

## GIDA KATKI MADDESİ SODYUM BENZOATIN OKSİDATİF STRES VE GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF FOOD ADDITIVE SODIUM BENZOATE ON OXIDATIVE STRESS AND GENOTOXICITY

İlter İLHAN<sup>1</sup>, Duygu KUMBUL DOĞUÇ<sup>1</sup>, Muhammet Yusuf TEPEBAŞI<sup>2</sup>, Okan SANCER<sup>3</sup>, Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** İlhan İ, Kumbul Doğuç D, Tepebaşı Y, Sancer O, Büyükbayram Hİ. Gıda Katkı Maddesi Sodyum Benzoatın Oksidatif Stres ve Genotoksosite Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Med J SDU 2023; 30(3): 276-283.

### Öz

#### Amaç

Son yıllarda gıda katkı maddelerinin kullanımında belirgin artış vardır. Doğumdan ölüme kadar maruz kalınan bu maddelerin, insanlarda uzun süreli tüketime bağlı olarak oluşturabileceği yan etkiler oldukça önem kazanmıştır. Çalışmamızda özellikle puberte öncesi sıçanlarda sodyum benzoata maruziyetin oksidatif stres ve genotoksosite açılarından değerlendirilmesini amaçladık.

#### Gereç ve Yöntem

Kırk iki adet, 4 haftalık erkek sıçan, kontrol (n=14), deney 1 (Acceptable Daily Intake (ADI) dozunda sodyum benzoat, n=14) ve deney 2 (No Advers Effect Level (NOAEL) dozunda sodyum benzoat, n=14) grupları şeklinde 3 gruba ayrılmıştır. Altı hafta süresince oral gavaj uygulanmıştır. Çalışma sonunda sakrifiye edilen sıçanların kan örneklerinden biyokimyasal parametreler (glukoz, kreatinin, AST, ALT, ALP, lipid profili, total protein, albümin), total oksidan status (TOS), total antioksidan status (TAS), iskemi modifiye albü-

min (İMA) ölçülmüş ve Comet yöntemi ile DNA hasarı değerlendirilmiştir. Ölçülen TOS ve TAS parametrelerinden oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanmıştır.

#### Bulgular

NOAEL dozu sodyum benzoat uygulanan sıçanlarda ALT ve kreatinin seviyeleri yükselmiştir. Ayrıca TOS, İMA ve OSİ seviyeleri NOAEL grubunda yüksek iken TAS seviyeleri düşük bulunmuştur. Bunlara ek olarak NOAEL dozunda sodyum benzoat DNA hasarına yol açmıştır.

#### Sonuç

Çalışmamızda, prepubertal dönem sıçanlarda ADI dozunda sodyum benzoat uygulamasının, olumsuz bir etkisi gözlemlenmemiştir. Diğer taraftan NOAEL dozunda sodyum benzoat uygulamasının böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını bozduğunu ve oksidatif stres ile genotoksositeye yol açabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Comet, Gıda katkı maddesi, Oksidatif stres, Sodyum benzoat

Sorumlu yazar ve iletişim adresi / Corresponding author and contact address: İ.İ. / ilterilhan@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 22.03.2022 • Kabul tarihi/Accepted Date: 13.04.2022

ORCID IDs of the authors: İ.İ: 0000-0003-3739-9580; D.K.D: 0000-0002-3879-9917;

M.Y.T: 0000-0002-1087-4874; O.S: 0000-0001-7935-5004; H.İ.B: 0000-0003-0560-042X

## Abstract

### Objective

Recently, there has been a significant increase in the use of food additives. Generation of possible side effects depending on the long-term consumption of these substances from birth to death has gained importance in humans. In our study, we aimed to evaluate the exposure to sodium benzoate in terms of oxidative stress and genotoxicity, especially in prepubertal rats.

### Material and Method

In our study, 42 male rats (4 weeks-old) divided into three groups as the control (n=14), experiment 1 (sodium benzoate Acceptable Daily Intake (ADI) dose, n=14) and experiment 2 (sodium benzoate No Advers Effect Level (NOAEL)dose, n=14) groups and sodium benzoate was administration by oral gavage for 6 weeks. At the end of the study, rats were sacrificed and biochemical parameters (glucose, creatinine, AST, ALT, ALP, lipid profile, total protein, albumin), total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS),

ischemia modified albumin (IMA) were measured, and DNA damage was evaluated by Comet analysis. Oxidative stress index (OSI) was calculated from the TOS and TAS parameters.

### Results

ALT and creatinine levels were increased with the NOAEL dosage of sodium benzoate. In addition, TOS, IMA and OSI levels were elevated, while TAS levels were decreased in the NOAEL group. Also, NOAEL dose of sodium benzoate significantly caused DNA damage.

### Conclusions

In our study, no adverse effect was observed in the administration of sodium benzoate at the dose of ADI in prepubertal rats. On the other hand, we found that NOAEL dose of sodium benzoate impairs kidney and liver functions and causes oxidative stress and genotoxicity.

**Keywords:** Comet, Food additive, Oxidative stress, Sodium benzoate

## Giriş

Sodyum benzoat, hazır gıdalarda koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılan antimikrobiyal maddedir. Günümüzde üretilen pek çok sıvı-katı gıda ürünüde, ayrıca kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır (1). Sodyum benzoat gıda katkı maddeleri listesinde E211 olarak kodlanmıştır ve antimikrobiyal aktivitesini pH<5 olduğu durumlarda anaerobik glikolizi fosfofruktokinaz üzerinden inhibe ederek gösterir. Bu şekilde küf, bakteri ve maya gelişimi inhibe edilerek gıdanın raf ömrü uzatılmış olur (2, 3).

Gıda Katkı Maddeleri Eksper Komitesi (JECFA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), sodyum benzoatın günlük kabul edilebilir alım miktarını (ADI: Acceptable Daily Intake) 0-5 mg/kg olarak belirtmiştir (4, 5). Bu değer deney hayvanlarında yürütülen toksite çalışmalarında bulunan negatif bir etki oluşturmayan (NOAEL) miktarın (500 mg/kg) güvenlik faktörüne (100) bölünmesiyle bulunur (6). Oral olarak alınan sodyum benzoatın sindirim sisteminde hızlı bir şekilde emildiği, insanlarda ve deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İnsanlarda alındıktan 1-2 saat sonra plazma konsantrasyonunun en yüksek düzeyine ulaştığı bilinmektedir (7, 8). Sodyum benzoat dermal ya da oral yolla alındıktan sonra karaciğerde metabolize olmaktadır. Ağızdan alımı halinde benzoik

asit gastrointestinal sistemde hızla absorbe edilir ve karaciğerde glisin ile birlikte hippürik asit oluşumunu sağlar. Daha sonra hızlı bir şekilde idrar yolu ile atılır (9).

Küçük miktarlarda olsa bile sodyum benzoatın uzun süreli alımı sonucunda bazı hastalıklar ve kromozom seviyesinde hasar görülebilir (10). Ayrıca, benzoik asitin oral, dermal ya da solunum yoluyla alınımına bağlı olarak insanlarda düşük seviyelerde bile astım, deri döküntüleri gibi çeşitli allerjik reaksiyonlara ve anafaktik şoka neden olduğu bildirilmiştir (11). Bununla birlikte içeceklerde askorbik asit (C vitamini, E300) ile sodyum benzoat veya potasyum benzoatın beraber kullanılması bilinen bir karsinojen olan 'benzen'in oluşmasına yol açmaktadır. Bu maddelerin birlikte bulunduğu içeceklerde, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından benzen analizi yapılmış ve birçoğunun Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından zararlı kabul edilen dozu aşmadığı görülmüştür. Benzen miktarı fazla ölçülen içeceklerin ise formülleri değiştirilmiştir. Ek olarak, ısıya, ışığa maruz kalan ve uzun süre bekleyen ürünlerde, benzenin daha çok oluştuğu görülmüştür (12). Kola, limonata ve meyveli sodalar gibi alkol içermeyen birçok içekte sodyum benzoat bulunmakta ve bu içeceklerin özellikle puberte öncesi çocuklar tarafından tüketimi fazla olabilmektedir (13).

Oksidatif stres, hücre metabolizması sırasında meydana gelen reaktif oksijen türlerinin artışı ve antioksidanların yetersizliği sonucunda oksidatif dengenin bozulmasıdır. Bu nedenle, ortamdaki reaktif oksijen türlerinin seviyesini gösteren TOS ölçümü ile eş zamanlı toplam antioksidan seviyesini gösteren TAS ölçümü oksidatif stresin değerlendirmesinde sıklıkla kullanılan parametrelerdir (14). Bozulan oksidatif denge sonrası artış gösteren reaktif oksijen radikalleri hücrede lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllere zarar verebilmektedir (15). Ayrıca, artmış oksidatif stres serum albümin moleküllerinin N-terminal ucunda serbest radikal hasarına neden olarak IMA olarak adlandırılan metallere daha az afinite gösteren albümin formunu oluştururlar. IMA seviyelerinin iskemi veya oksidatif strese bağlı hastalıklarda arttığı bildirilmiştir (16).

Bu çalışmada, ADI ve NOAEL dozundaki sodyum benzoat uygulamasının puberte öncesi sıçanlarda serum biyokimya parametreleri ve oksidatif stres üzerine etkisi ile DNA düzeyindeki etkilerini araştırdık.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ile Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 18.02.2016 tarih ve 13 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

Bu çalışmada Wistar Albino cinsi toplam 42 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Deney boyunca sıçanlar standart ışık (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) ve ısı (23°C) koşullarında yeteri kadar su ve yem ile beslenmişlerdir.

Doğum sonrası, sıçanların anne sütü aldığı dönem süresince (4 hafta) beklenmiş, anne sütünden kesilince deney uygulamaları başlamıştır. Yavrular kontrol

(n=14), D1 (ADI dozu, n=14) ve D2 (NOAEL dozu, n=14) olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır (Tablo 1).

Sodyum benzoat için belirlenen ADI (5 mg/kg) ve NOAEL (500 mg/kg) dozları (JECFA, 1996) temel alınarak her bir grup için sıçanların ağırlığına göre günlük alabileceği dozlar hesaplanmıştır. Gavaj solüsyonları hazırlanırken, %99,5 saflıktaki sodyum benzoat (Sigma-Aldrich, USA, B3420) hesaplanan miktarda tartılıp içme suyunda çözdürülmüştür.

Deney gruplarına 6 hafta süresince oral gavaj ile ADI (D1) ve NOAEL (D2) dozlarında sodyum benzoat uygulanırken kontrol grubuna da aynı hacimde içme suyu verilmiştir. Gavaj uygulamaları, 0,3 ml/100 g/gün şeklinde deney hayvanları laboratuvarında veteriner hekim gözetiminde yapılmıştır. Gavaj uygulamaları sıçanlar 4 haftalık iken başlayıp 10 haftalık olana (puberte dönemine ulaşana) kadar devam etmiştir. Puberte başlangıcı sıçanlarda ortalama 8-10 hafta olarak kabul edilmektedir (17).

Deney sonunda sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan %10'luk ketamin HCl (90 mg/kg)- %2'lik ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edilerek kanları jelli biyokimya tüpleri ve K2-EDTA'lı tüplere alındı. Aynı gün oksidatif stres, biyokimyasal analiz ve DNA hasarının değerlendirilmesi yapıldı.

DNA hasarının değerlendirilmesi için, Singh ve arkadaşlarının 1988'de geliştirmiş olduğu alkali Comet metodu bazı farklılarla uygulanmış ve uygulama adımları aşağıda verilmiştir (18). Eppendorf tüpüne, önce Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Co., LLC.) ve ardından kan örnekleri (1:1 oranında) yavaşça eklendi. 2000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme işlemi sonrasında kan hücreleri ve histopaque arasında kalan lökositleri içeren bulutumsu beyaz kısım yeni ependorfa aktarıldı. Elde edilen hücreler PBS ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım atılarak kalan hücreler 30-40 µl PBS ile dilue edildi. 15 µl hücre süspansiyonu ile %0.6'lık düşük erime noktalı agaroz (LMA, Fisher

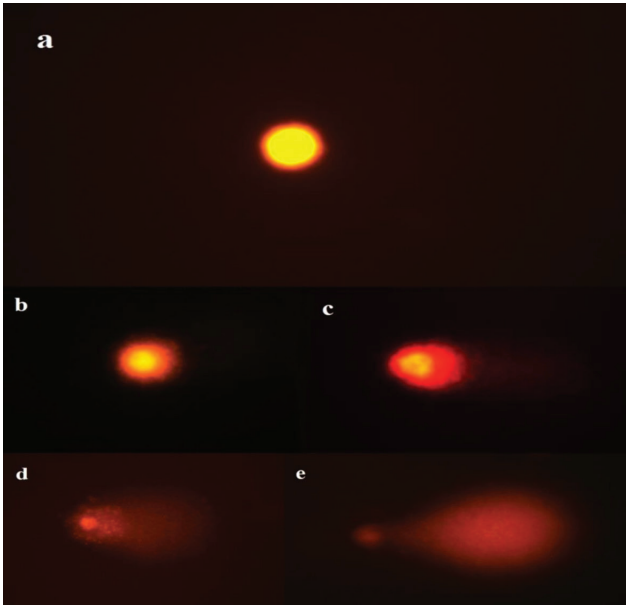
Tablo 1

Deney grupları

Gruplar	Uygulanan madde
Grup 1: Kontrol (n=14)	İçme suyu (0,3 ml/100 g/gün)
Grup 2: Deney 1 ( n=14)	ADI dozunda sodyum benzoat (5 mg/kg)
Grup 3: Deney 2 ( n=14)	NOAEL dozunda sodyum benzoat (500 mg/kg)

Scientific, LLC) 100 µl olacak şekilde yeni ependorf tüplerinde karıştırıldı.

Bu süspansiyon karışımı, yüzeyi daha önceden %1'lik normal erime noktali agaroz (NMA, Serva Electrophoresis GmbH) ile kaplanmış lamaların üzerine yayıldı. Her bir örnek için 2 lam hazırlandı. Lamaların üzerine lameller yerleştirildikten sonra buz üzerinde bir süre bekletildi ve lameller daha sonra dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Lamalar soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sup>2</sup>- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM Tris, pH 10, with 10% dimethyl sulfoxide and 1% Triton X-100 added fresh) 1 saat süre ile 4 °C'de karanlıkta bekletildi. Lizis işlemi sonrasında lamalar daha önceden soğutulmuş olan elektroforez tamponu (0.3 M NaOH ve 1 mM EDTA, pH > 13.0) içeren elektroforez tankına yerleştirildi ve karanlıkta ve 4°C'de 20 dakika bekletildi. Aynı alkali solüsyonda 300 mA'da 25 dakika elektroforez uygulandı. Lamalar nötralizasyon tamponu ile yıkandı ve 20 µg/mL etidyum bromür ile boyandı. Daha sonra lamalar, Zeiss Imager A1 floresan mikroskobu (Jena, Almanya) altında Zeiss Axiocam Icc 1 kamera (Jena, Almanya) ile fotoğraflandı. Her lam için 50 hücrenin fotoğrafları rastgele çekildi. Kuyruk uzunluğu (TL), kuyruk momentü (TM) ve kuyruk DNA yüzdesi (TDNAP) parametreleri Open Comet değerlendirme programı ile analiz edildi (Şekil 1).



**Şekil 1**

Comet yöntemi DNA görüntüleri (a-normal b, c, d, e-hasarlı DNA)

Oksidatif stresin değerlendirilmesinde TAS ve TOS parametreleri spektrofotometrik yöntemle Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) kitleri kullanılarak

Beckman Coulter AU5800 (Kaliforniya, Amerika) oto-analizörü ile ölçüldü (19, 20). Elde edilen TAS ve TOS değerleri kullanılarak OSİ değeri hesaplandı. OSİ aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

OSİ (arbitrary unit) = TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L) / TAS (mmol Trolox Eq/L) x 100.

Biyokimya parametreleri glukoz, kreatinin, AST, ALT, alkalen fosfataz, total kolesterol, trigliserit, HDL kolesterol, LDL kolesterol, total protein ve albümin düzeyleri spektrofotometrik yöntemle Beckman Coulter AU5800 (Kaliforniya, Amerika) otoanalizöründe ölçüldü.

Serum IMA düzeylerinin belirlenmesi için Bar-Or ve arkadaşlarının tanımladığı albümin kobalt bağlama testi kullanıldı. Son okutmalar Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japonya) spektrofotometre kullanılarak 470 nm'de yapıldı. Sonuçlar ortalama albümin düzeylerine göre düzeltilerek absorpsiyon ünitesi (ABSU) olarak verildi (21).

İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (ANOVA), posthoc Tukey's HSD testi kullanılarak IBM SPSS 20 programı ile yapıldı ve p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Değişkenler ortalama ± standart sapmalar olarak sunuldu.

## Bulgular

Spektrofotometrik olarak ölçülen serum biyokimya parametreleri istatistiksel olarak gruplar arasında değerlendirildiğinde kreatinin, ALT ve LDL kolesterol düzeyinde deney 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi (sırasıyla; p=0,001, p=0,047, p=0,015). Ayrıca deney 1 ve deney 2 grubu karşılaştırıldığında kreatinin seviyelerinin deney 2 grubunda anlamlı olarak arttığı bulundu (p=0,012) (Tablo 2).

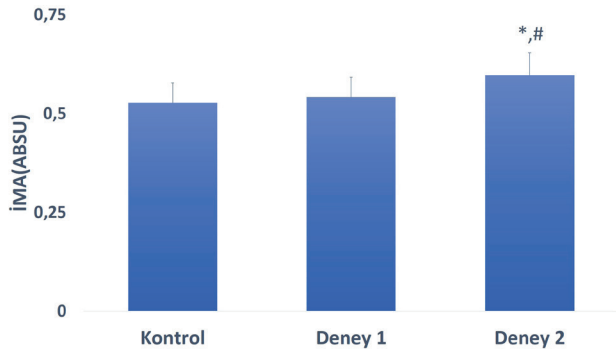
Kontrol ve deney gruplarında TAS, TOS, OSİ parametrelerinin ortalamaları ve standart sapmaları tablo 3'de gösterildi. Kontrol ve deney grupları oksidatif stres açısından değerlendirildiğinde; TOS ve OSİ kontrol ve deney 2 grubu karşılaştırıldığında, bu parametreler deney 2 grubunda artmış bulundu (sırasıyla; p=0,016; p=0,003). Ayrıca OSİ, deney 2 grubunda deney 1 grubuna göre de anlamlı olarak artmış bulundu (p=0,013). TAS düzeylerinde ise kontrol ve deney 2 grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşme saptandı (p=0,029). IMA düzeyleri incelendiğinde ise deney 2 grubunda kontrol ve deney 1 grubuna göre artış bulundu (sırasıyla; p=0,03, p=0,023) (Şekil 2).

Tablo 2

Serum biyokimya parametrelerinin ortalamaları ve standart sapmaları (Ort ± SS)

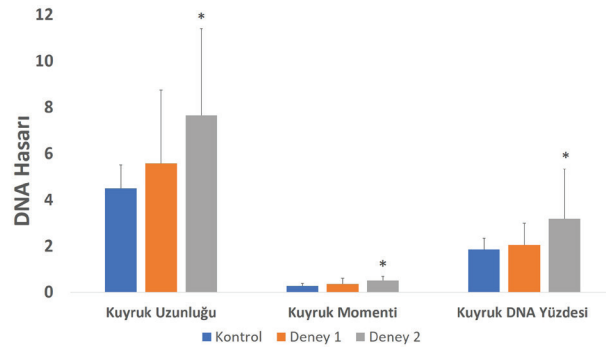
	Kontrol ort ± SS	Deney 1 ort ± SS	Deney 2 ort ± SS
Glukoz(mg/dl)	229,13±44	247,54 ± 63,9	252,47 ± 54,05
Kreatinin(mg/dl)	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,50 ± 0,04 <sup>a,b</sup>
AST(U/L)	116,4 ± 43,6	125,9 ± 47,2	148,83 ± 29,9
ALT(U/L)	52,34 ± 7	57,58 ± 16,1	63,2 ± 10 <sup>a</sup>
ALP(U/L)	288,90 ± 69,92	295,33 ± 49,85	297,45 ± 70,8
Total Kol. (mg/dl)	43,55 ± 11,54	42,17 ± 4,64	51,25 ± 12,97
Trigliserid(mg/dl)	32,07 ± 9,83	31,73 ± 9,82	39,48 ± 21,64
HDL kol. (mg/dl)	28,17 ± 6,91	27,39 ± 3,89	25,03 ± 4,78
LDL kol. (mg/dl)	8,96 ± 6,85	8,43 ± 4,99	18,32 ± 11,9 <sup>a</sup>
Total Protein(g/dl)	5,93 ± 0,32	5,96 ± 0,64	5,86 ± 0,43
Albumin(g/dl)	2,92 ± 0,17	2,86 ± 0,16	2,80 ± 0,18

'a' kontrol grubundan farklılığı, 'b' deney 1 grubu ile olan farkı göstermektedir. (p<0,05) SS: Standart sapma



Şekil 2

İMA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması  
\*' kontrol grubundan farklılığı, '#' deney 1 grubu ile olan farkı göstermektedir. (p<0,05)



Şekil 3

Comet parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması  
\*' kontrol grubundan farklılığı göstermektedir. (p<0,05)

Tablo 3

TAS, TOS ve OSİ parametrelerinin ortalamaları ve standart sapmaları (Ort ± SS)

	TAS(mmol Trolox Eq/L) ort ± SS	TOS(μmol H2O2 Eq/L) (ort ± SS)	OSİ (ort ± SS)
Kontrol	1,72 ± 0,27	19,79 ± 8,05	1,17 ± 0,45
Deney 1	1,66 ± 0,14	21,85 ± 8,03	1,31± 0,44
Deney 2	1,54 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	31,69 ± 14,87 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,94 <sup>a,b</sup>

'a' kontrol grubundan farklılığı, 'b' deney 1 grubu ile olan farkı göstermektedir. (p<0,05) TOS:Total Oksidan Kapasite; TAS: Total Antioksidan Kapasite; OSİ: Oksidatif Stres İndeksi. SS: Standart sapma



Tablo 4

Comet parametrelerinin ortalamaları ve standart sapmaları (Ort ± SS)

	Kuyruk Uzunluğu ort ± SS	Kuyruk Momenti ort ± SS	Kuyruk DNA yüzdesi ort ± SS
Kontrol	4,50 ± 1,01	0,27 ± 0,11	1,85 ± 0,49
Deney 1	5,57 ± 3,17	0,36 ± 0,25	2,05 ± 0,94
Deney 2	7,64 ± 3,75 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,18 <sup>a</sup>	3,18 ± 2,15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> kontrol grubu ile olan farkı göstermektedir. (p<0,05) SS: Standart sapma

Sodyum benzoat'ın DNA üzerine etkisi Comet yöntemi ile değerlendirildi ve kuyruk uzunluğu (TL), kuyruk momenti (TM) ve kuyruk DNA yüzdesi (TDNAP) parametrelerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 4'de gösterildi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde deney 2 grubunda kontrole göre TL, TM ve TDNAP parametrelerinde anlamlı bir artış saptandı (sırasıyla; p=0,018, p= 0,003, p=0,039) (Şekil 3).

### Tartışma

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoatın memelilerde toksik ve karsinojen etkisinin çok düşük olduğuna dair genel bir fikir birliği olmasına rağmen potansiyel mutajenlere dönüşme yeteneğine sahip oldukları da bilinmektedir (22). Ayrıca benzoatın membran iletkenliği ve proton geçirgenliğinde artışa neden olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir (12, 23, 24). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda sodyum benzoatın prepubertal dönemde ADI ve NOAEL dozunda oksidatif ve genotoksik etkilerini ve serum biyokimya parametrelerine etkilerini araştırdık.

Oyewolee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, iki hafta süreyle oral 200 mg/kg sodyum benzoat uygulanması sıçan karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerinde zararlı etkilere neden olduğu gösterilmiştir (25). Yapılan bir diğer araştırmada, 250 mg/kg/gün sodyum benzoat uygulamaya başladıktan sonra sıçanlarda 7 ile 21 gün arasında AST ve ALT düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur (26). Khodaei ve arkadaşları ise farelere 150, 300 ve 600 mg/kg/gün dozunda 4 hafta sodyum benzoat uygulamışlar ve böbrekteki hasar miktarının karaciğerdeki hasara göre çok daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte özellikle böbrekteki lipid peroksidasyonu ile oksidan moleküllerin arttığını ve antioksidan enzimlerin azaldığını dolayısıyla oksidatif strese bağlı bir hasarın görüldüğünü öne sürmüşlerdir. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda da ALT ve kreatinin seviyelerinin

özellikle deney 2 grubunda kontrol grubuna göre yükselmesi bu dozda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının bozulduğunu göstermektedir.

Piper ve ark. tarafından maya üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda sodyum benzoatın mitokondriyal ROS oluşumunu ciddi bir şekilde arttırdığı ve antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, katalaz vs.) oluşumunu azalttığı ortaya konulmuştur (27, 28). Bir başka hayvan çalışmasında ise 200, 400 ve 700 mg/kg/gün dozunda, 30 gün sodyum benzoat uygulamasının oksidatif stres ile birlikte inflamatuvar sitokinlerin artışına yol açtığı gösterilmiştir (29). Ayrıca in vitro koşullar altında, farklı konsantrasyonlardaki sodyum benzoatın insan lenfositlerinde antioksidan enzimlerin (GPx, GST, CAT ve SOD) aktivitelerini azalttığı rapor edilmiştir (30). Çalışmamızda ise sodyum benzoatın 500 mg/kg dozda serum TOS ve OSI seviyesini anlamlı olarak arttırdığını TAS seviyesini ise anlamlı olarak azalttığını bulduk. Bu durum NOAEL dozunda sodyum benzoatın oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese yol açtığını göstermektedir. Oksidatif stres organ toksisitesinin yanında akut iskemik inmenin de etyopatogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (31). Çalışmamızda albuminin iskemi ve oksidatif stres altında oluşan bir formu olan IMA düzeyleri değerlendirildiğinde deney 2 grubunda anlamlı yükseklik bulunmuştur. Literatürde gıda katkı maddeleri ve sodyum benzoatın serum IMA düzeyleri üzerine etkisi ile ilgili çalışma olmamakla beraber NOAEL grubunda artmış IMA düzeyleri oksidatif stresle ilişkili olabilir (32).

Ayrıca, bozulan oksidatif denge sonrası artan reaktif oksijen türleri, DNA üzerindeki bazlarla veya bu bazlarda bulunan çift bağlar ile reaksiyona girerek çok çeşitli toksik etkiler gösterebilirler (15). Bununla birlikte oluşan baz radikalleri proteinlerdeki aminoasitler ile çapraz bağlar oluşturabilmektedir (33). Ayrıca, DNA'da bulunan karbonhidrat yapılarının reaktif oksijen türleriyle etkileşimi modifikasyonlara ve zincir kırıl-

malarına yol açabilmektedir. Sonuç olarak oksidatif strese maruz kalınması replikasyon ve transkripsiyon üzerine etkili olup aynı zamanda DNA tamir mekanizmalarını baskılayarak DNA hasarını arttırmaktadır (34). 2011'de Zengin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sodyum benzoatın lenfositlerde kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu ayrıca DNA hasarına yol açtığı ortaya konulmuştur (35). 2016'da Çetin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada yeni doğan ve hamile sıçanlarda sodyum benzoatın periferik kan hücrelerinde mikronükleus oluşumu, DNA hasarı ve mitotik indeksi arttırdığı belirtilmiştir (36). Mpountoukas ve arkadaşlarının 2008'de yapmış olduğu çalışmada sodyum benzoatın, 4 ve 8 mM konsantrasyonlarında zayıf bir sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (37). Yapılmış olan bu araştırmalar sonucunda sodyum benzoatın yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterebileceği belirlenmiştir. Çalışmamızda prepubertal dönem boyunca sodyum benzoat uygulamanın genotoksik etkileri Comet yöntemi ile değerlendirilmiş ve TL, TM ve TDNAP'de anlamlı düzeyde artış genotoksisite göstergesi olarak kabul edilmiştir. Sodyum benzoatın ADI (5 mg/kg) dozlarında DNA hasarı oluşturabilecek bir etkiye sahip olmadığı ancak NOAEL (500 mg/kg) dozunda genotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında sodyum benzoatın doz bağımlı olarak oksidatif stresi artırarak genetik hasara yol açabileceğini düşünmekteyiz.

## Sonuç

Gıda katkı maddeleri özellikle artan dünya nüfusunu yeterince beslemeyi devam ettirmek için önemlidir. Bununla birlikte sık kullanılan bu maddelerin güvenlikleri sürekli olarak yeniden değerlendirilmelidir. Çalışmamızda sodyum benzoatın puberte öncesi ratlarda NOAEL dozunda böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını bozduğunu ve oksidatif stres ile genotoksisiteye yol açtığını bulduk. Bu durum sodyum benzoatın ADI dozlarında gözlenmemiş olsa da özellikle sodyum benzoat içeren yiyecek ve içeceklerin puberte öncesi çocuklarda tüketim miktarına dikkat edilmesini önermekteyiz.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, hayvan refahı gözetilerek Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 18.02.2016 tarih ve 13 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

## Finansman

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

## Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler yazarlardan talep edilebilir.

## Yazar Katkıları

İİ: Çalışmanın planlanması; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Makalenin Yazımı.

DKD: Çalışmanın planlanması; Proje Yönetimi, Makalenin düzenlenmesi.

MYT: Araştırma; Formal Analizler; Metodoloji; Makalenin Yazımı.

OS: Formal Analizler; Araştırma.

HİB: Verilerin İşlenmesi; Araştırma.

## Kaynaklar

1. Ünlütürk A, Turantaş F. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, 1. Baskı. ISBN 975-483-383-4, İzmir; 1998.
2. Coşkun F. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2006; (2): 27-33.
3. Özdemir H, Turhan AB, Arıkoğlu H. Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması. European Journal of Basic Medical Science. 2012;2:34-40.
4. Additives EPoF, Sources N. Scientific Opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. EFSA Journal. 2016;14(3):4433.
5. World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants [Internet]. WHO Technical Report Series 909. 2002 [cited 15 January 2022]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42578/WHO\\_TRS\\_909.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42578/WHO_TRS_909.pdf?sequence=1).
6. Çalışır ZE, Çalışkan D. Food additives and effects on the human health. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University. 2003;32(3):193-206.
7. United States Environmental Protection Agency. Provisional Peer Reviewed Toxicity Values for Benzoic Acid. [cited 15 January 2022]. Available from <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1010QFV.PDF?Dockey=P1010QFV.PDF>
8. Kubota K, Ishizaki T. Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. European journal of clinical pharmacology. 1991;41(4):363-8.
9. Feillet F, Leonard J. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. Journal of inherited metabolic disease. 1998;21(1):101-11.
10. Tuormaa TE. The adverse effects of food additives on health: a review of the literature with a special emphasis on childhood hyperactivity. Journal of Orthomolecular Medicine. 1994;9:225.
11. Coyerly J, Peters L, Whittle E, Basketter D. Susceptibility to skin stinging, non-immunologic contact urticaria and acute skin irritation; is there a relationship? Contact dermatitis. 1998;38(2):90-5.
12. Piper JD, Piper PW. Benzoate and sorbate salts: a systematic review of the potential hazards of these invaluable preserva-

- tives and the expanding spectrum of clinical uses for sodium benzoate. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2017;16(5):868-80.
13. Darch M, Martyn D, Ngo K, Jack MM. An updated estimate of benzoate intakes from non-alcoholic beverages in Canada and the United States. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2021;38(5):701-17.
  14. Klisic A, Kavaric N, Vujcic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljivic J, Ninic A. Total oxidant status and oxidative stress index as indicators of increased Reynolds Risk Score in postmenopausal women. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(19):10126-33.
  15. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015;6(3).
  16. Savci U, Senel E, Oztekin A, Sungur M, Erel O, Neselioglu S. Ischemia-modified albumin as a possible marker of oxidative stress in patients with telogen effluvium. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2020;95:447-51.
  17. Mülazımoğlu S, İde T, Aslan S. Ratlarda üreme. Yücel O (Editör) *Küçük deney hayvanlarından rat* Ankara: J Clin Anal Med. 2012:39-44.
  18. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
  19. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
  20. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
  21. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *The Journal of emergency medicine*. 2000;19(4):311-5.
  22. Gardner LK, Lawrence GD. Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(5):693-5.
  23. Gutknecht J. Aspirin, acetaminophen and proton transport through phospholipid bilayers and mitochondrial membranes. *Molecular and cellular biochemistry*. 1992;114(1):3-8.
  24. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press, USA; 2015.
  25. Oyewole OI, Dere FA, Okoro OE. Sodium benzoate mediated hepatorenal toxicity in wistar rat: Modulatory effects of *azadirachta indica* (neem) leaf. *European Journal of Medicinal Plants*. 2012;2(1):11.
  26. Efekemo O, Essien EB, Akaninwor JO. The Effect of Oral Intake of Sodium Benzoate on the Activity of Liver Marker Enzymes and Electrolyte Level of the Wistar Albino Rats. *Asian Food Science Journal*. 2019;11(2):1-9.
  27. Piper PW. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(11-12):1219-27.
  28. Piper PW. Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Advances in applied microbiology*. 77: Elsevier; 2011. p. 97-113.
  29. Khan IS, Dar KB, Ganie SA, Ali MN. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2020:1-10.
  30. Yetuk G, Pandir D, Bas H. Protective role of catechin and quercetin in sodium benzoate-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in human erythrocytes in vitro. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
  31. Jena I, Nayak SR, Behera S, Singh B, Ray S, Jena D, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin, oxidative stress, and antioxidant status in acute ischemic stroke patients. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2017;8(1):110.
  32. Roy D, Quiles J, Gaze D, Collinson P, Kaski J, Baxter G. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart*. 2006;92(1):113-4.
  33. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 2003;17(10):1195-214.
  34. Hu JJ, Dubin N, Kurland D, Ma B-L, Roush GC. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutation Research/DNA Repair*. 1995;336(2):193-201.
  35. Zengin N, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S, Aksoy H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(4):763-9.
  36. Saatci C, Erdem Y, Bayramov R, Akalin H, Tascioglu N, Ozkul Y. Effect of sodium benzoate on DNA breakage, micronucleus formation and mitotic index in peripheral blood of pregnant rats and their newborns. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016;30(6):1179-83.
  37. Mpountoukas P, Vantarakis A, Sivridis E, Lialiaris T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(7):2390-3.