

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALB/C CİNSİ FARELERDE STEVİOL GLİKOZİD'E
MARUZİYETİN OKSİDATİF HASAR İNDEKS
PARAMETRELERİ, PARAOXONASE VE BAZI GENETİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Şemsi Gül YILMAZ

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aslı UÇAR

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Serkan YILMAZ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
17L0241004 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Balb/c Cinsi Farelerde Steviol Glikozid’e Maruziyetin Oksidatif Hasar İndeks Parametreleri, Paraoxonase ve Bazı Genetik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımda yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Şemsi Gül YILMAZ

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
..... Anabilim Dalında
.....Ad SOYAD..... tarafından hazırlanan
“.....” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1. GİRİŞ	1
1.1. Şeker Alkolleri	4
1.1.1. Sorbitol	5
1.1.2. Ksilitol	6
1.1.3. Eritritol	7
1.1.4. Diğer Şeker Alkolleri	8
1.2. Yapay Tatlandırıcılar	11
1.2.1. Aspartam	12
1.2.2. Asesülfam-K	14
1.2.3. Sakkarin	15
1.2.4. Sükraloz	16
1.2.5. Neotam	17
1.3. Doğal Tatlandırıcılar	18
1.3.1. Stevia	19
1.3.1.1. Tanımı ve Tarihçesi	19
1.3.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	20
1.3.1.3. Biyokimyası ve Metabolizması	21
1.3.1.4. Tüketimi ve Güvenilirliği	22
1.3.1.5. Antioksidan Aktivite	24
1.3.1.6. Karsinojenite	25
1.3.1.7. Toksisite	27
1.3.1.8. Anti-inflamatuar Aktivite	28
1.3.1.9. Diğer Çalışmalar	30
1.4. Genotoksisite	32
1.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Gereç	36
2.1.1. Test Hammaddesi	36
2.1.2. Test Kimyasalları	37
2.1.3. Test Organizması	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Deney Protokolü	38
2.2.2. Etik Kurul Onayı	40
2.2.3. Verilerin Analizi	40
2.2.3.1. Biyokimyasal Analiz	40
2.2.3.1.1. Total Antioksidan Status (TAS) Tayini	41
2.2.3.1.2. Total Oksidan Status (TOS) Tayini	41

2.2.3.1.3. OSİ Hesaplaması	42
2.2.3.1.4. Paraoxonase (PON-1) Tayini	43
2.2.3.1.5. HDL Kolesterol (HDL-K) Tayini	43
2.2.3.1.6. LDL Kolesterol (LDL-K) Tayini	43
2.2.3.2. Genetik Analiz	44
2.2.3.2.1. Numunelerin Hazırlanması	44
2.2.3.2.2. Mitotik İndeks ve Kromozomal Anormalliğin Saptanması	46
2.2.3.2.2.1. Kromozomal Anormallik Testi	46
2.2.3.3. İstatistiksel Analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. Bazı Plazma Lipid Parametrelerine İlişkin Bulgular	48
3.2. Oksidatif Hasar İndeks Parametrelerine İlişkin Bulgular	50
3.3. Genetik Parametrelere İlişkin Bulgular	55
4. TARTIŞMA	60
4.1. SG'nin Plazma Lipid Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	60
4.2. SG'nin Oksidatif İndeks Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	62
4.3. SG'nin <i>İn-Vivo</i> Olarak Genetik Parametreler Üzerine Etkileri	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
ÖZET	75
SUMMARY	76
KAYNAKLAR	77
EKLER	95
Ek 1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Raporu	95
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖNSÖZ

Tatlandırıcılara özellikle doğal tatlandırıcılara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Dünya’da ve ülkemizde stevia ve türevlerinin tüketimi artan ilgi ile paralel bir şekilde değişmektedir. Steviol glikozid de, son zamanlarda bilim dünyasının en dikkat çekici konularından biri olmuştur. Şimdiye kadar steviol glikozid tüketiminin güvenilirliği konusunda ortak net bir kanıya varılmamıştır. Bu çalışma, Türkiye’de de steviol glikozidin hem oksidatif hasar indeks parametreleri hem de genetik parametreler üzerine etkisinin *in-vivo* koşullarda değerlendirilmesi ve yabancı literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırılması açısından önem kazanmaktadır.

Tezimin hazırlanması sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, eğitimin temel unsurlarından birinin şefkat ve sevgi olduğunu öğreten çok değerli hocalarım Doç. Dr. Aslı UÇAR ve Prof. Dr. Serkan YILMAZ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Uzm. Vet. Atilla İŞGÖREN ve Nazlı AYDIN başta olmak üzere tüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve yardımları için Mustafa Sefa KILIÇ’a teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve dualarını hep hissettiğim annem Keziban YILMAZ’a, babam Metin YILMAZ’a, beni bu süreçte yalnız bırakmayan çok değerli Arş. Gör. Beraât AKPINAR’a, ablalarım Fundagül BAYRAM’a ve Gülseren BÜYÜKCİRİT’e teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2.2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
ADI	İnsanda Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
AH	Anormal Hücre
Al	Alüminyum
ANS	Yıllık Beslenme Sempozyumu
AU	Arbitrary Unit
AÜDEHAL	Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı
β	Beta
BHA	Bütilat Hidroksianisol
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CFIA	Kanada Gıda Denetleme Ajansı
C ₂ H ₅ OH	Etil Alkol
dL	Desilitre
DMBA	7.12-dimetilbenz[a]antrasen
DPPH	1-1-difenil 2-pikrik hidroliz
DPX	Depex
DS	Disentrik
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
F	Fragment
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	Demir
Fe ⁺²	Ferröz
Fe ⁺³	Ferrik

G	Gauge
g	Gram
GİS	Gastrointestinal Sistem
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GRAS	Genellikle Güvenli Kabul Edilen
H	Halka Kromozom
HCl	Hidroklorür
HDL-K	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HgA1c	Hemoglobin A1c
HNO ₃	Nitrik Asit
IL-8	İnterlökin-8
İnch	İnç
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri FAO/DSÖ Ortak Uzman Komitesi
K	Potasyum
KA	Kromozomal Anormallik
KCl	Potasyum Klorür
KD	Kromatid Değişimi
kkal	Kilokalori
KtK	Kromatid Kırığı
KVH	Kalp ve Damar Hastalığı
KzK	Kromozom Kırığı
L	Litre
LDL-K	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LD50	%50 Öldürücü Doz
M	Molarite
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
Mİ	Mitotik İndeks
mL	Mililitre
mM	Mili Molarite
mmHg	Milimetre Civa
μmol	Mikromol

N	Azot
Na	Sodyum
NHANES	Amerika Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Taraması
NOAEL	Deney Hayvanlarında Toksik Etki Göstermeyen En Yüksek Doz
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
O ₂	Oksijen
P	Fosfor
PKU	Fenilketonüri
PON-1	Paraoksonaz-1
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
S. mutans	Staphylococcus mutans
SG	Steviol Glikozid
SH	Standart Hata
SOD	Süperoksit Dismutaz
SU	Kardeş Kromatid Birleşimi
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TC	Türkiye Cumhuriyeti
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- α
TOS	Total Oksidan Seviyesi
TPA	12-O-tetradekanoil florbol-13-asetat
U	Ünite
USDA-ERS	ABD Tarım Bakanlığı Ekonomik Araştırma Servisi
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
Zn	Çinko
°C	Santigrat Derece

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Steviol glikozidin kimyasal yapısı	36
Şekil 2.2.	OSİ değeri hesaplama denklemi	42
Şekil 2.3.	OSİ sınıflaması grafiği	42
Şekil 2.4.	Farelerden kemik iliği alınması	45
Şekil 2.5.	Kemik iliği örneklerinin polietilen tüpe alınması	45
Şekil 3.1.	Gruplara ait HDL-K değerleri	49
Şekil 3.2.	Gruplara ait LDL-K değerleri	50
Şekil 3.3.	Gruplara ait TAS değerleri	52
Şekil 3.4.	Gruplara ait TOS değerleri	52
Şekil 3.5.	Gruplara ait OSİ değerleri	53
Şekil 3.6.	Gruplara ait PON-1 değerleri	54
Şekil 3.7.	SG uygulamasıyla fare kromozomlarında gözlenen SU	55
Şekil 3.8.	SG uygulamasıyla fare kromozomlarında gözlenen poliploidi	55
Şekil 3.9.	Gruplara ait anormal hücre yüzde değerleri	57
Şekil 3.10.	Gruplara ait kromozomal anormallik/hücre yüzde değerleri	57
Şekil 3.11.	Gruplara ait mitotik indeks yüzde değerleri	59

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Deney protokolü ve grupların oluşturulması	38
Çizelge 3.1.	Gruplara göre bazı plazma lipid parametreleri	48
Çizelge 3.2.	Gruplara ait TAS, TOS, PON-1 ve OSİ değerleri	51
Çizelge 3.3.	Gruplara ait OSİ sınıflaması	55
Çizelge 3.4.	Steviol glikozid uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan kromozomal anormallikler	56
Çizelge 3.5.	Steviol glikozid uygulanan gruplarda mitotik indeks değerleri	58

1. GİRİŞ

Obezite, diyabet ve metabolik sendrom sıklığındaki artışın şeker ve şeker içeren besinlerin tüketimindeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tappy ve Lê, 2010). İki bin on dört-2015 yılı raporuna göre; ortalama kişi başı yıllık şeker tüketiminin dünyada 23 kg, Türkiye’de 26 kg olduğu belirtilmektedir (TC Şeker Kurumu, 2015). Dünya şeker tüketiminin 2016-2017 yılı için kişi başına yıllık ortalama 23,1 kg olduğu ve her geçen gün arttığı, Türkiye için ise bu değerin 25,2 kg olduğu bildirilmektedir (TC Şeker Kurumu, 2017). Şeker içeren yiyecek ve içecekler, tüketilen öğünün toplam enerji değerini ve glisemik indeksini önemli ölçüde etkilemektedir (Mathias ve ark., 2013 ve Van Wymelbeke ve ark., 2004). Buna ek olarak, yüksek enerjili ve yüksek glisemik indeksli besinlerin fazla miktarda tüketilmesi sonucunda, metabolik ve hormonal değişiklikleri tetikleyen ve vücut yağının depolanmasını artıran yüksek postprandial glukoz düzeyine neden olmaktadır (De la Hunty ve ark., 2006). Dünya’da obezite, diyabet sıklığındaki artış son zamanlarda alternatif arayışlara neden olmuştur. Enerji alımını azaltmak, kan glukozunu kontrol altında tutabilmek amacıyla enerji değeri ve şeker içeriği azaltılmış olan besinlere ilgi artmıştır (Dabelea ve ark., 2007 ve Ogden ve ark., 2006).

Tatlandırıcılar şeker yerine kullanılmak amacıyla üretilmiştir. Bu nedenle enerji alımının azaltılmasında, vücut ağırlığının kaybedilmesinde veya korunmasında ve buna bağlı olarak tip 2 diyabet, obezite ve metabolik sendrom gibi hastalıkların görülme sıklığının azaltılmasında etkili rol oynamakta ve kullanımı her geçen gün artmaktadır (Johnson ve ark., 2009 ve Reyna ve ark., 2003). Bunun yanı sıra, çeşitli besinlerin enerji değerlerinin azaltılması ile tüketiciye besin tüketiminde seçim şansı tanınması, diyabet hastalarına alternatif besinler sunması, diş çürümelerine engel olması bu ilgiyi daha da artırmıştır (Brusick, 2008 ve Nabors ve Gelardi, 2001).

Tatlandırıcı, eşit miktardaki şekerle kıyasla daha fazla tatlılığa sahip olan ve genellikle daha az enerji içeriği bulunan doğal veya yapay kökenli kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (Özdemir ve ark., 2014). Türk Gıda Kodeksi (TGK)’de

tatlandırıcı tanımı ise; “Diğer gıda katkı maddeleri ve/veya gıda bileşenlerini içerebilen ve son tüketiciye şeker ikamesi olarak satışı amaçlanan izin verilmiş tatlandırıcı preparatlarını ifade eder” şeklinde tanımlanmaktadır (TGK, 2013). Tatlandırıcılar gıda katkı maddeleri arasında en çok tartışılan maddeler olmuştur.

Tatlandırıcıların ilk defa kıtlık zamanlarında şeker alternatif olarak kullanılmaya başlandığı, daha sonra besin endüstrisinde ise maliyeti düşürmek için kullanıldığı bildirilmektedir. Tarihi kayıtlara göre ilk tatlandırıcının bal olduğu düşünülmektedir. Zamanla bala alternatif olarak şeker kamışından elde edilen sükroz kullanılmaya başlanmıştır (Nabors ve Gelardi, 2001). Bilim ve teknolojideki gelişmeler sonucunda tatlı tadının alınabileceği doğal ve yapay pek çok madde keşfedilmiş ve kullanılmıştır. Yapay tatlandırıcılar sınıfında ilk kullanılan tatlandırıcı sakkarin olup bunu aspartam ve siklamat izlemiştir (Weihrauch ve Diehl, 2004).

Tatlandırıcılar yaygın olarak çeşitli besin ve ürünlerde kullanılmakta ve tüketimi giderek artmaktadır (Sylvetsky ve Rother, 2016). Tatlandırıcıların tüketimi ile ilgili yapılan en geniş çaptaki çalışmada 1970 ile 2009 yıllarını kapsayan USDA-ERS (United States Department of Agriculture Economic Research Service-ABD Tarım Bakanlığı Ekonomik Araştırma Servisi) ve NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey-Amerika Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Taraması) veri tabanları kullanılmıştır. Çalışmaya göre; 1970 yılında tatlandırıcıların günlük enerji alımına katkısı 410 kkal iken 2009 yılında bu oran % 1,3 artarak 622 kkal değerine ulaşmıştır (Carden ve Carr, 2013). NHANES verileri kullanılan başka bir çalışmada 2003 ile 2010 yılları arasında Amerikan popülasyonunda tatlandırıcı tüketimleri değerlendirildi. Tatlandırıcı içeren içecek tüketimi 2003-2004 yıllarında yetişkinlerde %21,1, çocuklarda %7,8 olarak bulunmuştur. Fakat 2009-2010 yılları arasında bu oranlar yetişkinlerde %24,9’a, çocuklarda ise %18,9’a yükseldiği belirtilmiştir (Piernas ve ark., 2013).

Tatlandırıcılar en çok tartışılan gıda katkı maddeleridir. Genel olarak güvenli kabul edilseler de, son 20 yılda tatlandırıcıların tüketiminde görülen ciddi artış; kan

glukoz ve lipit değerlerini etkileme, insülin direnci, karaciğer yağlanması, sinir sistemi ve üreme sistemi üzerine etkileri, kanser, mutajenite, hepatotoksite ve genotoksisite başta olmak üzere çeşitli sağlık endişelerini de beraberinde getirmektedir (Bergamo ve ark., 2011).

TGK’nde tatlandırıcılar gıda katkı maddesi sınıfında olup; “Bir tatlandırıcının, şeker ilavesiz bileşik gıda, enerjisi azaltılmış bileşik gıda, düşük kalorili diyet amaçlı bileşik gıda, dişlerin çürümmesine neden olmayan bileşik gıda ve raf ömrü uzatılmış bileşik gıdada bulunmasına; bu bileşik gıdanın bileşenlerinden birinde kullanılabilmesi şartıyla izin verilir.” ibaresi yer almaktadır (TGK, 2013).

İdeal bir tatlandırıcıda bulunması gereken özellikler; şekerle eş değer tat sağlaması, renk ve koku içermemesi, suda çözünebilir olması, asidik ve bazik koşullara ve ısı işleme karşı dayanıklı olması, raf ömrü boyunca stabilitesini koruması şeklinde sayılabilmektedir (İnanç ve Çınar, 2009). Ayrıca ideal bir tatlandırıcı, toksik madde içermemeli, ürün içerisindeki bileşenlerle tepkimeye girmemeli ve vücutta birikime uğramadan kolayca metabolize olabilmeli ve atılabilmelidir. Bir tatlandırıcının besinlerde kullanılabilmesi için insan sağlığı açısından herhangi bir tehlikesinin olmadığı bilimsel olarak kanıtlanmış olması gerekmektedir (Brusick, 2008). Tatlandırıcıların maliyetinin düşük olması ve ürüne ekstra maliyet getirisi oluşturmaması, depolama ve nakliye işlemlerinin kolaylığı istenen diğer özellikler arasında bulunmaktadır (Nabors, 2002).

Tatlandırıcılar birçok şekilde sınıflandırılabilir. İçeriğinde enerji bulundurma durumuna göre “nutritive” (besleyici) veya “enerjisi azaltılmış” tatlandırıcılar ve “non-nutritive” (besleyici olmayan) veya diğer bir adıyla “enerji içermeyen” tatlandırıcılar olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Kroger ve ark., 2006 ve Özdemir ve ark., 2014). Nutritive tatlandırıcılar (şeker ve fruktoz) besinlerde doğal olarak bulunmaktadır (Fitch ve Keim, 2012). Diğer yandan, non-nutritive tatlandırıcılar (aspartam, stevia ve şeker alkolü) ticari olarak üretilmektedir (Gardner ve ark., 2012). Ancak şeker alkolüleri, yapay tatlandırıcılar ve doğal tatlandırıcılar olmak

üzere 3 grup altında yapılan sınıflama en çok tercih edilen sınıflama şekli olmuştur (ADA, 2004).

Aşağıda bu sınıflamaya göre tatlandırıcıların özellikleri açıklanmıştır.

1.1. Şeker Alkolleri

Şeker alkolleri veya diğer bir adıyla polioller, kimyasal olarak bir keton veya aldehit grubunun bir hidroksil grubuyla yer değiştirmesi sonucu oluşan sakkarit türevleri olarak tanımlanmaktadır (Zumbé ve ark., 2001). Molekülün içinde bulunan mevcut sakkarit birimlerinin sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Bu grupta sorbitol, mannitol, ksilitol, maltitol ve laktitol yer almaktadır. Sorbitol, mannitol ve ksilitol sırasıyla glukoz, mannoz ve ksilozdan türetilen monosakaritlerdir (Dills, 1989 ve Wheeler ve ark., 1990). Doğal olarak bazı meyve ve sebzelerde az miktarlarda bulunmaktadır. Ticari olarak glukoz, mannoz ve ksilozun hidrojenasyonu yöntemi ile üretilmektedirler (Langkilde ve ark., 1994). Maltitol ve laktitol sırasıyla maltoz ve laktozun hidrojenasyonundan üretilen disakkaritlerdendir (Würsch ve ark., 1989). Polioller vücutta tamamen metabolize edilemediğinden şeker ve diğer karbonhidratların ortalama yarısı kadar (~2 kkal/g) enerji sağlamaktadırlar (CFIA, 2017). Sorbitol gibi bazı poliollerin midede gaz başta olmak üzere çeşitli rahatsızlıklara neden olduğu bilinmektedir. Hatta yüksek miktarlarda (20-50 g/gün) tüketilmesi durumlarında bazı insanlarda ishale neden olabilmektedir. Bu nedenle poliollerin içeriği yüksek besinlerin paketleri üzerinde "Fazla tüketimi laksatif etki gösterebilir" ifadesi bulunabilmektedir (Asif, 2013).

1.1.1. Sorbitol

Sorbitol, doğal olarak birçok meyvede (özellikle dut, çilek, böğürtlen vb. gibi) bulunan 6 karbonlu bir şeker alkolüdür. Üreticiler için maliyeti çok yüksek olmasına

rağmen sorbitol; sakız, çikolata, kek, kurabiye gibi çeşitli besin maddelerinde, diş macunu, bazı ağız temizleme sıvıları ile ilaçlarda kullanılmaktadır (Asif, 2013). Avrupa Birliği (AB) tarafından gıda katkı maddelerini belirlemek için kullanılan E kodu sorbitol için E 420 ile gösterilmektedir (Leclercq, 1999).

Sorbitolün tatlılık derecesi sükrozun yarısı kadardır (Asif, 2013). İnce barsaktan absorpsiyonu (emilimi) ortamda glukoz varlığına göre artmakla birlikte, yaklaşık %50-70 oranındadır. Sorbitol insan barsağından en fazla emilen şeker alkolü olma özelliği taşımaktadır (Langkilde ve ark., 1994). Sorbitolün 1 gram'ı 2,6 kkal enerji değerine sahiptir (CFIA, 2017).

Diyabet hastaları tarafından sorbitolün tüketilip tüketilmemesi konusu hala tartışmalıdır (Duffy ve Anderson, 1998 ve Wolever ve ark., 2002). Ancak sorbitolün sağladığı enerji ve emilim oranı göz önünde bulundurularak, özellikle Tip 2 diyabet hastalarında 10 g/gün altında tüketilmesinin kontraendike olmadığı belirtilmektedir (Franz ve ark., 20002).

Sorbitol non-karsinojenik olarak kabul edilmektedir. *Staphylococcus mutans* (S. mutans) tarafından asidik ortamda fermente edilmektedir (Asif, 2013). Yapılan bir araştırmada, 17 sağlıklı yetişkin bireyin 25 gün boyunca 35 g/gün dozda sorbitol kullanması durumunda; hafif karsiojenik potansiyel etki görüldüğü, tükürük bezi işlevini azalttığı, normal olarak diş plaklarının oluşumunu desteklediği ve mutans streptokokların büyümesine neden olduğu gösterilmiştir (Wennerholm ve ark., 1994). Bununla birlikte sorbitolün özellikle dişlerde remineralizasyonu artırıcı etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Creanor ve ark., 1992).

Sorbitol, gastrointestinal sistemden (GİS) kolayca sindirilememekte ve absorbe edilememektedir. Bu nedenle yüksek miktarlarda (20-50 g/gün) tüketildiğinde potansiyel bir yan etki olarak diareye neden olduğu bildirilmektedir (Hyams, 1983). Sorbitol tüketiminin GİS'de yalnızca diare değil abdominal distansiyon, karın ağrısı ve barsaklarda gaz üretiminin artmasına da neden olduğu belirtilmektedir (Kajs ve

ark., 1997). Yapılan bir çalışmada 20 g/gün sorbitol tüketiminde diare gözleendiği, malabsorbsiyon görülme durumunun doz artışıyla paralel olduğu ve en yüksek dozda (20 g/gün) GİS şikâyetlerinin arttığı belirtilmektedir. Sorbitol tüketiminin 10 g/gün ile sınırlandırılması durumunda bu GİS şikâyetlerinde üçte bir oranında azalma olduğu bulunmuştur (Vernia ve ark., 1995).

1.1.2. Ksilitol

Ksilitol, doğal olarak oluşan beş karbonlu fermente edilemeyen bir şeker alkolüdür. İlk defa 1890 yılında huş cinsi ve diğer sert ağaçlarda, buğday ve yulaf samanında bulunmuş olup, 1891 yılında çeşitli meyve ve sebzelerde de doğal olarak bulunduğu keşfedilmiştir (Hildebrandt ve Sparks, 2000). Ksilitolün sınırlı miktarda kullanımı 1986 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA- U.S. Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (Wolever ve ark., 2002). Ksilitol bulunduğu besinlerin etiketinde E 967 kodu ile gösterilmektedir (Leclercq, 1999).

Ksilitol sükroz gibi tatlı ve hoş bir tada sahiptir fakat üretim maliyeti nispeten daha yüksektir. Ksilitol tüketildiğinde 2,4 kkal/g enerji vermektedir (Wolever ve ark., 2002). Bu nedenle kan glukozunu artırıcı etkisi bulunmaktadır (Isokangas ve ark., 1991). Ksilitol başlıca sakızlarda, nane veya mentollü şekerlerde ve diş macunlarında kullanıldığı gibi tablet şeklinde de bulunmaktadır (Hayes, 2001). Çalışmalar, ksilitol içeren sakızların düzenli kullanılmasının diş plağı miktarında ve *S. mutans* düzeylerinde belirgin bir azalma sağladığını bununla birlikte tükürük üretiminde de artışa neden olduğunu belirtmektedir (Autio, 2002; Hayes, 2001 ve Isokangas ve ark., 1991). Diş hassasiyeti şikâyeti olan bireylerde ksilitol içeren sakızların düzenli çiğnenmesinin diş çürüklerini azalttığı ve çürük lezyonlarında remineralizasyonu sağladığı bildirilmektedir (Mäkinen ve ark., 1995 ve Mäkinen ve ark., 1996). Ksilitolün aynı zamanda, periodontal patojen bakteriler grubunda yer aldığı kabul edilen ve diş eti hastalıklarına neden olan *Porphyromonas gingivalis*'i inhibe ettiği gösterilmiştir (Han ve ark., 2005). Bu nedenlerden dolayı, ksilitolün düzenli kullanımının, periodontal hastalıklar ve diş eti iltihaplanmasını önlenmede güçlü bir

yardımcı olabildiği kabul edilmektedir (Mäkinen, 2000). Yapılan çalışmalarda ksilitolün kloleksadin ve florür tedavileri ile kıyaslandığında anneden bebeğe karsinogenik bakteri bulaşma riskini düşürdüğü ve gündüz bakım merkezlerindeki çocuklarda enfeksiyon görülme sıklığını azalttığı belirtilmiştir (Mäkinen ve ark., 2001 ve Söderling ve ark., 2001). Bununla birlikte, aşırı ksilitol kullanımı, diare ile sonuçlanan Crohn hastalığı ve irritabl barsak sendromunun semptomlarını ağırlaştırabilmektedir (Asif, 2013; Ludwig ve ark., 1984 ve Newberne ve ark., 1988). Ksilitolün 50 g/gün üzerinde tüketilmesi durumunda tolerasyonun zorlaştığı, bununla birlikte özellikle GİS şikâyetlerinde artışa neden olduğu belirtilmektedir (Bonnema ve ark., 2016).

1.1.3. Eritritol

Dört karbonlu bir şeker alkolü olan eritritol; sorbitol, mannitol ve ksilitol gibi diğer şeker alkollerini ile benzer özelliklere sahiptir. Glukozun fermantasyonu ile başlayan bir dizi işlem sonucu oluşmakta; kavun, armut ve mantar başta olmak üzere çeşitli sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunmaktadır (Park ve ark., 2016). Eritritol eklenen besinlerin etiketinde E 968 kodu bulunmaktadır (Leclercq, 1999).

Suda çözünmeyen eritritol, sükrozla kıyaslandığında % 60-80 oranında tatlılığa sahiptir. Eritritolün enerji değeri diğer şeker alkollerini ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Gramı başına 0.2 kkal enerji vermektedir ve bu değer sükrozun enerji değerinin 0,05'ine denktir (CFIA, 2017). Eritritol, Japonya'da 1990 yılından bu yana şekerlemeler, alkolsüz içecekler, sakızlar, reçeller ve yoğurtlarda kullanılmaktadır. FDA tarafından 1997'de GRAS (Generally Recognized As Safe-Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen) listesine alınmıştır (Asif, 2013). Yapılan bir çalışmada eritritolün 35 g/gün üzerinde alınması durumunda şişkinlik, gaz ve diare gibi istenmeyen yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Bonnema ve ark., 2016). Diğer çalışmalarda ise; eritritolün 50 g/gün kadar alındığında tolerasyonunun iyi olduğu fakat hafif mide bulantısına ve GİS'te gurultuya yol açtığı, bununla birlikte 20-35 g/gün dozunda alındığında herhangi bir yan etki görülmediği belirtilmektedir (Flint ve

ark., 2014 ve Lee ve ark., 2002). Genel öneri ise; eritritolün 35 g/gün dozundan daha az alınması şeklindedir. Bu miktarın üzerinde alımı hem çocuklarda hem de erişkinlerde ishali tetiklemektedir (Munro ve ark., 1998).

Eritritol, ısıya dayanıklıdır. Bu nedenle düşük karbonhidratlı ve/veya enerjili diyetlerde ısıl işlem gerektiren besinlerde sıklıkla tercih edilmektedir. İnce barsaklardan neredeyse tamamen emilmekte ve 24 saat içinde idrarda metabolik olarak değişime uğramadan atılmaktadır. Eritritolün tamamen metabolize olması ve emilmesi diğer poliollerden farklı olarak diareye neden olmamasını sağlamaktadır (Munro ve ark., 1998). Mäkinen ve arkadaşları (2005) eritritolün toksik olmadığını, kanserojen etkiler göstermediğini ayrıca diyabet hastaları tarafından da tüketilmesinin güvenli olduğunu bildirmektedirler. Aynı zamanda, eritritolün düzenli kullanımının, diş plaklarında ve tükürükte *S. mutans* düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Mäkinen ve ark., 2005).

1.1.4. Diğer Şeker Alkolleri

Diğer şeker alkolleri grubu altında laktitol, maltitol ve mannitol ele alınmıştır. Bu şeker alkolleri besinlerde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, insanlarda metabolik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar sınırlıdır (Shankar ve ark., 2013).

Laktitol; laktozun hidrojenasyonu sonucunda üretilen, kimyasal yapısı laktozla benzerlik gösteren, disakkarit bir şeker alkolüdür (Würsch ve ark., 1989). Laktitol, sükroza göre %30-40 tatlılık derecesine sahip olup, 2 kkal/g enerji değeri bulunmaktadır (Özdemir ve ark., 2014). İnce barsaklarda tamamen sindirilememeleri nedeniyle ozmotik etki oluşturmakta, suyun barsaklar tarafından çekilmesine ve gaitanın yumuşak olmasına hatta diare görülmesine neden olmaktadır. Sindirilmeyen materyalin kolondaki bakteriler tarafından fermentasyonu sonucunda karında şişkinlik ve gaz gibi yan etkiler de görülebilmektedir (Wiebe ve ark., 2011).

Laktitolün GİS şikâyetleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çift kör randömize kontrollü bir çalışmada, 18-24 yaş arası 50 bireye 20 g sükröz ve 20 g laktitol verilmiştir. Çalışma sonunda, laktitol tüketen grubun gaz, gurultu ve diare şikâyetlerinin sükröz grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir (Lee ve Storey, 1999). Laktitolün diyabet hastalarında kullanımının güvenli olduğu belirtilmiştir (ADA, 2004). Obez olmayan sekiz sağlıklı erkek bireyde laktitol ve ksilitolün plazma insülin, glukoz ve C-peptid düzeylerindeki değişimleri ve aynı zamanda karbonhidrat ve lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 3 farklı gruba 25 g/gün olacak şekilde sırasıyla laktitol, ksilitol ve glukoz verilmiştir. Laktitol ve ksilitol verilen gruplarda glukozla göre plazma insülin, glukoz ve C-peptid düzeylerinde daha az yükselme olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,02$) olduğu belirtilmiştir. Laktitol ve ksilitol grupları arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca çalışmada, gruplar arasında karbonhidrat ve lipid peroksidasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmadığı ve diyabet hastalarında laktitolün güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir (Natah ve ark., 1997). Laktitol içeren besinlerin etiketinde E966 kodu bulunmaktadır (Leclercq, 1999).

Bir diğer şeker alkolü olan maltitol; maltozun hidrojenasyonundan üretilen ve kimyasal yapısı maltoza benzeyen, disakkarit yapıda bir şeker alkolüdür (Würsch ve ark., 1989). Maltitol doğal bir şekilde besinlerde bulunmamaktadır. İnce barsaklardan çok az miktarda emilmekte olup, idrarla atılmaktadır (Langkilde ve ark., 1994). İlk olarak Japonya’da kullanılmış olan maltitol düşük karsinojeniteye sahip bir tatlandırıcı olarak kabul edilmektedir (Birkhed ve ark., 1979). Sükröze göre %90 tatlılık derecesine sahip olup, 2,1 kkal/g enerji vermektedir (Özdemir ve ark., 2014). Maltitolün kan şekerini ve insülin sekresyonunu önemli ölçüde artırmadığı ve bu nedenle Tip 2 diyabet hastalarında güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir (Azami, 2000). Maltitol ilk olarak, sükröz içeren besinlerin dış plakasında asit üretimini artırması nedeniyle sükröz yerine tercih edilebilir bir tatlandırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra *Streptococcus mutans* tarafından fermente edilemediği ve bu özelliği ile ksilitole alternatif bir tatlandırıcı olacağı düşünülse de, *Lactobacillus* bakterileri tarafından fermente edildiği bulunmuş ve popülaritesini kaybetmiştir (Edwardsson ve ark., 1977 ve Haresaku ve ark., 2007). Laktitol ve maltitolün GİS

intolerasyonlarını değerlendirmek amacıyla yapılan çift kör randömise kontrollü bir çalışmada, 18-24 yaş arası 59 gönüllü birey ele alınmıştır. Bireylere her birinden 30'ar ve 40'ar g olacak şekilde laktitol, maltitol ve sü kroz eklenmiş 100 g sü tlü çikolata verilmiştir. Çalışma sonucunda, 30 g ve 40 g laktitollü çikolata tüketen bireylerde midede gaz oluşumu, gurultu, diare ve kolik semptomlarının sü kroza göre anlamlı olarak daha fazla görü ldü ğü ve ağır seyretti ği belirtilmiştir ($p=0,01$). Maltitol içeren çikolataların laktitole göre daha az intolerasyona neden oldu ğu ve daha hafif seyretti ği bildirilmiştir. Ayrıca maltitolün her iki dozunun da diareye neden olmadı ğı ve semptomlarının sü kroza benzer oldu ğu belirtilmiştir (Koutsou ve ark., 1996). Maltitol bulundu ğu besinlerin etiketinde E965 kodu ile gösterilmektedir (Leclercq, 1999).

Di ğer bir şeker alkolü mannitol; bakteri, maya, mantar ve bitkilerde yaygın olarak bulunan, fruktoz türevi, 6 karbonlu bir şeker alkolü dür (Song ve Vieille, 2009). Mannitol, sü kroza göre %50-70 tatlılık derecesine sahip olmakla birlikte, 1,6 kkal/g enerji de ğerine sahiptir (Özdemir ve ark., 2014). Di ğer şeker alkollerinde de oldu ğu gibi şekerleme, sakız, çikolata, dondurma, dondurulmuş besin, aromalı reel, jöle, fırınlanmış besin ve sü tlü tatlı başta olmak üzere birçok besinde, diyabetik ürünlerin o ğunda ve bazı ilaçlarda kullanılmaktadır (Kuitunen ve ark., 2002). Metabolize edilemeyen mannitol, ince barsaklardan çok az emilmektedir. Kan şekerini oldukça yavaş yükseltti ği, yani çok düşük glisemik indekse sahip oldu ğu ve bu nedenle diyabet hastalarının rahatlıkla kullanabilece ği belirtilmiştir (Pasha ve ark., 2002). Tip 1 diyabetli 26 ocuk ve sa ğlıklı 24 ocuk üzerinde yapılan bir çalışmada, çocuklara 5 hafta boyunca 4 g/gün mannitol oral olarak verilmiştir. Diyabetli gruptaki çocuklarla kontrol grubu arasında barsak permeabilitesi açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca diyabet grubundaki çocuklarda çalışma öncesine göre insülin sekresyonu ve kan glukoz düzeyleri açısından istatistiksel bir fark bulunmadı ğı bildirilmiştir (Kuitunen ve ark., 2002). Mannitolün bir di ğer özelli ği, a ğızda bulunan bakteriler tarafından metabolize edilemedi ği için diş plaklarında herhangi bir negatif etkiye neden olmamasıdır (Kearsley ve Deis, 2006 ve Wisselink ve ark., 2002). Mannitolün ayrıca non-karsinojenik oldu ğu ve bununla birlikte oksidatif hasara karşı korumada antioksidan rol oynadı ğı belirtilmektedir (Song ve Vieille, 2009). Mannitol tüketiminin 20 g/gün üzeri olması durumunda diareye neden olabilece ği belirtilmiştir

(ADA, 2004). Mannitol içeren besinler etikette E421 kodu ile gösterilmektedir (Leclercq, 1999).

1.2. Yapay Tatlandırıcılar

Tanımı gereği, çok düşük enerjili tatlandırıcılar, non-nutritive tatlandırıcılar, kalorisiz tatlandırıcılar veya yoğun tatlandırıcılar olarak da adlandırılan yapay tatlandırıcılar, sükroza göre gram başına daha yüksek tatlılık derecesine sahiptirler (Gardner ve ark., 2012). Bu nedenle besinlere daha düşük miktarlarda eklenmektedirler, dolayısıyla bulundukları besinlerin enerji değerini az ya da hiç denebilecek kadar düşük düzeyde etkilemektedirler (Duffy ve Anderson, 1998). Bundan dolayı yapay tatlandırıcılar, şeker içermeyen, şeker azaltılmış olan veya düşük enerjili diyet ürünlerinde, yoğurtlarda, tatlılarda ve sakızlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Özdemir ve ark., 2014). Besin sanayiinde sıklıkla karışım şeklinde veya şekerle birlikte kullanıldığı görülmektedir. Bunun nedeni ise; bazı yapay tatlandırıcıların ağızda bıraktıkları arzu edilmeyen aromayı gidermek veya lezzeti daha kabul edilebilir hale getirmektir (Mattes ve Popkin, 2009).

Tatlandırıcıların tüketim önerileri verilirken sıklıkla kullanılan terimlerin başında ADI (Acceptable Daily Intake-İnsanda Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) gelmektedir. ADI, bir kişinin bir madde için yaşamı boyunca risk almadan güvenle tüketebileceği gün bazındaki ortalama miktarı tanımlamaktadır ve genellikle mg/kg/gün cinsinden ifade edilmektedir (ADA, 2004). ADI, hayvan deneylerinde herhangi negatif etki gözlenmeyen maksimum dozun 1/100'i kadardır. Gıda katkı maddelerinin besinlerde kullanım miktarları, ADI değerini aşmayacak biçimde ayarlanmaktadır (Kroger ve ark., 2006).

FDA mevcut verileri değerlendirerek, yapay tatlandırıcılar grubunda yer alan yalnızca beş tatlandırıcıyı "gıda katkı maddeleri" sınıfı altında GRAS listesine alınmasını onaylamıştır. Bunlar: aspartam, asesülfam potasyum (asesülfam-K), sakkarin, sükraloz ve neotame'dır (Asif, 2013).

1.2.1. Aspartam

Kokusuz, yoğun tatlı, beyaz kristal toz şeklinde bulunan aspartam, düşük enerjili ve/veya şeker içermeyen besinlerde en sık kullanılan yapay tatlandırıcıdır (Abdel-Salam ve ark., 2012 ve Magnuson ve ark., 2007). Doğal olarak bulunmayan aspartam, kimyasal adı ile L-aspartil-L-fenilalanin metil ester, 1965 yılında James Schlatter tarafından keşfedilmiş olup, 1981'de FDA tarafından gıdalarda kullanımı onaylanmıştır (Magnuson ve ark., 2007). Bir metanol molekülünün (%10) fenilalanin (%50) ve aspartik asit (%40) amino asitleri ile bağlanması sonucu oluşan bir tatlandırıcıdır (Humphries ve ark., 2008). Aspartam, yoğurt, düşük alkollü içecekler, bazı ilaçlar gibi 6000'den fazla üründe kullanılan ve dünya çapında 200 milyondan fazla insan tarafından tüketilen bir bileşiktir (Abdel-Salam ve ark., 2012). Amerika'da aspartamın günlük alımının yetişkin popülasyonda 2-3 mg/kg, çocuklarda ise; 2.5-5 mg/kg kadar olduğu bildirilmektedir (Butchko ve ark., 2002). Bu değerlerin Avrupa'da 40 mg/kg ve Amerika'da 50 mg/kg olarak kabul edilen Önerilen Maksimum Günlük Alım Düzeyi (RDI)'nden oldukça düşük olduğu görülmektedir (Humphries ve ark., 2008). Aspartam için ADI değeri 40 mg/kg/gün, NOAEL (No Observed Advers Effect Level-Deney Hayvanlarında Toksik Etki Göstermeyen En Yüksek Doz) değeri 4000 mg/kg olarak kabul edilmektedir (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Aspartam hidroliz edildiğinde; beyin katekolaminlerinin bir prekürsörü olan fenilalanin, bir nörotransmitter uyarıcısı olan aspartik asit ile kanserojen ve nörotoksin olduğu bilinen formaldehit öncüsü metanol açığa çıktığı için alım miktarı ayrıca önem arz etmektedir (Hooper ve ark., 1994 ve Lee ve ark., 1994).

Düşük kalorili tatlandırıcılar sınıfında yer almasına rağmen sükroza denk bir kalori değeri (4 kkal/g) bulunan aspartam, sükrozdan 200 kat daha fazla tatlılık derecesine sahiptir (Grembecka ve Szefer, 2012). Bu nedenle sükroza kıyasla daha az miktarda eklenmekte, bu da besinlerin daha düşük enerjili olmasını sağlamaktadır (Abhilash ve ark., 2013).

Aspartam kimyasal yapısında fenilalanin aminoasidini bulundurmasından dolayı fenilketonürlü (PKU) hastalar için kontrendikedir. Bu nedenle aspartam içeren besinlerde fenilalanin aminoasidi içerdiği bilgisinin bulundurulması zorunludur (Kroger ve ark., 2006). Aspartam E 951 kodu ile besinlerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Leclercq, 1999).

Aspartam, insan vücudunda esteraz ve peptidazlar tarafından hızla metabolize edilebilmektedir. Metabolitlerinin emilimi gastrointestinal sistem lümeninde meydana gelmekte ve sonrasında sistemik dolaşıma girmektedir (Magnuson ve ark., 2007 ve Mourad ve Noor, 2011).

Amerikan Diyabet Birliği'ne (ADA) göre, diyabet ve obezite gibi kronik hastalıkların kontrolünde ve enerji alımının azaltılmasında aspartam gibi yapay tatlandırıcıların kullanılması uygundur (Whitehouse ve ark., 2008). Obezite en temel haliyle, yüksek enerji alımı ve düşük enerji harcaması ile karakterize, yüksek glisemik indeksli besinlerin alımıyla doğrudan ilişkili olabilen, vücutta anormal veya aşırı yağ birikiminin meydana geldiği bir hastalıktır (Roberts, 2015). Yüksek enerjili ve glisemik indeksli besinlerin tüketimi, glukoz düzeyi ve tokluk (postprandiyal) insülin salınımı üzerinde artışa neden olmaktadır (Anton ve ark., 2010). Basit karbonhidratların intestinal lümeninde emiliminin yüksek ve hızlı olması gerekçesiyle, şeker ve tatlandırıcı besinlerin tüketimi ile yetişkinlerde obezite gelişme riski arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Basu ve ark., 2014; Saris ve Tarnopolsky, 2003 ve Schulze ve ark., 2004). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular artan şeker ve tatlandırıcı tüketiminin yanı sıra azalan fiziksel aktivitenin; insülin direnci, abdominal adipozite (yağlanma) ve hepatik steatozu (karaciğer yağlanması), tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite ile sonuçlandığı belirtilmiştir.

De la Hunty ve arkadaşları (2006), aspartam tüketiminin enerji alımını düşürdüğünü, vücut ağırlığını kontrol etmede veya azaltmada etkili olduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan, bazı epidemiyolojik çalışmalar, diyetle düşük enerjili

veya enerji içermeyen tatlandırıcıların eklenmesiyle birlikte yeme alışkanlıklarını değiştirme girişiminin, dünya genelinde prevalansı her geçen gün artan obezitenin oranını düşürmede etkili bir rol oynamadığını göstermektedir (Gulati ve Misra, 2014 ve Yang, 2010). Rogers ve arkadaşlarının (2016) yaptığı, düşük enerjili tatlandırıcıların tüketiminin enerji alımı ve vücut ağırlığı üzerindeki etkilerini araştıran sistematik derleme çalışmada; şeker yerine düşük enerjili tatlandırıcı tüketiminin vücut ağırlığındaki azalma ile pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur.

Yapay tatlandırıcıların genotoksite ve DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) hasarı ile ilişkili olabileceği hipotezini araştırmak amacıyla yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Baeder ve ark., 1977; Mukherjee ve Chakrabarti, 1997; Rencüzoğulları ve ark., 2004; Shephard ve ark., 1993 ve Wolff ve Rodin, 1978). Bu çalışmaların genelinden elde edilen sonuçlar aspartamın genotoksik olmadığı ve DNA hasarına neden olmadığı yönündedir. Konu ile ilgili olarak swiss albino erkek farelerde yapılan bir çalışmada; aspartamın 7, 14, 28 ve 35 mg/kg/gün dozlarının uygulandığı gruplar ve kontrol grubu 7 gün boyunca takip edilmiştir. Farelerin femur kemiğinden alınan kemik iliği örnekleri ile DNA hasarı incelenmiş ve sadece 35 mg/kg/gün verilen grupta anlamlı farklılık bulunurken, diğer dozlarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı belirtmiştir (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Fakat 1978-2013 yılları arasında aspartamın genotoksik etkilerini inceleyen 24 çalışmanın ele alındığı bir derlemede, çalışmaların %55'nin pozitif sonuçlar bulduğu ve aspartamın orta düzey genotoksik ajan olduğu belirtilmiştir (Yılmaz ve Uçar, 2014).

1.2.2. Asesülfam-K

Keşfi 1967'de Almanya'da olan asesülfam-K diğer bir deyişle asesülfam potasyum, isminden de anlaşılacağı üzere yapısında potasyum (K) içermektedir (Kroger ve ark., 2006). İlk olarak 1988 yılında FDA tarafından kuru gıdalarda kullanılması amacıyla onaylanmıştır. Ancak 1984'te yoğurt, bazı tatlılar ve fırınlanmış ürünler gibi kısıtlı sayıda besinde kullanılırken, 2002 yılından itibaren tatlandırmak amacıyla çok çeşitli besinlerde, kozmetik ürünlerde ve birçok ilaçta kullanılmaya

başlanmıştır (Mukherjee ve Chakrabarti, 1997). Asesülfam-K için AB gıda katkı maddesi kodu E 950 olarak belirtilmektedir (Leclercq, 1999). Sükrozdan yaklaşık 200 kat daha fazla tatlılık derecesine sahip olan bu yapay tatlandırıcı, özellikle ısıya dayanıklı olması nedeniyle pişirme ve fırınlama gibi ısı işleme maruz kalan besinlerde sıklıkla tercih edilmektedir (Nabors 2002). Bunun yanı sıra orta dereceli asidik ortamlara dayanıklı olması, asesülfam-K'nın asitli içeceklerde başarılı bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Kroger ve ark., 2006). Sakkarin ile benzer olarak, hafif acı bir tada sahiptir. Bu nedenle; genellikle diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanılmaktadır (Horne ve ark., 2002).

Asesülfam-K, insan vücudunda metabolize edilememekte dolayısıyla günlük enerji ve K (yapısında K içermesine rağmen) alım miktarına etki etmemektedir (ADA, 2004). JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkı Maddeleri FAO/DSÖ Ortak Uzman Komitesi), asesülfam-K için ADI değerini 15 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (JECFA, 2001). Asesülfam-K'nın dış çürüklerine neden olmadığı ve non-karsinojenik olduğu kanısı bulunmaktadır (Asif, 2013). FDA tarafından besinlerle tüketiminin güvenli olduğu bildirilse de, doza bağlı sitogenetik toksisite açısından bazı endişeler bulunmaktadır (Mukherjee ve Chakrabarti, 1997). Mus musculus cinsi 16 erkek fare üzerinde yapılan bir çalışmada; asesülfam-K'nın 150, 300 ve 600 mg/kg dozlarında verildiği üç grup ve negatif kontrol grubu (distile su) 7 gün boyunca takip edilmiştir. Farelerden alınan kemik iliği örneklerinde comet assay yöntemi ile DNA hasarı değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubu dışındaki diğer tüm dozlarda DNA hasarı tespit edilip bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Bandyopadhyay ve ark., 2008).

1.2.3. Sakkarin

Sakkarin 1878 yılında keşfedilmiş, 1958'de FDA tarafından ilk onay alan yapay tatlandırıcı olmuştur. Bu nedenle üzerinde en çok araştırma yapılan ve en yaygın kullanımına sahip yapay tatlandırıcı olma özelliğini taşımaktadır (Özdemir ve ark., 2014). Sükrozdan 300 kat daha fazla tatlılığa sahip olup enerji içermemektedir. Non-

karsinojenik olduğu yıllar içinde kabul edilmiş olan sakkarinin, hafif acı ve metalik tadı bulunmaktadır. Bunun nedeni ise yapısında karbonilik oksijen (O₂), sülfonik O₂ ve bir azot (N) metalik atomların bulunmasıdır (Baran ve Yılmaz, 2006). Sakkarin için ADI değeri 5 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (Bergamo ve ark., 2011). Tablet, toz veya sıvı formda bulunabilmekte ve diyet içecekleri, ilaçlar ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sakkarinin kullanımı dünya çapında 100'den fazla ülkede onaylanmıştır. Isıya dayanıklı olması nedeniyle pişirme işlemine tabi tutulacak besinler için uygundur. Sakkarinin vücutta yıkımı olmaması nedeniyle enerjisi yoktur. Sakkarin, besinlerin etiketinde E 954 kodu ile gösterilmektedir (Duffy ve Anderson, 1998; Kroger ve ark., 2006; Leclercq, 1999; Mattes ve Popkin, 2009 ve Weihrauch ve Diehl, 2004).

Sakkarin tüketimi ile kanser insidansı arasında bir ilişki olmadığı gerekçesiyle potansiyel kansere neden olan ajanlar listesinden çıkarıldığı belirtilmiştir (Bell ve ark., 2002; Gallus ve ark., 2006; Trichopoulos, 1999; Uçar ve Yılmaz, 2015 ve Weihrauch ve Diehl, 2004).

1.2.4. Sükraloz

Sükraloz, 1976 yılında sükrozdan çok aşamalı bir şekilde üretilerek keşfedilen, özel ve tek yapay tatlandırıcıdır. Sükraloz, sükrozdan yaklaşık 600 kat daha tatlıdır ve vücutta metabolize edilemediği için enerji katkısı bulunmamaktadır. “Gerçek” şekerden meydana geldiği için oldukça hoş bir tada sahiptir (Goldsmith, 2000 ve Sims ve ark., 2000). Sükraloz, FDA tarafından 1998 yılında “masa üstü tatlandırıcısı” olarak kabul edilmiş, 1999 yılında ise genel amaçlı bir tatlandırıcı olarak onaylanmıştır. Isıya oldukça dayanıklı olması nedeniyle ısıl işlem uygulanacak besinlerde çok rahat kullanılabilir. Sükraloz ayrıca tablet şeklinde çay ve kahve tatlandırıcısı olarak kullanıldığı gibi, sakızlarda, dondurulmuş tatlılarda ve daha birçok yiyecek ve içecekte kullanılmaktadır (Grice ve Goldsmith, 2000). Sükraloz kullanıldığı besinlerdeki etiket bilgilerinde E 955 kodu ile gösterilmektedir (Leclercq, 1999).

FDA sükraloza için ADI değerini 5 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (Kroger ve ark., 2006). Şimdiye kadar, sükralozun kullanımının herhangi bir sağlık sorununa yol açtığı belirtilmemiştir (Gardner ve ark., 2012). Sükralozun diyabet hastalarında da güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir (Grotz ve ark., 2003 ve Ma ve ark., 2010). Tip 2 diyabetli 128 hastanın alındığı çift kör randomize bir çalışmada, 67 hastaya on üç hafta boyunca yüksek doz (7.5 mg/kg/gün) sükraloza, 69 hastaya ise plasebo verilmiş olup, her iki grupta HbA1c (Hemogloblin A1c), açlık kan glukozu, C-peptid seviyeleri açısından çalışma öncesi ve sonrasında fark olmadığı gösterilmiştir (Grotz ve ark., 2003).

1.2.5. Neotam

Neotam, kokusuz, beyaz renkte, kristal şeklinde bulunan ve bir dizi hidrasyon sonucu elde edilen bir bileşiktir. Neotame; fermente edilemeyen, ağızda belirgin bir tat bırakmayan ancak hoş bir tada sahip aynı zamanda en yoğun yapay tatlandırıcıdır. Sükroza göre 7000-13000 kat daha fazla tatlılık derecesine sahiptir. Neotame, aspartik asit ve fenilalanin amino asitlerinden oluşan bir dipeptit türevi olup kimyasal yapısı aspartam ile benzerlik göstermektedir. Fakat fermente edilememesi nedeniyle PKU hastalarında güvenle kullanılabilmektedir. FDA tarafından 2002 yılında et ve kümes hayvanları dışındaki besinlerde lezzet artırmak amacıyla kullanımı onaylanmıştır. Amerika'da ise, 1998 yılından beri birçok besinde kullanılmaktadır (Asif, 2013; Nofre ve Tinti, 2000; Özdemir ve ark., 2014 ve Witt, 1999). Besinlerde neotamın tercih edilmesinin birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlar: Yoğun tatlılık derecesi nedeniyle az miktarda kullanılabilmesi, maliyetinin düşük olması, tadının sükroza yakın olması, ağızda herhangi acı tat, metalik tat gibi arzu edilmeyen tatlar bırakmaması, nötral pH ortamında stabil olması, ısıya dayanıklı olması ve metabolize edilememesi dolayısıyla da günlük enerji, metanol ve fenilalanin alım düzeyini etkilememesi şeklinde sıralanabilir. Isıya dayanıklı olması neotamın, pişirme ve fırınlama işlemlerinde sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır. Neotam ayrıca; meşrubat, toz şeklinde satılan alkolsüz içecekler, pastalar, yoğurt ve sıcak paketlenen içeceklerde de

kullanılmaktadır (Kroger ve ark., 2006; Nofre ve Tinti, 2000 ve Witt, 1999). Neotam kullanılan besinlerin etiketlerinde E 961 kodu ile yer almaktadır (Leclercq, 1999).

Neotam için ADI değeri Avrupa'nın birçok ülkesinde 2 mg/kg/gün kabul edilirken, FDA bu değeri 18 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (Özdemir ve ark., 2014). İnsan üzerinde yapılan çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte, bu dozu aşmadığı takdirde gebelerde dahi kullanımının güvenli olduğu belirtilmektedir (Pope ve ark., 2014). Ağızda bulunan mikroorganizmalar tarafından metabolize edilemediği için diş çürümelerine neden olmadığı ve aynı zamanda da non-karsinojenik olduğu bildirilmektedir (Prakash ve ark., 2001).

1.3. Doğal Tatlandırıcılar

Doğal tatlandırıcılar, adından da anlaşıldığı gibi besinlerde doğal olarak bulunan ve tatlılık dereceleri yapay tatlandırıcılara göre daha düşük olan tatlandırıcı grubudur. Birçok besinde sükrozun yerine geçmeyi başaran doğal tatlandırıcılar, artan obezite ve diyabet insidansı nedeniyle özellikle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Bazı doğal tatlandırıcılar; agave şurubu, akçaağaç şurubu, melas, brazzein, curculin, pentadin, glisirizin, mabinlin, monellin, tamatin, tagatoz, hidrojene nişasta hidrolizatları ve izomalttır. Fakat doğal tatlandırıcı sınıfında en çok bilinen ve üzerinde en fazla çalışılan tatlandırıcı stevia'dır. Stevia son yılların en dikkat çekici tatlandırıcısı haline gelmiştir (Chatsudhipong ve Muanprasat, 2009 ve Takasaki ve ark., 2003). Bundan sonraki bölümde stevia'nın tanımı ve tarihçesine, fiziksel ve kimyasal özelliklerine, biyokimyası ve metabolizmasına, tüketimi ve güvenilirliğine, antioksidan aktivitesine, karsinojenitesine, toksisitesine, anti-inflamatuar aktivitesine ve stevia ile yapılmış diğer çalışmalara yer verilmiştir.

1.3.1. Stevia

1.3.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Stevia, *Asteraceae* ailesindeki “*Stevia rebaudiana Bertoni*” adlı bitkiden elde edilen, doğal bir tatlandırıcıdır. İlk olarak Paraguay’ın kuzeyindeki Amambay bölgesinde yetiştirilen stevia, sonrasında Brezilya ve Arjantin’de de yetiştirilmeye başlanmış olup, şimdilerde ise Asya, Avrupa ve Kanada başta olmak üzere dünyanın birçok bölgesine yayılmış haldedir (Hossain ve ark., 2010 ve Lemus-Mondaca ve ark., 2012). Her ne kadar stevia bitkisinin tatlandırıcı olarak kullanıldığı ilk yer Güney Amerika olarak bilinse de, tarihçesi incelendiğinde kullanımının antik çağa kadar dayandığı görülmektedir. *Stevia rebaudiana Bertoni*, çoğunlukla nemli ve ılıman bölgelerde yetişmekte olan, ortalama 65 ila 90 cm arasında uzunluğa sahip bir bitki türüdür (Goyal ve ark., 2010 ve İnanc ve Çınar, 2009). Bu bitki, ilk defa 1899 yılında Moisés Santiago Bertoni isimindeki bir bilim insanı tarafından botanik sınıflamaya dâhil edilmiştir. Başlangıçta *Eupatorium rebaudianum* olarak isimlendirilen bu bitki 1905 yılında *S. rebaudiana Bertoni* olarak bugünkü ismini almıştır. Bu bitkinin tatlı tadında olduğu ilk kez 1909 yılında izole edilmesi sonucu keşfedilmiş olup, 1931 yılında yalnızca steviosid pürifiye edilebilmiş, 1955’te ise diterpen glikozid olarak kimyasal yapısı keşfedilmiştir (Barriocanal ve ark., 2008 ve Lemus-Mondaca ve ark., 2012).

1.3.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Stevia’nın yaklaşık 230 türü bulunmaktadır fakat bunların arasından yalnızca *rebaudiana* ve *phlebophylla* türleri, steviol glikosidleri (SG) sentezleyebilmektedir (Brandle ve Telmer, 2007). *S. rebaudiana Bertoni*’nin kimyasal yapısının, labdan diterpenler, triterpenler, stigmasterol, taninler, uçucu yağlar, aminoasit, iz elementler (demir (Fe), çinko (Zn), alüminyum (Al) gibi) ve steviosid, steviobiosid, dulkozid ve rebaudiosit A, B, C, D ve E olmak üzere sekiz diterpenik glikozitden oluştuğu

belirlenmiştir. En yüksek oranda bulunan maddeler ise; steviosid ve rebaudiosit A'dır (Hossain ve ark., 2010). Stevianın 100 g'nda; 464.4 mg kalsiyum (Ca), 11.4 mg fosfor (P), 55.3mg Fe, 190 mg sodyum (Na), 1800 mg potasyum (K) bulunmaktadır. Her ne kadar stevianın mineral içeriği yüksek olsa da, yüksek oksalik asit (2295 mg/100g), yüksek lif (18.5 g/100g) ve düşük de olsa tanin (0.01 mg/100g) içermekte, bu da Ca ve Fe minerallerinin biyoyararlılığının azalmasına yol açmaktadır. Stevianın 100 g'ı 2,7 kkal enerji, 52 g karbonhidrat, 9,8 g protein ve 2,5 g yağ içermektedir (Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009).

SG; stevia'ya asıl tatlılık tadını veren, diterpen türevi, doğal steviol bileşiklerdir. Bu bileşiklerin steviosid, rebaudiosit A, B, C ve dulkozid başta olmak üzere yaklaşık 40 kadar çeşidi tespit edilmiştir. Bu 40 glikozid içinden yalnızca steviosid, rebaudiosit A, D ve E ve dukozid A ve B'nin stevia bitkisinin yapraklarında olduğu belirlenmiştir. Glikozidler, suda kolayca ekstrakte edilerek saflaştırma, konsantre edilme ve en son kurutma işlemlerinden geçirilmesi ile elde edilmektedir (Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009; Goyal ve ark., 2010; Lemus-Mondaca ve ark., 2012 ve Urban ve ark., 2013). SG içinde en çok bilineni olan steviosid, bir aglikona üç molekül glukozun bağlanmasıyla oluşan steviol yapıda bir glikozittir. Stevia yapraklarından ekstrakte edilen, tatlılık tadı yüksek, doğal yapıda bir bileşendir (Barriocanal ve ark., 2008 ve Goyal ve rak., 2010).

Stevia, besin endüstrisinde çok geniş bir yelpazede enerjisiz bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Tavarini ve Angelini, 2013). Bir stevia yaprağı analiz edildiğinde toplam kuru ağırlığın; %5-10'unu steviosid, %2-4'ünü rebaudiozit A, %1-2'sini rebaudiozit C ve %0.4-0.7'sini dulkosid A'nın oluşturduğu belirlenmiştir (Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009; Lemus-Mondaca ve ark., 2012 ve Urban ve ark., 2013).

Sükroza göre, dulkosid A'nın 50-120, rebaudiosit A'nın 250-450, rebaudiosit B'nin 300- 350, rebaudiosit C'nin 50-120, rebaudiosit D'nin 250-450, rebaudiosit E'nin 150-300 ve steviosidin 250-300 kat daha yüksek tatlılık derecesine sahip olduğu bildirilmiştir (Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009).

Steviosid ekstraktları, doğal veya pişirilmiş olarak kullanılabilmekte ve 200 °C'ye kadar termostabil oldukları bilinmektedir. Steviosidin 1 saat boyunca 120 °C'de inkübe edilmesi sonucu yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı, 140 °C'yi aşan sıcaklıklarda stabilitesini zor da olsa koruduğu, fakat 200 °C ve üzeri sıcaklıklarda kompozisyonunda bozulmalar meydana geldiği belirtilmektedir (Abou-Arab ve ark., 2010).

Sadece, steviosid ve rebaudioside A'nın, besin işlemede kullanılan yüksek sıcaklıklarda kararlı olması nedeniyle ısıtıldığında kahverengileşmeye veya karamelizasyona uğramadığı bildirilmiştir (Savita ve ark., 2004).

1.3.1.3. Biyokimyası ve Metabolizması

SG emilimi, insanlarda ve sıçanlarda, mide ve barsağın üst kısmında çok az miktarda gerçekleşmektedir. SG, kalın barsak florasıyla temas edinceye kadar metabolize edilmemektedir. Barsak florası, SG'leri katabolik basamağının son ürünü olan aglikon steviol'e hidroliz etmekte ve böylece barsaklar tarafından kolaylıkla emilmektedir (Renwick ve Tarka, 2008).

Steviol'e bağlanan glukoz moleküllerinin sayısı, barsak bakterilerinin parçalama oranını ve dolayısıyla katabolik süreci etkilemektedir. Örneğin; stevioside daha az glukoz molekülüne sahip olup, rebaudioside A ile karşılaştırıldığında daha kısa bir metabolik süreçten geçmektedir (Roberts ve Renwick, 2008).

SG'nin yıkımıyla elde edilen serbest steviol molekülleri enterohepatik dolaşıma girdikten sonra karaciğere taşınarak glukuronid ile bağlanmaktadır. Sıçanlarda, steviol glukuronid safradan atılarak tekrar barsağa geçmekte ve dışkıyla atılmadan önce dekonjugasyona uğramaktadır (Roberts ve Renwick, 2008).

İnsanlarda ise; steviol glukuronid, çoğunlukla idrarla atılmakta ve bununla birlikte oral alımı takiben dışkıda az miktarda steviol bulunabilmektedir (Wheeler ve ark., 2008).

Sistemik dolaşımdaki steviol miktarı insanlarda oldukça düşüktür. Rebaudioside A veya steviosid (100 ng/ml plazma sınırı) tüketen 16 kişiden 14'ünün plazmasında steviol tespit edilmemiştir (Wheeler ve ark., 2008).

Özetle SG, serbest steviol haline geçmeden önce barsak bakterileri tarafından hidroliz edilmekte; emildikten sonra karaciğerde glukuronidasyona uğramakta ve sonra atılmaktadır (Riobó Serván ve ark., 2014). Stevia alımını takiben gelişen biyokimyasal basamaklardan sonra kuru madde miktarına göre verdiği enerji değeri ortalama 2.7 kkal/g olarak belirlenmiştir (Chatsudhipong ve Muanprasat, 2009).

1.3.1.4. Tüketimi ve Güvenilirliği

Stevia ekstraktı ve steviosid, Japonya, Güney Kore, Brezilya, Arjantin ve Paraguay'da gıda katkı maddesi sınıfında onaylanmış olup, 2009 yılından bu yana Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde supleman olarak kullanılmaktadır (Choi ve ark., 2002 ve Riobó Serván ve ark., 2014). Stevia tüketiminin en fazla olduğu ülkelerden biri olan Japonya'da 2000'li yılların başında, 85-170 ton steviosid tüketildiği ve bunun birey bazında düşünüldüğünde 300 mg/gün'e eş değer olduğu belirtilmiştir (Huxtable, 2002).

Stevia için ABD'de ilk GRAS bildirimi rebaudioside A bakımından zengin bir stevia tatlandırıcısı ele alınarak oluşturulmuş, buna ek olarak JECFA tarafından biraz daha spesifikleştirilerek en az % 95 oranında steviol glikozid içeren stevia ürünleri için ek GRAS bildirimleri yayınlanmıştır (Woelwer-Rieck ve ark., 2010). Daha sonra, 2010 yılında ANS (Annual Nutrition Symposium-Yıllık Beslenme Sempozyumu), Avrupa Komisyonu'nun önerisi ile hazırlanan steviol glikozidlerin güvenli olduğu

konusunda bir karar yayınlanmıştır (Belda-Galbis ve ark., 2014). Çalışmalarda stevia'dan türetilen maddelerin kanserojen olmadığı veya diğer olumsuz etkilerle ilişkili olmadığı gösterilmektedir (Ishidate ve ark., 1984; Maki ve ark., 2008b ve Williams ve Burdock, 2009).

Avrupa Komisyonu, 11 Kasım 2011'de içecekler, tatlılar, şekerlemeler ve tatlandırıcılar da dâhil olmak üzere 31 farklı besin kategorisinde steviol glikozidlerin kullanımına izin veren yönetmeliği onaylamıştır (Kobus-Moryson ve Gramza-Michałowska, 2015). TKG'da ise; 30 Haziran 2013'te E960 koduyla steviol glikosidlerin, fırın ürünleri, içecekler, yoğurt, dondurma, reçel, sos, çikolata, ağız yıkama suyu ve düşük enerjili şekerlemeler gibi birçok üründe kullanımına izin verilmiştir. Stevianın kullanım limitleri (mg/kg veya mg/L); fırın ürünlerinde 200-1000, gazlı alkolsüz ve alkollü içeceklerde 50-600, toz içeceklerde 200-2000, tablet tatlandırıcılarda 800-4000, süt ürünlerinde 150-1000, sakızlarda 300-6000, şekerlemelerde 100-1000, tahıl ürünlerinde 200-1000, yenilebilir jellerde 200-1000, nutrasötiklerde 200-1000 ve ilaçlarda 50-1000 olarak belirtilmektedir (TKG, 2013).

Stevia endüstride en sık; turşu, kurutulmuş deniz ürünleri, soya sosu, içecek, şeker, sakız, yoğurt ve dondurma gibi çeşitli besinlerde ve diş macunu, ağız yıkama suyu gibi ürünlerde kullanılmaktadır (Choi ve ark., 2002).

JECFA tarafından 2005 yılında; bazı gıda katkı maddeleri, içerikleri, aroma maddeleri ve doğal gıda bileşenlerinin değerlendirilmesi sonucunda geçici olarak steviosid için ADI değeri 5 mg/kg ilan edilmiştir (JECFA, 2005). Yine JECFA tarafından 2008 yılında ADI değeri vücut ağırlığı başına steviol için 2 mg'dan 4 mg'a steviosid için ise 10 mg'a çıkarılmıştır (Khattab ve ark., 2015 ve Woelwer-Rieck ve ark., 2010).

1.3.1.5. Antioksidan Aktivite

Oksidasyon, birçok canlı organizmanın biyolojik süreçleri için gerekli enerjinin üretilmesinde elzemdir. Bununla birlikte, oksijen merkezli serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS), *in-vivo* olarak sürekli üretilmekte, bu da hücre ölümüne ve doku hasarına neden olmaktadır. Oksijen radikalleri, kanser, diyabet, kalp ve damar hastalığının (KVD) da dâhil olduğu çeşitli hastalıklarda ve yaşlanmada rol oynamaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Antioksidanlar, vücudu serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu zararlardan koruma yeteneğine sahip yaşamsal maddelerdir (Ozsoy ve ark., 2008). Oksidatif hasarın önlenmesinde yardımcı olabilen doğal antioksidanlara, özellikle, tıbbi kaynaklı veya doğal olarak bazı bitkilerde bulunan polifenollere her geçen gün ilgi artmaktadır (Silva ve ark., 2005). Polifenollerin serbest radikalleri süpürme aktivitesi için ideal kimyasal yapısal sahip olduğu bununla birlikte *in-vitro* koşullarda tokoferoller ve askorbattan daha etkili antioksidan olduğu gösterilmiştir (Rice-Evans ve ark., 1997).

İnsan vücudunda, hücrel molekülleri ROS'a bağlı hasara karşı korumak için, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler mevcuttur (Anderson, 1996). Her bireyde doğuştan gelen ya da kazanılmış bir bağışıklık sistemi mevcuttur, ancak bu savunma, devam eden ve ağır seyreden oksidatif stres durumunda yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla, insan vücudundaki ROS'u dengelemek amacıyla yeterli miktarda ve sürekli olarak antioksidan alımı gerekmektedir (Anagnostopoulou ve ark., 2006).

Vücutta serbest radikallerin miktarının antioksidan kapasitesini aştığı durumlarda çeşitli bozukluklar meydana gelebilmektedir. Antioksidan aktivite, genel sağlık durumunun sürdürülmesi amacıyla radikallerin uzaklaştırılması ve radikal oluşumuna neden olan reaksiyonların durdurulmasında büyük önem arz etmektedir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, hidrojen verici diğer bir deyişle indirgeyici ve

metal bileşiklerle şelat oluşturma özelliklerinden dolayı antioksidan aktivite gösterebilmektedir (Anderson, 1996 ve Rice-Evans ve ark., 1997).

Stevia yapraklarında bulunan total fenolik bileşiklerin ve *in-vitro* koşullarda antioksidan kapasitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, stevianın yüksek fenolik bileşikler içermesinden dolayı doğal antioksidan kaynağı olabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca stevianın 1-1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) lipofilik radikalini inhibe ettiği, süperoksit anyonunu, hidrojen peroksiti, nitrik oksit ve hidroksil radikalini temizlediği de aynı çalışmanın sonuçları arasındadır. Çalışmada stevia yapraklarından elde edilen özütün askorbik asit ile kıyaslandığında daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir (Shukla ve ark., 2009). Bu etkinin stevia yapraklarında bulunan yüksek flavonoid içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Stevianın yapısında, quercetin ve onun glikolize formu olan quercetin-3-O-arabinosid, apigenin, apigenin-4-O-glukozid, quercitrin, luteolin ve kaempferol-3-O-rhamnosid gibi birçok flavonoid bulunmaktadır (Ghanta ve ark., 2007).

1.3.1.6. Karsinojenite

SG'nin JECFA (2005) tarafından genotoksik olmadığı bildirilmiş olsa da (Ishidate ve ark., 1984; Maki ve ark., 2008b; Toyoda ve ark., 1997 ve Williams ve Burdock, 2009), literatürde genotoksik veya karsinojenik etki gösterdiğine dair çalışmalar da mevcuttur ve bu çalışmalarda, kromozomal anormalliklerin (KA) ancak yüksek miktarlarda (4000 mg/kg/gün ve üzeri) steviosid alımı sonucunda görüldüğü bildirilmektedir (Huxtable, 2002; Matsui ve ark., 1996; Nunes ve ark., 2007 ve Suttajit ve ark., 1993).

Çin hamsterları ile yapılan bir çalışmada, 28 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda steviosit ile kültürlenen D-6 hücrelerinde meydana gelen farklılıkların yalnızca %2 konsantrasyonda (24.8 mM) ve daha yüksek

konsantrasyonlarda görüldüğü belirlenmiştir. Kromozomlarda en fazla meydana gelen değişimin, kromozom aralarındaki boşlukların ve birleşme noktalarının sayısındaki artış olduğu ve kardeş kromatid değişimlerinin doza bağlı bir şekilde arttığı saptanmıştır (Huxtable, 2002).

Suttajit ve arkadaşlarının (1993) *in-vitro* olarak yaptıkları bir başka çalışmada; KA'yı belirlemek için 5 sağlıklı donörden kan örnekleri alınarak stevianın etkisi incelenmiştir. Stevia yapraklarından elde edilen steviosid 1, 5 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış ve çalışma sonucunda 10 mg/ml konsantrasyonundaki steviosid çözeltisinin genotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir. Matsui ve arkadaşlarının (1996) *in-vitro* (dört bakteri ve iki memeli hücresi) ve *in-vivo* olarak yaptığı çalışmada da benzer sonuçların bakteri *in-vitro* uygulamasında 12 mg/ml konsantrasyonunda elde edildiği fakat diğer uygulamalarda herhangi mutajenik etki gözlenmediği bildirilmiştir.

Nunes ve arkadaşlarının (2007) steviosid'in genotoksik etkilerini incelemek için yaptıkları *in-vivo* bir çalışmada, 45 gün süreyle içme sularına 4 mg/ml (yaklaşık 400 mg/kg/gün) steviosid eklenen sıçanların; kan hücreleri, dalak, karaciğer ve beyin dokularında DNA hasarı meydana geldiği bildirilmiştir.

Fare ve ratlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada, farelere intraperitoneal yolla 750 mg/kg dozunda, ratlara oral gavaj yolu ile 2000 mg/kg dozunda rebauside A verilmiştir. Farelerde uygulamadan 68 saat sonra kemik iliği hücreleri alınmış, ratlarda ise 16 saat sonra hepatositler alınarak genotoksik değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda her iki grupta da genotoksik bir etki gözlenmemiştir (Williams ve Burdock, 2009).

Bir başka çalışmada, %85 saflıkta ve 14.9 Mm yoğunluğundaki steviosidin Çin hamsterlerinin fibroblast diziliminde KA'ya neden olmadığı belirtilmiştir (Ishidate ve ark., 1984).

Salmonella typhimurium bakterisinin iki suşu üzerinde yapılan bir çalışmada ise, kültür ortamına 25 mg konsantrasyonunda steviosit verildiğinde hiçbir mutajenik etki gözlenmemiş, fakat 50 mg ve üzerindeki konsantrasyonlarda bir suş üzerinde mutajenite geliştiği belirtilmiştir (Takasaki ve ark., 2009).

1.3.1.7. Toksisite

Stevia ve steviosidin kullanıldığı miktarların çalışmalarda çok farklı olması ve tüketilemeyecek kadar yüksek olması nedeniyle, toksisite ve farmakolojiyle ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkması normal olarak değerlendirilebilmektedir. Bu nedenle çalışma bulguları değerlendirilirken insanların ortalama tüketim miktarları üzerinden yorumlamak gerekmektedir. Steviosid için kişi başı tüketim miktarı 300 mg/gün (0.37 mM) olarak tahmin edilmektedir (Huxtable, 2002).

Hayvanlar üzerinde steviosid ile yapılan çalışmaların hemen hepsi steviosidin düşük toksisite gösterdiği sonucuna varmaktadır (Akashi ve Yokoyama 1975; Fujita ve Edahiro 1979; Lee ve ark., 1979; Toskulkac ve ark., 1997; Yamada ve ark., 1985 ve Xili ve ark., 1992). Yapılan bir çalışmada, sıçanlara %50 oranında steviosid içeriği olan stevia özütü, 56 gün boyunca 1 g/gün dozlara kadar verilerek stevia'nın kronik toksisitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda, hepatik laktat dehidrojenaz aktivitesinde hafif bir azalma olması dışında herhangi bir biyokimyasal veya patolojik etki gözlenmediği belirtilmiştir (Lee ve ark., 1979).

Diğer bir çalışmada, sıçanlara %75 steviosid ve %16 rebaudiosit A içeriğine sahip stevia özütü 24 ay boyunca 550 mg/kg/gün dozunda verilmiştir. Çalışma sonucunda hafif büyüme geriliği şeklinde tek bir negatif etki saptanmış olup, bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Yamada ve ark., 1985).

Farelere iki hafta boyunca 2 g/kg saf steviosid gastrik entübasyon yolu ile verilmiş, ancak herhangi bir toksik etki tespit saptanmamıştır (Xili ve ark., 1992).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 104 hafta süreyle %5'i steviositten oluşan bir diyet verilmiş olup, toksikolojik ve karsinojenik bir etki gözlenmediği bildirilmiştir (Toyoda ve ark., 1997). Yamada ve arkadaşlarının (1985) sıçanlar üzerinde yaptıkları, iki yıl süreli toksisite ve karsinojenite çalışmasında stevia için NOAEL değeri 550 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir.

Xili ve arkadaşları (1992) sıçanlara iki yıl boyunca 800 mg/kg/gün dozunda %85 saflıkta steviosid vermişler ve steviosid için NOAEL değerini 794 mg/kg/gün olarak belirlemişlerdir. Bu rakamlar insanlara uyarlanarak ADI değeri 7.94 mg/kg/gün olarak kabul edilmiştir. Bu, 60 kg'lık bir yetişkin için 476 mg'a ve 20 kg'lık bir çocuk için 160 mg'a eşdeğerdir (Huxtable, 2002).

Ayrıca sıçanlarda LD50 (%50 Öldürücü Doz) dozu %50 steviosid içeren özütlerde 3400 mg/kg olarak belirlenmiş olup, genel olarak stevia ve türevleri için 1700 mg/kg üzeri kabul edilmektedir (Lee ve ark., 1979 ve Toskulkac ve ark., 1997). Farelerde ise; %50 steviosid ihtiva eden sulu özütlerin akut LD50 değeri 17000 mg/kg olarak kabul edilmektedir (Akashi ve Yokoyama, 1975). Steviosid özütlerinin %93-95'lik saflıkta olması durumunda ise, LD50 dozunun 15000 mg/kg'ın üzerinde olduğu belirtilmektedir (Huxtable, 2002).

1.3.1.8. Anti-inflamatuar Aktivite

İnflamasyon; vasküler dokuların, patojen, hasar görmüş hücre veya irritan gibi zararlı uyaranlara karşı doğuştan gelen bağışıklık reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Epitelyal ve endotel hücreler gibi bağışıklık hücreleri, zararlı uyaranların uzaklaştırılmasında ve iyileşme sürecinin başlatılmasında aktif bir şekilde rol oynamaktadır. Bununla birlikte, inflamasyonun, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar barsak hastalığı, ateroskleroz ve kanser gibi sonradan gelişen bozukluklarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (Chatsudhipong ve Muanprasat, 2009).

Stevianın anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu uzun yıllardır bilinmektedir, fakat halen bunu hangi yollarla sağladığı açık ve net ortaya konulabilmiş değildir (Huxtable, 2002). Yasukawa ve arkadaşlarının (1993) yaptığı bir çalışmada, stevia yaprağından elde edilen metanol ekstraktı ve aktif bileşeni olan lupeol palmitatın, fare derisinde 12-O-tetradekanoilflorbol-13-asetatın (TPA) neden olduğu inflamatuvar kulak ödemi önlediği belirlenmiştir.

Ayrıca steviol glikozitlerin deri tümörü oluşturulmuş farelerde, TPA'nın tümör teşvik edici etkisini belirgin bir şekilde azalttığı bulunmuştur (Yasukawa ve ark., 2002).

İnsan kolon epitel hücrelerinde özellikle steviol ve steviosidin, anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada insan kolon hücresinde steviol ve steviosidin interlökin-8 (IL-8) salınımında etkisi araştırılmıştır. Çalışmada toksik etki oluşturmayacağı düşünülen dozlarda steviol (<0,2 mM) ve steviosid (<2 mM) kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda steviolün Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) tarafından indüklenen IL-8 salınımını azalttığı ve immunoblast incelemesinde steviolün Nükleer Faktör kappa- B (NF- κ B) ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (Boonkaewwan ve ark., 2008).

Oral yolla steviosid alımının kolit oluşturulmuş hayvan modellerinde inflamasyon ve kanser transformasyonunu baskılayıcı etkilerinin bulunmasıyla steviosidin anti-inflamatuvar etkilerini araştıran çalışmalar önem kazanmıştır (Yasukawa ve ark., 2002). Steviosidin *in-vivo* olarak immunomodölatör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 6,25; 12,5 ve 25 mg/kg/gün oral steviosid verilen farelerde doza bağlı olacak şekilde fagositik fonksiyonun uyarılmış olduğu ve humoral yanıtta da artış olduğu gösterilmektedir. Ayrıca steviosidin fagositik aktivite ile T ve B hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Sehar ve ark., 2008).

Bu bulgular stevia ve türevlerinin anti-inflamatuvar olduğu yönündeki kanıları destekler niteliktedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda enfeksiyonlara karşı

bağışıklığı destekleme ve güçlendirme özellikleri nedeniyle steviosidin oral kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir (Boonkaewwan ve ark., 2008).

1.3.1.9. Diğer Çalışmalar

Stevianın akut toksisitesinin çok az olmasının yanı sıra şimdiye kadar herhangi bir alerjik reaksiyona neden olduğu belirtilmemiştir (Urban ve ark., 2013). Stevia, steviosid ve bunlarla birlikte rebaudioside A, steviol and isosteviol gibi stevia bileşiklerinin antiinflamatuvar, immünomodülatör gibi çok bilinen etkilerinin yanı sıra, antihiperglisemik, antihipertansif, antitümör, antidiarel ve antidiüretik etkilerinin de olduğu belirtilmektedir (Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009).

Stevianın, pankreasın beta hücrelerinde trofik etkisi olabileceği, ratlarda insülin hassasiyetinde artış sağladığı ve bununla birlikte insülin sentezini arttırarak diyabet dolayısıyla metabolik sendromda iyileşme sağlayabileceği vurgulanmaktadır (Chang ve ark., 2005 ve Lailerd ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada diyabetik erkek ratlara on hafta süresince 300 mg/kg dozunda stevia verilmiş olup, kontrol grubuyla kıyaslandığında kan glukoz seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığı, insülin sentezlerinde artış olduğu saptanmıştır (Dyrskog ve ark., 2005). Bu çalışmanın yanı sıra stevianın Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda kan glukoz düzeyi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Anton ve ark., 2010; Jeppesen ve ark., 2003 ve Maki ve ark., 2008b).

Stevianın kan basıncını olumlu etkilediği sonucuna varan çalışmalarda bulunmaktadır (Anton ve ark., 2010, ve Jeppesen ve ark., 2003). Chan ve arkadaşlarının (2000) Çin’de 28-75 yaş arası 106 (53 kadın ve 53 erkek) hipertansiyon hastası üzerinde yaptıkları randomize çift kör plasebo kontrollü çalışmada, tedavi grubuna (n=60) 1 yıl süresince günde 3 kez 250 mg steviosid içeren kapsül verilmiş, plasebo grubuna (n=46) aynı süre ve sıklıkta plasebo kapsül verilmiştir. Üç ay sonunda steviosid alan gruptaki hastaların sistolik ve diyastolik kan basınçlarının sırasıyla

166.0±9.4 mmHg'den 152.6±6.8 mmHg'ye; 104.7±5.2 mmHg'den 90.3±3.6 mmHg'ye düştüğü bulunmuştur ($p<0.05$). Glukoz ve lipidin dahil olduğu kan biyokimyasal parametreleri açısından anlamlı bir değişikliğe rastlanmadığı bildirilmiştir. Steviosidin antihipertansif etkisinin altında yatan mekanizma net olmamakla birlikte Ca antagonisti olarak etki gösterdiği düşünülmektedir (Melis, 1992 ve Melis ve Sainati, 1991a). Fakat diğer çalışmalarda, steviosidin kan basıncını düşürücü etkisinin muhtemelen prostaglandin aktivitesine bağlı olduğu belirtilmiştir (Chan ve ark., 1998; Lee ve ark., 2001 ve Melis ve Sainati, 1991b).

Maki ve arkadaşlarının (2008a) normal veya düşük kan basıncı olan 100 birey üzerinde yaptığı bir çalışmada, bireylere dört hafta boyunca 1000 mg/gün rebaudioside A verilmiş olup, sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçülmüştür. Deney grubunda sistolik ve diyastolik kan basıncı ortalama olarak 110.0/70.3 mmHg iken, kontrol grubunda 110.7/71.2 mmHg olduğu bulunmuştur. Çalışma sonunda stevianın kan basıncı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirtilmiştir.

Hsieh ve arkadaşlarının (2003) hipertansiyon hastası olan 82 birey üzerinde yaptıkları çalışmada, bireylere 24 ay boyunca günde üç defa 500 mg steviosid verilmiş, 86 birey ise plasebo grubunda yer almıştır. Steviosid verilen grubun iki yıl sonunda sistolik/diyastolik kan basınçlarının 150/95 mmHg'den 140/89 mm Hg'ye düştüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

Stevia ile yapılan ilk hayvan çalışmalarında stevianın üreme üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ve farelerde fertilite oranında azalmayı tetiklediği bildirilmiş olmasına rağmen (Mori ve ark., 1981 ve Usami ve ark., 1995) daha sonra yapılan hayvan çalışmalarında üreme sistemi üzerine herhangi bir negatif etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır (Aritajat ve ark., 2000, Aritajat ve ark., 2001 ve Saenphet ve ark., 2006).

Saenphet ve arkadaşlarının (2006) stevianın dişi ratlarda fertilizasyon üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, 8 haftalık ve 200-250 g ağırlığında olan ratlara 60 gün boyunca %0.2, %1 ve %10'luk farklı konsantrasyonlarda

hazırlanan stevia rebaudiana çözeltisi, 1 ml/gün olacak şekilde verilmiştir. Kontrol grubuna ise, aynı miktarda distile su verilmiştir. On dört günün sonunda hem stevia çözeltisini alan ratlar hem de kontrol grubunda bulunan ratların gebe kalmaları sağlanmış ve bu ratlar gebelikleri boyunca düşük riski ve mortalite açısından takip edilmiştir. İki grup arasında implantasyon sayısı, fetüs ağırlığı, spontan abortus ve mortalite durumları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiş ayrıca her iki grup için de gebelikte ve fetüste herhangi bir anormallik gözlenmemiştir.

Villareal ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, aspartam, stevia ve sükralozun fareler üzerinde nörotropik etkilerine ve hafızada tutma gücü üzerine etkilerine bakılmıştır. Çalışmada 20 adet *Mus musculus* cinsi fare 4 gruba ayrılmış, 32 gün boyunca 1. gruba su, 2. gruba 1000 mg/kg dozda aspartam, 3. gruba 1000 mg/kg stevia ve 4. gruba 16000 mg/kg sükraloze verilmiştir. Çalışmada nörotropik etkilerin saptanması amacıyla historik açıdan beyinleri değerlendirilmiştir. Stevia alan farelerde diğer gruplara göre daha yüksek hücresel apoptosis görülmüş olup nörotropik etki açısından anlamlı farklılık bulunmuştur. Fakat hafıza üzerine etkileri açısından stevia ve diğer tatlandırıcılar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

1.4. Genotoksisite

Genotoksisite, organizmanın biyokimyasal süreçlerinde, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlere bağlı olarak hücrelerdeki DNA moleküllerinde oluşan değişimleri inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Genotoksisite terimi genel olarak çekirdeğin, kromozomun ve DNA'nın yapısında meydana gelen KA, gen mutasyonları, DNA kırıkları, DNA eklentileri, anöploidi ve klastojenite gibi çeşitli hasarları kapsamaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genotoksik maddeler; organizmada bulunan genetik materyalde meydana gelen kalıtsal değişimlere neden olan maddelere denmektedir. Kalıtım materyali olan DNA ile ve/veya genom kopyasının çıkarılmasında yardımcı enzimlerle etkileşime girerek

mutasyonun gelişmesine neden olan genotoksik maddelerin, DNA’da belli hasarlar oluşturmaları ve bununla birlikte kalıcı bazı değişikliklere yol açması genotoksik etki olarak adlandırılmaktadır (Mortelmans ve Rupa, 2004).

Genotoksik maddelerin neden olduğu genotipteki kalıcı değişimlere mutasyon, mutasyonu tetikleyen etkenlere ise mutajen denilmektedir. Mutasyonların somatik doku hücrelerinde de meydana gelebildiği nadir durumlarda döllere aktarılan kalıtım materyalinde herhangi bir değişim gözlenmemektedir (Elsayed, 1997).

Mutasyon genellikle zararlı olarak bilinse de, bazı mutasyon türlerinin faydalı olabildiği belirtilmektedir. Bunlardan bazılarının doğal seleksiyon ve evrim sonucu değişime uğrayan kalıtım materyalinin ana maddesi olabileceği düşünülmektedir. Ancak mutasyonlar genellikle rastgele bir şekilde meydana gelmekte olup, kompleks yapıdaki bir organizmanın genetik materyalinde rastgele oluşan bir değişim sonucu herhangi olumlu yönde bir gelişme olmasının beklenemeyeceği belirtilmektedir. Mutasyonların zararlı etkilerinden bazıları; kanser, üreme bozuklukları, perinatal ölüm ve embriyogenik malformasyonlardır (Timbrell, 1998).

Genotoksik maddeler organizmadaki etkilerine göre üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar mutajenik, sitotoksik ve sitostatik etkenlerdir. Mutasyon, genotoksik maddelerin neden olduğu genotipteki kalıcı değişimler olarak tanımlanmakta ayrıca DNA’da meydana gelen bazı değişimler nokta mutasyonu şeklinde de adlandırılabilir. Genlerde meydana gelen bu nokta mutasyonları bazı kimyasal madde ve fiziksel etkenler sonucu görülebilmektedir. Kimyasal maddeler ve fiziksel etkenler sonucu gelişen bu duruma mutajenesiz denilmekte, mutasyona uğrayan tür ise mutant olarak adlandırılmaktadır. Sitotoksik maddeler, anoksi, hücrelerin membran geçirgenliğinde ve protein koagülasyonundaki artış nedeniyle hücre ölümüne neden olan maddelere denilmektedir. Genellikle kromozom sayısında ve yapısında meydana gelen değişiklikler ise sitostatik etki olarak adlandırılmaktadır. Genotoksisite etkilerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin başında KA testleri gelmektedir (Mortelmans ve Rupa, 2004).

1.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış orbitallerinde ortaklaşmamış elektron bulunduran, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Serbest radikaller içinde en önemlisi ROS'lardır. ROS'ların organizmada karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküller ile çok kolay tepkimeye girebildikleri bilinmektedir. Bu nedenle ROS'ler KVH, diyabet, karaciğer, böbrek, immün sistem hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve kanser gibi birçok hastalığın nedeni olarak görülmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Oksidasyon, bir atomun veya molekülün elektron vermesi sonucu yükseltgenmesi işlemidir. Yükseltgenme potansiyeline bağlı olarak bazı maddeler yükseltgenirken, elektron alan madde ise indirgenir. Organizmada ve besinlerde bulunan karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve nükleik asitlerin oksidasyona uğrayabildiği bunun sonucunda sağlığa zararları olan oksidasyon ürünlerinin oluşabildiği belirtilmektedir (Halliwell ve ark., 1995).

Antioksidanlar ise, genel olarak radikallerin etkisiyle oluşan oksidasyon sürecini durduran ya da yavaşlatan tüm moleküllere verilen isimdir (Young ve Woodside, 2001).

Doku ve hücre bütünlüğünün korunmasında ve normal görevlerini yerine getirmelerinde antioksidan ve oksidan sistemlerin arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelen serbest radikaller, organizmadaki karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi temel yapısal moleküllerde oksidatif hasara neden olabilmektedir (Serafini ve Del Rio, 2004).

Antioksidanlar genellikle iki sınıf altında incelenmektedir. Birincil antioksidanlar, oksidasyon sürecin başlamasını ve radikal oluşmasını tetikleyen tepkimelerin hızlarını azaltmakla görevlidir. Glutasyon, peroksidaz, katalaz enzimleri gibi hidroperoksitleri indirgeyebilmektedir (Young ve Woodside, 2001). İkincil

antioksidanlar ise, E vitamini, süperoksit dismutaz enzimi gibi radikallerin doğrudan tutulmasını sağlayarak, oksidasyon zinciri uzunluğunu azaltmakta ve peroksidatif hasar etkilerinin büyümesini önlemektedir (Huang ve ark., 2005).

Organizmanın ROS'lerden korunabilmeleri antioksidan savunma mekanizması sayesinde gerçekleşmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz enzimleri gibi antioksidan savunma mekanizmasını oluşturan faktörlerin, vücuttan serbest radikallerin ve diğer reaktif türlerin katalitik bir şekilde uzaklaştırılmasında görev aldıkları bilinmektedir. Ayrıca proteinlerin de farklı biyokimyasal mekanizmalar ile oksidatif hasara karşı koruyucu özelliklerinin olduğu belirtilmektedir. Tüm bunların yanı sıra, glutatyon, α -tokoferol ve askorbik asit gibi ajanların da reaktif azot türlerini (RNS) ve ROS'ları süpürme özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu maddeler güçlü antioksidan olarak değerlendirilmektedir (Katiyar ve Mukhtar, 1997).

Farelerde steviol glikozide maruziyetin oksidatif hasar indeks parametreleri, bazı biyokimyasal ve genetik parametreler üzerine etkisini *invivo* olarak değerlendirmek bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

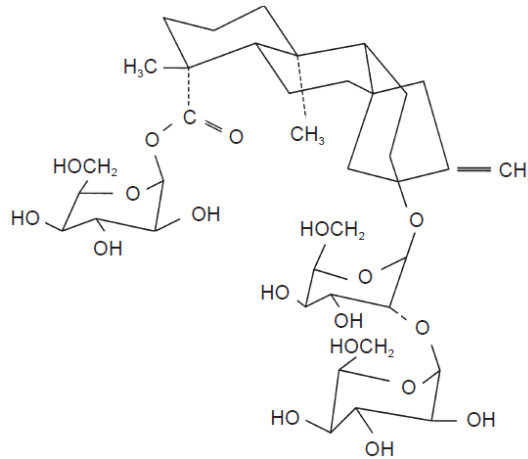
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu bölümde, çalışmada kullanılan hammadde, kimyasal maddeler ve test organizması verilmiştir.

2.1.1. Test Hammaddesi

Test hammaddesi olarak kullanılan SG, *Stevia rebaudiana Berton*i bitkisinden elde edilen, %99 saflıkta, yüksek tatlılık derecesine sahip, beyaz renkli, toz şeklinde, kokusuz ve suda çözünebilen özelliktedir. SG'nin kimyasal yapısı şekil 2.1'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan SG, belirtilen özelliklerde olup, İzmir'de bulunan Egepak Gıda ve Ambalaj Sanayi Anonim Şirketi bünyesindeki Takita isimli özel bir firmadan tedarik edilmiştir.



Şekil 2.1. Steviol glikozidin kimyasal yapısı

2.1.2. Test Kimyasalları

Bu araştırmada kullanılan Xylazine (Katalog No: 23076-35-9), ketamin HCl (hidroklorür) (Katalog No: 1867-66-9) isimli kimyasallar Sigma firmasından, potasyum klorür (KCl, Katalog No: 7447-40-7), metanol (Katalog No: 67-56-1), asetik asit (Katalog No: 401404), nitrik asit (HNO₃, Katalog No: 305201), etil alkol (C₂H₅OH, Katalog No: 64-17-5), giemsa (Katalog No: 109203) ve entellan (Katalog No: 107960) Merck firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Test Organizması

Çalışmada 25-40 g ağırlığında, 8-12 haftalık, 20 adet erkek ve 20 adet dişi olmak üzere toplam 40 adet Balb/c cinsi fare kullanılmıştır. Fareler Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından (AÜDEHAL) temin edilmiştir. Fare bakımları, uzman veteriner hekimler tarafından, Laboratuvar Hayvanları Kullanım ve Bakım Kılavuzu'na (NRC, 2010) uygun olarak yapılmıştır. Fareler kafeslerde, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta, %30-40 nem oranında ve 22-25°C sıcaklıkta, dörderli şekilde tutulmuştur. Su olarak şehir şebeke suyu, yem olarak %18 protein, % 7 yağı ve 3320 kkal/kg enerji değerine sahip Exclusivet firmasının standart pelet fare yemi verilmiştir. *Ad libitum* olarak beslenen farelere yemler günde iki sefer saat 09.00 ile 19.00'da verilmiş, kafeslerdeki altlıklar ise gün aşırı değiştirilmiştir. Çalışma süresince tüm fareler eşit çevresel koşullar altında tutulmuştur. Araştırmadan 7 gün önce gözlem altına alınan farelerin, deney ortamına adaptasyonu sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanların daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edilmiştir.

2.2. Yöntem

Bu bölümde deney protokolü, etik kurul onayı ve verilerin analizi ana başlıkları yer almaktadır.

2.2.1. Deney Protokolü

SG için LD50 dozu JECFA tarafından 15 g/kg vücut ağırlığı olarak belirtilmiştir (JECFA, 2008). Çalışmada farelere verilecek dozun belirlenmesinde bu değer temel alınmıştır. Belirtilen LD50 dozunun 1/32, 1/24, 1/16 ve 1/8'i hesaplanmış ve elde edilen değer farelerin vücut ağırlıkları ile çarpılarak, farelere verilecek SG dozu belirlenmiştir.

Fareler gruplandırılırken erkekler ve dişiler kendi arasında rastgele olacak şekilde kapalı zarf usulü ile 5 gruba ayrılmış ve Tablo 2.1'deki gibi gruplandırılmıştır.

Çizelge 2.1. Deney protokolü ve grupların oluşturulması

	KONTROL GRUBU	LD50/32 GRUBU	LD50/24 GRUBU	LD50/16 GRUBU	LD50/8 GRUBU
Beslenme Şekli	Oral Gavaj Yöntemi ile 0,2 mL Distile Su	Oral Gavaj Yöntemi ile 0,2 mL, 470 mg/kg (vücut ağırlığı)	Oral Gavaj Yöntemi ile 0,2 mL, 620 mg/kg (vücut ağırlığı)	Oral Gavaj Yöntemi ile 0,2 mL, 940 mg/kg (vücut ağırlığı)	Oral Gavaj Yöntemi ile 0,2 mL, 1880 mg/kg (vücut ağırlığı)
Hayvan Sayısı	4 adet erkek 4 adet dişi	4 adet erkek 4 adet dişi	4 adet erkek 4 adet dişi	4 adet erkek 4 adet dişi	4 adet erkek 4 adet dişi
Besleme Süresi	4 hafta	4 hafta	4 hafta	4 hafta	4 hafta

Tüm gruplarda ortak olarak her bir fare için SG çözeltisi uygun dozda 0,2 mL hacminde hazırlanarak 19 G (gauge)'lik çelik oral gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yöntemi ile günde bir kez ve aynı saatte (sabah 09:00) verilmiştir. Saat 19:00'daki ikinci öğünde ise SG verilmeyip, sadece yem verilmiştir. Yirmi sekiz günlük besleme

periyodunun ardından genel anestezi altında intrakardiyak yöntemle kan alınarak TOS (Total Oksidant Status), TAS (Total Antioxidant Status), PON-1 (Paraoksonaz), LDL kolesterol, HDL kolesterol düzeylerine bakılmış ve oksidatif hasar indeksi hesaplanmıştır. Ayrıca genetik parametrelerin değerlendirilmesinde femurdan alınan kemik ilik örnekleri mikroskop yardımı ile incelenmiş, muhtemel KA ve hücre döngüsü aktivitesi değerlendirilmiştir.

Kontrol Grubu: Sağlıklı kontrol grubu olarak 8 adet fareye 4 hafta boyunca 0,2 mL hacminde distile su verilmiştir.

LD50/32 Deney Grubu: Bu grupta bulunan farelere 15 g/kg vücut ağırlığı dozu olan LD50'nin 1/32'i verilmiştir. Bu değer pratik olarak 470 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde her bir farenin ağırlığına göre hesaplanarak verilmiştir.

LD50/24 Deney Grubu: Bu grupta bulunan farelere 15 g/kg vücut ağırlığı dozu olan LD50'nin 1/24'i verilmiştir. Bu değer pratik olarak 620 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde her bir farenin ağırlığına göre hesaplanarak verilmiştir.

LD50/16 Deney Grubu: Bu grupta bulunan farelere 15 g/kg vücut ağırlığı dozu olan LD50'nin 1/16'i verilmiştir. Bu değer pratik olarak 940 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde her bir farenin ağırlığına göre hesaplanarak verilmiştir.

LD50/8 Deney Grubu: Bu grupta bulunan farelere 15 g/kg vücut ağırlığı dozu olan LD50'nin 1/8'i verilmiştir. Bu değer pratik olarak 1880 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde her bir farenin ağırlığına göre hesaplanarak verilmiştir.

Çalışma 28. günün bitişi ile sona ermiş ve farelere steviol glikozid verilmesi kesilmiştir.

2.2.2. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın etik onayı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmış olup (Toplantı No: 2017-3, Karar No: 2017-3-19) onay yazısı ekte sunulmuştur (Ek 1). Çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 17L0241004) tarafından desteklenmiştir.

2.2.3. Verilerin Analizi

Bu bölümde çalışmada yapılan biyokimyasal analiz, genetik analiz ve istatistiksel analizler verilmiştir.

2.2.3.1. Biyokimyasal Analiz

Kan örneklerinin alınabilmesi için farelere 5 mg/kg Xylazine ve 100 mg/kg Ketamin HCl (hidroklorür) intramuskuler yolla enjekte edilmiş (Buitrago ve ark., 2008) ve fareler anestezi altına alınmıştır. Kan örnekleri genel anestezi altındaki farelerden intrakardiyak yöntemle alınmıştır. Bunun için fare sırt üstü yatırılarak kalp vuruşunun en güçlü olduğu nokta işaret parmağıyla saptanmış ve iğne orta hattın hafifçe solunda ksifoid kıkırdağın altına batırılmıştır. Kalbe girmek için enjektör horizontal akstan sternuma 20-30 derecede ilerletilerek hafifçe aspire edilmiş, kan yavaşça çekilmiştir. Her bir fareden 1-3 ml kan alınmış, alınan örnekler enjektör yardımıyla serum tüplerine aktarılmıştır. Yaklaşık 20 dk pıhtılaşma süresini takiben Nüve NF 400 model tezgah üstü santrifüj cihazında 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, üstte kalan serum kısmı pastör pipeti yardımıyla alınmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorf tüpler, analizler yapılana kadar -20 °C'de bekletilmiş ve alınan kan örnekleri soğuk zincir korunarak Baran Medikal Laboratuvarı'na götürülmüştür. Numularda, TOS (Total Oksidant Status), TAS (Total Antioxidant Status), PON-1 (Paraoksonaz-1), LDL kolesterol, HDL kolesterol düzeylerine bakılmış ve Oksidatif

Stres İndeksi (OSİ) değeri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar laboratuvarın kullandığı referans değerlere göre yorumlanmıştır.

2.2.3.1.1. Total Antioksidan Status (TAS) Tayini

Serum örneklerinin Total Antioksidan Kapasite ölçümleri (Total Antioxidant Status: TAS), Erel'in geliştirdiği metoda göre (Erel, 2004) Rel Assay Diagnostics Total Antioxidant Status kiti kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm prensibi hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate) molekülünün ABTS+ molekülüne okside olması esasına dayanmaktadır. Numunede bulunan antioksidan miktarı arttıkça ABTS+ radikalinin ABTS'ye indirgenme oranı artmakta ve ABTS+'nın karakteristik rengi olan koyu yeşil renk açılmaya, beyazlamaya başlamaktadır. Absorbans 660 nm'de ölçülmüş, sonuçlar mmol/L olarak verilmiştir. TAS değerindeki artış vücutta antioksidan kapasitenin arttığını göstermektedir.

2.2.3.1.2. Total Oksidan Status (TOS) Tayini

Serum örneklerinin Total Oksidan Kapasite ölçümleri (Total Oxidant Status: TOS), Erel'in geliştirdiği metoda göre (Erel, 2005) Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status kiti kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm prensibi numunede bulunan oksidanların, ferröz iyon komplekslerini (Fe^{+2}) okside ederek ferrik forma (Fe^{+3}) dönüştürmesi esasına dayanır. Oksidasyon sonucu konsantrasyonu artan ferrik iyonlar asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir bileşke oluşturmaktadır. Oluşan rengin yoğunluğu numunede bulunan oksidan maddelerin miktarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Absorbans 560 nm'de ölçülmüş olup, sonuçlar μ mol/L olarak verilmiştir. TOS değerindeki artış, oksidatif stresin arttığını göstermektedir.

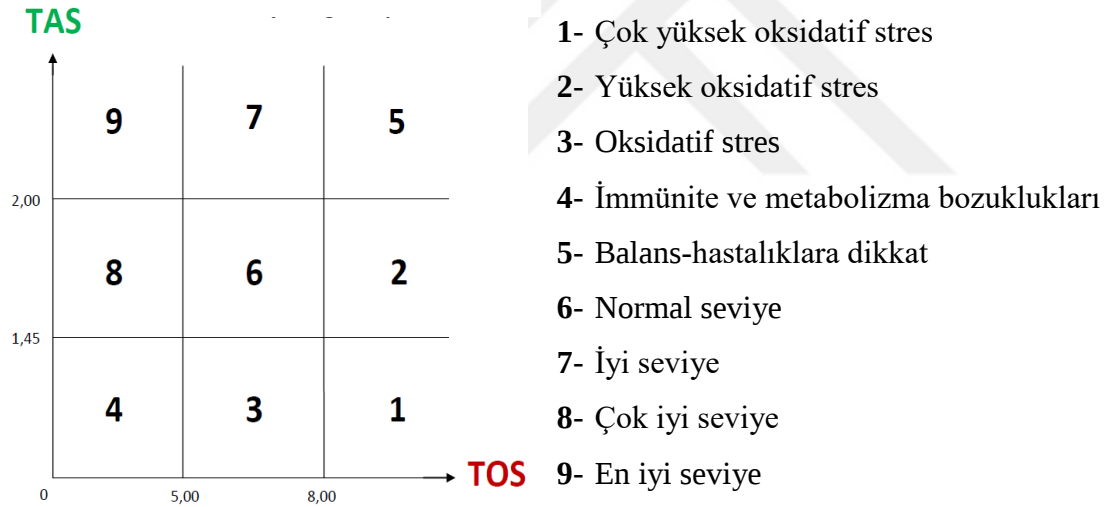
2.2.3.1.3. OSİ Hesaplaması

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ değeri oksidatif stres derecesinin bir indiktor parametresi olup, formülizasyonu aşağıdaki gibidir. Sonuçlar “arbitrary unit” (AU) olarak ifade edilmiş ve Şekil 2.2’de verilen formüle göre hesaplanmıştır (Abuhandan ve ark, 2012):

$$OSİ = \frac{(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L})}{(TAS, \text{mmol Trolox equivalent/L}) \times 10}$$

Şekil 2.2. OSİ değeri hesaplama denklemi

OSİ sınıflaması TAS ve TOS değerlerinin kullanıldığı grafiğe göre yapılmış ve açıklamaları yazılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. OSİ sınıflaması grafiği (Baran Medikal Laboratuvarı’ndan alınmıştır)

Genelde, OSİ değerindeki artış oksidatif strese yatkınlığın artması olarak, azalma ise oksidatif strese yatkınlığın azalması olarak değerlendirilmektedir.

2.2.3.1.4. Paraoxonase (PON-1) Tayini

Serum örneklerinin PON-1 enzim düzeyi ölçümleri Rel Assay marka kit kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm prensibi numunedeki paraoksonaz enziminin reaksiyon ortamındaki paraokson substratını hidroliz etmesi esasına dayanmaktadır. Absorbans 412 nm’de ölçülmüştür. Sonuçlar U/L olarak verilmiştir. PON-1 aktivitesi için 1 µmol paraoksonu 1 dakikada p-nitrofenol’e dönüştüren enzim aktivitesi Ünite (U) olarak tanımlanmıştır.

2.2.3.1.5. HDL Kolesterol (HDL-K) Tayini

Serum örneklerinin HDL-K düzeyleri Rel Assay marka ELISA analiz kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm prensibi numunedeki HDL-K düzeyinin polietilenglikol (PEG) kolesterol esteraz ve PEG kolesterol oksidaz kullanılarak enzimatik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçlar mg/dL olarak verilmiştir.

2.2.3.1.6. LDL Kolesterol (LDL-K) Tayini

Serum örneklerinin LDL-K düzeyleri Rel Assay marka ELISA analiz kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm prensibi iki aşamalı eliminasyon metoduna dayanmaktadır. İlk aşamada VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) ve HDL özel koşullar altında elimine edilerek sadece LDL-K türevi bırakılır. İkinci aşamada ise kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimleri ve sürfaktanlar yardımı LDL-K düzeyi ölçülür. Sonuçlar mg/dL olarak verilmiştir.

2.2.3.2. Genetik Analiz

Çalışmada yapılan genetik analizler; numunelerin hazırlanması, mitotik indeks (MI) ve KA değerlerinin saptanması olmak üzere 2 başlık altında verilmiştir.

2.2.3.2.1. Numunelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar ve cihazlar Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Numuneler alınmadan önce hazırlanan kimyasallar ve malzemeler aşağıda verilmiştir:

- KCl çözeltisi: Taze olarak çalışmadan hemen önce 0,075 M (molarite)'de hazırlanmış ve Nüve EN 400 Model inkübatörde 37 °C'ye getirilmiştir.
- Metanol asetik asit (3:1) çözeltisi: Taze olarak çalışmadan hemen önce 600 ml metanol ve 200 ml asetik asit kullanarak hazırlanmış, ağzı kapalı bir şekilde buzdolabında +4 °C'ye getirilmiştir.
- HNO₃ çözeltisi: 1 Normalite olacak şekilde distile su ile hazırlanmış, ağzı kapatılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- C₂H₅OH: %95-96 saflıkta ve %70'lik orandaki etil alkol balon joje içerisinde ağzı kapalı olacak şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Lam ve lamellerin ön hazırlığı: Numunelerin alınması işleminden 2 gün önce lamlar içerisinde HNO₃ çözeltisi bulunan şalelerde oda sıcaklığı koşullarında 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra lamlar yıkanmış ve kullanılacağı güne kadar -18 °C'de etil alkol çözeltisi içinde saklanmıştır.
- Giemsa: Preparat yapımından hemen sonra %5'lik hazırlanmış, süzölmüş ve oda sıcaklığında kullanılmıştır.

Çalışmada genetik analizlerin yapılabilmesi amacıyla farelerden kemik iliği örnekleri alınmıştır (Şekil 2.4). Kemik iliği örnekleri alınmadan 2 saat öncesinde farelere intraperitoneal olarak 5 mg/kg dozunda colchicine (kolşisin) 0,1 ml volümde hazırlanarak enjekte edilmiştir. Kolşisin hücrelerin bölünme evrelerinden olan metafaz aşamasında durmasına neden olan kimyasal bir ajandır.

Genel anestezi altında bulunan ve sırt üstü yatırılan farelerin her iki femur kemiğinden de kemik iliği örnekleri alınmıştır. Alınan kemik iliği örnekleri KCl çözeltisinin bulunduğu polietilen tüpe aspire edilmiştir (Şekil 2.5). Numuneler 37°C'deki etüvde 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve tüplere vorteks eşliğinde 5 ml 3:1 metanol asetik asit çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. Numuneler 1 saat +4°C'deki buzdolabında bekletildikten sonra yeniden 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek süpernatantı atılmıştır. Bu işlem toplamda 3 kez gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işlemi sona erdikten sonra preparat yapım aşamasına geçilmiştir. Daha önceden hazırlanan ve -18 °C'de etil alkol çözeltisi içinde bekletilen lamalar distile su ile yıkanmış ve kemik iliği örnekleri 30°'lik eğimle 15-20 cm yükseklikten kurutulmuş lamaların üzerine damlatılmıştır. Bir gün boyunca yaşılandırılan preparatlar %5'lik giemsa ile 15-20 dakika arasında boyanmış ve kuruması beklenmiştir. Boyama işleminin ardından lamaların üzerine birkaç damla entellan damlatılarak 24x60 mm'lik lamellerle kapatılmıştır.



Şekil 2.4. Farelerden kemik iliği alınması



Şekil 2.5. Kemik iliğinin polietilen tüpe alınması

2.2.3.2.2. Mitotik İndeks ve Kromozomal Anormalliğin Saptanması

Mİ hesaplaması yapabilmek için; her birinden ayrı olmak üzere 40 fareden temin edilen kemik iliği örnekleri ile hazırlanmış olan her preparattan rastgele bir şekilde 1000 hücre taranmış ve bu hücreler arasında bölünenlerin total hücre sayısına oranı belirlenmiştir. Her uygulama grubu için toplamda 8000 (1000x8) hücre incelenmiştir. KA'nın tespit edilmesi amacıyla ise; her bir preparatta rastgele 100 hücre olmak üzere her uygulama grubunda 800 hücre taranmıştır. Bu incelemeler için Leica DM 750 model ışık mikroskobu kullanılmıştır.

2.2.3.2.2.1. Kromozomal Anormallik Testi

Genlerde çeşitli nedenlere bağlı olarak meydana gelen değişimler sonucunda oluşan genetik hasarlar, makrolezyonlar olarak adlandırılmakta, bunun nedeni ise; bu hasarların mikroskop yardımıyla görülebilecek büyüklükte olmasıdır. Bu hasarlar genellikle hücrenin bölünmesi esnasında replikasyona uğramış kromozomlarda tam ayrılamama sonucunda meydana gelmektedir. Makrolezyonlar kromozomun yapısında morfolojik olarak değişikliğe neden olabilmektedir (Nuwaysir ve ark., 1999).

KA'nın incelenmesinde kullanılan yöntemlerden biri klasik yöntemlerdir ve hücre bölünmesinin metafaz basamağında durdurulan kromozomların doğrudan gözle analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile kromozomlarda oluşabilen sayısal ve yapısal değişimler incelenebilmektedir (Barile, 2010).

Kısa süreli karsinojenite ve mutajenite testlerinden olan kardeş kromatid değişimleri (SU) ve KA analizlerini tarihte ilk kez 1975 yılında Evans ve Perry'nin çalışmaları ile başladığı bilinmektedir. Oldukça duyarlı bir test olan bu iki yöntemin ardından birçok araştırmacıya farklı ajanların genetik etkilerini inceleme yolu açılmış bulunmaktadır (Nuwaysir ve ark., 1999 ve Gómez-Arroyo ve ark., 1997).

2.2.3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Her grupta verilerin parametrik koşulları yerine getirip getirmediğini inceleyebilmek için normal dağılıma uygunluk ve varyans homojenliği testi olan One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test'i yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde parametrik olan verilerin karşılaştırması yapılırken T-Testi ve One-Way ANOVA testi kullanılırken, post test olarak Tukey testi kullanılmıştır. Non-parametrik verilerde ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık $p < 0.05$, < 0.01 ve < 0.001 değerlerine göre belirlenmiştir. KA/hücre frekansı, AH yüzdesi ve Mİ yüzdesi hesaplanmasında ise, Z testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Tüm parametrelerde doza bağlı değişim gösterip göstermediğini değerlendirmek amacıyla regresyon analizi yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Bazı Plazma Lipid Parametrelerine İlişkin Bulgular

Çizelge 3.1’de çalışmada kullanılan farelere ait bazı plazma lipid parametreleri yer almaktadır. Farelerin HDL-K (Yüksek Dansiteli Lipoprotein kolesterol) değerinin en yüksek olduğu grup LD50/24 grubudur. Deney grubundaki en düşük grup ise LD50/16’dır. Kontrol grubundaki değerin ise deney gruplarında bulunan farelerden daha düşük olduğu görülmektedir. En yüksek doz SG’nin verildiği LD50/8 grubunda yer alan farelerin HDL-K değerinin LD50/24 grubundan sonra en yüksek değer olduğu görülmektedir. Tüm farelerin ortalama HDL-K değerinin $46,5 \pm 1,32$ mg/dL olduğu bulunmuştur. Gruplar arasında HDL kolesterol değeri açısından istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

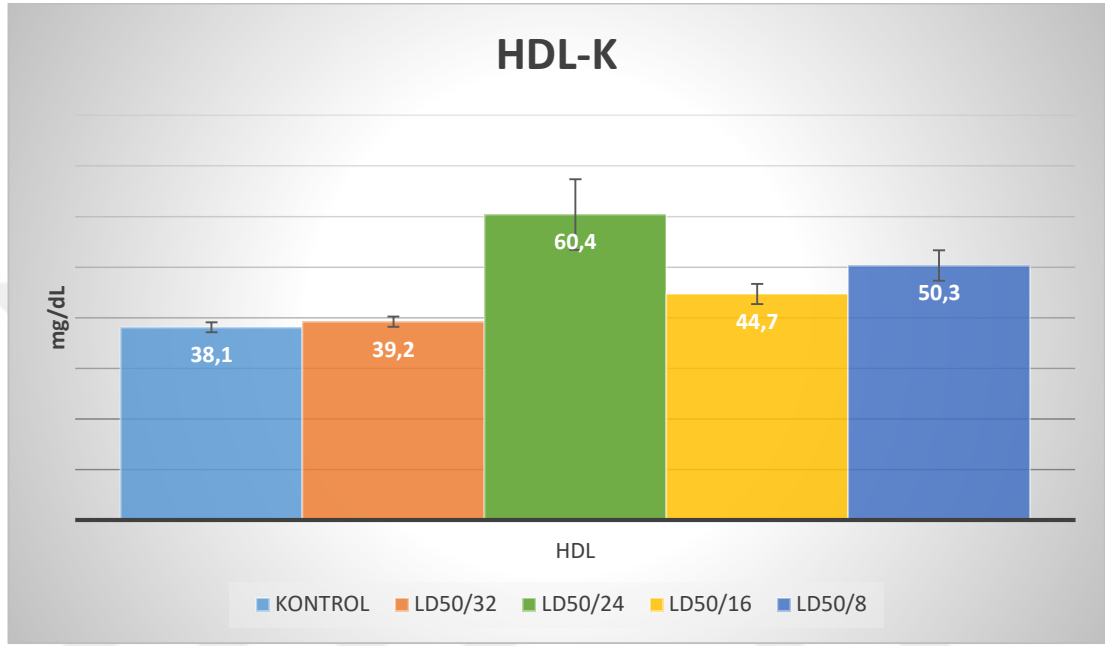
Aynı çizelgede, farelerin LDL-K (Düşük Dansiteli Lipoprotein kolesterol) değerlerine bakıldığında ortalamanın $95,4 \pm 4,71$ mg/dL olduğu ve en düşük LDL-K değerinin LD50/8 grubunda olduğu görülmektedir. Kontrol grubunun LDL-K değerinin $92,6 \pm 2,24$ mg/dL olduğu ve bu değerin deney gruplarından (LD50/24 hariç) daha yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek LDL-K değeri ise LD50/24 grubundadır. Ayrıca LD50/24 ile LD50/32 grubu arasında ($p = 0,049$) ve LD50/8 arasında ($p = 0,041$) istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

Çizelge 3.1. Gruplara göre bazı plazma lipid parametreleri

Kan Lipitleri (mg/dL)	KONTROL (n=8) Ort. $\pm$ SS	LD50/32 (n=8) Ort. $\pm$ SS	LD50/24 (n=8) Ort. $\pm$ SS	LD50/16 (n=8) Ort. $\pm$ SS	LD50/8 (n=8) Ort. $\pm$ SS	TOPLAM (n=40) Ort. $\pm$ SS
HDL-K	$38,1 \pm 1,75$	$39,2 \pm 1,49$	$60,4 \pm 7,56$	$44,7 \pm 2,59$	$50,3 \pm 3,70$	$46,5 \pm 1,32$
LDL-K	$92,6 \pm 2,24$	$84,8 \pm 1,23$	$135,2 \pm 5,84^a$	$92,3 \pm 9,81$	$72,3 \pm 3,73^b$	$95,4 \pm 4,71$

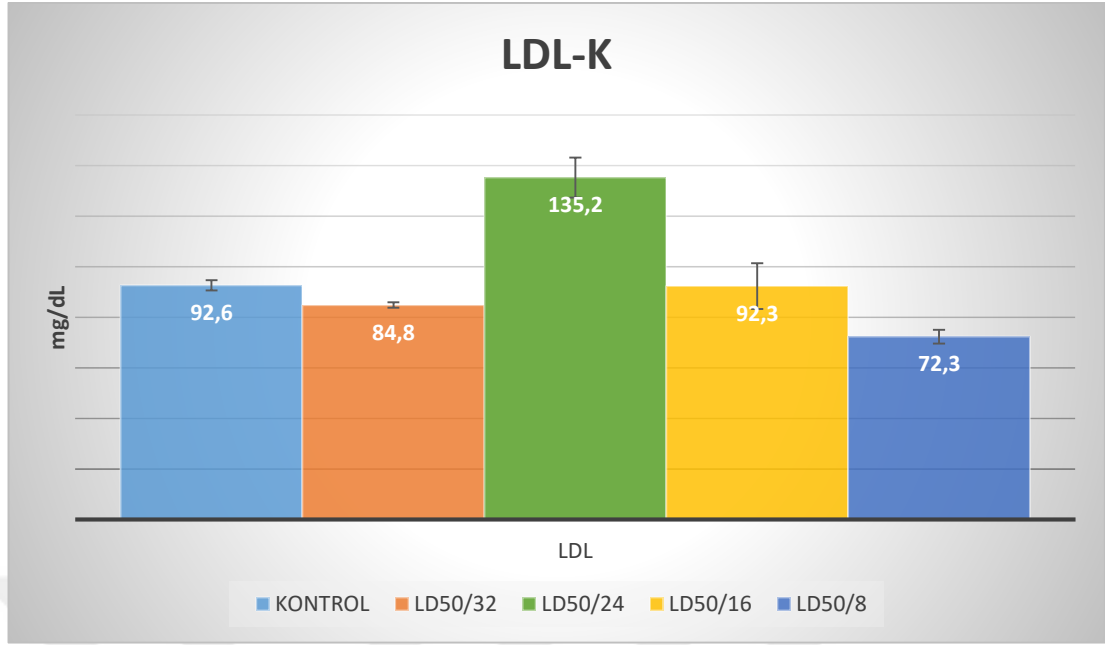
Ort.: Ortalama; SS: Standart Sapma; **a**: LD50/32 grubuna göre; **b**: LD50/24 grubuna göre istatistiksel önemliliği göstermektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma ortalaması olarak ifade edilmiştir. SG dozu ile HDL için korelasyon değeri: 0,27, LDL için korelasyon değeri: 0,05 bulunmuştur. Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Gruplara ait HDL-K değerleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Bu şekle göre; gruplar arasında en yüksek HDL kolesterol değerinin LD50/24 doz grubunda olduğu, en düşük değerin ise, kontrol grubunda olduğu görülmektedir. Kontrol grubundan sonra LD50/32 grubu en düşük HDL kolesterol değerine sahip olan gruptur.



Şekil 3.1. Gruplara ait HDL-K değerleri

Gruplara ait LDL-K değerleri Şekil 3.2’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi; gruplar arasında en düşük LDL kolesterol değeri LD50/8 doz grubunda, en yüksek değer ise, LD50/24 grubundadır. LD50/8 grubundan sonra en düşük değerin LD50/32 grubunda olduğu; LD50/24 grubundan sonra en yüksek değerin ise, kontrol grubunda olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.2. Gruplara ait LDL-K değerleri

3.2. Oksidatif Hasar İndeks Parametrelerine İlişkin Bulgular

Çizelge 3.2’de TAS, TOS, PON-1 ve OSİ parametrelerinin ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. TAS değerlerine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,19$). En yüksek TAS değerinin LD50/32 grubunda olduğu, en düşük değerin ise LD50/8 grubunda olduğu görülmektedir. Verilen doz miktarı arttıkça, TAS değeri düşmektedir.

TOS değerlerine bakıldığı zaman yine gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte, en yüksek değerin LD50/8 doz grubunda olduğu, en düşük değerin ise $17,2 \pm 7,28$ $\mu\text{mol/L}$ değeriyle kontrol grubunda olduğu görülmektedir ($p=0,12$).

PON-1 enzimi aktivitesi açısından en yüksek değerin kontrol grubunda, en düşük değerin ise en yüksek doz grubu olan LD50/8’de bulunduğu görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığa bakıldığında; kontrol grubu ile

LD50/24 grubu arasında anlamlılık saptanmıştır ($p=0,007$). Buna ek olarak kontrol grubu ile LD50/8 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,002$).

OSİ değeri, deney grupları arasında en yüksek LD50/8, en düşük LD50/32’de olduğu bulunmuştur. Verilen SG dozundaki artışa bağlı olarak, OSİ değerinin arttığı görülmüş, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.2. Gruplara ait TAS, TOS, PON-1 ve OSİ değerleri

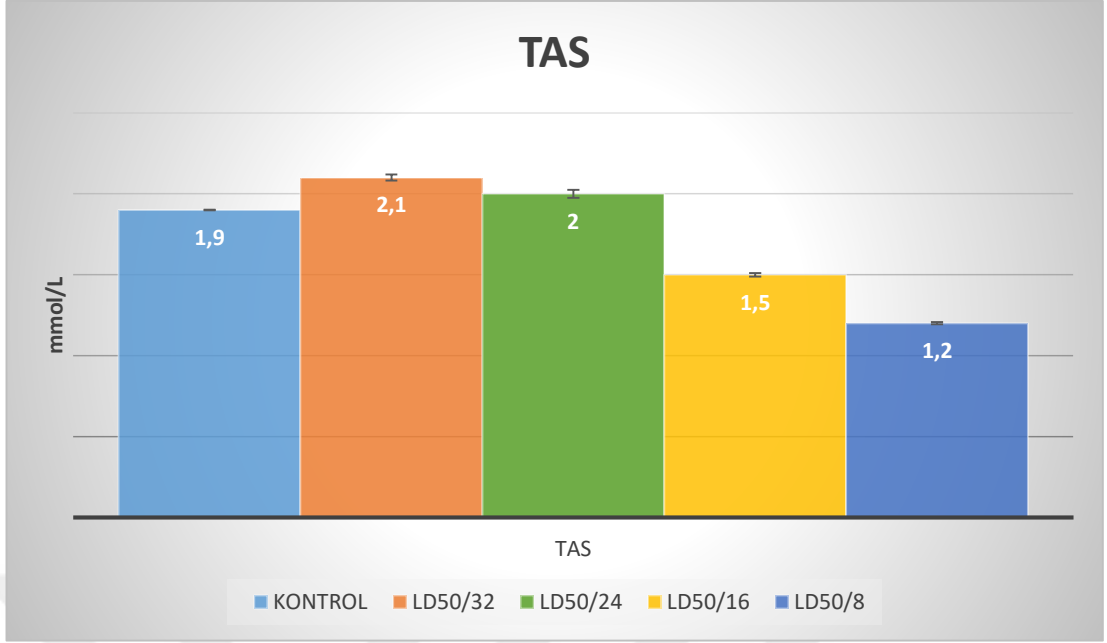
	KONTROL (n=8) Ort. ± SS	LD50/32 (n=8) Ort. ± SS	LD50/24 (n=8) Ort. ± SS	LD50/16 (n=8) Ort. ± SS	LD50/8 (n=8) Ort. ± SS	TOPLAM (n=40) Ort. ± SS
TAS * (mmol/L)	1,9 ± 0,13	2,1 ± 0,90	2,0 ± 1,26	1,5 ± 0,71	1,2 ± 0,58	1,7 ± 0,83
TOS ** (μmol/L)	17,2 ± 7,28	35,8 ± 26,41	49,4 ± 41,21	37,5 ± 23,13	50,4 ± 26,48	38,1 ± 28,45
PON-1 * (U/L)	733,6 ± 99,49	630,3 ± 135,75	428,6 ± 164,39 ^a	560,1 ± 135,69	390,9 ± 256,17 ^a	548,7 ± 203,69
OSİ ** (AU)	0,9 ± 0,35	2,2 ± 1,85	3,1 ± 3,77	4,4 ± 6,57	6,7 ± 6,75	3,5 ± 4,81

a: Kontrol grubuna göre istatistiksel önemliliği göstermektedir. Değerler ortalama ± standart sapma ortalaması olarak ifade edilmiştir. SG dozu ile korelasyon değeri TAS için; -0,70, TOS için; 0,65, PON-1 için; -0,71, OSİ için; 0,97 bulunmuştur.

* One-Way ANOVA testi kullanılmıştır.

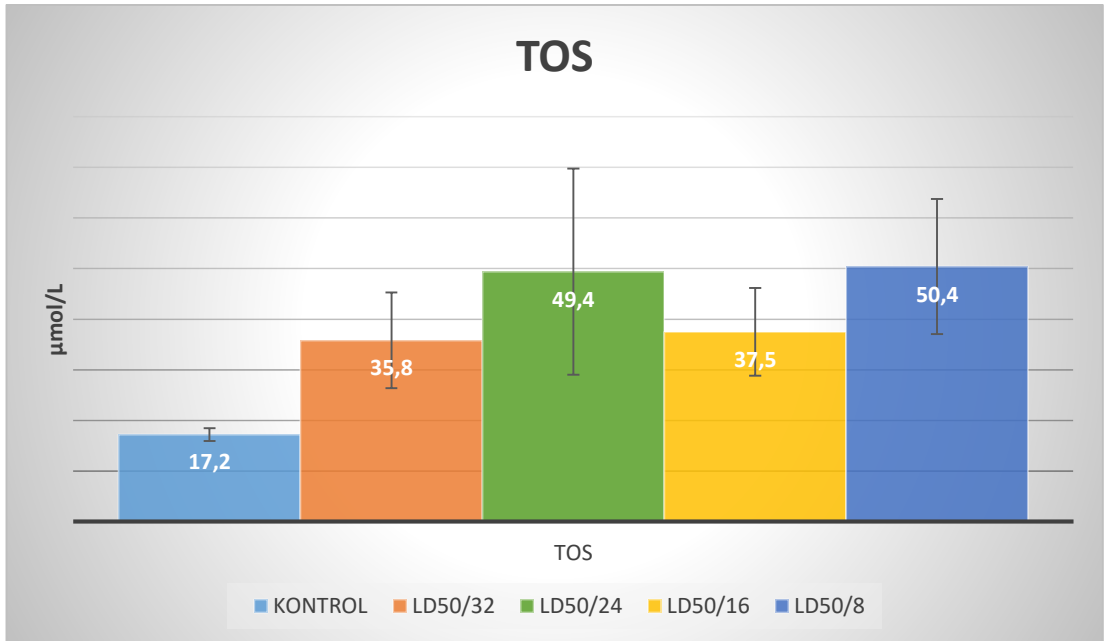
**Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Gruplara ait TAS değerleri Şekil 3.3’te verilmiştir. Şekil 3.3’te görüldüğü gibi, TAS değeri verilen doza göre ters orantılı olarak azalmaktadır.



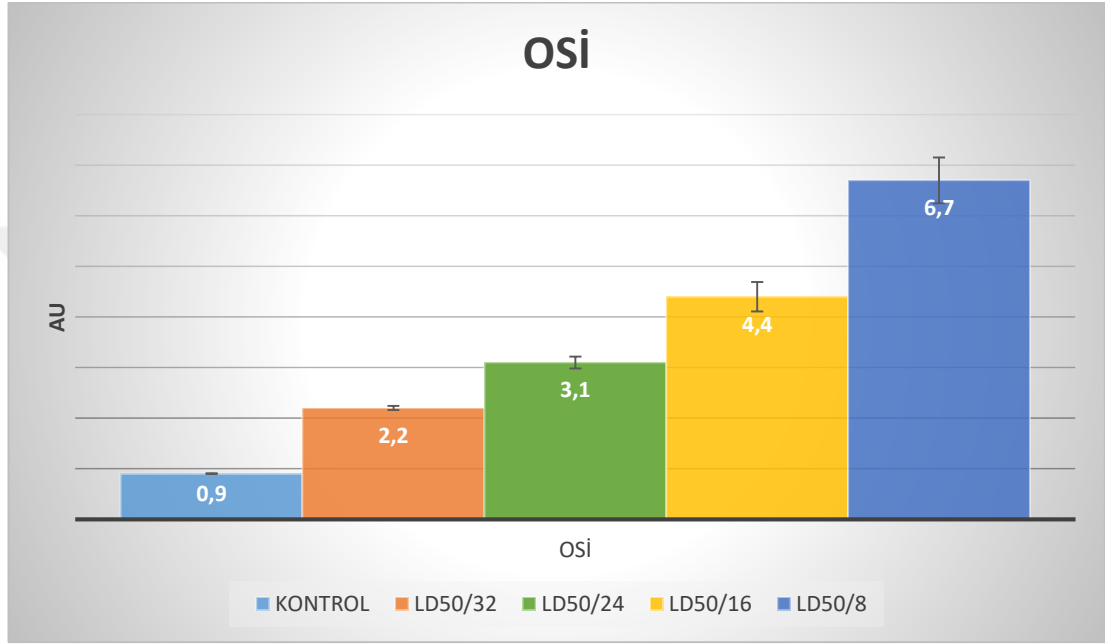
Şekil 3.3. Gruplara ait TAS değerleri

Şekil 3.4'te gruplara ait TOS değerleri verilmiştir. Şekil 3.4'ten görüldüğü gibi, en düşük TOS değeri kontrol grubundadır. Deney grupları içerisinde ise en düşük TOS değeri en düşük doz SG'nin verildiği LD50/32 grubundadır. En yüksek TOS değeri ise en yüksek doz SG'nin verildiği LD50/8 grubundadır.



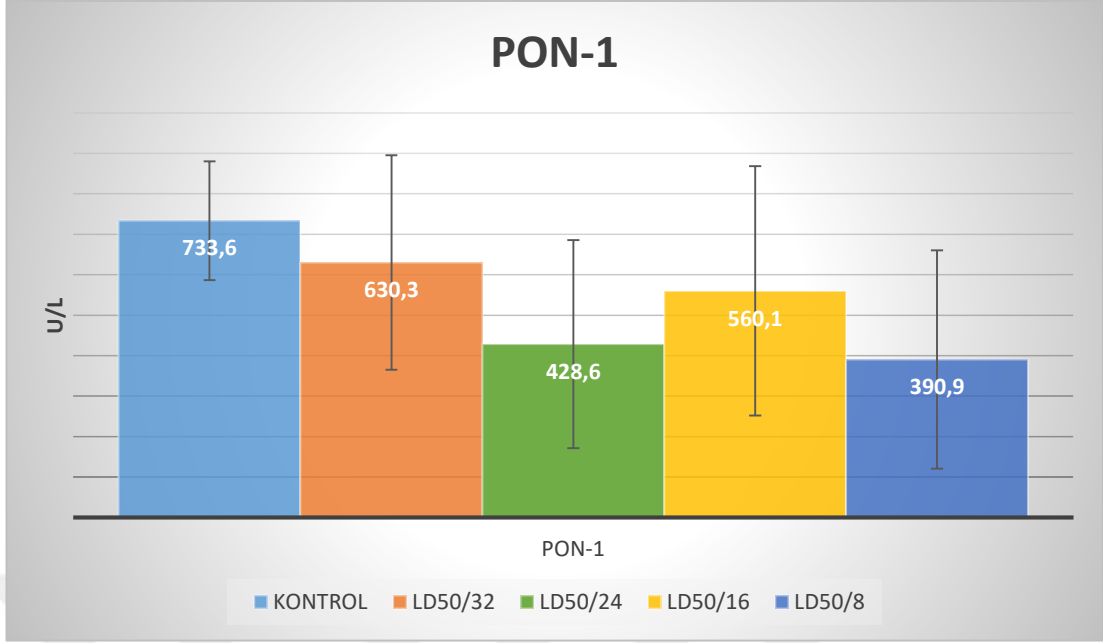
Şekil 3.4. Gruplara ait TOS değerleri

Gruplara ait OSİ değerleri Şekil 3.5'te verilmiştir. OSİ değeri bakımından gruplar ele alındığında; en yüksek değerin LD50/8 grubunda, en düşük değerin ise kontrol grubunda olduğu bulunmuştur. Şekilde kontrol grubundan LD50/8 grubuna doğru OSİ değerinin artmış olduğu görülmektedir. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 3.5. Gruplara ait OSİ değerleri

Gruplara ait PON-1 değerleri Şekil 3.6'da verilmiştir. Buna göre, en yüksek PON-1 değerinin kontrol grubundadır. Deney grupları içerisinde ise en yüksek değer LD50/32 grubundadır. Gruplar arasında en düşük PON-1 değeri ise, LD50/8 grubunda bulunmaktadır. LD50/24 grubu ise LD50/8 grubundan sonra en düşük PON-1 değerine sahip grup olmuştur.



Şekil 3.6. Gruplara ait PON-1 değerleri

Farelerin TAS ve TOS değerleri ile hesaplanan OSİ sınıflaması çizelge 3.3'te verilmiştir. Bu sınıflamaya göre “Çok yüksek oksidatif stres” sınıfında yer alan farelerin %44,5’inin LD50/8 grubunda olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda “Çok yüksek oksidatif stres” sınıfında olan fare bulunmamaktadır. “Yüksek oksidatif stres” sınıfında kontrol grubu ile LD50/16 grubunun eşit yüzdeye sahip oldukları görülmektedir (%27,8). “Yüksek oksidatif stres” sınıfında en az yüzdeye sahip olan grubun ise, LD50/24 olduğu bulunmuştur (%5,5). “Oksidatif stres” sınıfında sadece 1 fare yer almaktadır ve bunun LD50/24 grubunda olduğu saptanmıştır. “Balans-hastalıklara dikkat” sınıfında LD50/32 ile LD50/24 grubunun eşit ve en yüksek yüzdeye sahip oldukları (%36,4) ve bu sınıfta LD50/8 grubunun bulunmadığı görülmektedir. OSİ sınıflamasında “normal seviye” sınıfında sadece kontrol grubundan 1 farenin yer aldığı görülmektedir. Tüm farelere genel olarak bakıldığında çoğunluğun “yüksek oksidatif stres” grubunda yoğunlaştığı görülmektedir (n=18). Doz grupları birbiriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

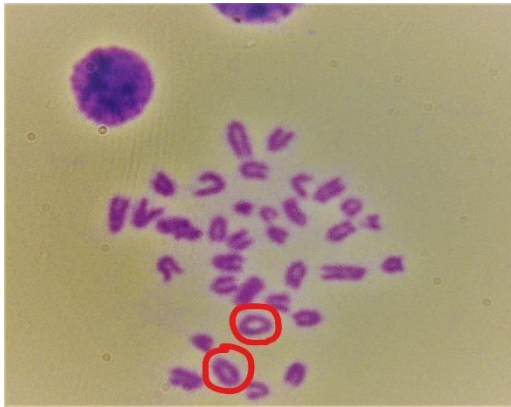
Çizelge 3.3. Gruplara ait OSİ Sınıflaması

OSİ Sınıflaması	KONTROL (n=8)		LD50/32 (n=8)		LD50/24 (n=8)		LD50/16 (n=8)		LD50/8 (n=8)		TOPLAM (n=40)	
	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%
Çok Yüksek Oksidatif Stres	-	-	1	11,1	2	22,2	2	22,2	4	44,5	9	100,0
Yüksek Oksidatif Stres	5	27,8	3	16,7	1	5,5	5	27,8	4	22,2	18	100,0
Oksidatif Stres	-	-	-	-	1	100,0	-	-	-	-	1	100,0
Balans-Hastalıklara Dikkat	2	18,2	4	36,4	4	36,4	1	9,0	-	-	11	100,0
Normal Seviye	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0

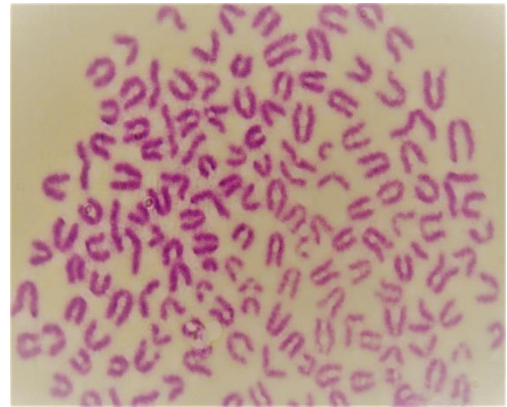
Chi-Square Testi kullanılmıştır.

3.3. Genetik Parametrelere İlişkin Bulgular

Çalışmada kromozomal anormallikler ile ilgili bulgular çizelge 3.4’te verilmiştir. Buna göre; anormal hücre (AH) yüzdesinin en yüksek olduğu grubun LD50/16 olduğu görülmektedir. Aynı zamanda hücre başına düşen KA değerinin en yüksek olduğu grup yine LD50/16’dır. Kontrol grubunda herhangi bir KA bulunmamıştır. Kontrol grubundan sonra en az KA’nın bulunduğu grubun LD50/32, yani en düşük doz SG’nin verildiği grup olduğu görülmektedir. KA genel olarak ele alındığında, en çok karşılaşılan anormalliğin SU (Sister Union-kardeş kromatid birleşimi) olduğu saptanmıştır (Şekil 3.7) ve bunu poliploidi (Şekil 3.8) takip etmektedir. En yüksek doz SG verilen LD50/8 grubunun sonuçları orta doz grup olarak adlandırılabilen LD50/24 grubuyla benzerdir.



Şekil 3.7. SG uygulamasıyla fare kromozomlarında gözlenen SU



Şekil 3.8. SG uygulamasıyla fare kromozomlarında gözlenen poliploidi

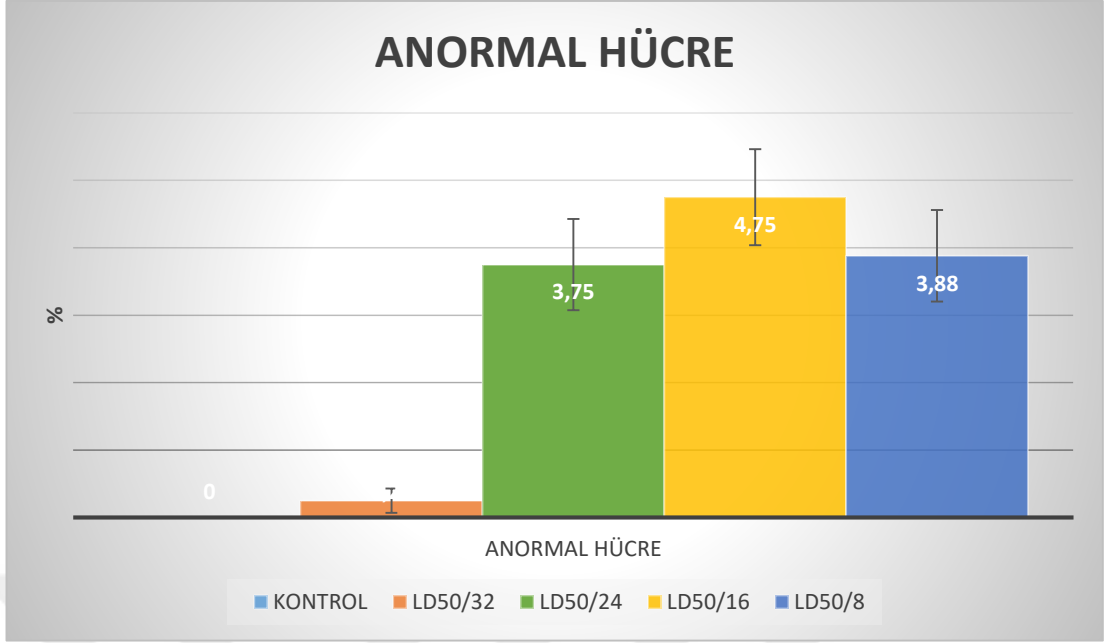
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AH yüzdesi ve KA/hücre sayısı bakımından LD50/32 grubu dışında tüm gruplar ile istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,001$). LD50/32 ile kontrol grubu arasında AH yüzdesi ve KA/hücre sayısı bakımından anlamlılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 3.4. Steviol glikozid uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan kromozomal anormallikler

ETKEN MADDE	UYGULAMA			KROMOZOMAL ANORMALLİKLER									
	Süre (gün)	Grup Adı	Doz (mg/kg)	KzK	KtK	F	P	SU	KD	DS	H	AH $\pm$ SH (%)	KA/Hücre $\pm$ SH
	28	Kontrol	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steviol Glikozid	28	LD50/32	470	-	-	-	-	1	-	-	1	0,25 $\pm$ 0,18	0,003 $\pm$ 0,019
	28	LD50/24	620	2	1	-	5	17	-	-	5	3,75 $\pm$ 0,67 ^{a,b}	0,038 $\pm$ 0,069 ^{a,b}
	28	LD50/16	940	-	2	2	9	22	1	-	2	4,75 $\pm$ 0,75 ^{a,b}	0,048 $\pm$ 0,077 ^{a,b}
	28	LD50/8	1880	-	-	1	4	18	-	5	3	3,88 $\pm$ 0,68 ^{a,b}	0,039 $\pm$ 0,070 ^{a,b}
	28	LD50/4	3640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

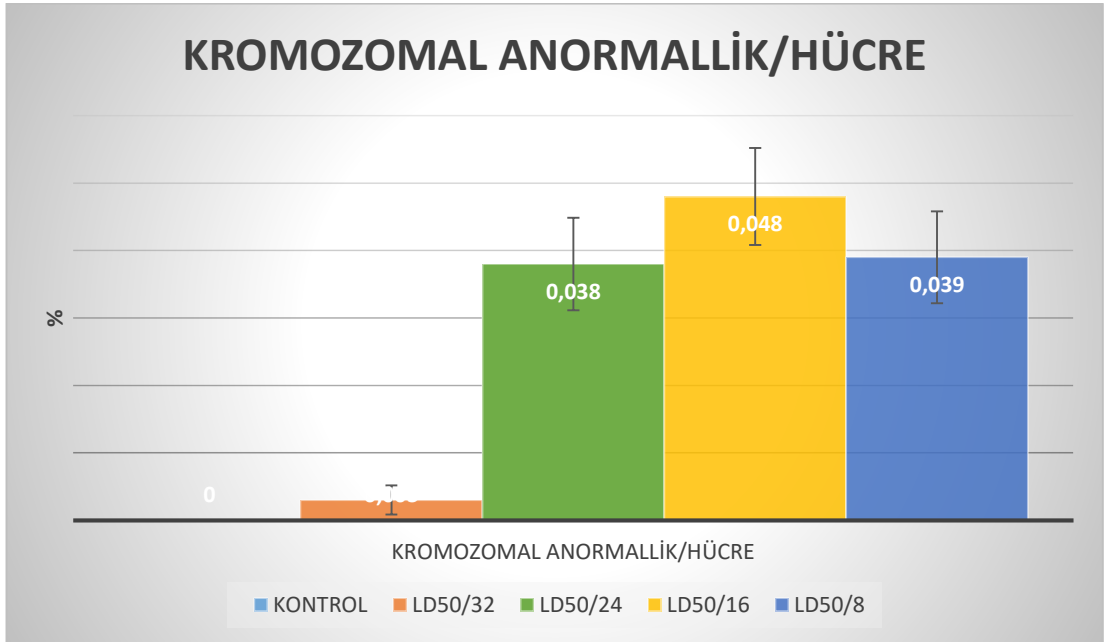
a: Kontrol grubuna göre; b: LD50/32 grubuna göre istatistiksel önemliliği göstermektedir. KzK: Kromozom kırığı; KtK: Kromatid kırığı; F: Fragment; P: Poliploidi; SU: Kardeş kromatid birleşimi; KD: Kromatid değişimi; DS: Disentrik; H: Halka kromozom; AH: Anormal hücre; SH: Standart hata; KA: Kromozomal anormallik Z testi uygulanmıştır. SG dozu ile korelasyon değeri KA/Hücre için; 0,76, AH yüzdesi için; 0,74 olduğu bulunmuştur.

Şekil 3.9’da gruplara ait anormal hücre yüzde değerleri verilmiştir. Şekil 3.9’dan da görüldüğü gibi; en yüksek AH yüzdesi LD50/16 grubunda, en düşük AH yüzdesi ise; kontrol grubundadır.



Şekil 3.9. Gruplara ait anormal hücre yüzde değerleri

Şekil 3.10’da gruplara ait KA/hücre yüzde değerleri verilmiştir. Şekilde en yüksek KA/hücre yüzdesinin LD50/16 grubunda, en düşük yüzdenin ise; kontrol grubunda olduğu görülmektedir.



Şekil 3.10. Gruplara ait kromozomal anormallik/hücre yüzde değerleri

Çizelge 3.5'te farklı dozlardaki steviol glikozidin hücre döngüsü aktivitesi üzerine etkileri verilmiştir. Bu çizelgeye göre; en düşük Mİ kontrol grubundadır. Deney grubunda ise, en düşük Mİ, LD50/32 grubunda, en yüksek Mİ LD50/16 grubundadır. En yüksek doz steviol glikozid verilen LD50/8 grubunun Mİ değerinin LD50/24 grubundan nispeten daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca KA ve Mİ aktivitesi birlikte değerlendirildiğinde sonuçların LD50/24 doz grubunda maksimum olduğu, LD50/8 ile LD50/24 grubunun sonuçlarının ise birbirine yakın olduğu görülmektedir.

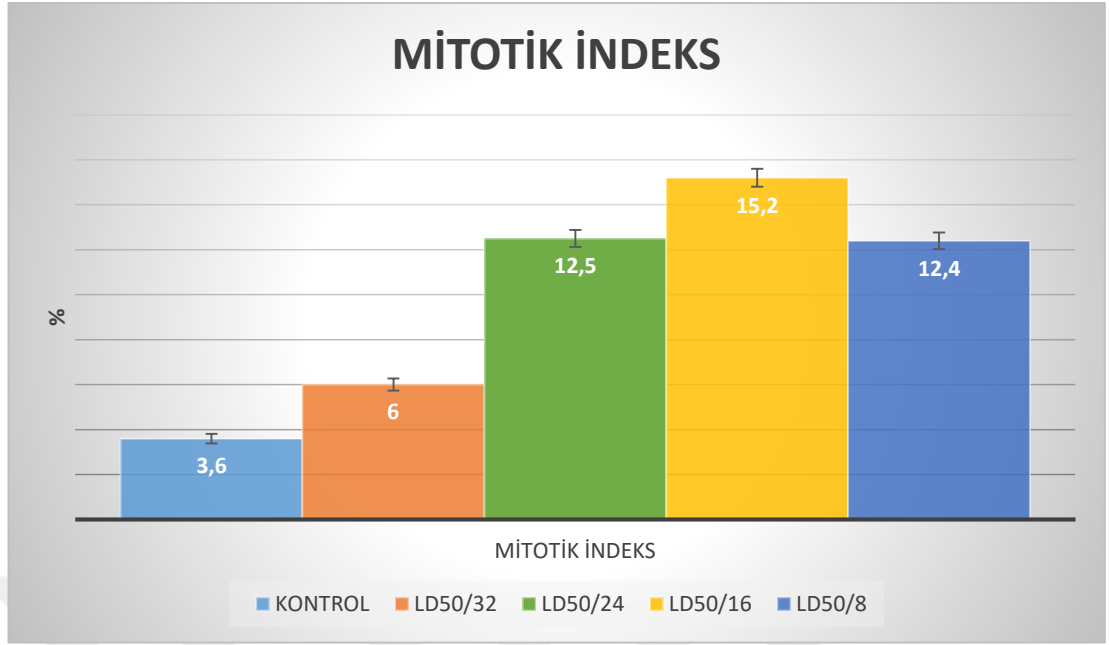
Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,001$). LD50/32 grubu ile diğer gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,001$). LD50/24 grubunun LD50/8 grubu dışındaki diğer gruplarla arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$). LD50/16 grubu ile diğer tüm gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 3.5. Steviol glikozid uygulanan gruplarda mitotik indeks değerleri

ETKEN MADDE	UYGULAMA			MİTOTİK İNDEKS		
	Süre (gün)	Grup Adı	Doz (mg/kg)	Sayılan Hücre Sayısı	Bölünen Hücre Sayısı	Mİ $\pm$ SH (%)
Steviol Glikozid	28	Kontrol	0	8000	287	3,6 $\pm$ 0,21 ^{b,c,d}
	28	LD50/32	470	8000	482	6,0 $\pm$ 0,27 ^{a,c,d}
	28	LD50/24	620	8000	1003	12,5 $\pm$ 0,37 ^{a,b,d}
	28	LD50/16	940	8000	1215	15,2 $\pm$ 0,40 ^{a,b,c}
	28	LD50/8	1880	8000	988	12,4 $\pm$ 0,37 ^{a,b,d}

a:Kontrol grubuna göre; **b:**LD50/32 grubuna göre; **c:**LD50/24 grubuna göre; **d:**LD50/16 grubuna göre istatistiksel önemliliği göstermektedir. Mİ: Mitotik indeks; SH: Standart hata
SG dozu ile mitotik indeks değeri arasındaki korelasyon katsayısı; 0,74 olarak bulunmuştur.
Z testi uygulanmıştır.

Şekil 3.11'de gruplara ait Mİ değerlerinin yüzde olarak ifadeleri verilmiştir. En yüksek Mİ yüzdesine sahip olan grubun LD50/16 olduğu görülmektedir. En düşük Mİ yüzdesi ise, kontrol grubundadır.



Şekil 3.11. Gruplara ait mitotik indeks yüzde değerleri

4. TARTIŞMA

Bu çalışma *in-vivo* bir çalışma olup, araştırmanın örneklemini 40 adet Balb/c cinsi farelerdir. Çalışmada SG'nin oksidatif hasar indeks parametreleri ve bazı genetik parametreler üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada plazma lipid parametrelerinden HDL-K ve LDL-K, oksidatif hasar indeks parametreleri; TAS, TOS, PON-1, genotoksisite ve sitotoksisite değerlendirmesi için KA/hücre oranı ve Mİ yüzdesi incelenmiştir.

4.1. Steviol Glikozidin Plazma Lipid Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Steviol glikozidin barsaklardan yağ emilimini azalttığı ve lipid metabolizması yolları üzerinde etkileri olduğu, bu yolla da plazma lipid parametrelerini etkilediği ve bu nedenle hiperlipidemik hastalarda terapötik etkileri olabileceği belirtilmektedir (Atteh ve ark., 2008 ve Holvoet ve ark., 2015). Hiperlipidemik hastalarda terapötik etkileri olabileceğini kanıtlar nitelikte yapılan bir çalışmada, 12 haftalık 34 obez fare kullanılmış, fareler kontrol grubu ve 10 mg/kg/gün dozunda steviosid verilen deney grubu olmak üzere 2'ye ayrılmış ve 12 hafta deney süresinin sonunda kan lipidleri incelenmiştir. Total kolesterol değerinin steviosid verilen farelerde kontrol grubuna göre düşük olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,01$). Trigliserit değerlerinin ise steviosid grubunda daha düşük olduğu bulunmuş, fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ($p>0,05$) (Geeraert ve ark., 2010).

Bu çalışmada kontrol grubu ile deney gruplarının HDL-K düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak SG verilen tüm gruplarda HDL-K düzeyi kontrol grubundan yüksektir. SG verilen gruplar içerisinde en yüksek HDL-K değeri LD50/24 grubunda, en düşük değer ise LD50/32 grubunda bulunmuştur. En düşük doz SG verilen LD50/32 grubunun HDL-K değeri kontrol grubundan sonra en düşük değerdir. LD50/24 grubundan sonra en yüksek HDL-K değeri LD50/8 grubunda

bulunmuştur (çizelge 3.1). Yapılan regresyon analizi sonucunda HDL-K değerinin doza bağlı değişmediği bulunmuştur ($r=0,27$).

Bu çalışmada LDL-K değerinin LD50/24 grubunda en yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). En düşük LDL-K değeri LD50/8 grubunda olup, bu grup en yüksek dozun verildiği gruptur. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada, HDL-K değerinin SG dozu ile ilişkili olmadığı, LDL-K değeri için ise yüksek doz SG uygulaması sonucu anlamlı bir düşüş görülmesine rağmen, LDL-K değerinin doza bağlı değişmediği sonucuna varılmıştır ($r=0,05$) (Çizelge 3.1). Konu ile ilgili yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda farklı sonuçlar da olduğu görülmektedir. Savita ve arkadaşlarının (2004) 30-55 yaş arası hipertansif ve diyabetik 30 hasta üzerinde yaptığı bir çalışmada, bireylere 30 gün boyunca 0,5 g/gün ve 1 g/gün SG verilmiş ve kan lipid parametreleri incelenmiştir. Çalışma sonunda her iki grupta da başlangıça göre HDL-K değerleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuş, fakat LDL-K değerindeki düşüşün anlamlı olmadığı belirtilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, herhangi bir ilaç kullanmayan 20 hiperkolesterolemi hastası kadına 30 gün boyunca 3,3 g/gün stevia ekstraktı verilmiştir. Çalışma başlangıcında HDL-K değeri $47,9\pm9,26$ mg/dL iken, çalışma sonunda $49,8\pm9,23$ mg/dL'ye çıkmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). Aynı çalışmada LDL-K değeri, $129,7\pm17,48$ mg/dL'den $125,0\pm18,74$ mg/dL'ye düşmüş, bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$) (Sharma ve ark., 2009). Bu çalışmada ise, HDL-K ve LDL-K değerinde değişimler olduğu fakat tüm gruplar arasında anlamlı olmadığı bulunmuştur. Bunun nedeni, kullanılan SG dozlarının Sharma ve arkadaşlarının çalışmasında uygulanan doza göre çok daha düşük olması ile açıklanabilir.

Normal diyet ve yüksek yağlı diyetle beslenen toplam 40 fare üzerinde yapılan bir çalışmada, deney grubuna 1000 mg/kg dozda stevia ekstraktı verilerek yüksek yağlı diyetle beslenmiş, kontrol grubu ise yalnızca normal diyet ile beslenmiştir. Stevia ekstraktı verilen ve yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin 15 hafta sonunda, kontrol

grubuna göre HDL-K değerlerinin daha yüksek olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir (Park ve Cha, 2010).

Görüldüğü gibi, çalışmalardan elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Bu nedenle, tek bir yoruma ulaşabilmek şu an için pek mümkün olamamaktadır. Bu farklılıkların başlıca nedenleri; farklı stevia bileşenlerinin kullanılması, uygulama dozlarındaki farklılıklar ve test organizmasının farklı olması şeklinde düşünülmektedir.

4.2. Steviol Glikozidin Oksidatif Hasar İndeks Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Son yıllarda, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde, doğal antioksidanlardan zengin taze meyve ve sebzeler ile bitki çaylarının tüketimi üzerinde durulmaktadır (Atrooz, 2009 ve Yanishlieva-Maslarova ve Heinonen, 2001). Bu bitkisel besinlerin koruyucu etkileri, yapısında bulunan bileşenlerin varlığına bağlıdır. Enzimler, proteinler, vitaminler, karotenoidler, flavonoidler, antosiyaninler ve diğer fenolik bileşiklerin dâhil olduğu düşük molekül ağırlıklı bileşikler buna örnek verilebilir (Halliwell, 1996 ve Zhang ve Wang, 2002). Günümüzde artan antioksidan ihtiyacını karşılamak amacıyla sentetik antioksidanlar üretilmiş fakat bunların yan etkileri nedeniyle bazı endişeler gündeme gelmiştir. Bu nedenle doğal besinlerden elde edilen, yüksek koruyucu etkiye sahip, güvenilir ve ekonomik antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda stevia gündeme gelmiş, stevia yaprağında bulunan fenolik bileşikler ve bazı vitaminlerin antioksidan aktive gösterip göstermediği konusu ise halen netlik kazanmamıştır (Holiman ve ark., 1996 ve Kähkönen ve ark., 1999). Stevianın antioksidan içeriğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, SOD, GPX, CAT gibi bazı karaciğer enzimleri veya besinin fenolik ve/veya flavonoid içeriklerinden yararlanıldığı görülmektedir (Abou-Arab ve Abu-Salem, 2010; Bracht ve ark., 1985; Kim ve ark., 2011; Özbayer ve ark., 2011 ve Tadhani ve ark., 2007).

Stevianın antioksidan bileşenlerinin incelendiği bir çalışmada, stevia yapraklarının toplam antioksidan aktivitesi; kuru ağırlık bazında, gram başına gallik asit, askorbik asit, yapay antioksidan olan BHA (bütilat hidroksianisol) ve troloks eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Stevia yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin; 9,66 g gallik asitin, 25,7 g askorbik asitin, 20,2 g BHA'nın ve 38,2 g troloksın sahip olduğu antioksidana eş değer olduğu bulunmuştur. Stevia yaprakları ise, diğer antioksidan maddelere göre çok güçlü olmasa da antioksidan özelliğe sahiptir (Tadhani ve ark., 2007).

Stevianın antioksidan içeriği ile ilgili yapılan bir çalışmada, 1 mg stevia ekstraktının total fenolik içeriğinin $130,7 \pm 2,23$ µg kateşin eşdeğeri/mg, total flavonoid içeriğinin $15,6 \pm 0,25$ µg kuersetin eşdeğeri/mg olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada stevia yaprağının yüksek antioksidan bileşenlere sahip olması nedeniyle doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği üzerinde durulmuştur (Kim ve ark., 2011).

In-vitro koşullarda steviosid ve inülinin antioksidan etkilerini karşılaştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, steviosidin inüline göre daha düşük konsantrasyonda süperoksit radikalini inhibe ettiği bulunmuş, hidrojen peroksit radikalinin inhibisyonunda inüline göre daha yüksek konsantrasyonda steviosid gerektiği bildirilmiştir ($p < 0,05$). Çalışma sonunda, steviosid ve inülinin sadece yiyecek ve içecekleri tatlandırmak amacıyla değil, antioksidan olarak da kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Stoyanova ve ark., 2011).

Bu çalışmada farklı dozlarda verilen stevia bitki özütü SG'nin, oksidatif indeks parametreleri olan TAS, TOS ve PON-1 aktivesi ve OSİ değeri üzerine etkileri incelenmiştir. Yöntem ve incelenen parametreler itibarıyla bu çalışma, literatürde stevia ile yapılan tek çalışmadır. Verilen SG dozu ile TAS değeri ele alındığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte ($p > 0,05$), en yüksek TAS değeri LD50/32 grubunda görülmüş, bunu LD50/24 grubu takip etmiştir (Şekil 3.3). Ayrıca bu iki grubun TAS değerleri kontrol grubuna göre daha yüksektir.

Doz LD50/16 düzeyine çıktığında TAS değerinin kontrol grubundan daha düşük olduğu görülmüştür. Çalışmada en düşük TAS değerinin, en yüksek doz verilmiş olan LD50/8 grubunda olduğu ve bu değer $1,2 \pm 0,58$ mmol/L olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Bu nedenle; SG'nin LD50/32 ile LD50/24 dozlarında vücutta antioksidan seviyesinin arttığı, LD50/16 ve üzeri dozlarda ise antioksidan etkisinin kontrol grubundan bile daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur. TAS değeri ile SG dozu arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır ($r=-0,70$). Bu nedenle, SG dozundaki artışa bağlı olarak antioksidan aktivitenin azaldığı sonucuna varılmıştır (Şekil 3.3).

Çalışmada TOS değerlerine bakıldığında, dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da ($p>0,05$), en düşük TOS değerinin kontrol grubunda olduğu bulunmuştur. Deney grupları arasında ise en düşük TOS değeri en düşük doz SG'nin verildiği LD50/32 grubundadır. Kontrol grubunun TOS değeri $17,2 \pm 7,28$ $\mu\text{mol/L}$, LD50/32 grubunun ise, $35,8 \pm 26,41$ $\mu\text{mol/L}$ 'dir (çizelge 3.2). LD50/32 grubunun TOS değerinin kontrol grubuna göre yaklaşık 2 katı yüksek olduğu görülmektedir. Yani, en düşük dozda SG verilmesi bile TOS değerinin 2 katına çıkmasına yol açmıştır. En yüksek dozun verildiği LD50/8 grubunun TOS değeri, çalışmadaki en yüksek değer olup, bu değer kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat fazladır (Şekil 3.4). TOS değeri ile SG dozu arasında pozitif korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır ($r=0,65$).

Çalışmada incelenen bir diğer parametre PON-1 aktivitesidir. PON-1; 354 aminoasitten oluşan, paraoksonaz, arilesteraz, laktonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolaz enzimidir (Ceron ve ark., 2014). Enzim aktivitesi Ca^{+2} 'a bağımlıdır. İnsan karaciğerinde sentezlenmekte ve kana salınmaktadır (Rozek ve ark., 2005). Kanda %80'den fazlası HDL-K ile taşınmakta, ayrıca VLDL ve şilomikron yapısında da az miktarda olduğu belirtilmektedir (Gugliucci ve Menini, 2015). PON-1 insanlarda, kalp, karaciğer, böbrek, akciğer, mide, ince bağırsak, dalak, plasenta ve testiste bulunmaktadır (Mackness ve ark., 2010). PON-1'in vücutta, özellikle HDL-K ve LDL-K'nin yükseltgenmesini önleyen, lipid peroksidleri metabolize eden ve arterosklerozise karşı koruyucu olduğu bilinen laktonaz aktivitesi ile etki gösterdiği bilinmektedir (Lu ve ark., 2006). PON-1'in daha çok LDL-K ve total kolesterol

düzeyleri, hiperkolesterolemi, koroner arter hastalığı, tip 2 diyabet, Parkinson hastalığı ve inme gibi hastalıklarla ilişkisi incelenmiştir (Medina-Díaz ve ark., 2017). Diyetin yağ miktarı ve kompozisyonu, antioksidan vitamin ve mineraller, polifenol içeriği yüksek besinler, genetik faktörler, ilaç ve yaşam tarzı PON-1 aktivitesini etkilemektedir (Schrader ve Rimbach, 2011). Bu çalışmada PON-1 aktivitesinin SG dozları ile ilişkisi ele alınmıştır. PON-1 düzeyinin en yüksek olduğu grup, kontrol grubu iken, en düşük olduğu grup, en yüksek doz SG verilen LD50/8'dir. LD50/8 ile kontrol grubu karşılaştırıldığında farkın anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). LD50/8 grubundan sonra en düşük PON-1 düzeyinin LD50/24 grubunda olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 3.2). Deney grupları arasında en yüksek PON-1 düzeyi, en düşük doz SG verilen LD50/32 grubunda bulunmuştur ($p>0,05$). LD50/32 grubundan sonra en yüksek PON-1 düzeyi LD50/16 grubundadır ($p>0,05$). PON-1 değeri ile SG dozu arasında negatif korelasyon bulunmuş olup, SG dozu artışına bağlı olarak PON-1 değerinin azaldığı sonucuna varılmıştır ($r=-0,71$).

PON-1 düzeyinin dolaylı olarak HDL-K ve LDL-K düzeylerindeki artışı önlediği bilinmektedir (Gugliucci ve Menini, 2015 ve Lu ve ark., 2006). Çalışmada PON-1 düzeyleri ile HDL-K değerleri karşılaştırıldığında; PON-1 düzeyinin yüksek bulunduğu gruplarda HDL-K değerlerinin düşük olduğu bulunmuştur. Buna göre sadece LD50/8 ve LD50/24 dışındaki gruplarda, PON-1 ile HDL-K değerleri arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür ($r=-0,73$) (Şekil 3.1 ve Şekil 3.6). PON-1 düzeyi ile LDL-K değeri karşılaştırıldığında; negatif korelasyon bulunmamıştır. Bunun yanı sıra, en düşük PON-1 değerinin olduğu LD50/8 grubunda, en düşük LDL-K değeri bulunmuştur ($r=0,04$). Bu çalışmada PON-1 düzeyi ile HDL-K değeri arasında negatif korelasyon olduğu, fakat LDL-K değeri ile arasında korelasyon olmadığı sonucuna varılmıştır. Konu ile ilgili olarak 710 koroner arter hastası birey ve 199 henüz herhangi bir tanı almamış fakat göğüs ağrısı ile hastaneye başvurmuş sağlıklı bireyler ile yapılan bir çalışmada, PON-1 seviyesinin hasta olan bireylerde sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). PON-1 seviyesinin düşük bulunmasına paralel olarak hasta bireylerin HDL-K değeri de sağlıklı bireylere göre daha düşüktür ($p<0,0001$). LDL-K değerinin ise sağlıklı bireylerde daha yüksek

olduğu fakat bu farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). PON-1 seviyesi ile HDL-K değeri pozitif ilişkili, LDL-K ile negatif ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Garin ve ark., 2006). Bu sonuçların bu çalışmada bulunan sonuçlarla benzerlik göstermediği görülmüştür. Çünkü PON-1 değerinin en düşük olduğu LD50/24 grubunda, HDL-K ve LDL-K değerlerinin diğer gruplara göre en yüksek olduğu bulunmuştur.

PON-1 ile HDL-K ilişkisinin araştırıldığı çift kör randomize kontrollü bir çalışmada, 134 bireyin PON-1 ve HDL-K değerleri incelenmiş ve korelasyonları verilmiştir. Bireylerin ortalama HDL-K değeri $1,16\pm0,31$ mmol/L olarak bulunmuş ve HDL-K düzeyi ile PON-1 seviyesi arasındaki korelasyon katsayısının 0,37 olduğu bildirilmiştir ($p<0,001$). HDL-K düzeyi ile PON-1 aktivitesi arasındaki korelasyon katsayısı ise 0,23'tür ($p<0,05$). Çalışmada LDL-K seviyelerine de bakılmış, oksitlenmiş LDL-K ile PON-1 korelasyonu verilmiştir. Bireylerin ortalama LDL-K değeri $8,19\pm1,95$ mmol/L'dir. PON-1 seviyesi ile oksitlenmiş LDL-K arasında korelasyon katsayısı 0,002 bulunurken ($p>0,05$), PON-1 aktivitesi ile oksitlenmiş LDL-K arasındaki korelasyon katsayısı ise 0,054 olarak belirtilmiştir ($p>0,05$). Bu çalışmanın sonucunda PON-1 aktivitesi ve seviyesinin HDL-K ile pozitif korelasyona sahip olduğu, oksitlenmiş LDL-K ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (van Himbergen ve ark., 2005).

PON-1 seviyesi ile kanser ve HDL-K düzeyinin incelendiği bir çalışmada, pankreas kanseri olan 20 birey ile sağlıklı 20 birey araştırmaya alınmış ve bireylerin PON-1, HDL-K, LDL-K değerleri ölçülmüştür. Kanser olan grubun serum HDL-K düzeyi, $40,21\pm13,82$ mg/dL, kontrol grubunun $47,30\pm6,65$ mg/dL olarak bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,05$). Kanser grubunda ölçülen serum LDL-K düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olmadığı belirtilmiştir ($p>0,05$). Serum PON-1 düzeyleri kanser ve kontrol grubunda sırasıyla $61,57\pm22,44$ U/L ve $87,50\pm23,39$ U/L olarak bulunmuş olup, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir ($p<0,005$). Serum PON-1 aktivitesi ve HDL-K düzeyi arasında pozitif korelasyon bulunmuş, korelasyon

katsayısı 0.69 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). PON-1 ile LDL-K arasında korelasyon olmadığı belirtilmiştir (Akçay ve ark., 2003).

Bu çalışmada TAS ve TOS parametreleri kullanılarak OSİ değeri hesaplanmıştır. OSİ değeri oksidatif strese yatkınlığı belirlemek amacıyla kullanılan, TAS ve TOS değerleri ile hesaplanan oksidatif indeks parametrelerinden biridir (Erel, 2005). Genel olarak, OSİ değerindeki artış oksidatif strese yatkınlığın artması olarak, azalma ise oksidatif strese yatkınlığın azalması olarak değerlendirilmektedir. Abuhandan ve arkadaşlarının (2012) bakteriyel menenjit tanısı alan 25 hastanın 10 günlük tedavi sürecinin öncesi ve sonrasında serum TAS, TOS ve OSİ değerlerini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, TOS ve OSİ değerlerinin tedavi öncesinde daha düşük, TAS değerinin daha yüksek olduğu ve farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir ($p < 0,01$). OSİ değeri tedavi öncesinde; 2.31 ± 1.37 AU, tedavi sonrasında; 1.15 ± 0.32 AU olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada klinik ve bakteriyolojik düzelme sağlanmasının TOS ve OSİ değerini azalttığı, TAS değerini ise attırdığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, OSİ değeri, en yüksek doz uygulaması yapılan LD50/8 grubunda; $6,7 \pm 6,75$ AU, en düşük doz uygulanan LD50/32 grubunda; $2,2 \pm 1,85$ AU'dur. Bu değerlerin ortalaması $3,5 \pm 4,81$ AU olarak saptanmıştır. Deney gruplarının OSİ değerlerinin, LD50/32 grubundan LD50/8 grubuna doğru arttığı görülmektedir ($p > 0,05$). Korelasyon katsayısı 0,97 olarak bulunmuştur. Doz arttıkça OSİ değerinin yükselmesi, etken madde olan SG'nin oksidatif stresi tetiklediği yönünde yorumlanmıştır (Şekil 3.5).

In-vivo olarak yapılan bir çalışmada, 12 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozunda steviosid verilen C57BL6 tipi farelerde SOD enzim düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Çalışma sonunda 10 mg/kg/gün steviosidin farelerde antioksidan etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır (Geeraert ve ark., 2010).

İn-vivo koşullarda stevianın antioksidan etkilerinin araştırıldığı diğerk bir çalışmada, 28 diyabetik ve 21 normal ratın karaciğerk antioksidan enzim düzeyleri incelenmiştir. Çalışmada 200 mg/kg dozunda stevia verilen diyabetik ratların, kontrol grubuna göre SOD ($p<0,05$), ve GPX (Glutasyon peroksidaz) ($p<0,001$) enzim düzeylerinin daha yüksek olduğu fakat MDA (Malondialdehit) ($p<0,01$) düzeyinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Stevia verilen diyabetik grubun, diyabetik kontrol grubuna göre NOS (Nitrik oksit sentaz) enzim düzeylerinin anlamlı şekilde düşük olduğu ($p<0,05$), diğerk enzim düzeylerindeki farklılıkların ise anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Diyabette antioksidan enzim olan GPX düzeyinin azaldığı bilinmekte olup, bu çalışmada stevianın etkisinin net olarak görüldüğü bildirilmiştir. Çünkü; çalışmada diyabetik ratlara verilen stevianın etkisi ile GPX düzeyinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Özbayer ve ark., 2011).

Bu çalışmada yalnızca *S. rebaudiana* bitkisinin özütü olan SG kullanılmıştır. Ancak stevia bitkisinden elde edilen bazı diğerk bileşiklerin de antioksidan etkilere sahip olabileceğı düşünölmektedir (Huxtable, 2002). Yapılan bir çalışmada, *stevia rebaudiana* bitkisi yapraklarından çıkarılan doğal bileşiklerin sıçan karaciğerkinde mitokondriye olan etkileri araştırılmıştır. Karma olarak kullanılan doğal bileşikler, steviosid, steviolbiosid, izosteviol ve steviol olup, bunların oksidatif fosforilasyonu, ATPaz aktivitesini, NADH-oksidaz aktivitesini, süksinat-oksidaz aktivitesini, süksinat dehidrojenaz ve L-glutamat dehidrojenazı inhibe ettiğı ve bu etkilerin yüksek konsantrasyonda (1 Mm) daha belirgin olarak gözleendiğı belirtilmektedir ($p<0,05$). Çalışmanın sonucunda; steviosidin yanı sıra diğerk *S. rebaudiana* doğal bileşiklerinin de, oksidatif fosforilasyonun ayrıştırıcıları olarak görev yapabileceğı ve antioksidan etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Bracht ve ark., 1985).

Bu çalışma sonuçlarına göre SG'nin dozundaki artışın oksidatif hasar indeks parametrelerinde değışikliklere neden olduğu ve SG'nin oksidatif hasarı arttırdığı sonucuna varılmıştır.

4.3. Steviol Glikozidin *İn-Vivo* Olarak Genetik Parametreler Üzerine Etkileri

Genotoksisite; organizmanın normal biyolojik döngüsünde veya fiziksel, kimyasal, biyolojik ajanların etkisiyle kalıtım materyali olan DNA moleküllerinde ortaya çıkan değişikliklerdir. KA'lar, DNA kırıkları, gen mutasyonları genotoksisitenin içinde değerlendirilmektedir. Genotoksisitenin belirlenmesinde birçok yöntem olmasına rağmen, en çok tercih edilen yöntemlerin başında, KA testleri yer almaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Fare kemik iliği hücrelerindeki KA'lar, fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Yılmaz ve ark., 2008). Bu çalışmada farklı dozlarda SG verilen farelerin kemik iliği hücrelerinde KA frekansına ve hücre döngüsü üzerine etkileri belirlenerek, stevia tatlandırıcısının genotoksisitesi ve sitotoksisitesi çalışılmıştır.

Stevianın genotoksik etkileri, yıllardır araştırılan bir konudur, fakat yapılan çalışmalarla ortak bir sonuca varmak mümkün değildir. Bu durumun nedenleri arasında, çalışmalarda etken madde olarak stevianın farklı bileşenlerinin kullanılması, uygulama dozlarındaki farklılıklar ve test organizması farklılıkları sayılabilmektedir. *İn-vivo* ve *in-vitro* koşullarda yapılan bazı çalışmalarda, stevianın genotoksik etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (Das ve ark., 1992; Ishidate ve ark., 1984; Maki ve ark., 2008b; Pezzuto ve ark., 1985; Toyoda ve ark., 1997; Uçar ve ark., 2017; Urban ve ark., 2013 ve Williams ve Burdock, 2009). Diğer taraftan, çok az sayıda da olsa, stevianın genotoksik etkilerinin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Huxtable, 2002; Matsui ve ark., 1996; Nunes ve ark., 2007 ve Suttajit ve ark., 1993). *İn-vivo* olarak stevianın genotoksik etkisini bildiren tek çalışmaya rastlanılmış olup, çalışmada 45 gün süreyle içme sularına 4 mg/ml (yaklaşık 400 mg/kg/gün) steviosid eklenen sıçanların; kan hücreleri, dalak, karaciğer ve beyin dokularında DNA hasarı meydana geldiği bildirilmiştir. (Nunes ve ark., 2007). SG'nin genotoksisitesinin belirlenmesinde *in-vivo* çalışmaların sınırlı olması nedeniyle, bu çalışma önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, kontrol grubunda KA'ya rastlanılmamıştır. En düşük doz SG verilen deney grubu LD50/32'nin AH yüzdesi, diğer deney grupları arasında en düşük değere sahiptir. Kontrol grubu ile LD50/32 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı, fakat LD50/32 grubunun kontrol grubuna göre daha yüksek KA/hücre ve AH yüzdesi olduğu görülmüştür. LD50/24 grubunun AH yüzdesi ve KA/hücre değerinin kontrol grubu ve LD50/32 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,001$). Deney grupları içinde en yüksek KA/hücre ve AH yüzde değerinin LD50/16 grubunda olduğu bulunmuştur. LD50/16 grubunun AH yüzdesi ve KA/hücre değerleri, hem kontrol grubu, hem de LD50/32 grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,001$). LD50/16 grubuna kadar doz arttıkça AH yüzdesi ve KA/hücre değerleri de artmıştır, fakat en yüksek doz uygulanan deney grubu LD50/8'in AH yüzdesi ve KA/hücre değerlerinin, LD50/16'ya göre daha düşük olduğu görülmüştür ($p>0,05$). LD50/8 grubunun KA/hücre oranı ve AH yüzdesi, kontrol grubu ve LD 50/32 grubu ile karşılaştırıldığında farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). KA/hücre değerinin korelasyon katsayısı 0,76, AH yüzdesinin 0,74 olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, SG dozu ile KA/hücre oranı ve AH yüzde değerinin pozitif ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada görülen KA'nın tipleri ele alınacak olursa; en çok karşılaşılan SU anormallığıdır. SU'nun en çok karşılaşıldığı deney grubu KA'nın en yüksek görüldüğü LD50/16 grubudur. SU'dan sonra en çok saptanan KA, poliploidi olmuştur. Poliploidinin en çok görüldüğü grup yine LD50/16 grubudur. En az görülen KA, KD'dir. Tüm gruplar arasında yalnızca 1 tane görülmüştür. KD'den sonra en az rastlanan KA, kromozom kırığı (KzK)'dır. Toplamda 2 farede rastlanılmış ve bunlar LD50/24 grubunda bulunmuştur (Çizelge 3.4).

Uçar ve arkadaşlarının (2017), stevia'nın *in-vitro* koşullarda insan lenfositleri üzerinde genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, KA/hücre ve AH yüzde değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada ADI/4, ADI/2, ADI, ADIx2 ve ADIx4 dozları kullanılmıştır. Bu dozlar göz önünde bulundurularak 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarında stevia çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışmada aynı dozların kullanıldığı 24 ve 48 saat süreli iki periyod grubu bulunmaktadır. Çalışmanın sonucunda 24 saatlik grubun AH yüzdesinin doza bağlı olarak değişmediği

gözlenmiştir. ADIx2 ve ADIx4 grubunun AH yüzde değerleri aynı ve en yüksektir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Çalışmada 48 saatlik grubun AH yüzdesinin doza bağlı değişmediği ayrıca, 24 saatliğe göre AH yüzde değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. KA/hücre değerleri açısından her iki periyod grubunda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı belirtilmektedir ($p>0,05$). Çalışmada en çok bulunan KA tipinin, bu çalışmaya benzer olarak SU olduğu görülmektedir. En çok SU görülen grubun, 48 saatlik periyod grubundaki en yüksek doz grubu olan ADIx4 olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada ise en yüksek SU görülen grup LD50/16 olmuş, en yüksek doz grubu olan LD 50/8 grubunda ise LD50/16'ya göre daha az SU olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ile tez çalışmasının sonuçlarının uyumlu olmamasının birkaç nedeni olduğu düşünülmektedir. Bunlar; uygulama sürelerindeki farklılık, farklı doz miktarları, kullanılan test organizması farklılığı ve fare karaciğerindeki biyoaktivasyon mekanizmalarının devreye girmesi olarak sayılabilir.

Bu çalışma sonuçları, 940 mg/kg ve 1880 mg/kg gibi yüksek doz SG'nin, KA ve AH oluşumunu tetiklediği ve dolayısıyla genotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada hücre proliferasyonu üzerine etkilerin belirlenmesi amacıyla Mİ yüzde değerleri hesaplanmıştır. Mİ yüzdesinin gruplarda, KA/hücre ve AH yüzde değerlerine benzer bir şekilde olduğu görülmektedir. En yüksek Mİ yüzdesi, LD50/16 grubunda olup, diğer tüm gruplarla arasında istatistiksel anlamlılık olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). LD50/16 grubundan sonra en yüksek Mİ yüzdesine sahip grup, LD50/24'tür. En yüksek doz SG verilmiş olan LD50/8 grubunun Mİ yüzdesi, LD50/24 grubunkine ile çok yakın değerler olduğu görülmüştür. Bu nedenle tüm grupların birbirleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p<0,001$), sadece LD50/8 ile LD50/24 grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). En düşük Mİ yüzdesi bulunan deney grubu, en düşük doz SG verilmiş olan LD50/32 grubu olup, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığa sahiptir ($p<0,05$). Mİ yüzdesinin SG dozundaki artışa bağlı olarak arttığı sonucuna varılmıştır ($r=0,74$).

Uçar ve arkadaşlarının (2017) yaptığı, *in-vitro* koşullarda stevianın sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, mikronükleus sıklığı ve yüzdesi hesaplanmıştır. Mikronükleuslu binükleat hücre yüzdesinin doza bağlı olarak değişmediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca nükleer bölünme indeksinin etkilenmediği dolayısıyla bu maddenin insan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik olmadığı bildirilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *in-vivo* olarak stevia'nın kan lipidleri, oksidatif hasar indeks parametreleri ve bazı genetik parametreler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Toplam 40 adet Balb/c cinsi fareye 28 gün boyunca oral gavaj yöntemi ile LD50'ye göre belirlenen farklı dozlarda SG verilmiştir.

Çalışmada, HDL-K ve LDL-K değerleri en yüksek LD50/24 grubunda bulunmuştur. HDL-K değerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı bulunmamaktadır. LDL-K değeri, LD50/24 ile kontrol grubu arasında ve LD50/8 ile LD50/24 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). HDL-K ve LDL-K değerlerinin SG dozuna bağlı bir değişim göstermediği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada incelenen oksidatif hasar indeks parametreleri; TAS, TOS ve PON-1 değerleridir. SG dozu ile TAS değeri arasında negatif korelasyon olduğu ($r=-0,70$) bulunurken, TOS değeri ile pozitif korelasyon ($r=0,64$) bulunmuştur. PON-1 aktivitesinin, doz artışına bağlı olarak düşüş gösterdiği sonucuna varılmıştır ($r=-0,71$). SG dozundaki artışa bağlı olarak OSI değerinin arttığı bulunmuştur ($r=0,97$). Ayrıca çalışmada PON-1 ile HDL-K değerleri arasında negatif korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır ($r=-0,73$).

Çalışmada genetik parametrelerin incelenmesi sonucunda, doz artışına bağlı olarak KA/hücre değerinde artış olduğu görülmüştür ($r=0,76$). SG dozu ile AH yüzdesi arasında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur ($r=0,74$). Mİ değerinin doza bağlı artış gösterdiği ve korelasyon katsayısının 0,74 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, çalışmada kullanılan dozlardaki SG'nin *in-vivo* genotoksik ve mitojenik etkilerinin olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışma, stevia'nın *in-vivo* genotoksik etkisinin bulunduğu literatürdeki 2. çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada elde edilen biyokimyasal veriler genetik verilerle uyumlu olarak bulunmuştur. SG'nin oksidatif hasarı artırarak genotoksik etkilere neden olduğu

görülmüştür. Ayrıca SG'nin, hücre proliferasyonunu uyarıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durumun mekanizması ile ilgili olarak kesin bir yorum yapılamamakla birlikte, hücre döngüsünü kontrol eden tümör baskılayıcı genler üzerinde etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Doğal tatlandırıcılar grubunda olması ve yapılan çalışmalar sonucunda güvenli olarak kabul edilmesi nedeniyle, stevia'nın tüketimi her geçen gün artmaktadır. Fakat bu çalışma, *in-vivo* koşullarda stevia'nın genotoksik ve mitojenik etkilerinin olduğunu göstermiştir. Stevia tatlandırıcısının güvenilirliğinin belirlenmesi açısından öncü araştırmalar arasında yer alan bu çalışmaya ilave olarak özellikle tümör gelişimi ile ilgili araştırmaların da yapılması ile güvenilirlik bakımından kesin bir sonuca varılması gerekmektedir. Yapılacak bu çalışmalar neticesinde, stevia'nın tüketiciler tarafından tüketiminin sınırlandırılıp sınırlandırılmayacağına karar verilmesi büyük önem arz etmektedir.

ÖZET

Balb/c Cinsi Farelerde Steviol Glikozid'e Maruziyetin Oksidatif Hasar İndeks Parametreleri, Paraoxonase ve Bazı Genetik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmanın amacı, kullanımı her geçen gün artan stevia tatlandırıcısının bileşeni olan steviol glikozid (SG)'e maruziyetin oksidatif hasar indeks parametreleri, paraoxonase (PON-1) ve bazı genetik parametreler üzerine etkisini belirlemektir. Çalışma 40 adet (20 erkek, 20 dişi) Balb/c cinsi fare üzerinde yapılmıştır. Her biri 8 hayvandan oluşan (4 erkek ve 4 dişi) 4 deney grubu ve plasebo kontrol grubu oluşturulmuştur. Doz ayarlaması SG için belirlenen LD50 dozuna göre yapılmıştır. Farelere 4 hafta süresince oral gavaj yöntemi ile farklı dozlarda SG verilmiştir. Dört hafta sonunda farelerden kan örnekleri alınarak TAS, TOS, paraoxonase (PON-1), HDL-K ve LDL-K düzeylerine bakılmış ve oksidatif hasar indeksi hesaplanmıştır. Çalışmada genetik parametrelerin değerlendirilmesinde farelerden alınan kemik iliği örneği incelenmiş muhtemel kromozomal anormallik (KA) ve hücre döngüsü aktivitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen çalışma bulgularına göre, plazma lipid parametreleri HDL-K ve LDL-K'nın SG dozuna bağlı olarak değişmediği bulunmuştur. Oksidatif hasar indeks parametreleri olan TAS ve PON-1 değerlerinin SG dozu ile negatif korelasyonu olduğu bulunmuştur. En yüksek TOS değerinin en yüksek doz SG verilen LD50/8 grubunda olduğu belirlenmiştir. TOS değeri ile SG dozları arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0,65$). Elde edilen TAS ve TOS değerleri ile hesaplanan OSİ (oksidatif stres indeksi) sınıflamasına göre çok yüksek oksidatif stres sınıfında bulunan farelerin %44,5 gibi büyük çoğunluğu LD50/8 grubundadır. Genetik parametrelerin incelenmesi sonucunda, uygulanan SG dozlarının anormal hücre (AH) ve KA'yı artırdığı ve aralarında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur (korelasyon katsayısı sırasıyla $r=0,74$, $0,76$). En yüksek AH yüzdesi ve KA/hücre oranı saptanan grup LD50/16 olmuştur. Hücre döngüsü aktivitesini değerlendirmek için kullanılan mitotik indeks (Mİ) değeri ile SG dozu arasında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur ($r=0,74$). Çalışma bulguları neticesinde; SG'nin oksidatif hasar indeksini artırdığı, hücre döngüsü aktivitesini etkilediği ve KA'yı artırarak genotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Balb/c, Genetik, Oksidatif Hasar İndeksi, Paraoxonase, Stevia, TAS, TOS

SUMMARY

Investigation of Effect Exposure to Steviol Glycoside on Oxidative Damage Index Parameters, Paraoxonase Enzyme and Some Genetic Parameters in Balb/c Mice

The aim of this study was to determine the effect of exposure to steviol glycoside (SG), a component of the ever-increasing stevia sweetener, on the oxidative damage index parameters, paraoxonase (PON-1) enzyme and some genetic parameters. The study was performed on 40 (20 males, 20 females) BALB/c typemices. There were formed 4 experimental groups and placebo control groups, each consisting 8 mice (4 males, 4 females). Dose adjustment had been done according to LD50 (Lethal Dose/50) appointed for SG. Diffeent dose of SG was given by oral gavage method for 4 weeks. At the end of four weeks, TAS, TOS, PON-1, HDL-C and LDL-C levels were analysed by taking blood samples from mice and oxidative damage index was be calculated. In assessing genetic parameters in the study, the probable chromosomal abnormality (CA) and cell cycle activity examined bone marrow samples from mice were evaluated. According to the study findings, plasma lipid parameters HDL-C and LDL-C did not change depending on the SG dose. The oxidative damage index parameters TAS and PON-1 values were found to be negatively correlated with SG doses. The highest TOS value was determined to be in the LD50/8 group given the highest dose SG. Positive correlation was found between TOS value and SG doses ($r=0,65$). According to the OSI (oxidative stress index) classification calculated by the obtained TAS and TOS values, 44,5% of the mice in the very high oxidative stress class were in the LD50/8 group. As a result of examining the genetic parameters, it was found that the applied SG doses increased the abnormal cell (AC) and CA and there was a positive correlation between them (correlation coefficient $r=0,74$; $0,76$, respectively). The highest of AC percentages and CA/cell ratio were detected in the LD50/16 group. A positive correlation was found between the mitotic index (MI) value used to assess cell cycle activity and SG dose ($r=0,74$). As a result of the study findings, it was concluded that SG increased the oxidative damage index, affected cell cycle activity and increased CA and showed genotoxic effect.

Keywords: Balb/c mice, Genetic, Oxidative Damage Index, Paraoxonase, Stevia, TAS, TOS

KAYNAKLAR

- ABDEL-SALAM OME, SALEM NA, EL-SHAMARKA ME, HUSSEIN JS, AHMED NA, EL-NAGAR ME (2012). Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **16(15)**: 2092-2101.
- ABHILASH M, SAUGANTH PAUL MV, VARGHESE MV, NAIR RH (2013). Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. *Drug and Chemical Toxicology*, **36(2)**: 135-140.
- ABOU-ARAB AE, ABOU-ARAB AA, ABU-SALEM MF (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, **4(5)**: 269-281.
- ABOU-ARAB EA, ABU-SALEM FM (2010). Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *African Journal of Food Science*, **4(10)**: 627-634.
- ABUHANDAN M, ÇALIK M, ALMAZ V, GETER S, SELEK Ş, KOCA B, İŞCAN A (2012). Bakteriyel Menenjitli Çocuklarda Tedavi Öncesi ve Sonrası S-100B ve Oksidatif Durumun Değerlendirilmesi. *Klimik Journal/Klimik Dergisi*, **25(2)**: 16-22.
- AKASHI H, YOKOYAMA Y (1975). Dried-leaf extracts of stevia, toxicological test. *Shokuhin Kogyo*, **18(20)**: 34-43.
- AKCAY MN, POLAT MF, YILMAZ I, AKCAY G (2003). Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepato-gastroenterology*, **50(2)**: 245-247.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2004). Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*, **2(104)**: 255-275.
- ANAGNOSTOPOULOU MA, KEFALAS P, PAPAGEORGIOU VP, ASSIMOPOULOU AN, BOSKOU D (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, **94(1)**: 19-25.
- ANDERSON D (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **350(1)**: 103-108.
- ANTON SD, MARTIN CK, HAN H, COULON S, CEFALU WT, GEISELMAN P, WILLIAMSON DA (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, **55(1)**: 37-43.
- ARITAJAT S, KAWEEWAT K, MANORUANG W (2001). Toxicological study of some antifertility plant extracts by micronucleus test. *J Sci Fac CMU*, **28**: 113-18.
- ARITAJAT S, KAWEEWAT K, MANOSROI J, MANOSROI A (2000). Dominant lethal test in rats treated with some plant extracts. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **31**: 171-173.

- ASIF M (2013). Low caloric sweeteners for diabetes and obesity care and their. *Journal of Pharmaceutical Care*, **1(3)**: 104-113.
- ATROOZ OM (2009). The antioxidant activity and polyphenolic contents of different plant seeds extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **12(15)**: 1063.
- ATTEH JO, ONAGBESAN OM, TONA K, DECUYPERE E, GEUNS JMC, BUYSE J (2008). Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **92(6)**: 640-649.
- AUTIO JT (2002). Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus* mutans in preschool children. *Journal of Dentistry for Children*, **69**: 81-86.
- AZAMI Y (2000). Paralytic ileus accompanied by pneumatosis cystoides intestinalis after acarbose treatment in an elderly diabetic patient with a history of heavy intake of maltitol. *Internal Medicine*, **39(10)**: 826-829.
- BAEDER C, HORSTMANN G, WEIGAND W (1977). *Oral mutagenicity study (micronucleus test) of Acesulfam in NMRI mice* (No. 77.0591). Report.
- BANDYOPADHYAY A, GHOSHAL S, MUKHERJEE A (2008). Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*, **31(4)**: 447-457.
- BARAN EJ, YILMAZ VT (2006). Metal complexes of saccharin. *Coordination Chemistry Reviews*, **250(15)**: 1980-1999.
- BARBA FJ, CRIADO MN, BELDA-GALBIS CM, ESTEVE MJ, RODRIGO D (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry*, **148**: 261-267.
- BARILE FA (2010). Validating and troubleshooting ocular invitro toxicology tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **61(2)**: 136-145.
- BARRIOCANAL LA, PALACIOS M, BENITEZ G, BENITEZ S, JIMENEZ JT, JIMENEZ N, ROJAS V (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **51(1)**: 37-41.
- BASU S, VELLAKKAL S, AGRAWAL S, STUCKLER D, POPKIN B, EBRAHIM S (2014). Averting obesity and type 2 diabetes in India through sugar-sweetened beverage taxation: an economic-epidemiologic modeling study. *PLoS Medicine*, **11(1)**: 100115.
- BELDA-GALBIS CM, PINA-PÉREZ MC, ESPINOSA J, MARCO-CELDRÁN A, MARTINEZ A, RODRIGO D (2014). Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food Microbiology*, **38**: 56-61.

- BELL W, CLAPP R, DAVIS D, EPSTEIN S, FARBER E, FOX DA, REUBER MD (2002). Carcinogenicity of saccharin in laboratory animals and humans: letter to Dr. Harry Conacher of Health Canada.
- BERGAMO AB, DA SILVA JAF, DE JESUS DP (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, **124(4)**: 1714-1717.
- BIRKHED D, EDWARDSSON S, AHLÉN ML, FROSTELL G (1979). Effects of 3 months frequent consumption of hydrogenated starch hydrolysate (Lycasin®), maltitol, sorbitol and xylitol on human dental plaque. *Acta Odontologica Scandinavica*, **37(2)**: 103-115.
- BONNEMA A, DECOCK P, EAPEN A, BOSSCHER D (2016). The tolerance of erythritol and xylitol based on effective dose methodologies. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **311**: 761-761.
- BOONKAEWWAN C, AO M, TOSKULKAO C, RAO MC (2008). Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(10)**: 3777-3784.
- BRACHT AK, ALVAREZ M, BRACHT A (1985). Effects of Stevia rebaudiana natural products on rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, **34(6)**: 873-882.
- BRANDLE JE, TELMER PG (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, **68(14)**: 1855-1863.
- BRUSICK DJ (2008). A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, **46(7)**: 83-91.
- BUITRAGO S, MARTIN TE, TETENS-WOODRING J, BELICHA-VILLANUEVA A, WILDING GE (2008). Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **47(1)**: 11-17.
- BUTCHKO HH, STARGEL WW, COMER CP, MAYHEW DA, BENNINGER C, BLACKBURN GL (2002). Intake of aspartame vs. the acceptable daily intake. *Regul Toxicol Pharmacol*, **35**: 13-16.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Guide to Food Labelling and Advertising. Erişim Adresi: [http://www.inspection.gc.ca/english/bureau/labeti/guide/guideee.shtml] Erişim Tarihi: 06/10/2017.
- CARDEN TJ, CARR TP (2013). Food availability of glucose and fat, but not fructose, increased in the US between 1970 and 2009: analysis of the USDA food availability data system. *Nutrition Journal*, **12(1)**: 130-136.
- CERON JJ, TECLES F, TVARIJONAVICIUTE A (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research*, **10(1)**: 74-81.

- CHAN P, TOMLINSON B, CHEN YJ, LIU JC, HSIEH MH, CHENG JT (2000). A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **50(3)**: 215-220.
- CHAN P, XU DY, LIU JC, CHEN YJ, TOMLINSON B, HUANG WP, CHENG JT (1998). The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, **63(19)**: 1679-1684.
- CHANG JC, WU MC, LIU IM, CHENG JT (2005). Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Hormone and Metabolic Research*, **37(10)**: 610-616.
- CHATSUDTHIPONG V, MUANPRASAT C (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, **121(1)**: 41-54.
- CHOI YH, KIM I, YOON KD, LEE SJ, KIM CY, YOO KP, KIM J (2002). Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. *Chromatographia*, **55(9)**: 617-620.
- CREANOR SL, STRANG R, GILMOUR WH, FOYE RH, BROWN J, GEDDES DAM, HALL AF (1992). The effect of chewing gum use on in situ enamel lesion remineralization. *Journal of Dental Research*, **71**: 1895-1900.
- DABELEA D, BELL RA, D'AGOSTINO JR RB, IMPERATORE G, JOHANSEN JM, LINDER B, PETTITT DJ (2007). Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA*, **297(24)**: 2716-2724.
- DAS S, DAS AK, MURPHY RA, PUNWANI IC, NASUTION MP, KINGHORN AD (1992). Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research*, **26(5)**: 363-366.
- DE LA HUNTY A, GIBSON S, ASHWELL M (2006). A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. *Nutrition Bulletin*, **31(2)**: 115-128.
- DILLS JR WL (1989). Sugar alcohols as bulk sweeteners. *Annual Review of Nutrition*, **9**: 161-186.
- DUFFY VB, ANDERSON GH (1998). Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*, **98(5)**: 580-587.
- DYRSKOG SEU, JEPPESEN PB, COLOMBO M, ABUDULA R, HERMANSEN K (2005). Preventive effects of a soy-based diet supplemented with stevioside on the development of the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism*, **54(9)**: 1181-1188.
- EDWARDSSON S, BIRKHED D, MEJÀRE B (1977). Acid production from Lycasin®, maltitol, sorbitol and xylitol by oral streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, **35(5)**: 257-263.
- ELSAYED NM (1997). Toxicology of blast overpressure. *Toxicology*, **121(1)**: 1-15.

- EREL O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, **38(12)**: 1103-1111.
- FITCH C, KEIM KS (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*: **112**: 739-758.
- FLINT N, HAMBURG NM, HOLBROOK M, DORSEY PG, LELEIKO RM, BERGER A, VITA JA (2014). Effects of erythritol on endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *ACTA Diabetologica*, **51**: 513-516.
- FRANZ MJ, BANTLE JP, BEEBE CA, BRUNZELL JD, CHIASSON JL, GARG A, PURNELL JQ (2002). Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care*, **25(1)**: 148-198.
- FUJITA H, EDAHIRO T (1979). Safety and Utilisation of Stevia Sweetener. *The Food Industry*, **8(22)**: 1-8.
- GALLUS S, SCOTTI L, NEGRI E, TALAMINI R, FRANCESCHI S, MONTELLA M, LA VECCHIA, C (2006). Artificial sweeteners and cancer risk in a network of case control studies. *Annals of Oncology*, **18(1)**: 40-44.
- GARDNER C, WYLIE-ROSETT J, GIDDING SS, STEFFEN LM, JOHNSON RK, READER D, LICHTENSTEIN AH (2012). Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives. *Circulation*, **126(4)**: 509-519.
- GARIN MCB, MOREN X, JAMES RW (2006). Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *Journal of Lipid Research*, **47(3)**: 515-520.
- GEERAERT B, CROMBE F, HULSMANS M, BENHABILES N, GEUNS JM, HOLVOET P (2010). Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice. *International Journal of Obesity*, **34(3)**: 569-577.
- GHANTA S, BANERJEE A, PODDAR A, CHATTOPADHYAY S (2007). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(26)**: 10962-10967.
- GOLDSMITH L. A. (2000). Acute and subchronic toxicity of sucralose. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 53-69.
- GÓMEZ-ARROYO S, ARMIENTA MA, CORTÉS-ESLAVA J, VILLALOBOS-PIETRINI R (1997). Sister chromatid exchanges in Vicia faba induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **394(1)**: 1-7.
- GOYAL SK, GOYAL RK (2010). Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **61(1)**: 1-10.
- GREMBECKA M, SZEFER P (2012). Simultaneous determination of caffeine and aspartame in diet supplements and non-alcoholic beverages using liquid-chromatography

- coupled to Corona CAD and UV-DAD detectors. *Food Analytical Methods*, **5(5)**: 1010-1017.
- GRICE HC, GOLDSMITH LA (2000). Sucralose—an overview of the toxicity data. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 1-6.
- GROTZ VL, HENRY RR, MCGILL JB, PRINCE MJ, SHAMOON H, TROUT JR, PI SUNYER FX (2003). Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *Journal of the American Dietetic Association*, **103(12)**: 1607-1612.
- GUGLIUCCI A, MENINI T (2015). Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clinica chimica acta*, **439**: 5-13.
- GULATI S, MISRA A (2014). Sugar intake, obesity, and diabetes in India. *Nutrients*, **6(12)**: 5955-5974.
- HALLIWELL B (1996). Commentary: vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Radical Research*, **25(5)**: 439-454.
- HALLIWELL B, AESCHBACH R, LOLIGER J, ARUOMA OI (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33(7)**: 601-617.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, **186**: 1-85.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (1999). Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **1**: 485-543.
- HAN SJ, JEONG SY, NAM YJ, YANG KH, LIM HS, CHUNG J (2005). Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12(11)**: 1285-1291.
- HARESAKU S, HANIOKA T, TSUTSUI A, YAMAMOTO M, CHOU T, GUNJISHIMA Y (2007). Long-term effect of xylitol gum use on mutans streptococci in adults. *Caries Research*, **41(3)**: 198-203.
- HAYES C (2001). The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *Journal of Dental Education*, **65**: 1106-1109.
- HILDEBRANDT GH, SPARKS BS (2000). Maintaining mutans streptococci suppression: with xylitol chewing gum. *The Journal of the American Dental Association*, **131**: 909-916.
- HOLIMAN PC, HERTOOG MG, KATAN MB (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, **57(1)**: 43-46.
- HOLVOET P, RULL A, GARCIA-HEREDIA A, LÓPEZ-SANROMÀ S, GEERAERT B, JOVEN J, CAMPS J (2015). Stevia-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food and Chemical Toxicology*, **77**: 22-33.

- HOOVER NM, HESP RJ, TIEKU S (1994). Metabolism of aspartame by human and pig intestinal microvillar peptidases. *Biochemical Journal*, **298(3)**: 635-639.
- HORNE J, LAWLESS HT, SPEIRS W, SPOSATO D (2002). Bitter taste of saccharin and acesulfame-K. *Chemical Senses*, **27(1)**: 31-38.
- HOSSAIN MA, SIDDIQUE AB, RAHMAN SM. HOSSAIN M.A (2010). Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Berton leaves. *Asian J Trad Med*, **5(2)**: 56-61.
- HSIEH MH, CHAN P, SUE YM, LIU JC, LIANG TH, HUANG TY, CHEN YJ (2003). Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics*, **25(11)**: 2797-2808.
- HUANG D, OU B, PRIOR RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(6)**: 1841-1856.
- HUMPHRIES P, PRETORIUS E, NAUDE H (2008). Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*, **62(4)**: 451-457.
- HUXTABLE RJ (2002). Pharmacology and toxicology of stevioside, rebaudioside A, and steviol. *Stevia: The Genus Stevia*. London, Engl./New York (NY): Taylor and Francis, 160-177.
- HYAMS JS (1983). Sorbitol intolerance: an unappreciated cause of functional gastrointestinal complaints. *Gastroenterology*, **84**: 30-33.
- ISHIDATE M, SOFUNI T, YOSHIKAWA K, HAYASHI M, NOHMI T, SAWADA M, MATSUOKA A (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, **22(8)**: 623-636.
- ISOKANGAS P, TENOVUO J, SODERLING E, MANNISTO H, MÄKINEN KK (1991). Dental caries and mutans streptococci in the proximal areas of molars affected by the habitual use of xylitol chewing gum. *Caries Research*, **25**: 444-448.
- İNANÇ AL, ÇINAR İ (2009). Alternatif doğal tatlandırıcı: Stevia. *Gıda/The Journal Of Food*, **34(6)**: 78-83.
- JEPPESEN PB, GREGERSEN S, ROLFSEN SED, JEPSEN M, COLOMBO M, AGGER A, HERMANSEN K (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*, **52(3)**: 372-378.
- JOHN BA, WOOD SG, HAWKINS DR (2000). The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the rabbit. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 111-113.
- JOHNSON RK, APPEL LJ, BRANDS M, HOWARD BV, LEFEVRE M, LUSTIG RH, WYLIE-ROSETT J (2009). American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Epidemiology and Prevention. Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, **120(11)**: 1011-1020.

- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2005). Steviol glycosides [Addendum to stevioside]. In *Safety evaluation of certain food additives: Sixtythird Meeting of the Joint FAO/WHO Expert on Food Additives* (pp. 117-144).
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2008). Steviol glycosides. In: Summary and conclusions of the 69th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), Rome. Erişim Adresi: [http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/jecfa69_finalpdf] Erişim Tarihi: 13/09/2016.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING, & WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001). *Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 9* (No. 52). Food & Agriculture Org..
- KÄHKONEN MP, HOPIA AI, VUORELA HJ, RAUHA JP, PIHLAJA K, KUJALA TS, HEINONEN M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **47(10)**: 3954-3962.
- KAJS TM, FITZGERALD JA, BUCKNER RY, COYLE GA, STINSON BS, MOREL JG, LEVITT MD (1997). influence of a methanogenic flora on the breath h₂ and symptom response to ingestion of sorbitol or oat fiber. *American Journal of Gastroenterology*, **92**: 27-36.
- KATIYAR SK, MUKHTAR H (1997). Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, **67(27)**: 59-67.
- KEARSLEY MW, DEIS RC (2006). Sorbitol and mannitol. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, **17**: 249-261.
- KHATTAB SN, MASSOUD MI, JAD YES, BEKHIT AA, EL-FAHAM A (2015). Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside. *Food Chemistry*, **173**: 979-985.
- KIM IS, YANG M, LEE OH, KANG SN (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, **44(5)**: 1328-1332.
- KOBUS-MORYSON M, GRAMZA-MICHAŁOWSKA A (2015). Directions on the use of Stevia Leaves (Stevia Rebaudiana) as an additive in food products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **14(1)**: 5-13.
- KOUTSOU GA, STOREY DM, LEE A, ZUMBE A, FLOURIE B, LEBOT Y, OLIVIER PH (1996). Dose-related gastrointestinal response to the ingestion of either isomalt, lactitol or maltitol in milk chocolate. *European Journal of Clinical Nutrition*, **50(1)**: 17-21.
- KROGER M, MEISTER K, KAVA R (2006). Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5(2)**: 35-47.
- KUHN C, BUFE B, WINNIG M, HOFMANN T, FRANK O, BEHRENS M, MEYERHOF W (2004). Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *Journal of Neuroscience*, **24(45)**: 10260-10265.

- KUITUNEN M, SAUKKONEN T, ILONEN J, ÅKERBLOM HK, SAVILAHTI E (2002). Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1* 02 allele. *Autoimmunity*, **35**(5): 365-368.
- LAILERD N, SAENGSRISUWAN V, SLONIGER JA, TOSKULKAO C, HENRIKSEN EJ (2004). Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*, **53**(1): 101-107.
- LANGKILDE AM, ANDERSSON H, SCHWEIZER TF, WURSCH P (1994). Digestion and absorption of sorbitol, maltitol and isomalt from the small bowel: a study in ileostomy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, **48**: 768-775.
- LECLERCQ C (1999). Intake of saccharin, aspartame, acesulfame K and cyclamate in Italian teenagers: present levels and projections. *Food Additives & Contaminants*, **16**(3): 99-109.
- LEE A, STOREY DM (1999). Comparative gastrointestinal tolerance of sucrose, lactitol, and tagatose in chocolate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **29**(2): 78-82.
- LEE A, WILS D, ZUMBE A, STOREY DM (2002). The comparative gastrointestinal responses of children and adults following consumption of sweets formulated with sucrose, isomalt and lycasin HBC. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**: 755-762.
- LEE CN, WONG KL, LIU JC, CHEN YJ, CHENG JT, CHAN P (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Medica*, **67**(9): 796-799.
- LEE EW, GARNER CD, TERZO TS (1994). Animal model for the study of methanol toxicity: Comparison of folate-reduced rat responses with published monkey data. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, **41**(1): 71-82.
- LEE SJ, LEE KR, PARK JR, KIM KS, TCHAI BS (1979). A study on the safety of stevioside as a new sweetening source. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **11**(4): 224-231.
- LEMUS-MONDACA R, VEGA-GÁLVEZ A, ZURA-BRAVO L, AH-HEN K (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, **132**(3): 1121-1132.
- LU H, ZHU J, ZANG Y, ZE Y, QIN J (2006). Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in Escherichia coli and its characterization. *Protein Expression and Purification*, **46**(1): 92-99.
- LUDWIG B, SCHINDLER E, BOHL J, PFEIFFER J, KREMER G (1984). Reno-cerebral oxalosis induced by xylitol. *Neuroradiology*, **26**: 517-521.
- MA J, CHANG J, CHECKLIN HL, YOUNG RL, JONES KL, HOROWITZ M, RAYNER, CK (2010). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, **104**(6): 803-806.

- MACKNESS B, BELTRAN-DEBON R, ARAGONES G, JOVEN J, CAMPS J, MACKNESS M (2010). Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life*, **62(6)**: 480-482.
- MAGNUSON BA, BURDOCK GA, DOULL J, KROES RM, MARSH GM, PARIZA MW, WILLIAMS GM (2007). Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Critical Reviews in Toxicology*, **37(8)**: 629-727.
- MAKI KC, CURRY LL, CARAKOSTAS MC, TARKA SM, REEVES MS, FARMER MV, DICKLIN MR (2008a). The hemodynamic effects of rebaudioside A in healthy adults with normal and low-normal blood pressure. *Food and Chemical Toxicology*, **46(7)**: 40-46.
- MAKI KC, CURRY LL, REEVES MS, TOTH PD, MCKENNEY JM, FARMER MV, CARAKOSTAS MC (2008b). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, **46(7)**: 47-53.
- MÄKINEN KK, BENNETT CA, HUJOEL PP, ISOKANGAS PJ, ISOTUPA KP, PAPE JR HR, MÄKINEN PL (1995). Xylitol chewing gums and caries rates: a 40-month cohort study. *Journal of Dental Research*, **74**: 1904-1913.
- MÄKINEN KK, ISOTUPA KP, KIVILOMPOLO T, MÄKINEN PL, TOIVANEN J, SODERLING E (2001). Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans streptococci. *Caries Research*, **35**: 129-135.
- MÄKINEN KK, SAAG M, ISOTUPA KP, OLAK J, NÖMMELA R, SODERLING E, MÄKINEN PL (2005). Similarity of the Effects of Erythritol and Xylitol on Some Risk Factors of Dental Caries. *Caries Research*, **39(3)**: 207-215.
- MÄKINEN KK (2000). The rocky road of xylitol to its clinical application. *Journal of Dental Research*, **79**: 1352-1355.
- MÄKINEN KK, MÄKINEN PL, PAPE JR HR, PELDYAK J, HUJOEL P, ISOTUPA KP, BENNETT C (1996). Conclusion and review of the Michigan Xylitol Programme (1986-1995) for the prevention of dental caries. *International Dental Journal*, **46**: 22-34.
- MATHIAS KC, SLINING MM, POPKIN BM (2013). Foods and beverages associated with higher intake of sugar-sweetened beverages. *American Journal of Preventive Medicine*, **44(4)**: 351-357.
- MATSUI M, MATSUI K, KAWASAKI Y, ODA Y, NOGUCHI T, KITAGAWA Y, ISHIDATE Jr M (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, **11(6)**: 573-579.
- MATTES RD, POPKIN BM (2009). Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89(1)**: 1-14.
- MEDINA-DIAZ IM, PONCE-RUIZ N, RAMIREZ-CHÁVEZ B, ROJAS-GARCIA AE, BARRÓN-VIVANCO BS, ELIZONDO G, BERNAL-HERNÁNDEZ YY (2017).

- Downregulation of human paraoxonase 1 (PON1) by organophosphate pesticides in HepG2 cells. *Environmental Toxicology*, **32(2)**: 490-500.
- MELIS MS (1992). Influence of calcium on the blood pressure and renal effects of stevioside. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, **25(9)**: 943-949.
- MELIS MS, SAINATI AR (1991a). Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside. *Journal of Ethnopharmacology*, **33(3)**: 257-262.
- MELIS MS, SAINATI AR (1991b). Participation of prostaglandins in the effect of stevioside on rat renal function and arterial pressure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, **24(12)**: 1269-1276.
- MORI N, SAKANOE M, TAKEUCHI M, SHIMPO K, TANABE T (1981). Effect of stevioside on fertility in rats. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **22(5)**: 409-414.
- MORTELMANS K, RUPA DS (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, **56**: 379-401.
- MOURAD IM, NOOR NA (2011). Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. *Int J Pharm Biomed Sci*, **2(1)**: 4-10.
- MUKHERJEE A, CHAKRABARTI J (1997). In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K a non-nutritive sweetener. *Food and Chemical Toxicology*, **35(12)**: 1177-1179.
- MUNRO IC, BERNT WO, BORZELLECA JF, FLAMM G, LYNCH BS, KENNEPOHL E, MODDERMAN J (1998). Erythritol: an interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data. *Food and Chemical Toxicology*, **36**: 1139-1174.
- NABORS LO, GELARDI R (2001). Alternative sweeteners: an overview. *Alternative Sweeteners*, **2**: 1-10.
- NABORS LOB (2002). Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. *Food Technology*, **56(7)**: 28-34.
- NATAH SS, HUSSIEN KR, TUOMINEN JA, KOIVISTO VA (1997). Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **65(4)**: 947-950.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press, Eight Edition, Washington, DC.
- NEWBERNE PM, CONNER MW, ESTES P (1988). The influence of food additives and related materials on lower bowel structure and function. *Toxicologic Pathology*, **16**: 184-197.
- NOFRE C, TINTI JM (2000). Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chemistry*, **69(3)**: 245-257.

- NUNES APM, FERREIRA-MACHADO SC, NUNES RM, DANTAS FJS, DE MATTOS JCP, CALDEIRA-DE-ARAUJO A (2007). Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, **45(4)**: 662-666.
- NUWAYSIR EF, BITTNER M, TRENT J, BARRETT JC, AFSHARI CA (1999). Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, **24(3)**: 153-159.
- OGDEN CL, CARROLL MD, CURTIN LR, MCDOWELL MA, TABAK CJ, FLEGAL KM (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*, **295(13)**: 1549-1555.
- OZSOY N, CAN A, YANARDAG R, AKEV N (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, **110(3)**: 571-583.
- ÖZBAYER C, DEĞİRMENCİ İ, KURT H, ÖZDEN H, ÇİVİ K, BAŞARAN A, GÜNEŞ HV (2011). Antioxidant and free radical-scavenging properties of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) extracts and L-NNA in streptozotocine-nicotinamide induced diabetic rat liver. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **31(1)**: 51-60.
- ÖZDEMİR D, BAŞER H, ÇAKIR B (2014). Tatlandırıcılar. *Turkiye Klinikleri Journal of Endocrinology*, **9(2)**: 60-70.
- PARK JE, CHA YS (2010). *Stevia rebaudiana* Bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90(7)**: 1099-1105.
- PARK YC, OH EJ, JO JH, JIN YS, SEO JH (2016). Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Current Opinion in Biotechnology*, **37**: 105-113.
- PASHA I, BUTT S, ANJUM FM, SHEHZADI N (2002). Effect of dietetic sweeteners on the quality of cookies. *Analysis*, **8(60)**: 20-27.
- PEZZUTO JM, COMPADRE CM, SWANSON SM, NANAYAKKARA D, KINGHORN AD (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82(8)**: 2478-2482.
- PIERNAS CNGSW, POPKIN B (2013). Trends in purchases and intake of foods and beverages containing caloric and low-calorie sweeteners over the last decade in the United States. *Pediatric Obesity*, **8(4)**: 294-306.
- POPE E, KOREN G, BOZZO P (2014). Sugar substitutes during pregnancy. *Canadian Family Physician*, **60(11)**: 1003-1005.
- PRAKASH I, BISHAY IE, DESAI N, WALTERS DE (2001). Modifying the temporal profile of the high-potency sweetener neotame. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(2)**: 786-789.
- RENCÜZOĞULLARI E, TÜYLÜ BA, TOPAKTAŞ M, İLA HB, KAYRALDIZ A, ARSLAN M, DİLER SB (2004). Genotoxicity of aspartame. *Drug and Chemical Toxicology*, **27(3)**: 257-268.

- RENEWICK AG, TARKA SM (2008). Microbial hydrolysis of steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, **46(7)**: 70-74.
- REYNA NY, CANO C, BERMÚDEZ VJ, MEDINA MT, SOUKI AJ, AMBARD M, INGLET GE (2003). Sweeteners and beta-glucans improve metabolic and anthropometrics variables in well controlled type 2 diabetic patients. *American Journal of Therapeutics*, **10(6)**: 438-443.
- RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2(4)**: 152-159.
- RIOBÓ ZP, SIERRA POYATOS R, SOLDÓ RODRIGUEZ J (2014). Low and no calorie sweeteners (LNCS); myths and realities. *Nutricion Hospitalaria*, **30**: 5-9.
- ROBERTS A, RENEWICK AG (2008). Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **46(7)**: 31-39.
- ROBERTS JR (2015). The paradox of artificial sweeteners in managing obesity. *Current Gastroenterology Reports*, **17(1)**: 1-7.
- ROGERS PJ, HOGENKAMP PS, DE GRAAF C, HIGGS S, LLUCH A, NESS AR, MELADJ (2016). Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *International Journal of Obesity (2005)*, **40(3)**: 381-388.
- ROZEK LS, HATSUKAMI TS, RICHTER RJ, RANCHALIS J, NAKAYAMA K, MCKINSTRY LA, JARVIK GP (2005). The correlation of paraoxonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs with vascular disease status. *Journal of Lipid Research*, **46(9)**: 1888-1895.
- SAENPHET K, ARITAJAT S, SAENPHET S, MANOSROI J, MANOSRO A (2006). Safety evaluation of aqueous extracts from *Aegle marmelos* and *Stevia rebaudiana* on reproduction of female rats. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **37**: 203-209.
- SANTOS NC, ARAUJO LMD, DE LUCA CANTO G, GUERRA ENS, COELHO MS, BORIN MDF (2017). Metabolic effects of aspartame in adulthood: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2017.1304358.
- SARIS WH, TARNOPOLSKY MA (2003). Controlling food intake and energy balance: which macronutrient should we select?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **6(6)**: 609-613.
- SAVITA SM, SHEELA K, SUNANDA S, SHANKAR AG, RAMAKRISHNA P (2004). *Stevia rebaudiana*—A functional component for food industry. *J. Hum. Ecol*, **15(4)**: 261-264.
- SAVITA SM, SHEELA K, SUNANDA S, SHANKAR AG, RAMAKRISHNA P, SAKEY S (2004). Health Implications of *Stevia rebaudiana*. *J. Hum. Ecol*, **15(3)**: 191-194.

- SCHRADER C, RIMBACH G (2011). Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Current Medicinal Chemistry*, **18(36)**: 5624-5643.
- SCHULZE MB, MANSON JE, LUDWIG DS, COLDITZ GA, STAMPFER MJ, WILLETT WC, HU FB (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*, **292(8)**: 927-934.
- SEHAR I, KAUL A, BANI S, PAL HC, SAXENA AK (2008). Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chemico-Biological Interactions*, **173(2)**: 115-121.
- SERAFINI M, DEL RIO D (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report*, **9(3)**: 145-152.
- SHANKAR P, AHUJA S, SRIRAM K (2013). Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, **29(11)**: 1293-1299.
- SHARMA N, MOGRA R, UPADHYAY B (2009). Effect of stevia extract intervention on lipid profile. *Studies on Ethno-Medicine*, **3(2)**: 137-140.
- SHEPHARD SE, WAKABAYASHI K, NAGAO M (1993). Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation. *Food and Chemical Toxicology*, **31(5)**: 323-329.
- SHUKLA S, MEHTA A, BAJPAI VK, SHUKLA S (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, **47(9)**: 2338-2343.
- SILVA CD, HERDEIRO RS, MATHIAS CJ, PANEK AD, SILVEIRA CS, RODRIGUES VP, NOGUEIRA FLP (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, **52(3)**: 229-233.
- SIMS J, ROBERTS A, DANIEL JW, RENWICK AG (2000). The metabolic fate of sucralose in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 115-121.
- SYLVETSKY AC, ROTHER KI (2016). Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*, **164**: 446-450.
- SODERLING E, ISOKANGAS P, PIENIHÄKKINEN K, TENOVUO J, ALANEN P (2001). Influence of maternal xylitol consumption on mother–child transmission of Mutans Streptococci: 6–year follow–up. *Caries Research*, **35**: 173-177.
- SONG SH, VIEILLE C (2009). Recent advances in the biological production of mannitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84(1)**: 55-62.
- STOYANOVA S, GEUNS J, HIDEG É, VAN DEN ENDE W (2011). The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **62(3)**: 207-214.
- SUTTAJIT M, VINITKETKAUMNUEN U, MEEVATEE U, BUDDHASUKH D (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environmental Health Perspectives*, **101(3)**: 53-59.

- SYLVETSKY AC, ROTHER KI (2016). Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*, **164**: 446-450.
- ŞEKEROĞLU ZA, ŞEKEROĞLU V (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, **4(3)**: 221-229.
- TADHANI MB, PATEL VH, SUBHASH R (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20(3)**: 323-329.
- TAKASAKI M, KONOSHIMA T, KOZUKA M, TOKUDA H, TAKAYASU J, NISHINO H, LEE KH (2009). Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17(2)**: 600-605.
- TAKASAKI M, KONOSHIMA T, MURATA Y, SUGIURA M, NISHINO H, TOKUDA H, YAMASAKI K (2003). Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori*. *Cancer Letters*, **198(1)**: 37-42.
- TAPPY L, LÊ KA (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, **90(1)**: 23-46.
- TAVARINI S, ANGELINI LG (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93(9)**: 2121-2129.
- TIMBRELL JA (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, **129(1)**: 1-12.
- TOSKULKAC C, CHATURAT L, TEMCHAROEN P, GLINSUKON T (1997). Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug and Chemical Toxicology*, **20(1-2)**: 31-44.
- TOYODA K, MATSUI H, SHODA T, UNEYAMA C, TAKADA K, TAKAHASHI M (1997). Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, **35(6)**: 597-603.
- TRICHOPOULOS D (1999). Response to Schwartz GR. Aspartame and breast and other cancers. *Western Journal of Medicine*, **171(5-6)**: 301.
- TÜRK GIDA KODEKSİ (TGK) (2013). Türk gıda kodeksi gıda katkı maddeleri yönetmeliği. Erişim Adresi: [\[http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18532&MevzuatIliski=sourceXmlSearch=katk%C4%B1\]](http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18532&MevzuatIliski=sourceXmlSearch=katk%C4%B1). Erişim Tarihi: 18/10/2017.
- TÜRKİYE CUMHURİYETİ ŞEKER KURUMU (2015). T.C. Şeker Kurumu 2015 Yılı Faaliyet Raporu. Erişim Adresi: [\[http://www.sekerkurumu.gov.tr/upload/special/SEKER_KURUMU_2015_F.pdf\]](http://www.sekerkurumu.gov.tr/upload/special/SEKER_KURUMU_2015_F.pdf) Erişim Tarihi: 10/11/2017.
- TÜRKİYE CUMHURİYETİ ŞEKER KURUMU (2017). Sektör Raporu 2016. Erişim Adresi: [\[http://www.turkseker.gov.tr/sektor_raporu_2017.pdf\]](http://www.turkseker.gov.tr/sektor_raporu_2017.pdf) Erişim Tarihi: 10/11/2017.

- UÇAR A, YILMAZ S (2015). Saccharin genotoxicity and carcinogenicity: a review. *Adv. Food Sci*, **37**: 138-143.
- UÇAR A, YILMAZ S, YILMAZ Ş, KILIÇ MS (2017). A research on the genotoxicity of stevia in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-4. DOI: 10.1080/01480545.2017.1349135.
- URBAN JD, CARAKOSTAS MC, BRUSICK DJ (2013). Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient? *Food and Chemical Toxicology*, **51**: 386-390.
- USAMI M, SAKEMI K, KAWASHIMA K, TSUDA M, OHNO Y (1995). Teratogenicity study of stevioside in rats. *Eisei Shikenjo hokoku. Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, **113**: 31-35.
- VAN HIMBERGEN TM, ROEST M, DE GRAAF J, JANSEN EH, HATTORI H, KASTELEIN JJ, VAN TITS LJ (2005). Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, **46**(3): 445-451.
- VAN WYMELBEKE V, BERIDOT-THEROND ME, DE LA GUERONNIERE V, FANTINO M (2004). Influence of repeated consumption of beverages containing sucrose or intense sweeteners on food intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**(1): 154-161.
- VERNIA P, FRANDINA C, BILOTTA T, RICCIARDI, MR, VILLOTTI G, FALLUCCA F (1995). Sorbitol malabsorption and nonspecific abdominal symptoms in type II diabetes. *Metabolism*, **44**: 796-799.
- WEIHRAUCH MR, DIEHL V (2004). Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology*, **15**(10): 1460-1465.
- WENNERHOLM K, ARENDS J, BIRKHED D, RUBEN J, EMILSON CG, DIJKMAN AG (1994). Effect of xylitol and sorbitol in chewing-gums on mutans streptococci, plaque pH and mineral loss of enamel. *Caries Research*, **28**: 48-54.
- WHEELER A, BOILEAU AC, WINKLER PC, COMPTON JC, PRAKASH I, JIANG X, MANDARINO DA (2008). Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(7): S54-S60.
- WHEELER ML, FINEBERG SE, GIBSON R, FINEBERG N (1990). Metabolic response to oral challenge of hydrogenated starch hydrolysate versus glucose in diabetes. *Diabetes Care*, **13**: 733-740.
- WHITEHOUSE CR, BOULLATA J, MCCAULEY LA (2008). The potential toxicity of artificial sweeteners. *Aaohn Journal*, **56**(6): 251-261.
- WIEBE N, PADWAL R, FIELD C, MARKS S, JACOBS R, TONELLI M (2011). A systematic review on the effect of sweeteners on glycemic response and clinically relevant outcomes. *BMC Medicine*, **9**(1): 123-128.
- WILLIAMS LD, BURDOCK GA (2009). Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology*, **47**(8): 1831-1836.

- WISSELINK HW, WEUSTHUIS RA, EGGINK G, HUGENHOLTZ J, GROBBEN GJ (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, **12(2)**: 151-161.
- WITT J (1999). Discovery and development of neotame. In *Low-Calories Sweeteners: Present and Future*, Karger Publishers. **85**: 52-57.
- WOELWER-RIECK U, LANKES C, WAWRZUN A, WUST M (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, **231(4)**: 581-588.
- WOLEVER TM, PIEKARZ A, HOLLANDS M, YOUNKER K (2002). Sugar alcohols and diabetes: a review. *Can J Diabetes*, **26**: 356-362.
- WOLFF S, RODIN B (1978). Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells. *Science*, **200(4341)**: 543-545.
- WURSCH P, KOELLREUTTER B, SCHWEIZER TF (1989). Hydrogen excretion after ingestion of five different sugar alcohols and lactulose. *European Journal of Clinical Nutrition*, **43**: 819-825.
- XILI L, CHENGJIANY B, ERYI X, REIMING S, YUENGMING W, HAODONG S, ZHIYIAN H (1992). Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **30(11)**: 957-965.
- YAMADA A, OHGAKI, S, NODA T, SHIMIZU M (1985). Chronic toxicity study of dietary stevia extracts in F344 rats. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **26(2)**: 169-183.
- YANG Q (2010). Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **83(2)**: 101-108.
- YANISHLIEVA-MASLAROVA NV, HEINONEN IM (2001). Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. *Antioxidants in Food*, **3**: 210-248.
- YASUKAWA K, KITANAKA S, SEO S (2002). Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25(11)**: 1488-1490.
- YASUKAWA K, YAMAGUCHI A, ARITA J, SAKURAI S, IKEDA A, TAKIDO M (1993). Inhibitory effect of edible plant extracts on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced ear oedema in mice. *Phytotherapy Research*, **7(2)**: 185-189.
- YILMAZ S, UÇAR A (2014). A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not?. *Cytotechnology*, **66(6)**: 875-881.
- YOUNG IS, WOODSIDE JV (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54(3)**: 176-186.

ZHANG HY, WANG LF (2002). Theoretical elucidation on structure–antioxidant activity relationships for indolinonic hydroxylamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **12(2)**: 225-227.

ZUMBE A, LEE A, STOREY D (2001). Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. *British Journal of Nutrition*, **85**: 31-45.



EKLER

Ek 1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

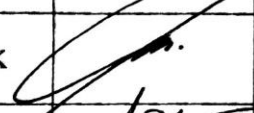
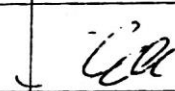
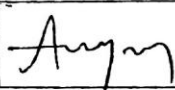
TOPLANTI TARİHİ : 01/02/2017
TOPLANTI NO : 2017-3
DOSYA NO : 2017-7
KARAR NO : 2017-3-19

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyelerinden Doç.Dr.Aslı Uçar'ın yaptığı; araştırmacı olarak Prof.Dr.Serkan Yılmaz ve Arş.Gör.Şemsi Gül Yılmaz'ın katıldığı; "Balb/c cinsi Farelerde Steviol Glikozid'e Maruziyetin Oksidatif Hasar İndeks Parametreleri, Paraoksonase Enzimi ve Bazı Genetik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına; oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 40
Geçerlilik Süresi : 01/03/2017-29/03/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	—
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	—

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gölnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Dr.Vet.Hek.Gülbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	—
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	



Doç.Dr.Ayten DEMİR
Dekan Yardımcısı

ASLI GİBİDİR
Doç.Dr.Ayten DEMİR
Dekan Yardımcısı

ÖZGEÇMİŞ

I-Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Şemsi Gül YILMAZ

Doğum yeri ve tarihi: 06.02.1993

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekâr

İletişim adresi: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Aktaş Mah. Plevne cd. Aktaş Kavşağı No: 5 Altındağ/Ankara

II-Eğitimi

Yüksek Lisans (2015-Halen): Ankara Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Lisans (2010-2014): Gazi Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Yabancı dili: İngilizce

III-Mesleki Deneyimi

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi / Araştırma Görevlisi, 2014 – 2015

Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi / Araştırma Görevlisi, 2015 - Halen

IV. Bilimsel İlgili Alanlar

SCI, SSCI, SCI-EXP Yayınlar:

1. Uçar, A., Yılmaz, S., Yılmaz, Ş., & Kılıç, M. S. (2017). A research on the genotoxicity of stevia in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-4. DOI: 10.1080/01480545.2017.1349135.

Diğer Yayınlar:

1. YILMAZ ŞG., AKÇALI Ç., UÇAR A. (2015). Probiyotikler ve Sağlık Üzerine Etkileri, 3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotikler Kongresi, Poster Sunumu.
2. YILMAZ ŞG., YARDIMCI H. (2017). Kafeinin Sporcular Üzerinde Ergojenik Etkisi. *e-sağlık Beslenme ve Diyetetik Dergisi*, 5 (17): 56-65.
3. YILMAZ ŞG., UÇAR A. (2017). Pekmez, 1. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi, Poster Sunumu.
4. YILMAZ ŞG., UÇAR A. (2017). Dinler ve Beslenme, International Congress On Cultural Heritage And Tourism, Sözel Sunum ve Tam Metin Bildirimi.
5. BAHAR Ş., YILMAZ ŞG. (2017). Sporcularda Kafeinin Ergojenik Etkileri, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri, VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Poster Sunumu.
6. MANGAR B., YILMAZ ŞG. (2017). Anne Sütü ve Mikrobiyota, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri, VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Poster Sunumu.
7. SARITEKELİ ML., Ş., YILMAZ ŞG. (2017). Probiyotikler, Mikrobiyota ve Obezite, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri, VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Poster Sunumu.
8. YILMAZ ŞG., UÇAR A. (2017). Caffeine and Health, 11th European Nutrition and Dietetics Conference, Poster Sunumu.
9. YILMAZ ŞG., UÇAR A. (2017). University Students' Body Perception and Obesity Prejudice, 11th European Nutrition and Dietetics Conference, Sözel Sunum.
10. UÇAR A., YILMAZ ŞG., YILMAZ S. (2017). Assessment of Perception, Knowledge and Attitudes Related to Nutrigenetics among Dietitians Working at Hospital, World Congress on Nutrition and Obesity Prevention Source, Sözel Sunum.

V. Bilimsel Etkinlikleri

Devam Eden Projeler:

1. Balb/c Cinsi Farelerde Steviol Glikozid'e Maruziyetin Oksidatif Hasar İndeks Parametreleri, Paraoxonase Enzimi ve Bazı Genetik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi (Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Lisansüstü Tez Projesi, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Aslı UÇAR, Araştırmacı: Arş. Gör. Şemsi Gül YILMAZ ve Prof. Dr. Serkan YILMAZ)

VI. Diğer Bilgiler

Katıldığı Konferans ve Sempozyum v.b:

1. Nutrisyonda Güncel Yaklaşımlar Eğitimi, 19 Mayıs Üniversitesi (Ekim, 2015)
2. Obeziteye Multidisipliner Yaklaşım Kongresi, Şifa Üniversitesi (Kasım, 2015)
3. 3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotikler Kongresi, Gazi Üniversitesi (Mart, 2016)
4. Mikrobiyota ve İnsan Sağlığı Sempozyumu, TÜBA (Nisan, 2017)
5. 1. Ulusal Hemşirelikte Araştırma Kongresi, HEMARGE (Nisan, 2017)
6. Yaşamın İlk 60 Ayında Malnütrisyon Çalıştayı, SADEFE (Mayıs, 2017)
7. 1. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi, TABKON (Mayıs, 2017)
8. International Congress On Cultural Heritage And Tourism, ICCHT (Mayıs, 2017)
9. 11th European Nutrition and Dietetics Conference, Madrid, Conferenceseries (Haziran/Temmuz, 2017)
10. Hastalıklarda Güncel Nütrisyon Yaklaşımları Sempozyumu-I, GATA (Ekim, 2017)
11. World Congress on Nutrition and Obesity Prevention Source, Barcelona, Scientific Future Group (Kasım, 2017)
12. Düşük Kalorili ve Kalorisiz Tatlandırıcılar Konferansı, TDD (Aralık, 2017)