



Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbatın Fibroblast ve Osteoblast Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Cytotoxic Effects of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate on Fibroblast and Osteoblast Cells

Simge KARA ERTEKİN

SKE: 0000-0002-7976-7057

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Günümüzde hazır ve paketlenmiş gıdaların yaygınlaşmasıyla birlikte gıda katkı maddelerinin kullanımı da hızla artmıştır. Tatlandırıcılar, renklendiriciler, koruyucular ve kıvam artırıcılar gibi birçok katkı maddesi, bireylerin günlük yaşamında kaçınılmaz hale gelmiştir. Sodyum benzoat ve potasyum sorbat ise özellikle gıda ve ilaç sanayisinde yaygın olarak kullanılan güçlü antimikrobiyal maddelerdir. Ancak, bu maddelerin bu kadar geniş çapta kullanımının insan sağlığı üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır. Bu belirsizlikler, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın potansiyel zararlarını daha derinlemesine araştırma gereksinimini doğurmuştur. Bu çalışmanın amacı, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın L929 fare fibroblast ve HOB insan osteoblast hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkilerinin gösterilmesini amaçlamaktadır.

Yöntem: Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbat'ın sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için HOB ve L929 hücre soylarına 24 saat süre 10 farklı konsantrasyonun (0,5mM- 100mM) maruziyeti yapılmış ve MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

Bulgular: MTT testi sonuçlarına göre; Sodyum Benzoat'ın ve Potasyum Sorbat'ın her iki hücre soyu için 20 mM üzerinde konsantrasyona göre anlamlı derece artan sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Sodyum Benzoat'ın L929 ve HOB hücrelerinde 24 saat için IC50 değerleri sırasıyla; 240,7 ve 99,78 mM; Potasyum Sorbat'ın L929 ve HOB hücrelerinde IC50 değerleri sırasıyla; 404,9 ve 122,1mM olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Gıda takviyelerinde ve endüstride en sık kullanılan katkı maddelerinden olan Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbat'ın iki farklı sağlıklı hücre hattında artan konsantrasyonlarla gösterdiği sitotoksik etkiler, bu maddelere maruz kalmanın daha kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, bu konsantrasyonlardaki etkileri daha iyi anlamak için daha ayrıntılı moleküler çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Sodyum benzoat, Potasyum Sorbat, Gıda Katkı Maddesi, E202, E212

Abstract

Aim: The rapid increase in the use of food additives has paralleled the widespread consumption of ready-made and packaged foods. Additives such as sweeteners, colorants, preservatives, and thickeners have become unavoidable in daily life. In particular, sodium benzoate and potassium sorbate are widely used as powerful antimicrobial agents in the food and pharmaceutical industries. However, there needs to be more scientific data regarding the effects of their extensive use on human health. These uncertainties have highlighted the need for further investigation into the potentially harmful effects of sodium benzoate and potassium sorbate. This study aims to assess the cytotoxic effects of sodium benzoate and potassium sorbate on L929 mouse fibroblast and HOB human osteoblast cells based on their concentrations.

Methods: To assess the cytotoxic effects of sodium benzoate and potassium sorbate, HOB and L929 cell lines were exposed to 10 different concentrations (ranging from 0.5 mM to 100 mM) for 24 hours. Cell viability was then determined using the MTT assay.

Results: The MTT test results indicated that sodium benzoate and potassium sorbate significantly increased cytotoxic effects on both cell lines at concentrations above 20 mM. The IC50 values of Sodium Benzoate in L929 and HOB cells for 24 hours were calculated as 240.7 and 99.78 mM, respectively; the IC50 values of Potassium Sorbate in L929 and HOB cells were calculated as 404.9 and 122.1 mM, respectively.

Conclusion: The cytotoxic effects of sodium benzoate and potassium sorbate, among the most used additives in food supplements and industry, observed at increasing concentrations in two different healthy cell lines indicate that exposure to these substances should be more carefully controlled. Moreover, more detailed molecular studies are needed to understand these concentrations' effects better.

Keywords: Sodium benzoate, potassium sorbate, food additive, E202, E212



1. Giriş / Introduction

Gıda katkı maddeleri, genellikle bozulmayı önlemek, küf oluşumunu engellemek ve tazeliği korumak amacıyla meyve suyu, gazoz, soya sosu ve krem peynir gibi işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Sodyum benzoat (E212) ve potasyum sorbat (E202), küf büyümesini inhibe edici, bozulmayı önleyici ve ürünlerin tazeliğini koruyucu etkileriyle antibakteriyel ve antifungal ajanlar olarak gıda katkı maddeleri arasında yaygın şekilde kullanılmaktadır (2, 3). AO-WHO Ortak Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi Raporu (JECFA), bu bileşiklerin güvenliğini incelemiş ve benzoik asit ve benzoat tuzları için kabul edilebilir günlük alım miktarını (ADI) vücut ağırlığı başına 0-5 mg/kg, sorbik asit ve sorbat tuzları için ise vücut ağırlığı başına 0-25 mg/kg olarak rapor etmiştir (2). Bu koruyucular, yasal olarak gıdalarda kullanılmakta olup, vücut tarafından izin verilen sınırların üzerinde alındığında zararlı etkileri olabilir ve alerjik reaksiyonlara yol açarak ürtiker, non-immünolojik temas ürtikeri, astım gibi reaksiyonlar veya hücrel toksik etkiler oluşturabilir. Bu nedenle, bu koruyucuların kullanımını sınırlayan çeşitli düzenlemeler yürürlüğe konulmuştur. İşlenmiş gıdalarda benzoat ve sorbat kullanımına ilişkin olarak, FDA, bu maddelerin maksimum sınırlarını sırasıyla %0,1 ve %0,1-0,2 olarak belirlemiştir. Ayrıca, AB Yönetmeliği 92/2/EC'ye göre farklı işlenmiş gıdalar için benzoat ve sorbatın maksimum seviyeleri 200 mg/L ile 2000 mg/L arasında belirlenmiştir (3, 4).

Sodyum benzoat (SB), benzoik asidin sodyum tuzudur ve bakteriyel ve fungal büyümeyi asidik ortamlarda inhibe eder. Benzoat yapısının yüksüz olması, hücre membranlarından hızla difüze olmasına olanak tanır. Düşük organik asitli gıda koruyucularının mayaların mitokondriyal DNA'sında mutajen ve prooksidan etkiler yarattığı belirlenmiştir. Bu nedenle mayalara karşı da koruyucu etkisi bulunmaktadır. Oral yolla alınan sodyum benzoat, sindirim sisteminde hızla absorbe edilmekte ve yaklaşık 1-2 saat sonra plazma konsantrasyonunda en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Dermal ya da oral yolla alındıktan sonra karaciğerde metabolize edilerek glisin ile hippürik asit yapısını oluşturur ve hızlı bir şekilde idrar yoluyla atılmaktadır (5). Ancak birçok çalışma, toksisitesi nedeniyle SB'nin gıda koruyucusu olarak yaygın kullanımının kısıtlanması gerektiğini göstermiştir (6, 7). Kronik maruziyetin ürtiker,

anjyioödem, astım ve çocukluk çağı hiperaktivitesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Hücrel toksik etkileri, Vicia faba, Allium cepa, çin hamsteri ovariumu, fibroblast ve insan lenfosit hücrelerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda ortaya konmuştur. Kolorektal kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116) SB'nin hücre canlılığını azalttığı ve apoptoza neden olduğu, ayrıca memeli hücrelerinde mitokondriyal DNA hasarı yarattığı belirlenmiştir (6, 8, 9).

Potasyum sorbat (PS), sorbik asidin potasyum tuzudur ve küf oluşumunu önleyici antimikrobiyal özelliklere sahiptir. PS, meyve suyu, soda, soya sosu, keçap gibi işlenmiş gıdalarda yaygın olarak koruyucu olarak kullanılmaktadır (1, 10). Farmakokinetik açıdan, PS'nin oral uygulamadan sonra tamamen absorbe edildiği ve vücutta dağılım gösterdiği belirtilmiştir. PS, heksanoik aside metabolize edilebileceği gibi karbondioksit (CO_2) ve suya (H_2O) oksitlenebilir. %80-86'sı akciğerler yoluyla CO_2 olarak atılırken, %2-10'u idrar yoluyla üre olarak ve daha düşük konsantrasyonlarda mukonik ve sorbik asit olarak atılmaktadır. Birçok çalışma, PS'nin çeşitli hayvan modellerinde toksisitesini göstermiş olsa da, PS'nin çeşitli hücreler ve hayvanlar üzerindeki toksisite mekanizması ile ilgili çelişkili veriler bulunmaktadır (10).

Bu çalışmada sodyum benzoat ve potasyum sorbatın L929 (fare fibroblast) ve HOB (insan osteoblast) hücre soylarında sitotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

2. Yöntem / Method

2.1. Sitotoksitenin belirlenmesi

Sodyum benzoat (Tekkim, TK.201030.01002, Türkiye), Potasyum sorbat (Tekkim, TK.200970.01002, Türkiye), Tekkim kimyadan, hücre kültürü medyum ve diğer solüsyonlar Multicell'den (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Kanada) satın alındı. Sodyum Benzoat (SB) ve Potasyum Sorbat (PS)'in sitotoksik etkisini belirlemek için L929 (fare fibroblast) ve HOB (insan osteoblast) hücre soyları kullanılmıştır ve hücreler ATCC'den temin edilmiştir. Hücreler %10 fetal siğir serumu ve %1 penisilin-streptomisin bulunan DMEM içerisinde ve %5 CO_2 ile 37°C 'de inkübe edilmiştir. Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbat'ın 500 mM olacak şekilde PBS (Fosfat tuzu tamponu) içerisinde stok solüsyonları hazırlanmış ve hücrelere

0,5, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 70 ve 100 mM olarak hazırlanmış konsantrasyonlar 24 saat uygulanmıştır. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi, Mossmann (1983)'e göre yapılmıştır (11). MTT testi için hücreler, kuyu başına 5×10^4 hücre yoğunluğunda 96 kuyulu plakalara ekilmiş bir gece boyunca tutunmaları sağlanan hücreler SB ve PS'in farklı 10 konsantrasyonuna (0,5-100 mM) maruz bırakılmıştır. Maruz kalma süresinin sonunda, her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu (PBS'de 5 mg/ml) eklenmiş ve karanlıkta 4 saat inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristalleri DMSO ile çözüldükten sonra, mikropılaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılarak 570 nm'de absorbansları ölçülmüş ve kontrole göre hücre canlılığı hesaplanmıştır.

2.2. İstatistiksel analiz

Deney gruplarına ait ortalama veriler ve $\pm$ ortalama-ların standart hataların (SEM) değerlendirilmesinde GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve ardından Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

3. Bulgular/Results

Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbatın fare fibroblast ve insan osteoblast hücrelerinde hücre canlılığına olan etkisi şekil 1'de gösterilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri sonrasında 10 mM üzerinde konsantrasyonlarda hücre canlılığında konsantrasyona bağlı olarak artan seviyeden anlamlı bir azalma bulun-

muştur. Sodyum benzoat ve Potasyum sorbat'ın 24 saat maruziyeti sonrasında elde edilen IC50 değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

SB = Sodyum Benzoat, PS= Potasyum Sorbat, L929= fare fibroblast hücre soyu; HOB= insan osteoblast hücre soyu.

4. Tartışma/Discussion

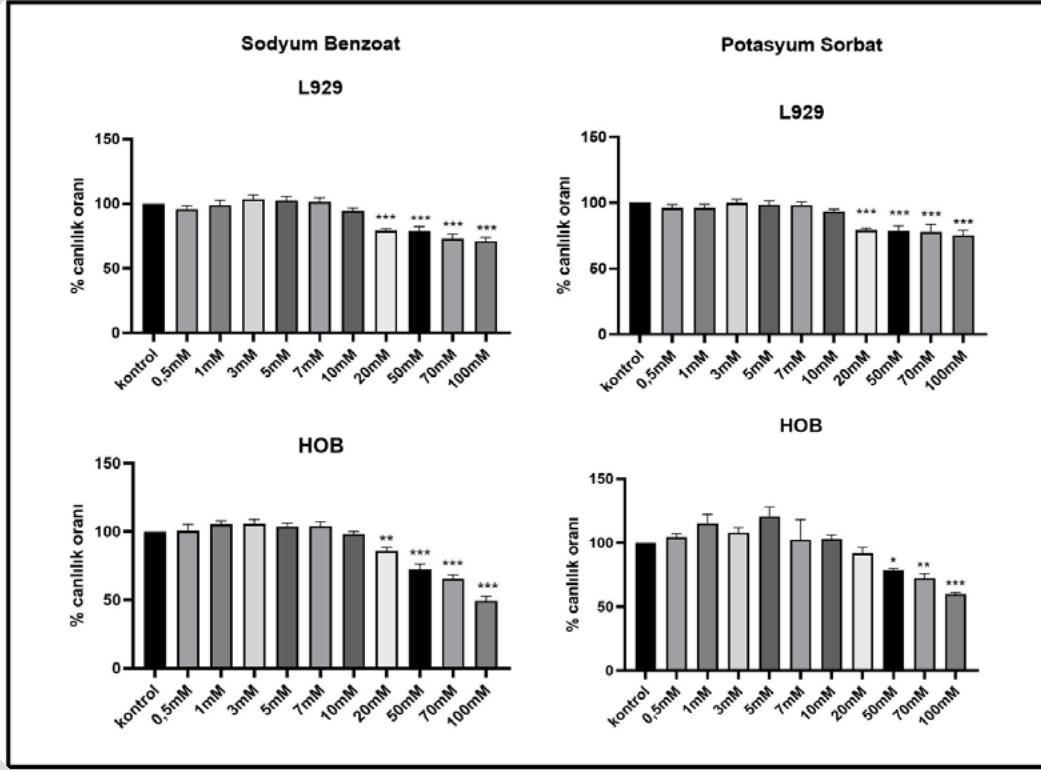
Sodyum benzoat ve potasyum sorbat, düşük konsantrasyonlarda yaygın olarak kullanılan gıda koruyucularıdır ve Avrupa Ekonomi Topluluğu ülkelerinde 1964'ten bu yana kullanımına izin verilmektedir. Bu katkı maddeleri, genellikle ABD'de güvenli olarak kabul edilen (GRAS) doğrudan gıda katkı maddeleri arasında yer alır. Ancak, kullanıldıkları gıda ürünleri ve ilaçlar yoluyla biyolojik süreçlere dahil olarak beslenme yetersizliğine ve çeşitli hastalıklara yol açabildikleri, yüksek dozlarda ise insan sağlığına olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10, 12).

Chaleshtori ve ark. (2018) İran'da yaptıkları çalışmada, birçok paketli gıdada bulunan SB ve PS miktarları incelemiş ve kronik maruziyetleri hesaplamıştır. Her ne kadar gıdalardaki bu katkı maddelerinin tek başına yasal sınırlar içinde olduğu bulunsada, kronik maruziyet hesaplamaları sonucunda önerilen günlük alım dozlarının üzerinde bir tüketim olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, ortalama kronik maruziyet değerleri SB için 81 mg/kg, PS için ise 76 mg/kg olarak belirlenmiş ve bu sonuçlar yaklaşık 1 mM seviyesinde kronik maruziyete işaret etmiştir (2). Ulca ve ark. (2013) tarafından Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada ise,

Tablo 1 Sodyum benzoat ve Potasyum sorbat'ın 24 saat maruziyeti sonrasında elde edilen IC50 (mM) değerleri

	SB	PS
L929	234,1	404,9
HOB	99,78	122,1

SB = Sodyum Benzoat, PS= Potasyum Sorbat, L929= fare fibroblast hücre soyu; HOB= insan osteoblast hücre soyu.



Şekil 1 Sodyum Benzoat ve Potasyum Sorbat'ın hücre canlılığı üzerine etkileri

(*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001). L929: Fare fibroblast hücreleri, HOB: insan osteoblast hücreleri.

983 perakende gıda örneği incelenmiş ve örneklerin %2,3'ünde sorbik asit ve benzoik asit oranlarının izin verilen limitlerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (13).

Yapılan çalışmalarda, SB'nin ve PS'nin sitotoksik etkileri farklı *in vitro* ve *in vivo* modellerde araştırılmıştır (14, 15). Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın 4 ve 8 mM konsantrasyonlarında insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etkiler gözlenmiş, ancak bu konsantrasyonlarda sitotoksik etki görülmediği rapor edilmiştir (16). Jurkat hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, SB'nin 0,125 mM ile 1 mM konsantrasyonları arasında, PS'nin ise 5 mM ile 10 mM arasında doza bağlı olarak sitotoksitesinin arttığı gösterilmiştir (17). HCT116 kolon kanseri hücreleri üzerinde SB'nin etkileri incelendiğinde, 6,25 mM'dan itibaren 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarında apoptoza bağlı hücre canlılığının azaldığı

belirlenmiştir (8). Pongsavee ve Mishra (2021) potasyum sorbatın 0,5-2 mg/ml konsantrasyonlarında insan lenfosit hücrelerinde sitotoksik etkilerinin yanı sıra oksidatif stresi artırdığını ve kromozom hasarına yol açtığını göstermiştir (18). Benzer şekilde, PS'nin 125-1000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda genotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (19).

Bu çalışmada, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın, sağlıklı hücre soyları olan L929 ve HOB hücrelerinde 10 mM üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, SB ve PS'nin sitotoksitesinin değerlendirildiği diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur

5. Sonuç/Conclusion

Sodyum benzoat ve potasyum sorbat için sırasıyla önerilen günlük alım miktarları olan 5 mg/kg ve 25

mg/kg dozlarının molaritesi hesaplandığında (35 μ M ve 167 μ M), bu değerlerin L929 ve HOB hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı konsantrasyonlardan oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ancak, bu katkı maddelerinin gıda, endüstri ve kozmetik gibi birçok üründe yaygın kullanılması ve yapılan analizlerin de gösterdiği üzere, ortalama kronik alım miktarının önerilen dozların çok üzerinde olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle, bu maddelere ilişkin daha detaylı moleküler çalışmalara ve ürünlerdeki miktarların analizine yönelik daha fazla veri sunulmasına ihtiyaç vardır.

Received/Geliş Tarihi: 09.09.2024

Accepted/Kabul Tarihi: 07.10.2024

Kaynaklar / References

1. Pylypiw Jr HM, Grether MT. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of chromatography A*. 2000;883(1-2):299-304.
2. Chaleshtori FS, Arian A, Chaleshtori RS. Assessment of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in some products in Kashan, Iran with estimation of human health risk. *Food and chemical toxicology*. 2018;120:634-8.
3. Gören AC, Bilsel G, Şimşek A, Bilsel M, Akçadağ F, Topal K, et al. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food chemistry*. 2015;175:273-9.
4. Yu J, Liu J-Y, Xiong W-M, Zhang X-Y, Zheng Y. Binding interaction of sodium benzoate food additive with bovine serum albumin: multi-spectroscopy and molecular docking studies. *Bmc Chemistry*. 2019;13:1-8.
5. İlhan İ. Prepubertal dönem süresince yavru sıçanlarda sodyum benzoata maruziyetin öğrenme ve nörodavranış üzerine etkileri.
6. Park HyeWon PH, Park E, Yun HyungMun YH, Rhim HyeWhon RH. Sodium benzoate-mediated cytotoxicity in mammalian cells. 2011.
7. Dinç E. Sodyum benzoat'ın koryoallantoik membran (CAM) modelinde anjiyogenez ve oksidatif stres üzerine etkileri: Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü; 2022.
8. Yılmaz B, Karabay AZ. Food additive sodium benzoate (NaB) activates NF κ B and induces apoptosis in HCT116 cells. *Molecules*. 2018;23(4):723.
9. 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.
10. Dehghan P, Mohammadi A, Mohammadzadeh-Aghdash H, Dolatabadi JEN. Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;80:123-30.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
12. Münzner R, Guigas C, Renner H. Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential. *Food and Chemical Toxicology*. 1990;28(6):397-401.
13. Ulca P, Atamer B, Keskin M, Senyuva HZ. Sorbate and benzoate in Turkish retail foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 2013;6(3):209-13.
14. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002;519(1-2):103-19.
15. Nair B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *International journal of toxicology*. 2001;20:23-50.
16. 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.
17. Halilčević D, Dautović E, Lelić M, Husejnović MŠ, Smajlović A, Srbović N, et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Sunset Yellow and Potassium Sorbate in Jurkat Cell Line. *IJB-cRR*. 2022:1-9.
18. Pongsavee M, Mishra R. Potassium Sorbate Induces Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Lymphocytes. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. 2021;15(2).
19. Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in vitro*. 2010;24(3):790-4.