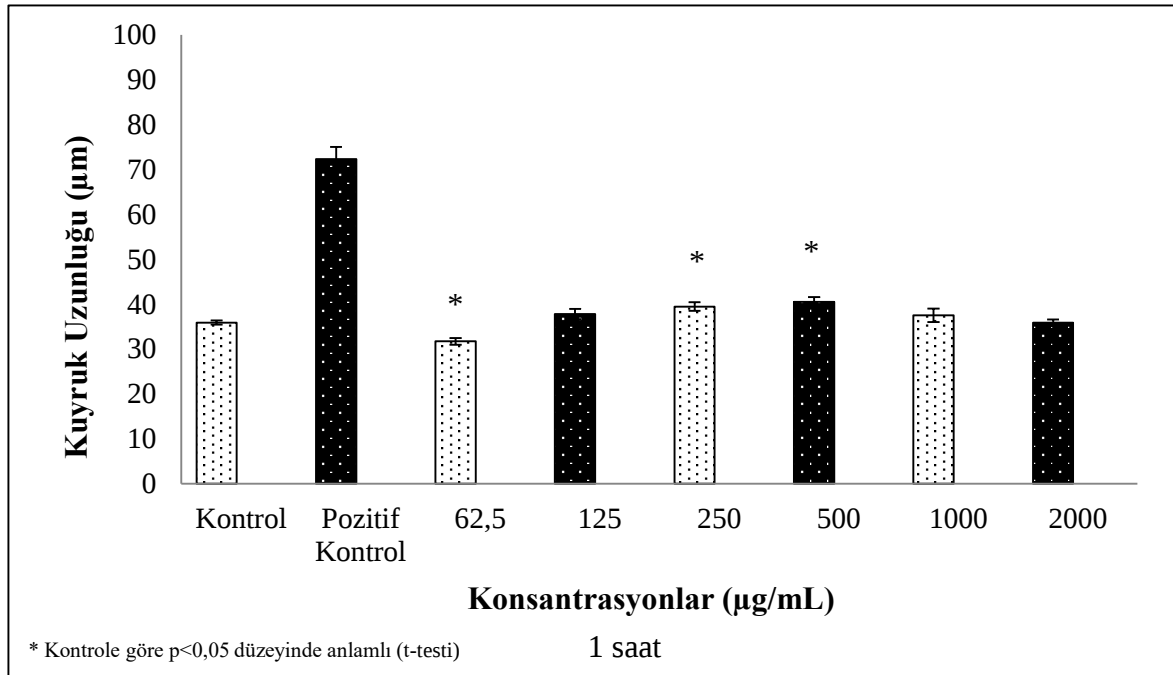
Comet analizinde FR uygulamasıyla elde edilen sonuçlara göre; kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti en düşük konsantrasyon (62,5 µg/mL) hariç tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.18, Şekil 4.20, Resim 4.8). Kuyruk uzunluğu ise 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında anlamlı artış göstermiştir. 62,5 µg/mL’lik konsantrasyonda ise anlamlı oranda azalmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.19). Meydana gelen bu artışların konsantrasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir (kuyruk yoğunluğunu $r=0,14$; kuyruk uzunluğunu $r=0,04$; kuyruk momentini $r=0,23$).

Çizelge 4.10. Fruktozun izole insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı

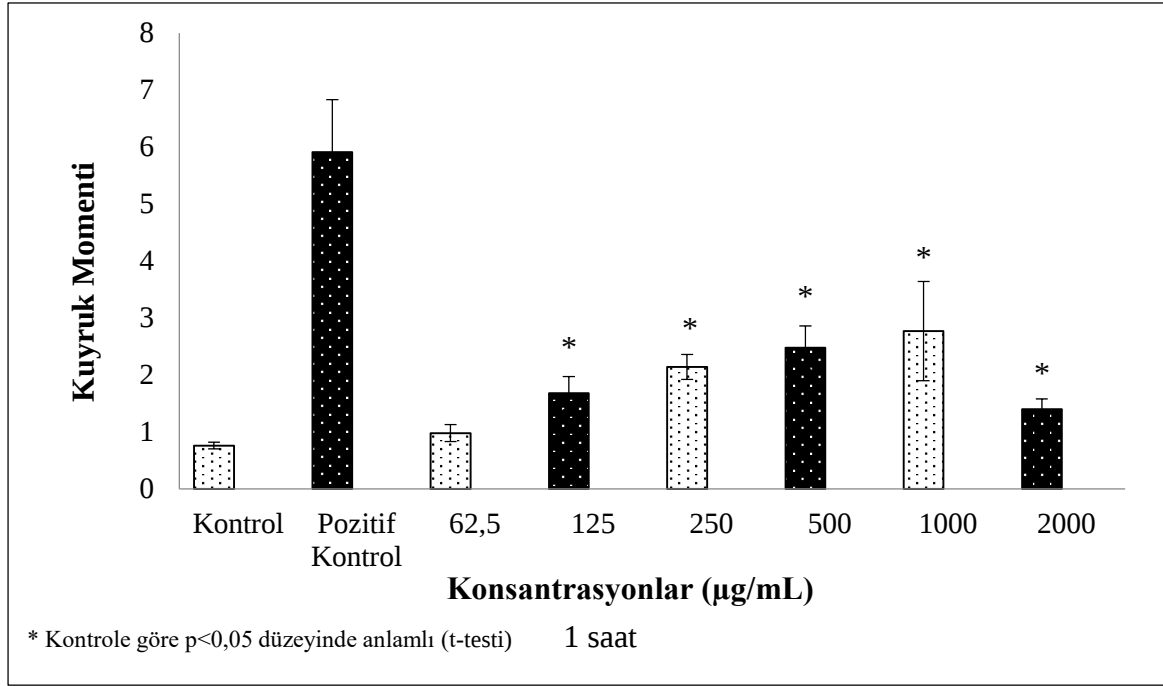
Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Süre (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)			
Kontrol	1	0,00	3,96±0,30	35,90±0,47	0,76±0,06
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	1	100 (µM)	15,11±1,15	72,35±2,71	5,91±0,92
Fruktoz	1	62,5	5,17±0,62	31,71±0,77 *	0,98±0,15
		125	6,68±0,76 *	37,80±1,13	1,68±0,29 *
		250	10,33±1,00 *	39,48±0,96 *	2,14±0,22 *
		500	9,68±0,92 *	40,50±1,07 *	2,48±0,38 *
		1000	7,53±0,97 *	37,52±1,49	2,77±0,87 *
		2000	6,73±0,64 *	35,85±0,73	1,40±0,18 *
H ₂ O ₂ : Hidrojen peroksit					
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)					



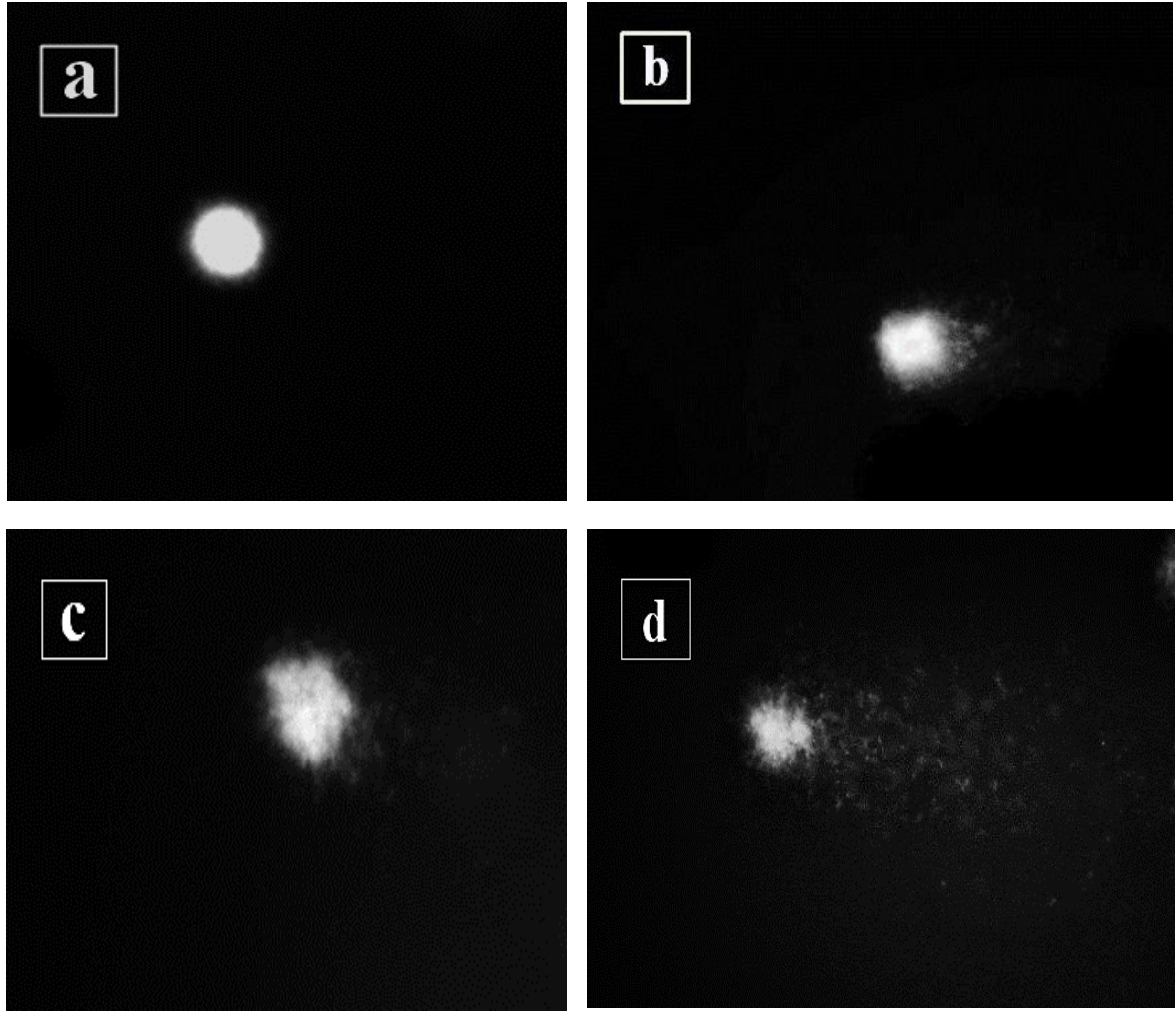
Şekil 4.18. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.19. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu



Şekil 4.20. Fruktoz uygulamasıyla izole insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk momenti



Resim 4.8. Fruktöz ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

YFMŞ ve FR'un tüm uygulamalarının sonuçları Çizelge 4.11 ve 4.12'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.12. YFMŞ ve FR'un izole lenfosit hücrelerinde 1 saat muamelesinin genel sonuçları

Uygulama	Süre (Saat)	Konsantrasyonlar	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
YFMŞ	1 Saat	% 5	↑	—	—
		% 7,5	—	↑	—
		% 10	↑	↑	↑
		% 15	↑	↑	↑
		% 20	↑	↑	↑
		% 30	↑	↑	↑
FR	1 Saat	62,5 µg/mL	—	↓	—
		125 µg/mL	↑	—	↑
		250 µg/mL	↑	↑	↑
		500 µg/mL	↑	↑	↑
		1000 µg/mL	↑	—	↑
		2000 µg/mL	↑	—	↑
— Anamlı bir etkisi yok					
↑↓ Kontrole göre anlamlı artış					

5. TARTIŞMA

Dünyada beslenme ile ilişkili sağlık problemleri en başta gelen problemler arasında yer almaktadır. 2019 yılında DSÖ kronik hastalıkları en büyük on sağlık tehdidinden biri olarak belirtmiştir. Bu hastalıkların en önemlileri kanser, obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklardır. Bu hastalıkların başlıca nedenleri sedanter yaşam ve sağlıklı olmayan beslenme alışkanlıklarıdır (Şahin, Sezerol ve Atak, 2021). Son yıllarda birçok yiyecek ve içecekte doğal ve yapay tatlandırıcılar sıklıkla tercih edilmektedir. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalara göre işleme sırasında gıdaya bilinçli olarak eklenen tatlandırıcılar, renklendiriciler, kimyasallar ve doğrudan gıdaya eklenmesi amaçlanmayan gıda ile temas eden maddelerin (yapıştırıcılar, boyalar, kaplamalar, kâğıt, karton, plastik ve diğer polimerler dâhil) özellikle de çocuklarda (metabolik sistemlerinin gelişmesinden dolayı) yetişkinlere kıyasla sağlık üzerinde daha fazla risk oluşturabilmektedir (Trasande, Shaffer ve Sathyanarayana, 2018).

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve beslenmemizde önemli bir rol oynayan tatlandırıcılar günümüzde büyük önem taşımaktadırlar. Özellikle düşük kalorili olmaları ve antikaryojenik etkileri nedeniyle tüketiciler arasında giderek daha popüler hale gelmiştir. Bu maddeler kökenlerine (doğal veya sentetik maddeler), teknolojik işlevlerine (ağızda kalan tat, çözünürlük ve stabilite), dokularına (tozlar ve şuruplar) ve besin değerlerine (kalorili ve kalorisiz) göre sınıflandırılabilirler (Grembecka, 2015; Belloir, Neiers ve Briand 2017). Tatlandırıcıların çeşitli yiyecek ve içeceklerde tüketiminin hızla artış göstermesi sebebiyle sağlık üzerinde oluşturacağı etki endişe yaratmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda kalorili olarak tatlandırılmış içecek tüketimi ve obezite arasında bir ilişki bulunmuştur (Mooradian, Smith ve Tokud, 2017). Ayrıca yapılan bir dizi deneysel çalışma, tatlandırıcı tüketiminin Tip 2 diyabeti ve kardiyovasküler risk faktörlerini arttırdığını göstermiştir (Malik ve Hu, 2012; Mathur, Agrawal, Nagpure ve Deshpande, 2020; Mbambo, Dlamini, Chukwuma ve Islam, 2020; Risdon ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, bu maddeler apoptotik genlerin mRNA ekspresyonunda önemli değişiklikleri indükleyerek, tümör baskılayıcı gen p53 ve apoptotik gen bax transkripsiyonunda artış, bcl-2 sentezinin baskılanması durumunda apoptoz yoluyla sitotoksik etkilere neden olmaktadır (Maghiari ve diğerleri, 2020). Düşük kalorili ve kalorisiz tatlandırıcılar kilo alımını azaltmak ve önlemek için değerli bir araç olsa da, bu bileşiklerin kısa ve uzun vadede güvenlik ve etkinliğini araştıran toksikolojik ve

karsinojenik potansiyeli ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı ve sonuçları tartışmalıdır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar ile sağlıklı deneklerde ve diyabet, obezite ve metabolik sendromlu hastalarda farklı tatlandırıcı türlerinin sağlık (enerji dengesi, iştah, vücut ağırlığı, kardiyometabolik risk faktörleri) üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin aydınlatılması gerekmektedir (Moriconi ve diğerleri, 2020).

Sitotoksisite testleri, *in vitro* çalışmalarda hücrenin ölümü ya da hayatta kalması ile ilişkili olan genlerin ve proteinlerin etki mekanizmalarının biyolojik değerlendirilmesi için en önemli göstergelerden biridir. Bu testler toksik etkisi bilinmeyen ya da ilaç olarak kullanılması muhtemel bir maddenin davranışına ilişkin temel bilgiler vererek daha sonra yapılacak hayvan veya klinik denemelere kaynak oluşturmaktadır (Adan, Kiraz ve Baran, 2016; Tokur ve Aksoy, 2017; Liu ve diğerleri, 2018). Sitotoksisite testlerinin sürekli gelişmesiyle birlikte, morfolojik değişikliklerle hücre hasarının tespiti, hücre büyümesinin ve metabolik özelliklerinin ölçülmesi gibi yöntemler ortaya çıkmış ve kalitatif değerlendirmeden kantitatif değerlendirmeye doğru gidilerek geliştirilmiştir (Li, Zhou ve Xu, 2015). Günümüzde yaygın olarak kullanılan kişisel bakım ürünleri, kozmetikler, çevresel kimyasal maddeler, ağır metaller, ilaç etken maddeleri gibi birçok fiziksel veya biyolojik ajanlar farklı mekanizmalar ile sitotoksisiteye neden olabilirler. Bunlar; 1) Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoza neden olabilirler. Apoptoz oluşumunu tetikleyen en önemli mekanizmalardan biri olan oksidatif stres DNA, protein ve lipid gibi makromoleküllerde hasara, DNA'da yapısal hasar oluşturmaya ile genotoksik etkiye ya da mitokondri hasarına yol açabilir. 2) Kullanılan faktöre bağlı olarak hücreler çevrelerindeki hücreleri de etkileyip onların da ölmesine yol açarak nekroz oluşumuna sebep olabilirler (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Sitotoksisite ölçüm yöntemlerinden biri olan MTT testi, canlı hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan popüler bir araçtır (Grela, Kozłowska ve Grabowiecka, 2018). MTT testi, canlı hücrelerde mitokondriyal NAD(p)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri ile MTT'nin çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır. Bu mitokondriyal enzimler, belirli hücre kültürü koşulları altında indirgeme reaksiyonu ile MTT'yi çözünmeyen formazanlara dönüştürme özelliğine sahiptir. MTT testi temel olarak, formazan kristallerinin miktarı ile ilgili olan mitokondriyal aktiviteyi ölçerek canlı hücre sayısını belirlememizi sağlamaktadır. Çoğalan hücreler daha yüksek oranda MTT dönüştürme reaksiyonuna sahipken, ölü veya yavaş büyüyen hücreler düşük metabolizmaya sahip olmasından dolayı daha az MTT indirgeme

seviyelerine neden olmaktadır (Adan ve diğ erleri, 2016; Kamiloğlu, Sari,  zdal ve  apanoğlu, 2020).

Bu çalışmada, gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan Yüksek fruktozlu mısır şurubunun (YFMS) ve Fruktozun (FR) insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücrelerinde MTT testi ile sitotoksik etkileri incelenmiştir. YFMS'nun 24 ve 48 saatlik (% 5 hariç) uygulamalarda çalışılan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı oranda hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. YFMS'nun gıdalara eklenen değer olan % 5 (48 saat hariç) ve % 10 konsantrasyonları sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca YFMS'nun hücrelerin % 50'sini öldüren IC₅₀ değer 48 saatlik uygulamada % 15 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. FR'un ise; HepG2 hücreleri üzerinde 24 saatlik ve 48 saatlik muamele sonucunda çalışılan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı oranda (%) hücre canlılığını azaltarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca FR'un IC₅₀ değerinin 24 ve 48 saatlik uygulamalarda 62,5  g/mL konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir.

Genotoksisite, bir kimyasalın hücre içindeki genetik bilgiye zarar vererek maligniteye yol açabilecek mutasyonlara neden olmasıdır (Kopp, Khoury ve Audebert, 2019). Genotoksik maddeler, birçok türde genetik hasarı doğrudan ve dolaylı olarak indükleyerek karsinojenezde önemli bir rol oynayabilirler (Ren, Atyah, Chen ve Zhou 2017). Genotoksisite testleri sayesinde kanser, hücresel mutasyon ve kalıtsal hastalıklar gibi sağlık sorunlarına neden olabilecek mutajenik kimyasalların neden oldukları kromozomal hasar ve gen mutasyonları tespit edilmektedir (Kumar, Singh, Sharma ve Kishore, 2019: 67, 98). Kimyasalların insanlar üzerinde oluşturdukları olası kanserojenik ve mutajenik etkileri değerlendirmek için DNA, gen ve kromozom hasarlarını belirleyen *in vitro* ve *in vivo* test yöntemleri kullanılmaktadır. *In vitro* testler, primer genotoksisiteyi değerlendirmek için uygun olup *in vivo* testler, enflamasyon ve oksidatif stres yoluyla sekonder genotoksik etkiler hakkında bilgi verebilir (Türkez, Arslan ve  zdemir, 2017). Genotoksisite testleri kullanarak DNA hasarının ölçülmesi, karsinojenezi anlamak ve kanser insidansı riskini değerlendirmek için çok önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir (Kang, Kwon, Lee ve Seo 2013; Souto ve diğ erleri, 2020). İnsan sağlığı risk değerlendirmesi için genotoksisite test sonuçlarının nicel olarak incelenmesi ve değerlendirilmesi konusunda gittikçe artan bir anlayış vardır (Johnson ve diğ erleri, 2015). Genotoksisitenin değerlendirmesi, farklı tiplerde olan her bir DNA hasarına karşı duyarlı çok çeşitli testlerin uygulanmasını içermektedir. Bu yüzden genotoksik maddeleri kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için tek bir test yöntemi

yeterli olmamaktadır (Türkez ve diğerleri, 2017). Genotoksisite testlerinde kullanılan güncel yöntemler kromozomal anormallik testi (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, mikronükleus (MN) ve comet testi olarak sıralanabilir. Bu testlerden elde edilen pozitif bir sonuç, sadece DNA ile doğrudan etkileşimi; zincir kırılmalarına, mutasyona veya eklentilere neden olduğunu göstermez; aynı zamanda oksidatif stres, topoizomeraaz inhibisyonu ve kromozom segregasyonunun bozulması gibi dolaylı mekanizmalarla da ilişkili olabilir (Hasselgren ve diğerleri, 2019).

Bu çalışmada insan periferik lenfositlerinde YFMŞ ve FR'un genotoksik etkileri kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleriyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; gıdalarda tatlandırıcı olarak yaygın kullanılan YFMŞ ve FR'un (24 saatlik uygulama hariç) insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansında özellikle yüksek konsantrasyonlarda önemli artışlara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu iki tatlandırıcı madde tarafından en sık oluşturulan anormallik tipleri yapısal anormallikler olan kromatit kırığı ve kardeş kromatitlerde birleşmedir. Bununla birlikte bu iki tatlandırıcı kromozom kırığı, kromatit değişimi, fragment ve poliploidi oluşumuna da sebep olmuştur. Bunun yanı sıra, YFMŞ'nun disentrik kromozom ve endoredublikasyon gibi sayısal anormalliklerin oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir.

Periferik kan lenfositlerindeki kromozomal anormallikler, hem genotoksik karsinojenlerin erken biyolojik etkilerini göstermekte hemde kanserojenik risk belirteçleri olarak değerlendirilmektedir (Vodenkova ve diğerleri, 2015). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek kromozomal anormallik frekansı ile farklı kanser türleri arasında anlamlı bir korelasyon görülmektedir (Yılmaz ve Uçar, 2014; Sezginer ve Dane, 2016; Niazi ve diğerleri, 2021). Kimyasallarla ve ultraviyole radyasyonla indüklenen mutajenler, DNA'da dolaylı olarak çift zincir kırılmalarına neden olarak kromozomal anormalliklere yol açabilmektedir. Kromozomal anormallikler özellikle çift zincir kırıkları sırasında oluşan önemli değişikliklerden biridir (Jain ve diğerleri, 2018b: 69, 92). DNA'nın yapısında meydana gelen kırılma, kromozomların anormal bir şekilde ayrılması, replikasyon mekanizmasındaki hatalar veya DNA sentezinin engellenmesi gibi olaylar ksenobiyotiklere bağlı olarak ya da kendiliğinden meydana gelebilmektedir (Kalefetoğlu-Macar ve Macar, 2020: 96, 114). İyonlaştırıcı radyasyon gibi çeşitli genotoksik ajanlara hücre döngüsünün G0 ve G1 evresi boyunca maruz kalan canlı hücrelerde, kromozom kırılmasını ve

fragmentlerin yeniden düzenlenmesini takiben genellikle homolog olmayan uç birleşmesi nedeniyle kromozomal anormallikler görülebilmektedir. İki ayrı kromozom üzerinde indüklenen iki kırık oluşumu, iki sentromer içeren bir disentrik kromozoma neden olabilir ya da her iki kromozomun bir sentromere sahip olduğu karşılıklı translokasyonla ile asentrik bir fragment oluşabilir (Cajiao, Carante, Rodriguez ve Ballarini, 2017). Kromatit değişimleri ise kromozomlar arası (interkromozom) değişimler olup tipik olarak triradyal veya quadriradyal kromozomlar olarak görülür (Satoh, Hatanaka, Yamamoto, Kuro-o ve Sofuni, 2002). Kromatit tipi anormallikler, hücre döngüsünün S veya G2 fazı sırasında yetersiz onarılan çift zincir kırıkları nedeniyle oluşurken, kromozom tipi anormallikler G0 ve G1 fazı sırasında oluşmaktadır (Mosesso ve Cinelli, 2019: 79, 104). Kimyasal veya fiziksel mutajenlere maruz kalan hücrelerde ortaya çıkan yapısal kromozomal anormallikler, onarılmamış veya yetersiz onarılmış çift zincir kırıklarının yanı sıra telomer işlev bozukluğu ile de ilişkilidir (Bolzán, 2020). Yapısal anormallikler DNA sentezinin inhibisyonundan, doğrudan DNA kırılmasından, hasarlı DNA replikasyonundan, ya da diğer mekanizmalardan (spontan çift zincir kırıkları, topoizomerazlar, replikasyon hataları) kaynaklı olabilmektedir (Albertini ve diğerleri, 2000; Jain ve diğerleri, 2018: 45, 65). Sayısal kromozomal anormallikler ise, kromozom sayısındaki değişiklikleri (esas olarak, anöploidi) ve kromozom kararsızlığını ifade etmektedir (Kou, Wu, Ren ve Yang, 2020).

DNA çift zincir kırıkları, genomik kararsızlığa, kromozomal değişikliklere ve hatta hücre ölümüne yol açabileceğinden, onarılmadığında veya yanlış onarıldığında hücre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Kromozomal anormallik oluşumunun moleküler mekanizması hala belirsizdir, ancak son teoriler kromozomal anormallik oluşumunun nasıl gerçekleştiğini açıklamaya çalışmaktadır. İki önemli teori vardır: 1) “Kırılma ve yeniden birleşme” teorisi 2) “Değiş-tokuş teorisi”. Kırılma ve yeniden birleşme teorisi, kromozomdaki kırılmaların a) yeniden birleşebileceğini ve orijinal yapıyı oluşturabileceğini (restitüsyon), b) diğer kırıklara yeniden katılarak değişim tipi aberasyonlara yol açabileceğini açıklar. Değiş-tokuş teorisine göre anormallikler, tek bir DNA ipliğindeki çift zincir kırığının rekombinasyonel tamiri sonucunda oluşabilir (Jain ve diğerleri, 2018a: 69, 92).

Bu çalışmada uygulanan bir diğer genotoksisite testi de kardeş kromatit değişimi testidir. YFMS ve FR’un insan lenfositlerine uygulanması sonucunda tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde, kardeş kromatit değişimi frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca YFMS’un 24 saatlik uygulamada % 10; 15

ve 20 konsantrasyonlarında, 48 saatlik uygulamada ise % 7,5; 10; 15 ve 20 konsantrasyonlarında mitotik indeksi azalttığı tespit edilmiştir. FR her iki uygulama süresinde 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL'lik konsantrasyonlarda mitotik indeksi kontrole göre önemli oranda düşürmüştür. Ayrıca bu iki tatlandırıcının da replikasyon indeksi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

KKD test yöntemi ile bir kromozomun kardeş kromatitlerinin homolog lokuslarından kırılması ve ardından kırılan parçaların simetrik şekilde yer değiştirip birleşmesi ile ortaya çıkan kardeş kromatit değişimlerine yol açan mutajenler belirlenmektedir (Salawu ve diğerleri, 2018). Bu teknik gen amplifikasyonu, nokta mutasyonların indüksiyonu ve sitotoksitesite ile bağlantılıdır (Benzer, 2020). Hücre DNA'sında radyasyon, ultraviyole ışık, ilaç, kimyasal gibi genotoksik ajanlar tarafından hasar meydana geldiğinde KKD oranının arttığı görülmüştür (Kanmaz, Okur, Dilli, Yeşilyurt ve Oğuz, 2017). KKD frekansındaki artış düşük düzeylerdeki genotoksik ajanlara maruziyet ile de ortaya çıktığından kromozomal etkilenmenin hassas bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Kanmaz ve diğerleri, 2017). Ayrıca KKD testi, genotoksik etkenler tarafından indüklenen çift zincir kırıkları şeklindeki DNA hasarını tespit etmek için kullanılan önemli bir yöntemdir. DNA çift zincir kırıkları homolog rekombinasyon gibi mekanizmalarla onarılır ya da apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur (Salawu ve diğerleri, 2018).

Mitotik indeks (Mİ), hücresel bölünme sıklığını tahmin etme ve çeşitli ajanların sitotoksitesini değerlendirmek için kullanılan güvenilir bir parametredir (Özkara, Akyıl, Eren ve Erdoğan, 2014). Birçok ajan sitotoksik etkiye yol açarak mitotik indekste düşüş meydana getirebilmektedir. Mitotik indekste gözlenen bu azalmalar genellikle DNA sentezindeki bir inhibisyondan veya G2 fazının engellenmesinden kaynaklanmaktadır (Graña, 2018: 231, 240).

Çalışmada YFMŞ ve FR'un genotoksik etkisini değerlendirmek için diğer bir test yöntemi olan mikronükleus (MN) testi kullanılmıştır. Bu test ile binükleat hücrelerde mikronükleus frekansı belirlenmiştir. Ayrıca hücre proliferasyon belirteci olan nükleer bölünme indeks değerleri de hesaplanmıştır. YFMŞ uygulamasında % 15 ve 20 olan yüksek iki konsantrasyonda MN frekansında artış görülmüştür. FR uygulamasında ise 250; 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında MN frekansını anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir.

Buna karşın her iki tatlandırıcının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Mikronükleus testi ile kromozom seviyesinde (DNA onarım, kromozomal kararsızlık, nükleer bölünme oranı, nekrotik ve apoptotik hücrelerin insidansı) DNA hasarı güvenilir, hızlı ve geniş spektrumlu olarak tespit edilmektedir (Kang ve diğerleri, 2013). Diğer genotoksisite testleriyle karşılaştırıldığında daha hızlı ve kolay bir yöntemdir (Fenech ve diğerleri, 2020). Bu yöntem kromozom yapısını değiştiren ve kromozomlarda ayrılma hatasına neden olan kimyasalların potansiyel genotoksik etkilerini değerlendirmektedir (Kang ve diğerleri, 2013). MN'lar; DNA onarımındaki stokastik hatalar veya endojen genotoksinler, DNA metabolizmasındaki genetik kusurların neden olduğu kromozomların yanlış ayrılması ile ortaya çıkabilir. Bu nedenle, belirli bir hücrede MN'nin varlığı, hücrelerde önemli bir genomik kararsızlığa ve modifikasyona yol açan genom hasarına işaret etmektedir (Kirsch-Volders, Fenech ve Bolognesi, 2018). Mikronükleus oluşumları, insanlarda yaşlanma dahil olmak üzere çok çeşitli gelişimsel ve dejeneratif hastalıklarla ilişkili genom patolojisinin en önemli biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilmiştir. Ayrıca yapılan son çalışmalar, artan MN frekansının kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Fenech ve diğerleri, 2020).

Bu araştırmada tatlandırıcı olarak kullanılan iki farklı tatlandırıcının izole insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını belirlemek için comet testi uygulanmıştır. YFMSŞ kuyruk yoğunluğunu, kuyruk uzunluğunu ve kuyruk momentini özellikle yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır. FR, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini en düşük konsantrasyon (62,5 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. Kuyruk uzunluğunda ise 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında anlamlı artışa neden olmuştur.

Comet tekniği (tek hücreli jel elektroforez), ökaryotik hücrelerde fiziksel ve kimyasal ajanların neden olduğu DNA zincir kırıklarını ölçmek için yaygın olarak kullanılan basit, çok yönlü, hızlı ve duyarlı bir yöntemdir (Azqueta ve Collins, 2013; Maronpot, Hobbs ve Hayashi, 2018). Hücrelerde kuyruk uzunluğunda meydana gelen artış DNA kırıklarının olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinde artış meydana gelmesi oluşan DNA hasarını göstermektedir (Kılıç-Toprak ve diğerleri, 2019).

Comet testi, birçok memeli hücresinde birtakım ajanlar tarafından oluşan DNA hasarının belirlenmesi haricinde DNA onarım bozukluğunun saptanmasını amaçlayan çeşitli araştırmalarda da kullanılmaktadır (Göney, 2016). Hücresel DNA, radyasyon, reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen türleri (RNS) gibi çevresel faktörler dahil olmak üzere kimyasal ajanlar tarafından sürekli olarak hasara uğrar. Yapılan çalışmalarda birçok önemli hastalığın etiyojisi ile DNA hasarı arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Gyori ve diğerleri, 2014).

Tez çalışmasında sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenen YFMS gıdalarda tatlandırıcı olarak yaygın kullanılan bir maddedir. YFMS'nun HepG2 hücre hattında MTT testi ile sitotoksitesi ve insan lenfosit hücrelerinde KA, KKD, MN ve comet testleri ile genotoksitesi incelenen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elseehy, (2015) yapmış olduğu bir çalışmada YFMS'nun genotoksik etkisini Allium testi ile araştırmıştır. Bu çalışmada kök uçları beş farklı konsantrasyon (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; mL/L) ile muamele edilmiştir. YFMS ile muamele edilen köklerde en yüksek iki konsantrasyonun (1 ve 2 mL/L) mitotik bölünmeyi engellediği tespit edilmiş ve konsantrasyonun artmasına (0,25 ve 0,5 mL/L) bağlı olarak mitotik indeksin azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca YFMS uygulanan köklerde çeşitli tiplerde; vagrant (ileri veya geri kalmış) kromozom, gecikmeli kromozom, yapışkanlık, c-mitoz, köprü, bozulmuş metafaz gibi kromozomal sapmalar tespit edilmiştir. Bu tip kromozomal sapmaların, YFMS konsantrasyonunun artması sonucunda meydana geldiği belirtilmiştir (Elseehy, 2015). Bu çalışma dışında YFMS'nun sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

FR günümüzde gıdalarda tatlandırıcı olarak yaygın kullanılan bir diğer maddedir. FR'un HepG2 hücre hattında MTT testi ile sitotoksik ve insan lenfosit hücrelerinde KA, KKD, MN ve comet testleri ile genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır. Bu maddenin olası genotoksik etkisini farklı hücrelerde farklı test teknikleri ile inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada, FR'un % 0,5- 5 arası konsantrasyonlarda *in vitro* fare motor nöron hücre hattında (NSC-34) 48 saat muamele süresinde MTT testi ile hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, *Caenorhabditis elegans* ile *in vivo* olarak % 1 ve 5 konsantrasyonları ile metabolik aktivite XF24 Seahorse testi kullanılarak FR'un mitokondri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Uygulama sonucunda % 0,5 ve 1 konsantrasyonlarında FR hücre canlılığı etkilememiş olup, % 4 ve 5 konsantrasyonlarında kontrole kıyasla hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca %

5 konsantrasyonun *Caenorhabditis elegans* üzerinde yaşam süresini azalttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada yüksek konsantrasyonlarda FR maruziyetinin hücre canlılığını, mitokondriyal fonksiyonu ve yaşam süresini olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Bakır (Cu) ve demir (Fe) elementleri, elektron taşıma zincirinin önemli bileşenlerindendir. Yüksek fruktoz ile beslenme Cu eksikliğine ve yüksek demir yüklenmesine yol açan bakır taşıyıcısı CTR-1'in azalmasına neden olmaktadır. Bu mekanizma mitokondriyal işlev ile doğrudan bağlantılıdır. Diğer bir olasılık, ROS oluşumu ve oksidatif stres yanıtının olmamasıdır (Lodha ve diğerleri, 2020).

Üç farklı şekerin genotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada % 30 FR, % 30 Sukroz ve % 30 Glikoz şeker konsantrasyonları ratlara 35 gün boyunca uygulanmıştır. Kolon ve karaciğerdeki mutasyon oranları ve DNA eklenti düzeyleri belirlenerek comet testi ile DNA hasarı incelenmiştir. Uygulanan bu üç şekerin, kolonda DNA zincir kırıklarına neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca üç şeker enerji alımını ve kolondaki mutasyon oranını artırmış ancak mutasyon oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte bu üç şekerin kolon ve karaciğerdeki DNA eklenti seviyelerini de benzer ölçüde arttırdığı belirtilmiştir (Hansen ve diğerleri, 2008). Bir başka çalışmada, Swiss farelerde hamilelik (21 gün) ve emzirme (21 gün) dönemlerinde FR tüketiminin genotoksik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Farelere % 10 ve 20'lik konsantrasyonlarda FR verildikten sonra comet testi ile DNA hasarı, MN testi ile de klastojenik ve anöjenik etki değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda uygulanan her iki konsantrasyonun DNA hasarı meydana getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca uygulanan % 10 konsantrasyonun kontrole göre mikronükleus sıklığını artırdığı belirtilmiştir. Dolayısıyla FR'un aşırı tüketiminin hamilelik ve emzirme dönemlerinde lipid, glisemik ve oksidatif stres gibi sistemik ve patolojik değişikliklere yol açarak DNA hasarına neden olabileceği ileri sürülmüştür (Magenis ve diğerleri, 2020). Macgregor ve diğerleri (1989), ısıtılmış 0,67 M FR ve 0,67 M lizin (şeker/aminoasit) karışımını iki farklı grup olan pH: 7 ve pH: 10 olmak üzere ayarlayarak fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi ile klastojenik etkilerini incelemişlerdir. Bu karışım 0,5 ml/30 g vücut ağırlığı konsantrasyonunda 8 gün boyunca farelere gavaj yoluyla uygulanmıştır. Ayrıca pH: 7 için 3,12; 6,25; 12,50 ve 25,00 mM ve pH: 10 için 1,60; 3,12; 6,25 ve 12,50 mM konsantrasyonları kullanılarak Ames testinde *Salmonella typhimurium* suşları (TA100, TA2637, TA98 ve TA102) ile mutajenik etki ve Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde kromozomal anormallik testi ile genotoksik etki değerlendirilmiştir. Isıtılmış FR ve lizin karışımının mikronükleus frekansında iki farklı

grupta anlamlı bir artışa neden olmadığı, ancak diğer uygulama grubunda (pH: 7 için 3,12; 6,25; 12,50; 25,00 mM ve pH: 10 için 1,60; 3,12; 6,25; 12,50 mM) FR'un 12,50 ve 25,00 mM (pH: 7) olan yüksek konsantrasyonlarda ve 1,60 mM (pH: 10) konsantrasyonunda kromozomal anormallik oranını anlamlı düzeyde arttırdığı ve çalışmada kullanılan suşlarda mutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Macgregor ve diğerleri, 1989). Tez çalışmasında kullanılan 250, 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlar sırasıyla 1,38; 5,55 ve 11,10 mM'lara denk gelmektedir. Dolayısıyla Macgregor ve diğerleri, (1989) tarafından yapılan çalışmada pH: 7 (3,12; 6,25; 12,50; 25,00 mM) için kullanılan konsantrasyonlardan daha düşüktür. Buna rağmen KA oranında anlamlı düzeyde artışa neden olmuşlardır.

Başka bir çalışmada, FR'un 2,5; 5; 10; 20 ve 40 mM konsantrasyonlarının insan dalak B lenfoblast (WIL2-NS) hücrelerine 9 günlük muamelesinin etkileri sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi ile incelenmiştir. FR ile muamele sonucunda CBMN-Cyt testi biyobelirteçleri olan mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) tespit edilmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak nükleer bölünme indeksinde önemli düşüş gözlenmiş olup; buna karşın mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekanslarında anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler sonucunda yüksek FR alımının genomik kararsızlığa neden olarak hücrelerde yaşlanmaya yol açabileceği belirtilmiştir (Deo ve diğerleri, 2020). Tez çalışmasında 1,38; 5,55 ve 11,10 mM'lara sırasıyla karşılık gelen 250, 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonları Deo ve diğerleri, (2020) tarafından yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyonlardan daha düşüktür ve MN frekansını anlamlı oranda artırmışlardır.

Tatlandırıcı maddelerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği farklı çalışmalar mevcuttur. Bir tatlandırıcı olan stevia ile yapılan çalışmada, insan periferik lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri kullanılarak genotoksik etkisi incelenmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca Stevia'nın 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL konsantrasyonlarında muamele edilmiştir. Araştırma sonucunda her iki uygulama süresinde tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallik ve mikronükleus frekansında kontrole göre bir anlamlı bir değişiklik görülmediği belirtilmiştir (Uçar, Yılmaz, Yılmaz ve Kılıç, 2017). Ayrıca 2020 yılında yapılan bir çalışmada, BALB/c faresi kemik iliğinde Steviol glikozitlerinin (470, 620, 940 ve 1880 mg/kg) genotoksik etkileri kromozomal anormallik testi ile incelenmiştir. Stevia'nın 470 mg/kg konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallik frekansı kontrole göre istatistiksel olarak

anlamli oranda artirdigi tespit edilmiştir. Steviol glikozitlerin, oksidatif hasarı ve kromozomal anormallik sıklığını düşük düzeyde arttırdığı sonucuna varılmıştır (Yılmaz, Uçar ve Yılmaz, 2020).

Şeker alkollerinde yer alan ve gıdalarda kullanılan bir diğer doğal tatlandırıcı katkı maddesi olan Xylitol'ün, 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 µg/mL konsantrasyonları kullanılarak 24 ve 48 saat boyunca insan periferik kan lenfositlerinde muamele edilerek kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleri ile *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada xylitol'ün mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de araştırılmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek iki konsantrasyonda (500,00 ve 1000,00 µg/mL) kromozom anormallik frekansını, kardeş kromatit değişimi frekansını (KKD), sitokinez blok mikronükleus sıklığını ve comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini kontrole göre önemli düzeyde artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca replikasyon ve nükleer bölünme indekslerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüşken, mitotik indeksin 24 saatlik uygulamada en yüksek iki konsantrasyonda ve 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak Xylitol'ün, özellikle yüksek konsantrasyonlarda klastojenik, anöjenik, mutajenik ve sitotoksik etkilere neden olduğu saptanmıştır (Avuloğlu-Yılmaz, 2018).

Yapay tatlandırıcı olarak kullanılan sodyum siklamat ve sodyum sakkarin yapılan bir araştırmada hem ayrı ayrı hem de kombine olarak hücrelere 48, 72 ve 168 saat uygulanarak *Allium cepa L.* ve farelerde mikronükleus testi ile genotoksik etkisi incelenmiştir. Sodyum siklamatin 10,00; 15,00 ve 30,00 mg/mL ve sodyum sakkarinin 20,00; 40,00 ve 80,00 mg/mL'lik konsantrasyonları seçilmiş ve iki madde hem tek başına hem de kombine olarak (10,00+20,00 mg; 15,00+40,00 mg ve 30,00+80,00 mg) kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda uygulanan her iki tatlandırıcı maddesi ve bunların kombinasyonları konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak kullanılan iki test sisteminde de sitotoksik ve mutajenik etki göstermiştir. Özellikle hücrelere kombine olarak uygulanan tatlandırıcıların 168 saatlik muamele sonucunda en fazla toksik etki gösterdiği saptanmıştır (Oliveira ve diğerleri, 2017). Bir diğer araştırmada *Allium cepa L.* testi kullanılarak sakkarinin belirlenen % 0,25; 0,5 ve 1 konsantrasyonları 3, 6 ve 12 saat süre boyunca kök uçlarına uygulanarak genotoksik etkisi incelenmiştir. Sakkarin ile muamele edilen kök uçlarında konsantrasyon ve uygulama

süresine bağlı olarak mitotik indeksi (Mİ) düşürerek ve kromozomal anormallik frekansını artırarak genotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Das, Hazra, Sengupta, Hazra ve Chattopadhyay, 2021).

Gıdalarda sıklıkla kullanılan bir diğer yapay bir tatlandırıcı olan Aspartamın MTT testi ile sitotoksik ve kromozomal anormallik testi ile genotoksik etkisi incelenmiştir. Aspartamın belirlenen 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 mg/L konsantrasyonları insan periferik lenfosit hücrelerinde 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, aspartamın hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak düşük bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Aspartam'ın lenfosit hücreleri üzerinde MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değeri (287.342 mg/L) kromozomal anormallik frekansında artışa neden olarak genotoksik etkili olduğu bulunmuştur (Çadircı, Özdemir-Tozlu, Türkez ve Mardinoğlu, 2020). Aspartam'ın *in vivo* olarak isviçre Albino farelerinin kemik iliği hücrelerinde 3,5; 35 ve 350 mg/kg konsantrasyonları oral yol ile uygulanarak kromozomal anormallik ve kardeş kromatit değişimi testi ile genotoksik etkisi incelenmiştir. Aspartam ile muamele sonucunda kardeş kromatit değişim frekansında kontrole göre anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir. Kromozomal anormallik frekansında ise 35 ve 350 mg/kg konsantrasyonlarında doza bağlı olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Aspartam'ın Mİ düşürmediği belirtilmiştir. Aspartamın düşük konsantrasyonda önemli ölçüde genotoksik olmadığı bildirilmiştir (AlSuhaibani, 2010). Aspartam ile yapılan bir diğer genotoksisite çalışmasında, *Allium cepa L.* testi kullanılarak kromozomal anormallik ve Mİ oranı incelenmiştir. Aspartamın belirlenmiş olan 400; 600; 800 ve 1000 mg/mL konsantrasyonları 72 saat boyunca kök uçlarına uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, Aspartamın Mİ oranını en düşük konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda azaltarak sitotoksik etki gösterdiği; kromozomal anormallik frekansını ise tüm konsantrasyonlarda artırarak genotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (Vasileva, Stoyanov, Chayleva, Staykova ve Ivanova, 2021).

Silva, Moya, León, Velasco, ve Flores (2018), yaptıkları bir çalışmada yapay tatlandırıcı olarak kullanılan Asesülfam potasyumun (ASE-K) insan periferik lenfosit hücrelerinde hem tek başına ve hem de Aspartam (AS) ile kombine halinde genotoksik etkilerini incelemişlerdir. % 0,5 ve 5 uygulama dozları olarak seçilmiş ve comet testi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tek başına uygulanan ASE-K'un düşük konsantrasyonda (% 0,5) genotoksik etki oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca AS+ASE-K kombinasyonunda tüm konsantrasyonların önemli genetik hasar oluşturduğu

gözlenmiştir (Silva ve diğerleri, 2018). van Eyk (2015), ACE-K'nın insan kolon karsinoma hücreleri (Caco-2 ve HT-29) ve insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücre hattı üzerindeki etkilerini 1, 4, 10, 20 ve 50 mM konsantrasyonlarında MTT ve comet testi kullanarak araştırmıştır. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat boyunca ASE-K ile muamele edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, ACE-K ile muamele edilen hücreler, tüm inkübasyon sürelerinde ve test edilen tüm hücre hatlarında DNA fragmentasyon oranını düşük düzeyde etkilemiştir. Ayrıca artan konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirtilmiştir (van Eyk, 2015). Najam ve diğerleri, (2017), ACE-K'nın lenfosit hücreleri üzerinde 100, 200, 400, 800 ve 1600 µg/mL konsantrasyonlarında tek başına ve Sitagliptin ile kombinasyon halinde 100+190, 200+380, 400+760, 800+1520 ve 1600+3040 µg/mL konsantrasyonlarında *in vitro* genotoksik etkisini comet testi ile mutajenik etkisini ise Ames testi ile değerlendirmiştir. ASE-K ile muamele sonucunda kontrol ile karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak önemli oranda DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca ASE-K ile tek başına 800 µg/plate ve 1600 µg/plate konsantrasyonlarında ve Sitagliptin+ASE-K kombinasyonunun 760+400 µg/plate ve 1520+800 µg/plate konsantrasyonlarında mutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Najam ve diğerleri, 2017).

Tatlandırıcıların ve metabolitlerinin DNA kırılmalarına neden olduğu mekanizma hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Tatlandırıcı kullanımı kaynaklı olan DNA hasarlarının oluşum nedeninin, DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu ve onarımında rol oynayan proteinlerde serbest radikaller (reaktif oksijen türleri=ROS) tarafından oluşturulan geri dönüşü olmayan hasarlar olabileceği belirtilmiştir (Lin, Zhang, Chen ve Qing, 2007; Fındıklı ve Türkoğlu, 2014). Fruktöz tüketimi serbest radikal üretiminin artması ve antioksidan seviyesinde azalma ile oksidatif hasar oluşumunu kolaylaştırarak zararlı etki gösterebilmektedir. Oksidatif stres, metabolik değişikliklerin gelişiminde anahtar bir rol olarak kabul edildiğinden Fruktöz'un oksidatif stres üzerindeki belirgin etkisi, insülin direnci ve metabolik sendromun patofizyolojisindeki rolünü açıklayabilmektedir. Bununla uyumlu olarak, yüksek Fruktöz içeren diyetle beslenen ratlarda, hem lipid hem de protein bileşeninde mitokondriyal oksidatif hasar ile birlikte insülin direnci ve antioksidan aktivitesinde azalma bulunmuştur. Mevcut sonuçlar, Fruktöz ve metabolitlerinin sitotoksik etkisine ışık tutmaya yardımcı olabilir (Cioffi ve diğerleri, 2017).

YFMS ve FR'un obezite üzerindeki etkisini araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır. 2010 yılında yapılan bir çalışmada YFMS'nun vücut ağırlığı, vücut yağı ve dolaşımdaki trigliseritler üzerindeki hem kısa hem de uzun vadeli etkilerini incelemişlerdir. İlk uygulamada erkek Sprague-Dawley ratları % 8 YFMS ve % 10 sükroz ile 8 hafta (kısa vadeli) boyunca beslenmiştir. Çalışma neticesinde YFMS uygulanan ratlar, % 10 sukroza göre aynı sayıda toplam kaloriyi tüketmelerine rağmen önemli ölçüde daha fazla vücut ağırlığına sahip olmuştur. İkinci uygulamada YFMS'nun vücut ağırlığı ve obezojenik parametreler ile cinsiyet farklılıkları üzerindeki uzun vadeli etkilerini incelemişlerdir. 6 ve 7 ay boyunca YFMS uygulanan hem erkek hem de dişi ratlarda, sükroz ve kontrol gruplarına kıyasla vücut ağırlığı ve trigliserit seviyelerinde anlamlı ölçüde artış gözlenmiştir. Bu veriler aşırı YFMS tüketiminin obezite insidansına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Bocarsly, Powell, Avena ve Hoebel, 2010). Bir diğer çalışmada, YFMS ve FR ile beslenen ratlarda, Na⁺/K⁺- ATPaz aktivitesi ile glukoz transporter (GLUT) 2, adiponektin, resistin ve diğer biyokimyasal belirteçleri 3 grup oluşturarak araştırmışlardır. Kontrol grubuna % 70 karbonhidrat, % 20 protein ve % 10 yağ içeren normal diyet verilmiştir. İkinci gruba yüksek FR içerikli % 70 karbonhidrat (% 87 FR ve %13 YFMS), %20 protein ve %10 yağ] ve son gruba yüksek sükroz içerikli [%70 karbonhidrat (% 87 Sükroz ve % 13 YFMS), %20 protein ve %10 yağ] yem ile 8 hafta boyunca verilmiştir. Bu süreçte kilo takibi yapmışlar. YFMS ve sükroz ile beslenme kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HbA1c, GLUT2 ve Glukoz düzeyleri değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır. Ancak hem YFMS hem de sükroz ile beslenme sonucunda adiponektinde ve kilo alımında anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. FR ile zengin beslenme durumunda ise karaciğer Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi değerlerinde anlamlı azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Aksoy, Gürbilek, Çetinkaya ve Topçu, 2016). Beş aylık Wistar ratlarına 7 hafta boyunca YFMS-55 ve sükroz verilmiştir. Kilo alımı, yağ depolama, leptin, glikoz ve insülin seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Standart yem (grup 1), % 10 Sükroz (grup 2) ve % 10 YFMS (grup 3) verilen olmak üzere 3 farklı grup oluşturulmuştur. Uygulama sonunda tüm grupların günlük alınan enerji miktarının, glikoz ve insülin seviyelerinin benzer olduğu ancak sükroz ve YFMS ile beslenme sonucunda kilo alımında ve yağ depolamada benzer miktarlarda artış gösterdikleri belirtilmiştir. Ayrıca Sükroz ile muamele edilen grupta diğer gruplara oranla kan plazmasında daha yüksek leptin seviyesi tespit edilmiştir (Sadowska ve Rygielska, 2019). Light, Tsanzı, Gıgliotti, Morgan, ve Tou (2009), 28 günlük dişi Sprague-Dawley ratlarına 8 hafta boyunca kontrol olarak distile su, % 13 YFMS-55, % 13 FR % 13 Glikoz ve % 13 Sükroz vermişler ve bu tatlandırıcıların yağlanma ve metabolik

bozuklukların gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Sonuçta YFMŞ-55, FR, Sükroz ve Glikoz'un kontrole kıyasla daha fazla enerji alımına neden olduğu belirtilmiştir. YFMŞ-55 ile beslenen ratlar glikoza ve konrole kıyasla daha fazla vücut ağırlığına ve yağ kütlesine sahip olmuşlardır. YFMŞ-55, FR ve Sükroz arasında önemli farklılık ve metabolik bozukluk gözlenmemiştir (Lıght ve diğerleri, 2009).

Obezitenin temel nedeni fiziksel hareketin azalması ve yüksek enerjili diyet ile beslenmenin artması ile beraber ortaya çıkan enerji dengesizliğinden kaynaklanmaktadır (Tekin, Çiçek ve Konyalıgil, 2018). Obezite prevalansının günümüzde giderek artış göstermesi, Tip 2 diabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Bu hastalıkların birlikte gelişmesi metabolik sendrom olarak ifade edilmektedir (Hekimoğlu, 2007). Metabolik sendrom gelişiminde gen mutasyonlarının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Polimorfik genlerin ekspresyonundaki değişiklikler insülin direnci, obezite ve hipertansiyona neden olabilir (Gözel ve Kılınç, 2018). FR, metabolik sendrom eğiliminin artmasında önemli bir faktördür. Yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, FR tüketimi ile metabolik sendromun gelişimi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Ang ve Yu, 2018).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde enerji vermeyen ya da daha az enerji içeren tatlandırıcılar, düşük maliyeti, yüksek tatlandırma gücü gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel özellikleri dolayısıyla şekerlerin yerini alarak gıdalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Gıda sektöründe tatlandırıcıların bu denli yoğun olarak kullanılmaya başlanması insan sağlığı üzerinde endişeleri de beraberinde getirmektedir. Özellikle uygun fiyatlı olmaları ve yoğun tatlılık içermelerinden dolayı diğer tatlandırıcılara göre gıdalarda kullanımları daha cazip olan YFMS ve FR'un obezite, dislipidemi, tip 2 diyabet, nonalkolik karaciğer yağlanması, hipertansiyon, kalp damar hastalıkları gibi çeşitli sağlık sorunları açısından bir risk oluşturabileceği ve bu hastalıkların birlikte ilerlemesinin metabolik sendrom gelişimi üzerinde etkili olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle bu tip tatlandırıcıların kullanıldığı gıdalardan uzak durmak ve mümkünse doğal gıdalara yönelmek sağlık açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Her iki tatlandırıcı da günümüzde pek çok gıdada kullanıldığından, çağımızın en önemli sorunlarından biri olan obezite ile de ilişkilendirilmektedirler. Yapılan çalışmalar bu yönde yeni deliller ortaya koymaktadır. Bu nedenle bu tatlandırıcıların özellikle yüksek konsantrasyonlarının ve kullanıldığı gıda sınıflarının yeniden gözden geçirilmesinde yarar vardır.

YFMS ve FR ile ilgili farklı araştırmaların sayısı giderek artmasına rağmen literatürde bu tatlandırıcıların genotoksik etkileri ile ilgili net sonuçlar ortaya konulmamıştır. Genotoksik etkilerin bağımsız laboratuvarlar tarafından araştırılması son derece önemlidir. Kullanılan farklı testler sayesinde söz konusu maddenin hem genotoksik potansiyeli hem de bu etkinin ortaya çıkışında rol oynayan mekanizmalar aydınlatılabilmektedir. Gıdalarda sıklıkla kullanılan tatlandırıcıların insan sağlığı üzerindeki olası etkileri göz önüne alındığında uzun süreli ve farklı test sistemlerinde gerçekleştirilmiş sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada günümüzde kullanımının uygun olup olmadığı konusunda hâlen net bir sonuca varılamayan YFMS'nun ve birtakım araştırmalar neticesinde tüketiminin insan sağlığı üzerinde endişe yaratabileceği düşünülen FR'un HepG2 hücre hattında sitotoksik etki ve insan periferik lenfosit hücrelerinde genotoksik etki oluşturdukları saptanmıştır. YFMS'nun

daha önce gıdalarda kullanılan % 10'luk kota çalışmamızda sitotoksik ve genotoksik etkili bulunmuştur. YFMS, FR'a kıyasla özellikle yüksek konstrasyonlarda daha fazla sitotoksik ve genotoksik etki sergilemiştir. Bu nedenle YFMS'nun yüksek oranlarda kullanılmamasına önem gösterilmelidir. Özellikle riskli gruplarda YFMS ve FR içeren aşırı şekerli yiyecek ve içecek tüketimi sınırlandırılmalı ve her türlü tatlandırıcı tüketiminin azaltılması sağlanmalıdır. Toplumda doğal ürün tercihinin dengeli ve sağlıklı beslenme konusunda bilgilendirme yapılmalıdır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *in vitro* koşullardaki genotoksik potansiyellerini gösterdiğinden benzer testler ile *in vivo* genotoksik etkilerinin de incelenmesi uygun olacaktır. Bu nedenle özellikle *in vivo* genotoksisite çalışmalarına ve ayrıca epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır. Böylece bu iki tatlandırıcının genotoksik etkilerinin kökeninde yer alan mekanizma ya da mekanizmalar daha net olarak açıklanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adan, A., Kiraz, Y. and Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Aksoy, R., Gürbilek, M., Çetinkaya, Ç. D. ve Topcu, C. (2016). Glukoz, fruktoz, nişasta bazlı şekerler ile beslenmiş ratlarda Na^+/K^+ ATPaz (ec 3.1. 6.37) aktivitesi, GLUT ve adipositokinlerin araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 23(2), 167-175.
- Aksu-Kılıçle, P. ve Doğan, A. (2020). Akrilamidin in-vivo genotoksitesitesi üzerine fenolik bileşiklerden pelargonidin ve gallik asidin etkileri. *Caucasian Journal of Science*, 7(1), 9-27.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Ticej, R., Waters, M. D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
- Ali, A., Banerjee, S., Kamaal, S., Usman, M., Das, N., Afzal, M., Alarifi, A., Sepay, N., Roy, P. and Ahmad, M. (2021). Ligand substituent effect on the cytotoxicity activity of two new copper (ii) complexes bearing 8-hydroxyquinoline derivatives: validated by MTT assay and apoptosis in MCF-7 cancer cell line (human breast cancer). *RSC Advances*, 11(24), 14362-14373.
- AlSuhaibani, E. S. (2010). In vivo cytogenetic studies on aspartame. *Comparative and Functional Genomics*, 2010.
- Ang, B. R. G. and Yu, G. F. (2018). The role of fructose in type 2 diabetes and other metabolic diseases. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 8(1), 659.
- Ardebili, E. Y. (2015). *Gebelik Döneminde Tüketilen Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubunun Sıçanlarda Anne ve Yavrulara Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2.
- Arslan, S. ve Şanlıer, N. (2016). Fruktoz ve sağlık. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9(3), 150-158.
- Aslankoç, R. and Ozmen, O. (2019). The effects of high-fructose corn syrup consumption on testis physiopathology-The ameliorative role of melatonin. *Andrologia*, 51(8), e13327.
- Aşıcı, N., Oturak, G. ve Ekerbiçer, H. (2020). Geçmişten günümüze yüksek fruktozlu mısır şurubu ve sağlık etkileri üzerine bir derleme. *Sakarya Tıp Dergisi*, 10, 57-68.
- Avuloğlu-Yılmaz, E. (2018). *Gıda Katkı Maddeleri Olarak Kullanılan Monopotasylum Glutamat, Magnezyum Dıglutamat ve Xylitol'ün Genotoksik Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 77-87.

- Ayyıldız, F. ve Yıldırım, H. (2019). Farklı diyet modellerinin bağırsak mikrobiyotası üzerine etkisi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 47(2), 77-86.
- Azqueta, A. and Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968.
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K. and Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 115-118.
- Bayram, H. M. ve Öztürkcan, A. (2020). Gıda katkı maddelerinin mikrobiyota üzerine etkisi. *Gıda*, 45(5), 1030-1046.
- Bellisle, F. and Drewnowski, A. (2007). Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 691–700.
- Belloir, C., Neiers, F. and Briand, L. (2017). Sweeteners and sweetness enhancers. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(4), 279-285.
- Benvindo-Souza, M., Assis, R. A., Oliveira, E. A. S., Borges, R. E. and de Souza Santos, L. R. (2017). The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 27724-27730.
- Benzer, M. (2020). *Dna Hasarına Karşı Plantago Lancelota Ekstraktının ve Luteolin-7-B-D-Gligozit'in İnsan Lenfosit ve Hep-G2 Hücrelerinde İyileştirici Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 15.
- Bernas, T. and Dobrucki, J. W. (2000). The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(1), 108-116.
- Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Bivehed, E., Söderberg, O. and Hellman, B. (2020). Flash-comet: significantly improved speed and sensitivity of the comet assay through the introduction of lithium-based solutions and a more gentle lysis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 858, 503240.
- Bocarsly, M. E., Powell, E. S., Avena, N. M. and Hoebel, B. G. (2010). High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(1), 101-106.
- Bolzán, A. D. (2020). Using telomeric chromosomal aberrations to evaluate clastogen-induced genomic instability in mammalian cells. *Chromosome Research*, 1-18.

- Bonassi, S. and Fenech, M. (2019). Micronuclei and their association with infertility, pregnancy complications, developmental defects, anaemias, inflammation, diabetes, chronic kidney disease, obesity, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and cancer. *The Micronucleus Assay in Toxicology*, 38-78.
- Bonassi, S., Ceppi, M., Møller, P., Azqueta, A., Milić, M., Monica, N., Brunborg, G., Godschalk, R., Koppen, G., Langie, S. A. S., Teixeira, J. P., Bruzzone, M., Silva, J. D., Benedetti, D., Cavallo, D., Ursini, L. C., Giovannelli, L., Moretti, S., Riso, P., Del Bo', C., Russo, P., Dobrzyńska, M., Goroshinskaya, I. A., Surikova, E. I., Staruchova, M., Barančokova, M., Volkovova, K., Kažimirova, A., Smolkova, B., Lafon, B., Valdiglesias, V., Pastor, S., Marcos, R., Hernández, A., Gajski, G., Spremo-Potparević, B., Živković, L., Boutet-Robinet, E., Perdry, H., Lebailly, P., Perez, C. L., Basaran, N., Nemeth, Z., Safar, A., Dusinska, M. and Collins, A. (2021). DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Scientific Reports*, 11(1), 1-11.
- Boyunağa, H., Badem, N. D. ve Mortaş, T. (2018). Mısır şurubunun metabolizmada oluşturduğu anarşi ve hastalıklarla ilişkisi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(2), 198-204.
- Börçek-Kasurka, C. (2019). Geno-sitotoksiste çalışmalarına sitom yaklaşımı. *Anadolu University of Sciences and Technology-C: Life Sciences and Biotechnology*, 8(2).
- Bray, G. A. (2010). Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. *Current Opinion in Lipidology*, 21(1), 51-57.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J. and Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537-543.
- Buranaamnuy, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 251-269.
- Cajiao, J. J. T., Carante, M. P., Rodriguez, M. A. B. and Ballarini, F. (2017). Proximity effects in chromosome aberration induction by low-LET ionizing radiation. *DNA Repair*, 58, 38-46.
- Canedo, A. and Rocha, T. L. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Science of the Total Environment*, 762, 144084.
- Cao, Y., Liu, H., Qin, N., Ren, X., Zhu, B. and Xia, X. (2020). Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 99, 295-310.
- Chéron, J. B., Marchal, A. and Fiorucci, S. (2019). Natural sweeteners. *Elsevier*, 189-195.

- Cioffi, F., Senese, R., Lasala, P., Ziello, A., Mazzoli, A., Crescenzo, R., Liverini, G., Lanni, A., Goglia, F. and Iossa, S. (2017). Fructose-rich diet affects mitochondrial DNA damage and repair in rats. *Nutrients*, 9(4), 323.
- Cong, W. N., Wang, R., Cai, H., Daimon, C. M., Scheibye-Knudsen, M., Bohr, V. A., Turkin, R., Wood III, W. H., Becker, K. G., Moaddel, R., Maudsley, S. and Martin, B. (2013). Long-term artificial sweetener acesulfame potassium treatment alters neurometabolic functions in C57BL/6J mice. *PLoS One*, 8(8), e70257.
- Çadirci, K., Tozlu, Ö. Ö., Türkez, H. and Mardinoğlu, A. (2020). The in vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human blood cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(2), 448-454.
- Daly, K., Darby, A. C. and Shirazi-Beechey, S. P. (2016). Low calorie sweeteners and gut microbiota. *Physiology and Behavior*, 164, 494–500.
- Das, T., Hazra, S., Sengupta, S., Hazra, P. and Chattopadhyay, D. (2021). Genotoxic effect of saccharin on *Allium cepa* root tips. *Biologia*, 1-9.
- D'Costa, A., Kumar, M. P. and Shyama, S. K. (2019). Genotoxicity assays: The micronucleus test and the single-cell gel electrophoresis assay. In *Advances in Biological Science Research*, 291-301.
- de Koning, L., Malik, V. S., Rimm, E. B., Willett, W. C. and Hu, F. B. (2011). Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(6), 1321-1327.
- Deo, P., McCullough, C. L., Almond, T., Jaunay, E. L., Donnellan, L., Dhillon, V. S. and Fenech, M. (2020). Dietary sugars and related endogenous advanced glycation end-products increase chromosomal DNA damage in WIL2-NS cells, measured using cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis*, 35(2), 169-177.
- Diaz, G., Melis, M., Musinu, A., Piludu, M., Piras, M. and Falchi, A. M. (2007). Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. *European Journal of Histochemistry*, 51(3), 213-218.
- Duffey, K. J., Steffen, L. M., Van-Horn, L., Jacobs, D. R. and Popkin, B. M. (2012). Dietary patterns matter: diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95:909-915.
- Elseehy, M. (2015). Evaluation of high fructose corn syrup (HFC) genotoxic effect on *Allium cepa* genome. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 6(5), 91-103.
- Erkekoğlu, P. ve Baydar, T. (2021). Güncel in vitro sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.

- Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53(3), 220-235.
- Erol, B. ve Budak-Diler, S. B. (2011). Kimya öğrencilerinde, kimyasalların genotoksik etkisinin kromozom aberasyon testiyle belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 27(2), 217-221.
- Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Amsterdam, Elsevier Sciences, 405-424.
- Fagbohun, O. F., Olawoye, B., Ademakinwa, A. N., Oriyomi, O. V., Fagbohun, O. S., Fadare, O. A. and Msagati, T. A. (2020). UHPLC/GC-TOF-MS metabolomics, MTT assay, and molecular docking studies reveal physostigmine as a new anticancer agent from the ethyl acetate and butanol fractions of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. fruit extracts. *Biomedical Chromatography*, 35(2), e4979.
- Farkas, G., Kocsis, Z. S., Székely, G., Dobozi, M., Kenessey, I., Polgár, C. and Jurányi, Z. (2021). Smoking, chromosomal aberrations, and cancer incidence in healthy subjects. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 503373.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81-95.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T. and Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 12-25.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Holland, N., Bonassi, S. and Kirsch-Volders, M. (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 786, 108342.
- Fındıklı, Z. and Türkoğlu, 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.
- Fowler, S. P. G. (2016). Low-calorie sweetener use and energy balance: Results from experimental studies in animals, and large-scale prospective studies in humans. *Physiology Behavior*, 164, 517-523.
- Fung, T. T., Malik, V., Rexrode, K. M., Manson, J. E., Willett, W. C. and Hu, F. B. (2009). Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(4), 1037-1042.

- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M.-L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S. A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.-C.W., Martin, S. J., Medema, J. P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U. M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D. W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H.-U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Voutsden, K. H., Youle, R. J., Yuan, J., Zhivotovsky B. and Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16, 1093-1107.
- George, A., Dey, R., Bhuria, V., Banerjee, S., Ethirajan, S., Siluvaimuthu, A. and Saraswathy, R. (2014). Nuclear anomalies, chromosomal aberrations and proliferation rates in cultured lymphocytes of head and neck cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(3), 1119-1123.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. and Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
- Gilbert D. F. and Boutros M. (2016). A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. In D. Azorsa and S. Arora (Eds), *High-Throughput RNAi Screening*. Methods in Molecular Biology, New York, Humana Press, 1470, pp. 75-84.
- Gómez-Fernández, A. R., Santacruz, A. and Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). The complex relationship between metabolic syndrome and sweeteners. *Journal of Food Science*, 86(5), 1511-1531.
- Göney, G. (2016). Çevre kirliliğinin biyoizlenmesinde balıklarda genotoksisite testleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9(1), 43-49.
- Gözel, N. ve Kılınç, F. (2018). Obezite ve metabolik sendrom. *Fırat Tıp Dergisi*, 23, 18-21.
- Graña, E. (2018). Mitotic index. In *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*, 231-240.
- Grela, E., Kozłowska, J. and Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303-311.
- Grembecka, M. (2015). Natural sweeteners in a human diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66(3).
- Gunasekarana, V., Raj, G. V. and Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(3), GE01.

- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D. and Clement, M. V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.
- Hansen, M., Baunsgaard, D., Autrup, H., Vogel, U. B., Møller, P., Lindecrona, R., Wallin, Poulsen, H.E., Loft, S. and Dragsted, L. O. (2008). Sucrose, glucose and fructose have similar genotoxicity in the rat colon and affect the metabolome. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 752-760.
- Hasselgren, C., Ahlberg, E., Akahori, Y., Amberg, A., Anger, L. T., Atienzar, F., Auerbach, S., Beilke, L., Bellion, P., Benigni, R., Bercu, J., Booth, E. D., Bowe, D., Brigo, A., Cammerer, Z., Cronin, M. T. D., Crooks, L., Cross, P. K., Custer, L., Dobo, K., Doktorova, T., Faulkner, D., Ford, K. A., Fortin, M. C., Frericks, M., Gad-McDonald, S. E., Gellatly, N., Geretsaa, H., Gervaisab, V., Glowienkeac, S., Gompelad, J. V., Harveyae, J. S., Hillegassq, J., Honmaaf, M., Hsiehag, J.-H., Hsuah, J.-W., Barton-Maclarenai, T. S., Johnsonl, C., Jollyaj, R., Jonesak, D., Kemperal, R., Kenyonr, O. K., Kruhlakah, N. L., Kulkarniai, S. A., Kümmereram, K., Leavittq, P., Mastenf, S., Millerl, S., Moudgal, C., Musterm, W., Paulinoan, A., Lo Piparao, E., Powleyap, M., Quigleyl, D. P., Reddyap, M. V., Richarzaq, A.-N., Schilterao, B., Snyder, R. D., Stavitskayaah, L., Stidlas, R., Szaboat, D. T., Teasdaleau, A., Ticeav, R. R., Trejo-Martinj, A., Vuorinenh, A., Wallaw, B. A., Wattsax, P., Whiteae, A. T., Wicharday, J., Wittf, K. L., Woolleyaz, A., Woolleyaz, D., Zwickl, C. and Myatt, G. J. (2019). Genetic toxicology in silico protocol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 107, 104403.
- Healy, M. E., Chow, J. D., Byrne, F. L., Breen, D. S., Leitinger, N., Li, C., Lackner, C., Caldwell, S. H. and Hoehn, K. L. (2015). Dietary effects on liver tumor burden in mice treated with the hepatocellular carcinogen diethylnitrosamine. *Journal of Hepatology*, 62(3), 599-606.
- Hekimoğlu, A. (2007). Metabolik sendromda adiponektin. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(2), 61-68.
- Hernández-Pérez, A. F., Jofre, F. M., de Souza Queiroz, S., de Arruda, P. V., Chandel, A. K. and de Almeida Felipe, M. D. G. (2020). Biotechnological production of sweeteners. *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*, 261-292.
- Hong, Y., Han, H. J., Lee, H., Lee, D., Ko, J., Hong, Z. Y., Li, J. Y., Seok, J. H., Lim, H. S., Son, W. C. and Sohn, I. (2020). Deep learning method for comet segmentation and comet assay image analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.
- Hori, H., Shimoyoshi, S., Tanaka, Y., Momonami, A., Masumura, K., Yamada, M., Fujii, W., Kitagawa, Y. and Hayashi, M. (2020). Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 849, 503130.
- Hou, R., Panda, C. and Voruganti, V. S. (2019). Heterogeneity in metabolic responses to dietary fructose. *Frontiers in Genetics*, 10, 945.

- Iancu, I. M., Bucur, L. A., Schroder, V., Mireşan, U., Sebastian, I., Iancu, U. and Badea, V. (2021). Phytochemical evaluation and cytotoxicity assay of lythri herba extracts. *Farmacía*, 69, 51-58.
- Islam, J. and Kabir, Y. (2019). Measurement of DNA damage in bladder cancer patients by alkaline comet assay. *Annals of Urologic Oncology*, 2, 64-70.
- İnan-Eroğlu, E. ve Ayaz, A. (2018). Gıda katkı maddelerinin sağlık üzerine etkileri: risk değerlendirme. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(3), 311-319.
- İnternet: Fruktoz LD 50. Web: http://www.theglobalquality.com/private_folder/fructose_msds.pdf Son Erişim Tarihi: 30.10.2021.
- İnternet: Sigma Aldrich. Fruktoz yapısal formülü. Web: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/f0127?context=product> Son Erişim Tarihi: 30.08.2021.
- İşgören, A. ve Sungur, S. (2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific*, 3(1), 19-33.
- İşgüzar, Y. ve Akbulut, G. (2016). Yüksek fruktoz tüketimi ve kanser. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1(2), 35-40.
- Jain, A. K., Singh D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S. and Pandey, A. K. (2018a). Models and Methods for In Vitro Toxicity. In A. Dhawan and S. Kwon (Eds.), *In Vitro Toxicology*. London. Academic Press, pp. 45-65.
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R. and Pandey, A. K. (2018b). Chromosomal aberrations. In A. Kumar, V. N. Dobrovolsky, A. Dhawan and R. Shanker (Eds.), *Mutagenicity: Assays and Applications*. London. Academic Press, pp. 69-92.
- Johnson, G. E., Slob, W., Doak, S. H., Fellows, M. D., Gollapudi, B. B., Heflich, R. H., Rees, B. J., Soeteman-Hernández, L. G., Verma, J. R., Wills, J. W., Jenkins, G. J. S. and White, P. A. (2015). New approaches to advance the use of genetic toxicology analyses for human health risk assessment. *Toxicology Research*, 4(3), 667-676.
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., Gersch M. S., Benner, S. and Sánchez-Lozada, L. G. (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 899-906.
- Kadlcikova, D., Musilová, P., Hradská, H., Petrovová, M., Selingerová, I., Vozdová, M., Svoboda, M. and Rubes, J. (2020). Different chromosome damage in lymphocytes of newly diagnosed gastrointestinal and breast cancer patients. *Neoplasma*, 67(3), 668-676.
- Kaina, B. (2004). Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 77-86.

- Kalefetoğlu-Macar, T. ve Macar, O. (2020). Çevresel kirleticilerin potansiyel genotoksitesinin bitki modelleri vasıtasıyla izlenmesi. M. Düz (Editör). *Fen ve matematik bilimleri*. (Birinci Baskı). Cetinje-Montenegro: IVPE Yayıncılık, s. 96-114.
- Kamiloğlu, S., Sari, G., Özdal, T. and Çapanoğlu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K. and Seo, Y. R. (2013). Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 277.
- Kanmaz, H. G., Okur, N., Dilli, D., Yeşilyurt, A. ve Oğuz, Ş. S. (2017). Hiperbilirubinemili yenidoğanlarda farklı ışık yoğunluğundaki fototerapinin kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi. *Turkish Archives of Pediatrics*, 52(4).
- Karaoğlu, M. (2011). Yüksek fruktozlu mısır şurubu. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 33, 1-12.
- Kaya-Cebioğlu, İ. ve Önal, A. E. (2017). Gıda katkı maddesi içeren bazı besinlerin tüketiminin ve sağlığa etkilerinin araştırılması: gıdaların risk analizi. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 21-35.
- Khorshidian, N., Shadnouch, M., Khajavi, M. Z., Sohrabvandi, S., Yousefi, M. and Mortazavian, A. M. (2021). Fructose and high fructose corn syrup: are they a two-edged sword?. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(5), 592-614.
- Kılıç-Toprak, E., Yaylalı, Y. T., Özdemir, Y., Küçükata, V., Şenol, H. ve Melek, B. K. (2019). Pulmoner hipertansiyonlu hastalarda comet analizi ile değerlendirilen artmış DNA hasarı. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 12(3), 415-421.
- 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., Fenech, M. and Bolognesi, C. (2018). Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 47-52.
- Ko, E. A., Kim, H. R., Kim, Y. B., Kim, H. S. and Lee, S. H. (2017). Effect of High Fructose Corn Syrup (HFCS) intake on the female reproductive organs and lipid accumulation in adult rats. *Development and Reproduction*, 21(2), 151.
- Kontaş, S. (2011). Kardeş kromatid değişimi testi ve kullanım alanları. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(4), 226-234.
- Kopp, B., Khoury, L. and Audebert, M. (2019). Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Archives of toxicology*, 93(8), 2103-2114.
- Kou, F., Wu, L., Ren, X. and Yang, L. (2020). Chromosome abnormalities: new insights into their clinical significance in cancer. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 17, 562-570.

- Kumar, N., Singh, A., Sharma, D. K. and Kishore, K. (2019). Toxicity of food additives. In R. K. Singh and S. Mondal (Eds.), *Food Safety and Human Health*, Hindistan. Academic Press, pp. 67-98.
- Kumar, P., Nagarajan, A. and Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb-prot095505.
- Li, D., O'Brien, J. W., Tschärke, B. J., Choi, P. M., Zheng, Q., Ahmed, F., Thompson, J., Li, J., Mueller, J. F., Sun, H. and Thomas, K. V. (2020). National wastewater reconnaissance of artificial sweetener consumption and emission in Australia. *Environment International*, 143, 105963.
- Li, W., Zhou, J. and Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3(5), 617-620.
- Light, H. R., Tsanzi, E., Gigliotti, J., Morgan, K. and Tou, J. C. (2009). The type of caloric sweetener added to water influences weight gain, fat mass, and reproduction in growing Sprague-Dawley female rats. *Experimental Biology and Medicine*, 234(6), 651-661.
- 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.
- Lin, J. and Curhan, G. C. (2011). Associations of sugar and artificially sweetened soda with albuminuria and kidney function decline in women. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, 6, 160-166.
- Liu, X., Rodeheaver, D. P., White, J. C., Wright, A. M., Walker, L. M., Zhang, F. and Shannon, S. (2018). A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97, 24-32.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. and Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 581-593.
- Lodha, D., Rajasekaran, S., Jayavelu, T. and Subramaniam, J. R. (2020). Detrimental effects of fructose on mitochondria in mouse motor neurons and on *C. elegans* healthspan. *Nutritional Neuroscience*, 1-10.
- MacGregor, J. T., Tucker, J. D., Zideman, I. I., Wehr, C. M., Wilson, R. E. and Friedman, M. (1989). Non-clastogenicity in mouse bone marrow of fructose/lysine and other sugar/amino acid browning products with in vitro genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 27(11), 715-721.
- Magenis, M. L., Damiani, A. P., de Marcos, P. S., de Pieri, E., de Souza, E., Vilela, T. C. and de Andrade, V. M. (2020). Fructose consumption during pregnancy and lactation causes DNA damage and biochemical changes in female mice. *Mutagenesis*, 35(2), 17-26.

- Maghiari, A. L., Coricovac, D., Pinzaru, I. A., Macașoi, I. G., Marcovici, I., Simu, S., Navolan, D. and Dehelean, C. (2020). High concentrations of aspartame induce pro-angiogenic effects in ovo and cytotoxic effects in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Nutrients*, 12(12), 3600.
- Mai, B. H. and Yan, L. J. (2019). The negative and detrimental effects of high fructose on the liver, with special reference to metabolic disorders. *Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity: Targets and Therapy*, 12, 821.9-187.
- Malik, V. S. and Hu, F. B. (2012). Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: the role of sugar-sweetened beverages. *Current Diabetes Reports*, 12(2), 195-203.
- Malik, V. S., Pan, A., Willett, W.C. and Hu, F. B. (2013). Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(4), 1084–1102.
- Mamur, S., Ünal, F., Yılmaz, S., Erikel, E. and Yüzbaşıoğlu, D. (2020). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 149-157.
- Maronpot, R. R., Hobbs, C. A. and Hayashi, S. M. (2018). Role of pathology peer review in interpretation of the comet assay. *Journal of Toxicologic Pathology*, 31(3), 155-161.
- Mathur, K., Agrawal, R. K., Nagpure, S. and Deshpande, D. (2020). Effect of artificial sweeteners on insulin resistance among type-2 diabetes mellitus patients. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(1), 69.
- Mazloun-Ardakani, M., Barazesh, B., Moshtaghioun, S. M. and Sheikhha, M. H. (2019). Designing and optimization of an electrochemical substitute for the MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) cell viability assay. *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.
- Mbambo, N. P., Dlamini, S. N., Chukwuma, C. I. and Islam, M. S. (2020). Comparative effects of commonly used commercially available non-nutritive sweeteners on diabetes-related parameters in non-diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 44(11), e13453.
- Meky, F. A., Hardie, L. J., Evans, S. W. and Wild, C. P. (2001). Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 827-836.
- Merino, B., Fernández-Díaz, C. M., Cózar-Castellano, I. and Perdomo, G. (2020). Intestinal fructose and glucose metabolism in health and disease. *Nutrients*, 12(1), 94.
- Milošević-Djordjevic, O., Grujicic, D., Vaskovic, Z. and Marinkovic, (2010) High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 220, 115-20.

- Mishima, M. (2017). Chromosomal aberrations, clastogens vs aneugens. *Front Biosci (Schol Ed)*, 9, 1-16.
- Møller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1), 1-7.
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Pereira, C. C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannel, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., Basaran, N., Del Bo', C., Zegura, B., Novak, M., Stopper, H., Vodicka, P., Vodenkova, S., de Andrade, V. M., Sramkova, M., Gabelova, A., Collins, A. and Langie, S. S. A. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817-3826.
- Mooradian, A. D., Smith, M. and Tokuda, M. (2017). The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical Nutrition eSPen*, 18, 1-8.
- Moriconi, E., Feraco, A., Marzolla, V., Infante, M., Lombardo, M., Fabbri, A. and Caprio, M. (2020). Neuroendocrine and metabolic effects of low-calorie and non-calorie sweeteners. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 444.
- Mosesso, P. and Cinelli, S. (2019). In vitro cytogenetic assays: Chromosomal aberrations and micronucleus tests. *In Genotoxicity Assessment*, 79-104.
- Mossman T. (1983). Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Mourelatos, D. (2016). Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 803, 1-12.
- Najam, K., Altaf, I., Ashraf, M., Rasheed, M. A., Saleem, F., Munir, N. and Bashir, R. (2017). In vitro evaluation of mutagenicity and genotoxicity of sitagliptin alone and in combination with artificial sweeteners. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(8), 1841-1847.
- Nemes, D., Kovács, R., Nagy, F., Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, W. P., Rebenku, I., Hajdu, P. B., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vécsernyés, M. and Bácskay, I. (2020). Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 143, 105162.
- Nettleton, J. A., Lutsey, P. L., Wang, Y., Lima, J. A., Michos, E. D. and Jacobs, D. R. (2009). Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*, 32(4), 688-694.

- Niazi, Y., Thomsen, H., Smolkova, B., Vodickova, L., Vodenkova, S., Kroupa, M., Vymetalkova, V., Kazimirova, A., Barancokova, M., Volkovova, K., Staruchova, M., Hoffmann, P., Markus M. N., Dusinska, M., Musak, L., Vodicka, P., Försti, A. and Hemminki, K. (2021). DNA repair gene polymorphisms and chromosomal aberrations in healthy, nonsmoking population. *DNA repair*, 101, 103079.
- OECD. (2015). *Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines*. Paris: OECD Publishing, 64. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf> Son Erişim Tarihi: 5.11.2021
- 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. C., Peron, A. P. and e Sousa, J. M. 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.
- Ökçesiz, A. ve Ündeğer-Bucurgat, Ü. (2017). Sitotoksosite çalışmalarında kök hücre. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 41(2), 1-14.
- Örek, Ş. Y. ve Mertoğlu, D. (2020). Yüksek fruktozlu mısır şurubunun tüketiminin insan sağlığına etkileri. *Van Tıp Dergisi*, 27(3), 371-382.
- Özdemir, D., Başer, H. ve Çakır, B. (2014). Tatlandırıcılar. *Türkiye Klinikleri J Endocrin*, 9(2), 60-70.
- Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y. and Erdoğan, S. F. (2015). Potential cytotoxic effect of Anilofos by using Allium cepa assay. *Cytotechnology*, 67(5), 783-791.
- Özkara, A. ve Akyıl, D. (2015). Bitkilerde mikronükleus testi ile genotoksik hasarın değerlendirilmesi. *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University*, (034), 27-40.
- Patel, S., Patel, P. and Bakshi, S. R. (2017). Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. *Cytotechnology*, 69(2), 245-263.
- Pehlivan, M. ve Köksal, E. (2020). Doğal ve yapay tatlandırıcıların glukoz intoleransı, karaciğer enzimleri ve oksidatif stres üzerine etkisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1), 140-154.
- Pepino, M. Y. (2015). Metabolic effects of nonnutritive sweeteners. *Physiology Behavior*, 152, 450-455.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251 (5471), 156-158.
- Raatz, S. K., Johnson, L. K. and Picklo, M. J. (2015). Consumption of honey, sucrose, and high-fructose corn syrup produces similar metabolic effects in glucose-tolerant and-intolerant individuals. *The Journal of Nutrition*, 145(10), 2265-2272.

- Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y. and Zhou, C. H. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1-13.
- Risdon, S., Meyer, G., Marziou, A., Riva, C., Roustit, M. and Walther, G. (2020). Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(5), 843-846.
- Riss, T. L. and Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating intensity in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51-62.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. and Minor, L. (2013). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual*, 1-26.
- Riss, T.L., Moravec, R.A. and Niles. A.L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. In M.J. Stoddart (Eds.), *Methods and Protocols*, Mammalian Cell Viability, New York: Humana Press, pp. 103-114.
- Rizkalla, S. W. (2010). Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutrition & Metabolism*, 7(1), 1-17.
- Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., Wilkins, R. C. and Fenech, M. F. (2018). The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cyto assay using imaging flow cytometry. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 53-64.
- Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M. J. and Gil, A. (2019). Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trials. *Advances in Nutrition*, 10, 31-48.
- Russo, A. and Degraffi, F. (2018). Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 36-40.
- Sadowska, J. and Rygielska, M. (2019). The effect of high fructose corn syrup on the plasma insulin and leptin concentration, body weight gain and fat accumulation in rat. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(7), 879-884.
- Saks, M., Upreti, S., SV, R. and Dang, R. (2017). Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 133-138.
- Salawu, A., Wright, K., Al-Kathiri, A., Wyld, L., Reed, M. and Sisley, K. (2018). Sister chromatid exchange and genomic instability in soft tissue sarcomas: potential implications for response to DNA-damaging treatments. *Sarcoma*, 2018, 1-8.

- Sánchez-Lozada, L. G., Mu, W., Roncal, C., Sautin, Y. Y., Abdelmalek, M., Reungjui, S., Le, M., Nakagawa, T., Lan, H. Y., Yu, X. and Johnson, R. J. (2010). Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *European Journal of Nutrition*, 49(1), 1-9.
- Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M. and Sofuni, T. (2002). Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 57-65.
- 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.
- Setayesh, T., Kundi, M., Nersesyan, A., Stopper, H., Fenech, M., Krupitza, G. and Knasmüller, S. (2020). Use of micronucleus assays for the prediction and detection of cervical cancer: a meta-analysis. *Carcinogenesis*, 41(10), 1318-1328.
- Sezginer, H. ve Dane. F. (2016). Toksik Maddelerin Genotoksik Analiz Yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9(1), 50-55.
- Sheiham, A. and James W. P. (2014). A reappraisal of the quantitative relationship between sugar intake and dental caries: the need for new criteria for developing goals for sugar intake. *BMC Public Health*, 14(1), 1-8.
- Siedlecka, D., Micał, W., Krzewicka-Romaniuk, E. and Romaniuk, A. (2020). The bitter side of high fructose corn syrup (HFCS)-the global obesity pandemic. *Journal of Education, Health and Sport*, 10(9), 747-751.
- Silva, M. R., Moya, C. Á., León, A. G. S., Velasco, R. R. and Flores, A. M. C. (2018). Genotoxic activity of saccharin, acesulfame-K, stevia and aspartame-acesulfame-K in commercial form. *Journal of Clinical Toxicology*, 8(386), 2161-0495.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and 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.
- Smart, D. J., Helbling, F. R., Verardo, M., Huber, A., McHugh, D. and Vanscheeuwijck, P. (2020). Development of an integrated assay in human TK6 cells to permit comprehensive genotoxicity analysis in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 849, 503129.
- Snyder, R. D. (2010). Possible structural and functional determinants contributing to the clastogenicity of pharmaceuticals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(8-9), 800-814.

- Sommer, S., Buraczewska, I. and Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534.
- Souto, E. B., Campos, J. R., Da Ana, R., Martins-Gomes, C., Silva, A. M., Souto, S. B., Lucarini, M., Durazzo, A. and Santini, A. (2020). Ocular cell lines and genotoxicity assessment. *International journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 2046.
- Souza, A. C. F., Yujra, V. Q., Pisani, L. P., Viana, M. D. B., De Castro, G. M. and Ribeiro, D. A. (2019). The use of single-cell comet assay on oral cells: a critical review. *Anticancer Research*, 39(8), 4011-4017.
- Speit, G. and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. and Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114(8), 785-796.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. and Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta histochemica*, 120(3), 159-167.
- Stults, D. M., Killen, M. W., Marco-Casanova, P. and Pierce, A. J. (2020). The Sister Chromatid Exchange (SCE) assay. *Molecular Toxicology Protocols*, 441-457.
- Suez, J., Korem, T., Zeevil, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, 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.
- Swithers, S. E. (2013). Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(9), 431-441.
- Şahin, Ç. E., Sezerol, M. A. ve Atak, M. (2021). Türkiye'deki birinci basamak sağlık merkezlerinde sağlıklı beslenme ve obezite hizmetlerinin değerlendirilmesi. *Anatolian Clinic the Journal of Medical Sciences*, 26(1), 60-69.
- Şekeroğlu, V. ve Atlı-Şekeroğlu, Z. (2011). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252.
- Şen, S., Beceren, A. ve Aksoy, H. (2018). Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi. *Journal of Human Sciences*, 15(3), 1634-1649.
- Tekin, T., Çiçek, B. ve Konyalıgil, N. (2018). İntestinal mikrobiyota ve obezite ilişkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 27(1), 95-99.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.

- Trasande, L., Shaffer, R. M. and Sathyanarayana, S. (2018). Food additives and child health. *Pediatrics*, 142(2).
- Tumini, E. and Aguilera, A. (2021). The sister-chromatid exchange assay in human cells. In A. Aguilera and A. Carreira (Eds.), *Homologous Recombination*, New York: Humana, 383-393.
- Türkez, H., Arslan, M. E. and Özdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089-1098.
- Uçar, A., Yılmaz, S., Yılmaz, Ş. and Kılıç, M. S. (2017). A research on the genotoxicity of stevia in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 221-224.
- van Eyk, A. D. (2015). The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 318-327.
- Vasileva, P., Stoyanov, I., Chayleva, E., Staykova, T. and Ivanova, E. (2021, 15-16 April). *Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of commonly used food additives on the root meristem cells of allium cepa*. 5th Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria.
- Veličkova, N. and Milev, M. (2020). Genotoxicity test methods - A tool for DNA and chromosome damage biomonitoring. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 148(9-10), 626-630.
- Vodenkova, S., Polivkova, Z., Musak, L., Smerhovsky, Z., Zoubkova, H., Sytarova, S., Kavcova, E., Halasova, E., Vodickova, L., Jiraskova, K., Svoboda, M., Ambrus, M., Hemminki, K. and Vodicka, P. (2015). Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis*, 30(4), 557-563.
- Vodicka, P., Vodenkova, S., Opattova, A. and Vodickova, L. (2019). DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 95-110.
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D. and Wang, X. (2010). An improved 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), 330-333.
- Wilson III, D. M. and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23.
- Wilson, A., Grabowski, P., Elloway, J., Ling, S., Stott, J. and Doherty, A. (2021). Transforming early pharmaceutical assessment of genotoxicity: applying statistical learning to a high throughput, multi end point in vitro micronucleus assay. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.

- Wójcik, E. and Sokół, A. (2020). Assessment of chromosome stability in boars. *PloS One*, 15(4), e0231928.
- Yılmaz, H. K. ve Yılmaz, H. Ö. (2019). Fruktoz tüketimi ve sağlık üzerine etkileri. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2), 50-57.
- Yılmaz, H. Ö. ve Yabancı-Ayhan, N. (2015). Fruktozun sağlık üzerine etkileri. *International Peer-Reviewed Journal of Nutrition Research*, (5), 69-80.
- Yılmaz, S. and Uçar, A. (2014). A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not?. *Cytotechnology*, 66(6), 875-881.
- Yılmaz, Ş. G., Uçar, A. and Yılmaz, S. (2020). Do steviol glycosides affect the oxidative and genotoxicity parameters in BALB/c mice?. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-6.
- Yilmaz, Z., Dogan, A. L., Ozdemir, O. and Serper, A. (2012). Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dental Materials Journal*, 31(6), 1028-1032.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Mamur, S., Yılmaz, E., Erikel, E., Çelebi Keskin, A. and 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.
- Zargaraan, A., Kamaliroosta, L., Yaghoubi, A. S. and Mirmoghtadaie, L. (2016). Effect of substitution of sugar by high fructose corn syrup on the physicochemical properties of bakery and dairy products: a review. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(4), 3-11.



GAZİ GELECEKTİR...