






Laktitolün Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesiEce Avuloğlu Yılmaz*¹ , Sevcan Mamur² , Esra Erikel³ ,
Deniz Yüzbaşıoğlu³ , Fatma Ünal³ ¹Amasya Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Sağlık Bilgi Sistemleri Teknikerliği Programı, 05100, Amasya, Türkiye²Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06830, Ankara, Türkiye³Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye**Öne Çıkanlar**

- Laktitol tatlandırıcılar sınıfına dâhil bir gıda katkı maddesidir.
- Laktitolün olası genotoksik etkisi comet testi ile insan lenfositlerinde değerlendirilmiştir.
- Laktitolün sitotoksitesi MTT testi ile BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde incelenmiştir.
- Sonuçta laktitolün önemli bir genotoksik ve sitotoksik etki sergilemediği tespit edilmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş: 13/10/2022

Kabul: 16/11/2022

Anahtar KelimelerLaktitol,
Genotoksisite,
Sitotoksisite,
Comet,
MTT**Öz**

Laktitol bir poliol (şeker alkolü) olup tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Tatlılar, sakızlar, hamur işleri ve ekmekler gibi sık tüketilen gıdalarda bulunmakla birlikte bazı farmasötiklerde de bulunmaktadır. Kullanımları sürekli artan gıda katkı maddelerinin sağlığa olan etkileri de çokça tartışılmaktadır. Genotoksisite, biyolojik, fiziksel veya kimyasal herhangi bir ajanın DNA hasarına neden olabileceği potansiyeli olarak tanımlanır ve söz konusu hasarın mutasyona neden olabileceği kabul edilmektedir. Sitotoksisite testleri, maddelerin çeşitli dokulara ya da hücrelere toksisitesini belirlemek için kullanılır. Bu çalışmada, laktitolün genotoksik ve sitotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla comet ve MTT testleri kullanılmıştır. Comet testi sağlıklı iki donörden alınan kan örneklerinden izole edilen lenfositlerde, MTT testi ise BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelere laktitolün (125 µg/mL sadece MTT testinde), 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlarıyla comet testinde 1 saat, MTT testinde 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçta laktitolün önemli bir genotoksik ve sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak bu sonuçların farklı test yöntemleri ve hücre grupları ile desteklenmesi gereklidir.

Investigation of Genotoxic and Cytotoxic Effects of Lactitol**Highlights**

- Lactitol is a food additive included in the sweeteners class.
- The possible genotoxic effect of lactitol was evaluated in human lymphocytes by the comet assay.
- The cytotoxicity of lactitol was investigated in BHK-21 An 31-baby hamster kidney cells by MTT test.
- As a result, it was determined that lactitol did not exhibit a significant genotoxic and cytotoxic effect.

Article Info

Received: 13/10/2022

Accepted: 16/11/2022

KeywordsLactitol,
Genotoxicity,
Cytotoxicity,
Comet,
MTT**Abstract**

Lactitol is a polyol (sugar alcohol) and a food additive used as a sweetener. It is included in common foods such as sweets, chewing gums, pastries, and bread, but also other some pharmaceuticals. The health effects of food additives, whose use is constantly increasing, are also widely discussed. Genotoxicity is defined as the ability of any biological, physical, or chemical agent to cause DNA damage, and it is accepted that such damage can cause mutation. Cytotoxicity tests are used to predict the toxicity of substances to various tissues or cells. In this study, comet and MTT tests were used to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of lactitol. Comet test was performed with lymphocytes isolated from blood from two healthy donors, and MTT test was performed on BHK-21 An 31 baby hamster kidney cells. Cells were treated with (125 µg/mL only in MTT test), 250, 500, 1000, 2000, and 4000 µg/mL concentrations of lactitol for 1 hour in the comet test and 24 hours in the MTT test. As a result, it was determined that lactitol did not show a significant genotoxic and cytotoxic effect. However, these results need to be supported by different test methods and cell groups.



1. GİRİŞ

Gıda ve beslenme, insanoğunun uzun yıllardır teknolojik ve bilimsel ilerlemeler ışığında geliştirdiği ve üzerinde çalıştığı en önemli konulardan biri olmuştur. Söz konusu ilerlemeler içinde belki de en çok tartışılanı gıdalara eklenen kimyasal bileşenlerdir. Vitaminler, karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve mineraller gıdalardaki doğal bileşenler olup, bunlara ek olarak gıdaları işleme aşamalarında isteğe bağlı olan veya olmayan şekilde eklenen bazı kimyasal maddeler de vardır. Bu kimyasal bileşenlere gıda katkı maddeleri adı verilmektedir. Gıda katkı maddeleri, aromayı korumak, tadını, görünümünü veya diğer niteliklerini geliştirmek için gıdaya eklenen maddelerdir [1-3]. Bunlardan biri veya birkaçı paketlenmiş gıdalarda mutlaka bulunmaktadır.

İşlevlerine göre çok sayıda ve farklı özellikte gıda katkı maddesi sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflardan birini oluşturan tatlandırıcılar binlerce gıda ürünüde bulunan ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinden birisidir. Tatlandırıcı içeren birçok gıda ürünü arasında özellikle diyabetik ve/veya obez kişiler için üretilen yiyecek ve içecekler, tatlılar, sakızlar, hamur işleri ve ekmekler bulunmaktadır. Ayrıca diş macunları ve öksürük şurupları gibi diğer kişisel bakım ve farmasötik ürünlerde de kullanılmaktadır [4]. Bu tür gıda katkı maddeleri öncelikle gıda endüstrisinde şekersiz düşük kalorili gıdaların işlenmesi için kullanılmaktadır. Çoğu, bir kez alındıklarında herhangi bir glisemik etki/insülin reaksiyonu indüklemediği için, insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca şekerden farklı olarak kalori değerleri yoktur ya da düşüktür ve diş plağı mikroflorasını olumsuz etkilemezler [4, 5].

Polioller (şeker alkoller) tatlandırıcıların bir grubu olup doğal tatlandırıcıları içerir. Bunlar en sık kullanılan tatlandırıcı sınıfı olup, hücre içine girmek için insüline ihtiyaç göstermezler, bu nedenle diyabetli hastaların kullanımlarına uygundur. Ancak günlük aşırı alımın (yetişkin bir insan ortalama 70 kg kabul edilerek 50-60 g) karaciğerde glikoza dönüştüğu de ifade edilmektedir. Poliollerin belirli miktarların üzerinde tüketiminin oluşturacağı laksatif etkinin bilinmesi, bunların gıdalarda kullanımlarını kısıtlayan başka bir konudur [6, 7].

Laktitol (E966) bir disakkarit polioller (şeker alkolü) olup, şekerden daha az (0,3-0,4 kat) tatlıdır. Kan şekeri düzeyine etkisi önemsizmeyecek kadar azdır. Bu tatlandırıcı ile üretilen ürünlerin lezzetli olduğu ve tüketimi sırasında beğerilmeyen bir tat bırakmadığı bildirilmektedir. Ayrıca laktitol ilaçlar gibi farmasötik ürünlerde de ek komponent niteliğinde kullanılmaktadır. Bunların dişında, laktozun yerine prebiyotik olarak fonksiyonel gıda ürünlerinde, özel beslenmeye yönelik gıdalarda ve bazı tedaviye dönük uygulamalarda da kullanılmaktadır [8, 9].

Genotoksisite, fiziksel, kimyasal veya biyolojik herhangi bir etkenin DNA'da hasara neden olma potansiyeli olarak tanımlanmakta ve söz konusu hasarın mutasyona neden olabileceği kabul edilmektedir. Onarılmamış genetik hasarlar, genetik materyalde kalıcı değişikliklere (mutasyonlar) yol açabilir. Bu durum özellikle kritik genlerde meydana gelirse kansere dahi yol açabilir. Bu nedenle, her mutajen potansiyel olarak kanserojen olarak kabul edilir. Mutajenite, insan sağlığı üzerindeki önemli sonuçları nedeniyle, tüm ürünlerin etkilerinin belirlenmesinde gerekli olan bir risk değerlendirmesidir. Bu nedenle birçok kimyasal ürün gibi gıda katkı maddelerinin güvenilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen test stratejileri için kilit bir noktadır [10]. Hücrenin bütünlüğünü etkileyerek genetik materyale zarar veren herhangi bir ajan genotoksin olarak adlandırılmaktadır. Genotoksinler doğrudan ya da dolaylı hasar oluşturmak suretiyle DNA'nın yapısını değeristirebilir. DNA eklentileri, oksidasyon ve alkilasyon gibi olaylar çoğu kimyasalın genotoksik etkisinin mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu hasarlar DNA onarım mekanizmaları ile genomik DNA'dan uzaklaştırılır. Ancak, onarılmamış hasarlar kromozomal kararsızlığa veya hücre ölümlüne yol açabilir. Söz konusu bu hasarların kanserogeneze de hizmet ettiği bilinmektedir[10,11].

Comet testi, tek tek hücrelerde DNA zincir kırıklarının ölçmek için kullanılan bir genotoksisite test yöntemidir. Küçük parçalara ayrılmış DNA'nın bir agaroz matrisi boyunca elektroforez altında bozulmamış DNA'dan daha hızlı göç etmesi ilkesine dayanır. Testin çok yönlülüğü ve duyarlılığı, çok çeşitli deneysel koşullar altında çok sayıda farklı organizmadan elde edilen hücrelerde kimyasal veya fiziksel ajanların neden olduğu DNA hasarını değerlendirmek için uygulanmasına yol açmıştır. Comet testi insan biyo-izlem çalışmalarında DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmanın bir biyolojik belirteci olarak ve çeşitli sentinel organizmalarda ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılır. Kontrollü laboratuvar koşullarında uygulanan bu test, kimyasalların etki şeklinin anlaşılmasına katkıda bulunmakta ve risk değerlendirmesi hakkında bilgi vermektedir [12, 13].

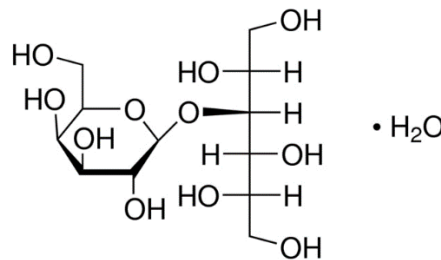
Birçok kimyasal ajan hücelere farklı seviyelerde zarar vererek sitotoksisiteye neden olmaktadır. Söz konusu ajanların biyolojik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, bunların toksik olup olmadığının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla *in vitro* hücre kültüründe sitotoksisite testleri yapılmaktadır. Uygulanan bu testler kısa zamanda birçok ajanın aktivitesinin incelenmesine izin vermekte ve ileriye dönük yapılması gereken değerlendirmeler için temel veriler sunmaktadır. Maddelerin çeşitli dokulara toksisitesini tahmin etmek için kullanılan ilk *in vitro* biyoanaliz yöntemleri arasında olan sitotoksisite testleri, güvenlik değerlendirmesi için çok önemli araçlardır. Sitotoksisitenin veya hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi en çok tercih edilen kolorimetrik testlerden biridir [14]. Test hızlı, güvenilir ve uygulaması kolay olup dünya çapında birçok laboratuvarında tercih edilmektedir [15, 16].

Bu çalışmanın amacı, genotoksik ve sitotoksik etkileri yönünden çok sınırlı değerlendirmeye sahip olan laktitolün genotoksik etkisini insan periferik lenfositlerinde comet testi ile, sitotoksik etkisini ise BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde MTT testi ile değerlendirmektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

Test maddesi olan laktitol (Katalog No: 81025-04-9), Sigma-Aldrich firmasından satın alınmış ve steril distile suda çözülerek kullanılmıştır. Laktitolün kimyasal yapı formülü Şekil 1'de gösterilmiştir. DMSO (Katalog No: 67-68-5), EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), Triton X-100 (Katalog No: 9002- 93-1), düşük erime ısı agar (Katalog No: 9012-36-6), normal erime ısı agar (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog. No: 1239-45-8) ve H₂O₂ (Katalog No: 7722-84-1) Applichem'den, NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Tris (Katalog No: 77-86-1), PBS (Katalog No: L1825) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Merck'ten temin edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (DMEM) (Katolog No: F0445), fetal bovine serum (FBS) (Katolog No: S0613), penicillin/streptomycin (Katolog No: A2213), trypsin (Katolog No: L2163) Biochrome'den, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Katolog No: M2128) Sigma'dan temin edilmiştir. Çalışma, Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 11.06.2020-42 tarih ve sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Laktitolün kimyasal yapısı [17]

2.2. Comet Testi

Bu araştırmada, Singh ve arkadaşlarının [18] comet tekniği bazı değişikliklerle uygulanmıştır [13, 19]. Sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı olmayan, genotoksik bir etkene maruziyeti olmayan, sağlıklı ve 25-30 yaşları arasında iki kadın gönüllüden periferal kan örnekleri temin edilmiştir. Sođuk ortamda 100 µL kan, PBS ile karıştırılarak süspanse edilmiş ve ardından Biocoll kullanılarak lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositlerde tripan mavisi canlılık testi gerçekleştirilerek, hücre canlılık oranı \geq %97 olarak saptanmıştır. Laktitolün DNA'da bir hasar oluşturup oluşturmadığını belirlemek için izole lenfositler beř farklı konsantrasyon (250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL) ile tek başına 1 saat muamele edilmiştir. Ayrıca, kùltür ortamına bir pozitif kontrol (100 µM, H₂O₂) ve bir negatif kontrol (distile su) dahil edilmiştir. İnkübasyon sonunda, santrifüj işlemi gerçekleştirilerek süpernatant atılmış ve hücreler PBS ile resüspanse edilmiştir. Bu aşamadan sonra, lenfositler temiz endorflar içersinde düşük erime ısılı agarla karıştırılmıştır. Bu lenfosit-agar karışımları önceden yüksek erime ısılı agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılarak lamelle kapatılmıştır. Preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra lameller kaldırılmış ve lysing solüsyonu ile en az 1 saat muamele edilmiştir. Daha sonra elektroforez tamponunda beklemeye alınan preparatlara (pH>13) 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez işlemi uygulanmıştır. Takiben 0,4 M Tris (pH=7,5) tamponunda nötrale edilen lamalar, EtBr ile boyanarak Olympus marka floresan mikroskopta 40X objektifte incelemeye alınmıştır. Her bir donör ve konsantrasyon için 100 hücre olmak üzere toplam 200 hücre Comet ölçüm programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak değerlendirilmif ve hücrelerin hasar dereceleri iki farklı comet parametresi (kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini) bakımından analiz edilmiştir, ek olarak istatistiksel değerlendirmede t-testi kullanılmıştır.

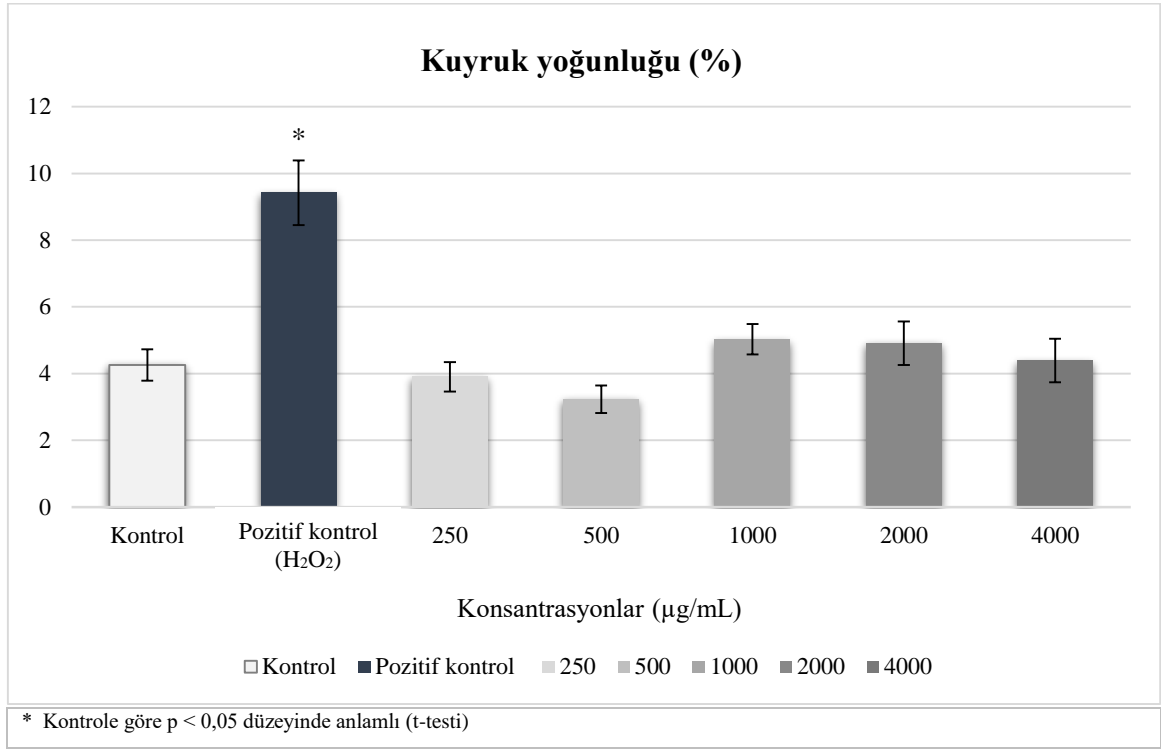
2.3. MTT Testi

Laktitolün potansiyel sitotoksik etkisi BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde (HÜKÜK, Ankara) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile analiz edilmiştir. MTT testi Mossman'ın [20] metoduna göre bazı modifikasyonlarla [16] takip edilmiştir. BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve 2mM L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içerisinde nemlendirilmif, %5 CO₂/ %95 hava, 37°C'de 75 cm² ya da 25 cm² kùltür flaklarında geliştirilmifdir. Analiz için hücreler 96 kuyucuklu plakalara alınarak her bir kuyucuğa 5x10³ hücre gelecek şekilde ekilmifdir. BHK-21 An 31 hücreleri, Laktitolün altı farklı konsantrasyonu (125, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL) ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Süre bitiminde tüm kuyucuklara MTT solüsyonu ilave edilmiştir. Formazan kristalleri oluşana kadar (yaklaşık 2-4 saat) inkübe edilmiştir. Takiben tüm kuyucuklara çözücü çözeltilisi olarak dimetilsülfoksit (DMSO) eklenecek kristallerin çözümlenmesi sağlanmıştır. Tüm uygulamalar için absorbans (ABS) değerleri Elisa okuma cihazında (Molecular Devices, M5) 570 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Tüm işlemler 3 tekrarlı olarak gerekleştirilmifdir. Elde edilen absorbans değerlerinden, tüm uygulamalar için ortalama absorbans ve nisbi canlılık (% canlılık) değerleri hesaplanmıştır. İstatistiki değerlendirme SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak One Way ANOVA-Dunnet testi ile gerekleştirilmifdir. P<0,05 'in altındaki değerler kontrole göre anlamlı kabul edilmiştir.

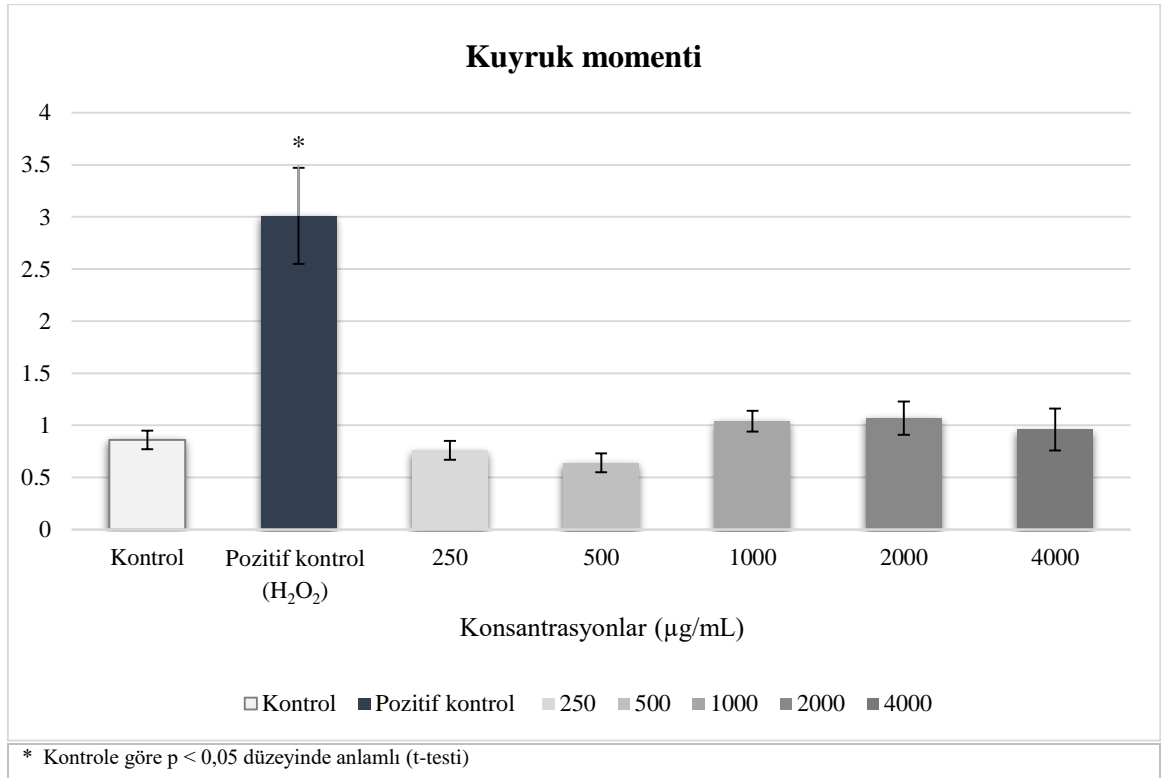
3. BULGULAR

3.1. Comet Testi

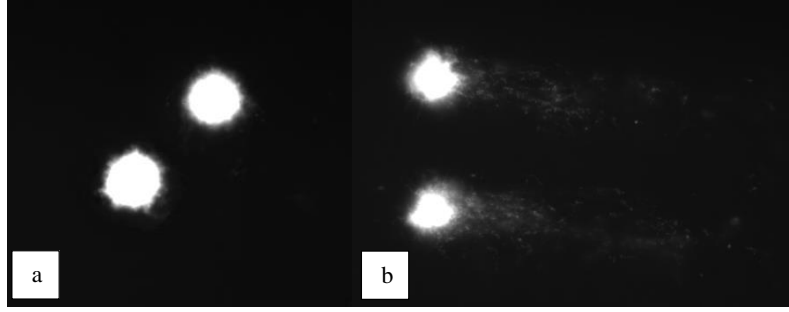
Laktitolün izole lenfositlere uygulamasının DNA hasarı üzerine etkileri iki önemli comet parametresi olan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini açısından değerlendirilmifdir. Buna göre, laktitolün izole lenfositlere 1 saatlik muamelesi sonucunda, test edilen tüm konsantrasyonlarda comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini istatistiki olarak önemli düzeyde artırmadığı belirlenmiştir (*şekil 2 ve şekil 3*). Bu veriler işığında, laktitolün test edilen konsantrasyonlar için önemli ölçüde DNA hasarına neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Resim 1'de, laktitol uygulaması sonucunda gözlenen DNA hasarı örnekleri sunulmuştur.



Şekil 2. İnsan periferik kan lenfositlerinde laktitol'ün comet kuyruk yoğunluğuuna etkileri



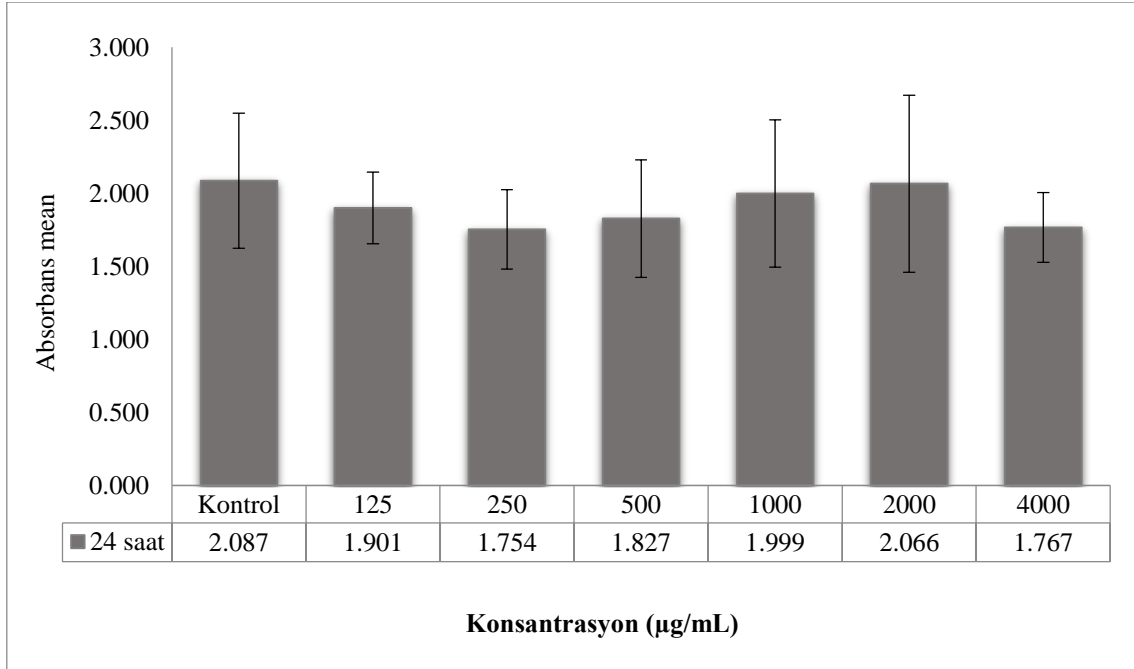
Şekil 3. İnsan periferik kan lenfositlerinde laktitol'ün comet kuyruk momentine etkileri



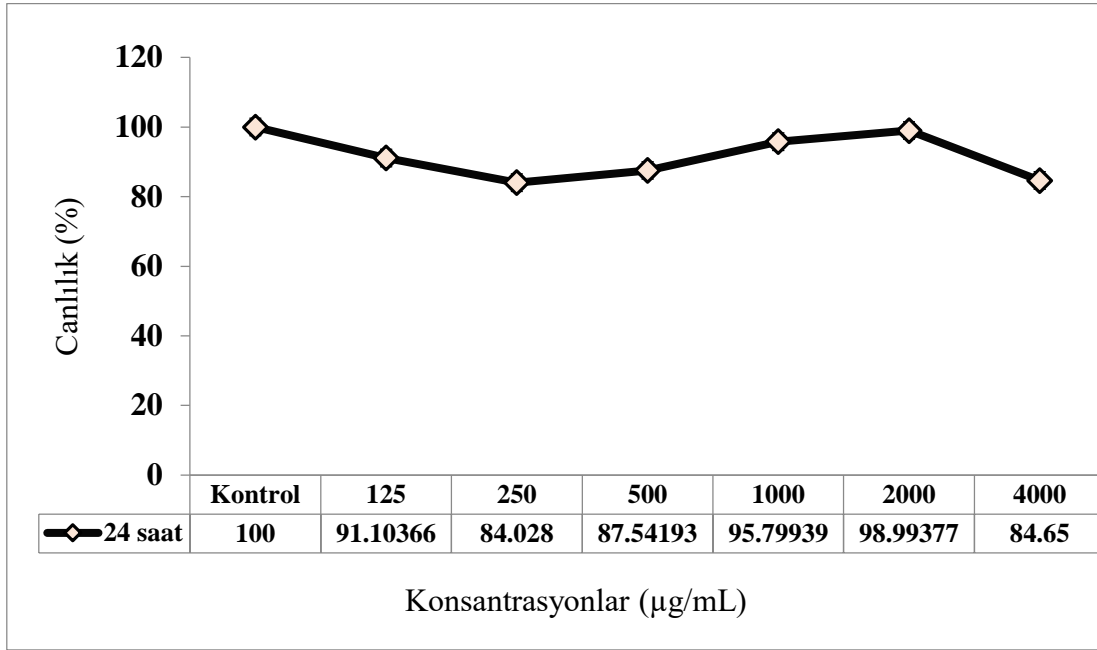
Resim 1. Laktitol muamelesi sonucu insan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) hasarlı DNA

3.2. MTT Testi

Laktitolün çeşitli konsantrasyonlarının BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen MTT analizi sonuçları Şekil 4'te özetlenmiştir. Uygulama sonucunda elde edilen hücre canlılık değerleri Şekil 5'te sunulmuştur. Laktitolün 125, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4). Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde hücre canlılığını hafif düzeyde düşürdüğü, ancak bu düşüşün önemli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5). Sonuç olarak, laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine önemli düzeyde sitotoksik etkiye yol açmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4. Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri üzerine absorbans değerleri



Şekil 5. Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri üzerine hücre canlılık değerleri

4. TARTIŞMA

Sorbitol ve galaktozdan oluşan laktitol, laktozun hidrojenasyonu ile üretilen bir disakkarit polioldür. Laktitol, besleyici bir tatlandırıcı olarak tanımlanır. FAO/WHO Ortak Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi [21] tarafından "ADI belirtilmemiş" sınıfına dâhildir. Bu disakkarit polioldür, sakkarozdan %48-40 daha düşük kalorili, hafif tatlı bir tada sahip olduğundan genellikle düşük kalori değerine sahip bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca laktitol bir prebiyotik olarak minerallerin biyoyararlanımını artırabilmekte ve probiyotiklerin çoğalmalarını teşvik edebilmektedir [9,20]. Bu çalışmada laktitolün oluşturabileceği DNA hasarı insan lenfositlerinde comet testi ile, olası sitotoksik etkisi ise MTT testi ile BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde değerlendirilmiştir. Sonuçta, her iki hücre tipinde de önemli genotoksik ve sitotoksik bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada genotoksitesisi ve sitotoksitesisi incelenen laktitolün insan lenfositlerinde daha önce yapılmış bir çalışmasına rastlanmamıştır. 1983 yılında JECFA laktitolün *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında mutajenik olmadığını rapor etmiştir [21]. Bu çalışma dışında laktitolün genotoksik etkilerinin incelendiği başka bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Ancak diğer tatlandırıcıların farklı hücrelerle genotoksitesisinin ve sitotoksitesisinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır.

Bir polioldür olan eritritol, *Salmonella typhimurium* TA98, TA1537, TA100, TA1535 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA suşlarında uygulanan Ames testinde mutajenik etkiye neden olmamıştır. *In vitro* kromozomal anormallik (Çin hamsteri akciğer fibroblast hücrelerinde) ve mikronükleus testi (L5178Y tk+/- hücrelerinde) 1250, 2500 ve 5000 g/mL konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve herhangi bir mutajenite tespit edilmemiştir. Eritritol'ün L5178Y tk+/- hücrelerinde aynı konsantrasyonlarla gerçekleştirilen comet testinde çalışılan en yüksek iki konsantrasyonda DNA hasarında artışa neden olduğu görülmüştür. İlâveten, 1250, 2500 ve 5000 g/mL konsantrasyonlarının oral olarak verildiği erkek ICR farelerinin kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansında bir değişiklik görülmemiştir. Elde edilen çıktılar değerlendirildiğinde eritritolün bakteri hücre sistemlerinde mutajeniteye ve *in vitro* veya *in vivo* memeli hücre sistemlerinde de kromozom hasarına sebep olmadığı belirtilmiştir [22].

Bir diğer tatlandırıcı gıda katkı maddesi olan maltitolün olası genotoksik etkisi insan periferal lenfositlerinde mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve kromozomal anormallik testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada lenfositler maltitolün 1,25; 2,5 ve 5 mg/mL konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kardeş kromatit değişimi ve kromozomal anormallik frekansları uygulanan hiçbir konsantrasyon ve muamele süresinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak etkilenmemiştir. Ancak konsantrasyondan bağımsız olarak tüm muamele sürelerinde mikronükleus sıklığını artırmıştır. Ayrıca hiçbir uygulamada replikasyon indeksi ve mitotik indeks etkilenmemiştir. Sonuçta, maltitolün genotoksik etkisinin zayıf olduğu ve insan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir [23].

Bir tatlandırıcı olan steviol Ames testinde mutajeniteye neden olmamıştır [24-26]. 125, 250, 500 ve 1000 mg/kg steviol verilen MS/Ae farelerinden alınan kemik iliği eritrositlerinde mikronükleus frekansı etkilenmemiştir [24]. En fazla 200 mg/kg dozunda kullanılan steviol fare kemik iliği ve karaciğer hücrelerinde yine mikronükleus artışına neden olmamıştır [27]. Çok benzer şekilde, kemirici (rat, fare ve hamster) kemik iliği eritrositlerinde (4000 ve 8000 mg/kg) mikronükleus testinde genotoksik etki tespit edilmemiştir [28]. Steviolün 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde kromozomal anormallik ve mikronükleus oluşumunu indüklediği belirtilmiştir [29]. Fare karaciğer hücreleri ve kemik iliği eritrositlerine en fazla 250 mg/kg olacak şekilde verilen steviosid, mikronükleus sıklığını değiştirmemiştir [27]. En yüksek doz olarak 2000 mg/kg steviol verilen BDF1 ve ddY farelerinin çeşitli organ ve dokularında gerçekleştirilen comet testinde DNA hasarında artış gözlenmemiştir [30-31]. Yapılan bu gözlemlere karşın steviosidin *S. typhimurium* TA98 suşunda mutajenik etkiye neden olduğu (50 mg/petri) [32], TM677 suşunda ise ileri mutasyon testinde pozitif etkiye neden olduğu görülmüştür [33]. Steviolün CHL (Chinese Hamster Lung) hücre hattında kromozomal aberasyonları artırdığı ve gen mutasyonu testinde mutajenik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir [24]. Wistar ratlar kullanılarak (4 mg/mL oral) steviosidin dalak, karaciğer, beyin ve kan hücrelerinde comet testi ile DNA hasarına sebep olduğu rapor edilmiştir [34].

Rebaudiosid A, tatlandırıcılardan olup genotoksisitesi metabolik aktivasyon bulunan ve bulunmayan şartlarda *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Çin Hamster V79 hücrelerinde kromozomal aberasyon (en fazla 5000 µg/mL'lik konsantrasyon), *S. typhimurium* ve *E. coli* ile Ames ve L5178Y+/- hücreleri ile fare lenfoma testleri uygulanmış ve hiçbirinde mutajeniteye neden olmadığı görülmüştür. Farklı bir çalışmada farelere en yüksek doz olarak 750 mg/kg verilen rebaudiosid A, hayvanların kemik iliğinde mikronükleus oluşumunu artırmamış ve en yüksek doz olarak 2000 mg/kg verilen ratlarda da programlanmamış DNA sentezi testinde yine genotoksisiteye neden olmamıştır. Sonuçta rebaudiosid A'nın uygulanan konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği ve kullanıma uygun olabilecek bir tatlandırıcı olduğu belirtilmiştir [35]. Başka bir çalışmada Rebaudiosid A'nın etkisi insan kolon kanser HT-29 ve T84 hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda (%0, %0.001, %0.05, %0.1, %0.3, %0.5 ve %1) MTT testi ile değerlendirilmiş ve sonuçta farklı miktarlarda Rebaudiosid A eklendiğinde (%1 hariç) hücresel canlılık ve proliferasyonda belirgin bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir [36].

Yapay bir tatlandırıcı olan aspartamın (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, ve 100 mg/L) primer insan kan hücrelerinde sitotoksik etkisi MTT testi ile, genotoksik etkisi ise kromozomal anormallik testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta hücre canlılığında konsantrasyona bağlı önemli düşüşe yol açan aspartamın kromozomal anormallik frekansında ise artışa neden olduğu görülmüştür [37].

Van Eyk (2015), Asesülfam-K'nın Caco-2, HT-29 (kolon) ve HEK-293 (böbrek) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 1, 4, 10, 20 ve 50 mM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinde MTT testi ile değerlendirmiştir. Hücre canlılığının, kullanılan tüm hücre hatlarında konsantrasyona ve muamele süresine bağlı olarak 10 mM'dan büyük konsantrasyonlarda azaldığı tespit edilmiştir. Asesülfam K'nın yüksek konsantrasyonlardaki sitotoksik etkisinden dolayı dikkatle kullanılması gerektiği vurgulanmıştır [38]. Asesülfam K'nın insan karaciğer karsinoma HepG₂ hücrelerinde MTT analizi sonucunda 48 saatlik uygulamada 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığını önemli düzeyde düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca bu tatlandırıcının hem 24 hem de 48 saatlik muamele süresinde mitotik indeksi 60, 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde düşürdüğü gözlenmiştir [39]. Sonuç olarak, genellikle çalışma çıktılarımızın literatür örnekleri ile uyumlu olduğu gözlenmektedir. Ancak farklı fonksiyonel gruplara ait tatlandırıcılarla yapılan genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında pozitif sonuçların rapor edildiği de göz ardı edilmemelidir.

Günümüze kadar tatlandırıcıların sağlık açısından yapılan değerlendirmelerine bakıldığında, bu maddelerin ADI (kabul edilebilir günlük alım miktarı) değeri altında kalan tüketimi açısından risk değerlendirmesinde yeterli kanıt olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, çelişkili sonuçlara sahip son epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, bu katkı maddelerinin güvenliği konusundaki tartışmayı yeniden canlandırmıştır [40-43]. Bu bağlamda, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) dâhil olmak üzere birçok sağlık otoritesi tatlandırıcıları yeniden değerlendirmektedir. Kansere ilgili olarak yapılan tüm değerlendirmeler, özellikle insanlarda ek çalışmalara ihtiyaç olduğu konusunda hemfikirdir [44]. Yine de tatlandırıcıların sayısı ve kullanımı artmış ve sıklıkla tartışılmalarına rağmen üretimleri sürekli çoğalmıştır. Günümüzde birçok tatlandırıcı, şeker yerine kullanılmaya başlamıştır. Gündelik kullanıma bakıldığında tatlandırıcıların kullanıldığı ürünler yalnızca diyabet hastaları ya da metabolik bozuklukları bulunanlar için değil, vücut ağırlığını dengede tutmak ve kalori kontrollü bir beslenme biçimi isteyen tüketicilere de hitap etmektedir. Kısacası tatlandırıcı bulunduran gıdaları diyetine dâhil eden kişi sayısı oldukça fazladır. Bu nedenle bu kimyasallar, doz-cevap ilişkisi ve vücutta birikim gibi olası tehlikeler de göz önünde bulundurulmak suretiyle kullanılmalıdır. Çalışmamızdan çıkan sonuç, laktitolün uygulanan konsantrasyonlar ve sürelerde *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik ve BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde sitotoksik hasar oluşturmadığını göstermektedir. Ancak bu sonuçlar farklı test sistemlerinde ve hücre gruplarında ileri analizler ile desteklenmelidir.

TEŞEKKÜR

BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinin temini için Dr. Şükran Yılmaz'a teşekkürlerimizi sunuyoruz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Ishidate Jr, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., and Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22(8), 623-636.
- [2] Linke, B. G., Casagrande, T. A. and Cardoso, L. I. A. (2018). Food additives and their health effects: a review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 306-310.
- [3] Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., and Liu, G. (2021). Food additives: from functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-21.
- [4] Naik, A. Q., Zafar, T., and Shrivastava, V. K. (2021). Environmental impact of the presence, distribution, and use of artificial sweeteners as emerging sources of pollution. *Journal of Environmental and Public Health*, 6624569.
- [5] Kokotou, M. G., Asimakopoulos, A. G. and Thomaidis, N. S. (2012). Sweeteners. *Food Analysis by HPLC*. CRC Press, 22-44.

- [6] Altuğ, T., ve Elmacı, Y. (2009). Tatlandırıcılar. *Gıda Katkı Maddeleri*. Kan Yılmaz Matbaacılık. 201-223.
- [7] Scettri, A., and Schievano, E. (2022). Quantification of polyols in sugar-free foodstuffs by qNMR. *Food Chemistry*, 390, 133125.
- [8] Ünal, D. (2011). Farklı oranlarda laktitol ve sakkaroz ilavesiyle hazırlanan tekirdağ peynir helvalarının bazı özelliklerinin belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tekirdağ.
- [9] Li, H., Song, W., Liu, T., Xu, S., Zhang, S., Zhang, Y., Liu, D., Li, H., and Yu, J. (2022). Developing novel synbiotic yoghurt with *Lactocaseibacillus paracasei* and laktitol: investigation of the microbiology, textural and rheological properties. *International Dairy Journal*, 135, 105475.
- [10] Siivola, K. K., Burgum, M. J., Suárez-Merino, B., Clift, M. J., Doak, S. H., and Catalán, J. (2022). A systematic quality evaluation and review of nanomaterial genotoxicity studies: a regulatory perspective. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 1-24.
- [11] Akagi, J. I., Yokoi, M., Cho, Y. M., Toyoda, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., and Ogawa, K. (2018). Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61, 76-85.
- [12] Cordelli, E., Bignami, M., and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68-78.
- [13] Ünal, F., Saygılı, Y., ve Dimici, E. (2022). Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. *Genetik Toksikoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık. 313-340.
- [14] 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.
- [15] Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in vitro Hepatocyte Research*, 333-348.
- [16] Mamur, S. Sitotoksiste Testleri. *Genetik Toksikoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık, 31-40.
- [17] İnternet: Sigma-Aldirich URL: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/13520> Son Erişim tarihi: 07.10.2022
- [18] 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.
- [19] Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., Özçelik, A. B., Ersan, S., and Ünal, F. (2017). Evaluation of genotoxic effects of 3-methyl-5-(4-carboxycyclohexylmethyl)-tetrahydro-2H-1, 3, 5-thiadiazine-2-thione on human peripheral lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1228-1233.
- [20] Mossman, T. (1983). Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [21] JECFA. (1983). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. JECFA Evaluations.
- [22] Chung, Y. S., and Lee, M. (2013). Genotoxicity assessment of erythritol by using short-term assay. *Toxicological Research*, 29(4), 249.
- [23] Canımoğlu, S., and Rencüzoğulları, E. (2006). The cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(3), 269-278.
- [24] Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M. Jr., and Sofuni, T. (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, 11(6), 573-579.
- [25] Pezzuto, J.M., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Nanayakkara, N.P.D. and Kinghorn, A.D. (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, 82, 2478-2482.
- [26] Pezzuto, J.M., Nanayakkara, N.P.D., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D., Guenther, T.M., Sparnins, V.L., and Lam, L.K.T. (1986). Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione s-transferase in mice. *Mutation Research*, 169, 93-103.
- [27] Oh, H. Y., Han, E. S., Choi, D. W., Kim, J. W., Eom, M. O., Kang, I. H., Kang, H. J., and Ha, K. W. (1999). In vitro and in vivo evaluation of genotoxicity of stevioside and steviol, natural sweetner. *Journal Pharmaceutical Society of Korea*, 43, 614-622.
- [28] Temcharoen, P., Suwannatrai, M., Klongpanichpak, S., Apibal, S., Glinsukon, T., and Toskulkao, C. (2000). Evaluation of the effect of steviol on chromosomal damage using micronucleus test in three laboratory animal species. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet Thangphaet*, 83, 101-108.
- [29] Uçar, A., Yılmaz, S., Yılmaz, Ş., and Kılıç, M. S. (2018). A research on the genotoxicity of stevia in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41 (2), 221-224.
- [30] Sekihashi, K., Saitoh, H., and Sasaki, Y. (2002). Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27, 1-8.

- [31] Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., and Tsuda, S., (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519, 103–119.
- [32] Suttajit, M., Vinitketkaumnuen, U., Meevatee, U., and Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from stevia rebaudiana bertonii. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 53-56.
- [33] Terai, T., Ren, H., Mori, G., Yamaguchi, Y., and Hayashi, T. (2002). Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* Tm677. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1007–1010.
- [34] Nunes, A. P. M., Ferreira-Machado, S. C., Nunes, R. M., Dantas, F. J. S., De Mattos, J. C. P., and Caldeira-de-Araujo, A. (2007). Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 45(4), 662-666.
- [35] Williams, L. D., and Burdock, G. A. (2009). Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1831-1836.
- [36] Wu, X., Wang, B., Chen, T., Gan, M., Chen, X., Chen, F., Wei, H., and Xu, F. (2014). The non-cytotoxicity characterization of rebaudioside A as a food additive. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 334-340.
- [37] Çadırcı, 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.
- [38] 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.
- [39] Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Bülbül, S.N., ve Ünal, F. (2022). Investigation of cyto-genotoxic effects of a food sweetener Acesulfame potassium. *Food Health*, 8(4), 273-283.
- [40] Toews I, Lohner S, de Gaudry DK, Sommer H, and Meerpohl J. J. (2019). Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *British Medical Journal*, 364, 4718.
- [41] Laviada-Molina, H., Molina-Segui, F., Pérez-Gaxiola, G., Cuello-García, C., Arjona-Villicaña, R., Espinosa-Marrón, A., and Martínez-Portilla, R. J. (2020). Effects of nonnutritive sweeteners on body weight and BMI in diverse clinical contexts: Systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 21(7), e13020.
- [42] Pang, M. D., Goossens, G. H., and Blaak, E. E. (2021). The impact of artificial sweeteners on body weight control and glucose homeostasis. *Frontiers in Nutrition*, 7, 598340.
- [43] Azad, M. B., Abou-Setta, A. M., Chauhan, B. F., Rabhani, R., Lys, J., Copstein, L., Mann, A., Jeyaraman, M. M., Reid A. Y., Fiander, M., MacKay, D. S., McGavock, J., Wicklow, B., and Zarychanski, R. (2017). Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Canadian Medical Association Journal*, 189(28), 929-939.
- [44] Debras, C., Chazelas, E., Srour, B., Druetne-Pecollo, N., Esseddik, Y., de Edelenyi, F. S., Agae'sse, C., e De Sa, A., Lutchia, R., Gigandet, S., Huybrechts, I., Julia, C., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Andreeva, V. A., Galan, P., Hercberg, S., Deschasaux-Tanguy, M., and Touvier, M. (2022). Artificial sweeteners and cancer risk: results from the nutriNet-santé population-based cohort study. *PLoS Medicine*, 19(3), e1003950.