

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUHTELİF GIDA BOYALARININ
Pisum sativum L.
ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan KIRCA EKİNCİ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ
Enstitü Bilim Dalı : BOTANİK
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. E. Selcen DARÇIN

Haziran 2011

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUHTELİF GIDA BOYALARININ *Pisum sativum L.*
ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan KIRCA EKİNCİ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Enstitü Bilim Dalı : BOTANİK

Bu tez 15/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Arif BARAN

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. E. Selcen

DARÇIN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU

Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince danışmanlığımı yürüten, hocam sayın Yrd. Doç. Dr. E. Selcen DARÇIN'a; tez aşaması boyunca yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Sema Tülay HEKİMBAŐI'NA Őukranlarımı sunarım. 2011-50-01-081 nolu projemizi destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına, ayrıca maddi manevi desteğini her zaman üzerimde hissettiğim aileme, İngilizce çeviriler konusundaki yardımlarından dolayı kardeşim Zehra KIRCA'ya, ve de bu çalışmanın tamamlanması konusunda benden daha heyecanlı olan sevgili eşim Hasan EKİNCİ'ye sonsuz teşekkür ederim..

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	1
1.1.1. Gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi.....	2
1.2. Gıda Boyaları.....	4
1.2.1. Gıda boyalarının tarihçesi.....	4
1.2.2. Gıda boyalarının güvenilirliği.....	7
1.2.3. Renklendiricilerin gıdalarda kullanım alanları.....	8
1.2.4. Kullanımına izin verilen gıda boyaları.....	10
1.3. Tartrazin.....	10
1.3.1. Tartrazinin kimyasal yapısı ve genel özellikleri.....	11
1.3.2. Tartrazinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	12
1.3.3. Tartrazinin metabolizması	13
1.3.4. Tartrazinin genotoksik etkileri.....	13
1.3.4.1. Tartrazin ile yapılan <i>in vitro</i> çalışmalar.....	15
1.3.4.2. Tartrazin ile yapılan <i>in vivo</i> çalışmalar.....	15
1.3.5. Tartrazinin karsinojenitesi.....	17

1.4. Sunset Yellow	18
1.4.1. Sunset yellowun kimyasal yapısı ve genel özellikleri....	18
1.4.2. Sunset yellowun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	19
1.4.3. Sunset yellowun metabolizması.....	20
1.4.4. Sunset yellowun genotoksik etkileri.....	20
1.4.5. Sunset yellowun karsinojenitesi.....	23
BÖLÜM 2.	
MATERYAL VE METOT.....	25
2.1. Materyal.....	25
2.1.1. Bezelye (<i>Pisum Sativum L.</i>).....	25
2.1.2. Tartarazin ve sunset yellow çözeltilerinin hazırlanışı.....	26
2.2. Metot.....	27
2.2.1. Tohumların çimlendirilmesi.....	27
2.2.2. Çimlenen tohumlarda kök uzunluklarının ölçülmesi.....	27
2.2.3. Mitotik preparatların hazırlanması.....	27
2.2.4. Mikroskopik gözlem.....	28
2.2.5. Mitotik indeksin hesaplanması.....	29
2.2.6. Kromozom anormalliklerinin hesaplanması.....	29
2.2.7. İstatistiksel verilerin hesaplanması.....	29
BÖLÜM 3.	
BULGULAR.....	30
3.1. Tartrazinin Genotoksik Etkileri.....	30
3.1.1. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri.....	30
3.1.2. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının kök gelişimi üzerine etkisi.....	31

3.1.3. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının mitotik indeks üzerine etkisi.....	34
3.1.4. Farklı konsantrasyonlarda tartrazinde çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları.....	35
3.1.5. Farklı tartrazin konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda interfaz anormalliği.....	37
3.2. Sunset Yellowun Genotoksik Etkileri.....	38
3.2.1. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri.....	38
3.2.2. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının kök gelişimi üzerine etkisi.....	39
3.2.3. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının mitotik indeks üzerine etkileri.....	42
3.2.4. Farklı konsantrasyonlarda sunset yellowda çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları.....	44
3.2.5. Sunset yellowun farklı konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda interfaz anormalliği.....	46
3.3. Farklı tartrazin ve sunset yellow konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda mitotik anormallik tanımları.....	47

BÖLÜM 4.

TARTIŞMA.....	54
---------------	----

KAYNAKLAR.....	59
----------------	----

ÖZGEÇMİŞ.....	68
---------------	----

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

WHO	: Dünya sağlık örgütü
FAO	: Gıda ve tarım örgütü
JECFA	: Joint. Expert Committee on Food Additives
ADI	: Sakıncasızca alınabilecek günlük doz
NOAEL	: Toksik etkinin görülmediği en yüksek doz
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
CHL	: Çin hamster karaciğer hücresi
CCMA	: Sertifikalı renk sanayicileri derneği
MI	: Mitotik indeks
N	: Normal hücre
A	: Anormal hücre
AN	: Anormallik oranı (%)
kg	:Kilogram
Mg	: Miligram
µg	:Mikrogram
ppm	:Milyonda bir birim
mm	: Milimetre
L	: Litre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Gıdalarda kullanılan renk katkı maddelerinin tarihsel gelişim süreci	6
Şekil 1.2.	Tartrazin (trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo) -H-pirazol-3-karboksilat) yapısı.....	11
Şekil 1.3.	Sunset Yellowun (Disodyum 2-hidroksi-1-(4-sülfonatofenilazo) naftalen-6-sülfonat) Yapısı.....	18
Şekil 2.1.	<i>Pisum sativumun</i> Morfolojik Yapısı.....	26
Şekil 3.1.	Kontrol Grubu ve Tartrazin Konsantrasyonlarında 24 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	32
Şekil 3.2.	Kontrol Grubu ve Tartrazin Konsantrasyonlarında 48 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	33
Şekil 3.3.	Kontrol Grubu ve Tartrazin Konsantrasyonlarında 72 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	33
Şekil 3.4.	Kontrol Grubu ve Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 24 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	41
Şekil 3.5.	Kontrol Grubu ve Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 48 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	41
Şekil 3.6.	Kontrol Grubu ve Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 72 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi....	42
Şekil 3.7.	Tartrazin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde anafazda geri kalma, metafazda büzülen kromozomlar.....	47
Şekil 3.8.	Tartrazin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde metafazda fregmantasyon.....	47
Şekil 3.9.	Tartrazin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde metafazda poliploidi.....	48

Şekil 3.10.	Tartrazinin 25mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde normal metafaz,büzüşmüş metafaz.....	48
Şekil 3.11.	Tartrazinin 25mg/L konsantrasyonunda metafaz plağında toplanamama	49
Şekil 3.12.	Tartrazinin 100mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde anafazda geri kalma.....	49
Şekil 3.13.	100mg/L Tartrazinde çekirdek büzülmesi.....	50
Şekil 3.14.	100mg/L Tartrazinde çift çekirdek.....	50
Şekil 3.15.	Sunset yellow 400mg/L konsantrasyondaki hücrede milronükleus..	51
Şekil 3.16.	Sunset Yellow 200 mg/L konsatrasyondaki hücrede anafazda geri kalma.....	51
Şekil 3.17.	Tartrazinin 10mg/L konsantrasyondaki hücrede metafazda poliploidi.....	52
Şekil 3.18.	Tartrazinin 10mg/L konsantrasyondaki hücrede profazda fragmentasyon.....	52
Şekil 3.19.	Sunset Yellow 10mg/L konsantrasyondaki hücrede anafazda geri kalma.....	53
Şekil 3.20.	Sunset Yellow 100mg/L konsantrasyondaki hücrede metafazda yapışma.....	53

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Gıda renklendiricilerinin gıdalarda bulunabileceği maksimum miktarları.....	9
Tablo 1.2.	Gıdalarda Kullanımına İzin Verilen Gıda Boyaları.....	10
Tablo 1.3.	Tartrazinle yapılan genotoksik çalışmalar.....	14
Tablo 1.4.	Sunset Yellowla Yapılan Genotoksik Çalışmalar.....	21
Tablo 3.1.	Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında Hazırlanan Çözeltilerin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	30
Tablo 3.2.	Farklı Konsantrasyonlardaki Tartrazin Çözeltilerine 24, 48 ve 72 saat Maruz Kalmış Bezelye Tohumlarının Ölçülen Kök Uzunlukları.....	31
Tablo 3.3.	Farklı Konsantrasyonlarda Tartrazin Grupları ile Kontrol Gurubuna Ait Kök Ucu Hücrelerindeki Mitotik İndeks Değerleri	34
Tablo 3.4.	Farklı Konsantrasyonlarda Tartrazinde Çimlendirilen Tohumların Mitotik Anormallik Dağılımı.....	35
Tablo 3.5.	Tartrazinin Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Mitotik Evre Dağılımı ve Anormallik Oranları.....	36
Tablo 3.6.	Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Normal ve Anormal İnterfaz Dağılımı.....	37
Tablo 3.7.	Farklı Sunset Yellow Konsantrasyonlarında Hazırlanan Çözeltilerin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	38
Tablo 3.8.	Farklı Konsantrasyonlardaki Sunset Yellow Çözeltilerine 24, 48 ve 72 Saat Maruz Kalmış Bezelye Tohumlarının Ölçülen Kök Uzunlukları.....	40
Tablo 3.9.	Farklı Konsantrasyonlarda Sunset Yellow Grupları ile Kontrol Gurubuna Ait Kök Ucu Hücrelerindeki Mitotik İndeks Değerleri	43

Tablo 3.10.	Sunset Yelloewun Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Mitotik Anormallik Dağılımı.....	44
Tablo 3.11.	Farklı Konsantrasyonlarda Sunset Yellowda Çimlendirilen Tohumların Mitotik Evre Dağılımı ve Anormallik Oranları.....	45
Tablo 3.12.	Sunset Yellowun Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Normal ve Anormal İnterfaz Dağılımı.....	46

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Pisum sativum L.*, Tartrazin, Sunset Yellow, Genotoksik

Bu çalışmada, çeşitli gıdalarda renklendirici olarak kullanılan Tartrazin ve Sunset Yellow'un genotoksik etkisi *Pisum sativum L.* model organizması üzerinde incelenmiştir. Bitki tohumları 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanan boya çözeltilerinde çimlendirilmiştir. Kontrol grubu ise damıtık suda çimlendirilen tohumlardan oluşturulmuştur.

Araştırma sonucuna göre; çimlenmenin sadece 24. saatinde Tartrazin ve Sunset Yellow'un tüm konsantrasyonlarında kontrole kıyasla anlamlı fark gözlenmiştir. Çimlenme süresi 72 saate ulaştığında ise tüm gruplarda çimlenme oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

Tartrazin'in tüm konsantrasyonlarında mitotik indeks ileri derecede anlamlı olacak şekilde azalmıştır ($p < 0.00001$). Sunset Yellow'un 10 mg/L konsantrasyonunda mitotik indeksteki azalma anlamlı bulunmazken ($p > 0.05$); diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir.

İstatistiksel hesaplamalarda Tartrazin ve Sunset Yellow'un çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarında mitoz bölünmedeki anormallikler anlamlı bulunmuştur. Mitotik hücrelerde, metafaz plağında toplanamama, kromozomlarda yapışma, poliploidi, fregmantasyon, anafaz köprüleri, mikronükleus ve çift çekirdek anormallikleri gözlemlendi.

Sonuç olarak; çalışmada kullanılan her iki gıda boyasının 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterdiği kanısına varılmıştır.

GENOTOXIC EFFECTS OF SOME COLORANTS ON *Pisum sativum L.*

SUMMARY

Key Words: *Pisum sativum L.*, Tartrazin, Sunset Yellow, Genotoxic

In this study, genotoxic effects of Tartrazine and Sunset Yellow used as colorants in various foods have been investigated on the model organism of *Pisum sativum L.* Plant seeds were germinated in dye solutions prepared in 10, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L concentration values. Control group was formed by seeds germinated in distilled water.

As a result of this study, a significant difference was observed at only 24 hours of germination in all concentrations of Tartrazine and Sunset Yellow compared to control. When germination time reaches at 72 hours, germination rate was determined to be % 100 in all groups.

Mitotic index has decreased highly significantly in all concentrations of Tartrazine. ($p < 0.00001$). Whereas there was no significant reduction in 10 mg/L concentration of Sunset Yellow in mitotic index ($p > 0.05$); a statistically significant decrease was observed in all other concentrations.

In statistical calculations, abnormalities in mitosis were found to be significant in all concentrations of Tartrazine and Sunset Yellow used in the study. Ungathering on metaphase plate, sticky chromosomes, polyploidy, fragmentation, anaphase bridges, micronucleus and dual-core abnormalities were observed in mitotic cells.

As a result, it was indicated that the two food dye used in the study showed genotoxic effect in 10, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L concentrations.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. Gıda Katkı Maddeleri

Günümüzde tükettiğimiz hemen hemen tüm gıdalarda katkı maddelerine rastlanmaktadır. Türk gıda kodeksi yönetmeliğine göre; gıda katkı maddesi, ‘normal koşullarda tek başına tüketilemeyen veya gıda hammaddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir’.

Gıda katkı maddelerine, doğumdan ölüme kadar yaşamın her anında maruz kalılabilmektedir. Katkı maddelerini taşıyan gıdaları yüz milyonlarca kişinin tükettiği düşünüldüğünde, yapılan en ufak hatanın insan sağlığı ile ilgili çok ciddi sorun oluşturacağı aşikardır. Bu özellik nedeni ile, gıda katkı maddelerinin kullanım izni uluslararası ve ulusal sağlık otoritelerinin son derece yoğun ve dikkatli incelemesi sonucunda verilmektedir. Dolayısıyla gıda katkı maddeleri kullanımı insan sağlığının korunması yönünden en sıkı denetim altında tutulan kimyasal madde grubudur.

Gıda katkı maddeleri ile ilgili ilk sistematik araştırma 1956’da WHO ve FAO tarafından 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması şeklinde gerçekleşmiştir. Bu çalışmada 200’e yakın kimyasal maddenin gıdalarda bu amaçla kullanılmakta olduğu tespit edilmiştir. 1962’de FAO ve WHO kuruluşlarının bu konularda uzman olan araştırmacıları bir araya gelerek JECFA (Joint Expert Committee on Food

Additives)' yı oluşturmuşlardır. JECFA; bugün de katkı maddesi olarak kullanılan her kimyasal madde için toksikolojik çalışmaların düzenlenmesini, yürütülmesini ve sonuçlarının değerlendirmelerini üstlenmiş yegane uluslararası kurumdur. Sayıları artık 1500'ü aşmış bu maddeleri JECFA'nın alt uzman komisyonları periyodik toplantılar düzenleyerek değerlendirmeye devam etmektedir (Karaali, 2006).

JECFA'nın görevleri;

- Katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmeleri için metodolojileri belirler.
- Toksikolojik değerlendirmeleri yürütür ve sonuçları değerlendirerek sakıncasızca alınabilecek dozları (ADI) belirler.
- Her katkı maddesi için spesifikasyonları, saflık kriterlerini ve analiz yöntemlerini belirler.
- Çeşitli toplumlarda gıda katkı maddelerinin günlük-yıllık tüketim düzeylerini belirler ve değerlendirir.

1.1.1. Gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi

Gıda katkı maddelerinin kimyasal madde olduğu düşünüldüğünde, tüm kimyasal maddelerde olduğu gibi gıda katkı maddeleri de alınan doza bağımlı olarak toksikolojik etki gösterir. Toksikite çalışmaları çoğunlukla deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilir. Kronik toksisite karsinojenite testleri deney hayvanlarının ortalama yaşam süresinin %70-80'nini kapsayacak süre boyunca, test edilecek kimyasalın her gün deney hayvanına verilmesiyle gerçekleşir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, ömür boyu tüketilmek koşuluyla maddenin bir günde sakıncasızca alınabileceği günlük doz (ADI) tespit edilir. ADI değeri tespit edilirken ana hedef, popülasyondaki deneklere ömürleri boyunca verildiği halde, herhangi bir fizyolojik etkinin gözlenmediği, maddeden ötürü hiçbir toksik etkinin görülmediği en yüksek doz (NOAEL değeri)'un belirlenmesidir. Ancak bu doz, deney hayvanının vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak saptanmış bir dozdur ve insandaki

etkileri bilinmemektedir. Deney, insanlar üzerinde de etik nedenlerle yapılamayacağından, elde edilen dozun 1/10'u alınır. İnsanlar arasındaki bireysel ayrıcalıklar düşünülerek yine 1/10 alınarak NOAEL 100 olan güvenlik faktörüne bölünür. Yani deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100'ü insan için kabul edilir. ($ADI = NOAEL / 100$). Böylece günlük alınabilecek miktar (ADI), insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir (Karaali, 2006; Yurtakul ve Ayaz, 2008).

Günlük Maksimum Alım = ADI x Vücut Ağırlığı (kg)



Katkı maddesi



Deney hayvanları üzerinde katkı maddelerinin toksik etkilerinin incelenmesi



Etkisiz dozun (NOAEL değeri) belirlenmesi (Deney hayvanlarında)



Etkisiz doz (NOAEL) / 100 (insanda)



Günlük alınabilecek katkı maddesi miktarı (ADI)

ADI değeri sadece ve sadece JECFA tarafından tespit edilmekle beraber bu değer değişmez değildir. Gıda katkı maddeleri üzerinde yapılan çalışmalar süreklilik taşıyıcı ve yeni bulgular çerçevesinde sürekli değerlendirilir (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

1.2. Gıda Boyaları

Renk, ışığın spektral dağılımında meydana gelen görsel bir özelliktir. Doğal gıdaların renkleri içerdikleri çok çeşitli kimyasal formlara sahip olan ve pigment olarak tanımlanan maddelerden kaynaklanmaktadır. Meyveler ve sebzeler gibi doğal kaynaklı birçok ürün çeşitli renklere sahiptir. Renk; gıdaların duyuşsal özellikleri yönünden ele alındığında, tüketici tercihi açısından, gıdanın çekiciliğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bir gıda ile ilgili ilk izlenim görseldir ve gıdanın tercih edilmesi onun renginin kabul edilmesine veya reddedilmesine bağlıdır. Konu ile ilgili olarak yapılan pek çok çalışma renk ile lezzet arasında pozitif yönde bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Gıda katkı maddeleri içerisinde önemli bir grubu gıda boyaları řu sebeplerle gıdalara katılmaktadır;

- İşlem ve depolama sırasında gıda maddesinin kaybolan rengini yeniden vermek için,
- Zayıf olan doğal rengi kuvvetlendirmek için,
- Gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek için,
- Düşük kalitelerini gizlemek amacıyla cazip ve kabul edilebilen ürünler elde etmek için (Crosby, 1981) .

1. 2.1. Gıda boyalarının tarihçesi

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, Milattan Önce (MÖ) 3000 yıllarında et ürünlerini kürlümede tuzdan yararlanıldığı, MÖ 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağ'da etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün

yanı sıra katılan nitratın etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve botulizmi önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. MÖ 50'lerde baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3.500 yıl kadar önce Mısırlı'lar tarafından renklendirici amaçla kullanılmıştır. On dokuzuncu yüzyılda; hızlı kentleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımı, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup, günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır (Atman, 2004).



Şekil 1.1. Gıdalarda kullanılan renk katkı maddelerinin tarihsel gelişim sürecinin çizelgesi (Delgado-Vargas, ve Paredes-López, 2003).

1.2.2. Gıda boyalarının güvenilirliği

Geçmiş yıllarda kömür katranı, günümüzde ise petrol kökenli sentezlenen gıda boyaları uzun yıllardır tartışma konusu olmuştur. Bir çok gıda boyası laboratuvar hayvanları üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı yasaklanmıştır (Sarah ve Michael, 2010). Her ne kadar son yıllarda gıda renklendiricilerinin kullanımı güvenilirlik nedenleri ile azaltılmış olsa da, çeşitli sentetik gıda renklendiricileri hala dünyanın birçok yerinde ucuz, etkili ve stabil olduğu için doğal boyalar yerine kullanılmaktadır (Seyhan, 2006).

Gıda boyaları; 1923 yılında ilk olarak İngiltere’de Sağlık Bakanlığının görevlendirdiği bir komite tarafından değerlendirilmiştir. Bu komitenin amacı; gıda renklendiricilerinin sağlığa zararlı olup-olmadığını; eğer zararlı ise, bunun hangi dozda gerçekleştiğini bulup, ilan etmektir. Komitenin sonuçları bildirdiği raporunda; renklendiricilere numaralar verildi ve zararlı olanların yiyeceklerde kullanımı yasaklanmıştır (Chappel ve Howell, 1992).

Gıda maddelerinde kullanılan bazı sentetik boyaların insanlar üzerinde yaptığı toksik etkiler 1950 yılından sonra özellikle toksikoloji bilimindeki gelişmelere bağlı olarak ilk defa dikkati çekmiş ve sentetik boyaların insan sağlığı açısından risk oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu tarihten sonra sentetik gıda boyaları üzerinde kronik toksisite çalışmaları başlamıştır (Radomski, 1974; Marmion,1979; Yentür ve Karakaya, 1985).

Doğal ya da sentetik renklendiricilerden, özellikle gıdalarda kullanılanlar üzerinde Hueper (1956)’in yaptığı çalışmalar; bu bileşiklerin potansiyel karsinogen olabileceklerini ortaya çıkarmıştır. O tarihlerden beri, renklendiricilerin karsinogenik, mutajenik, toksikolojik özelliklerine ait çalışmalar süregelmektedir (Matula ve Downie, 1984; Jansson ve Zechi, 1987; Lakdawalla ve Netrawali, 1988(a); Lakdawalla ve Netrawali, 1988(b); Borzelleca ve ark., 1989; İzbrak ve ark., 1990; Kılıçcioğlu, 1995).

Sentetik gıda boyalarının kullanılması 1963-1970 yılları arasında FAO/WHO uzmanlar komitesi tarafından incelenmiş ve bu komite tarafından bazı boyaların ADI değeri saptanmıştır (Chichester ve Tanner, 1972).

İsveç'te 1974'ün ilk yarısında, gıda boyalarının kullanımı hakkında yoğun tartışmalar olmuştur. FDA; bir renk raporu çıkararak yeni düzenlemeler getirmiştir. Renk maddelerinin toksisite ve karsinojenik özellikleri incelendiğinde, her zaman güvenilir olmadıkları görülmüştür (El-Saaday, 1991; Larsson, 1975). Tüm bu gelişmeler göz önüne alındığında, gıda boyalarının metabolizmaları ve özellikleri hakkındaki araştırmaların sürelilik arz etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

1.2.3. Renklendiricilerin gıdalarda kullanım alanları

Renklendirici kullanılmasına izin verilen gıdalar ve bu gıdalarda renklendiricilerin bulunabileceği maksimum miktar, 25/08/2002 tarihli 24857 sayılı Resmi Gazete'de yayımlan 'Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Gıda renklendiricilerinin gıdalarda bulunabileceği maksimum miktarları

Gıda Maddesi	Maksimum Miktar
Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
Meyve ve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
Korunmuş kırmızı meyveler	200 mg/kg
Şekerlemeler	300 mg/kg
Süsleme ve kaplama malzemeleri	500 mg/kg
Hafif fırıncılık ürünleri	200 mg/kg
Dondurma	150 mg/kg
Aromalveirilmiş eritme peynir	100 mg/kg
Aromalveirilmiş süt ürünleri dahil tahıllar	150 mg/kg
Soslar, çeşni maddeleri, turşular	500 mg/kg
Hardal	300 mg/kg
Balıkların ve kabukluların ezmeleri	100 mg/kg
Ön pişirme yapılmış kabuklular	250 mg/kg
Somon balığı benzerleri	500 mg/kg
Balık yumurtası	300 mg/kg
Füme balık	100 mg/kg
Kuru patates, tahıl veya nişasta bazlı çerezler	
Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200 mg/kg
Diğer çerezler	100 mg/kg
Tıbbi kontrol altında kullanılan komple formüller ve ek gıdalar	50 mg/kg
Sıvı gıda takviyeleri	100 mg/l
Katı gıda takviyeleri	300 mg/kg
Çorbalar	50 mg/kg
Bitkisel protein bazlı et ve balık analogları	100 mg/kg
Distile alkollü içkiler	200 mg/l
Aromalveirilmiş şaraplar, aromalveirilmiş şarap bazlı içkiler ve aromalveirilmiş şarap-ürün kokteyleri	200 mg/l
Meyve şarapları, elma şarabı ve aromalveirilmiş armut şarabı	200 mg/l

1.2.4. Kullanımına izin verilen gıda boyaları

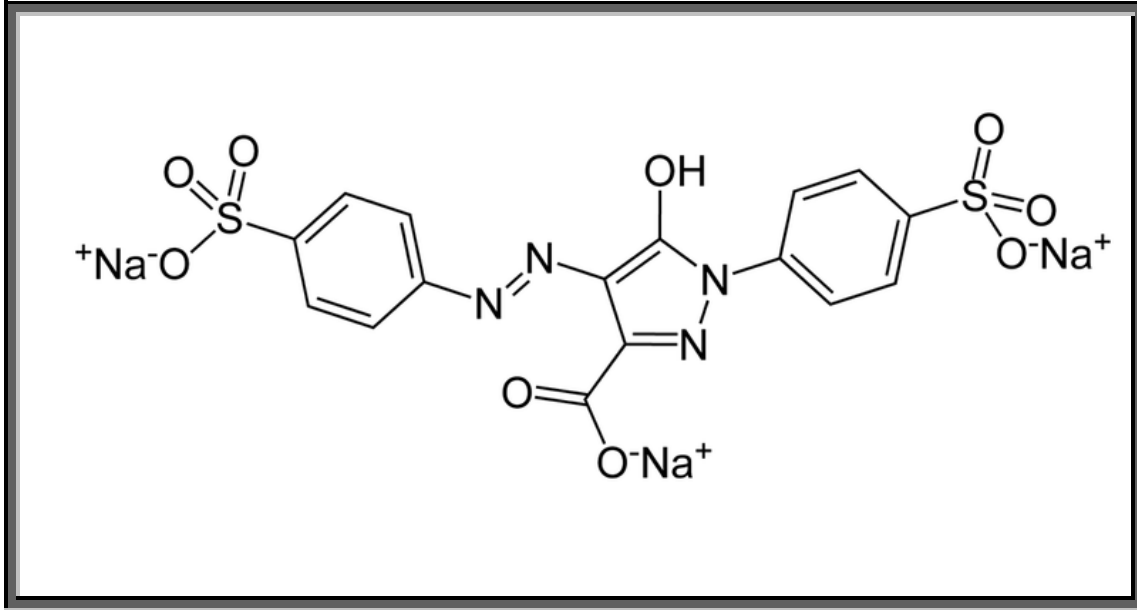
Gıdalarda kullanımına izin verilen gıda boyaları ve EC kodu (Gıda renklendiricileri için Uluslararası renk kod numarası), 25/08/2002 tarihli 24857 sayılı Resmi Gazete’de yayımlan ‘Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne göre Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Gıdalarda kullanımına izin verilen gıda boyaları ve EC kodları

EC Kodu	Genel Adı	EC Kodu	Genel Adı
E 100	Kurkumin	E 151	Brilliant Black BN, Black PN
E 101	Riboflavin Riboflavin-5’-fosfat	E 153	Bitkisel karbon
E 102	Tartrazin	E 154	Brown FK
E 104	Kinolin sarısı	E 155	Brown HT
E 110	Sunset yellow FCF Orange yellow S	E 160a	Karotenler (i) Karışım halindeki karotenler (ii) Beta-karoten
E 120	Koşineal, Karminik asit, Karminler	E 160b	Anatto, Biksin, Norbiksin
E 122	Azorubin, Karmosin	E 160c	Paprika ekstraktı Kapsantin, Kapsorubin
E 123	Amarant	E 160d	Likopen
E 124	Ponso(ponceau) 4R, Koşineal Red A	E 160e	Beta-apo-8’-karotenol (C 30)
E 127	Eritrosin	E 160f	Beta-apo-8’-karotenik asidin etil ester(C 30)
E 128	Red 2G	E 161b	Lutein
E 129	Allura Red AC	E 161g	Kantaksantin
E 131	Patent Blue V	E 162	Pancar kökü kırmızısı, Betanin
E 132	İndigotin (İndigo Karmin)	E 163	Antosiyantinler
E 133	Brilliant Blue FCF	E 170	Kalsiyum karbonat
E 140	Klorofiller ve Klorofilinler (i) Klorofiller (ii) Klorofilinler	E 171	Titanyum dioksit
E 141	Klorofiller ve Klorofilinlerin bakır kompleksleri (i) Klorofillerin bakır kompleksleri (ii) Klorofilinler bakır kompleksleri	E 172	Demir oksit ve hidroksitler
E 142	Green S	E 173	Alüminyum
E 150a	Sade Karamel (1)	E 174	Gümüş
E 150b	Kostik sulfit karamel	E 175	Altın
E 150c	Amonyum karamel	E 180	Litolrubin BK
E 150d	Amonyum sülfid karamel		

1.3. Tartrazin

1.3.1. Tartrazinin kimyasal yapısı ve genel özellikleri



Şekil 1.2. Tartrazinin (trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo)-H-pirazol-3-karboksilat) kimyasal yapısı

Tartrazin (E 102 veya FD&C Yellow 5), gıda boyası olarak kullanılan sentetik azo boyasıdır. Gıdalarda sarı renk oluşturmak için Afrika ve İsveç’de yaygın olarak kullanılır.

Tartrazin pek çok pastane mamullerinde, içecek, tatlı, şekerleme, jelatinli tatlılar, evcil hayvan yiyeceği ve birçok gıdanın yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünlerinde sıkça kullanılan renk katkı maddelerindedir. Tartrazin’in günlük maksimum alınabileceği miktar, FDA tarafından 5/mg/kg/gün olarak belirlenmiştir, ortalama 30 kg ağırlığındaki bir çocuk için bu değer 150 mg/gün doza denk gelmektedir (FDA, 1985).

1.3.2. Tartrazin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

- Sınıf: Monoazo
- Kimyasal adı: Trisodyum-5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo)-H-pirazol-3-karboksilat
- Kimyasal formülü: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
- Molekül ağırlığı: 543.37
- Tartarazin, trisodyum-5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo)-H-pirazol-3-karboksilat ve başlıca renksiz elementler olarak, sodyum klorid ve/veya sodyum sülfat ile birlikte yardımcı renklendirici maddelerden oluşur.
- Toz ve granüler halde portakal rengindedir.
- Tartrazin, sodyum tuzu olarak tanımlanır. Kalsiyum ve potasyum tuzuna da izin verilir.
- Saflık: Sodyum tuzu cinsinden, toplam renklendirici maddelerin % 85'inden az olmamalıdır.
- Renklendirici maddeler dışındaki organik bileşikler:
 1. 4-hidrazinobenzen sülfonik asit
 2. 4-aminobenzen-1- sülfonik asit
 3. 5-oxo-1-(4-sulfofenil)-2- pirazolin-3-karboksilik asit Toplam %5'den fazla olmamalıdır.
 4. 4,4'-diazonamidi (benzensülfonik asit)
 5. Tetrahidroksisüksinik asit
 6. Sülfone edilmemiş primer aromatik aminler: Anilin cinsinden % 0.01'den fazla olmamalıdır.
 7. Eter ile ekstrakte edilebilir madde: Nötr koşullarda %0.2'den fazla olmamalıdır.
 8. Arsenik: 3 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 9. Kurşun: 10 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 10. Cıva: 1 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 11. Kadmiyum: 1 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.

1.3.3. Tartrazin'in metabolizması

Tatrazin'in başlıca metabolizma ürünü sülfanilik asittir. ¹⁴C işaretli Tartrazin'in farelere ve tavşanlara intraperitonel uygulanması sonucunda idrarda radyoaktif sülfanilik asite rastlanmamıştır (Jones ve ark., 1964). Aynı çalışmada Tartrazin'in fare, tavşan ve insanda ağızdan verilmesiyle idrarda az miktarda sülfanilik asite rastlanmıştır. Bu sonuçlar Tartrazin'deki azalmanın mide ve bağırsak florası tarafından gerçekleştiğini göstermektedir. Ryan ve ark. (1969), farelerde ağızdan verilme sonucu bileşiğin büyük ölçüde bağırsak florası tarafından indirgendiğini ve Tartrazin'in bağırsak florası tarafından metabolize edildiğini doğrulamıştır.

1.3.4. Tartrazin'in genotoksik etkileri

Hücrelerde DNA ile etkileşime girerek olumsuz etki gösteren kimyasal maddeler genotoksik maddeler olarak adlandırılır. İnsan karsinojenlerinin çoğu genotoksiktir. Genotoksisite testleri, *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere, direk veya indirek yollarla kimyasalların farklı mekanizmalarla canlı üzerinde genetik hasara neden olup olmadığını belirlemede kullanılan testlerdir.

Tablo 1.3'de belirtilen 11 çalışmanın altısında Tartrazin'in genotoksik etkiye neden olduğu tespit edilmiştir. 1985'de Birleşmiş Milletler Sağlık ve İnsan Servisleri Departmanı genotoksisite çalışmalarından ikisini incelemiştir (Patterson ve Butler 1982; Ishidate, ve ark., 1984) ve Tartrazin'in kromozom aberasyonunu teşvik ettiği sonucuna karşı çıkmıştır (Flamm ve ark., 1985). Fakat, Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bakanlığı raporunda 'kültüre hücrelerde Tartrazin için belirtilen kromozom aberasyonları *vivo*'da gerçekleşirse, ciddi anlamda ters bir etkiye yol açması muhtemeldir' şeklinde ifade etmiştir. Akabinde, Sasaki ve ark. (2002), Comet Assay'de Tartrazin'in *In vivo*'da DNA hasarına neden olduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak çeşitli pozitif genotoksik sonuçlar daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Tablo 1.3. Tartrazinle yapılan çeşitli genotoksik çalışmalar (Kobylewski ve ark., 2010)

Deney	Mutasyon Çeşidi	Metabolik Aktivasyon (S9)	Doz	Sonuç	Referans
Comet Assay	DNA hasarı		10 mg/kg >10 mg/kg	Pozitif (kolon) Pozitif (mide)	(Sasaki, Kawaguchi ve ark. 2002)
Sitogenetik Deney	Kromozom Aberasyonu			Pozitif	(Hayashi, Matsui ve ark. 2000)
<i>S.Typhimurium</i> TA94,TA1537, TA98	Çerçeve Kayması	Var-Yok	5 mg/plak	Pozitif	(Ishidate, Sofuni ve ark. 1984)
<i>S.Typhimurium</i> TA1535,TA100, TA92	Baz çifti	Yok	2.5 mg/ml	Pozitif	
CHL hücrelerinde kromozom aberasyonu test	Kromozom aberasyonu	Yok	6 mg/ml	Pozitif	
In-vitro Muntiacus Muntjac	Kromozom aberasyonu	Yok	3 µg/ml	Pozitif	(Patterson ve Butler 1982)
<i>S. Typhimurium</i> TA1537,TA1538, TA98	Çerçeve kayması	Var-yok	5 mg/plak	Negatif	(Chung, Fulk ve ark. 1981)
<i>S. Typhimurium</i> TA1535,TA100	Kromozom çifti		5 mg/plak	Negatif	
<i>S. Typhimurium</i> TA100	Kromozom çifti	Var-yok		Negatif	(Kawachi, Yahagi ve ark. 1980)
<i>S. Typhimurium</i> TA98	Çerçeve Kayması	Var-yok		Negatif	
CHL hücrelerinde kromozom aberasyonu testi	Kromozom aberasyonu	Var-yok		Negatif	

* CHL: Çin Hamster Karaciğer Hücreleri

1.3.4.1 . Tartrazin ile yapılan *in vitro* çalışmalar

JECFA (1966) Tartrazin'in *Escherichia Coli* kültürlerinde mutajenik etkisinin test edildiği bir çalışmada, hiçbir mutajenik etkisinin gözlenmediğini açıklamıştır (Lück ve Rickerl, 1960).

Salmonella typhimurium (Izbirak ve ark., 1990) ve *E. Coli* (Karpliuk ve ark., 1984; Henschler ve Wild, 1985; Pollastrini ve ark., 1990)'de yapılan *in vitro* çalışmalarda mutajenik aktiviteye rastlanmadığını rapor etmiştir.

Gıda boyası olarak kullanılan dört azo boyası (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow ve Tartrazin)'nin mutajenitesi geniş ölçüde araştırılmıştır ve bu testlerde azo boyalarının mutajenik aktivite göstermediği gözlenmiştir (Izbirak ve ark., 1990).

Ishidate ve ark. (1984) ise, Çin Hamster fibroblast hücrelerine 48 saatlik bir Tartrazin uygulamasından sonra poliploid hücrelerin görülme sıklığında küçük bir artış olduğunu bildirmiştir.

Das ve Mukherejee (2004) metabolik faaliyet olmadan *Salmonella typhimurium* suşlarında ve *in vivo* fare kemik iliği deneyinde Tartrazin'in Ames testi ile mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. Ames testinde Tartrazin'in 10, 100, 250, 500 ve 1000 µg konsantrasyonlarda TA97a ve TA100 suşlarında mutasyona neden olmadığı fakat en yüksek iki dozda A 98 revertant-koloni sayısında artış olduğunu belirtmektedir.

1.3.4.2. Tartrazin ile yapılan *in vivo* çalışmalar

Giri ve ark. (1990), diyet ile kısa süreli veya sürekli yüksek dozlarda Tartrazin'e maruz bırakılmış fare ve sıçanların kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonlarında önemli bir artış gözlemlendiğini belirtmiştir.

Durnev ve ark. (1995), Tartrazin dahil olmak üzere altı gıda boyasında *in vivo* mutajenik etkiyi araştırmıştır. Gıda boyaları günlük 0.5 ve 5 mg/kg dozlarda (grup başına 5 hayvan) 18-20gr ağırlığında, 8-12 haftalık C57BL/6 farelere beş gün süreyle verilmiştir. Her uygulama ve kontrol grubundaki hayvanların kemik iliği hücrelerinden hazırlanan 100 metafaz plağındaki hücre incelenmiştir. Beş günlük uygulamadan sonra kontrol grubu ile Tartrazin uygulanan metafaz hücrelerinde anormallik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Araştırmacılar, Tartrazin'in fare kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonunda artışa neden olmadığını bildirmiştir.

Farag ve ark. (2001), günlük 68mg/kg Tartrazin ile ağızdan uygulama sonucunda 0-7 günlük gebe farelerde anne ve embriyodaki sitogenetik değişiklikleri değerlendirmiştir. Gözlemler sonucunda kromozom aberasyonunda artış ve mitotik indekste azalma tespit edilmiştir.

Sasaki ve ark. (2002), gıda katkı maddesi olarak kullanılmakta olan 39 kimyasalın genotoksisitesini çalışmıştır. Tartrazin'in mide, kolon veya mesanede doza bağlı olarak DNA hasarına yol açtığını belirtmiştir. Bazı gıda boyalarında düşük dozlarda (10veya 100mg/kg) mide ve bağırsaklarda DNA hasarı tespit edilmiştir. Bunlar arasında Amaranth, Allura Red, New coccine ve Tartrazin'de DNA hasarı gözlenmiştir. Tartrazin'de doz-etki ilişkisi olmadan 10-200mg/kg dozlar arasında midede DNA hasarı tespit edilmiştir.

Poul ve ark. (2009)'ın yaptığı bir araştırmaya göre; farelere 24 saat aralıklarla günde iki kez ağızdan besleme yoluyla Tartrazin uygulamasını takiben 24 saatlik inceleme sonucunda, Tartrazin'in bağırsak hücrelerinde mikronükleus tayininde genotoksisite gözlenmemiştir. Tartrazin'in ana metaboliti (sülfanilik asit) 24 saatlik inceleme süresince dışkıda ölçülmüş ve temel bileşikler ve onların metabolitleri kolon hücrelerinde önemli miktarda tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda Tartrazin'in 2000 mg/kg doza kadar bağırsak hücrelerinde mikronükleus tayininde genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise her düzeyde mitotik hücrelerin arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılara göre bu tutarsız sonuçlar;

oluşan genotoksik bir lezyonun tamir edilemeyeceği için, kısmen lokal sitotoksosite ile açıklanabilmektedir.

1.3.5. Tartrazinin karsinojenitesi

Karsinojenite, DNA'daki değişikliklerin, bir hücrenin uygun olmayan şekilde büyümesine ve bölünmesine yol açması anlamına gelir. Karsinojen ise, hücre DNA'sını etkileyerek kansere yol açan kimyasal bileşikler, fiziksel ve biyolojik (bazı virüs ve bakteriler) etmenlerdir. Gıda boyalarının insan hayatı boyunca en sık karşılaştığı kimyasal maddeler olduğu düşünüldüğünde bu konudaki çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

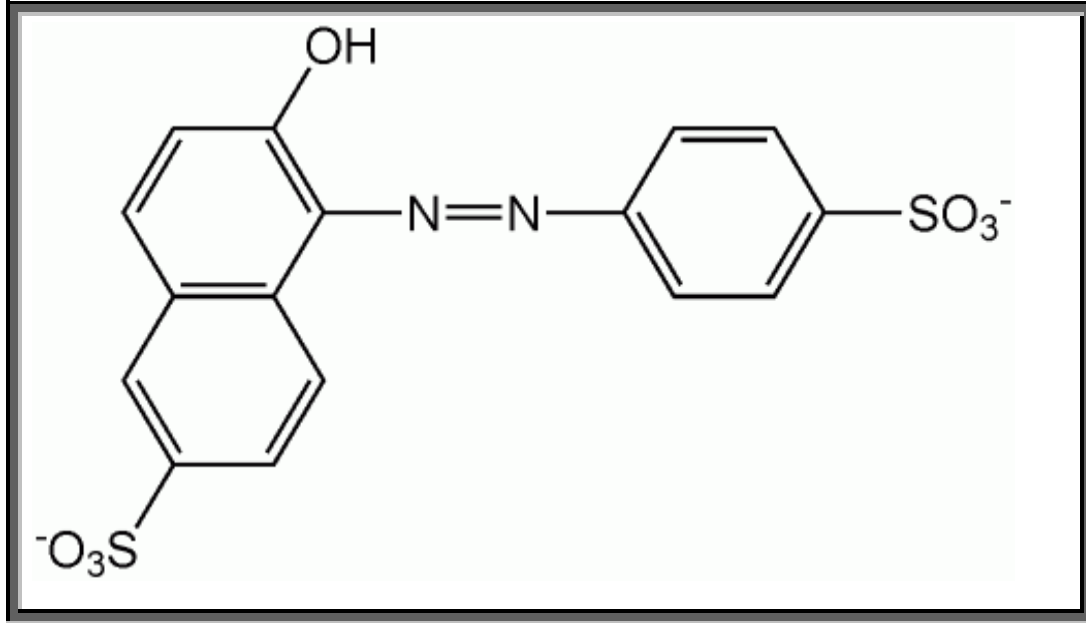
Osborne-Mendel'in süten yeni kesilmiş sıçanlarla yaptığı çalışmada, deney hayvanlarını %0, %0.5, %1, %2 ve %5'lik dozlarda Tartrazin'le beslenmiştir. Doz başına her cinsiyetten 12 sıçan kullanılmış ve çalışma sonunda Tartrazin'in hiçbir dozda karsinojenik ya da toksik etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Davis, Fitzhugh ve ark., 1964).

Borzelleca ve Hallagan (1988a)'da Tartrazin'le beslenen Charles River CD sıçanlarda karsinojenik ya da toksik etkiye rastlanmadığı bildirmiştir. Araştırmacılar, doğurganlık, gebelik, emzirme, yavruların hayatta kalma şansı ve de doğan yavru sayısı ile bileşik arasında bir ilişkinin bulunmadığını bildirmiştir. FDA (2000)'nin tavsiyesi üzerine cinsiyet başına 10 farede 12 ay boyunca histopatolojik incelemeler yapılmıştır. İncelemeler sonucunda herhangi bir problem görülmediği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda, erkek ve dişi fareler için NOAEL değerinin %5 olduğu bildirilmiştir.

Borzelleca ve Hallagan (1988b), CD-1 farelerde de kronik toksisite/karsinojenite çalışmalarını yürütmüştür. 60 erkek ve 60 dişi fareden oluşan gruplar %0, %0.5, %1.5 ve %5'lik konsantrasyonda Tartrazin'le 104 hafta boyunca beslenmiştir. Araştırmacılar çalışmanın sonuna kadar yeterli sayıda farenin hayatta kaldığını ve Tartrazin'in önemli bir etkisine rastlanmadığını bildirmişlerdir.

1.4. Sunset Yellow

1.4.1. Sunset yellowun kimyasal yapısı ve genel özellikleri



Şekil 1.3. Sunset Yellowun (Disodyum 2-hidroksi-1-(4-sülfonatofenilazo) naftalen-6-sülfonat) Kimyasal Yapısı

Sunset Yellow (E110 veya FD&C Yellow 6), FDA tarafından onaylı suda eriyebilen sülfonatlı azo boyasıdır. Gıdalarda kırmızı-turuncu renk oluşturmak için kullanılır.

Sunset Yellow, pek çok pastane mamüllerinde, tahıl, alkolsüz içecek, tatlı, şeker, jelatin, sosis, reçel, galeta unu ve birçok gıdanın yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünlerde kullanılan renk katkı maddelerindedir. Sunset Yellow'un günlük maksimum alınabileceği miktar FDA tarafından 3.75 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Ortalama 30 kg ağırlığındaki bir çocuk için bu değer 112.5 mg/gün doza denk gelmektedir (FDA, 1986).

1.4.2. Sunset yellow'un fiziksel ve kimyasal özellikleri

- Sınıf: Monoazo
- Kimyasal adı: Disodyum 2-hidroksi-1-(4-sülfonatofenilazo) naftalen-6-sülfonat
- Kimyasal formül: $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$
- Molekül ağırlığı: 452.37
- Güneş sarısı FCF, disodyum 2-hidroksi-1-(4-sülfonatofenilazo) naphthalen-6-sülfonat ve başlıca renksiz elementler olarak sodyum klorid ve/veya sodyum sülfat ile birlikte olan yardımcı renklendirici maddelerden oluşur.
- Güneş sarısı FCF, sodyum tuzu olarak tanımlanır. Kalsiyum ve potasyum tuzuna da izin verilir.
- Saflık: Sodyum tuzu cinsinden toplam renklendirici maddelerin % 85'inden az olmamalıdır.
- Renklendirici maddeler dışındaki organik bileşikler:
 1. 4-aminobenzen-1-sülfonik asit
 2. 3-hidroksinaftalen-2,7- disülfonik asit
 3. 6- hidroksinaftalen -2- sülfonik asit
 4. 7- hidroksinaftalen -1,3-disülfonik asit Toplam % 0.5'ten fazla olmamalıdır.
 5. 4,4'-diazaminodi(benzen sülfonik asit)
 6. 6,6'-oksidi(naftalen-2-sülfonik asit)
 7. Sülfone edilmemiş primer aromatik aminler: Anilin cinsinden% 0.01'den fazla olmamalıdır.
 8. Eter ile ekstrakte edilebilir madde: Nötr koşullar altında % 0.2'den fazla olmamalıdır.
 9. Arsenik: 3 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 10. Kurşun: 10 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 11. Cıva: 1 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 12. Kadmiyum: 1 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.
 13. Ağır metaller: (Pb cinsinden): 40 mg/kg'dan fazla olmamalıdır.

1.4.3. Sunset yellow'un metabolizması

0.5 mg/kg dozda Sunset Yellow tavşanlara ağızdan verildiğinde çeşitli metabolitlerine tavşanın idrarında rastlanılmıştır. Sunset Yellow'un sülfanilik asit ve 1-amino-2-naftol-6-sülfanilik n-asitlenmiş formu bağırsak mikroflorası tarafından p-acetamidobenzen-sülfanilik asite dönüştürüldüğünden azalmaktadır. Dışkıda bozulmamış Sunset Yellow'un sadece %6'sına rastlanılmaktadır (Daniel, 1962). Honohan ve ark. (1977), tarafından yürütülen bir çalışmada, 5 sığana 2.7 mg dozda ¹⁴C işaretli Sunset Yellow ağızdan verildiğinde 24 saat sonra dışkıda bozunmamış Sunset Yellow sadece %1-2 oranında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Daniel (1962)'de belirtilen bulguları doğrulamaktadır. Başka bir çalışmada, sığanda tek bir seferde 100 mg dozda Sunset Yellow ağızdan verildiğinde bozulmamış ürün dışkıda %8 oranında tespit edilmiştir (Radomski ve Mellinger, 1962).

1.4.4. Sunset yellow'un genotoksik etkileri

Sunset Yellow'un genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen 6 çalışmada negatif sonuçlar gözlenirken, iki çalışmada ileri düzeyde mutasyon ve kromozom aberasyonuna rastlanılmıştır (Tablo 1.4.).

JECFA'nın yapmış olduğu değerlendirmeler sonucunda 5 çalışmada mutajenite tanımlanmaktadır. JECFA tarafından değerlendirilen çalışmalar;

0.5 mg Sunset Yellow/100 ml konsantrasyonda *E. Coli*'de hiçbir mutajenik etki görülmemektedir (Lück ve Rickerl, 1960).

Sunset Yellow metabolik aktivasyon olmadan *Solmonella typhimurium*'un üç suşunda mutajenik etki göstermemektedir (Garner ve Nutman, 1977).

Ames testinde *Solmonella typhimurium*'un dört türünde hiçbir mutasyon gözlenmemiştir (Viola ve Nosotti, 1978).

Sunset Yellow'a maruz kalan *Saccharomyces cerevisiae*'da mitotik genlerde bir artışa rastlanmamıştır (Sankaranarayanan ve Murthy, 1979).

Tablo 1.4. Sunset Yellow ile yapılan çeşitli genotoksik çalışmalar (Kobylewski ve ark., 2010)

Deney	Mutasyon Çeşidi	Metabolik Aktivasyon (S9)	Doz	Sonuç	Referans
Comet Assay	DNA hasarı		2000 mg/kg	Negatif (mide kolonu, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer ve beyin)	Sasaki, Kawaguchi ve ark., 2002)
Sitogenetik Test	Kromozom Aberasyonu	-----	-----	Pozitif	(Hayashi, Matsui ve ark., 2000)
<i>S. Typhimurium</i> TA98	Çerçeve Kayması	Var – Yok	300 µg/plak	Negatif	(Rafi, Hall ve ark., 1997)
<i>S. Typhimurium</i> TA100	Baz çifti	Var - Yok	300 µg/plak	Negatif	
Kemik iliği mikronükleus testi	Kromozom hasarı		2000 mg/kg	Negatif	(Westmorelve ve Gatehouse, 1991)
L5178Y TK+/- Fare lenfoma testi	İleri düzeyde Mutasyon	Var	1 mg/ml	Pozitif	(McGregor, Brown ve ark., 1988)
<i>S. Typhimurium</i> TA1537, TA1538 TA 98	Çerçeve kayması	Var – Yok	5mg/plak; Ayrıca 1mg/plak sülfanilik asit test edildi.	Negatif	(Chung, Fulk ve ark., 1981)
<i>S. Typhimurium</i> TA1535, TA100	Baz çifti	Var – Yok	5mg/plak; Ayrıca 1mg/plak sülfanilik asit test edildi.	Negatif	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BZ 34	Mitotik genlerde değişim	Yok	5 mg/ml	Negatif	(Sankaranarayanan ve Murthy 1979)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Baz değişimi	Var - Yok	10 mg/ml	Negatif	(Havelve-Smith, Combes Ve ark., 1979)

JECFA'nın değerlendirmelerinden bu yana yayımlanan TemaNord'da 9 in-vitro, 3 in-vivo mutajenite/genotoksisite çalışmalarından bahsedilmiştir.

Seweeney ve ark. (1994), in-vitro veriler dahilinde doğrudan etkili oksidatif genotoksisitenin azo boyalarının reaksiyon ürünleri tarafından oluşturulabileceğini dşunmektedir. Bununla beraber, TemaNord raporunda bu bulgular sorgulanabilir bir ilişki olarak belirtilir.

TemaNord'da belirtilen diğer sekiz *in vitro* alışmayla ilgili deneysel bilgi sunulmamıştır. Sonuç olarak tüm bu çalışmalar genotoksisite için yeterli bir kanıt sağlamamıştır (Yoshimoto ve ark., 1984; Tennant ve ark., 1986, 1987; Ashby ve ark., 1988; McGregor ve ark., 1988; Benigni, 1989; Izbirak ve ark., 1990; Rafii ve ark., 1997).

In vivo mikronükleus testlerinde;

Sunset Yellow 2000mg/kg dozda tekbir seferde farelere ve sıçanlara ağızdan uygulandığında hiçbir mutajenik etkinin gözlenmediği belirtilmiştir (Westmorelve ve Gatehouse, 1991).

Sunset Yellow, Ames testinde olası mutajenik etkiyi belirlemek ve sitogenetik test sistemleri uygulayarak kemik iliği hücrelerinde klastojenik etkiyi belirlemek için kemirgen türlerine ağızdan uygulanmıştır. Araştırmacılar, uygulama sonucunda Sunset Yellow'un hiçbir genotoksik etki oluşturmadığı sonucuna ulaşmıştır (Wever ve ark., 1989).

Başka bir çalışmada, farelere ağızdan 0.17 mg/kg ve 1.7 mg/kg konsantrasyonlarda Sunset Yellow verildiğinde kromozomal hasar ile hücre sayısında bir artış gözlenmediği belirtilmiştir (Durnev ve ark., 1995).

Sasaki ve ark. (2002), 0-2000mg/kg dozda Sunset Yellow farelere ağızdan uygulandıktan sonra farklı dokularda DNA hasarını ölçmek için *in vivo* Comet

Assay uygulamıştır. Çalışma sonucunda 3 ile 24 saat aralığında hiçbir DNA hasarı kaydedilmemiştir.

Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak Sunset Yellow'un genotoksik etki göstermediği söylenebilmektedir (EFSA, 2009).

1.4.5. Sunset yellow'un karsinojenitesi

Amerikan Ulusal Toksikoloji Programı (1981), cinsiyet başına her gruptan 50 hayvan (F344 sıçanları ve B6C3F1 fareleri) kullanarak karsinojenik çalışmalar yürütmüştür. Her bir grup 103 hafta boyunca 0, 12, 500 ve 25000 ppm Sunset Yellow içeren gıdalarla beslenmiştir. Kontrol grupları her cinsiyetten 50 fare ve 90 sıçandan oluşturulmuştur. Sıçanların herhangi bir grubunda gıda boyası ile ilişkili istatistiksel olarak anlamlı neoplastik veya non-neoplastik lezyonlara rastlanılmamıştır. Kontrole kıyaslandığında erkek farelerde düşük dozda hepatosellüler karsinom ve adenomlar yüksek sıklıkla görülmüştür. Farelerde doz-cevap ilişkisi olmaması sebebiyle Sunset Yellow'un karsinojenik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bio/dinamics (1982a) A.Ş., Sertifikalı Renk Sanayicileri Derneği (CCMA) ile yaptığı sözleşme kapsamında, Charles River Sprague-Dawley sıçanlarında iki ayrı uzun süreli besleme çalışması yürütmüştür. İlk çalışma %0 (iki kontrol grubu), %0.75, %1.5 ve %3 konsantrasyonlarda, ikinci çalışma ise %0 (bir kontrol grubu), %0.75, %1.5 ve %5 konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. İlk çalışma erkekler için 30 ay, dişiler için 28.5 ay; ikinci çalışma ise erkekler için 25.6, dişiler için 27.8 ay sürmüştür. F₁ nesillerinde ilk çalışmada %3'lük konsantrasyonda ve ikinci çalışmada %5'lik konsantrasyonda ölüm oranı artmıştır. İkinci çalışmada, %5'lik konsantrasyonda dişi farelerin böbrek ağırlığında artış saptanmıştır. Her iki çalışmada; %3'lük ve %5'lik konsantrasyonlarda dişilerin böbrek ağırlıklarıyla ilişkili olarak ağırlıklarında mutlak ortalama artışın yanı sıra %5'lik konsantrasyonda dişi ve erkeklerin tiroid ağırlığında da artış tespit edilmiştir. Dişilerde ve erkeklerde %3'lük ve %5'lik konsantrasyonlarda adrenal medülar adenom sıklığı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca %3'lük konsantrasyonda

erkeklerde tüm kontrol gruplarına kıyasla testis doku hücrelerinin insidansında artış gözlenmiştir. Tüm bu bulgulara rağmen araştırmacılar, Sunset Yellow'un karsinojenik etki gösterdiği sonucuna ulaşmak için verilerin yeterli olmadığını bildirmektedir (Bio/dinamik 1982a).

FDA (1986), Bio/dinamik çalışmaların sonuçlarını değerlendirdikten sonra artan tümör oranlarının Sunset Yellow'la ilişkili olmadığı sonucuna varmıştır. Bunun sebepleri ise;

- %3'lük ve %5'lik konsantrasyonlarda doz-cevap eksikliği (iki farklı çalışma içermesine rağmen),
- Yanlış pozitif sonuç olasılığı,
- Prekanseroz lezyon eksikliği,
- Kontrol ve diğer gruplarda adrenal medüllerin benzer morfolojisi,
- Tümörler oluşmadan önceki gizli periyodun farklı olmaması,
- Yaşça büyük farelerde tümörlerin yaygın spontan tümörler olması,
- Bu tip tümörlerle Sunset Yellow arasında bir bağlantı bulan çalışmaların eksikliği.

Bio/dinamics (1982b). A.Ş., Sertifikalı Renk Sanayicileri Derneği (CCMA) ile yaptığı sözleşme kapsamında, 60 Charles River CD-1 COBS farelerde kronik toksisite/karsinojite çalışmasını yürütmüştür. Deney hayvanlarının besininde %0 (iki kontrol grubu), %0.5, %1.5 ve %5 oranında Sunset Yellow kullanılmıştır. Çalışma erkek farelerde 20 ay, dişilerde 23 ay (utero döneminde yapılmamıştır) sürmüştür. Sadece %5'lik konsantrasyonda erkek farelerde yüksek ölüm oranı anlamlı bulunmuştur fakat bu sonuç gıda boyası düşük miktarda tüketildiğinde insanlar için geçerli değildir. Laboratuar çalışmaları sonucunda karsinojenite ile ilişkili endişe edilebilecek sonuçlara rastlanılmamıştır.

BÖLÜM 2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

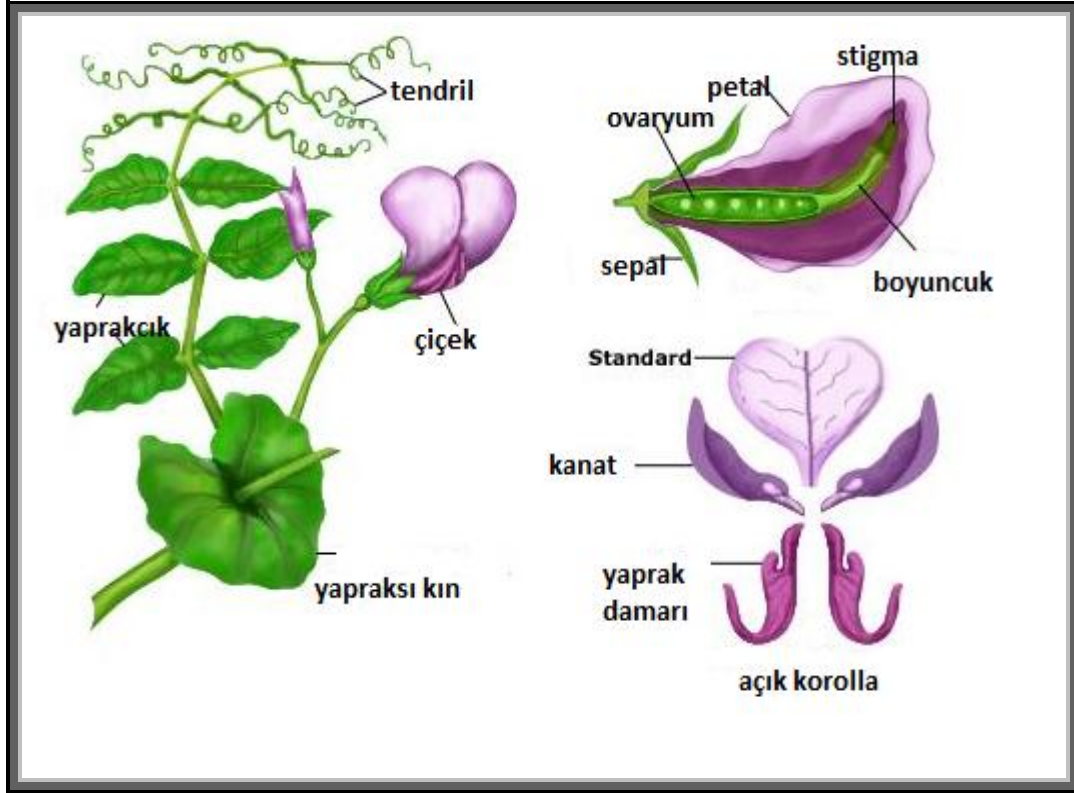
Bu çalışmada muhtelif gıda boyalarının canlılar üzerine genotoksik etkisinin kontrolü bezelye (*Pisum Sativum L.*) model organizması kullanılarak yapıldı. Gıda boyalarından yaygın olarak kullanılan Tartrazin (E 102) ve Sunset Yellow (E 110) kullanıldı.

Araştırmada Konya Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tamkoç tarafından yetiştirilen tohumlar kullanıldı.

2.1.1. Bezelye (*Pisum Sativum L.*)

Pisum L. cinsi, Fabaceae familyasının Viciae tribinin bir üyesidir. Bu cinsin sadece iki türü olduğu bilinmektedir. Bunlar, kültüre edilmiş *Pisum sativum* ve yabani *Pisum fulyum* Sibth. ve Sm. (Davis,1970)'dır. *Pisum sativum* Türkiye'nin doğal florasında mevcut bir bitki türüdür. Tarman (1954), bezelyenin başka ülkelere Türkiye'den götürüldüğünü, ıslah edildiğini ve çoğaltıldığını bildirmektedir. Ülkemizde en fazla üretimi Ege ve Marmara Bölgelerinde yapılmaktadır (Toğay ve ark., 2006).

Bezelyeler çoğunlukla tırmanıcı, tüsüz, tek yıllık bitkilerdir (morfolojik yapısı şekil 2.1.'de sunulmaktadır). Gövde kolaylıkla yatar, enine kesit hafif köşelidir. Kulakçıklar, oldukça iri, kalkan şeklinde, sapa bağlandığı yerin çevresi dişlidir. Yapraklar, karşılıklı bileşiktir. Yaprak eksini sülükle biter. Çiçek topluluk şekli, seyrek salkımlıdır. Çiçekler yaprak koltuklarından çıkar. Taç yapraklar beyaz, krem veya menekşe rengi olabilir. Meyve, düz fasulye şeklindedir. İçerinde 3-10 tohum bulunur (Elçi ve Açıkgöz, 1994).



Şekil 2.1. *Pisum Sativum* 'un morfolojik yapısı

Bezelye'nin somatik kromozom sayısı ($2n=14$)'dür (Cannon, 1903). Karyotip analizi yapılan ilk bitkilerdendir (A. Marshak, 1931; Lewitsky, 1931). Bezelye az sayıda ve büyük kromozomlar içerdiğinden daha kolay gözlem yapmaya olanak sağlar. Bu özelliklerinden dolayı genetik çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır.

2.1.2. Tartarazin ve sunset yellow çözeltilerinin hazırlanışı

Tartrazin ve sunset yellow kullanılarak 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L ve 400 mg/L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Çözücü olarak saf su kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Tohumların çimlendirilmesi

Rastgele seçilen 30 adet bezelye tohumu; 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L ve 400 mg/L konsantrasyonlarındaki Tartrazin ve Sunset yellow çözeltileri ile nemlendirilmiş kurutma kağıtları arasına konarak standart petri kaplarına yerleştirildi. Kontrol grubu için saf su kullanıldı. Petri kaplarının ağzı kapatılarak tohumlar oda sıcaklığında 24, 48 ve 72 saatlik süreler için tohumlar çimlenmeye bırakıldı.

2.2.2. Çimlenen tohumlarda kök uzunluklarının ölçülmesi

Kontrol grubu ve her bir doz grubundaki preparatlarda çimlenen tohumlardan gelişen köklerin uzunlukları, 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda ayrı ayrı ölçülerek aritmetik ortalamaları alındı. Fotoğraf çekimleri için, 30 tohumdan kök uzunlukları ortalamalara en yakın olan örnekler seçildi.

2.2.3. Mitotik preparatların hazırlanması

- Mitotik preparatların hazırlanması için Feulgen ezme preparat metodu (Ma, 1999), bezelye bitkisi için modifiye edildi.
- Tohumların kök uçları 1–1,5 cm uzunluğunda kesilerek α -monobromonaftalin'in sudaki doymuş çözeltisine ön fiksasyon için alındı ve +4°C da 16 saat buzdolabında bekletildi. Bu aşamada amaç, mitoz bölünmeyi tespit etmektir. Aynı zamanda kromozomların kısalmasını engelleyerek, metafazda daha belirgin izlenmelerini sağlamaktır.
- Ön fiksasyon için buzdolabında bekletilen kök uçları, bir kısım glasiyel asetik asit, üç kısım etil alkol oranında hazırlanan Farmer fiksatifine alınarak buzdolabında depolandı.

- Farmer fiksatifinde depolanmış kök uçları alınarak önce %70 alkolde sonra damıtık suda yıkama yapıldı.
- Kök uçları, 1N HCl'de, sıcak su banyosunda 60°C'da, 10 dk tutuldu. Sıcak su banyosunda hidrolizin amacı; kromozomların yapısında yer alan nükleik asitlerdeki aldehit gruplarının serbest hale geçmesini sağlamaktır. Hidroliz işlemi, aynı zamanda, hücre çeperi bileşenlerini de yıkarak hücrelerin birbirinden kolayca ayrılmasını sağlamaktadır.
- Kök uçları sıcak su banyosundan alınıp, içinde Feulgen boyası bulunan küçük şişelere konuldu.
- Şişeler ışık almayan karanlık bir yerde, kök uçları kırmızı-viole renk alana kadar 1-2 saat bekletildi. Burada, hidroliz ile açığa çıkan aldehit grupları Feulgen reaktifindeki leuco – basic füksin ile reaksiyona girmekte ve kromozomlar kırmızı-viole renkte boyanmaktadır.
- Boyanan kök uçlarından 1-2 mm kesilerek LPO damlatıldı. Lam üzerinde pirinç çubukla ezilip dağıtıldı. Üzerine lamel kapatıldı.
- Preparat; kurutma kağıdı arasına konularak, düz bir zeminde başparmak ile bastırıldı. Böylece, kromozomların tek düzlem üzerine gelmesi sağlandı.
- Hücrelerin dağılması ve yassılaşması için, arkası düz bir kursun kalem yardımıyla kurutma kağıdı kaldırılmadan preparatlara kuvvetlice birkaç defa vuruldu.

2.2.4. Mikroskopik gözlem

Mikroskopik gözlemler, Olympus BX–50 Işık Mikroskobu ile 10x40 ve 10x100 büyütmelemlerde yapılarak hücrelerin fotoğrafları çekildi.

2.2.5. Mitotik indeksin hesaplanması

Mitotik indeks yaşayan tüm organizmalar için kabul edilebilir bir sitotoksik ölçüttür (Amer ve Alı 1974). Sitotoksik seviye mitotik indeks oranındaki azalmayla belirlenebilir. %50' den daha az orandaki azalmalar genelde subletal etkiyi ifade eder. Eğer mitotik indeks oranındaki azalma %50' nin üzerine çıkarsa test organizması üzerinde öldürücü etkiye sahip olabilir. Genellikle sitotoksik maddeler mitoz üzerine olan etkilerini mikrotübül oluşumunu inhibe ederek gösterirler. Birçok araştırmacıya göre C-mitoz, multipolar anafaz ve yapışkanlıklar gibi anormallikler iğ ipliği formasyonunun inhibisyonuna bağlanmaktadır (Lazareve ve ark.,2003; Amer ve Alı, 1974).

Mitotik indeks genellikle 100 hücredeki mitoz sayısı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, ışık mikroskobu'ndaki incelemelerde her bir preparattan 3000'er hücre sayıldı. 3000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücreler ve geçirdikleri bölünme evreleri tespit edildi. Mitotik indeksleri (MI) hesaplandı.

2.2.6. Kromozom anormalliklerinin hesaplanması

Işık Mikroskobu ile mitoz bölünme geçiren hücrelerin buldukları mitoz evreleri ve bu evrelerde görülen mitotik anormallikler sayıldı, tanımlaması yapıldı.

2.2.7. İstatistiksel verilerin hesaplanması

Çimlenme ve kök uzunluğu oranlarının istatistiksel analizleri ile mitotik indeks hesaplamaları için *student-t* testi (<http://home.clara.net/sisa/t-test.htm>), sayılan hücrelerdeki anormallik oranlarının anlam derecelerini karşılaştırmak için ise, ki-kare (χ^2) testi (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/chi-square.html>) kullanıldı.

BÖLÜM 3. BULGULAR

3.1. Tartrazinin Genotoksik Etkileri

3.1.1. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri

Farklı Tartrazin konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri Tablo 3.1’de belirtilmektedir. Tüm Tartrazin konsantrasyonlarında çimlenme süresi (24 saat, 48 saat, 72 saat) ile tohum çimlenme oranı arasında doğru orantı tespit edildi.

Tablo 3.1. Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında Hazırlanan Çözeltilerin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Uygulanan Tartrazin konsantrasyonu (mg/L)	Çimlenmeye bırakılan tohum sayısı	Çimlenme Oranları		
		24. saat (%)	48. saat (%)	72.saat (%)
Kontrol (saf su)	30	73.3	100	100
10	30	13.3	100	100
25	30	10.0	100	100
50	30	13.3	100	100
100	30	13.3	100	100
200	30	13.3	100	100
400	30	10.0	100	100

Saf suda çimlendirilen bezelye tohumlarının çimlenme oranı; 24 saat sonunda %73.3 iken, 10mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L ve 400mg/L Tartrazin konsantrasyonlarında %10-13.3 olarak hesaplandı. Kontrol grubuyla kıyaslandığında çimlenme oranındaki bu azalma, istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0.00001$).

Kontrol grubu dahil tüm konsantrasyonlarda çimlenmenin 48. ve 72. saatinde çimlenme oranı % 100 olarak tespit edildi.

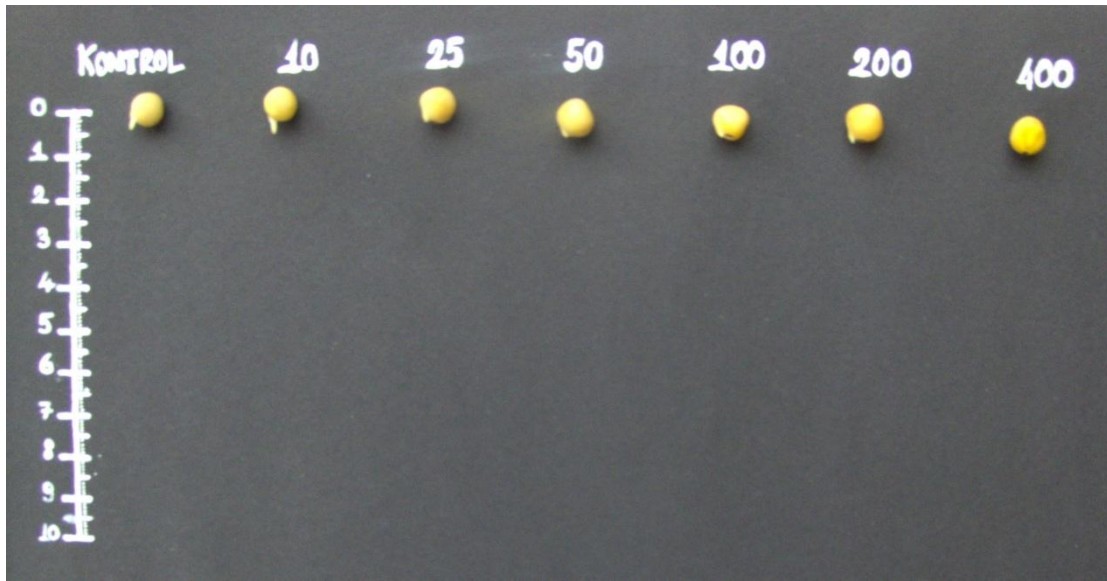
3.1.2. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının kök gelişimi üzerine etkisi

Tartrazin'in farklı konsantrasyonlarında çimlenmeye bırakılan tohumların 24, 48 ve 72 saat süre ile kök gelişimleri takip edildi. 24., 48. ve 72. saatlerde çimlenen tohumların boyları ölçülerek ortalama kök uzunluğu tespit edildi (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Tartrazin Çözeltilerine 24, 48 ve 72 saat Maruz Kalmış Bezelye Tohumlarında Ölçülen Kök Uzunlukları

Uygulanan Tartrazin Konsantrasyonu (Mg/L)	24 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)	48 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)	72 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)
Kontrol	0.40±0.03	1.74±0.3	2.71±0.6
10	0.41±0.03	1.80±0.3	2.82±0.6
25	0.20±0.03	1.73±0.3	2.91±0.5
50	0.15±0.02	1.68±0.4	2.40±0.6
100	0.15±0.01	2.24±0.4	3.25±0.7
200	0.12±0.02	1.40±0.3	2.93±0.5
400	0.05±0.02	1.20±0.2	2.21±0.4

Kontrol grubunda, 24 saat sonunda ölçülen kök uzunluğu (Şekil 3.1.) ortalama 0.40 ± 0.03 cm iken, 10mg/L konsantrasyonda, 0.41 ± 0.03 cm olarak ölçülmüştür. Kök uzunluğundaki bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). 25, 50, 100, 200 ve 400mg/L konsantrasyonlarda ise konsantrasyon yoğunluğu ile kök uzunluğu arasında doğru orantılı azalma tespit edildi. Kök uzunluğundaki bu azalma, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.0001$).

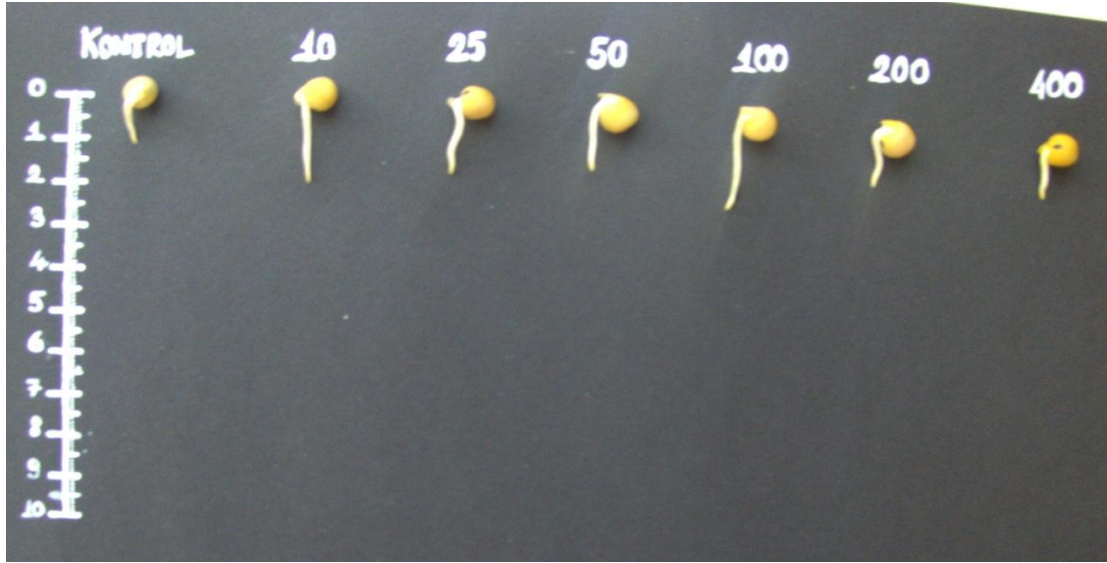


Şekil 3.1. Kontrol Grubu ve Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında 24 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

48 saat sonunda kontrol grubunda kök uzunluğu 1.74 ± 0.3 cm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2.). 10mg/L konsantrasyonda ise 1.80 ± 0.3 cm olarak ölçülen kök uzunluğundaki artış, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). 25mg/L ve 50mg/L Tartrazin çözeltisinde çimlendirilen tohumların kök uzunluğunda görülen azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

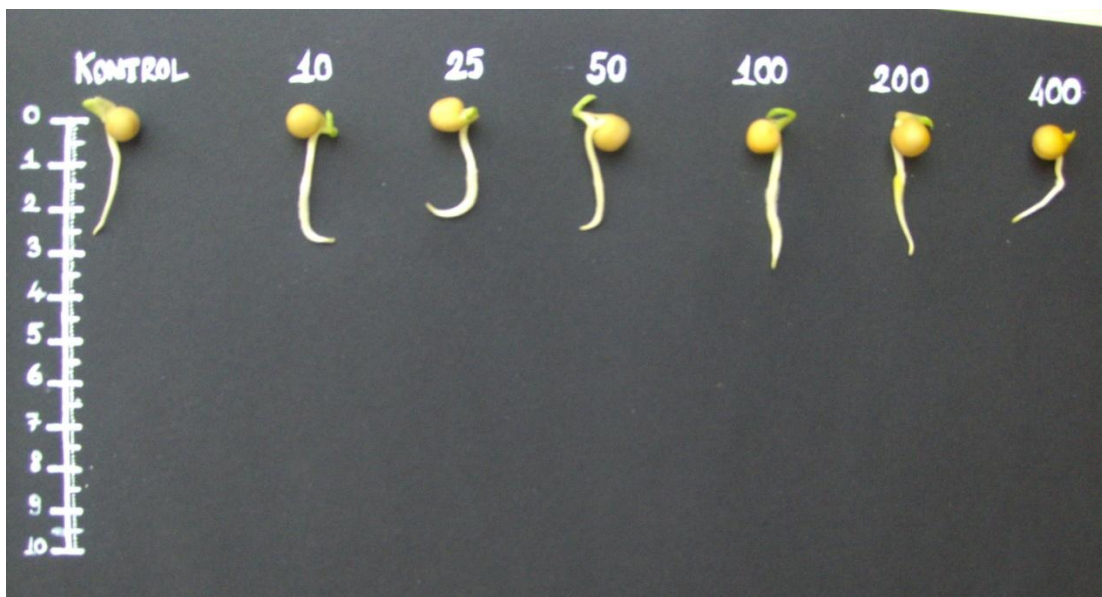
100mg/L konsantrasyonda kök uzunluğu ortalama 2.24 ± 0.4 cm olarak hesaplandı. Kök uzunluğunda hesaplanan bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0001$). 200 ve 400mg/L konsantrasyonlarda ise istatistiksel açıdan anlamlı azalma tespit edildi ($p < 0.0001$).

Kontrol grubunda, 72 saat sonunda ölçülen ortalama kök uzunluğu 2.71 ± 0.6 cm iken,



Sekil 3.2. Kontrol Grubu ve Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında 48 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

10 ve 25mg/L konsantrasyonlarda kök uzunluğu uzunluğundaki artış (şekil 3.3.) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.01$). 50mg/L konsantrasyonda kök uzunluğu ortalama 2.40 ± 0.5 cm olarak hesaplandı. Bu konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı azalma tespit edildi ($p<0.05$). 100mg/L konsantrasyonda çimlendirilen tohumların ortalama kök uzunluğu hesaplandığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.01$). 200mg/L konsantrasyonda anlamlı bir fark gözlenmezken 400mg/L konsantrasyonda kök uzunluğunda istatistiksel açıdan anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.01$).



Sekil 3.3. Kontrol Grubu ve Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında 72 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

3.1.3. Farklı tartrazin konsantrasyonlarının mitotik indeks üzerine etkileri

Kontrol grubu ve farklı Tartrazin konsantrasyonlarında çimlenen bezelye tohumlarının kök uçlarından hazırlanan preparatlarda mitoz bölünme geçiren hücre sayısı hesaplandı. Bölünen hücre sayısına bağlı mitotik indeks (%) ve t değeri bulundu. Mitotik sıklık üzerine farklı Tartrazin konsantrasyonlarının etkisi, Tablo 3.3.'de sunulmaktadır.

Tablo 3.3. Farklı Konsantrasyonlarda Tartrazin Grupları ile Kontrol Gurubuna Ait Kök Ucu Hücrelerindeki Mitotik İndeks Değerleri

Uygulanan Tartrazin konsantrasyonu	Sayılan hücre	Bölünen hücre	Mitotik indeks (%)	(t) değeri	(p) değeri
Kontrol	3000	546	18.20	-	-
10 mg/L	3000	396	13.20	5.336	0.0000
25 mg/L	3000	379	12.63	5.988	0.0000
50 mg/L	3000	354	11.80	6.97	0.0000
100 mg/L	3000	419	13.97	4.47	0.0000
200 mg/L	3000	315	10.50	8.558	0.0000
400 mg/L	3000	223	7.43	12.639	0.0000

(*p<0.01)

Mitotik indeks en yüksek kontrol grubunda (%18.20), en düşük ise 400mg/L konsantrasyonda (%7.43) olarak hesaplandı. 400mg/L doz dahil tüm konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 ve 200mg/L) kontrol grubuna kıyasla mitotik indekste istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı azalma tespit edildi (p<0.00001).

3.1.4. Farklı konsantrasyonlarda tartrazinde çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları

Tartrazin'in belirlediğimiz konsantrasyonlarda ve kontrol grubunda gözlenen mitotik anormallik oranları Tablo 3.4'de sunulmaktadır. Kontrol grubuna kıyasla konsantrasyon yoğunluğuna bağlı olarak mitozdaki anormallik oranlarının doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi.

Tablo 3.4. Tartrazinin Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Mitotik Anormallik Dağılımı

Uygulanan Tartrazin konsantrasyon	Hücre sayısı	Normal mitoz	Anormal mitoz	Anormallik yüzdeleri (%)
Kontrol	3000	540	6	1.11
10 mg/L	3000	370	26	6.57
25 mg/L	3000	347	32	8.44
50 mg/L	3000	302	52	14.69
100mg/L	3000	327	92	21.96
200 mg/L	3000	236	79	25.08
400 mg/L	3000	166	57	25.56

Kontrol grubunda mitotik anormallik oranı % 1.11 olarak hesaplanırken, 10mg/L Tartrazin konsantrasyonunda % 6.57 olarak ölçüldü. Mitotik anormallik oranındaki bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.00001$). 25, 50, 100, 200 ve 400mg/L konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumların kök ucu hücrelerinde

gözlenen mitotik anormallikler kontrol grubuna kıyasla önemli derecede anlamlı bulundu ($p < 0.00001$).

Mitozun farklı safhalarındaki hücrelerin sayılımı ile anormallik görülen hücrelerin sayısı ve yüzdeleri Tablo 3.5’de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Tartrazinin Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Mitotik Evre Dağılımı ve Anormallik Oranları

Uygulanan konsantrasyon	Profaz			Metafaz			Anafaz			Telofaz		
	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)
Kontrol	255	-	-	193	4	2.03	46	2	4.16	46	-	-
10 mg/L	206	1	0.48	135	24	15.09	14	1	6.66	15	-	-
25mg/L	214	2	0.92	106	28	20.86	16	2	11.10	11	-	-
50 mg/L	194	2	1.02	47	41	46.59	33	9	21.42	28	-	-
100 mg/L	214	3	1.38	76	81	51.59	22	8	26.66	15	-	-
200 mg/L	146	3	2.01	61	70	53.43	13	6	31.57	16	-	-
400 mg/L	109	4	3.53	30	44	59.45	12	9	42.85	15	-	-

Kontrol grubunda profazda 255 normal mitoz gözlenirken anormal mitoz gözlenmedi. Metafazda 193 normal, 4 anormal hücre tespit edildi. Anafazda gözlenen hücrelerin 46’sı normal iken 2 hücrede anormalliğe rastlandı. Telofaz evresinde ise, gözlenen 46 hücrenin hiçbirinde anormallik tespit edilmedi.

Profaz evresinde konsantrasyon yoğunluğuna bağlı olarak, anormal hücre sayısında artış tespit edildi. Metafaz safhasında ise, gözlenen normal mitotik hücre sayısı azalırken anormal hücre sayısında artış belirlendi. Anafaz evresinde kontrol grubunda

anormallik oranı % 4.16 olarak hesaplanırken, doz gruplarında bu oran % 42.85 olarak hesaplandı. Telofaz evresinde gözlenen hücrelerin hepsinin normal mitoz geçirdiği belirlendi.

3.1.5. Farklı tartrazin konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda interfaz anormalliği

Farklı konsantrasyonlardaki preparatlar incelenirken, mitoz anormalliğinin yanı sıra bölünme geçirmeyen hücrelerde de anormalliğe rastlandı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Farklı Tartrazin Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Normal ve Anormal İnterfaz Dağılımı

Uygulanan konsantrasyon	Hücre sayısı	Bölünen hücre	Normal interfaz	Anormal interfaz	Anormallik oranı (%)
Kontrol	3000	546	2451	3	0.12
10 mg/L	3000	396	2566	38	1.45
25mg/L	3000	379	2578	43	1.64
50 mg/L	3000	354	2599	47	1.77
100 mg/L	3000	419	2520	61	2.36
200 mg/L	3000	315	2601	84	3.12
400 mg/L	3000	223	2630	147	5.29

Kontrol grubunda interfazdaki normal hücre sayısı 2451, anormal hücre sayısı 3 ve anormallik oranı % 0.12 olarak hesaplandı. Tartrazin konsantrasyonunsa bağlı olarak anormallik oranlarında doğru orantılı bir artış gözlemlendi. Çalışma gruplarındaki bu artış kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0001$).

3.2. Sunset Yellow'un Genotoksik Etkileri

3.2.1. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri

Farklı Sunset Yellow konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri Tablo 3.7'de belirtilmektedir. Tüm Sunset Yellow konsantrasyonlarında çimlenme süresi (24 saat, 48 saat, 72 saat) ile çimlenen tohum sayısı arasında doğru orantı tespit edildi.

Tablo 3.7. Farklı Sunset Yellow Konsantrasyonlarında Hazırlanan Çözeltilerin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Uygulanan Sunset Yellow konsantrasyonu (mg/L)	Çimlenmeye bırakılan tohum sayısı	Çimlenme Oranları		
		24. saat (%)	48. saat (%)	72.saat (%)
Kontrol (saf su)	30	73.3	100	100
10	30	70.0	100	100
25	30	70.0	100	100
50	30	63.3	100	100
100	30	60.0	100	100
200	30	56.6	100	100
400	30	53.3	96.6	100

Kontrol grubunda çimlendirilen bezelye tohumlarının çimlenme oranı; 24 saat sonunda % 73.3 iken, 10mg/L ve 25mg/L konsantrasyondaki Sunset Yellow çözeltilerinde %70 olarak hesaplandı. Çimlenme oranındaki bu azalma, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.01$). 50mg/L ve 100mg/L konsantrasyonlarında da 24 saat sonundaki çimlenme oranlarında kontrole göre, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmedi ($p>0.01$). Ancak, 200mg/L grubunda çimlenme oranı % 56.6 olarak hesaplandı ve bu doz grubunda çimlenme oranında, istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). 400mg/L konsantrasyonda ise, % 53.3 olarak hesaplanan çimlenme oranı, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı azalma bulundu ($p<0.01$).

Çimlenmenin 48. saatinde kontrol grubunda tüm tohumlarda çimlenme gözlemlendi. Aynı zamanda 10, 25, 50, 100 ve 200mg/L konsantrasyonlardaki çözeltilerde çimlendirilen tohumlarda da çimlenme oranının % 100 olduğu belirlendi. Sadece 400mg/L'lik konsantrasyonda bir farklılığa rastlandı. Bu konsantrasyonda çimlenme oranı % 96.6 iken bu farklılık, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Çimlenme süresi 72 saate ulaştığında ise, kontrol grubu dahil tüm gruplarda çimlenme oranı % 100 olarak tespit edildi.

3.2.2. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının kök gelişimi üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlarda Sunset Yellow çözeltilerinde çimlenmeye bırakılan tohumların 24, 48 ve 72 saat süre ile kök gelişimleri takip edildi. 24., 48. ve 72. saatlerde çimlenen tohumların boyları ölçülerek ortalama kök uzunlukları hesaplandı (Tablo 3.8.). Tüm çalışma gruplarında kontrole kıyasla kök uzunluğunda azalma gözlemlendi.

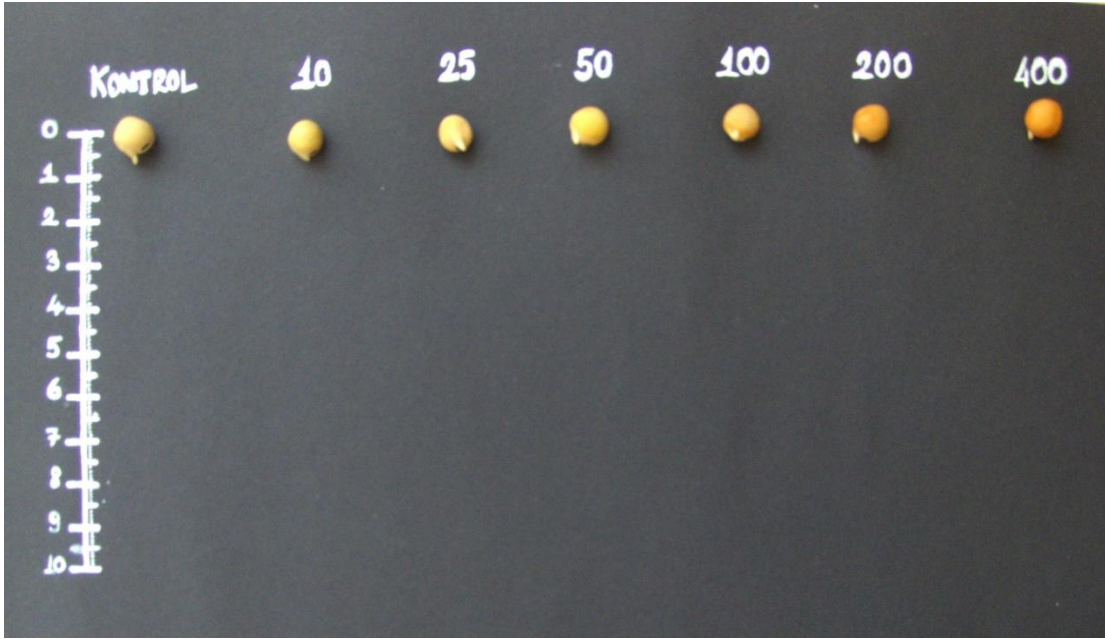
Saf suda çimlendirilen bezelye tohumlarında, 24 saat sonunda ölçülen ortalama kök uzunluğu (Şekil 3.4.) 0.40 ± 0.03 cm iken, 10mg/L konsantrasyonda 0.25 ± 0.03 cm

Tablo 3.8. Farklı Konsantrasyonlardaki Sunset Yellow Çözeltilerine 24, 48 ve 72 Saat Maruz Kalmış Bezelye Tohumlarının Ölçülen Kök Uzunlukları

Uygulanan Sunset Yellow Konsantrasyonu (mg/L)	24 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)	48 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)	72 saat sonundaki kök uzunluğu (cm)
Kontrol	0.40±0.03	1.74±0.3	2.71±0.6
10	0.25±0.03	1.70±0.3	2.40±0.5
25	0.36±0.03	1.42±0.2	1.89±0.5
50	0.35±0.03	1.62±0.4	2.28±0.6
100	0.29±0.02	1.42±0.3	1.9±0.4
200	0.34±0.02	1.52±0.3	1.99±0.4
400	0.24±0.01	1.35±0.2	1.86±0.3

olarak tespit edildi. Kök uzunluğundaki bu azalma istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulundu ($p<0.0001$). 25, 50, 100, 200 ve 400mg/L konsantrasyonlardaki Sunset Yellow çözeltilerinde çimlendirilen tohumların ortalama kök uzunluklarının, kontrol grubundaki tohumların kök uzunluğundan farklı olduğu belirlendi. İstatistiki hesaplamalar yapıldığında, bu farklılık anlamlı bulundu ($p<0.0001$).

Çalışmanın 48. saatinde kontrol grubunda kök uzunluğu ortalama 1.74±0.3cm olarak ölçüldü (şekil 3.5.). 10mg/L konsantrasyonda 1.70±0.3cm ölçülen ortalama kök uzunluğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). 25mg/L konsantrasyonda, kök uzunluğunda anlamlı azalma gözlenirken ($p<0.001$), 50mg/L konsantrasyonda, fark tespit edilmedi ($p>0.05$).



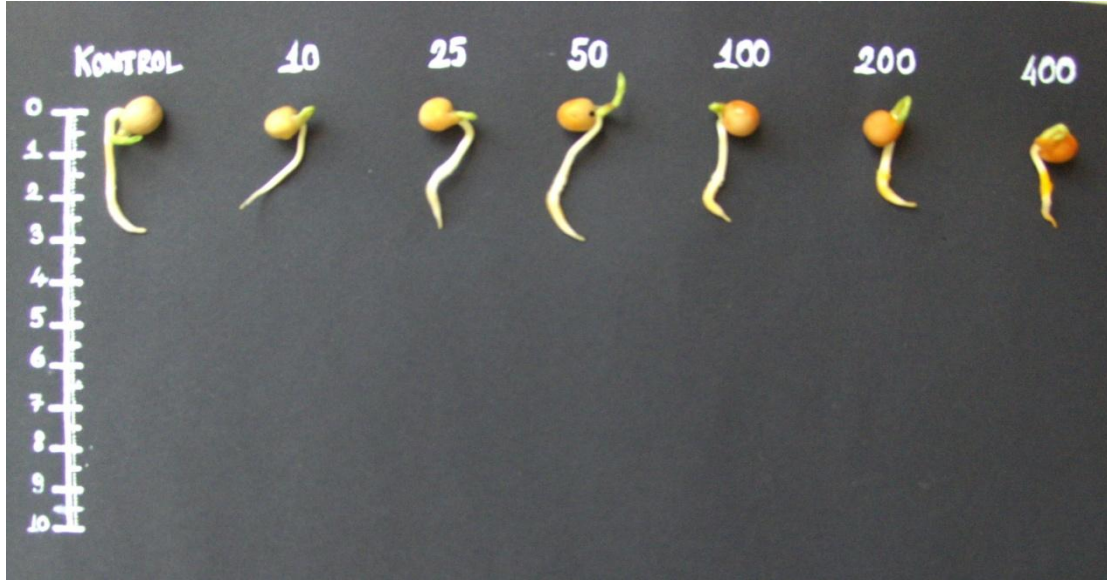
Sekil 3.4. Kontrol Grubu ve Farklı Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 24 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

100mg/L ve 200mg/L konsantrasyonda çimlenen tohumların kök uzunluğunda istatistiksel açıdan anlamlı azalma tespit edildi ($p < 0.01$). 400mg/L konsantrasyonda çimlendirilen bezelye tohumlarındaki kök uzunluğu ortalama 1.35cm olarak hesaplandı ve hesaplanan bu değişim istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0.00001$).



Sekil 3.5. Kontrol Grubu ve Farklı Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 48 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

Çimlenme 72. Saatinde (şekil 3.6.) kontrol grubunda ölçülen ortalama kök uzunluğu 2.71 ± 0.6 cm iken, 10 mg/L konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). 25 mg/L konsantrasyonda kök uzunluğu ortalama 1.89 ± 0.5 cm olarak ölçüldü. Kök uzunluğundaki farklılık anlamlı bulundu ($p < 0.0001$). Sunset Yellow'un 50 mg/L konsantrasyonunda çimlendirilen tohumlarda kök uzunluğu ortalama 2.28 ± 0.6 cm ölçüldü. Ölçülen bu değer kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.01$). 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonlardaki kök gelişiminde gözlenen azalma istatistiksel açıdan önemli derecede anlamlı bulundu ($p < 0.0001$).



Şekil 3.6. Kontrol Grubu ve Farklı Sunset Yellow Konsantrasyonlarında 72 Saat Çimlendirilen Bezelye Tohumlarında Gözlenen Kök Gelişimi

3.2.3. Farklı sunset yellow konsantrasyonlarının mitotik indeks üzerine etkileri

Kontrol grubu ve farklı Sunset Yellow konsantrasyonlarında çimlenen bezelye tohumlarının kök uçlarından hazırlanan preparatlarda mitoz bölünme geçiren hücre sayısı hesaplandı. Bölünen hücre sayısına bağlı mitotik indeks (%) ve t değeri bulundu. Mitotik sıklık üzerine farklı Sunset Yellow konsantrasyonlarının etkisi, Tablo 3.9'da sunulmaktadır.

Tablo 3.9. Farklı Konsantrasyonlarda Sunset Yellow Grupları ile Kontrol Gurubuna Ait Kök Ucu Hücrelerindeki Mitotik İndeks Değerleri

Uygulanan Sunset Yellow konsantrasyonu	Sayılan hücre	Bölünen hücre	Mitotik indeks (%)	(t) değeri	(p) değeri
Kontrol	3000	546	18.20	-	-
10 mg/L	3000	512	17.06	1.152	0.2494
25 mg/L	3000	411	13.70	4.769	0.0000
50 mg/L	3000	439	14.63	3.733	0.0002
100 mg/L	3000	338	11.26	7.613	0.0000
200 mg/L	3000	203	6.76	13.602	0.0000
400 mg/L	3000	180	6.00	14.749	0.0000

(*p<0.01)

Mitotik indeks; kontrol grubunda % 18.20 olarak hesaplanırken, 10mg/L konsantrasyonda % 17.06 hesaplandı. 10mg/L konsantrasyonda görülen mitotik indeksteki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). 25mg/L Sunset Yellow'da çimlendirilen tohumlardaki mitotik sıklıkta ise kontrole kıyasla ileri derecede anlamlı azalma tespit edildi ($p<0.00001$). 50mg/L konsantrasyonda ölçülen mitotik indeks % 14.63 iken bu azalma, istatistiki hesaplamalar sonucunda anlamlı bulundu ($p<0.001$). 100, 200 ve 400mg/L konsantrasyonlarda gözlenen mitotik indeksteki azalma istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p<0.00001$).

3.2.4. Sunset yellow'un farklı konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları

Kontrol grubu ve çeşitli konsantrasyonlardaki sunset yellow uygulanan tohumların mitotik anormallik oranları hesaplandı. Bu değerler Tablo 3.10'da sunulmaktadır.

Tablo 3.10. Sunset Yellowun Farklı Konsantrasyonlarda Çimlendirilen Tohumların Mitotik Anormallik Dağılımı

Uygulanan Sunset Yellow konsantrasyon	Hücre sayısı	Normal mitoz	Anormal mitoz	Anormallik yüzdeleri (%)
Kontrol	3000	540	6	1.11
10 mg/L	3000	483	29	5.66
25 mg/L	3000	375	36	8.76
50 mg/L	3000	404	35	7.97
100mg/L	3000	285	53	15.68
200 mg/L	3000	162	41	20.20
400 mg/L	3000	131	49	27.22

Yapılan gözlemler sonucunda, saf suda çimlendirilen bezelye tohumlarında mitotik anormallik oranı %1.11 olarak hesaplandı. Sunset Yellow'un farklı konsantrasyonlarında çimlenen tüm gruplarda mitotik anormallik yüzdelerinin arttığı tespit edildi. Mitoz anormalliğindeki bu artış istatistiksel olarak tüm konsantrasyonlar için anlamlı bulundu ($p < 0.00001$).

Mitozun farklı safhalarındaki hücrelerin sayılımı ile anormallik görülen hücrelerin sayısı ve yüzdeleri Tablo 3.11’de sunulmaktadır.

Tablo 3.11. Farklı Konsantrasyonlarda Sunset Yellowda Çimlendirilen Tohumların Mitotik Evre Dağılımı ve Anormallik Oranları

Uygulanan konsantrasyon	Profaz			Metafaz			Anafaz			Telofaz		
	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)
Kontrol	255	-	-	193	4	2.03	46	2	4.16	46	-	-
10 mg/L	267	-	-	154	26	14.44	38	3	7.31	24	-	-
25mg/L	229	-	-	107	34	24.11	22	2	8.33	17	-	-
50 mg/L	286	-	-	85	33	27.96	14	2	12.5	19	-	-
100 mg/L	168	-	-	88	51	39.69	11	2	15.38	18	-	-
200 mg/L	96	1	1.03	51	35	40.69	6	5	45.45	9	-	-
400 mg/L	84	2	3.3	33	42	56.00	4	5	55.55	10	-	-

Profaz evresinde; kontrol grubu ile Sunset Yellow’un 10, 25, 50 ve 100mg/L konsantrasyonlarında herhangi bir anormal bölünme gözlenmedi. 200mg/L konsantrasyonda 1 ve 400mg/L’de 2 anormal bölünmeye rastlandı.

Metafaz safhasında kontrol dahil tüm gruplarda normal bölünmedeki hücre sayısı azalırken, anormal hücre sayısı artmaktadır. Anafaz evresinde kontrol grubunda gözlenen anormallik oranı % 4.16 iken bu oran en yüksek % 55.55 olarak hesaplandı. Telofaz evresinde incelenen hiçbir konsantrasyonda anormal bölünmeye rastlanmadı.

3.2.5. Sunset yellow'un farklı konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda interfaz anormalliği

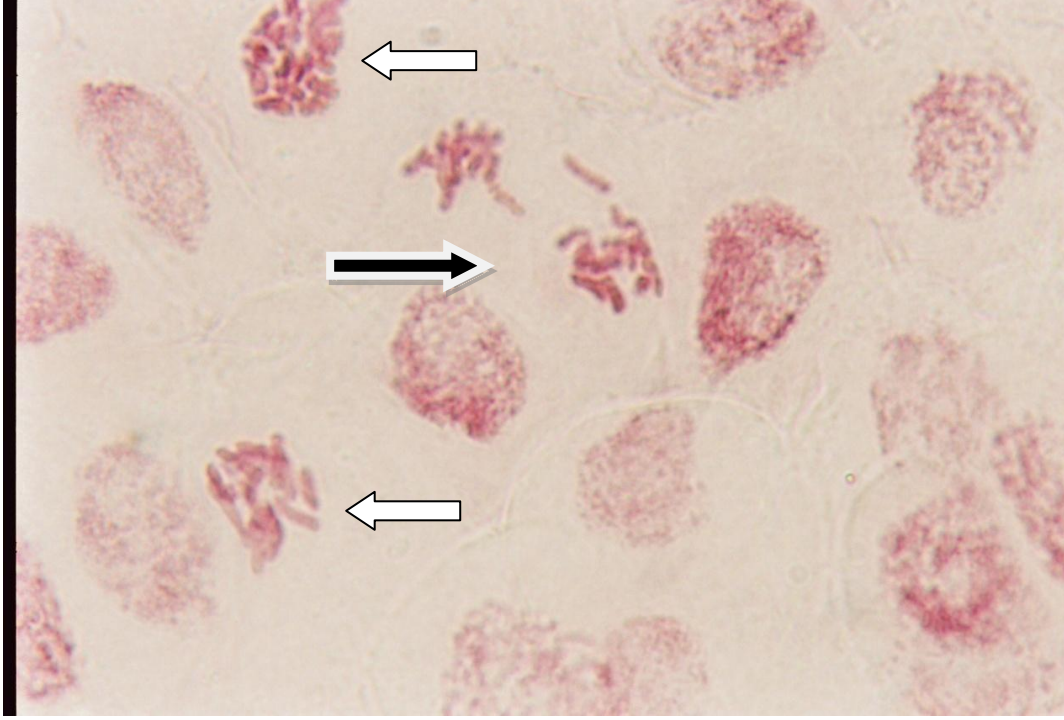
Farklı doz gruplarına ait preparatlar incelenirken, bölünme geçirmeyen hücrelerde çekirdek büzölmelerine rastlandı (Tablo 3.12).

Tablo 3.12. Sunset Yellow'un Farklı Konsantrasyonlarında Çimlendirilen Tohumların Normal ve Anormal İnterfaz Dağılımı

Uygulanan konsantrasyon	Hücre sayısı	Bölünen hücre	Normal interfaz	Anormal interfaz	Anormallik oranı (%)
Kontrol	3000	546	2451	3	0.12
10 mg/L	3000	512	2445	43	1.72
25mg/L	3000	411	2527	62	2.39
50 mg/L	3000	439	2491	70	2.73
100 mg/L	3000	338	2580	82	3.08
200 mg/L	3000	203	2686	107	3.83
400 mg/L	3000	180	2699	121	4.29

Saf suda çimlendirilen tohumlarda interfazda 3 anormal hücre sayılırken, doz gruplarında (400mg/L) en yüksek 121 hücre olarak tespit edildi. En düşük konsantrasyon (10mg/L) dahil tüm gruplarda anormallik oranında artış gözlemlendi. Bu artış; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.00001$).

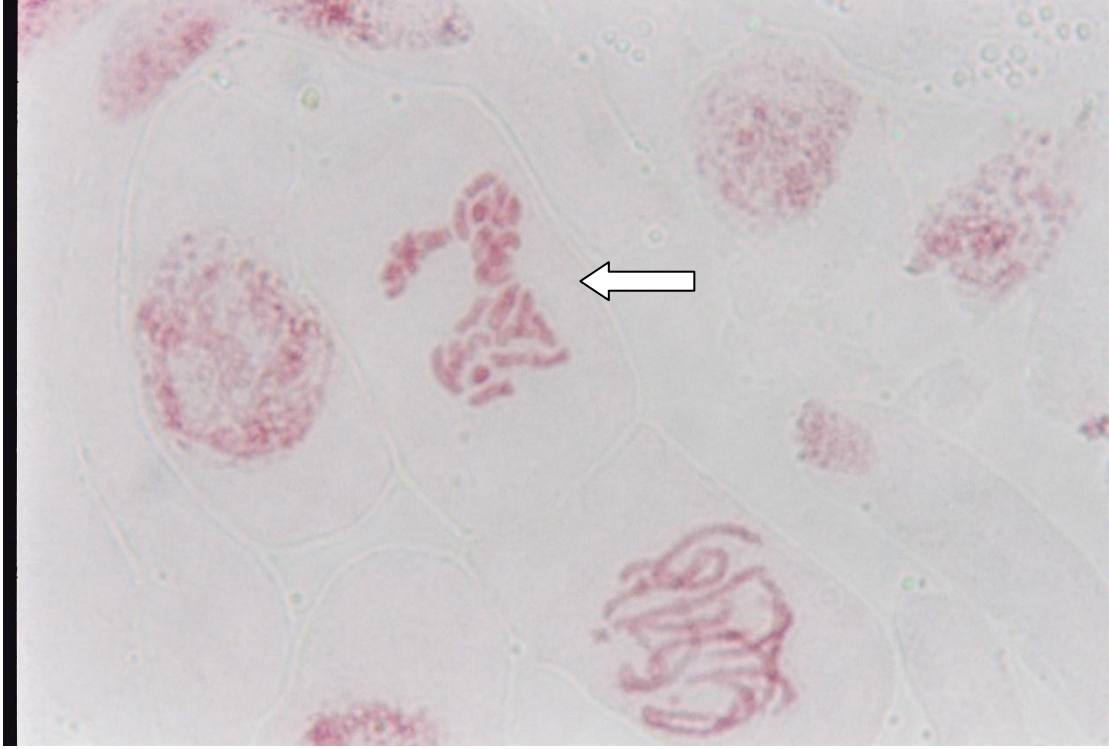
3.3. Farklı tartrazin ve sunset yellow konsantrasyonlarında çimlendirilen tohumlarda mitotik anormallik tanımları



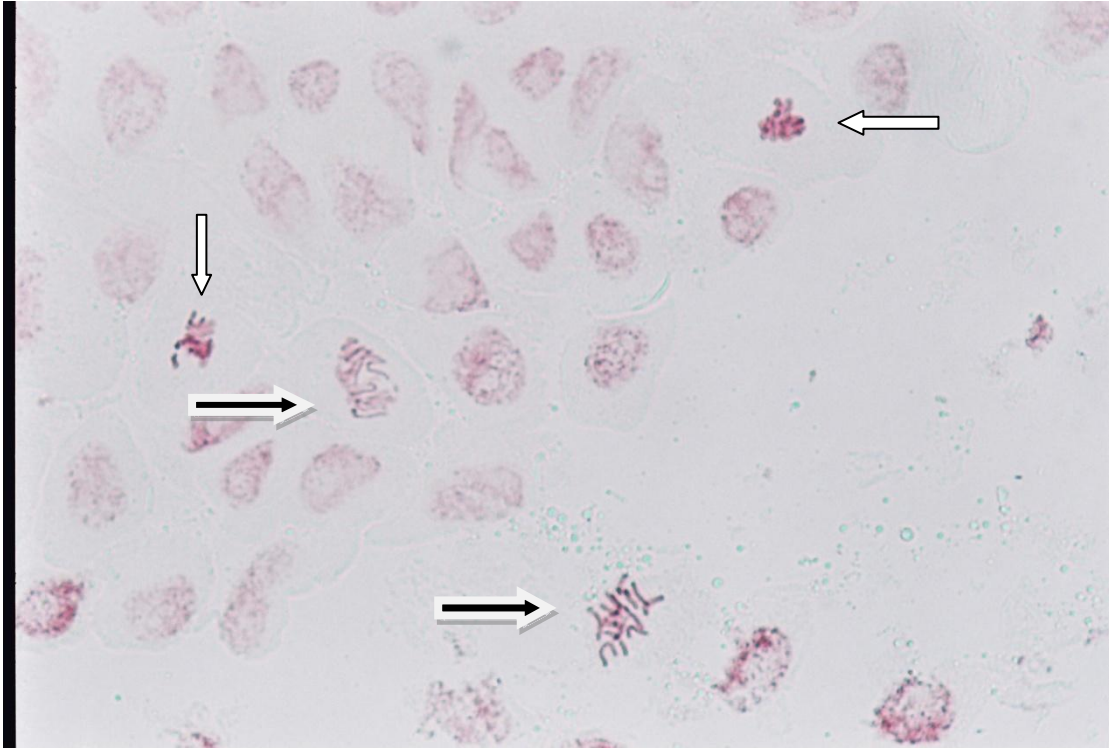
Şekil 3.7. Tartrazinin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde anafazda geri kalma (siyah ok), metafazda büzülen kromozomlar (beyaz oklar) (10X40)



Şekil 3.8. Tartrazinin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde metafazda fregmantasyon (siyah ok) (10X100)



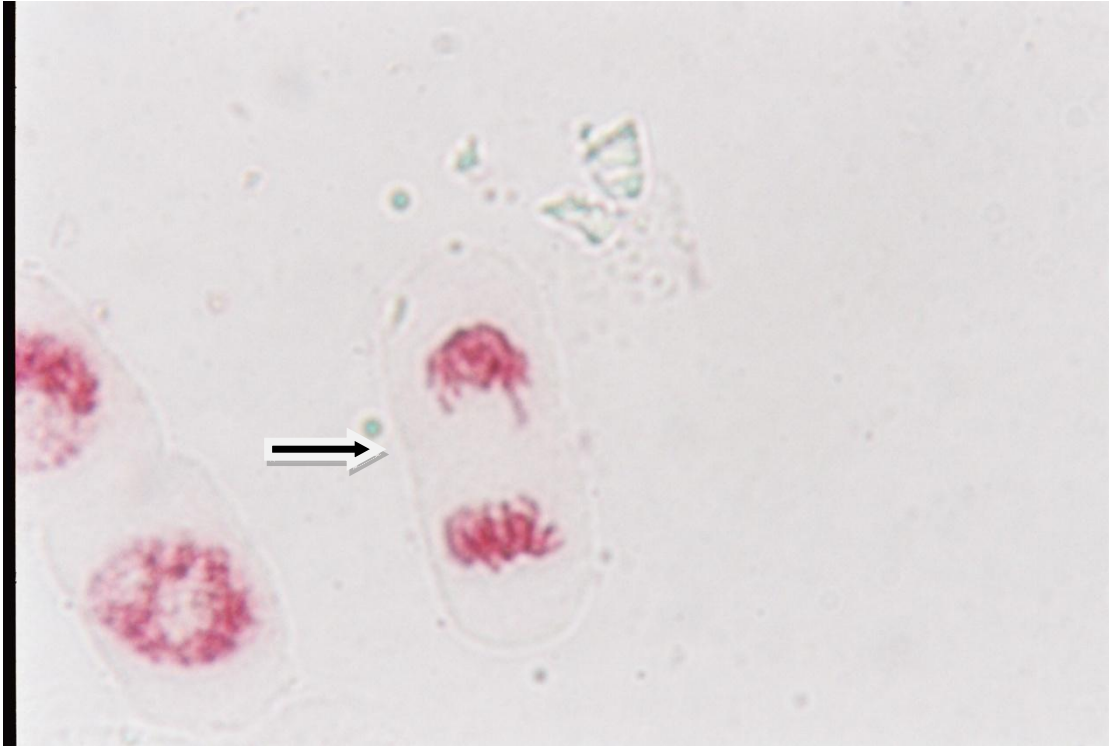
Şekil 3.9. Tartrazinin 400mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde metafazda poliploidi (beyaz ok) (10X100)



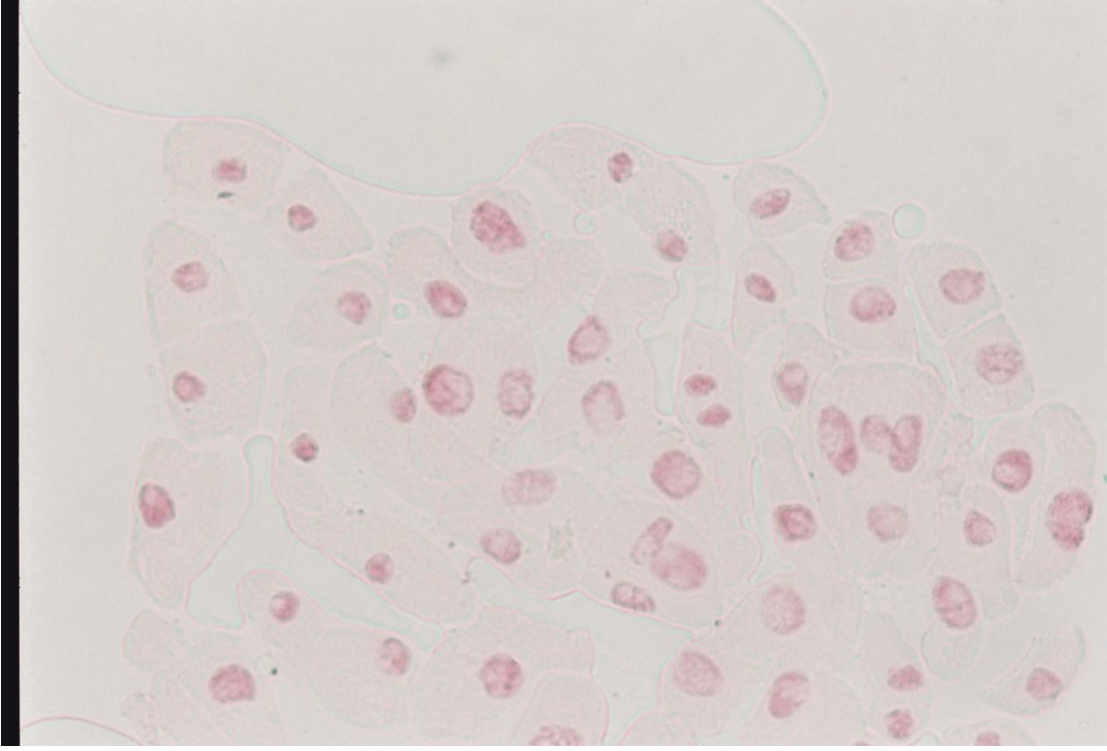
Şekil 3.10. Tartrazinin 25mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde normal metafaz (siyah ok), büzüşmüş metafaz (beyaz ok) (10X10)



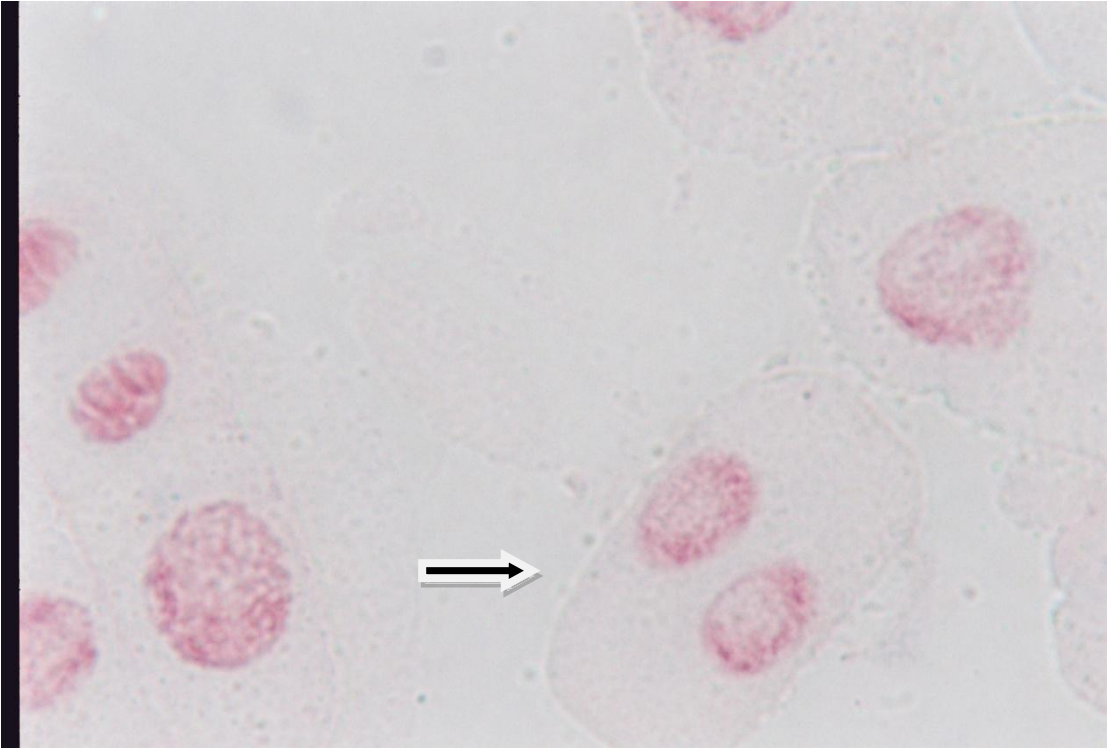
Şekil 3.11. Tartrazin'in 25mg/L konsantrasyonunda metafaz plâğında toplanamama (siyah ok) (10X40)



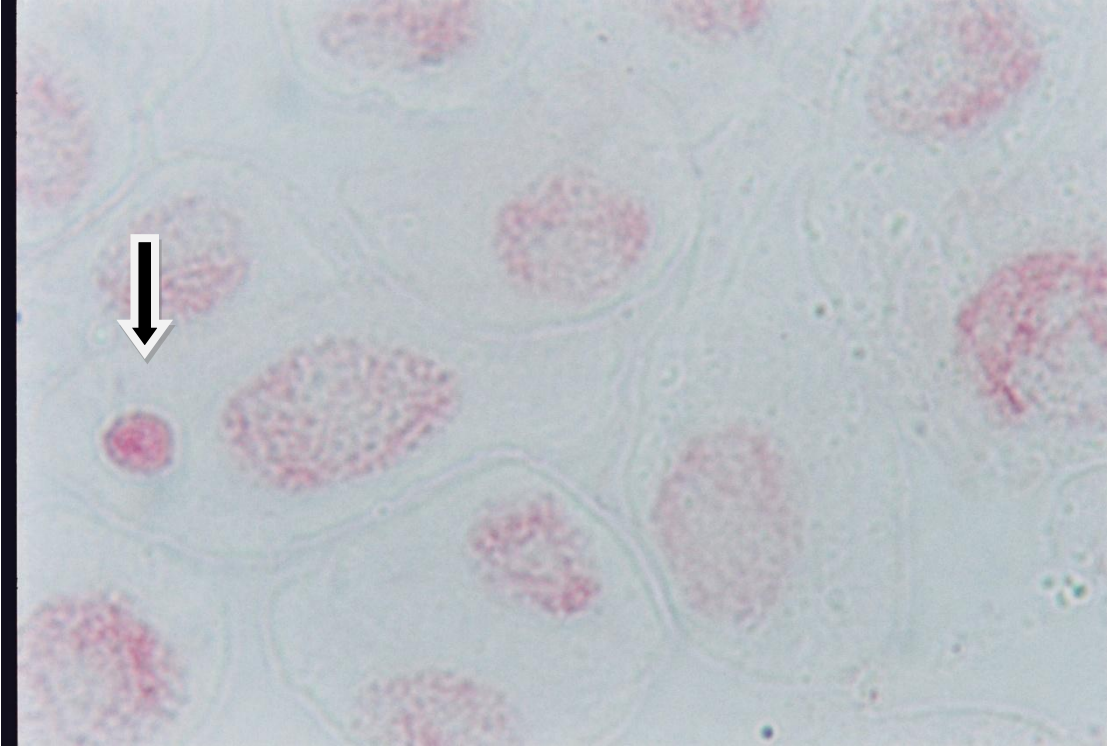
Şekil 3.12. Tartrazin'in 100mg/L konsantrasyonuna maruz kalmış hücrelerde anafazda geri kalma (siyah ok) (10X100)



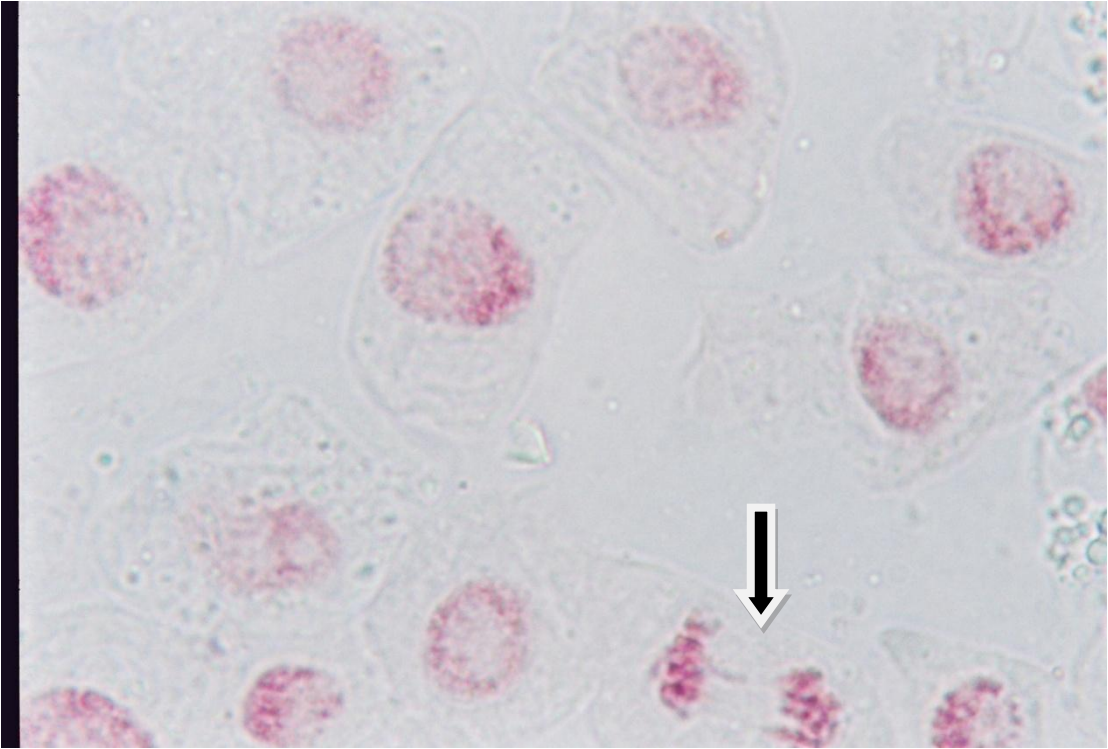
Şekil 3.13. 100mg/L Tartrazinde çekirdek büzülmesi (10X10)



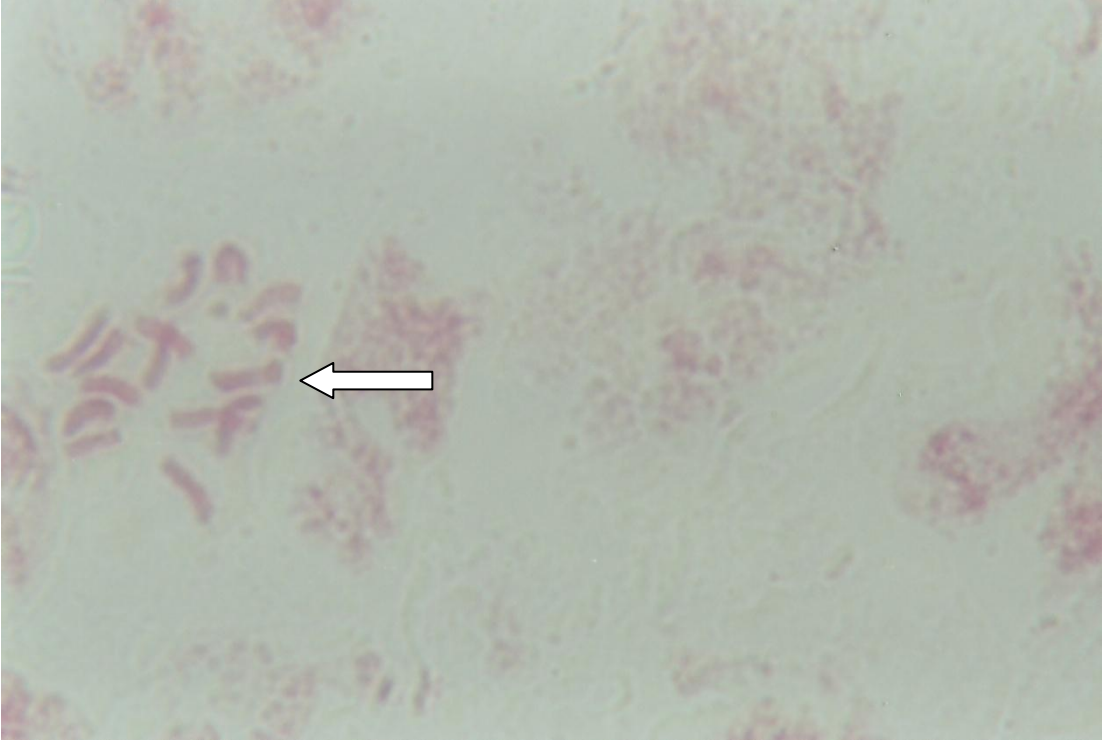
Şekil 3.14. 100mg/L Tartrazinde çift çekirdek (Siyah ok) (10X100)



Şekil 3.15. Sunset yellow 400mg/L konsantrasyondaki hücrede milronükleus (siyah ok) (10X40)



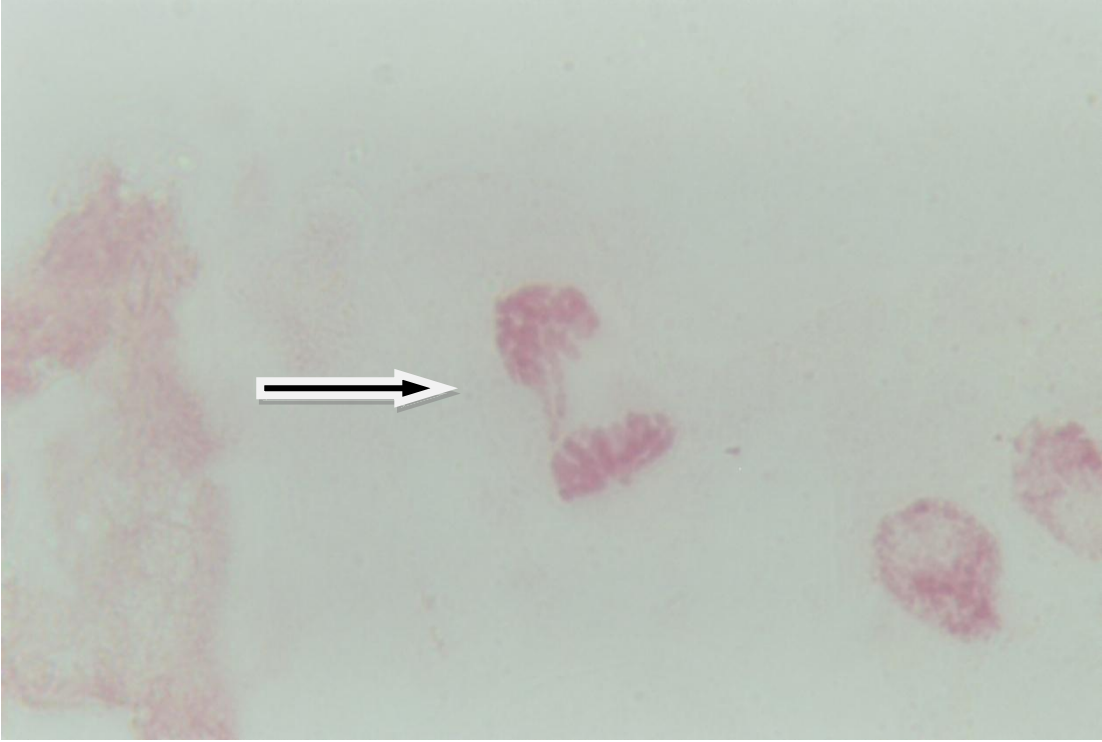
Şekil 3.16. Sunset Yellow 200 mg/L konsantrasyondaki hücrede anafazda geri kalma (Siyah ok) (10X40)



Şekil 3.17. Tartrazin 10mg/L konsantrasyonundaki hücrede metafazda poliploidi (beyaz ok) (10X100)



Şekil 3.18. Tartrazin 10mg/L konsantrasyonundaki hücrede profazda fragmentasyon (beyaz ok) (10X100)



Şekil 3.19. Sunset Yellow 10 mg/L konsatrasyondaki hücrede anafazda geri kalma (siyah ok)
(10X100)



Şekil 3.20. Sunset Yellow 100 mg/L konsatrasyondaki hücrede metafazda yapışma (beyaz ok)
(10X100)

BÖLÜM 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada gıdalarda boya maddesi olarak yaygın olarak kullanılan Tartrazin ve Sunset Yellow'un *Pisum sativum L.* model organizması üzerine olası genotoksik etkileri incelendi. Gıda boyaları ile yapılan genotoksik çalışmalar süreklilik arz etmesine rağmen, bu çalışma bitki model organizması üzerinde yapılan ilk çalışma niteliğindedir.

Gıda boyaları ile yürütülen daha önceki bazı genetik toksikoloji çalışmaları, Tartrazin'in hiçbir mutajenik potansiyeli olmadığını göstermektedir (Brown ve ark.,1978; Muzzall ve Cook, 1979; Sankaranarayanan ve Murthy, 1979; Haveland-Smith ve Combes, 1980; Chung ve ark.,1981; Ishidate ve ark., 1981; Tarja'n ve ark., 1982; Brown ve Dietrich, 1983; Chung, 1983; Ishidate ve ark., 1984; Karpliuk ve ark., 1984; Henschler ve Wild, 1985; Cameron ve ark., 1987; Munzner ve Wever, 1987; Izbirak ve ark., 1990; Rafii ve ark., 1997). Hiçbir çalışmada, mikronükleus'a rastlanmamıştır (Tarja'n ve ark., 1982; Renner, 1984). Yine Renner (1984), kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve kromozom aberasyonu testlerinde negatif sonuçlar bulmuştur.

Diğer genetik toksikoloji çalışmaları ise; Tartrazin'in mutajenik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Tartrazin'in Çin Hamsterlarında (İshidate ve ark., 1981, 1984) ve sıçanda (Giri ve ark., 1990) somatik hücrelerde mutasyona sebep olduğu, fakat farede (Durnev ve ark., 1995) mutasyona sebep olmadığı ortaya konulmuştur. Yine bir çalışmada çin hamster fibroblast hücrelerinde Tartrazin uygulamasından 48 saat sonra poliploid hücrelerin oluş sıklığında küçük bir artış bulunmuştur (İshidate ve ark., 1984). Giri ve ark. (1990), gıdalarla yüksek dozda Tartrazin'e maruz kalmış fare ve sıçan kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyonlarda ve kardeş kromatid değişimlerinde önemli artış olduğunu belirtmektedir. *In vivo* tek hücre jel elektroforez deneyi ya da 'Comet assay' deneyleri tartrazinin günlük alım miktarına

(ADI) yakın dozlarda, farelerin kolonlarında DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir (Sasaki ve ark., 2002).

Sunset yellow'la yeterli çalışmalar olmamasına rağmen eldeki çalışmalar genelde bakterilerde ya da mayalarda gerçekleştirilen mutajenite testleridir. Fare, sıçan ve hamster'lerin kemik iliği hücrelerinde klastojenite çalışmaları sürdürülmüş ve bileşiğin karsinogenik ve genotoksik etki yapmadığı rapor edilmiştir (JECFA, 1982; Wewer ve ark., 1989).

Bu çalışmada; gıdalarda renklendirici olarak kullanılan Tartrazin ve Sunset yellow'un kromozomal aberasyonlara ve sitotoksik etkiye sebep olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bezelye bitkisi özelinde incelenmiştir.

Tartrazin'in çalışmada kullanılan tüm konsantrasyon gruplarında çimlenme oranına bakıldığında; sadece 24. saatte kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiştir. Çimlenmenin 48. ve 72. saatlerinde ise, kontrol ve tüm çalışma gruplarında çimlenme oranı %100 olarak tespit edilmiştir. 24.saatte çimlenme oranındaki azalmanın Tartrazin'in kimyasal yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim; Tartrazin Sodyum tuzu olarak da tanımlanabilmektedir. Tuzlu ortamda yetiştirilen bitkilerin çoğu osmotik düzenleme yapabilir. Böyle bir düzenleme sonucu su potansiyeli düşerken turgor kaybı önlenir; ancak bilinmeyen bir nedenden ötürü, bu düzenlemeden sonra bitkilerin büyümesi yavaşlar (Bressan ve ark., 1990).

Tartrazin'in bezelye bitkisinde kök büyümesi ve gelişimine etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, kontrole kıyasla 10 ve 25mg/L konsantrasyonlarda anlamlı bir fark belirlenmedi. 50 mg/L Tartrazin konsantrasyonunda çimlendirilen tohumların kök uzunluğunda, istatistiksel açıdan anlamlı azalma tespit edildi ($p<0.05$). 100mg/L konsantrasyonda ise kök uzunluğunda anlamlı artış gözlemlendi ($p<0.01$). 200mg/L konsantrasyonda kontrole kıyaslandığında herhangi bir fark belirlenmezken çalışmanın en yüksek konsantrasyonunda kök uzunluğunda azalma tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Elde edilen sonuçlar, Poul ve ark.'ın 2009'da yaptığı çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Farelere ağızdan farklı konsantrasyonlarda Tartrazin

uygulanması sonucunda, 20 mg/kg ve 200 mg/kg'lık dozlarda mitotik hücrelerde artış; 2000 mg/kg'lık doz uygulandığında ise mitotik hücrelerde anlamlı azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Mitotik indeksteki artış, bileşenlerin mitotik hücrelerin toplanmasını kapsayan hücre döngüsü sürecini engellediğinin ya da geçici sitotoksitenin bir sonucu olarak kolon hücrelerindeki çoğalmanın göstergesi olarak açıklanmaktadır.

Tartrazin'in mitotik indeks üzerine etkileri ile ilgili gözlemlerde; 100 mg/ L doz grubu hariç, tüm gruplarda konsantrasyon yoğunluğu ile mitotik indeks arasında ters orantı gözlenmiştir. Diğer gruplara kıyasla mitotik indeks en yüksek 100mg/L konsantrasyonda çimlenen tohumların kök hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu sonuç bezelye tohumlarının kök uzunluğu ile paralellik göstermektedir.

Mitotik indeks yaşayan tüm organizmalar için kabul edilebilir bir sitotoksik ölçüttür (Amer ve Alı, 1974). Sitotoksik seviye mitotik indeks oranındaki azalmayla belirlenebilir. % 50' den daha az orandaki azalmalar genelde subletal etkiyi ifade eder. Eğer mitotik indeks oranındaki azalma % 50' nin üzerine çıkarsa test organizması üzerinde öldürücü etkiye sahip olabilir. Genellikle sitotoksik maddeler mitoz üzerine olan etkilerini mikrotübül oluşumunu inhibe ederek gösterirler. Birçok araştırmacıya göre C-mitoz, multipolar anafaz ve yapışkanlıklar gibi anormallikler iğ ipliği formasyonunun inhibisyonuna bağlanmaktadır (Amer ve Alı, 1974; Lazareve ve ark., 2003).

Farklı Tartrazin konsantrasyonlarında çimlendirilen bezelye tohumlarının kök ucu hücrelerinden hazırlanan preparatlarda, çeşitli mitotik anormallikler gözlenmiştir. Bunlar; metafaz palağında toplanamama, poliploidi, anafazda geri kalma, kromozomlarda yapışma, fregmantasyon, çift çekirdek, çekirdek büzülmeleri ve mikronükleusdur. Bu çalışmada Tartrazin'in tüm konsantrasyonlarında ortaya çıkan mitotik anormallik oranları istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0.00001$). Daha önce Tartrazin'in olası genotoksik etkilerini, bitkiler üzerinde inceleyen çalışmaya rastlanılmadığından, kıyaslamalar deney hayvanları üzerine yapılan çalışmalardan yararlanılarak gerçekleştirilmektedir. Giri ve ark. (1990), gıdalarla yüksek dozda Tartrazin'e maruz kalmış fare ve sıçan kemik iliği

hücrelerinde kromozomal aberasyonlarda ve kardeş kromatid değişimlerinde önemli artış olduğunu belirtmektedir. Tartrazin'in etkisi altında tespit edilen sonuçlar, bu çalışmada elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

Sunset Yellow'un 10, 25, 50, 100, 200 ve 400mg/L konsantrasyonunda çimlendirilen tohumlarda çimlenme oranına bakıldığında, 24. saatte 200mg/L konsantrasyonda anlamlı bir azalma ($p<0.05$) ve 400mg/L konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı azalma ($p<0.01$) tespit edildi. Çimlenmenin 48. ve 72. saatlerinde tüm gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark gözlenmedi. Elde edilen bulgular Tartrazin'de çimlendirilen gruplarla benzerlik göstermektedir.

Sunset Yellow'un farklı konsantrasyonlarında çimlendirilen bezelye tohumlarında, kök gelişimi incelendiğinde tüm gruplarda, kök gelişiminin anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. Kök uçlarından elde edilen preparatlarda mitotik indeks hesaplandığında, sadece 10mg/L konsantrasyonda fark gözlenmedi. Diğer tüm konsantrasyonlarda mitotik indeks, istatistiksel açıdan anlamlı şekilde azalmıştır. Mitotik indeks, hücre bölünmesinin frekansını yansıtır ve kök büyüme oranlarının belirlenmesine yönelik önemli bir parametredir. Bu çalışmanın bulgularına göre, konsantrasyon gruplarına ait mitotik indeks ve kök uzunlukları oranları paralellik göstermiş olup, hemen hemen tüm konsantrasyonlarda azalma saptanmıştır.

Poul ve ark. (2009), farelere ağızdan 200 mg/kg ve 1000 mg/kg Sunset Yellow uygulandığında, bağırsak hücrelerinde, mitotik hücrelerin arttığını bildirmektedir. İki çalışma arasındaki farklılık, kullanılan model organizmanın farklı oluşu ile açıklanabilir. Aynı zamanda, Sunset Yellow'da çimlendirilen tohumlar, çimlenme sürecinde gıda boyasının kimyasal yapısından dolayı farklı fizyolojik tepki gösterebilmektedir.

Sunset Yellow'da çimlenen tohumlardan hazırlanan preparatlar incelendiğinde, Tartrazin'de çimlendirilen tohumlarda gözlenen anormalliklere benzer mitotik anormallikler tespit edildi. Çalışma grubundaki tüm konsantrasyonlar kontrol grubu ile kıyaslandığında, mitotik anormallik yüzdelерinin arttığı gözlemlendi.

Tartrazin ve Sunset Yellow'un tüm gruplarındaki anormallikler incelendiğinde, en fazla gözlenen anormalliklerin kromozomlarda poliploidi, yapışma, fragmentasyon ve anafaz köprüleri olduğu belirlendi. Fragmentasyon, çoklu kromozom kırıklarının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Grant, 1978). Kromozom kırıklarına neden olan kimyasal maddeler klastojenik ajanlar olarak bilinirler ve kromozomlar üzerindeki etkilerini DNA'ya etki ederek gerçekleştirdikleri belirtilmektedir (Chauhan ve ark., 1999). Kromozomlarda toksik bir etki sonucu meydana gelebilen yapışma olayı ise, genellikle geri dönüşümsüzdür ve bitkinin ölümüne neden olabilmektedir (Klasterska ve ark., 1976). Patil ve Bhat (1992) kromozom yapışkanlığını çoğunlukla kromatin materyalinin protein matriksini içine alan fizyolojik bir adezyon tipi olarak tanımlamıştır. Yapışkanlık, DNA'daki fosfat grupları ile komplekslerin formasyonu üzerine kimyasal maddelerin etkisi olarak kabul edilebilir (Valle ve Ulmer, 1972). Bir takımdaki kromozom sayısının hepsinin birden ikiden fazla kata yükselmesi sonucu meydana gelen poliploidi olayı, genotoksisiteyi tespit etmeye yönelik diğer bir anormallik tipidir. Poliploidi sonucunda $3n$, $4n$, $5n$ ve daha yüksek katsayılı kromozomlara sahip bireyler meydana gelir. Bu çalışmada, mikroskopik incelemeler sonucu gözlenen anormalliklerden bir diğeri, anafaz köprüsüdür. Anafaz köprüsü kullandığımız iki kimyasalda da gözlenmiştir. Kromozom köprüleri, genellikle metafazda kromozomların yapışması veya kullanılan kimyasal maddelerin klastojenik etkisi sonucu kromozomların kopup sonra yeniden birleşmesi sonucu meydana gelebilir (Türkoğlu, 2007; Tomkins ve Grant, 1972). Kromozom segmentlerinin düzensiz translokasyon ve inversiyonları da kromozom köprülerine neden olabilir (Gömürgen, 2005). Kromozom köprüleri veya kromatidler arası bağlantılar metafazda kardeş kromatidlerin birleşimi sonucu oluşan kromatin fiberleri tarafından meydana getirilirler ve bu kromatidler geç anafaz veya telofaza kadar bir arada kalırlar. Eğer bu bağlantılar çok gerilirse, kromatidler anafazdaki birleşme noktalarında veya bu noktalara yakın yerlerden kırılabilirler. Bu kırılmalar kardeş kromatidlerin her ikisinde de ayrı noktada meydana gelebilir ve sonuçta kromozom benzeri yapılar olan fragmentlerin oluşumuna neden olur.

Sonuç olarak; her iki gıda boyasında çimlendirilen tohumlarda gözlenen mitotik indeksteki azalmadan dolayı, çalışmada kullanılan gıda boyalarının sitotoksik etkiye

neden olabileceği aynı zamanda gözlenen mitotik anormalliklerin oranı nedeniyle bu boyaların canlıda genotoksik etki oluşturabileceği düşünölmektedir.

Gıda katkı maddelerinin tüketiminin, kullanım miktarlarından daha az miligramlarda bile, bazı kişilerde gıda intoleransına neden olabileceği düşünölmektedir. Böyle durumlarda, gıda intoleransı ile bağlantılı olduğu düşünölen Tartrazin ve Sunset Yellow gibi içeren gıda yemekten kaçınılmalıdır. Bu amaçla boyaların varlığı, gıda veya ilaçların etiketlerinde açıkça belirtilmelidir. Özellikle, dondurma tatlı gibi endişe içeren ürünler üzerlerinde net bir etiket olmadan satılmamalıdır (Poul ve ark., 2009).

KAYNAKLAR

AMER, S.M., ALI, E.M., Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia*, 39, 633-643, 1974.

Amerika Ulusal Toksikoloji Programı, Carcinogenesis bioassay of FD&C Yellow No. 6. Cas No. 2783-94-0. 1981.

ASHBY, J., TENNANT, R.W., Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.* 204, 17-115, 1988.

ATMAN, Ü.C., Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontrolü. www.ttb.org.tr/STED/sted0304/gida.pdf. 2004.

BENIGNI, R., Analysis of the National Toxicology Program data on *in vitro* genetic toxicity tests using multivariate statistical methods. *Mutagenesis* 4, 412-419, 1989.

BIO/DYNAMICS, A long-term oral carcinogenicity study on FD&C Yellow #6 in rats. Unpublished, 1982a.

BIO/DYNAMICS, A long-term oral carcinogenicity study on FD&C Yellow #6 in mice. Unpublished, 1982b.

BORZELLECA, J.F., HALLAGAN, J.B., Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD&C Yellow No. 5 (Tartrazine) in rats. *Food and Chemical Toxicology* 26(3): 179-87, 1988a.

BORZELLECA, J.F., HALLAGAN, J.B., A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD&C Yellow No. 5 (Tartrazine) in mice. *Food and Chemical Toxicology* 26(3): 189-94, 1988b.

BORZELLECA, J.F., OLSON, J.W., RENO, F.E., Lifetime toxicity/ carcinogenicity study of FD&C Red No. 40 (Allura Red). In sprague-dawley rats. *Food chem. Toxicol.* 27: 701-5, 1989.

BRESSAN, R.A., NELSON, D.E., IRAKI, N.M., LA ROSA, P.C., SINGH, N.K., HASEGAWA, P.M., CARPITA, N.C. Reduced cell expansion and changes in cell walls of plant cells adapted to NaCl. In: *Environmental injury to plants*, pp. 37-171, F. Katterman, ed. Academic Press, Inc., 1990.

- BROWN, J., ROEHM, G., BROWN, R., Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the salmonella/microsome system. *Mutat. Res.* 56, 249–271, 1978
- BROWN, J., DIETRICH, P., Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the Salmonella/microsome assay: use of aerobic and anaerobic activation procedures. *Mutat. Res.* 116 (3–4), 305–315, 1983.
- CAMERON, T., HUGHES, T., KIRBY, P., FUNG, V., DUNKEL, V., Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/ microsome and mouse lymphoma TK+/_ assays. *Mutat. Res.* 189, 223–261, 1987.
- CANNON, W.A., Studies in plant hybrids: the spermatogenesis of hybrid peas, *Bull. Torrey Bot. Club* 30) 519–543, 1903.
- CHAPPEL, C.I., HOWELL, J.C., Caramel colours. A historical introduction. *Food Chem. Toxicol.* 30:351-57, 1992.
- CHAUHAN, L.K.S., SAXENA, P.N., GRUPTA S.K., Cytogenetic effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the root meristems cells of *Allium cepa*. *Environmental Experimental Botany*, 42, 181-189, 1999.
- CHICHESTER, D.F., TANNER, F.W., Food Clours. In *Handbook of Food Additives*, 2nd Ed. T.E. Furia, S. 587-596, CRC Press, Ohio, 1972.
- CHUNG, K. T., G. E. FULK, *et al*, Mutagenicity testing of some commonly used dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 42(4): 641-8, 1981.
- CHUNG, K.T., The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* 114, 269–281, 1983.
- CROSBY, N.T., Food Colours. In *Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis, Some Aromatic Amines and Azo Dyes*, Vol.4. H. Egan (Ed.) P. 311-320, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1981.
- DANIEL, J. W., The excretion and metabolism of edible food colors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 4: 572-94, 1962.
- DAS, A., MUKHERJEE, A., Genotoxicity testing of the food colours amaranth and Tartrazine. *Int. J. Hum. Genetics*, 4, 277-280, 2004.
- DAVIS, P.H, *Flora of Turkey*, Vol. 3, Edinburgh Press, Edinburgh, pp. 370–373, 1970.
- DAVIS, K. J., O. G. FITZHUGH, *et al.*, Chronic rat and dog toxicity studies on Tartrazine, *Toxicology and Applied Pharmacology* 6: 621-6., 1964.
- DELGADO-VARGAS, F., PAREDES-LÓPEZ, O., *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press, 2003.

DURNEV, A.D., ORESHCHENKO, A.V., KULAKOVA, A.V., BERESTEN, N.F., [Analysis of cytogenetic activity of food dyes]. Vopr. Med. Khim. 41, 50-53, 1995.

ELÇİ, Ş., AÇIKGÖZ, E., Baklagil (Leguminosae) ve Buğdaygil (Gramineae) Yem Bitkileri Tanıtma Klavuzu. TİGEM. Afşaroğlu Matbaası. Ankara, 1994.

EL-SAADANY, S.S., Biochemical effect of chocolate colouring and flavouring like substances on thyroid function and protein biosynthesis. Die Nahrung. 35:335-43,1991.

EFSA, Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food.EFSA Journal, 7(11), 1330, 2009.

FARAG, IM, ABDEL AZİZ KB, EL-NAHASS E, ZAHER M, HEGAZY MA, ROSHDY HM, Cytogenetic studies on the effects of Tartrazine, beta-carotene and a mixture of both dyes on pregnant mice and their embryos. Bulletin of the National Research Centre (Egypt) 26, 93-109. 2001.

FDA, FD&C Yellow No. 5, Food and Drug Administration;, action, final rule, removal of stay, Federal Register. 50, 35774-35783, 1985.

FDA, Permanent listing of FD&C Yellow No. 6; final rule, Federal Register. 51: 41765-41783, 1986.

FLAMM, W.G., JACKSON, B.A., FD&C Yellow No. 5 Safety Evaluation. Reference to memorandum from Flamm to Gryder, Department of Health and Human Services, 1985.

GARNER, RC., NUTMAN, C.A., Testing of some azodyes and their reproduction products for mutagenicity using *S. typhimurium* TA 1538. Mutation Res. 44, 9-19, 1977.

GİRİ, A.K., DAS, S.K., TALUKDER, G., SHARMA, A., Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by Curcumin and Tartrazine on mammalian cells *in vivo*. Cytobios. 62 (249), 111-7., 1990.

GÖMÜRGEN, A.N., Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L., Cytologia, 70, 119-128., 2005.

GRANT, W.F., Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. Envir. Health Perspectives, Vol 27 pp 37-43, 1978.

HAVELAND-SMİTH, R.B., COMBES, R.D., *et al.*, Methodology for the testing of food dyes for genotoxic activity: experiments with red 2G (C.I. 18050). Mutation Research 64(4): 241-8, 1979.

HAVELAND-SMİTH, R., COMBES, R., Screening of food dyes for genotoxic activity. Food Cosmet. Toxicol. 18, 215-221, 1980.

HAYASHI, M., MATSUI, M., *et al.*, Genotoxicity evaluation datasheet of food additives by the MHW (1980-1998), Environmental Mutagenesis Research 22, 27-44, 2000.

HENSCHLER, D., WILD, D., Mutagenic activity in rat urine after feeding with the azodye Tartrazine. Arch. Toxicol. 57, 214-215. 1985.

HONOHAN, T., ENDERLIN, F.E., *et al.*, Intestinal absorption of polymeric derivatives of the food dyes Sunset Yellow and Tartrazine in rats. Xenobiotica 7(12), 765-774, 1977.

HUEPER, W.C., Potential role of non-nutritive food additives and contaminants as environmental carcinogens. A. M. A. Archives Path., 62. 218, 1956.

ISHIDATE, M J., SOFUNI, T., *et al.*, Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food and Cosmetics Toxicology 22(8), 623-636, 1984.

ISHIDATE, M., SOFUNI, J., YOSHIKAWA, K., Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. Gann Monogr. Cancer Res. 27, 95-108, 1981.

İZBIRAK, A., SÜMER, S., DİRİL, N., Gıdalara katılan bazı azo boyaların mutajenik etkilerinin test edilmesi. Mikrobiyoloji Bült. 24,48-56, 1990.

JANSSON, T., ZECH, L., Effects of vanilin on sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human lymphocytes. Mut. Res. 190,221-24, 1987.

JECFA, Specifications for identity and purity and toxicological evaluation of food colours. In: FAO Nutrition Meetings Report Series No. 38B. WHO, Geneva, 1964.

JECFA, World Health Organization. Sunset Yellow FCF. WHO Food Additives Series, vol. 17. <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je29.htm>>,1982.

JONES, R., RYAN, A.J., *et al.* The metabolism and excretion of Tartrazine in the rat, rabbit and man. Food and Cosmetics Toxicology 2, 447-52 ,1964.

KARAALI, A., Gıda Katkı Maddeleri, İTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü, 2006.

KARPLIUK, I.A., VOLKOVA, N.A., OKUNEVA, L.A., GOGOL, A.T., RYBAKOVA, K.D., [Mutagenic effect of the food-coloring agents Tartrazine and indigo carmine]. Vopr. Pitan. 58-61, 1984.

KAWACHI, T., YAHAGI, T., *et al.* Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan." IARC Scientific Publications (27), 323-30, 1980.

KILIÇCIOĞLU, O., Gıda Renklendiricilerinden Eitrosin'in Teratojenik Etkileri ve Atopik Hastalıkların Etiyolojisindeki Rolü, 1995.

KLASTERSKA, I., NATARAJAN, A.T., RAMEL, C., An interperation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a catogory of chromatid aberrations. *Hereditas*, 83, 153-162 ,1976.

LAKDAWALLA, A.A., NETRAWALLI, M.S., Mutagenicity, comutagenicity and antimutagenicity of erythrosine (FD&C Red No. 3), a food dye, in the Ames/Salmonella assay. *Mut. Res.* 204, 131-39, 1988(a).

LAKDAWALLA, A.A., NETRAWALLI, M.S., Erythrosine, a permitted food dye, is mutagenic in the *Bacillus subtilis* multigene sporulation assay. *Mut. Res.* 206: 171-76, 1988 (b).

LARSSON, K.S., A teratologic study with the dyes amaranth and porceau-4R in mice. *Toxicology*, 4:75-82, 1975.

LAZAREVE, E.M., POLYAKOV, V.Y., CHENTSOV, Y.S., SMURNOVA E.A., Time and cell dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicines in *Triticum aestivum* root meristem. *Cell Biology International*, 27:633-646, 2003.

LEWITSKY, G.A., The morphology of the chromosomes, *Trudy Prikiady botanike, Genetike Selektii* 27 103–173, 1931.

LÜCK, H., RICKERL, E., Food additives and mutative effects. VI Report, *Z. Lebesmitt.-Untersuch.* 112, 157-174,1960.

MA, T.H., The role of plant systems for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res.*, 437: 97-100, 1999.

MARMION, H.D., *Handbook of U.S. Colorants for Foods, Drugs and Cosmetics*, P. 6, John Wiley Sons. New York ,1979.

MARSHAK, A., The morphology of the chromosomes of *Pisum sativum*, *Cytologia* 2 318–339, 1931.

MATULA, T.L., DOWNIE, R.H., Genetic toxicity of erythrosine in yeast. *Mut. Res.* 138: 153-56, 1984.

MCGREGOR, D.B., BROWN, A., *et al*, Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 12(1), 85-154, 1988.

MUNZNER, R., WEVER, J., Mutagenic activity of the feces of rats following oral administration of tartrazine, *Arch Toxicol* 60, 328-330, 1987.

MUZZALL, J., COOK, W., Mutagenicity test of dyes used in cosmetics with the salmonella/mammalian-microsome test. *Mutat. Res.* 67, 1–8, 1979.

PATİL, B.C, BHAT, T.G.I., A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria termata* L., *Cytologia* 57, 259-264, 1992.

PATTERSON, R.M., BUTLER, J.S., Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology* 20(4), 461-5,1982.

POLLASTRİNİ, M.T., BAREA, M., SALAS, J., [Genotoxic study of commercial dyes with Tartrazine base in *S. typhimurium* his- and *E. coli* trp-]. *Rev. Sanid. Hig. Publica. (Madr.)* 64, 203-209, 1990.

POUL, M., JARRY, G., ELHKİM, M.O., POUL, J-M, Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and Tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology* 47, 443–448, 2009.

RADOMSKİ, J.L., MELLİNGER, T.J., The absorption, fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes, FD&C Red No. 2, FD&C Red No. 4, and FD&C Yellow No. 6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 136: 259-66,1962.

RADOMSKİ, J.L., *Toxicology of Food Colors. Annu- Rey. Pharmacol* 14, 127-137, 1974.

RAFİİ, F., HALL, J., CERNİGLİA, C., Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs, and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from human intestinal tract. *Food Chem. Toxic.*, 897–901, 1997.

RENNER, H.W., Tartrazine—a reinvestigation by in vivo cytogenetic methods. *Food Chem. Toxicol.* 22, 327, 1984.

RYAN, A.J., WELLİNG, P.G., *et al.* Further studies on the metabolism of Tartrazine and related compounds in the intact rat. *Food and Cosmetics Toxicology* 7(4): 287-95,1969.

SANKARANARAYANAN, N., MURTHY, M.S., Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Research* 67(4): 309-314, 1979.

SARAH, KOBYLEWSKİ, Ph.D. Candidate Molecular Toxicology Program University of California, Los Angeles and Michael F. Jacobson, Ph.D. Executive Director Center for Science in the Public Interest, 2010.

SASAKİ, YF., KAWAGUCHİ, S., KAMAYA, A., OHSHİTA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANİGUCHİ, K., TSUDA, S., The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519, 103–119, 2002.

SEYHAN, A., Bazı Gıdalarda Tartrazin ve İndigotin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromografi Yöntemi ile Tayini, 2006.

SWEENEY, E.A., CHİPMAN, J.K., FORSYTHE, S.J., Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 6, 119-122, 1994.

TARJAN, V., KURTİ, M., Mutagenicity testing of several food colourants certified for use in Hungary. *Mutat. Res.* 97, 228, 1982.

TARMAN, Ö., *Baklagillerden Yem Bitkileri Yetiştirilmesi*. Ziraat Vekaleti Neşriyatı. İstanbul Matbaası. Ankara, 1954.

TENNANT, R.W., STASIEWICZ, S., SPALDİNG, J.W., Comparison of multiple parameters of rodent carcinogenicity and *in vitro* genetic toxicity. *Environ. Mutagen.* 8, 205-227, 1986.

TOĞAY, N., TOĞAY, Y., ERMAN, M., YILDIRIM, B., Kışlık İki Bezelye Hattı (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.)'nda Farklı Bitki Sıklıklarının Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 16 (2): 97–103, 2006.

TOMKİNS, D.J., GRANT, W.F., Comparative cytological effects of pesticides menazon, metrobromuron and tetrachloro nitrile in *Hordeum* and *Tradescanita*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14: 245-256, 1972.

TÜRK GIDA KODEKSİ YÖNETMELİĞİ, T.C. Resmi Gazete. Sayı: 23172: 1-220, 1997.

TÜRKOĞLU, Ş., Genotoxicity of five food preservation tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 626, 4-14, 2007.

VALLE, B.L., ULMER, D.D., Biochemical effects of mercury, cadmium and lead, *Annual Review of Biochemistry*, 41, 92-128, 1972.

VİOLA, M., NOSOTTİ, A., Application of the Ames test on some dyes. *Boll. Chim. Farm.* 117, 402, 1978.

WESTMORELAND, C., GATEHOUSE, D.G., The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and FD&C Yellow No. 6 *in vivo* in the rodent micronucleus test (observations on species and tissue specificity). *Carcinogenesis* 12(8): 1403-7, 1991.

WEVER, J., MUNZNER, R., RENNER, HW., Testing of Sunset Yellow and Orange II for genotoxicity in different laboratory animal species. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 271-276, 1989.

YENTÜR, G., KARAKAYA, A.E., *Kullanımı Yasaklanan Aromatik Azo Yapısındaki Gıda Boyalarının Bazı Gıda Maddelerinde Araştırılması*, 1985.

YOSHİMOTO, M., YAMAGUCHİ, M., HATANO. S., WATANABE T, Configurational changes in rat liver nuclear chromatin caused by azo dyes. Food Chem. Toxicol. 22, 337-344, 1984.

YURTTAGÜL, M., AYAZ, A., Katkı Maddeleri, Yanlışlar ve Doğrular, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

1983'de Ordu'da doğan Neslihan KIRCA EKİNCİ, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans öğrenimine 2009 yılında başladı.