



**T.C.
MEHMET AKIF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI YAPAY TATLANDIRICILARIN mtDNA
HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nesibe KÜRKLÜ

BURDUR, 2017

**T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI YAPAY TATLANDIRICILARIN mtDNA
HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Nesibe KÜRKLÜ

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

BURDUR, 2017

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Nesibe KÜRKLÜ tarafından Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU yönetiminde hazırlanan “Bazı Yapay Tatlandırıcıların mtDNA Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/05/2017

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN (Başkan)

Akdeniz Üniversitesi.....

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....

Yrd. Doç. Dr. Dilara Akçora YILDIZ (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. İskender GÜLLE

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Bazı Yapay Tatlandırıcıların mtDNA Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05 / 05 / 2017

(İmza)

Nesibe KÜRKLÜ

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, deneylerimi yapmam için laboratuvarlarını bana açan ve araştırmalarımnda hiçbir yardımı esirgemeyen değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

0368-YL-16 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mayıs, 2017

Nesibe KÜRKLÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sakkarin.....	2
2.2. Aspartam	2
2.3. Siklamat.....	4
2.4. Acesulfam K.....	5
2.5. Sukraloz.....	5
2.6. Mitokondrial Genom	6
2.7. Mitokondrial DNA Hasarı.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Drosophila Kültürleri	9
3.2. Oluşturulan Deney Grupları	9
3.3. mtDNA Çalışmaları.....	10
3.3.1. DNA Çalışmaları İçin Örneklerin Hazırlanması	10
3.3.2. DNA'nın Ön Kantitasyonu.....	11
3.3.3. PCR.....	11
3.3.4. PCR Ürünlerinin Kantitasyonu.....	12
3.3.5. mtDNA Hasar Miktarının Hesaplanması	13
3.4. İstatistik	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	14
5. SONUÇ	20
KAYNAKLAR.....	22
ÖZGEÇMİŞ.....	25

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sakkarinin molekül formülü ($C_7H_5NO_3S$)	2
Şekil 2.2. Aspartamın molekül formülü ($C_{14}H_{18}N_2O_5$)	4
Şekil 2.3. Siklamatin molekül formülü ($C_6H_{12}NNaO_3S$)	4
Şekil 2.4. Acesulfam K'nın molekül formülü ($C_4H_4KNO_4S$)	5
Şekil 2.5. Sukralozun molekül formülü ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$)	6
Şekil 2.6. İnsan Mitokondrial DNA'sı genleri, ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri ve promotorları (McKinney ve Oliveira, 2013)	7
Şekil 3.1. Drosophila kültürleri ve bazı deney grupları	9
Şekil 3.2. DNA izolasyonu, lizat hazırlama aşaması	10
Şekil 3.3. PCR Sonrası Amplikasyon Ürünlerinin Florimetrik Ölçümü	12

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Relatif amplifikasyon ve mtDNA kopya sayısı değerleri.	14



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bp	: Baz çifti
DMSO	: Dimetil sulfoksit
dsDNA	: Double-stranded DNA
EDTA	: Etilendiamın tetraasetikasit
FDA	: Food and Drug Administration
mM	: Mili molar
ng	: Nanogram
nm	: Nanomolar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	: Revolutions per minute
μ L	: Mikro litre

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Yapay Tatlandırıcıların mtDNA Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Nesibe KÜRKLÜ

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

Mayıs, 2017

Bu tez çalışmasının amacı, bazı yapay tatlandırıcıların *Drosophila melanogaster*'de mtDNA hasarı ve kopya sayısı üzerine etkilerini değerlendirmektir. Yapay tatlandırıcılar, gıdalar, içecekler, ilaçlar ve hijyen ürünlerinin büyük bir kısmına eklenir. Dolayısıyla bu bileşiklerin herhangi birinin toksik bir özelliğinin olması tüm popülasyonda bir sağlık riski oluşturabileceği manasına gelir. Yapay tatlandırıcılar tarafından oluşturulan nükleer DNA hasarı bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş fakat bu bileşiklerin mtDNA üzerinde nasıl bir etki gösterdiği bugüne kadar araştırılmamıştır. mtDNA hasarı, nükleer DNA'daki delesyonlardan potansiyel olarak daha önemli olabilir. Çünkü tüm mitokondrial genom, intronlar olmaksızın ifade edilir. Ayrıca, kanserlerde gözlenen mtDNA mutasyonları gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada, mtDNA hasarını ölçmek için kantitatif PCR metodu kullanılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre Aspartam, istatistiksel olarak anlamlı derecede mtDNA hasarı oluşturmuştur. Sakkarin+Siklamat, Sakkarin, Acesulfam K ve Sukraloz uygulanan gruptaki hasar ise istatistiksel olarak önemsizdir. Son yıllarda birçok mtDNA mutasyonları, insan kanserlerinin farklı tiplerinde tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, aspartam, *Drosophila*'da mtDNA hasarı oluşturmuştur. Bu sonuç, aspartamın insanlarda etkilerinin dikkatli bir şekilde araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: mtDNA hasarı, mtDNA kopya sayısı, aspartam, sakkarin, siklamat, acesulfam K, sukraloz, yapay tatlandırıcılar, *Drosophila*

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi MAKÜ BAP koordinatörlüğü tarafından 0368-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Investigation of The Effects of Some Artificial Sweeteners on mtDNA Damage

Nesibe KÜRKLÜ

**Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU

May, 2017

The aim of the current study, detection of the effects of some artificial sweeteners on mtDNA damage and copy number in *Drosophila melanogaster*. Artificial sweeteners are added to a wide variety of food, drinks, drugs and hygiene products. A cancer-inducing activity of one of these substances would mean a health risk to an entire population. DNA mutations generated by some artificial sweeteners have been investigated by some researchers but there is no information in the literature about the effects of these substances on mtDNA. mtDNA damage could potentially be more important than deletions in nDNA because the entire mitochondrial genome codes for genes are expressed. Also, somatic mtDNA mutations have been increasingly observed in primary human cancers. In this research, the QPCR method was used to measure mtDNA damage. Aspartame created statistically significant mtDNA damage. There was no mtDNA damage in Saccharine+Cyclamate, Saccharine, Acesulfam K and Sucralose application groups. In recent years, many mtDNA mutations have been identified in various types of human cancer. Aspartame created mtDNA damage in *Drosophila* according to this study. These results indicate that the effects of aspartame in human should carefully detect.

Keywords: mtDNA damage, mtDNA copy number, aspartame, saccharine, cyclamate, acesulfam K, sucralose, artificial sweeteners, *Drosophila*

The present M.Sc. Thesis was supported by MAKU Scientific Projects Unit under the Project number of 0368-YL-16

1. GİRİŞ

Yapay tatlandırıcılar, gıdalar, içecekler, ilaçlar ve hijyen ürünlerinin büyük kısmına eklenir. Bu sebeple Amerika ve Avrupa’da yaşayan her bireyin bilerek ya da bilmeden yapay tatlandırıcılar kullandığı farz edilebilir. Dolayısıyla bu bileşiklerin herhangi birinin toksik bir özelliğinin olması tüm popülasyonda bir sağlık riski oluşturabileceği manasına gelir. Bu bileşiklerin olası sağlık riskleri ile ilgili medyada çıkan haberler sebebiyle bugün birçok insan yapay tatlandırıcıları kullanırken endişelidir (Weihrauch ve Diehl, 2004).

Pek çok insan bu ürünleri kilo verme amacıyla kullanmasına rağmen aslında bu ürünlerin kilo aldıracağına dair pek çok çalışma yapılmıştır. Şeker ve yüksek fruktozlu mısır şurubu obezite salgınının ana sorumlusu olarak görülmektedir. Şeker, çabuk emilebilen karbonhidratları bol miktarda sağlayarak aşırı enerji alınımı, kilo alma ve metabolik sendroma sebep olabilir. Diyet içecek endüstrisinin başarılı pazarlama stratejisinin sonucu yapay tatlandırıcı ürünler kilo sorunu olan kişiler tarafından sağlıklı olarak düşünülmektedir. Şaşırtıcı olansa epidemiyolojik verilerin bunun zıttını söylemesidir. Büyük ölçekli bazı çalışmalar sonucunda yapay tatlandırıcı kullanımı ve kilo alma arasında pozitif bağlantı bulunmuştur. Bunun dildeki tatlı hissini şeker ya da yapay tatlandırıcıdan geldiği fark etmeksizin iştahı arttırmasından kaynaklandığı düşünülür (Yang, 2010).

2014 yılında Nature dergisinde yayınlanan bir çalışmaya göre yapay tatlandırıcılar bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek glikoz intoleransını indüklemektedir (Suez ve diğerleri, 2014).

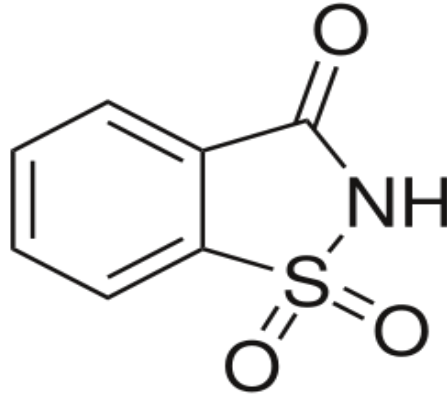
Bu tez çalışmasının amacı, bazı yapay tatlandırıcıların *Drosophila melanogaster*’de mtDNA hasarı ve kopya sayısı üzerine etkilerini değerlendirmektir. Yapay tatlandırıcılar tarafından oluşturulan nükleer DNA hasarı bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş fakat bu bileşiklerin mtDNA üzerinde nasıl bir etki gösterdiği bugüne kadar araştırılmamıştır. mtDNA hasarı, nükleer DNA’daki delesyonlardan potansiyel olarak daha önemli olabilir. Çünkü tüm mitokondrial genom, intronlar olmaksızın ifade edilir. Ayrıca, kanserlerde gözlenen mtDNA mutasyonları gün geçtikçe artmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sakkarin

Sakkarin en eski yapay tatlandırıcıdır. Johns Hopkins üniversitesinden Constantine Fahlberg tarafından 1879'da keşfedilmiştir. Sukrozdan yaklaşık 300 kat daha tatlıdır. Fakat sonrasında hafif acı bir tat bırakır (Yang, 2010).

Şekil 2.1.'de molekül formülü gösterilen Sakkarinin önemli bir özelliği, tadının ısıyla azalmamasıdır. Endüstriyel ürünlerde kullanım için bu çok önemli bir özelliktir. Gastrointestinal sistemde metabolize edilmez ve bu yüzden kan insülin seviyesini etkilemez. Günlük tavsiye edilen alım miktarı 5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Ticari olarak satılmaya başlandığından itibaren karsinojenik potansiyeli hakkında araştırmalar yoğun olarak yapılmıştır. 1970 ve 80'lerdeki çalışmalar yüksek dozda sakkarinin ratlarda mesane kanserini indüklediğini göstermiştir. Bunun üzerine FDA 1981 yılında sakkarin içeren ürünlerin potansiyel insan karsinojeni olduğuna dair bir uyarı etiketiyle satılmasına karar vermiştir. Bununla birlikte daha sonrasında, kemirgenlerde kansere sebep olan mekanizmanın insanlardan farklı olduğu ve sakkarin ile ilgili ratlarda görülen karsinojenik etkinin insanlarda geçerli olmadığı ortaya çıkmıştır ve üzerindeki uyarı etiketi kaldırılmıştır (Shankar vd., 2013).



Şekil 2.1. Sakkarinin molekül formülü (C₇H₅NO₃S)

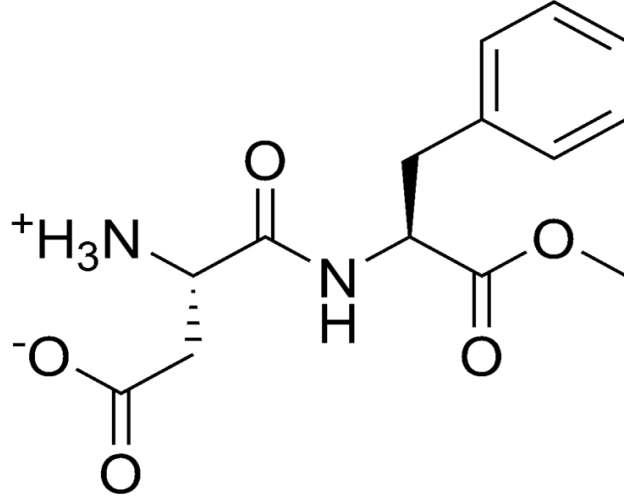
2.2. Aspartam

Aspartam, James Schlatter isimli bir kimyager tarafından bir ülser ilacı üzerinde çalışırken keşfedilmiştir. Aspartik asit ve fenilalanin aminoasitlerinin metil esteridir. 1965'te keşfedilmesine rağmen FDA tarafından 1981'e kadar onaylanmamıştır. Aminoasitlerden yapılmış olduğu için tamamen kalorisiz değildir. Gramı 4 kcal enerji

verir. Aspartam sukrozdan 200 kat tatlıdır. FDA'ya göre insanlarda aspartamın günlük kabul edilebilir alım miktarı 50 mg/kg vücut ağırlığıdır. Sakız, diyet soda içecek karışımları, yoğurt ve puding, hazır çay ve kahve gibi birçok ürünün tatlandırılmasında kullanılır. Pankreastan bir insülin salınımına sebep olmaz.

Molekül formülü Şekil 2.2.'de gösterilen Aspartam, gastrointestinal sistemde fenilalanin, aspartik asit ve metanole metabolize edilir. Aspartamın güvenilirliği hakkında çelişkili raporlar vardır. Endüstri tarafından fonlanan çalışmaların tümü, aspartamın güvenilirliğini teyit etmekte, fakat bağımsız olarak fonlanan çalışmaların %92'si aspartamın sağlık üzerine çeşitli etkileri olabileceğini göstermektedir. Aspartam bugün en yaygın kullanılan ve en tartışmalı yapay tatlandırıcılardan biridir (Shankar vd., 2013).

Hayvan çalışmalarının çoğu aspartamın herhangi bir kanser yapıcı etkisinin olmadığını ileri sürmektedir. Nükleer DNA hasarı çalışmalarının bir kısmı bileşiklerin genotoksik olmadığını desteklemektedir. 1991 yılında yayınlanan bir araştırma, 1980'lerden beri insanlarda beyin tümörlerinin insidansının artışı aspartamın kullanılmaya başlamasıyla ilişkilendirmiştir. Araştırmacılar hipotezlerini 320 rat üzerinde yaptıkları bir çalışmayla desteklemişlerdir. Çalışma bilimsel topluluktan ağır eleştiriler almıştır. Olney ve arkadaşlarının ratlardan elde ettikleri bu sonuçlar, sonraki çalışmalarda doğrulanmamıştır. 1999'da yayınlanan bir başka çalışmada bilim adamları meme kanserindeki artışla aspartam arasında bir bağlantı önermişler fakat bu çalışma da eleştirilere maruz kalmıştır (Weihrauch ve Diehl, 2004) Birkaç çalışma, aspartamın baş ağrıları tetiklediği ile ilgili sonuçlar rapor etmiştir. Hatta aspartamın alzheimer, dikkat eksikliği, doğumsal anomaliler, kanser, diyabet ve lupusa sebep olabileceğini bile düşünenler vardır. Hamile ratlarda aspartamın fetusta nefrotoksik olduğu ve vücut ağırlığını azalttığı kanıtlanmıştır (Shankar vd., 2013). Bir başka çalışmada da aspartam alımının gastrik pankreatik ve endometrial kanserler gibi genel neoplazmların oluşumunda bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Bosetti vd., 2009).

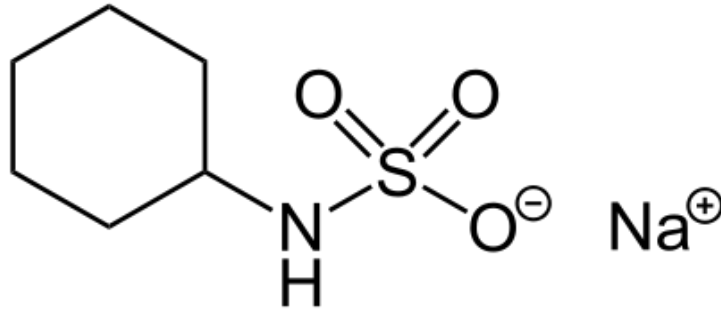


Şekil 2.2. Aspartamin molekül formülü (C₁₄H₁₈N₂O₅)

2.3. Siklamat

1937’de Michael Sveda tarafından keşfedilmiştir. Genellikle sakarinle birlikte tadı arttırmak için harmanlanır. FDA’nın 1958’deki raporunda güvenli olarak tanımlanmasına rağmen 1969’da karsinojenik potansiyeli olduğu gerekçesiyle yasaklanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar siklamat ve kanser arasındaki ilişkiyi çürütmüş ve tekrar satışı serbest bırakılmıştır (Yang, 2010).

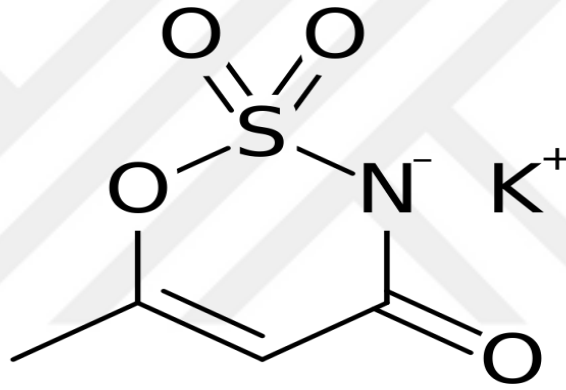
Şekil 2.3.’te molekül formülü verilen Siklamat, vücutta sikloheksilamin adı verilen bir metabolite dönüşür. Rat ve köpeklerde bu bileşiğin testiküler atrofiye ve spermatogenezde sorunlara sebep olduğu gösterilmiştir. Daha sonra maymunlarda yapılan bir çalışmada siklamat grubunda üç hayvan kansere yakalanmış, kontrol bireylerde ise böyle bir durum gözlenmemiştir. Buna rağmen yazarlar, tümörlerin farklı histolojileri ve maymunlarda tümörlerin sıklıkla geliştiği gerekçesiyle sodyum siklamatın karsinojenitesi için bu durumun kanıt olamayacağı yorumunu yapmışlardır (Weihrauch ve Diehl, 2004).



Şekil 2.3. Siklamatın molekül formülü (C₆H₁₂NNaO₃S)

2.4. Acesulfam K

Karl Clauss tarafından 1967'de keşfedilmiştir. FDA kuru gıdalarda kullanımını 1988'de kabul etmiş ve 2003'te de genel bir tatlandırıcı olarak kullanımını onaylamıştır. Sukrozdan 200 kat tatlıdır. Isı ile bozulmadığından pişirilen, fırınlanan ürünlerde de kullanılmaktadır. Kabul edilebilir günlük alınımı 15 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Şekil 2.4.'te molekül formülü gösterilen ve bir organik asit ve potasyumdan oluşan acesulfam K, diğer yapay tatlandırıcılarla daha fazla şeker benzeri tat elde etmek için kombinasyon halinde kullanılabilir. Vücutta metabolize edilemez ve değişmemiş halde böbreklerden atılır. Acesulfam K'nın güvenilirliği konusunda bir uzlaşma söz konusudur (Shankar vd., 2013).



Şekil 2.4. Acesulfam K'nın molekül formülü (C₄H₄KNO₄S)

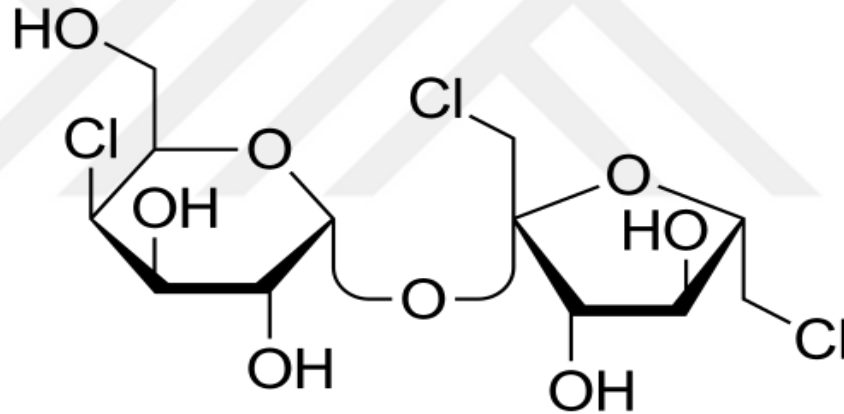
2.5. Sukraloz

Sukrozun 3 hidroksil grubunun klorla yer değiştirmesi yoluyla üretilmiştir ve bu değişiklik tatlılıkta 600 kat artışa sebep olmuştur. 1999'da kullanımı onaylanmıştır. FDA onaylı yapay tatlandırıcılar içerisinde en popülerleri 1500 üründe kullanılan sukralozdur. Bunu 1103 ürünle acesulfam K ve 974 ürünle aspartam takip etmektedir (Yang, 2010).

Molekül formülü Şekil 2.5.'te sunulan Sukralozun tadı normal sofraya şekerine çok benzer ve kullanım sonrası ağızda istenmeyen tat bırakmaz. Yoğun araştırmalar sukralozun güvenilirliği konusunda çok iyi sonuçlar vermiştir ve hamileler ile emziren annelerde kullanımına bile izin verilmiştir. Bu bileşik sukroza benzerliğine rağmen vücut tarafından bir karbonhidrat olarak kabul edilmez ve sindirim sürecinde çok az emilir. Böylece çoğunluğu değişmeden atılır. Isı ile yapısının değişmemesi, yüksek ısı ve asitli ürünlerde

kullanımını arttırmaktadır. Bugün 80'den fazla ülkede tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda karsinojenik ve genotoksik olmadığı anlaşılmıştır. İnsanlarda ve hayvanlarda biyoetkinliği ve biyobirikimi yoktur.

Tüm bu özellikler sukralozun uzun vadeli kullanımda güvenilir olduğu fikrini oluşturmuştur. Fakat yine de bazı negatif etkilere sahip olduğuna dair araştırmalara rastlanmaktadır. Ratlarda yapılan bir çalışmada 12 hafta sukraloz kullanan grupta faydalı bağırsak bakterilerinde anlamlı bir azalma ve bunun sonucunda da kilo alımı gözlenmiştir. Dahası mide-bağırsak sisteminde bazı durum değişiklikleri rapor edilmiştir. Bununla beraber bu sonuçlar bilim dünyasında geniş bir kesim tarafından eleştirilmiş ve çalışmaların güvenilirliği sorgulanmıştır. Sukralozun migren ağrılarını tetiklediğine dair bazı çalışmalara da literatürde rastlanmaktadır. Kanadalılarda iltihabi kolon hastalığının insidansındaki artışın sebebi olarak bağırsak bakterilerini azaltması yoluyla sukralozun sorumluluğunu ileri süren bilim adamları vardır (Shankar vd., 2013).

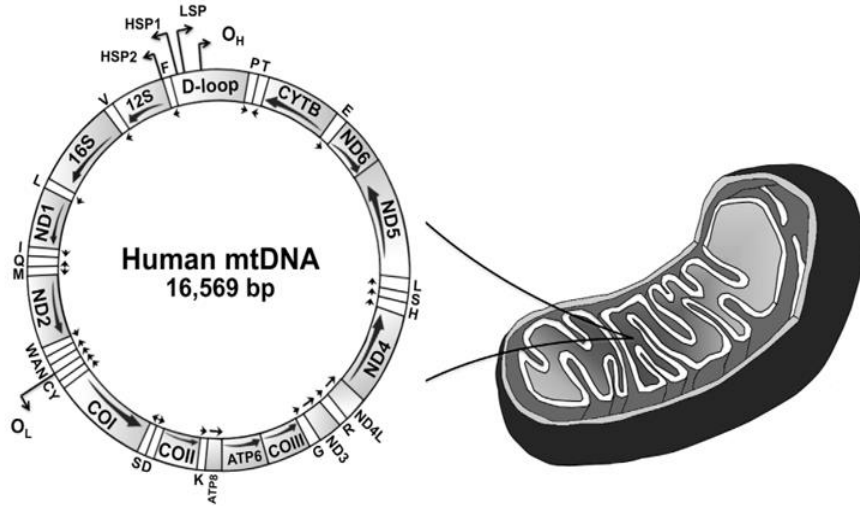


Şekil 2.5. Sukralozun molekül formülü ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$)

2.6. Mitokondrial Genom

İnsanlarda mitokondrial DNA (mtDNA) 16569 baz çiftlik, çift iplikli, kapalı dairesel yapıya sahip bir DNA molekülüdür. 37 gen ihtiva eder. Bu genlerden 13 tanesi mitokondrial elektron taşıma zinciri için gerekli olan polipeptidleri kodlar. 22 tRNA ve 2 tane de rRNA genleri vardır. Her organelde mtDNA molekülünün 2-10 adet kopyası vardır ve her hücrede çok sayıda mitokondri bulunabilir. Mitokondrial DNA'nın iki ipliğinden biri ağır (H), diğeri hafif (L) iplik olarak adlandırılır. Ağır (H) ve hafif (L) iplikler farklı

yönde transkribe edilir, replikasyon orjinleri farklıdır ve farklı ürünler kodlar (Ayhan vd., 2004).



Şekil 2.6. İnsan Mitokondrial DNA'sı genleri, ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri ve promotorları (McKinney ve Oliveira, 2013)

2.7. Mitokondrial DNA Hasarı

Mitokondrial hastalıklar ya mendeliyen ya maternal ya da her ikisinin bir kombinasyonu olarak kalıtılabilir. Aynı mtDNA mutasyonu çok farklı fenotipler ortaya çıkartırken, farklı mutasyonlar benzer fenotipler meydana getirebilir. Patojenik olan mitokondrial DNA mutasyonları hem baz değişimi hem de yeniden düzenleme mutasyonlarının ikisini de kapsar.

Yaşla birlikte mitokondrial DNA mutasyonlarının artması, ilerleyen yaşlarda mitokondrial fonksiyonların azalmasına sebep olur. Somatik mtDNA mutasyonlarına oksidatif hasarın sebep olabileceği düşünülmektedir. DNA'nın lokasyonunun oksidantların olduğu iç mitokondrial membranın yanında olması, mitokondrial DNA'da koruyucu histonlar ve DNA tamir aktivitesinin eksik olması, mitokondrial DNA'daki mutasyonların ve oksidatif hasarın yüksek olmasına sebep olmaktadır. Mitokondrial DNA polimeraz enzimi nükleer kökenlidir. Bu enzimin yanlış eşleşme yapma olasılığı oldukça düşüktür ve 250.000 nükleotidde 1 nükleotiddir. DNA bu kadar yüksek doğrulukta sentezlenmesine rağmen, DNA polimeraz gamma, potansiyel sıcak noktalar (hot spots) olarak bilinen bölgelerde çerçeve kaymasına sebep olur. Homopolimerik bölge olan hotspot'lardan en önemlisi D-Loop bölgesidir. mtDNA mutasyonlarının çoğu D-Loop bölgesinde ve bu bölgenin içindeki D-310 bölgesinde görülür (Ayhan vd., 2004).

Mitokondrial DNA mutasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünölen bir dizi insan hastalıkları vardır. Bu hastalıklar arasında Parkinson, prematüre yaşlanma, kanser, diabetes mellitus, alzheimer, epilepsi, duyma ve görme kaybı, kas ve merkezi sinir sistemini ilgilendiren sendromlar (MELAS, MERF, NARP, LHON, Miyopati) sayılabilir. Manik depresyon gibi bazı bipolar efektif hastalıkların da mtDNA hasarı ile ilgili olduğu düşünölmektedir.

Bazı çalışmalarda kanser hücrelerinde mtDNA mutasyonlarının gerçekleşmiş olduğu görölmüştür. Karaciğer, akciğer, prostat, tiroid, mide, mesane, meme, baş ve boyun, pankreas, oral doku, özefagus, hematolojik malignansilerden lösemi ve lenfomada mitokondrial DNA mutasyonları tanımlanmıştır. Tümör oluşumuyla ilgili olan mutasyonlar, mtDNA'nın kodlayıcı olan ya da olmayan bölgelerine dağılmıştır. Kodlayıcı bölge mutasyonlarının çoğu, kompleks I bölgesinde bulunmuştur. Kodlayıcı olmayan D-Loop bölgesinde de sıcak noktaların varlığı tespit edilmiştir (Ayhan vd., 2004).

Genellikle karsinojenite çalışmalarda, nükleer DNA mutasyonları araştırılmaktadır. Fakat mtDNA'nın karsinogenezdeki rolü ile ilgili kanıtlar arttıkça, mtDNA hasarlarına olan ilgi gittikçe artmıştır. Bu bağlamda potansiyel karsinojenik maddeler için, sadece nükleer DNA hasarı yapıp yapmadığına değil, mtDNA da hasar yapıp yapmadığına da bakılmalıdır. Kanserın bazı tipleriyle, spesifik mtDNA mutasyonlarının ilişkisi kanserin ortaya çıkartılmasında belirleyici olarak kullanılabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Drosophila Kültürleri

Standart mısır unu besi yerinde, 25 °C inkübatörde üretilmiştir. Yapay tatlandırıcılara maruz bırakılacak sinekler için ise, dişi ve erkeklerin çiftleşmesinden hemen sonra dişi sinekler yapay tatlandırıcılı besi yerine alınmış ve böylece deney grubu, larvadan itibaren yapay tatlandırıcı içeren besi yerinde gelişmiştir.

3.2. Oluşturulan Deney Grupları

Normal besi yerine şeker yerine Sakkarin, Acesulfam K, Siklamat, Aspartam ve Sukraloz koyulmuş 5 adet deney grubu ve 1 adet kontrol grubu olmak üzere 6 adet grup oluşturulmuştur. Uygulanan tatlandırıcı miktarları aşağıdaki gibidir:

- Aspartam 72 mg/100 ml
- Na sakkarin + Na siklamat 12,5 mg+125 mg/100 ml
- Na sakkarin 50 mg/100 ml
- Sukraloz 16 mg/100 ml
- Acesulfam K 80 mg/100 ml

Her bir grupta 50 adet sinekle deneye başlanmış, deney sonunda her gruptan 10 adet larva için (3. instar evresi) mtDNA ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.1. Drosophila kültürleri ve bazı deney grupları

3.3. mtDNA Çalışmaları

3.3.1. DNA Çalışmaları İçin Örneklerin Hazırlanması

DNA izolasyonu için SIGMA Gen elute genomic DNA purification kit kullanılmıştır. Buna göre aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1. Larva, 1,5 ml'lik ependorf tüpte, makasla küçük parçalara ayrılır (buz içerisinde)
2. Her tüpe 180 µl Lizis solüsyonu T eklenir
3. Her tüpe 20 mg/ml'lik proteinaz K solüsyonundan 20 µl eklenir
4. Bütün tüpler vortekslenir ve 55°C'da doku tamamen çözülene kadar tutulur (2-4 saat) 4 saatin sonunda örnekler tekrar vortekslenir



Şekil 3.2. DNA izolasyonu, lizat hazırlama aşaması

5. Tüplere 20 µl RNaz A eklenir ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletilir
6. Tüplere 200 µl Lizis solüsyonu C eklenir
7. Bütün tüpler 15 saniye kadar vortekslenir ve karışımın iyice homojen hale gelmesi sağlanır
8. 70 °C'da 10 dakika inkübe edilerek lizat elde edilir.
9. 500 µl kolon preparasyon solüsyonu her bir kolona eklenir ve 12000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek akan sıvı uzaklaştırılır

10. Bağlanma için lizata hazırlamaya yönelik olarak, lizata 200 µl saf etanol eklenir ve 5-10 saniye vortekslenir
11. Geniş ağızlı pipet ucu kullanılarak lizatin 500 µl'si hazırlanan kolona yüklenir ve 9300 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir, kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır
12. 500 µl yıkama solüsyonu kolona yüklenir ve 9300 rpm'de 1 dakika döndürülür, kolon yeni bir toplama tüpüne alınır (ilk yıkama)
13. 500 µl yıkama solüsyonu kolona yüklenir ve 10200 rpm de 3 dakika santrifüj edilir, kolon yeni bir toplama tüpüne alınır (ikinci yıkama)
14. Kolonun merkezine 100 µl elusyon solüsyonu (10 mM Tris-HCl pH: 9, 0,5 mM EDTA) eklenir ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 9300 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır. Bu basamakta DNA kolondan elue edilir.

3.3.2. DNA'nın Ön Kantitasyonu

PCR için her tüpe 5 ng kalıp koyulacağı için, izole edilen DNA ların miktarlarının belirlenmesi gereklidir. Bunun için, çok hassas ölçüm yapılmasını sağlayan Pico Green floresan dsDNA kantitasyon boyası kullanılarak, florimetrede 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapıldı. Standart grafik, 100 ng/ µl'lik λ DNA stoğundan 20, 10, 5, 2,5 ve 1,25 ng/ µl'lik dilusyonlar hazırlanarak belirlendi.

3.3.3. PCR

Her bir 50 µl' lik reaksiyon tüpüne 5 ng kalıp DNA koyulur (Ön kantitasyon sonuçlarına göre seyreltilmiş olan kalıplardan). Reaksiyonun spesifikliğı açısından hot start özellikli bir PCR enzimi olan, Thermo Phire hot start II DNA polimeraz kullanıldı. Reaksiyon karışımına % 4 DMSO eklendi.

100 bp lik kısa fragment için primerler (sonuçları aynı zamanda mtDNA kopya sayısını verir):

11426 5'- TAAGAAAATTCCGAGGGATTCA - 3'

11525 5'- GGTCGAGCTCCAATTCAAGTTA - 3'

10629 baz'lık uzun fragment için primerler ise şunlardır:

1880 5'- ATGGTGGAGCTTCAGTTGATTT - 3'

12508 5'- CAACCTTTTTGTGATGCGATTA - 3'

Termal koşullar uzun fragment için aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

98 °C 1 dakika

98 °C 10 saniye

52 °C 45 saniye

68 °C 5 dakika (uzun amplifikasyonlar için düşük uzama sıcaklıkları tavsiye edilir)

68 °C 5 dakika olarak belirlendi (*Koyu renkle yazılmış olan kısım, asıl döngüdür ve 21 kez tekrarlanır*).

Termal koşullar kısa fragment için aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

98 °C 1 dakika

98 °C 10 saniye

55 °C 45 saniye

72 °C 10 saniye

72 °C 2 dakika

(*Koyu renkle yazılmış olan kısım, asıl döngüdür ve 21 kez tekrarlanır*).

3.3.4. PCR Ürünlerinin Kantitasyonu

PCR'dan sonra, PCR ürünlerinin kantitasyonu için de kuyucuklara 10 µl PCR ürünü, 90 µl TE ve 100 µl Picogreen solüsyonu koyularak, florimetrede 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapıldı.



Şekil 3.3. PCR Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Florimetrik Ölçümü

3.3.5. mtDNA Hasar Miktarının Hesaplanması

Bireydeki hasar miktarının (lezyon frekansı) bulunabilmesi için, Uzun fragment amplifikasyonundan elde edilen sonuç, kısa fragment amplifikasyonuna bölünür. Böylece, bireyin uzun fragment amplifikasyonundan ortaya çıkan sonuçlar, mtDNA kopya sayısı göz önünde bulundurularak normalize edilmiş olur.

3.4. İstatistik

Verilerin istatistiksel analizleri, Minitab Release 13.0 istatistik programı (www.minitab.com/products/minitab) kullanılarak, Mann Whitnet testi ile yapılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Deneyisel çalışmalar sonucu elde edilen relatif amplifikasyon ve mtDNA kopya sayısı değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Düşük relatif amplifikasyon, yüksek mtDNA hasarının göstergesidir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucu, aspartam’ın anlamlı derecede mtDNA hasarı oluşturduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 4.1. Relatif amplifikasyon ve mtDNA kopya sayısı değerleri.

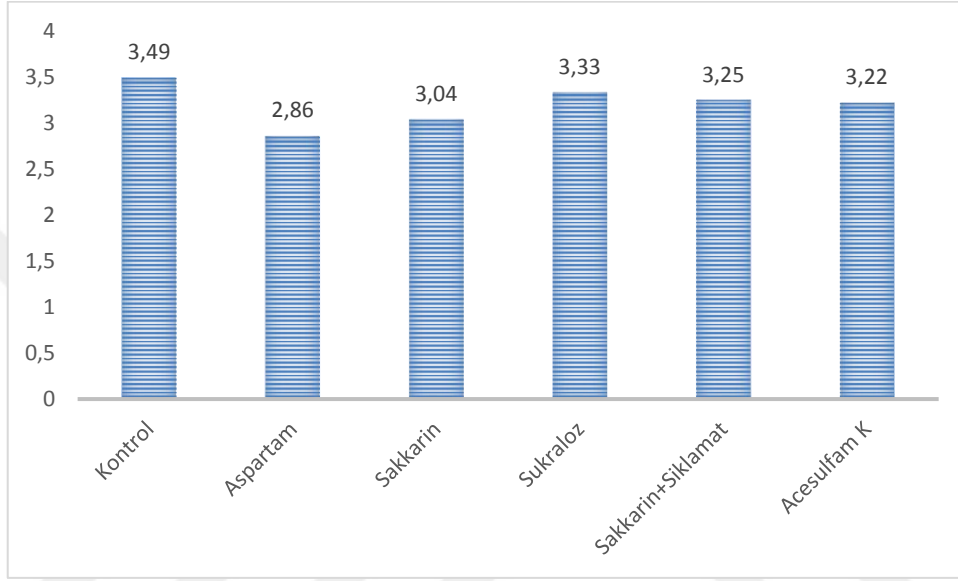
Gruplar	Relatif Amplifikasyon \pm SH	mtDNA kopya sayısı \pm SH
Kontrol	3,49 \pm 0,23	131,2 \pm 5,42
Aspartam	2,86 \pm 0,15*	158,1 \pm 3,88
Sodyum Sakkarin	3,04 \pm 0,15	144,78 \pm 7,05
Sukraloz	3,33 \pm 0,18	147,22 \pm 5,63
Sodyum Sakkarin + Sodyum Siklamat	3,25 \pm 0,10	136,5 \pm 3,78
Acesulfam K	3,22 \pm 0,20	144,2 \pm 4,97

*İstatistiksel olarak kontrol grubundan farklıdır

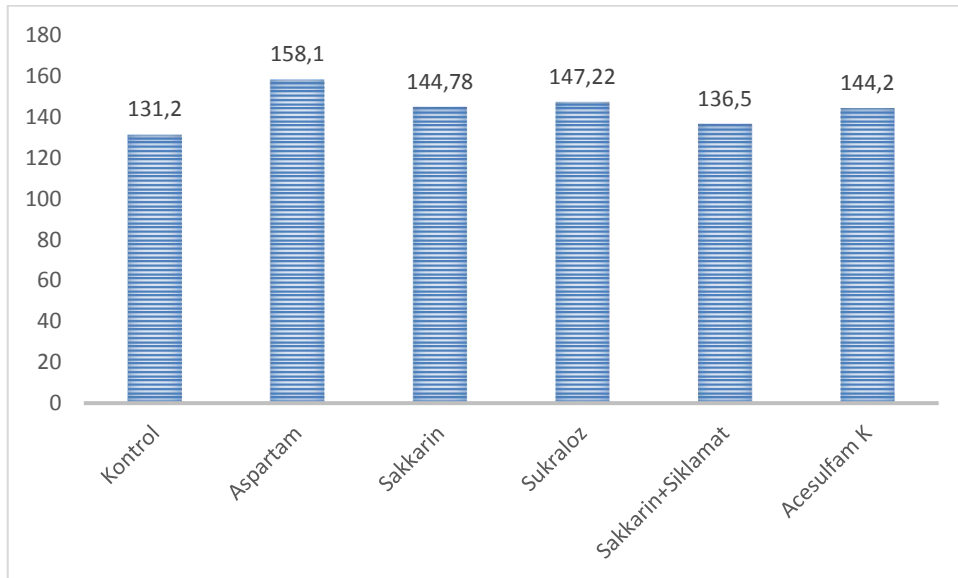
Günümüzde yapay tatlandırıcılar pek çok gıda maddelerine, içeceklere, ilaçlara ve hijyen ürünlerine eklenmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki her bireyin bilerek ya da bilmeyerek bu maddelere maruz kaldığı farz edilebilir. Sakkarin, siklamat ve aspartam gibi birinci nesil tatlandırıcılara artık acesulfam K ve sukraloz gibi yeni nesil tatlandırıcılar eklenmiştir. İnsanların pek çoğu yapay tatlandırıcı kullanımıyla ilgili kafa karışıklığı yaşamaktadır. Bunun sebebi de bu konuyla ilgili sonuçları birbiriyle çatışan bilimsel çalışmalar ve bunların medyaya üstün körü yansıtılmasıdır (Weihsrauch ve Diehl, 2004). Gerçekten de yapay tatlandırıcıların etkileri üzerine yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen ortaya çıkan farklı sonuçlar sebebiyle yapay tatlandırıcıların güvenilirliği bilim dünyasında bile tartışma konusudur.

Bu tez çalışmasının amacı, en çok kullanılan 5 yapay tatlandırıcının mtDNA üzerine etkilerini araştırmaktır. Mitokondri genomunun mutasyonu ile bağlantılı olduğu düşünülen bazı hastalıklar vardır. Bunlar kas ve merkezi sinir sistemini içeren sendromlar, diabetes mellitus, kanser, prematüre yaşlanma, parkinson, alzheimer, epilepsi, duyu kaybı gibi rahatsızlıklardır. Kanserlerin pek çoğunda da mtDNA mutasyonları tesbit edilmiş ve edilmeye devam etmektedir (Ayhan vd., 2004).

Çalışmamızın sonuçlarına göre Aspartam, Drosophila larvalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0,05$) mtDNA hasarı oluşturmuştur. Yapay tatlandırıcı uygulanan diğer gruplardaki mtDNA hasarı seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.1). mtDNA kopya sayısı ise Aspartam uygulanan grupta, diğer gruplara göre artış göstermiş olsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının relatif amplifikasyon grafiği



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının mtDNA kopya sayısı grafiği

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, yapay tatlandırıcıların nükleer DNA (nDNA) üzerine etkileri araştırılmıştır. Literatürde yapay tatlandırıcıların mtDNA üzerine etkileri ile ilgili hiçbir bilgi yoktur.

Jeffrey ve Williams'ın yaptığı çalışmada acesulfam K, aspartam, siklamat, sakarin ve sukraloz nDNA hasarı aktiviteleri açısından ratlarda araştırılmış ve DNA hasarı yapmadıkları sonucuna varılmıştır (Jeffrey ve Williams, 2000). Bir başka çalışmada COMED testinde kemik iliği hücrelerinde aspartam, acesulfam K ve sakkarinin DNA hasarını arttırdığı, bu hasar artışının acesulfam K ve sakkarinde aspartamdan daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla beraber aynı çalışmada yapılan Ames / Salmonella / Microsome testinde hiçbirinin potansiyel mutajen olmadığı ileri sürülmüştür (Bandyopadhyay vd., 2008). Farelerde COMED testi kullanılarak yapılan bir çalışmada siklamat, sakkarin ve sukralozun gastrointestinal organlarda DNA hasarını indüklediği tespit edilmiş, acesulfam K ve aspartamın ise DNA hasarını arttırmadığı sonucuna varılmıştır (Sasaki vd. 2002). Demir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise acesulfam K, aspartam, sakkarin ve sukraloz Drosophila'da COMED testi ile de değerlendirilmiş ve acesulfam K, sakkarin ve sukraloz genotoksik bulunmazken, aspartamın genotoksik etkisi tespit edilmiştir (Demir vd., 2014). Farelerde acesulfamK uygulayarak yapılmış sitogenetik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde düşük dozlarda (15 mg/kg vücut ağırlığı) acesulfam K'nın kromozomal bozukluklara sebep olmadığı, bununla beraber yüksek dozlarda (60, 450, 1100, 2250 mg/kg) klastojenik ve genotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Normal dozlarda değil ama yüksek dozlarda DNA ile etkileşime girebildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu dozlar günlük alım için tavsiye edilen dozlarında oldukça üstündedir (Whitehouse vd., 2008).

Bir bileşiğin DNA hasarı yapıp yapmadığının tespiti, genellikle o bileşiğin karsinojenik olup olmadığına dair şüpheleri doğrulayabilir. Bu bağlamda yapay tatlandırıcıların genotoksitesisi ve karsinojenitesi ile ilgili çalışmalar geçmişten beri yoğun olarak yapılmıştır. 1977'de yayınlanan ve yapay tatlandırıcılarla kanser arasındaki ilişkiyi ilk ortaya atan çalışmalardan biri olan makalede, yapay tatlandırıcıların, özellikle sakkarinin kullanımının erkeklerde mesane kanseri riskini arttırdığı ortaya atılmıştır (Howe vd., 1977). Morrison ve Buring'in yaptığı ve 1980'de yayınlanan çalışmada bunun tersi sonuçlar bulunmuş ve yapay tatlandırıcıların kullanımının alt idrar yolu kanserleri riskini arttırmadığı gösterilmiştir (Morrison ve Buring, 1980). Bu çalışmadan 2 ay sonra yayınlanan bir başka çalışma, mesane kanserinde yapay tatlandırıcıların bir risk olmadığını ileri sürmüştür (Hoover, Strasser, 1980). 1980 yılından yayınlanan bir başka makalede ise

yapay tatlandırıcı kullanımı ile mesane kanseri arasında bir ilişki olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Wynder ve Steliman, 1980).

Sakkarinle yapılan çalışmalar hem pozitif hem de negatif sonuçlar vermiştir. İki jenerasyonlu yapılan çalışmalarda %5 ya da %7,5 oranında sakkarin içeren diyetlere maruz bırakılan gruplarda özellikle erkeklerde mesane kanseri riskinin sıklıkla arttığı görülmüştür. Sakkarin metabolize edilmez, nükleofiliktir, fakat DNA'ya bağlanmaz. Yani tipik bir karsinogen gibi davranmaz. Bununla beraber antibadi üretimini baskıladığı gösterilmiştir. İki nesilli çalışmalar bileşiklerin potansiyel etkilerini araştırmak için faydalıdır. Fakat sakkarinle yapılan çalışmaların çoğu maruz bırakılan tek bir nesli incelemek içindir (Whitehouse vd., 2008).

Weihrauch, derlemesinde ratlarda sakkarinle ilgili yapılmış 50'den fazla çalışmayı incelemiş ve birinci nesil ratların bir çalışma dışında hiçbir grubunda anlamlı derecede daha fazla neoplazmlar gözlenmediğini tespit etmiştir. Bu pozitif çıkan çalışmada kullanılan ratlar, sıklıkla mesane paraziti olan *Trichosomoides crassiconda* içerebildikleri için çalışma sonuçları şüpheli karşılanmıştır. Maymunlarda yapılan çalışmalarda da sakkarinin karsinogenik etkisi gözlemlenmemiştir (Wiehrauch ve Diehl, 2004).

Siklamat metabolize olarak sikloheksilamine dönüştürülür. Bu metabolitin, ratlarda ve köpeklerde testiküler atrofi ve spermatogenezde sorunlara yol açtığı görülmüştür. Maymunlarda yapılan bir çalışmada siklamat grubunda üç tane hayvanda malignansiler görülmüştür. Diğer üçünde de iyi huylu tümörler görülmüş, yazarlar yine de bu durumun sodyum siklamatın karsinogenitesinin bir kanıtı olmadığı yorumunu yapmıştır. Çünkü siklamat grubunda görülen tümörler, farklı organlarda farklı histolojilere sahiptir ve ayrıca maymunlarda tümör görülme sıklığı oldukça yüksektir (Weihrauch ve Diehl,2004).

Normal dozlarda acesulfam K'nın güvenilirliği açısından geniş çaplı bir uzlaşma vardır (Shankar vd., 2013). Sukralozun toksikolojik çalışmaları ise bu molekülün oldukça güvenilir olduğunu göstermiştir. Fakat diğer bazı yapay tatlandırıcılarda olduğu gibi migrene sebep olabileceği ile ilgili tartışmalar vardır (Whitehouse vd., 2008). Sukralozun karsinogenik ve genotoksik olmadığını rapor eden pek çok çalışma mevcuttur (Brusik vd. 2010; Shankar vd. 2013). Bağırsaklardan emilmediği için biyobirikimi ve biyoreaktivitesi yoktur ve uzun vadeli kullanımda güvenli olduğu düşünülmektedir. Fakat bağırsaklardaki faydalı bakterilerin azalmasına sebep olduğu ve bunun sonucunda da kilo alımına sebep olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Shankar vd., 2013). Yapay tatlandırıcıların kilo alımına sebep olduğuna dair çalışmalar olmasına rağmen tam tersi çalışmalar da mevcuttur. Sukroz ve yapay tatlandırıcıların kıyaslandığı bir çalışmada vücut ağırlığı ve yağ kitlesi

açısından sukroz grubunun çok daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir (Raben vd., 2002).

Aspartam en tartışmalı yapay tatlandırıcılardan biridir. Karsinojenik potansiyeli olduğuna dair bazı çalışmalar vardır. Sofritti ve arkadaşlarının 2006'da yaptıkları bu konudaki ilk çalışmalarında, aspartamın ratlarda multipotansiyel karsinojenik etkileri ilk kez deneysel olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada kabul edilebilir günlük alım miktarından daha az bir günlük dozda bile (20 mg/kg vücut ağırlığı) aspartamın bu etkileri gösterdiği gözlemlenmiştir (Soffritti vd., 2006). Sofritti ve arkadaşlarının 2007 yılındaki çalışmaları da bu molekülün, günlük kabul edilebilir alım dozlarına yakın dozlarda karsinojenitesini göstermiştir. Çalışma ratlarda yapılmış ve aspartam uygulanan gruplarda malignant tümörlerin, lenfoma ve lösemilerin, erkek ve dişilerde anlamlı derecede arttığı ve dişilerde meme kanseri insidansının yükseldiği görülmüştür (Soffritti vd., 2007).

Belpoggi ve arkadaşları da 2006 yılında yayınlanan çalışmalarında aspartamın, malignant tümör taşıyan hayvanların insidansında artışa, ayrıca lenfoma ve lösemilerde artışa sebep olduğunu göstermişlerdir (Belpoggi vd., 2006). Aspartamın anjiyogenezi indüklediği ve bu yüzden kanserlerde ve kanser şüphesi olan vakalarda kullanımın arzu edilmeyen sonuçlar ortaya çıkarabileceği de düşünülmektedir (Yeşildal vd., 2015).

2010 yılında yayınlanan bir çalışmada erkek farelerde aspartamın doza bağlı olarak karaciğer ve akciğer kanserlerini indüklediği ortaya çıkarılmış fakat dişi farelerde bu etkiyi göstermediği gözlenmiştir (Soffritti vd., 2010).

Aspartamın dana timusu DNA'sı ile invitro bağlanma çalışmalarında, bu molekülün DNA'ya yüksek bağlanma afinitesi olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlanma interkalatif tipte değildir. Bu etkileşimin daha çok DNA oluşuna bağlanma şeklinde olduğu düşünülmektedir (Kashanian vd., 2013).

AlSuhaibani, yaptığı çalışmada aspartam ile muamele edilen farelerin kemik iliğinde doza bağlı olarak artan kromozom bozuklukları gözlemlemiş, bu aberasyonlar düşük konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken yüksek konsantrasyonda anlamlı bulunmuştur (AlSuhaibani, 2010).

Rencüzoğulları ve arkadaşları, aspartamın sadece yüksek konsantrasyonda kromozom aberasyonlarını ve mikronukleus formasyonunu indüklediği ve mitotik indeksi azaltma yoluyla sitotoksik etkiler gösterdiğini bulmuştur. Salminella, TA98 ve TA100 soylarında mutajenik olmadığı yine aynı çalışmada gösterilmiştir (Rencüzoğulları vd., 2004).

Aspartamın genotoksik, sitotoksik, karsinojenik etkisi pek çok çalışmada gösterilmesine rağmen 2006 yılından önce yazılmış bazı derlemelerde aspartamın zararsız olduğu bildirilmiştir. Weihrauch ve Diehl, 2004 yılında yazdıkları derlemelerinde hayvan çalışmalarının aspartamın yüksek dozlarda bile herhangi bir kanser indükleyici etkisi olmadığını gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Aspartamın gen ekspresyonu üzerinde etkisi olduğuna dair bir çalışma 2007'de yayınlanmıştır. Bu çalışmaya göre aspartam, farelerde özellikle limforetiküler organlar olan kemik iliği ve böbrekte, hem onkogen hem de tümör süpresör gen ifadelerini arttırmaktadır (Gombas vd., 2007).

Aspartamın ratlarda oksidatif stres oluşturduğu, özellikle de karaciğerde lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Yine karaciğer dokusu ve böbrek dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzim aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Redükte glutatyon (GSH) seviyeleri bu farelerde düşerken, glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerinin ise arttığı bulunmuştur (Mourad, 2011).

Aspartamın güvenilirliği hakkında çelişkili ve karışık sonuçlar vardır. Endüstri tarafından fonlanan çalışmaların tümü aspartamın güvenilir olduğunu ortaya koyarken, bağımsız fonlanan araştırmaların %92'si aspartamın sağlık üzerine olumsuz etkileri olduğunu rapor etmiştir (Shankar vd., 2013).

5. SONUÇ

Yapay tatlandırıcıların mtDNA üzerine etkileri daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu tez çalışması bu açıdan bir ilktir. Çalışmamızın sonuçlarına göre Aspartam, *Drosophila* larvalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,05$) mtDNA hasarı oluşturmuştur. Yapay tatlandırıcı uygulanan diğer gruplardaki mtDNA hasarı seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aspartamın mtDNA üzerindeki etkileri metanol aracılığıyla olabilir. Çünkü aspartam vücuda alınıp metabolize edildikten sonra, oluşan metabolizma ürünlerinden biri metanoldür. 2012 yılında yayınlanan çalışmasında Mutlu, metanolün *Drosophila*'da mtDNA hasarını indüklediğini bulmuştur (Mutlu, 2012).

Mitokondride gerçekleşen elektron taşıma sistemi ve oksidatif fosforilasyon olayları ile hücrenin enerjinin çoğu üretilir. Ayrıca mitokondri, apoptozisin merkezi düzenleyicisidir. Memelilerde mitokondri aktivitelerinin düzenlenmesi için gerekli genler, nükleer DNA ve mitokondri DNA'sında toplanmış 1000 kadar genidir. Her bir memeli hücresi, yüzlerce mitokondri ve binlerce mtDNA içerebilir. Hücrede yeni bir mtDNA mutasyonu olduğunda, mtDNA'nın karışık bir hücre içi popülasyonu oluşur ve buna heteroplazmi denir. Mutant mtDNA yüzdesi arttığında, mitokondrial enerjetik kapasite azalır, ROS üretimi artar ve hücrenin apoptozise uğrama olasılığı da yükselir. Mitokondrial fonksiyon kaybına en duyarlı organlar, beyin, kalp, iskelet kası, endokrin sistem ve böbrektir (Wallace, 2002).

Mitokondride nükleotid eksiyon tamirinin bulunmaması, mtDNA'yı mutajenlere daha duyarlı bir hale getirir (Pettepher vd., 1991). Mitokondrial DNA'daki hasarlar, potansiyel olarak, nDNA'daki delesyonlardan daha önemli olabilir. Çünkü mitokondrial genomda intron bölgeler yokken, nDNA'da geniş intron bölgeler vardır. Ayrıca, mtDNA, nDNA'nın aksine, kesintisiz olarak replike olur ve nöronlar ve kardiyomyositler gibi tamamen farklılaşmış hücrelerde bile çoğalmaya devam eder. Bu yüzden somatik mtDNA mutasyonları, hücresel fonksiyonlar üzerinde nDNA mutasyonlarından daha fazla zararlı etkilere sahip olabilir (Liang ve Godley, 2003).

Yapay tatlandırıcılar, gıdalar, içecekler, ilaçlar ve hijyen ürünlerinin büyük kısmına eklenir. Bu sebeple gelişmiş ülkelerde yaşayan her bireyin bilerek ya da bilmeden yapay tatlandırıcılar kullandığı farz edilebilir. Dolayısıyla bu bileşiklerin herhangi birinin toksik bir özelliğinin olması tüm popülasyonda bir sağlık riski oluşturabileceği manasına gelir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre aspartam, *Drosophila* larvalarında mitokondrial DNA hasarı yapmaktadır. Bu durumun toplum sağlığı açısından bir risk oluşturabileceğini

düşünmekteyiz. Dolayısıyla aspartam kullanan insanların, mtDNA hasarı yönünden değerlendirilmesi, insanlar üzerindeki olası toksisitesinin ortaya çıkartılması açısından bir gerekliliktir.



KAYNAKLAR

- AlSuhaibani, E.S., 2010. In vivo cytogenetic studies on aspartame. *Comparative and Functional Genomics*, (605921),1-4
- Ayhan, A., Özkan, A., Fıskın, K., 2004. Mitokondrial DNA ve kanser. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 14, 232-240.
- Bandyopadhyay, A., Ghoshai, S., Mukherjee, A., 2008. Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-k, and saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*, 31, 447-457.
- Belpoggi, F., Soffritti, M., Padovani, M., Esposti, D.D., Lauriola, M., Minardi, F., 2006. Results of long-term carcinogenicity bioassay on sprague-dawley rats exposed to asparta administered in feed. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076, 559-577.
- Bosetti, C., Gallus, S., Talamini, R., Montella, M., Franceschi, S., Negri, E., Vecchia, C.L., 2009. Artificial sweeteners and the risk of gastric, pancreatic, and endometrial cancers in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18 (8), 2235-2238.
- Brusick, D., Grotz, V.L., Slesinski, R., Kruger, C.L., Hayes, A.W., 2010. The absence of genotoxicity of sucralose. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3067-3072
- Demir, E., Turna, F., Aksakali S., Kaya, B., Marcos, R., 2014. Genotoxicity of different sweeteners in drosophila. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(12), 3426-3432.
- Gombos, K., Varjas, T., Orsós, Z., Polyák, E., Peredi, J., Varga, Z., Nowrasteh, G., Tettinger, A., Mucsi, G., Ember, I., 2007. The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. *In Vivo*, 21, 89-92.
- Hoover, R.N., Strasser, P.H., 1980. Artificial sweeteners and human bladder cancer: preliminary results. *The Lancet*, 315, 837-841.
- Howe, G.R., Burch, J.D., Miller, A.B., Morrison, B., Gordon, P., Weldon, L., Chambers, L.W., Fodor, G., Winsor, G.M., 1977. Artificial sweeteners and human bladder cancer. *The Lancet*, 2 (8038), 578-581.
- Jeffrey, A.M., Williams, G.M., 2000. Lack of DNA-damaging activity of five non-nutritive sweeteners in the rat hepatocyte/DNA repairs assay. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 335-338.
- Kashanian, S., Khodaei, M.M., Kheiridoosh, F., 2013. In vitro DNA binding studies of aspartame, an artificial sweetener. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120, 104-110.
- Liang, F.Q., Godley, B.F., 2003. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76 (4), 397-403.

- McKinney E.A., Oliveira M.T., 2013. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 308-315.
- Morrison, A.S., Buring, J.E., 1980. Artificial sweeteners and cancer of the lower urinary tract. *The New England Journal of Medicine*, 302, 537-541.
- Mourad, I.M., 2011. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(6), 678-682.
- Mutlu, A.G., 2012. Increase in mitochondrial DNA copy number in response to ochratoxin A and methanol-induced mitochondrial DNA damage in drosophila. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(6), 1129-1132.
- Pettepher, C.C., LeDoux, S.P., Bohr, V.A., Wilson, G.L., 1991. Repair of alkali labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to nitrosourea streptozotocin. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (5), 3113-3117.
- Raben, A., Vasilaras, T.H., Møller, A.C., Astrup, A., 2002. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (4), 721-729.
- Rencüzoğulları, E., Tüylü, B.A., Topaktaş, M., İla, H.B., Kayraldız, A., Arslan, M., Diler, S.B., 2004. Genotoxicity of aspartame. *Drug and Chemical Toxicology*, 27, 257-268.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519, 103-119.
- Shankar, P., Ahuja, S., Sriram, K., 2013. Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, 29, 1293-1299.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Esposti, D.D., Lambertini, L., Tibaldi, E., Rigano, A., 2006. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to sprague-dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 114(3), 379-385.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Tibaldi, E., Esposti, D.D., Lauriola, M., 2007. Life-span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. *Environmental Health Perspectives*, 115 (9), 1293-1297.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Manservigi, M., Tibaldi, E., Lauriol, a M., Falcioni, L., Bua, L., 2010. Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine*, 53(12), 1197-1206.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal,

- I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514 (7521), 181-186.
- Wallace, D.C., 2002. Animal Models for Mitochondrial Disease. *Mitochondrial DNA Methods and Protocols*, Copeland WC, ed., Totawa, NJ, Humana Press Inc.,pp 3-39.
- Weihrauch, M.R., Diehl, V., 2004. Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology*, 15, 1460-1465.
- Whitehouse, C.R., Boullata, J., McCauley, L.A., 2008. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN Journal*, 56(6), 251-259.
- Wynder, E.L., Stellman, S.D., 1980. Artificial sweetener use and bladder cancer: a case-control study. *Science*, 207 (4436), 1214-1216.
- Yang, Q., 2010. Gain weight by “going diet?” artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 83, 101-108.
- Yeşildal, F., Aydın, F.N., Deveci, S., Tekin, S., Aydın, I., Mammadov, R., Fermanlı, O., Avcu, F., Açikel, C.H., Özgürtaş, T., 2015. Aspartame includes angiogenesis in vitro and in vivo models. *Human & Experimental Toxicology*, 34(3), 260-265.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nesibe KÜRKLÜ
Doğum Yeri ve Yılı : Dört Yol / 1972



<u>Eğitim Durumu</u>	<u>Yıl</u>
Lise : Erzincan Yeşilkent Lisesi	1991
Lisans : Akdeniz Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji	1996
Yüksek Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	Devam

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

- 1- Mutlu AG, Kürklü N. The Effects of Some Artificial Sweeteners on mtDNA.
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Konya.