

**T. C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**GIDA KATKI MADDESİ SODYUM BENZOAT' IN
İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN VITRO*
TOKSİK ETKİSİ VE KATEŞİN VE KUERSETİNİN
KORUYUCU ROLÜ**

Gamze YETÜK

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dilek PANDIR**

Yozgat 2013

**T.C
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**GIDA KATKI MADDESİ SODYUM BENZOAT' IN
İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN VITRO*
TOKSİK ETKİSİ VE KATEŞİN VE KUERSETİNİN
KORUYUCU ROLÜ**

Gamze YETÜK

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dilek PANDIR**

**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2012FBE/07 kodu ile desteklenmiştir.**

Yozgat 2013

T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 70110310005 numaralı öğrencisi Gamze YETÜK'ün hazırladığı “**Gıda Katkı Maddesi Sodyum Benzoat’ın İnsan Eritrositleri Üzerine *In Vitro* Toksik Etkisi ve Katesin ve Kuersetin’in Koruyucu Rolü**” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca Salı günü saat 11:00’de yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU

Üye : Doç. Dr. Dilek PANDIR (Danışman)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sedat PER

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu’nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../..... /20....

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı.....	1
1.2. Tezin Konusu ve Önemi	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanım Alanları.....	2
2.2. Sodyum Benzoat.....	5
2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi.....	7
2.4. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri	9
2.4.1. Kuersetin.....	10
2.4.2. Kateşin.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Kimyasallar	13
3.2. Eritrositlerin hazırlanması.....	13
3.3. Eritrositlere uygulama	13
3.4. Parametrelerin Değerlendirilmesi ve Ölçüm Metodları	14
3.4.1. Malondialdehit (MDA) Miktarının Tayini	14
3.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi.....	14
3.4.3. Katalaz (CAT) enzimi	15
3.4.4. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi.....	15

3.4.5. Glutasyon-S-Transferaz(GST) enzimi.....	16
3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu ile Hemoglobin Tayini.....	16
3.6. İstatistiki Analizler	17
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR.....	18
4.1. Sodyum Benzoat'ın Malondialdehit (MDA) Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	18
4.1.1. Sodyum Benzoat'ın Malondialdehit (MDA) Miktarına Etkisi.....	18
4.1.2. Sodyum Benzoat'ın Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkisi.....	19
4.1.3. Sodyum Benzoat'ın Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine Etkisi	19
4.1.4. Sodyum Benzoat'ın Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkisi.....	20
4.1.5. Sodyum Benzoat'ın Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesine Etkisi.....	21
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	23
KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ	37

GIDA KATKI MADDESİ SODYUM BENZOAT' IN İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN VITRO* TOKSİK ETKİSİ VE KATEŞİN VE KUERSETİNİN KORUYUCU ROLÜ

Gamze YETÜK

Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

2013; Sayfa: 37

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek PANDIR

ÖZET

Gıda katkı maddeleri birçok besinde antimikrobiyal ajan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Sodyum Benzoat (SB)'in insan ve birçok hayvanda toksik olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmanın amacı kateşin ve kuersetinin insan eritrositlerinde SB'in oluşturduğu oksidatif strese karşı *in vitro* olarak koruyucu etkisini araştırmaktır. Bu amaçla SB'nin farklı dozları (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) ile kateşin (10 µM) ve kuersetin (10 µM)'nin malondialdehit (MDA) seviyesi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri eritrositlerde çalışılmıştır. Kontrol grubuna hiçbir kimyasal verilmemiştir. Deney grubu ise beş gruba ayrılmıştır: kateşin, kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin. SB'nin her bir dozu hazırlanan eritrositlerle 37 °C'de 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA seviyesi belirlenmiştir. SB'nin artan dozlarında MDA seviyesinin arttığı SOD, CAT, GPx ve GST aktivitelerinde ise istatistiksel olarak bir azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir (p<0.05). Kateşin ve kuersetin ile muamele edilen gruplarda bu iki maddenin SB'in düşük konsantrasyonlarının meydana getirdiği oksidatif strese karşı eritrositlerde koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu yararlı etki sadece SB'in düşük uygulama dozlarında (12.5 ve 25 µg/ml) görülmüştür. Eklenen kateşin ve kuersetinin (10 µM) SB'nin yüksek konsantrasyonlarının toksik etkisini değiştirememiştir.

Anahtar Kelimeler: sodyum benzoat, oksidatif stres, eritrosit, kateşin, kuersetin, *in vitro*

TOXICITY OF FOOD ADDITIVE SODYUM BENZOAT ON HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO* AND PROTECTIVE EFFECT OF CATECHIN AND QUERCETIN

Gamze YETÜK

**Bozok University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2013; Page:37

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dilek PANDIR

ABSTRACT

Food preservatives are commonly used as antimicrobial agents in many kinds of foods. A number of toxicological studies of sodium benzoate (SB) have been reported in humans and various animal species. The purpose of this study was to show the protective effect of catechin and quercetin in adverting SB-induced oxidative stress in human erythrocytes *in vitro*. So, the effects of various doses of SB (6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml), catechin (10 µM) and quercetin (10 µM) on level of malondialdehit (MDA) and the activities of enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) in erythrocytes were studied. No chemicals were administered for control group. The experimental groups were divided into five groups: catechin, quercetin, SB, SB + catechin, SB + quercetin. Each SB dose was incubated with a previously prepared erythrocyte sample at 37 °C for 60 min. After incubation, antioxidant enzymes activities and MDA levels were detected. MDA level increased and activities of SOD, CAT, GPx and GST were significantly observed with the increasing concentrations of SB treatment ($p < 0.05$). Treatment of catechin or quercetin protected the erythrocytes exposed to low concentrations of SB against oxidative stress. But these effects were seen only at extremely low concentrations of SB (12.5 and 25 µg/ml). The supplement of catechin or quercetin (10 µM) have not changed effects of SB-caused toxicity at a high concentrations. **Key words:** sodium benzoate, oxidative stress, erythrocytes, catechin, quercetin, *in vitro*

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın tım aőamalarında büyük ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgilerinden yararlandığım ve çalıőmalarımı yönlendiren danıőmanım Doç. Dr. Dilek PANDIR' a teőekkürü bir borç bilirim.

Çalıőmalarım esnasında her zaman bana yardımcı olan, her konuda fikir veren sevgili hocam Araő. Gör. Hatice BAŐ'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans dönemlerimde bana desteği olan tım biyoloji bölümündeki bütün hocalarıma teşekkür ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Sodyum Benzoat'ın Yapısı ve Moleküler Özelliği.....	6
Şekil 2.2: Benzoat ve Türevlerinin E Numaraları	6
Şekil 4.1: Kontrol ve Deney Gruplarında Eritrosit MDA Düzeyleri	18
Şekil 4.2: Kontrol ve Deney Gruplarında Eritrosit SOD Düzeyleri.....	19
Şekil 4.3: Kontrol ve Deney Gruplarında Eritrosit CAT Düzeyleri.....	20
Şekil 4.4: Kontrol ve Deney Gruplarında Eritrosit GPx Düzeyleri.....	21
Şekil 4.5: Kontrol ve Deney Gruplarında Eritrosit GST Düzeyleri	22

KISALTMALAR LİSTESİ

AChE	: Asetilkolin Esteraz
BPO	: Benzol Peroksit
CAT	: Katalaz
ChE	: Kolin Esteraz
DDVP	: Diklorvos
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferas
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PBS	: Fosfat Tamponu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TCA	: Trikloroasetik Asit

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, gıda katkı maddelerinden birisi olan SB'nin çeşitli dozlarının insan eritrositlerinin antioksidan enzimlerine (SOD, CAT, GPx ve GST), LPO etkisini ve flavonoidlerden kateşin ve kuersetin'in koruyucu rolünü araştırmaktır.

1.2. Tezin Konusu ve Önemi

Modern gıda teknolojisinde işlenmiş gıdaların üretiminin artmasıyla birlikte kimyasal koruyucuların bu alanda kullanımı da hız kazanmıştır. Bu koruyucular, mikrobiyolojik, enzimatik veya kimyasal değişiklikler yüzünden ortaya çıkan besinsel kaybı engellemek veya geciktirmek ve gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla gıdalara ilave edilmektedir [1]. Koruyuculardan sodyum benzoat (SB) benzoik asidin tuzudur, bunlar gıdalarda küf, bazı bakteriler ve mayaların gelişmelerini inhibe ettiklerinden dolayı koruyucu olarak kullanılmaktadırlar. JECFA (Gıda katkı maddeleri eksper komitesi), SB'nin günlük kabul edilebilir alım miktarını (ADI) 0-5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirtmiştir. Bu koruyucu madde pek çok gıda maddesinde antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır [2].

Bu tez çalışmasında eritrositlere uygulanan SB'nin neden olduğu toksik etkiyi azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için kateşin ve kuersetin kullanılmıştır. Kateşin ve kuersetinin aralarında bulunduğu flavonoidler doğada yaygın olarak bulunan polifenoller içinde yer alan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir[3].

Bu çalışma, gıda katkı maddesi SB'nin çeşitli dozlarının uygulanması sonucu insan eritrositlerinde meydana gelen hasarın *in vitro* olarak belirlenmesi, antioksidan enzim sistemlerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi, kateşin ve kuersetin'in koruyuculuğunun ortaya konulması ve bu konuyla ilgili çeşitli çalışmalara katkı sağlaması açısından önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanım Alanları

Günümüzde giderek gereksinimi artan ve bu nedenle de hızla gelişen gıda teknolojisinde kullanılan gıda katkı maddeleri toplumun beslenmesi açısından çok önemlidir. Gıdaların görünüm ve lezzetlerini toplumun arzu ettiği duruma getirmek, bozulmalarını önleyerek daha uzun saklanabilmelerini sağlamak amacı ile gıdalara çeşitli kimyasal bileşikler katılması düşünülmüş ve uygulamaya konulmuştur [4].

Modern gıda teknolojisinde gıda katkı maddeleri giderek daha da önemli hale gelmektedir [1]. Gıda katkı maddeleri ve koruyucu katkı maddeleri modern dünyanın vazgeçilmezleri arasındadır. Bunlar, hazır gıdaları boyama, tatlandırma, besleyici olma veya antimikrobiyal özellik gibi değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Günümüzde 20.000'in üzerinde katkı maddesinin olduğu bilinmektedir ve bu maddelere bağlı allerjik reaksiyonlar azımsanmayacak kadar sıktır [5].

Gıda katkı maddeleri, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde şöyle tanımlanmaktadır. Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddelerdir [6].

Katkı maddeleri çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Eski devirde insanlar gıdalarını tütsüleyerek, sirke ile (asetik asit), yanmış kükürtle, tuzlamak ve salamura yapmak suretiyle korumaya çalışmışlardır. Bu insanlar gıdalarını böcek kabuklarını ezerek elde ettikleri kırmızı boya ve safran gibi doğal boyalarla da renklendirmişlerdir. Ayrıca arap sakızı (gam arabik) ile besinlerinin kıvamlarını arttırmışlardır. Bu maddelerin birçoğu bugün de üç temel fonksiyon için kullanılmaktadırlar: kozmetik, koruyuculuk, işleme [7].

Günümüzde besinlerin üretim ve tüketim ilişkileri, gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımını teknolojik bir zorunluluk olarak ortaya koymaktadır. Endüstrinin gelişmesi ile besin üretiminin ve işlenmesinin artması GKM kullanımını da artırmıştır. Beslenme alışkanlıklarının değişmesi, besin hazırlama için daha az zaman ayrılması gibi nedenler yarı hazır veya ticarî olarak tamamen hazırlanmış olan besin üretimini teşvik etmiş, bu da GKM kullanımını kaçınılmaz kılmıştır [8].

Kullanılabilir gıda katkı maddeleri, bunların belirli dozlarda kullanımlarının uygun olduğuna dair hazırlanan listelerde yer almıyorsa, belirlenen limitlerin üzerinde kullanılıyor ve ADI değeri dikkate alınmıyorsa, katkı maddesi bazı bulaşları içeriyorsa, eğitimsiz kişilerce teknolojisine uygun kullanılmaması ve kontrol mekanizmalarının iyi işletilememesi durumlarında tüketiciler, özellikle de risk grupları, risk altındadır [4].

Günlük hayatımızda farkında olarak ya da olmayarak yüzlerce çeşidini tükettiğimiz bu maddeler elbette bir kısım yararları için sofralarımızda yer alırlar. Koruyucu, renklendirici, oksitlenmeyi önleyici v.s. işlevi gören bu maddelerin kullanımı son yıllarda çok hızlı bir artış göstermiş ve yıllık 200.000 ton miktarına ulaşmıştır. Tüketimdeki bu hızlı tırmanmaya paralel olarak katkı maddelerine karşı gelişen ve çok değişkenlik gösteren yan etkilerde de artma gözlemlenmektedir [9].

Gıdalarda katkı maddelerinin kullanımı son yıllarda giderek artmakla birlikte batı ülkelerinde alınan gıdaların %75'ini işlenmiş ürünler teşkil eder ve bu ürünlerde çok çeşitli katkı maddeleri kullanılır. Yapılan hesaplamalar batı insanının yılda 5-6 kg veya daha da fazla katkı maddesi tükettiğini göstermektedir. Bu maddelerin kullanımıyla ilgili birçok aksi tesir belgelenmiştir. Bunlar arasında egzama, ürtiker, dermatit, barsak sendromu, bulantı, kusma, ishal gibi gastrik rahatsızlıklar, rinit, bronkospazm, migren, anafaksi, hiperaktivite ve diğer davranış bozuklukları sayılabilir [10].

Kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddelerinin sürekli olarak alındığında toksik etkiler gösterdikleri bilinmektedir [11]. Bu katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tuzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı zaman halk sağlığı açısından zararlı olabilir. Son zamanlarda kimyasal karsinojenlere maruz kalma, önemli bir sorun hâline

gelmiştir. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek dozlarda kullanılsalar dahi, bu maddelerin bir süre sonra vücutta birikerek insan sağlığını tehdit edebilecek miktarlara ulaşabileceği, dokularda hasar meydana getirebileceği, kısaca insan için mutajenik ve karsinojenik olabileceği gibi konular göz ardı edilmemelidir [7].

Gıda katkı maddelerinin 32 değişik fonksiyonu vardır. Gıda katkı maddeleri hazır gıdalarda bu değişik fonksiyonlardan birini veya birkaçını yerine getirmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Gıda katkı maddelerinin bazı kullanım amaçları ve örnekleri aşağıda verilmiştir [12].

Gıda Katkı Maddeleri kullanım amaçlarına göre 4 temel sınıfa ayrılmaktadır:

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular)

- a. Antimikrobialer (nitrit, nitrat, benzoik asit, propionik asit)
- b. Antioksidanlar (BHA, BHT, sorbikasit, kükürt dioksit). Gıdalarla alınan en önemli antioksidanlar: betakaroten, E ve C vitaminleridir.

2. Yapıyı ve hazırlama, pişme özelliğini geliştirenler

- a. pH ayarlayıcılar
- b. Topaklanmayı önleyenler (silikat, magnezyum oksit, magnezyum karbonat)
- c. Emülsifiyerler (lesitin, mono ve digliseritler)
- d. Mayalanmayı sağlayıcı ajanlar
- e. Nem ayarlayıcılar
- f. Olgunlaştırıcılar
- g. Ağartıcılar, dolgu maddeleri, köpük ayarlayıcılar, parlaticılar
- h. Stabilizörler, kıvam arttırıcılar, tatlandırıcılar

3. Aromayı ve rengi geliştiriciler

- a. Çeşni arttırıcılar (MSG)
- b. Çeşni vericiler (Aroma maddeleri)
- c. Renklendiriciler (tartrazin, indigotin)

4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler (Besin öğeleri)
 - a. Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A, D vitaminleri)
 - b. İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2, niasin)

24 farklı kategorideki gıda katkı maddeleri ise [12]

- | | | |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1. Antioksidanlar | 9. Hacim Arttırıcılar | 17. Nem Tutucular |
| 2. Aroma Arttırıcılar | 10. İtici Gazlar | 18. Parlaticılar |
| 3. Asitler | 11. Jelleştirme Ajanları | 19. Renklendiriciler |
| 4. Asitlik Düzenleyici | 12. Kabartıcılar | 20. Sertleştiriciler |
| 5. Ayırıcılar | 13. Kıvam Arttırıcılar | 21. Stabilizatörler |
| 6. Emülgatörler | 14. Koruyucular | 22. Tatlandırıcılar |
| 7. Emülgatör Tuzlar | 15. Köpüklenmeyi Önleyici | 23. Topaklanmayı Önleyici |
| 8. Enzimler | 16. Modifiye Nişasta | 24. Un İşleme Ajanları |

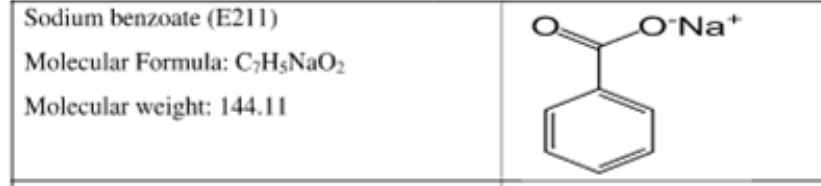
E-kodu gıda katkılarına SCF (Scientific Committee on Food) tarafından verilen kodları gösterir. “E” numara sistemi ile gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflaması şu şekildedir [13].

- 1- Renklendiriciler: E100-180,
- 2- Koruyucular: E200-297,
- 3- Antioksidanlar: E300-321,
- 4- Emülsifiyer ve Stabilizatörler: E322-500,
- 5- Asit-baz sağlayıcılar: E500- 578,
- 6- Tatlandırıcılar, koku verenler: E620-637,
- 7- Geniş amaçlı gıda katkı maddeleri: E900-927 [13].

2.2. Sodyum Benzoat

Benzoik asitin sodyum tuzu olan SB (şekil 2.1.) hazır gıdalarda kullanılan antimikrobiyal bir maddedir. Günümüzde üretilen pek çok gıdalarda özellikle margarinlerde, gazlı ve gazsız içeceklerde, meyve sularında, soslarda, kakaolu ürünlerde, bisküvi, gofret, kek ve kremalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda sektöründe ayrıca turşularda, ketçap ve benzeri soslarda, marmelat ve reçellerde,

zeytin üretiminde, işlenmiş balık ürünlerinde ve şekerlemelerde yaygın olarak kullanılır. % 0.1 - 0.2 aralığında kullanılmaktadır. İçecek endüstrisinde % 10-20 lik sulu çözeltilerinden faydalanılmaktadır. Ülkemizde ise en çok % 0.1 oranında kullanılabilmekte ve daha fazlasına izin verilmemektedir.



Şekil 2.1. Sodyum Benzoat'ın yapısı ve moleküler özelliği [14]

E-Numarası	Adı	Sınıf	Diğer Aksi tesirleri
E210	Benzoik Asit	Koruyucu	Başağrısı, Barsak bozukluğu, Allerjik
E211	Sodyum Benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E212	Potasyum Benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E213	Kalsiyum Benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E214	Etil 4- hidroksi benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E215	Etil 4-hidroksi benzoat Sodyum tuzu	Koruyucu	E210 ile aynı
E216	Propil 4- hidroksi benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E217	Propil 4- hidroksi benzoat Sodyum tuzu	Koruyucu	E210 ile aynı
E218	Metil 4- hidroksi benzoat	Koruyucu	E210 ile aynı
E219	Metil 4- hidroksi benzoat Sodyum tuzu	Koruyucu	E210 ile aynı

Şekil 2.2. Benzoat ve türevlerinin E numaraları [14]

SB gıdalara koruyucu katkı maddesi şeklinde katılmaktadır. Serbest benzoik asitin düşük düzeyde suda çözülmesi sebebiyle SB tercih edilmektedir. Maya üzerindeki inhibe edici etkiden dolayı maya ile kabartılmış ürünlerde kullanılmazken, bu gıda katkı maddesinin aktif olduğu optimum pH aralığı 2,5-4 tür [13]. SB gıda katkıları listesinde E211 olarak kodlanmıştır (Şekil 2.2.).

Benzoik asit menşei SB dünyanın birçok ülkesinde kullanılan, FDA tarafından gıdalarda kullanımına izin verilen ilk antimikrobiyel maddedir. Araştırmalar sonucunda görülmüştür ki, SB antimikrobiyel aktivitesini, yapısındaki benzoik asidin çözülmemiş molekülünün lipofilik karakterinden aldığı görülmüştür.

SB (E211) kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan en eski kimyasal koruyucular arasındadır [15]. Genel olarak en çok maya ve bakterilere karşı aktif, küflere karşı daha az aktif bir koruyucu olan SB düşük maliyeti ile tercih

edilmektedir. Ancak bu maddenin dar bir pH aralığında etkin olabilmesi ve bazı gıdalarda ve özellikle meyve sularında istenilmeyen lezzet oluşturmaya nedeni ile düşük düzeylerde ve potasyum sorbat ile kombine olarak kullanılmasının daha uygun olacağı belirtilmektedir [1, 15-17].

Canlı metabolizmasında % 0,1 konsantrasyonda 0,5 gr SB toksin etkisi tolere edilebilmektedir. Daha fazla doz aşımalarında mide bağırsaklardan hızlı ve tamamen arbsorplanmasıyla zehirlenme etkisi yapmaktadır. SB lethal dozun altında canlı metabolizmada idrarla dışarı atılmaktadır.

SB'ın gıdalara farklı ülkelerde farklı miktarda ilave edildiği bilinmektedir [18]. Oral olarak alınan SB'ın sindirim sisteminde hızlı bir şekilde emildiği, insanlarda ve deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [19]. İnsanlarda alındıktan sonra 1-2 saat içinde plazma konsantrasyonunda en yüksek düzeye vardığı bilinmektedir [20]. SB dermal ya da oral yolla alındıktan sonra karaciğerde metabolize olmaktadır [21]. Ağızdan alımı halinde benzoik asit gastrointestinal sistemde hızla absorbe edilir ve karaciğerde glisin ile birlikte hippürik asit yapılanmasını sağlar. Daha sonra hızlı bir şekilde idrar yolu ile atılır. SB'ın kısa süreli oral alımına bağlı olarak serum gama glutamiltranspeptidaz, albumin, kolinesteraz seviyelerini değiştirdiği, özellikle periportal alandaki hepatositlerde camsı sitoplazmanın oluştuğu [22, 23], ancak böbrek dokusunda bir değişikliğin gözlenmediği bildirilmiştir [22]. Benzoik asit'in oral, dermal ya da solunum yoluyla alımına bağlı olarak insanlarda düşük seviyelerde dahi astıma, deri döküntüleri gibi çeşitli allerjik reaksiyonlara ve anaflaktik şoka neden olduğu bildirilmiştir [24, 25].

2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma, bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen ürünlerini (ROS) oluşturur [26]. DNA, lipidler, proteinler gibi biyolojik moleküllerin prooksidan hasarına karşı koymada endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara gereksinim vardır. Eğer prooksidanlar aşırı olursa oksidatif stres ya da Oksidatif hasar meydana gelir. İnsanlardaki birçok hastalık (kanser, kardiyovasküler düzensizlikler vb.) prooksidan hasara eşlik eder. Bu hastalıkların antioksidanlar tarafından önlenmesi konusu son yıllarda tıbbi literatürde

önemli bir yer tutmaktadır. Antioksidanlar etkilerini ROS 'nin oluşumunu önleyerek ve/veya ROS'ni temizleyerek gösterirler [27].

Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır.

Hücre içi savunma merkezinin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT, GPx ve GST, hücre içi savunma merkezinin enzimatik antioksidanları arasında yer almaktadır (şekil 2.1). Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlara ise GSH, membranlara bağlanabilen alfa-tokoferol, beta-karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubin örnek olarak verilebilir [28, 29, 30, 31].

Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yok edicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur [32].

Antioksidan enzimlerin en önemlisi olan SOD, eritrositlerde hepatositlerin ve beyin hücrelerinin mitokondri matriksinde bulunur. Kararlı bir yapıya sahiptir. O_2^- H_2O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalizler [33- 35].

CAT enzimi ise, hepatositlerin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında bulunurken, diğer hücrelerin peroksizomlarında yer alır ve H_2O_2 'i su ve oksijene çevirerek etkisiz hale getirir [36,37].

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur [32] H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller [38] ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx, ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir [39, 40].

Glutatyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18), detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi

sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Bu basamakta, Glutatyon (GSH) ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir [41].

Eksojen kaynaklı antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır. Bunlar; bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller, ve diğer bileşikler kapsamaktadır [42].

2.4. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri

Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. Sayıları 4000' in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır [42-44].

Flavonoidler, fenolik maddeler grubundan olup bu maddeler bitkisel kaynaklı besinlerin lezzetine özellikle ağızda buruk bir tat bırakma yönünde ve rengine etki eden, meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarlarda bulunmakla birlikte önemli olan bir madde grubudur. Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir [45]. Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir [46].

Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla beraber meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenmektedir. Flavonoidler ise kateşin-kuersetinler, antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar ve proantosiyanidinler olmak üzere beş alt gruba ayrılır [46].

Bugüne kadar en az 5000 tane fenolik madde tanımlanmış olup bunların 2000'den fazlası doğal flavonoidlerdir. Genelde bitkilerin yaprak, çiçek, meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler [45]. Bitkiler aleminde

fenolik madde içeriği en zengin olan bitkinin *Camellia sinensis* olduğu bildirilmektedir [47]. Pek çok yiyecek flavonoidleri ve diğer polifenollerini içerir. Fenolik asit bakımından zengin besinler antioksidan, antibakteriyel, antiinflatuar, antiallerjik, antiviral özellik gösterirler ayrıca karaciğer üzerinde de koruyucu etkileri vardır. Bunların yanında polifenoller kanser, kardiovasküler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon, nörodejeneratif bozukluklar gibi kronik rahatsızlıkları da hafifletici özelliklere sahiptir [48]

Flavonoidler antitoksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmalarını şu şekilde açıklayabiliriz:

- a) Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikalini ($\cdot OH$) ve singlet oksijeni temizler [44, 49, 50, 51]
- b) Peroksil radikalini (ROO^{\cdot}) ve alkoksil (RO^{\cdot}) yakalar, lipid peroksil (LOO^{\cdot}) zincirini kırar [50, 52- 56]
- c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder [54, 57]
- d) Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar [54]
- e) Enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modülasyonu ile hücre sel regülasyonda önemli bir rol oynayan küçük bir asidik protein kalmodulini inhibe eder [58]
- f) Protein kinaz enzimini inhibe eder [58]
- g) Laktat transportunu engeller [58]

2.4.1. Kuersetin

Fenolik maddelerin önemli biyolojik özelliklerinden biri de antioksidatif etki göstermeleridir. Kuersetin gibi antioksidan flavonoidlerin *in vitro* çalışmalarında, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonu ve hücre toksikasyonunu azalttığı bildirilmiştir [59]. Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önler ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar [60]. Ayrıca antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflatuar, antikarsinojenik etkileri vardır [61]. Kuersetin apoptozu indükler, tümör gelişimini engeller, fosfolipaz A₂ ve protein kinazları inhibe eder,

membran akışkanlığını artırır. Kuersetinin farelerde eritrosit membranlarını oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir [62]. Kuersetinin de arasında bulunduğu flavonoidler LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunu engelleyerek ve de NOS (nitrik oksit sentaz) aktivitesini takiben vazodilatasyona neden olan NO (nitrik oksit) seviyesini arttırlar [63].

2.4.2. Kateşin

Kateşinler serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırarak antioksidan görevi yaparlar ayrıca ateşinlerin antimikrobiyal, antifungal, antitümör özellikleri de vardır [64]. Kateşinlerin antioksidatif ve antialerjik özellikleri vardır, antioksidan aktivitelerinden dolayı hücreler üzerinde koruyucu etkileri bulunur [65, 66]. Kateşinler biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırdıklarından antioksidan aktiviteye sahiptirler bu sayede DNA'yı ve diğer biyomolekülleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korurlar [67].

Kateşinler hücreleri DNA hasarına ve tümör oluşumuna karşı korurlar, serum kolesterol seviyesini azaltırlar, hipertansiyonu düşürürler ayrıca antimitojenik etkiye sahiptirler [68,69]. Kateşinlerin antiviral özellikler, plak oluşumunu inhibe etme, bazı tip kanserlerin önlenmesi, yüksek olan tansiyonu ve kan glukoz seviyesini düşürme gibi bir takım fizyolojik etkileri vardır. Kateşinlerin lipid metabolizması üzerine de etkileri vardır, total kolesterol ve trigliserit miktarını azaltırlar, karaciğerdeki yağ birikimini inhibe ederler, karaciğerdeki lipid katabolizmasını stimüle ederler ve enerji tüketimi arttırlar [66].

Kateşinler özellikle yeşil çay, siyah çay, meyve ve kakao ürünleri ve diğer bitkilerde bol miktarda bulunur. Baba ve ark., özellikle çayda bulunan kateşinlerin atheroskleroz gelişimini hafiflettiğini, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi nörodejeneratif bozuklukları azalttığını belirtmişlerdir [70].

Bu çalışmanın amacı gıda katkı maddelerinden SB'nin insan eritrositleri üzerine *in vitro* olarak toksisitesini spektrofotometrik olarak değerlendirmek ve meydana gelen

toksik hasar üzerine flavonoidlerden kateşin ve kuersetinin koruyucu etkisini belirlemektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Gıda katkı maddesi olan %99 saflıkta SB'in çeşitli dozları (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) [14] kullanılmıştır ve bu madde Merck'den temin edilmiştir.

Kateşin, kuersetin ve biyokimyasal analizlerde kullanılan diğer kimyasal maddelerin tümü Sigma-Aldrich'ten temin edildi.

3.2. Eritrositlerin hazırlanması

Bu çalışma için sigara-alkol kullanmayan, çalıştığı ortamda herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmayan sağlıklı 6 erkek bireyden 20 ml kan örneği heparinli tüplere alınmıştır.

Heparinleşmiş tam kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Plazma ve lökositler uzaklaştırılmış ve eritrositler fizyolojik tuz çözeltisi (% 0.9'luk NaCl) ile üç kez yıkandıktan sonra aynı çözeltiyle %50 (v/v) oranlı hücre süspansiyonları PBS ile hazırlanmıştır.

3.3. Eritrositlere uygulama

Eritrositler kontrol grubu (n=6) ve muamele grubu (her biri n=6) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Muamele grubu da kendi içinde beş gruba ayrılmıştır. Bunlar;

- 1. Grup:* Kateşinle muameleli grup (n=6),
- 2. Grup:* Kuersetin muameleli grup (n=6),
- 3. Grup:* SB muameleli grup (n=6).
- 4. Grup:* Kateşin + SB muameleli grup (n=6)
- 5. Grup:* Kuersetin + SB muameleli grup (n=6)

Maddeler eritrositlere eklenerek 1 saat 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma saatine kadar -20 °C’ de bekleyen eritrositler soğuk deiyonize su ile 4 kat sulandırılarak hemolizati elde edilmiştir.

Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) miktarı kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak spektroskopik (Shimadzu 1800, UV/VIS Spektrofotometre, Kyoto, Japan) yöntem ile belirlenmiştir.

3.4. Parametrelerin Değerlendirilmesi ve Ölçüm Metodları

3.4.1. Malondialdehit (MDA) Miktarının Tayini

MDA, aerobik şartlarda TBA ile 90 °C’de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur. Analizler ve analize ait hesaplamalar, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre yapılmıştır [71].

Her deney tüpüne % 15’lik TCA içinde % 0.375’lik hazırlanmış olan TBA dan 2 ml alınarak 1 ml homojenat (300µL + 700 µL distile su) üzerine konuldu. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpün ağzı kapatılıp 95 °C’ deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan tüpler, buz içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi ve spektrofotometrede 532 nm’de kör tüpüne karşı absorbansları okundu. Sabit sayı, $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, kullanılarak lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı nmol/mgHb olarak hesaplandı.

3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi

Toplam SOD (EC 1.15.1.1) tayininde Marklund ve Marklund’un metodu kullanılarak pyrogallol’un 3 dakikada 440 nm’de alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbans ölçülmüştür [72].

Bu enzim aktivitesinin ölçülmesinde 3 ml’lik 7 adet plastik küvete 2,80 ml Tris-EDTA tamponu (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,2) ve 6.25, 12.5, 25, 50, 100

$\mu\text{g/ml}$ 'lik değişen hacimlerde süpernatant konularak enzim kaynağı ilave edildi. Her küvetin son hacmi Tris-EDTA tamponu ile 2,90 ml'ye tamamlandı. Bu karışımların üzerlerine 100 μl 15 mM pyrogallol ilave edilerek pyrogallol'un otooksidasyonu başlatıldı. Her bir karışımın % inhibisyon miktarları hesaplanarak bir grafik elde edildi bu grafik kullanılarak bir ünite toplam SOD aktivitesi pyrogallol'un otooksidasyonunun % 50 inhibisyonuna sebep olan protein miktarı olarak hesaplandı. Daha sonra homojenattaki 1 mg protein başına toplam SOD aktivitesini bulmak için $1/(\text{mg prot.pyrogallolun otooksidasyonunun \% 50 inhibisyonu})$ eşitliği kullanılarak enzim aktivitesi U/mgHb olarak verilmiştir.

3.4.3. Katalaz (CAT) Enzimi

Katalaz (EC 1.11.1.6) enziminin aktivite tayini Aebi tarafından belirtilen metod ile yapıldı [73]. Spektrofotometrede absorbans okunmadan önce elde edilen süpernatanta peroksizomlardaki katalazı açığa çıkarmak için %1'lik Triton X-100 (h/h) ilave edildi, daha sonra 50 mM fosfat tamponu (pH 7) eklenerek seyreltme yapıldı. Daha sonra spektrofotometrede (UV dalga boyunda) kullanılan cam küvete en son sulandırılmış örnekten 2 ml konarak üzerine 1 ml % 30'luk hidrojen peroksit eklendi ve enzimatik reaksiyon başlatıldı. Üç dakika boyunca 240 nm'de H_2O_2 'in parçalanmasını gösteren azalan absorbans ölçüldü. Sabit sayı, ϵ_{240} : 0,0394 mM/cm kullanılarak birim zaman başına absorbansdaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alındı. Enzim aktivitesi U/mgHb birimiyle verildi.

3.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzimi

GPx (EC 1.11.1.9) tayini Paglia ve Valentine tarafından belirtilen metoda göre yapıldı [74]. Bu metod okside glutasyon (GS-SG) ve NADPH'ı substrat olarak kullanan glutasyon redüktazın 340 nm'de Nikotinamid-adenin-dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH)'ı okside etmesi ile meydana gelen azalan absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Okside glutasyon, GPx tarafından oluşturulduğu için NADPH'm azalması GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır. NADPH'm Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına sebep olur, böylece dolaylı olarak GPx'in aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Bu enzimin spesifik aktivitesini ölçmek için 3 ml'lik cam küvetlere

2,525 ml 0,1 M'lık Tris-HCl tamponu, 75 µl 80 mM redükte glutatyon, 100 µl seyreltilmiş süpernatant, 100 µl 2 mM NADPH, 100 µl 0,24 ünite glutatyon redüktaz ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu karışımın üzerine 100 µl 1,5 mM hidrojen peroksit eklenerek enzimatik reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika boyunca 340 nm'de azalan absorbanslar okundu. GPx aktivitesi (ϵ_{340} : 6220 M/cm) 1 dakikada 1 mg protein tarafından harcanan NADPH miktarı olarak hesaplandı ve enziminin spesifik aktivitesi U/mgHb olarak verildi.

3.4.5. Glutatyon-S-Transferaz (GST) Enzimi

Glutatyon S-transferaz tayini Habig tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır [75]. GST'nin bütün izozimleri için 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak kullanılmaktadır. GST enzimi tarafından CDNB, indirgenmiş glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek glutatyonun oksidasyonuna bağlı olarak 340 nm'de absorbans yükselmektedir. Enzim aktivitesinin tayini için 3 dakika boyunca 340 nm'de yükselen absorbanslar okundu. Enzim aktivitesi 340 nm'de (ϵ_{340} : 9.6 mM/cm) 1 dakikada süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına oluşturulan tioeter miktarı olarak hesaplandı ve enzimin spesifik aktivitesi U/mgHb olarak verildi.

3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu İle Hemoglobin Tayini

Hemoglobindeki Fe^{+2} , ferrisiyanür ile Fe^{+3} 'e okside edilir ve potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanomethemoglobine dönüşür. Siyanomethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılı Drapkin çözeltisi [76] için 0.198 g $K_3Fe(CN)_6$, 0.052 g KCN, 1 g NaHCO ayrı ayrı hassas terazide tartıldıktan sonra 1 litrelik balon joje içine konuldu. Bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı. Örnek tüpüne 5 ml Drapkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklenip iyice karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra Drapkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm'de okundu.

Hesaplama işlemi ise;

Hb Konsantrasyonu (g Hb/100 ml kan) = A (Okunan Absorbans Değeri) \times 36,8
(Sabit Katsayı)

3.6. İstatistiki Analizler

Tezde kullanılan istatistiksel veriler Windows SPSS 11.0 bilgisayar programında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

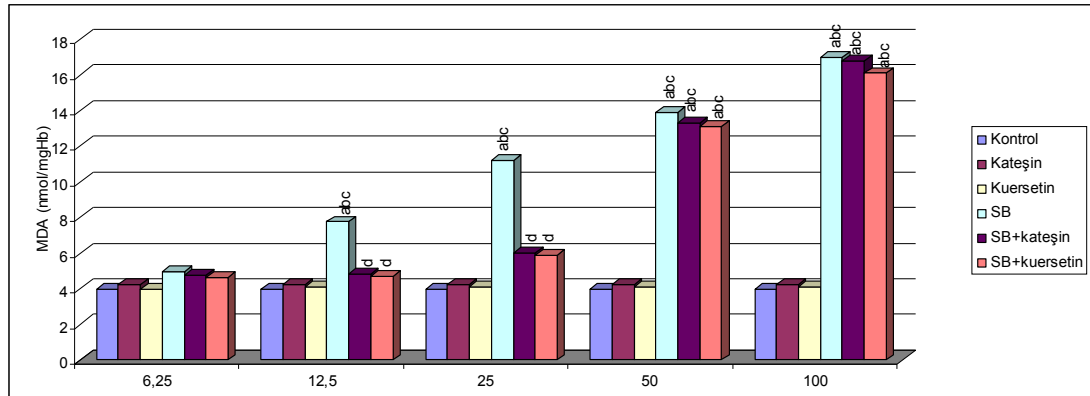
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1. Sodyum Benzoat'ın Malondialdehit (MDA) Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi

Kontrol grubu ile kateşin ve kuersetin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

4.1.1. Sodyum Benzoat'ın Malondialdehit (MDA) Miktarına Etkisi

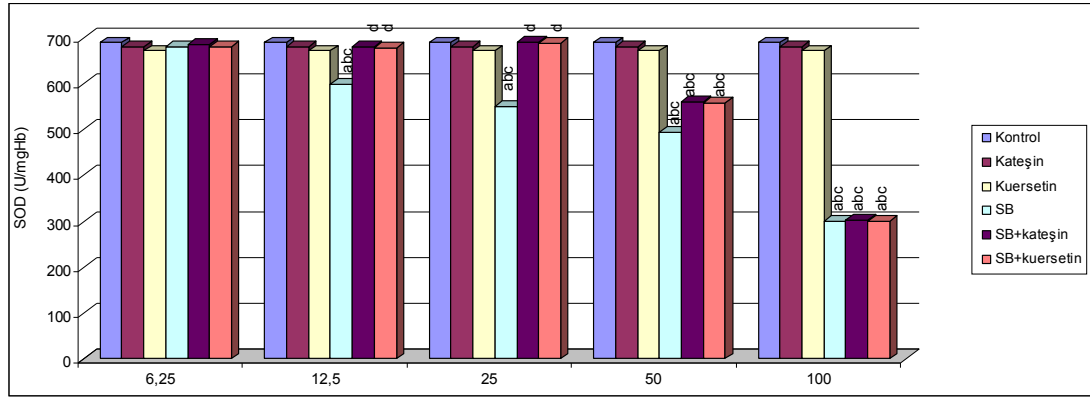
SB'ın 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml uygulanan gruplarında kontrol, kateşin ve kuersetin uygulanan grup karşılaştırıldığında MDA değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0,05$). SB'ın en düşük dozu olarak uygulanan 6.25 µg/ml uygulama grubu ile kontrol grubu, kateşin ve kuersetin uygulanan grup karşılaştırıldığında MDA seviyesinde istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 12.5 ve 25 µg/ml SB + kateşin ya da kuersetin uygulanan grupta MDA seviyesi sadece SB uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. 50 ve 100 µg/ml SB + kateşin ya da kuersetin ile birlikte uygulanan grupla kontrol grubu ve sadece kateşin ya da sadece kuersetin uygulanan grup karşılaştırıldığında aynı koruyucu etki gözlenmemiştir (Şekil 1).



Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri, ^aKontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKateşin uygulanan grupla kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^cKuersetin uygulanan grupla SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^dSB uygulanan grupla SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.2. Sodyum Benzoat'ın Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkisi

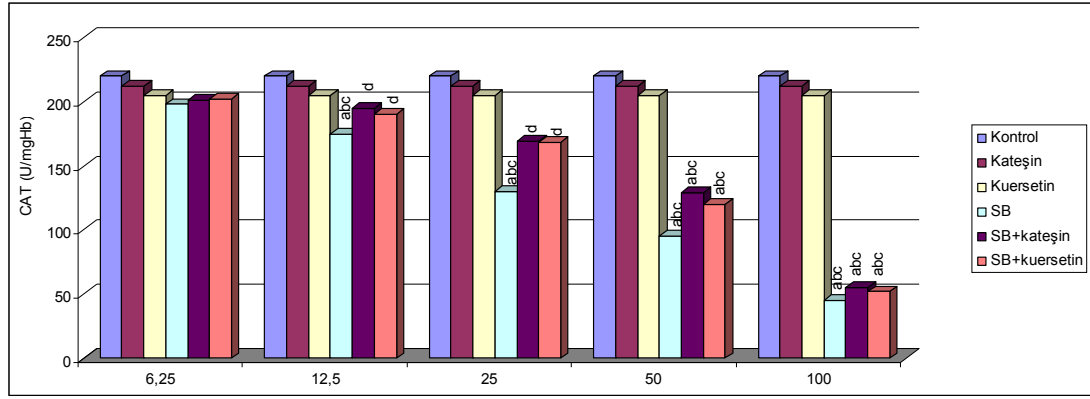
SB'nin uygulanan dört yüksek konsantrasyonda eritrositlerin SOD enzim aktivitesini istatistiksel olarak azaltmıştır ($P<0,05$). SB'nin 6.25 $\mu\text{g/ml}$ uygulanan grupla kontrol, kateşin ve kuersetin uygulanan grup karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitelerinde bir fark bulunmamıştır. SB'nin (12.5 ve 25 $\mu\text{g/ml}$) + kateşin veya kuersetin uygulanan gruplarında yalnızca SB uygulanan grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak uygulanan bu flavonoidlerin 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ SB'nin toksik etkisine karşı koruyuculuğu tespit edilmemiştir ($P<0,05$), (Şekil 2).



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri, ^aKontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKateşin uygulanan grupla kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^cKuersetin uygulanan grupla SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^dSB uygulanan grupla SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.3. Sodyum Benzoat'ın Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine Etkisi

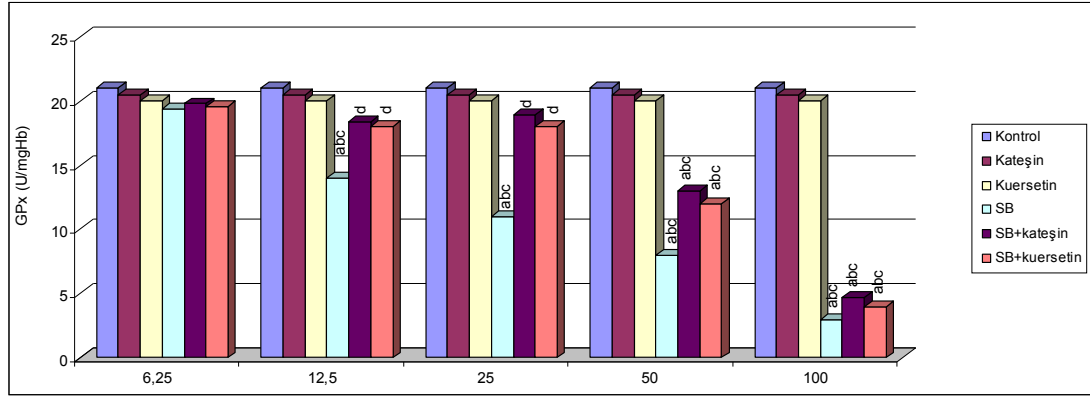
SB'nin 6.25 $\mu\text{g/ml}$ uygulanan gruplarında eritrositlerin CAT enzim aktivitelerinde kontrol, kateşin ve kuersetin uygulanan gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. SB'nin 12.5 ve 25 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında flavonoidlerle uygulanması CAT enzim aktivitesinde yalnızca SB uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir artış tespit edilmiştir. SB'nin 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ uygulanan gruplarında kateşin veya kuersetinin birlikte uygulanması CAT enzim aktivitesinde anlamlı bir değişim göstermemiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri, ^aKontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKateşin uygulanan grupla kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^cKuersetin uygulanan grupla SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^dSB uygulanan grupla SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.4. Sodyum Benzoat'ın Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkisi

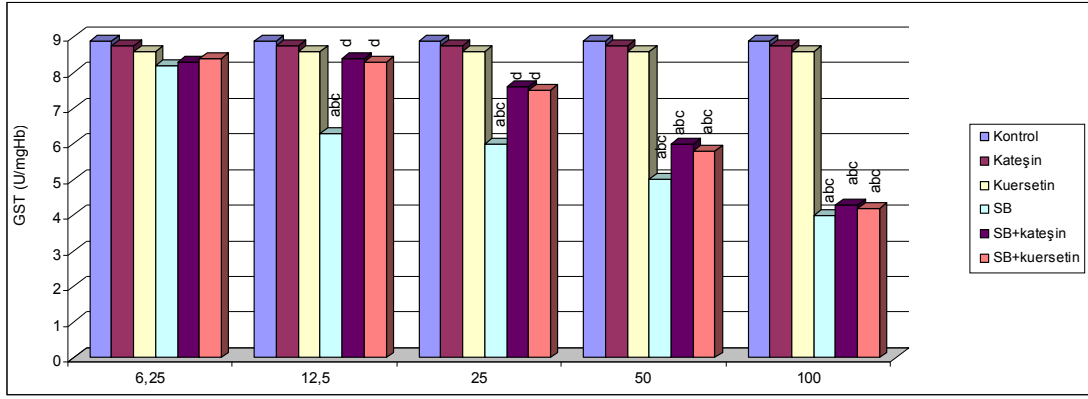
SB'nin 6,25 µg/ml uygulanan gruplarında eritrositlerin GPx enzim aktivitesinde anlamlı bir değişme gözlenmezken 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml dozları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 12,5 ve 25 µg/ml SB + kateşin ya da kuersetin uygulanan gruplar sadece SB uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. SB'nin 50 ve 100 µg/ml uygulanan gruplarında ise kateşin veya kuersetinin birlikte uygulanması GPx enzim aktivitesinde anlamlı bir artış göstermemiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri, ^aKontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKateşin uygulanan grupla kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^cKuersetin uygulanan grupla SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^dSB uygulanan grupla SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.5. Sodyum Benzoat'ın Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesine Etkisi

İnsan eritrositlerinin GST enzim aktivitesi SB'ın 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml dozlarında istatistiksel olarak bir azalma gösterirken en düşük dozunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($P<0,05$). SB'ın 12.5 ve 25 µg/ml dozlarında kateşin ve kuersetinin koruyuculuğu nedeniyle bu enzim aktivitesi istatistiksel olarak artarken SB'ın 50 ve 100 µg/ml dozlarında bu koruyuculuk tespit edilmemiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GST düzeyleri, ^aKontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKateşin uygulanan grupla kuersetin, SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^cKuersetin uygulanan grupla SB, SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$). ^dSB uygulanan grupla SB + kateşin, SB + kuersetin gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Gıda katkı maddeleri, gıdalara bazı özelliklerin kazandırılması, bir teknoloji veya modernizasyon gereği katılan maddelerdir. Günümüzde hızla gelişen endüstrileşme paralelinde mikrobiyal ve oksidatif bozulmalara dayanıklı ve kalite nitelikleri değişen tüketici ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde formülize edilmiş gıda üretimini gerçekleştirmek amacıyla, bu maddelerin kullanımı kaçınılmaz olarak giderek yaygınlaşmaktadır. Katkı maddelerinin gıda endüstrisi açısından pek çok yararı ve işlevi olmakla birlikte insan sağlığı açısından durumu her geçen gün tartışılmaya devam edilmektedir. Günümüzde insanların kırsal alanlardan daha kalabalık şehirlere göç etmeleri nedeniyle gıdanın üretildiği yerden çok daha uzak şehirlere veya ülkelere kadar bozulmadan ulaştırılabilmesi ancak katkı maddesi kullanımı ile mümkün olabilmektedir. Ancak bilinçsiz beslenme ve hazır tüketimin artması insanların daha fazla katkı tüketmelerine neden olabileceği ve sonuç olarak sağlık üzerinde olumsuz etki yaratabileceği de göz ardı edilmemelidir [12].

Birçok çalışmada gıda katkı maddelerinin canlı sistemler üzerine olumsuz etkiler gösterdiğine dair sonuçlar açıklanmıştır. Organik olarak bazı bitki köklerinden elde edilen fenolik bileşiklerin anti kanser özelliği taşırken, gıdalarda antioksidan olarak kullanılan sentetik fenolik bileşenlerin prekanserojen etkilerinin olduğu bilinmektedir [77]. SB'nin gastrointestinal sistem üzerine, karaciğer ve böbrek dokusu üzerine, tiroid bezleri üzerine olumsuz etkileri yapılan çalışmalarla açıklanmıştır [78-81]. Yine gıda katkı maddelerinden SB'nin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasıyla küçük damarlarda nekrozla seyreden, löko klastik vaskülit hastalığının ortaya çıktığı belirlenmiştir [79].

Kalender ve ark. ise fare dermal ve ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde SB'nin degranülasyon etkilerini araştırmıştır. SB ağız ve enjeksiyon yoluyla farelere (*Mus musculus domesticus*) verilmiş ve mast hücrelerindeki degranülasyon geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Sonuç olarak, hem dermal bağ dokusu mast hücrelerinde, hem de ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon tespit etmişlerdir [82]. Bir diğer çalışmada *Allium cepa* L.'nin kök

hüceleri 20-100 ppm konsantrasyonlarında SB ile muamele edilmiştir ve bütün dozların mitotik indeks üzerinde bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur [83, 84]. Düşük konsantrasyonlardaki (2,0, 0,2 ve 0,02 mM) potasyum sorbat ve SB'in genotoksik olmadığını ancak koruyucuların miktarı arttıkça (4 ve 8 mM) genotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır [85]. *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* ile yaptıkları bakteriyel mutajenite testlerinde SB'in kanserojenik olmadığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda SB'nin 6,25 µg/ml'lik konsantrasyonunun eritrosit hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (P>0,05).

SB'in 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarının kromozom anomaliliğine, kardeş kromatit değişimlerine ve mikronükleus oluşumuna sebep olduğu insan lenfosit hücrelerinde *in vitro* olarak gösterilmiştir. Aynı çalışma ile SB'in yüksek konsantrasyonda insan periferik lenfositlerde genotoksik olduğu belirtilmiştir [14]. Genotoksik etkili olan gıda katkı maddesi SB'in, diğer çalışmada kullanılan dozları 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml seçilmiş [15] ve insan eritrositleri üzerine toksik etkisi *in vitro* olarak tespit edilmiştir.

SB'nin serbest radikal üreterek hücelere zarar verdiği Piper tarafından ortaya konulmuştur [86]. Bu çalışmada, SB'in eritrositlerde hücre zarlarına zarar vererek LPO'nu artırdığı, antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT, GPx ve GST) azalttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde süperoksit iyonlarının etkisi ile SOD, CAT, GPx ve GST enzim aktiviteleri azalmış olabilir [87]. Bu enzimlerin aktivitelerinin azalması eritrositlerde GSH miktarının azalmasına süperoksit ve hidroksil radikallerinin hızla artmasına sebep olmaktadır [88].

Son yapılan araştırmalar, yaygın olarak kullanılan gıdaların besinsel özelliği olmayan ve bazı kanser türleri ve kardiyovasküler düzensizlikler gibi kronik hastalıklara karşı koruma sağlayabilen bileşikler içerdiğini ortaya koymuştur. Antikanserojen ve diğer yararlı özellikler içeren bu bileşikler diyetsel antioksidanlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Onların koruyucu etkisinin en önemli nedeni antioksidan aktiviteye sahip olmaları ve serbest radikal yakalama kapasiteleri yüzündendir. Son yıllarda en çok araştırılan diyetsel antioksidanlardan biri olan flavonoidlerin sayısı

yaklaşık 4000'in üzerinde olup sebzeler, meyveler, hububat, çay ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır [27].

Antioksidanlar eritrosit zarlarını oksidatif stresten korumakta [89, 90] ayrıca reaktif oksijen türevleri olan süperoksit ve hidroksil radikallerini temizlenmesini sağlamaktadırlar [91]. Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar flavanoidlerin kardiyovasküler [92-94], serebrovasküler [95] ve kanser [96] hastalıklarında azalma meydana getirdiğini göstermektedir. Flavanoidlerden kateşinin yeşil çay, siyah çay ve diğer besinlerde bulunduğu ve birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu rapor edilmiştir [70, 97]. HepG2 hücrelerinde myrisetin, kuersetin, (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin N-nitrosodibütilamin ve N-nitrosopiperidin'in DNA hasarına karşı koruyucu rolü araştırılmıştır. (+)-kateşinin en düşük dozda (10 µM) DNA ipliklerinin kırılmasını azalttığı tespit edilmiştir [98]. Lotito ve Fraga (+)-kateşinin kan plazmasında antioksidan olarak etkili olduğu, endojen lipid çözünürlüğünü geciktirdiği ve lipid oksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kuersetin ise potansiyel antioksidan olup, serbest radikalleri direk yok ederek lipid peroksidasyonu engelleyerek, *in vivo* ve *in vitro* antioksidan savunma sistemini düzenlemektedir [99]. Kuersetin doğal flavanoidlerden biri olup, RPE hücrelerini oksidatif stresten koruyarak hücrel yaşlanmayı doza bağlı olarak engellediği *in vitro* olarak gösterilmiştir [100]. Bu çalışmada, (+)-kateşinin ve kuersetinin en düşük dozu olarak 10 µM kullanılmış, SB'in oksidatif stresine karşı koruyuculuğu *in vitro* olarak çalışılmıştır. Eritrositlerin antioksidan enzim aktivitelerini değiştirdiği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda SB'in eritrosit hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Sigara içmeyen, ilaç kullanmayan, 20-35 yaş arası 6 sağlıklı bireyin eritrositlerinde bu gıda katkı maddesinin etkileri araştırılmıştır. Oksidatif stres sonucu oluşan hücrel harabiyetin hassas göstergelerinden biri olan lipid peroksidasyon seviyeleri ve antioksidan enzim aktivite değişimleri belirlenmiştir. Flavonoidlerden kateşin ve kuersetin'in SB'ye karşı bu değişimleri düzenleyip düzenlemediği tespit edilmiştir.

Gıda katkı maddeleri besin değerini artırmak ve korumak için gıdalara ilave edilmekte bu nedenle gıda katkı maddelerinin kullanımları ile ilgili olarak uyulması

zorunlu olan bazı temel ilkeler bulunmaktadır. Bundan dolayı bu konuda tüketiciler bilinçlendirilmeli ve denetimler arttırılmalıdır. Besin sanayisi için tüketici talepleri yön verici olduğundan dolayı bilinçli tüketici, doğru gıda katkı maddeleri kullanımı konusunda, hem üreticiyi hem de denetleme birimlerinin etkin kontrol yapma konusunda daha duyarlı hale getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Saad, B., Bari, M.F., Saleh, M.I., Ahmad, K., Talib, M.K.M., Simultaneous Determination Of Preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) In Foodstuffs Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal Of Chromatography A* 1073, 393–397, 2005.
2. Michaelsson, G., Juhlin, L., Urticaria Induced By Preservatives And Dye Additives In Foods And Drugs. *British Journal Dermatology* 88, 525–532, 1973.
3. Chander, V., Singh, D., Chopra, K., Catechin, A Natural Antioxidant Protects Against Rhabdomyolysis-Induced Myoglobinuric Acute Renal Failure, *Pharmacological Research*, 48,503-509 ,2003.
4. Atman, Ü. C., Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontrolü. *Sted Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 13(3), 86-88, 2004.
5. Öztürk, S., Erel, F., Çalışkaner, A. Z.,Karaayvaz, M., Güleç, M., Kartal, Ö., Kronik İdiopatik Ürtiker’de Katkı Maddeli Gıdalar ile Doğal Gıdalarda Bulunan Vazoaktif Maddelerin Rolü’’ *Koruyucu Hekimlik Bülteni* 6 (5), 351-356, 2007.
6. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, T.C. Resmî Gazete. Sayı: 23172 16 Kasım 1997.
7. Miller M., *Danger Additives At Work*, London Food Commission, London, 1985.
8. Sarıkaya, R., Solak, K., Benzoik Asit’in *Drosophila Melanogaster*’de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması. *GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, Cilt 23, Sayı 3, 19-32, 2003.
9. Cohen N, Weiss G, Minde K., Cognitive Styles In Adolescents Previously Diagnosed As Hyperactive. *J Chlld Psychol Psychiatry* 13, 203-209, 1972.
10. Tuormaa, T.E., The Adverse Effects Of Food Additives On Health: A Review Of The Literature With Special Emphasis On Childhood Hyperactivity. *Journal Of Orthomolecular Medicine* 9, 225–243, 1994.
11. Briggs DR. *Food Additavis*. Wahlgvist ML(Ed). ‘Food and Nutrition. Allen & Unwin Pty Ltd. Australia, 1997.

12. Akbulut M., Gıda Katkı Maddeleri: Fonksiyonları ve Kaynakları. 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 59-68, 2011.
13. Özdemir H., Turhan A.B., Arıkoğlu, H., Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitrit'in Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. *European Journal Of Basic Medical Science*, 2012.
14. 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* 49, 763–769, 2011.
15. Çakmaklı S, Çelik İ. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Erzurum, 1994.
16. Furia T. E. Handbook Of Food Additives. 2. Edition. Cleveland, Ohio, 1972.
17. Sofos JN. Antimicrobial Agents. In JA Maga & AT Tu (Eds.). *Food Additive Toxicology*. New York: Marcel Dekker, 501-529, 1995.
18. WHO, "Benzoik Acid and Sodium Benzoate." *Concise International Chemical Assesment*, 26, 2000.
19. US FDA, "GRAS (Generally Recognized As Safe) Food Ingredients: Benzoik Acid and Sodium Benzoate." Washington, DC.US Food and Drug Administration, 1972a.
20. Kubota, K., Ishizaki, T., "Dose-Dependent Pharmacokinetics Of Benzoik Acid Following Oral Administration Of Sodium Benzoate To Humans." *European Journal Of Clinical Pharmacology*, 41 (4),: 363-368, 1991.
21. Feilet, F., Leonard, JV., "Alternative Pathway Therapy For Urea Cycle Disorders." *Journal Of Inheridet Metabolic Disease*, 21 (1), 101-111, 1998.
22. Fujitani, T., "Short-Term Of Sodium Benzoat İn F344 Rats and B6C3F1 Mice." *Tox. Lett.*, 69, 171-179, 1993.
23. Kabaoğlu, A., Aktaç, T., "A Study Of The Effects Of Sodium Benzoate On The Mouse Liver." *Biologia*, 57 (3), 373-380, 2002.
24. Binslev-Jensen, C., "ABC Of Allergies. Food Allergy." *British Medical Journal.*, 316, 1299-1302, 1998.
25. Coveryl, J., Peters, L., Whittle, E., Basketter, D.A., "Susceptibility To Skin Stinging, Non-Immunologic Contact Urticaria and Acute Skin Irritation; İs There A Relationship?" *Contact Dermatitis*, 38 (2), 90-95, 1998.

26. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, and Hale A. Effect Of Red Wine İngestion On The Antioxidant Capacity Of Serum. *Clin. Chem.* 41/1, 32-35, 1995.
27. Kahraman A., Serteser M, Koken T. Flavonoidler, *Kocatepe Tıp Dergisi* 3, 01-08, 2002.
28. Brezezinska – Slebodzinska, E., Erythrocyte Osmotic Fragility Test As The Measure Of Defence Against Free Radicals İn Rabbits Of Different Age, *Acta Vet. Hung.*, 49(4), 413-419, 2001.
29. Koçyigit, A., Erel, Ö. ve Gür, S., Effects Of Tobacco Smoking On Plasma Selenium, Zinc, Copper and Iron Concentrations and Related Antioxidative Enzyme Activities. *Clin. Biochem.*, 34, 629-633, 2002.
30. Woods, J. R., Cavanaugh, J. L., Narkus, E. P., Plessinger, M. A. ve Miller, R. K., The Effect Of Labor On Maternal and Fetal Vitamins C and E, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 187(5), 1179-1185, 2002.
31. Kleczkowski, M., Klucinski, W., Sikora, J., Zdanowicz, M. ve Dziekan, P., Role Of The Antioxidants İn The Protection Against Oxidative Stress İn Cattle-Nonenzymaticn Mechanisms (Part 2), *Pol. J. Vet. Sci.*, 6(4), 301-308, 2003.
32. Armstrong, D. A.,Aragno, M., Tamagno, E., Gato, V., Brignardello, E., Parola, S., ve Danni, O., *Methods İn Molecular Biology*. Volume 108, Toronto, Humana Pres, 1998.
33. McIntyre, M., Bohr, D. F. ve Dominiczak, A. F., Endothelial Function İn Hypertension: The Role Of Superoxide Anion, *Hypertension*, 34, 539-545, 1999.
34. Draper, H. H., *Nutritional Modulation Of Oxygen Radical Pathology*. Kitap: Draper H. H., Ed., *Advances İn Nutritional Research*, Vol 8, Newyork, Plenum Pres, 1990.
35. Chan, A. C., Chow, C. K. ve Chiu, D., Interaction Of Antioxidants and Their Implication İn Genetic Anemia, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222(3), 274-282, 1999.

36. Mansour, S.A., Mossa, A.H., Lipid Peroxidation and Oxidative Stress İn Rat Erythrocytes İnduced By Chlorpyrifos and The Protective Effect Of Zinc, *Pesticide Biochemistry Physiology*, 93, 34-39 ,2009.
37. Bebe, F.N., Panemangalore, M., Exposure To Low Doses Of Endosulfan and Chlorpyrifos Modifies Endogenous Antioxidants İn Tissues Of Rats, *Journal Of Environmental Science and Health B*, 38,349–363 , 2003.
38. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Baspınar, N. ve Tiftik, A. M., 1. Baskı, Konya, Konya Selçuk Üniv. Vet. Fak. Yay. Üniv., Biyokimya Kitabı, 1998.
39. Brigelius-Flohe, R., Tissue- Spesific Functions Of Individual Glutathione Peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.*, 27(9–10), 951–965, 1999.
40. Karagöl, H., Fidancı, U. R., Altıntaş, A. ve Sel, T., *Klinik Biyokimya*. 1. baskı, Ankara, Meteksan, 2000.
41. Andersson, C., Soderstrom, M., Mannervik B., *J. Biochem.* 1988, 249, 819-823.
42. Stavric B. Role Of Chemopreventers İn Human Diet. *Clin. Biochem.*27(5), 319-332 1994a.
43. Stavric B. Quercetin İn Our Diet: From Potent Mutagen To Probable Anticarcinogen. *Clin. Biochem*, 27(4), 245-248, 1994b.
44. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid As Antioxidants: Determination Of Radical-Scavenging Efficiencies Methods İn *Enzimology*, 186, 343-355, 1990.
45. Shahidi, F., Naczk, M., 1995. *Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic, USA. Willson, K.C., Clifford, M.N., *Tea Cultivation To Consumption*. Chapman & Hall, London, 1995.
46. Cemeroğlu, B., Acar, J., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6, Ankara, 1986.
47. Willson K.C., Clifford M.N. *Tea Cultivation To Consumption*. Chapman & Hall, London, 1995.

48. Fujii, H., Nishioka, H., Wakame, K., Magnuson, B.A., Roberts, A., Acute, Subchronic and Genotoxicity Studies Conducted With Oligonol, An Oligomerized Polyphenol Formulated From Lychee and Green Tea Extracts, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3553-3562, 2008.
49. Husain S.R, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl Radical Scavenging Activity Of Flavonoids, *Phytochemistry*. 26(9), 2489-2491, 1987.
50. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and Iron-Chelating Activities Of The Flavonoids Catechin, Quercetin, and Diosmetin On Iron-Loaded Rat Hepatocyte Cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45(1), 13-19, 1993.
51. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids Are Scavengers Of Superoxide Anions. *Bio Chem. Pharmacol.* 37(5), 837-841, 1988.
52. Elengovan V, Sekar N, Govindasamy S. Chemopreventive Potential Of Dietary Bioflavonoids Against 20-Methylcholanthrene-Induced Tumorigenesis. *Cancer Lett.* 87, 107-113, 1994.
53. Frankel EN, Kanner J, German R.S, Parks E, Kinsella JE. Inhibition Of Oxidation Of Human Low-Density Lipoprotein By Phenolic Substances In Red Wine. *Lancet.* 341, 454-457, 1993.
54. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JRS. Selectivity Of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase, Inhibition By An Antiinflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 787-792, 1988.
55. Skaper S.D, Fabris M, Ferrari V.; Carbonare M.D, Leon A. Quercetin Protects Cutaneous Tissue-Associated Cell Types Including Sensory Neurons From Oxidative Stress Induced By Glutathione Depletion: Cooperative Effects Of Ascorbic Acid. *Free Rad. Bioi. Med.* 22(4), 669-678, 1997.
56. Ratty AK. and Das NP. Effects Of Flavonoids On Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship. *Biochem Med Met BioI.* 39, 69-79, 1988.

57. Stavric B. Quercetin In Our Diet: From Potent Mutagen To Probable Anticarcinogen. *Clin. Biochem.*, 27(4), 245-248, 1994.
58. Formica J.V., Regelson W. Review Of The Biology Of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food Chem. Toxic.* 33(12), 1061-1080, 1995.
59. Luzia, M.R., Da Paixao, C.C., Marcilio, R., Trugo, L.C., Quinteiro, L.M.C., De Maria, A.B.D., Effect Of 5-Caffeoylquinic Acid On Soybean Oil Oxidative Stability. *International J. Food Sci. and Tech.* 32, 15-19, 1997.
60. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., "Quercetin, A Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and β -cell Damage In Rat Pancreas", *Pharmacological Research*, 51, 117-123, 2005.
61. Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C., "Part Of Quercetin Absorbed In The Small Intestine Is Conjugated and Further Secreted In The Intestinal Lumen", *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277, 120-126, 1999.
62. Pawlikowska-Pawlega, B., Gruszecki, W.I., Misiak, L.E., Gawron, A., "The Study Of The Quercetin Action On Human Erythrocyte Membranes", *Biochemical Pharmacology*, 66, 605-612, 2003.
63. Benito, S., Lopez, D., Saiz, M.P., Buxaderas, S., Sanchez, J., Puig-Parellada, P., Mitjavila, M.T., "A Flavonoid-Rich Diet Increases Nitric Oxide Production In Rat Aorta", *British Journal Of Pharmacology*, 135, 910-916, 2002.
64. Veluri, R., Weir, T.L., Bais, H.P., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M., "Phytotoxic and Antimicrobial Activities Of Catechin Derivatives", *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1077-1082, 2004.
65. Kagaya, N., Hara, Y., Saijo, R., Kamiyoshi, A., Tagawa, Y., Kawase, M., Yagi, K., "Novel Function Of Rare Catechin, Epigallocatechin-3-(3'-O-methyl)Gallate, Against Cold Injury In Primary Rat Hepatocytes", *Journal Of Bioscience and Bioengineering*, 96, 559-563, 2003.
66. Chengelis, C.P., Kirkpatrick, J.B., Regan, K.S., Radovsky, A.E., Beck, M.J., Morita, O., Tamaki, Y., Suzuki, H., "28-Day Oral (Gavage) Toxicity Studies Of Green Tea Catechins Prepared For Beverages In Rats", *Food and Chemical Toxicology*, 46, 978-989, 2008.

67. Chu, K.A., Wang, C.C., Chu, C.Y., Rogers, M.S., Choy, K.W., Pang, C.P., "Determination Of Catechins and Catechin Gallates In Tissues By Liquid Chromatography With Coulometric Array Detection and Selective Solid Phase Extraction", *Journal Of Chromatography B*, 810, 187-195, 2004.
68. Satoh, K., Sakamoto, Y., Ogata, A., Nagai, F., Mikuriya, H., Numazawa, M., Yamada, K., Aoki, N., Inhibition Of Aromatase Activity By Green Tea Extract Catechins and Their Endocrinological Effects Of Oral Administration In Rats, *Food and Chemical Toxicology*, 40, 925-933 ,2002.
69. Lin, S.D., Liu, E.H., Mau, J.L., "Effect Of Different Brewing Methods On Antioxidant Properties Of Steaming Green Tea", *LWT-Food and Technology*, 41, 1616-1623 ,2008.
70. Baba S., Asakabe N., Natsume M., Muto Y., Tazizawa T., Terao J. In Vivo Comparison Of The Bioavailability Of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and Their Mixture In Orally Administered Rats. *J. Nutr.* 131, 2885–2891, 2001.
71. Ohishi, H., N. ve Tagi, K, Assay For Lipid Peroxides In Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Chim.*, 95, 351-362, 1979.
72. Marklund, S. ve Marklund, G., Involvement Of Superoxide Anion Radical In The Autoxidation Of Pyrogallol and A Convenient Assay For Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474, 1974.
73. Aebi, H., Catalase In Vitro, *Meth. Enzymol*, 105, 121-126, 1984.
74. Paglia, D. E. ve Valentine, W. N. Studies On The Quantitative and Qualitative Characterization Of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169, 1967.
75. Habig WH ,Pabst MJ,Jakoby WB (1974) Glutathione-S-Transferases:The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation.*J Biol Chem* 249:7130-7139.
76. Fairbanks, V. F. ve Klee, G. G., *Biochemical Aspects Of Hematology*. Kitap: Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Eds., *Tietz Textbook Of Clinical Chemistry*. 3rd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company, 1999.

77. Vogt, T., "Sodium Benzoate- Induced Acute Leukocytoclastic Vasculitis With Unusual Clinical Appearance"; *Archive Of Dermatology*, 135, 726-727, 1999.
78. Sitich, F. H., "The Beneficial and Hazardous Effects Of Simple Phenolic Compounds", *Mutation Research*, 259, 307-32, 1991.
79. Bağcı, T., "Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımız Üzerine Etkileri", *Hacettepe Tıp Dergisi*; 28(1), 18-23, 1997.
80. Groten, J.P., "An Analysis Of The Possibility For Health Implication Of Joint Actions and Interactions Between Food Additives", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31, 77-91, 2000.
81. Beuchat, L. R., "Comparison Of Anti- Vibrio Activities Of Potassium Sorbate, Sodium Benzoate and Glycerol and Sucrose Esters Of Fatty Acids" *Applied and Environmental Microbiology*, 39(6), 1178-1182, 1980.
82. Kalender S, Sodyum Benzoat ve Tartrazinin Fare Dermal ve İnce Bağırsak Bağ Dokusu Mast Hücrelerinde Degranülasyon Etkileri. Doktora Tezi. A.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, 1997.
83. Turkoglu S. Genotoxicity Of Five Food Preservatives Tested On Root Tips Of *Allium Cepa L.* *Mutat Res*; 626, 4-14, 2007.
84. Mpountoukas P, Vantarakis A, Sivridis E, Lialiaris T. Cytogenetic Study In Cultured Human Lymphocytes Trea Ted With Three Commonly Usedpreservatives. *Food Chem Toxicol*; 46(7), 2390-2393, 2008.
85. Prival JM, Simmon FV, Mortelmans EK. Bacterial Mutagenicity Testing Of 49 Food Ingredients Gives Very Few Positive Results. *Mutat Res*; 260, 321-329, 1991.
86. Piper P. W. Yeast Superoxide Dismutase Mutants Reveal A Pro-Oxidant Action Of Weak Organic Acid Food Preservatives. *Free Radical. Bio. Med.* 27, 1219-1227, 1999.
87. Kono Y., Fridovich I. Superoxide Radicals İnhibit Catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754, 1982.

88. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Lipid Peroxidative Damage On Cadmium Exposure and Alterations In Antioxidant System In Rat Erythrocytes: A Study With Relation To Time. *BioMetals* 11, 153–157, 1998.
89. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Cadmium Induced Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes In Rat Tissues: Role Of Vitamin E and Selenium. *Trace Elem. Electro.* 14, 41–45, 1997a.
90. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Cd Induced Lipid Peroxidation and The Antioxidant System In Rat Erythrocytes: Role Of Antioxidants. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11, 8–13, 1997b.
91. Galati G., Sabzevari O., Wilson J. X., O'brien P. J. Prooxidant Activity and Cellular Effects Of Phenoxyl Radicals Of Dietary Flavonoids and Other Polyphenolics. *Toxicology* 177, 91–104, 2002.
92. Hertog M.G.L., Holman P.C.H., Katan M.B., Krombot D. Intake Of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids and Their Determinants In Adults In The Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-29, 1993b.
93. Liu S., Manson J.E., Lee I.M., Cole S.R., Hennekens C.H., Willett W. C., Buring J.E. Fruit and Vegetable Intake and Risk Of Cardiovascular Disease: The Womens Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 922–928, 2000.
94. Sesso H.D., Gaziano J.M., Liu S., Buring J.E. Flavonoid Intake and The Risk Of Cardiovascular Disease In Women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1400–1408, 2003.
95. Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A. Flavonoid Intake and Risk Of Chronic Diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560–568, 2002.
96. Arts I.C., Holman P.C., Feskens E.J., Bueno M.H.B., Kromhout D. Catechin Intake Might Explain The Inverse Relation Between Tea Consumption and Ischemic Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 74(2), 227-232, 2001.
97. Kalender Y., Kaya S., Durak D., Uzun F.G., Demir F. Protective Effects Of Catechin and Quercetin On Antioxidant Status, Lipid Peroxidation and Testis Histoarchitecture Induced By Chlorpyrifos In Male Rats. *Environ. Toxicol. Phar.* 33, 141-148, 2012.

98. Delgado M. E , Haza A. I., Garcia A., Morales P. Myricetin, Quercetin, (+)-Catechin and (-)-Epicatechin Protect Against N-Nitrosamines-Induced DNA Damage In Human Hepatoma Cells. *Toxicol. In Vitro*, 23, 1292-1297, 2009.
99. Aajaneyulu M., Chopra K. Quercetin, An Anti-Oxidant Bioflavonoid, Attenuates Diabetic Nephropathy In Rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31, 244–248, 2004.
100. Kook D., Wolf A. H., Yu A. L., Neubauer A. S., Priglinger S. G., Kampik A., Welge-Lussen U. C. The Protective Effect Of Quercetin Against Oxidative Stress In The Human RPE In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1712-1720, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kayseri’de doğan Gamze YETÜK, ilk ve orta öğretimini sırasıyla Ahmet Paşa İlköğretim Okulu ve Melikgazi Lisesinde tamamlamıştır. 2005 yılında kazandığı Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2009 yılında başarıyla bitirmiştir. 2010 yılında tezsiz yüksek lisans eğitimini Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında tamamlamıştır. 2011 yılında Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

İletişim Bilgileri

Osman Kavuncu Bulv.

Osman Kavuncu Mah.

Hidayet Apt. No: 221/11

38060 KAYSERİ

e-posta: gam_38_38_ze@hotmail.com