

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARTRAZİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDEKİ
IN VITRO SİTOTOKSİSİTE VE GENOTOKSİSİTESİ**

BÜŞRA GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2016

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi BÜŞRA GÜNEŞ tarafından hazırlanan ve Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU danışmanlığında yürütülen “Tartrazinin İnsan Periferal Lenfositlerindeki *In Vitro* Sitotoksisite ve Genotoksisitesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 15/12/2016 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU


Başkan : Doç. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ
Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU
Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK
Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

İmza : 

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 16/12/2016 tarih ve 216/553 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

22./12./2016

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Kırsat KORKMAZ



TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


İmza
Büşra GÜNEŞ

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET
TARTRAZİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDEKİ *IN VITRO*
SİTOTOKSİTE VE GENOTOKSİSİTESİ

Büşra GÜNEŞ

Ordu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, 2016
Yüksek Lisans Tezi, 73s.

Danışman: Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU

Renk katkı maddesi olan tartrazin gıda ürünlerinde, ilaç ve kozmetikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, metabolik aktivatör (S9 karışımı) varlığında ve yokluğunda tartrazin ve metabolitlerinin insandaki genotoksitesini detaylı olarak araştırılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı tartrazin ve metabolitlerinin, insan periferal lenfosit kültürlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini, kromozom anormallikleri (KA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak incelemektir. Tartrazinin hücre bölünmesi üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için, mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI) de hesaplanmıştır. Kültürler S9 karışımı varlığında ve yokluğunda 625, 1250, 2500 µg/ml tartrazin dozları ile muamele edilmiştir. S9 karışımı içermeyen hücre kültürleri 48 saat tartrazine maruz bırakılırken, S9 karışımı ilave edilen kültürler 3 saat boyunca tartrazine maruz bırakılmıştır. Ayrıca hem negatif hem de pozitif kontrol grupları oluşturulmuştur.

Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, S9 karışımı yokluğunda en yüksek konsantrasyonun MI değerini önemli ölçüde düşürmesinden dolayı, tartrazin sitotoksik etki göstermiştir. Tartrazin ve metabolitleri S9 karışımı varlığında veya yokluğunda yüksek konsantrasyonlarda KA ve MN içeren anormal hücreleri önemli ölçüde artmıştır. Hem S9'lu hem de S9'suz kültürlerde en yüksek tartrazin konsantrasyonunda önemli ölçüde artmış MN değerleri bulunmuştur. Sonuçlarımız tartrazinin, insan lenfosit kültürlerinde sitotoksitesiyi uyarabildiği ve hem tartrazinin hem de metabolitlerinin genotoksik etkiye sahip olduğu göstermiştir. Tartrazinin mutajenite ve genotoksitesinin etkilerini belirlemek ve insanda, özellikle çocuklarda olası bir risk değerlendirmesi yapmak için farklı hücre hatlarının kullanıldığı daha hassas çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: İnsan periferal lenfositleri, Kromozom anormallikleri, Mikronükleus, Sitotoksite, Tartrazin

ABSTRACT

***IN VITRO* CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF TARTRAZINE IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES**

Büşra GÜNEŞ

Ordu University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Biology, 2016
MSc. Thesis, 73p.

Supervisor: Assoc. Prof. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU

The colour additive, tartrazine, is widely used in food products, drugs and cosmetics. However, genotoxicity of tartrazine and its metabolites has not been investigated in the presence and absence of a metabolic activator (S9 mix) in human in detail. Therefore, the aim of this study is to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of tartrazine and its metabolites on cultured human lymphocytes by using chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests. Mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI) were also calculated to determine the cytotoxic effect of tartrazine for cell division. Cultures were treated with 625, 1250 and 2500 µg/ml of tartrazine in the presence and absence of S9 mix. While the cells were treated with tartrazine for 48 h in cultures without S9 mix, the cultures with S9 mix were exposed to tartrazine for 3 h. Both negative and positive control groups were also established.

Tartrazine showed cytotoxic effect at the highest concentration due to significant decrease in MI in the absence of S9 mix when compared with solvent control. Tartrazine and metabolites significantly increased the CAs and aberrant cells in the presence and absence of S9 mix at the higher concentrations. Increased MN values in cultures with and without S9 mix were found to significantly at the highest concentration tested. Our results indicated that tartrazine can induce cytotoxicity, and both it and its metabolites have genotoxic potential on human lymphocyte cultures. More sensitive studies are necessary by using different cell lines to evaluation the effects of its mutagenicity and genotoxicity, and to make a possible risk assessment in human, especially in children.

Keywords: Chromosome aberration, Cytotoxicity, Human peripheral lymphocytes, Micronucleus, Tartrazine

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim ve tez çalışmam boyunca bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin yürütülmesi sırasında değerli fikir ve önerileri ile çalışmalarımı destekleyen sayın Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na ve emeği geçen tüm bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvara girdiğim ilk günden itibaren bütün bilgi ve birikimlerini bıkmadan usanmadan aktaran ve yardımını esirgemeyen Seval KONTAŞ YEDİER'e, araştırmam süresince, her zaman yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Ebru UÇGUN'a ve tez hazırlık aşamasında baştan sona emeği geçen ve desteklerini esirgemeyen B. Başak GÜLABİ, Gülaycan POLAT, T. Taha GÜNDOĞAN ve diğer tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hem bu zorlu ve uzun süreçte hem de hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleştirmemi sağlayan, çalışmalarım sırasında maddi ve manevi açıdan bana her zaman destek olan babam Mahmut GÜNEŞ'e annem Fatma GÜNEŞ'e ve kardeşlerim Sümeyra ve Enes GÜNEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından TF15-14 proje numarası ile desteklenmiştir. Yüksek lisans çalışmamı maddi yönden destekleyen Ordu Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
ÇİZELGELER LİSTESİ	X
SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanımları.....	4
2.2. Gıda Etiketleme	5
2.3. Gıda Katkı Maddeleri Konusunda Türkiye'deki Uygulamalar	5
2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	5
2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi	6
2.6. Gıda Boyaları ve Güvenilirlikleri	7
2.7. Tartrazin	9
2.7.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler	9
2.7.2. Tartrazin'in Kullanım Alanları	11
2.7.3. Tartrazin'in Metabolizması.....	11
2.7.4. Tartrazin'in Toksikolojik Etkileri	12
2.8. Genetik Toksikoloji	13
2.8.1. Genetik Toksikite Testleri.....	15
2.8.2. Genetik Toksikolojide Memeli Hücre Kültürleri	15
2.8.2.1. <i>In vitro</i> Kromozom Anormallikleri (KA) Testi	16
2.8.2.2. <i>In vitro</i> Mikronukleus (MN) Testi.....	17
2.9. Tartrazin İle Yapılan Genotoksikite Çalışmaları	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	23
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.1.1. Tartrazin	23
3.1.1.2. Saf Su	24
3.1.1.3. Kromozom Medyumu	24
3.1.1.4. Mitomisin C (MMC)	24
3.1.1.5. Sitokalsin B.....	25
3.1.1.6. Kolsemid (Kolşisin).....	25

3.1.1.7. Hipotonik Eriyik.....	26
3.1.1.8. Fiksatif.....	26
3.1.1.9. Sorensen Tamponu	26
3.1.1.10. Giemsa	26
3.1.1.11. Entellan	26
3.1.1.12. Siklofosfamid (CP- cyclophosphamid monohidrat).....	27
3.1.1.13. Standart Memeli Karaciğer Fraksiyonu (S9 karışımı)	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.1.2.1. Hassas Terazi.....	28
3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini	28
3.1.2.3. İnkübatör.....	28
3.1.2.4. Santrifüj.....	28
3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı	28
3.1.2.6. Mikroskop.....	28
3.2. Deneylerde Kullanılacak Tartrazin Dozlarının Belirlenmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	29
3.2.1. Tartrazin Dozlarının Belirlenmesi	29
3.2.2. Oluşturulan Deney Grupları	29
3.3. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürlerinin Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Analizi	30
3.3.1. S9 Karışımı İlave Edilmeyen KA Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	30
3.3.2. S9 Karışımı İlave Edilen KA Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	31
3.3.3. KA Preparatlarının Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	32
3.3.4. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme	32
3.3.5. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması	32
3.3.5.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	32
3.3.5.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	32
3.4. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Analizi	34
3.4.1. S9 Karışımı İlave Edilmeyen MN Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	34
3.4.2. S9 Karışımı İlave Edilen MN Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	35
3.4.3. MN Preparatlarının Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	35
3.4.4. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme	36
3.4.5. MN Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması	36
3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	38

4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1.	Tartrazinin İnsan Periferik Lenfositlerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri	39
4.1.1.	Tartrazinin Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	39
4.1.2.	Tartrazinin Kromozom Anormallikleri (KA) ve Anormal Hücre Ortalaması (AHO) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	40
4.1.3.	Tartrazinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	49
4.1.4.	Tartrazin Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak MI ve NBI Arasındaki İlişki.....	51
4.1.5.	Tartrazinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	52
4.1.6.	Tartrazin Dozlarına Bağlı Olarak KA ve MN Arasındaki İlişki.....	57
4.1.7.	Tartrazinin Sitotoksikite ve Genotoksikitesinin S9 Karışımının Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Çalışmalarla Bu Çalışmanın Sonuçlarının Tartışılması.....	58
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	64
6.	KAYNAKLAR	66
	ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Genotoksinlerin ortaya çıkardığı hücrel hasarlar ve sonuçları.....	14
Şekil 3.1.	Normal metafaz plağı (X1000).....	33
Şekil 3.2.	Binükleat hücre (a) ve bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (b) (X400)..	37
Şekil 3.3.	Mononükleat (a), binükleat (b), trinükleat (c) ve tetranükleat hücreler (d) (X400)	38
Şekil 4.1.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	39
Şekil 4.2.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	40
Şekil 4.3.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	41
Şekil 4.4.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	42
Şekil 4.5.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	43
Şekil 4.6.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	43
Şekil 4.7.	Kromatid kırığı X1000 (2500 µg/ml tartrazin).....	44
Şekil 4.8.	Kromozom kırığı X1000 (1250 µg/ml tartrazin).....	44
Şekil 4.9.	Fragment X1000 (625 µg/ml tartrazin)	45
Şekil 4.10.	Kardeş kromatid birleşmesi X1000 (625 µg/ml tartrazin).....	45
Şekil 4.11.	Disentrik kromozom X1000 (1250 µg/ml tartrazin)	46
Şekil 4.12.	Poliploidi X1000 (1250 µg/ml tartrazin).....	46
Şekil 4.13.	Endoreduplikasyon X1000 (2500 µg/ml tartrazin).....	47
Şekil 4.14.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	49
Şekil 4.15.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	50
Şekil 4.16.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen konsantrasyonları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı..	51
Şekil 4.17.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	52
Şekil 4.18.	Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	53
Şekil 4.19.	Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	54
Şekil 4.20.	Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (625 µg/ml tartrazin) X400.....	55

- Şekil 4.21.** Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (2500 µg/ml tartrazin) X400.....55
- Şekil 4.22.** Tartrazin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MN ve % KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı57
- Şekil 4.23.** Tartrazin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MN ve % KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....58



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Renk maddesi olarak kullanılan bazı boya maddelerinin sağlık üzerine etkisi	8
Çizelge 2.2. Tartrazinin kullanıldığı gıda maddeleri ve içerdikleri tartazin miktarları	10
Çizelge 4.1. Metabolik aktivatör (S9 karışımı) bulunan ve bulunmayan ortamda farklı dozlarda tartrazin ile muamele edilmiş insan periferal lenfosit hücre kültürlerindeki mitotik indeks (MI), kromozom anormallikleri (KA) ve anormal hücre ortalaması (AHO) değerleri.....	48
Çizelge 4.2. Metabolik aktivatör (S9 karışımı) bulunan ve bulunmayan ortamda farklı dozlarda tartrazin ile muamele edilmiş insan periferal lenfosit hücre kültürlerinde binükleat hücreler (BN), mikronükleus (MN) yüzdesi ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri.....	56

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
AHO	: Anormal Hücre Ortlaması
Ames Testi	: Salmonella/Mikrozom Mutajenite Testi
BN	: Binükleat Hücre
CP	: Siklofosfamid (cyclophosphamid monohydrat)
Cyt-B	: Cytochalasin-B (Sitokalasin-B)
DC	: Disentrik
dk	: Dakika
DS	: Distile su (Negatif /Çözücü Kontrol)
EC kodu	: Gıda renklendiricileri için uluslararası renk kod numarası
ERD	: Endoreduplikasyon
F	: Fragment
FAO	: Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi)
GKM	: Gıda Katkı Maddesi
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
JECFA	: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi)
K'	: Kromatit Kırığı
K''	: Kromozom Kırığı
KA	: Kromozom Anormallikleri
KD	: Kromatid Değişimi
kg	: Kilogram
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
MI	: Mitotik İndeks
ml	: Mililitre
MMC	: Mitomisin C
MN	: Mikronükleus

MNBN	: Mikronükleuslu Binükleat Hücre
MÖ	: Milattan Önce
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
NDI	: Nuclear Division Index
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü)
P	: Poliploidi
PHA-M	: Fitohemaglutinin M
PSA	: Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
S9 karışımı	: Memeli Karaciğer Fraksiyonu Karışımı
TRZ	: Tartrazin
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Beslenme alışkanlıklarımız, eskiye göre kıyasladığımızda hatta her geçen yıl değişmektedir. Pratik oldukları ve çekici görünmeleri nedeniyle hazır yiyeceklere olan talep giderek artmaktadır (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003). Buna bağlı olarak da gıdaların uzun süre bozulmadan saklanabilmesi daha çok önem kazanmıştır.

Gıda katkı maddeleri (GKM), besinlerin hazırlanması sırasında besinlere eklenen fakat normalde besinin kendi içeriğinde bulunmayan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Gıdalara katılan kimyasal maddeler; mikrobiyolojik bozulmayı önleme, dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma ve renk, görünüş, lezzet ve koku gibi duyuşsal özellikleri düzeltme gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Yılmaz, 2008). Gıdalara istenilerek kimyasal madde eklenmesi ile ilgili tarihsel gelişmelere bakıldığında M.Ö. 3500 yıllarına kadar dayandığı görülmektedir. M.Ö. 3000 yıllarında tuzun, M.Ö. 900 yıllarında ise hem tuzlama hem de tütsülemenin besinlerin saklanması için kullanıldığı görülmektedir. Benzer şekilde, ortaçağda da etler tuzlama, tütsüleme ve nitrat ilavesi gibi yöntemler kullanılarak muhafaza edilmeye çalışılmıştır (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Besin ve sağlık hizmetlerindeki gelişmeler ve yenilikler, ortaya çıkan pek çok sorunu ortadan kaldırmasına rağmen yeni sorunların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Gelişen teknolojinin getirdiği yeni üretim teknikleri ve tüketici beğenisinin çeşitlilik kazanması, GKM'nin kullanımlarının her geçen gün artmasına yol açmıştır. GKM'nin tarihsel gelişimi, gelişen teknolojiyle birlikte yeni gıda saklama yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç ve tüketicinin gözünde gıdanın daha kaliteli algılanması etkileriyle şekillenmiştir (Altuğ, 2001; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Teknolojinin ilerlemesine paralel olarak maruz kalınan yapay kimyasal maddelerin sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Bu kimyasal maddelerin bir kısmının da mutajenik ve kanserojenik olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır (Öncül, 2009). GKM'lerin vücuda sürekli alınmaları halinde doğurabilecekleri tehlikeler de halk sağlığı açısından oldukça önemlidir (Saldamlı, 1985; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003). Çünkü GKM'lere doğumdan ölüme kadar maruz kalınabilmektedir. GKM'lerin kontrollerinin yetersiz olduğu ülkelerde ve hem üretici hem de

tüketicilerin bilinçsiz olduğu toplumlarda tehlike daha büyük olmaktadır (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003). Bundan dolayı hem uluslararası hem de ulusal sağlık otoriteleri, son derece yoğun ve dikkatli çalışmalar yaparak GKM'lerin kullanımına izin vermelidir. Çünkü GKM'ler, insan sağlığının korunması bakımından en sıkı denetim altında tutulması gereken kimyasal madde gruplarından (Kırca-Ekinci, 2011).

GKM ile ilgili ilk sistematik araştırma 1956'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması şeklinde gerçekleştirilmiştir. 1962'de FAO ve WHO, konusunda uzman olan araştırmacıları bir araya getirerek Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesini (JECFA) oluşturmuşlardır. JECFA; katkı maddesi olarak kullanılan her kimyasal madde için toksikolojik çalışmaların düzenlenmesini, yürütülmesini ve sonuçlarının değerlendirmelerini üstlenmiş tek uluslararası kurumdur. JECFA'nın uzman komisyonları periyodik toplantılar düzenleyerek; GKM'nin toksikolojik açıdan değerlendirmeleri için metodolojileri belirlemek, GKM'lerin saflık kriterlerini ve analiz yöntemlerini tespit etmek, GKM'nin vücuda alınabilecek dozlarını ve günlük-yıllık tüketim düzeylerini belirleyerek değerlendirmek gibi görevleri vardır (Kırca-Ekinci, 2011).

GKM'ler gelişigüzel ve tüzük dışı kullanıldıklarında, tüketicilerde toksik reaksiyonların görülmesine neden olabilmektedirler. Besin içeriğindeki bu maddelerin düşük miktarda kullanılsalar bile, zamanla vücutta birikip dokularda tahribata neden olabileceği ve bu nedenle insan sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit edebileceği belirtilmektedir. Bu riskler nedeniyle GKM'ler de dâhil pek çok maddenin mutajenik ve genotoksik etkilerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* testlerle araştırılması gerekmektedir (Yılmaz, 2008).

Gıdalara; renk kaybını engellemek, lezzet ve vitamin değerini korumak, çekici ve iştah açıcı hale getirmek için yüzyıllardır doğal ve sentetik boya maddeleri ilave edilmektedir. Sentetik gıda renklendiricileri ucuz, etkili ve stabil olduğu için doğal boyalar yerine kullanılmaktadır ve kullanımları her geçen gün artmaktadır (Revankar ve Lele, 2007). Ancak gıda boyaları olarak kullanılan maddeler, bazen istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarabilmektedir. Çeşitli genotoksisite

testleri ile yapılan bazı çalışmalar, bazı gıda boyalarının sitotoksik olduğunu ve DNA'da mutasyona yol açtığını göstermiştir. Son yıllarda hem gıda boyalarının hem de diğer katkı maddelerinin mutajenik ve genotoksik potansiyelleri hakkındaki endişeler artmıştır ve bu tür maddelerin mutasyonlara yol açarak insan için olası bir tehlike kaynağı olabilecekleri düşünülmektedir (Mpountoukas ve ark., 2010; Mahfouz ve Al-Shammrani, 2013).

Çeşitli kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan *in vitro* test yöntemlerinde, insan periferik lenfosit kültürleri oldukça sık kullanılmaktadır. Periferik kandaki beyaz kan hücrelerinden lenfositler kullanılarak, çeşitli kimyasalların genotoksik etkili olup olmadıkları çeşitli testler kullanılarak değerlendirilebilmektedir (Yılmaz, 2008).

Literatür taraması sonucu; tartrazinin mutajenite, genotoksisite ve karsinogenisitesi hakkında hem pozitif hem de negatif sonuçların elde edildiği görülmektedir (Himri ve ark., 2012; Kirkland ve ark., 2011; Gomez ve ark., 2013; Mehedi ve ark., 2013; dos Santos ve ark., 2014; Soares ve ark., 2015). Bu farklı sonuçlar nedeniyle, tartrazinin genotoksik potansiyeli hakkındaki çalışmaların sonuçlarının tartışmalı olduğu görülmektedir. Ayrıca, insan hücreleri üzerinde karaciğer fraksiyonu (S9 karışımı, metabolik aktivatör) kullanılarak yapılmış bir *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmadaki amacımız; yaygın olarak kullanılan bir gıda boyası olan tartrazinin, karaciğer fraksiyonu ya da metabolik aktivatör (S9 karışımı) eklenen ve eklenmeyen insan periferik kan lenfosit kültürlerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olup olmadığını *in vitro* mikronükleus (MN) ve kromozom anormallikleri (KA) testleri ile ortaya çıkarabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanımları

GKM'ler, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler” şeklinde tanımlanmaktadır (Kaya, 2005).

GKM'lerin kullanımlarında bazı genel koşullar vardır:

- GKM'lerin hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın insan sağlığına zarar vermemesi gerekmektedir.
- Kullanılan katkı maddesine ait analiz sonuçları ve kullanılma miktarları bilinmelidir.
- GKM'ler ilave edildikleri gıdanın besleyici değerine zarar vermemeli, besin değerini azaltmamalı ya da değiştirmemelidir.
- Gıdanın içindeki vitaminleri tahrip etmemeli ve besinlerin emilimini azaltmamalıdır.
- Gıdaya ilave edilen GKM'lerin özellikleri hakkında bilgiler bulunmalı ve bu konuda *in vivo* ve *in vitro* deneyler yapılmış olmalıdır. GKM'nin kantitatif analizini yapabilecek güvenilir analiz metotları bulunmalı ve bu analizleri yapacak kontrol hizmetlerini yürütecek kurumlar olmalıdır.
- Katkı maddesinin hangi gıdalara, ne miktarda ve hangi amaçla katılabileceği GKM kodeksinde belirtilmiş olmalıdır.
- Gıdaya belirtilen miktarlardan fazlası eklenmemesi gerekir ve üretimleri sırasında katkı maddesi kullanılan gıdalar sürekli denetlenmelidir.
- Katılan maddenin açık ismi ve miktarı gıdanın üzerindeki etikette belirtilmelidir.
- GKM'ler, gıdanın bozukluğunu maskeleyici ve tüketiciyi aldatıcı olmamalıdır.

- Bazı gıdalara özellikle çocuk mamalarına ve diyet gıdalara eklenmesi düşünülen katkı maddesinin, katılma koşulları ve miktarları özel izne tabi olmalıdır (Bağcı, 1997; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

2.2. Gıda Etiketleme

Hazır gıda paketleri üzerinde kullanım amaçlarına göre GKM'nin kategorileri, bunu izleyen özel adlar ve "E" numaraları ile belirtilir. Paketler üzerindeki E numaraları katkı maddeleri için pratik bir kodlama yöntemi olarak geliştirilmiştir (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003). Güvenilir GKM listesinde yer alan ve E kodunu taşıyan tüm katkı maddeleri toksikolojik açıdan güvenilir olarak düşünülmektedir (Saldamlı ve Uygun, 2005; Çukadar, 2014). Gıda boyalarının üzerinde özel isimlerinin ya da E numarasını taşıyan bir etiket bulunması, tüketicilerin daha bilinçli seçim yapmalarına yardımcı olmaktadır (Atlı, 2010; Çukadar, 2014).

2.3. Gıda Katkı Maddeleri Konusunda Türkiye'deki Uygulamalar

Halk sağlığı açısından düşünüldüğünde, her ülkede GKM'lerin kullanımlarını düzenleyen yasa ve yönetmeliklerin bulunması gereklidir. FAO ve WHO komitelerinin kriterlerine bağlı kalınarak, her ülkenin sağlık otoriteleri GKM'lerin ekleneceği gıdaları ve bu maddelerin gıdalara eklenme miktarlarını kendi ülkelerinin koşullarına göre belirlemektedirler. Ülkemizde gıdaya ilişkin hizmetler devlet tarafından yürütülmektedir ve gıda kontrolünden sorumlu ilgili kurumlar bünyesinde çeşitli yasa, tüzük, yönetmelik, genelge, çeşitli tebliğ ve standartlar mevcuttur (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

2.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Sağlık Üzerine Etkileri

GKM'lerin kötü kullanılmalarını ve oluşabilecek tehlikelerin önüne geçmek amacıyla kabul edilmiş çeşitli yasalar bulunmaktadır. GKM'lerin yasal bir şekilde gıdalara eklenebilmesi için tüm akut, kronik ve farmakolojik deneylerinin yapılmış olması zorunludur (Altuğ, 2001; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Bazı GKM'lerin canlı sistemler üzerine olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir. İnsanların bazı GKM'lere karşı duyarlı oldukları ve buna bağlı olarak reaksiyon gösterebildikleri belirtilmiştir (Goodman, 1990; Esin, 1999; Erden-Çalışır ve

Çalışkan, 2003). GKM'lerin sağlık üzerinde ortaya çıkarabilecekleri tüm olumsuz etkileri ortadan kaldırabilmek ya da minimuma indirmek için, aşağıda belirtilen noktalara dikkat edilmesi çok önemlidir:

- Üreticiler bilinçlendirilerek, üretimde kullanılması zorunlu olan katkı maddelerinin önerilenden fazla kullanması önlenmelidir.
- Tek yönlü beslenmeden kaçınılmalı, yeterli ve dengeli beslenme sağlanmalıdır.
- Günlük diyetin çok az bir bölümü hazır yemeklerden oluşmalı ve mümkünse hazır yemeklerden kaçınılmalıdır.
- Tüketiciler özellikle ergenlik çağındakiler, gebeler, emzikli kadınlar ve çocuklar GKM'ler ve zararları konusunda aydınlatılmalı ve sağlıklı gıdalarla beslenme, bilinçlendirilme ve korunma konularında bilinçlendirilmelidir.
- Tüketiciler gıdaları alırken içeriğine mutlaka dikkat etmelidirler.
- Üreticiler denetim altına alınmalı ve denetim mekanizması iyileştirilmelidir.
- Adresi ve üretim kalitesi belli olmayan maddeler tüketilmemelidir (Bağcı, 1997; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi

GKM'ler, insanların doğrudan ya da dolaylı olarak istekleri dışında maruz kaldıkları kimyasallar içinde önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle GKM'lerin kullanıma sunulmadan önce ulusal ve uluslararası birçok kuruluşun onayından geçmesi gerekmektedir (Yılmaz, 2008). GKM'ler alınan dozlara bağlı olarak toksikolojik etki gösterebilirler (Yurtagül ve Ayaz, 2008; Kırca-Ekinci, 2011). Kullanıma sunulacak olan GKM'nin deney hayvanlarında doza bağlı olarak ortaya çıkarabileceği olası etkilerin belirlenmesi, GKM'lerin kullanım izinlerinin verilmesinde ilk basamağı oluşturmaktadır (Yılmaz, 2008). Kronik toksisite/karsinojenite testleri, deney hayvanlarının ortalama yaşam süresinin % 70-80'nini kapsayacak süre boyunca, test edilecek kimyasal maddenin her gün deney hayvanına verilmesiyle gerçekleştirilir. Ayrıca maksimum miktarlarının belirlenmesi için, katkı maddesinin günlük alınabilecek miktarının da belirlenmesi gereklidir (Yılmaz, 2008; Yurtagül ve Ayaz, 2008; Kırca-Ekinci, 2011). Elde edilen toksisite sonuçları, hem uluslararası hem de ulusal kuruluşlarca oluşturulmuş olan bilimsel komiteler tarafından değerlendirilir. Herhangi bir GKM'nin hiçbir etkisinin gözlenmediği bir doz elde edilmezse, bu

maddenin kullanımına izin verilmez (Yılmaz, 2008). Ayrıca GKM'ler üzerinde yapılan çalışmalar süreklilik gerektirdiği için, eski bulgularda değişiklik olup olmadığını belirlemek ve yeni bulgular elde edebilmek açısından sürekli yeni değerlendirmelerin yapılması gerekmektedir (Yurttagül ve Ayaz, 2008; Kırca-Ekinci, 2011).

2.6. Gıda Boyaları ve Güvenilirlikleri

Renk katkı maddeleri ya da boyaları; bir gıdaya, ilaca, kozmetik ürüne, insan vücuduna uygulandığında veya ilave edildiğinde renk veren boya, pigment veya maddelere verilen isimdir. Gıda endüstrisinde kullanılan renklendiriciler ya da boyalar sentetik, bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilirler (Yırtıcı, 2007; Çukadar, 2014).

Renk, gıdaların çekiciliğinde ve tüketiciler tarafından kabul edilmesinde en önemli duyu kalite niteliğindedir. Gıdaların üretim ve depolanması sırasında ısı, ışık, pH, oksijen gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olarak ürün renginde renk kayıpları olabilmektedir. Bu sorunu önlemek, ürünün görünüşü düzeltmek, gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek, daha parlak renkler elde etmek için renklendirici maddeler yani boyalar kullanılmaktadır (Adams ve Langley, 1995; Kırca-Ekinci, 2011; Çukadar 2014).

Yasaların izin verdiği miktarlardan daha fazla fazla boyar madde içeren gıdaların tüketilmesi sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Gerekenden daha fazla miktarda boyar madde kullanmak yasal değildir. Buna rağmen izinsiz üretim yerlerinde, izin verilenden daha fazla ve özellikle yasal olmayan boyar maddeler kullanılabilir. Bu sebeple gıda üreticileri, ilgili kurumlar tarafından düzenli olarak denetlenmelidir (Şimşek, 2012; Çukadar, 2014).

Son yıllarda gıda boyalarının kullanımı, güvenilirlik nedeni ile azaltılmış olsa da, çeşitli sentetik gıda renklendiricileri hala dünyanın birçok yerinde ucuz ve etkili olduğu için doğal boyalar yerine kullanılmaktadır (Seyhan, 2006; Kırca-Ekinci, 2011). Birçok gıda boyası ise, laboratuvar hayvanları üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu için yasaklanmıştır (Kırca-Ekinci, 2011).

Gıda maddelerinde kullanılan bazı sentetik boyaların insanlar üzerinde yaptığı toksik etkiler, 1950 yılından sonra özellikle toksikoloji bilimindeki gelişmelere bağlı olarak dikkat çekmiş ve bu sentetik boyaların insan sağlığı açısından risk oluşturabileceği ileri sürülmüştür. Daha sonra sentetik gıda boyaları üzerinde kronik toksisite testlerinin yapılmasına başlamıştır (Radomski, 1974; Marmion, 1991; Yentür ve Karakaya, 1985; Kırca-Ekinci, 2011). Besinlere eklenmesine izin verilen renklendiriciler ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Bazı ülkeler ise besinlerde boya maddelerinin kullanımını yasaklamıştır (Goodman, 1990; Esin, 1999; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003). Çizelge 2.1’de çeşitli gıda boyalarının insanda yol açabildiği bazı sağlık sorunları gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Renk maddesi olarak kullanılan bazı boya maddelerinin sağlık üzerine etkisi (Bağcı, 1997; Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003)

KATKI MADDESİ	SAĞLIK SORUNU	İLAVESİNE İZİN VERİLEN BESİNLER
E 102 Tartrazin	Astım, deri döküntüleri, migren	Hazır jöle karışımları, içecek tozları, şekerlemeler, ithal edilen kek ve kurabiyeler, karides konservesi
E 110 Sunset Yellow	Astım, deri döküntüleri, hiperaktivite	İçecek tozları, çerezler, hazır jöle karışımlar Şekerleme, karides konservesi, aromalı bisküvi ve gofret kremaları
E 127 Eritrosin	Astım, deri döküntüleri, hiperaktivite	Aromalı pudigler ve sütler, bisküviler, gofret kremaları, şekerlemeler, içecek tozları, çerezler, hazır jöle karışımları
E 131 Paten Blue 5	Astım, deri döküntüleri, hiperaktivite	Şekerlemeler
E 132 İndigotin	Astım, deri döküntüleri	İçecek tozları, şekerlemeler, buzlu ürünler
E 150 Karamel	Bazı tipleri gen bozukluğuna neden olabilir. Vitamin B6 düzeyini düşürebilirler	Alkolsüz içecekler, soslar, aromalı süt, bisküvi ve pudingler, şekerlemeler, gofret kremaları, hazır çorbalıklar, hazır jöle karışımları, et suyu tabletleri, buzlu ürünler
E 124 Ponso 4R	Astım, deri döküntüleri, hiperaktivite	İçecek tozları, hazır jöle karışımları, şekerlemeler

Sentetik boyar maddelerin toksisite ve karsinojenik özellikleri incelendiğinde, her zaman güvenilir olmadıkları (Larsson, 1975; El-Saaday, 1991; Kırca-Ekinci, 2011) ve özellikle gıdalarda kullanılan boyar maddeler üzerinde yapılan çalışmalarda; bu bileşiklerin karsinojen potansiyele sahip olabilecekleri ileri sürülmüştür (Kırca-Ekinci, 2011). Tüm bu gelişmeler değerlendirildiğinde, gıda boyaları ile ilgili toksikolojik araştırmaların süreklilik göstermesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

2.7. Tartrazin

2.7.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler

Tartrazin (E102 veya FD&C Yellow 5); kimyasal adı, Trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfanato-fenil)-4-(4-sulfanatofenilazo)-H-prizol-3-karboksilat (sodyum tuzu) ve kimyasal formülü $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ olan bir bileşiktir (Akgün, 2002; Çukadar 2014). Tartrazin; pirazolin halkası içeren, monoazo yapıda, sertifikalı, sentetik bir boya maddesidir. Bu grupta yer alan boyalar, -N=N- grubu içerdiğinden azo boyası olarak da bilinirler. Azo boyaları içerisinde en çok kullanılan boyalardan olan tartrazin; turuncu-sarı renkte ve toz halinde bir boyadır. Suda kolaylıkla çözünebilir ve altın sarısı renkte çözeltiler oluşturur (Deshpande, 2002; Yırtıcı, 2007; Çukadar 2014). Tartrazin, oksaloasetik ester ile fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonu sonucu sentezlenir. Reaksiyon ürünü, diazot içeren sülfanilik asit ile birleştirildikten sonra oluşan ester, sodyum hidroksit ile hidroliz edilir. Sentezlenmenin bir diğer yolu ise, bir mol dihidroksitartarik asit ile iki mol fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonudur (Karaali ve Özçelik, 1993; Yırtıcı, 2007; Çukadar, 2014).

Tartrazinin günlük maksimum alınabileceği miktar, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA tarafından 5 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Ortalama 30 kg ağırlığındaki bir çocuk için bu değer 150 mg/gün doza denk gelmektedir (Kırca-Ekinci, 2011).

Türk Gıda Kodeksi'nin Renklendiriciler Yönetmeliğine göre tartrazinin Türkiye'de kullanılabileceği gıdalar ve bulunabileceği en yüksek miktarlar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Tartrazinin kullanıldığı gıda maddeleri ve içerdikleri tartazin miktarları (Yırtıcı, 2007)

Gıda Maddesi	En Yüksek Miktar
Bitter soda, bitter şarap	100 mg/l
Bezelye konservesi	100 mg/kg
Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
Meyve ve sebze sekerlemeleri	200 mg/kg
Şekerlemeler	300 mg/kg
Korunmuş kırmızı meyveler	200 mg/kg
Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
Hafif fırıncılık ürünleri	200 mg/kg
Yenilebilir buzlar	150 mg/kg
Aromalandırılmış islenmiş peynir	100 mg/kg
Aromalandırılmış süt ürünleri dahil tatlılar	150 mg/kg
Soslar	500 mg/kg
Hardal	300 mg/kg
Balıkların ve kabuklu su ürünlerinin ezmeleri	100 mg/kg
Ön pişirme yapılmış kabuklu su ürünleri	250 mg/kg
Somon balığı benzerleri	500 mg/kg
Balık yumurtası	300 mg/kg
Füme balık	100 mg/kg
Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200 mg/kg
Diğer çerezler	100 mg/kg
Kilo kontrolü amaçlı komple formüller	50 mg/l
Tıbbi kontrol altında kullanılan komple formüller ve ek gıdalar	50 mg/kg
Ek sıvı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	100 mg/l
Ek katı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	300 mg/kg
Çorbalar	50 mg/kg
Bitkisel protein bazlı et ve balık analogları	100 mg/kg
Alkollü içecekler	200 mg/l
Meyve şarapları	200 mg/l

2.7.2. Tartrazinin Kullanım Alanları

Dünyada pek çok ülkede kullanılan tartrazin, 1916 yılından beri Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok kullanılan ikinci gıda boyasıdır. Tartrazin; aromalı içecekler, konserveler, korunmuş meyveler, pastane mamulleri, süsleme ve kaplama maddeleri, tatlılar, soslar, hardal, cipsler, dondurma ve şekerlemeler, çerezler, evcil hayvan yiyecekleri ve daha birçok gıdanın yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Mpountoukas ve ark., 2010; Mahfouz ve Al-Shammrani, 2013). İçecekler, aromalı mısır cipsi, krema tozu, hazır çorbalar, soslar, pastacılık ürünleri, et ve süt ürünleri, jöleler, pudingler, dondurma, sakız, reçel gibi gıda ürünlerinde, boya kalemleri, sulu ecza çözeltileri, ilaç tabletleri, diş macunları, şampuan ve nemlendirici gibi kozmetik ürünlerinde en sık kullanılan renklendiricilerden biridir (Akgün, 2002; Atlı, 2010; Peltek, 2012; Çukadar, 2014). Yün, ipek, naylon, deri ve kâğıt boyamada, mürekkep hazırlanmasında, sabun ve plastik boyanmasında ve hayvan histolojisinde kontrast boya olarak da kullanılmaktadır (Seyhan, 2006; Çukadar, 2014).

2.7.3. Tartrazinin Metabolizması

Gıdalarla alınan tartrazinin sindirilmesinde rat, tavşan ve insanlardaki birincil mekanizma, bağırsak florasındaki bakteriyal azo redüksiyonudur. Yani ağız yolula alınan tartrazinin bağırsak florası tarafından metabolize edildiği doğrulanmıştır. Tartrazinin başlıca metabolizma ürünleri yani metabolitleri sülfanilik asit ve aminopirazolondur. Ratlar ve tavşanlar ile yapılan bir çalışmada, tartrazinin idrar ve safra yolu ile değişmeden atıldığı tespit edilmiştir (Jones ve ark., 1964; Elhkim ve ark., 2007; Yırtıcı, 2007; Poul ve ark., 2009; Kırca-Ekinci, 2011; Himri ve ark., 2012; Soares ve ark., 2015; Bezerra ve ark., 2016).

Tartrazin gibi azo boyalarının mutajenik, karsinojenik ve toksik etkilerinin, boyanın metabolizması sırasında azo bağının indirgeyici biyotransformasyonun dolaylı veya doğrudan etkisi sonucu olabileceği ileri sürülmektedir (Demirkol ve ark., 2012; Soares ve ark., 2015). Oral yolla vücuda giren azo boyalar, bağırsak mikroorganizmaları tarafından azoredüktaz enzimleri kullanılarak metabolize edilerek aromatik aminler oluşur. Bir nitro azo boyası nitroredüktaz enzimleri ile metabolize edilir (Demirkol ve ark., 2012). Karaciğerdeki azo redüktaz enzimi de

azo bağlarının ayrılmasını katalize edebilir (Soares ve ark., 2015). Tartrazinin büyük bir kısmı kolayca bağırsak florası tarafından kolonda metabolize edilir. Bakteriler tarafından salınan elektron taşıyıcıları varlığı ve kolondaki anaerobik koşullar, tartrazinin sülfanilik asit (yüksek duyarlı olan bir aromatik amin) ve aminopirazolon olarak iki metabolite indirgenmesine neden olur. Tartrazin ve metabolitleri çoğunlukla dışkı ile atılmasına rağmen az miktarda da geri emilebilir (Elhkim ve ark., 2007; Poul ve ark., 2009; Himri ve ark., 2012; Soares ve ark., 2015; Bezerra ve ark., 2016). Bu metabolitler interfaz boyunca hücre döngüsünde ve rejeneratif hiperplazi sürecinde hücreleri değiştirme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle kanser gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunabilir (Bezerra ve ark., 2016). Tartrazin metabolizmasında intestinal mikrobiyal flora önemli bir rol oynamasına rağmen, karaciğerde bulunan diğer enzimler de azo bağlarını kırabilir ve nitro gruplarını azaltabilir. Hem bağırsak hem de karaciğerdeki reaksiyonlar sonucunda, eğer azo boyalar tamamen aromatik aminlere indirgenirse, bu aromatik aminler daha sonra P450 enzimleri ile N-hidroksi türevlerine okside edilir (Demirkol ve ark., 2012). Bu nedenle, azo bağlarını kıran karaciğer enzimleri de azo boyalarının metabolizmasında rol oynar.

2.7.4. Tartrazinin Toksikolojik Etkileri

Çeşitli klinik koşullarda etkisi incelenen tartrazinin toksik veya patolojik bir etkisinin olmadığı ya da tümör oluşumu için herhangi bir risk oluşturmadığı belirtilmesine rağmen, yapılan bazı çalışmalarda, tartrazinin kullanılması ile daha çok astım, çocuklukta hiperaktivite ve ürtiker (deride kaşınma ve yanma), egzama, migren, damar ödemlerinin ortaya çıktığı belirtilmiştir. İçme suyuna belli oranlarda konularak tartrazin verilen ratlarda vücut ağırlığında, timus ağırlığında, kırmızı kan hücrelerinde ve hemoglobin miktarında azalmalar gözlenmiştir (Yırtıcı, 2007; Çukadar, 2014).

Yapılan klinik çalışmalarda tartrazin gibi azo grubu boyaların özellikle çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu, astımlı ve aspirine duyarlı bireylerde istenmeyen reaksiyonlar (migren, deride kızarıklıklar ve kabarmalar, nezle, bulanık görme, öğrenme güçlüğü) meydana getirdikleri saptanmıştır (Monoret-Vautrin, 1986; Çukadar, 2014). Tartrazin duyarlılığının mekanizması tam olarak bilinmemesine

rapmen, bu tip reaksiyonlara tartrazinin metabolitlerinin neden olabileceği düşünülmektedir. Çünkü tartrazin, redüktazlara sahip bağırsak florasındaki bakteriler tarafından metabolize edilmektedir. Bunlara ek olarak çocuklarda detoksifikasyon sürecinin daha yavaş gerçekleşmesi de bu sonuca yol açabilmektedir (Çukadar, 2014).

Tartrazinin; nörodavranışsal toksisite, anksiyete, migren, klinik depresyon, bulanık görme, kaşıntı, halsizlik, sıcak basması, boğulma hissi, deride lekeler ve uyku bozukluğu gibi pek çok immünolojik tepkilerin ortaya çıkmasına da neden olabileceği belirtilmiştir (Miller, 1982; Park ve ark., 2009). Amin ve ark. (2010), tartrazinin düşük dozlarda dahi karaciğer ve böbrek gibi hayati organları etkileyerek bazı biyokimyasal parametreleri değiştirebileceği ifade etmişlerdir. Astım ataklarına yol açan alerji, hücrel hasar ve aspirin ve ventolin gibi yaygın kullanılan ilaç ürünleri ile tartrazinin etkileşimini gösteren çalışmalar, bazı ülkelerde tartrazin kullanımının yasaklanmasına yol açmıştır (Mahfouz ve Al-Shamrani, 2013). Mervat ve Heba (2011), ratlarla yaptıkları çalışmada, tartrazin ile hiperaktivite, anksiyete ve depresyon benzeri davranışlar arasında doğrudan bir ilişki olduğunu belirtmişler ve halk sağlığı üzerinde tartrazinin tehlikeli etkileri olabileceğine işaret etmişlerdir.

2.8. Genetik Toksikoloji

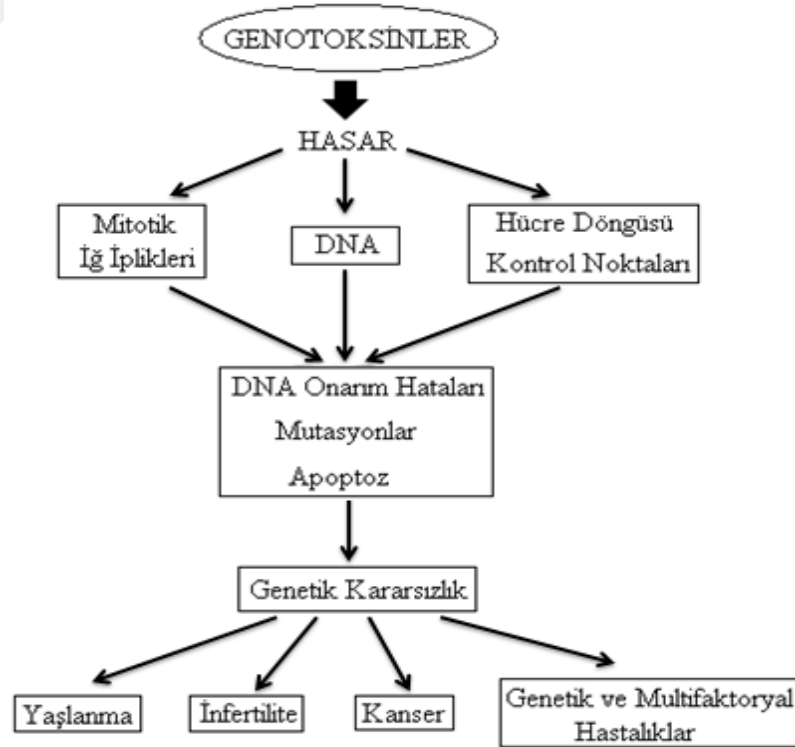
Genetik toksisite; genotoksinlerin DNA ve kromozom yapısında meydana getirdiği hasarları kapsayan bir terimdir. Bu hasarlar genellikle gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, DNA zincir kırıkları, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, klastojenite ve anöploididir. Bu tip genetik hasarlar; doğum defektleri, kanser, yaşlanma, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabildiğinden dolayı, mutajen ve karsinogenlerin tanımlanması ve risklerinin en düşük seviyeye indirilebilmesi halk sağlığının korunması için önemlidir (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimler ile etkileşime giren ve mutasyona neden olan maddelere genotoksik maddeler adı verilmektedir. Genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol

açmasına ise genotoksik etki denilmektedir (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Konaş, 2012).

Toksikolojinin özelleşmiş bir alt dalı olan genetik toksikoloji; organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında ya da kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak DNA’da oluşan değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Vural, 2005; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genotoksik maddeler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterebilirler (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Yırtıcı, 2007). Genotoksinlerin yol açtığı DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar; doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabilir (Şekil 2.1) (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).



Şekil 2.1. Genotoksinlerin ortaya çıkardığı hücresel hasarlar ve sonuçları (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011)

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişkinin incelendiği araştırmalar, insanlar için genotoksik olan çoęu bileşiğın aynı zamanda karsinojen olduğunu göstermiştir. Çeřitli mutasyonlara yol ačan bazı genotoksik maddeler; tümör baskılayıcı genlerin etkisiz hale getirilmesine ve protoonkogenlerin etkinleştirilmesine neden olan yeni mutasyonlara yol aarak karsinogenez olayına hizmet etmektedir (Yırtıcı, 2007; Konař, 2012).

Kimyasal maddelerin mutajenik ve genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında güçlü bir ilişkinin olması, genotoksisite testlerinin kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu ortaya çıkarmıştır (Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Konaş, 2012).

2.8.1. Genetik Toksisite Testleri

Genotoksisite testleri; temel olarak kanserin tanı ve tedavisinde, fiziksel ve kimyasal ajanların etkilerinin araştırılmasında, ilaçların veya diğer kimyasalların piyasaya sürülmeden önce toksikolojik açıdan güvenilirliklerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan biyoizlem testleridir. Bu testler, çeşitli bileşiklerin DNA molekülünde hasara yol aayıp aamadığını ortaya çıkarabilmek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. Bu testlerin kullanımlarının yaygınlaşması sayesinde, bir bireyin herhangi bir kimyasal ajana vereceği genetik cevap önceden belirlenebilir, kanser gibi hastalıklar klinik belirti vermeden taranarak yatkın bireyler belirlenebilir ve gerekli önlemler alınabilir (Choy, 2001; Bedir ve ark., 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Konaş, 2012).

2.8.2. Genetik Toksikolojide Memeli Hücre Kültürleri

Pek çok çalışmada, genotoksik etkinin belirlenmesinde tek bir testin tek başına yeterli olmayacağı, bir maddenin genotoksik ve ya mutajenik aktivitesinin tespit edilebilmesi için birden çok test sisteminin kullanılmasının gerekliliği belirtilmiştir (Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Konaş, 2012). Son yıllarda, genetik toksikoloji araştırmaları için fare kullanımından vazgeçilmiş ve hücre kültürü ile yapılan çalışmalara yoğunluk verilmiştir. Başta ilaçlar olmak üzere, yeni geliştirilen ve günlük hayatta yaygın

olarak maruz kalınan kimyasal maddelerin, insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testlerinin önemi çok büyüktür. İnsan hücre kültürleri kullanılarak ilaçların ve kimyasal maddelerin doğrudan insan üzerindeki genotoksik etkileri araştırılabilir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, insan kanser hücre kültürleri üzerinde yapılan araştırmalardan alınan sonuçların daha gerçekçi olduğunu belirtmektedir (Zoli ve ark., 1995; Banerjee ve ark., 1997; Davila ve ark., 1998; Robinson ve ark., 2002; Saygı, 2003; Börçek-Kasurka, 2010; Kontaş, 2012). Toksikolojik çalışmalarda insan hücre kültürlerinin kullanılması; tür farklılığını ortadan kaldırması, kimyasal maddelerin olası toksik etki yapacağı düşünülen spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlaması ve toksisite mekanizmalarının doğrudan hücreler üzerinde araştırılmasına olanak sağlaması gibi pek çok avantaja sahiptir (Saygı, 2003; Börçek-Kasurka, 2010; Kontaş, 2012).

Genotoksik hasarın ölçülmesi ve bu sayede kimyasal maddelerin karsinojenik potansiyeleri hakkında bilgi sahibi olunması amacıyla geniş ölçüde kullanılan *in vitro* genotoksisite testleri; Salmonella/mikrozom (Ames) testi, kromozom anormallikleri (KA) testi, mikronukleus (MN) testi, kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, fare lenfoma testi ve comet testidir. Çalışmamızda bu testlerden *in vitro* KA ve MN testleri kullanıldığı için, bu testler hakkında kısa bilgiler verilecektir.

2.8.2.1. *In vitro* Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

In vitro KA testi, test bileşikleri tarafından indüklenen yapısal ve sayısal KA'ların belirlenerek genotoksik riskin saptanması için sıklıkla kullanılan hassas bir yöntemdir. KA, DNA düzeyindeki zararın sonucu olarak ortaya çıkmaktadır ve genetik materyalde oluşan bu hasarlar tamir edilemediğinde; rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir. KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzerlik gösterdiği, özellikle lenfositlerde görülen anormallik seviyesinin kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini yansıtabildiği ve bu nedenle kanser riskini önceden gösterebildiği belirtilmiştir (Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006; Yavuz-Kocaman, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012). *In vitro* KA testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, genellikle periferik kan lenfositlerinden oluşan hücre kültürleri hazırlanır. Kültürler

inkübasyonun belirli zamanlarında test bileşiğine maruz bırakılır. Kültürü yapılan hücrelerden daha önceden belirlenmiş olan protokollere uygun olarak metafaz preparatları hazırlanır ve mikroskop altında yapısal ve sayısal KA yönünden incelenir (Choy, 2001; Börçek-Kasurka, 2010; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012). Periferik kan lenfositlerinde yapılan sitogenetik testlerle genetik materyalin hasar gördüğü gösterildiği zaman, sonuçlar populasyon düzeyinde risk hesaplamada da kullanılabilir. Populasyonda artan KA frekansı, kanser riskinin artışının bir işareti olarak dikkate alınır (Yırtıcı, 2007; Kontaş, 2012).

2.8.2.2. *In vitro* Mikronukleus (MN) Testi

Mikronukleuslar (MN), mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alırlar. Kromozom ya da kromatid kırıklarından ve kromozom ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı oluşan nükleusun dışında rastlanan oluşumlardır (Börçek-Kasurka, 2010; Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012). MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu genomik kararsızlığın göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle MN testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN artışının, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Börçek-Kasurka, 2010; Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012).

Bu test mitoz bölünme ile oluşan hemen hemen tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmektedir. Sitogenetik harabiyetin tespitinde, KA testine göre daha kolay uygulanabilmesi, kısa sürede daha fazla hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajlarından dolayı yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Börçek-Kasurka, 2010; Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011). *In vitro* MN testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, periferik kan lenfositlerini içeren hücre kültürleri inkübasyona bırakılır ve kültürle ilgili belirli zamanlarında test bileşiği ilave edilir. Kültürün yaklaşık 44. saatte sitokinezi engellemek ve binükleer hücre elde etmek amacıyla kültürle ilgili belirli miktarda sitokalin-B eklenir. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde sonlandırılır ve preparatlar hazırlanarak sitokinezi

bloklanmış binükleer hücreler mikronükleus yönünden incelenir (Börçek-Kasurka, 2010; Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011). Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde MN frekansını saptayan ve sitokalsin-B ile sitokinezin bloklanması dayanan bu metodun gelişmesiyle MN testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. Bu nedenle MN testi; fiziksel ve kimyasal maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılması, kanser riskinin tahmin edilmesi ve kanserin izlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir biyoizlem testi olarak düşünülmektedir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011; Konaş, 2012).

2.9. Tartrazin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gıdalarda kullanılan bazı boyar maddelerin DNA hasarına neden olabileceği ve bu nedenle de genotoksik oldukları ileri sürülmektedir (Sarıkaya ve Çakır, 2005; Poul ve ark., 2009; Hassan, 2010; Swaroop ve ark., 2011; Sarıkaya ve ark., 2012; Demirkol ve ark., 2012; Soares ve ark., 2015). Sentetik boyaların, azo fonksiyonel grupları ve aromatik halka yapıları içerdiğinden dolayı insan sağlığına zararlı oldukları öne sürülmektedir. Tartrazin de bir mono azo pirazolon boyasıdır (Kashanian ve Zeidali, 2011). Tartrazinin DNA ile etkileşime girebildiği, serbest radikallerin oluşumu ile oksidatif strese neden olabileceği, DNA hasarına ve bazı memeli hücrelerinde KA oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir (Poul ve ark., 2009; Mpountoukas ve ark., 2010; Kashanian ve Zeidali, 2011). Tartrazinin aynı zamanda mutajenik süreci uyarabileceği ve hücre canlılığını azaltabileceği ileri sürülmüştür (Demirkol ve ark., 2012).

Patterson ve Butler, (1982), tartrazinin Hint muncağı'nın (*Muntiacus muntjak*) fibroblast hücrelerinde KA'ların oluşumunu artırdığını ve memeliler için mutajenik olduğunu ifade etmişlerdir.

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

Salmonella typhimurium ve *Escherichia coli*'de yapılan *in vitro* çalışmalar sonucu, tartrazinin yol açtığı herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanmadığını rapor

edilmiştir (Karpliuk ve ark., 1984; Henschler ve Wild, 1985; Pollastrini ve ark., 1990; İzbirak ve ark., 1990).

Giri ve ark., (1990), diyet ile kısa süreli veya sürekli yüksek dozlarda tartrazine maruz bırakılmış fare ve sıçanların kemik iliği hücrelerinde KKD ve KA frekanslarında önemli bir artış gözlemlendiğini belirtmiştir.

İçlerinde tartrazinin de bulunduğu, gıda boyası olarak kullanılan dört farklı azo boyasının mutajenitesinin geniş ölçüde araştırıldığı bir çalışmada, bu azo boyalarının mutajenik aktivite göstermediği gözlenmiştir (İzbirak ve ark., 1990).

Durnev ve ark., (1995), tartrazin dahil olmak üzere altı gıda boyasının *in vivo* mutajenik etkisini araştırmıştır. Gıda boyaları farelere günlük 0.5 ve 5 mg/kg dozlarda beş gün süreyle verilmiştir. Her uygulama ve kontrol grubundaki hayvanların kemik iliği hücrelerinden hazırlanan 100 metafaz plağı incelenmiştir. Beş günlük uygulamadan sonra kontrol grubu ile kıyaslandığında, tartrazin uygulanan hayvanlardaki KA frekansının artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar, tartrazinin fare kemik iliği hücrelerinde KA oluşumunda artışa neden olmadığını bildirmiştir.

Farag ve ark., (2001), günlük 68 mg/kg tartrazinin ağızdan uygulandığı gebe farelerde anne ve embriyodaki sitogenetik değişiklikleri değerlendirmiştir. Gözlemler sonucunda tartrazin uygulanan hayvanlardaki KA oluşumunda artış ve mitotik indekste (MI) azalma tespit edilmiştir.

Sasaki ve ark., (2002), gıda katkı maddesi olarak kullanılmakta olan 39 kimyasalın genotoksitesini comet testi kullanarak araştırmışlardır. Comet testi sonuçlarına göre, tartrazine akut oral maruziyet sonrasında mide, kolon ve mesanede doza bağlı olarak DNA hasarının arttığı belirtilmiştir.

Das ve Mukherejee, (2004), metabolik aktivatör olmadan *S. typhimurium* suşlarında ve *in vivo* fare kemik iliği deneyinde tartrazinin mutajenik ve genotoksik etkilerini incelemiştir. Tartrazinin Ames testinde *S. typhimurium* suşlarında mutajenik olmadığı ve fare kemik iliği hücrelerinde KA frekansını önemli ölçüde artırmadığı için genotoksik olmadığı belirtilmiştir.

Yırtıcı, (2007), yaptığı çalışmada, *Cyprinus carpio*'nun eritrositlerinde tartrazinin genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığı eritrosit MN testi kullanılarak araştırılmıştır. Balıklar 24, 48 ve 72 saat boyunca 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L dozlarında tartrazine maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında MN frekansının hem doza hem de zamana bağlı olarak önemli bir artış gösterdiği bulunmuştur. Böylece, bu türde tartrazinin genotoksisiteyi uyardığı gösterilmiştir.

Poul ve ark., (2009), yaptıkları bir araştırmada, farelere 24 saat aralıklarla günde iki kez ağızdan besleme yoluyla tartrazin uygulanmıştır. Tartrazinin 2000 mg/kg doza kadar MN oluşumunu önemli ölçüde uyarmadığı ve genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. Ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm dozlarda mitotik hücreleri artırdığı gözlenmiştir.

Öncül, (2009), yaptığı çalışmaya göre; içerisinde tartrazinin de olduğu 5 farklı gıda boyasının mutajenik potansiyelleri Salmonella/mikrozom test sistemi ve β Galaktozidaz enzim aktivitesi değişimi ile araştırılmıştır. Salmonella/mikrozom test sisteminde *S. typhimurium* TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmıştır. S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda deneyler tekrar edilmiştir. S9 fraksiyonu yokluğunda tartrazinde mutajenik aktivite gözlenmemiştir. Fare karaciğer enzimleri varlığında deneyler tekrarlandığında tartrazinin mutajenik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Hassan, (2010), sentetik gıda boyası olan tartrazinin fareler üzerinde genotoksik etkilerini araştırmıştır. Fareler günlük 7.5 ve 15 mg/kg dozlarındaki tartrazin ile oral yolla beslenmiştir. Comet testi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre, tartrazinin karaciğer ve böbrek hücrelerinde DNA hasarına neden olduğunu ortaya konulmuştur. Ayrıca tartrazinin, doz artışına bağlı olarak kemik iliği hücrelerinde KA oluşumunu artırdığı da tespit edilmiştir.

Mpountoukas ve ark., (2010), 4 ve 8 mM konsantrasyonlarda tartrazinin insan periferik lenfositlerinde muhtemelen mitozda kromozomların paketlenmesini etkileyerek kromozomların kalitesi üzerine toksik etkiye yol açtığını belirtmişlerdir. Ayrıca tartrazinin DNA'ya bağlanabildiğini de belirtmişlerdir.

Tartrazinin *in vitro* KA ve *in vivo* kromozom kırıklarını artırdığı, ancak Ames testi, fare lenfoma testi ve *in vivo* MN testi sonuçları negatif sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (Kirkland ve ark., 2011).

Kashanian ve Zeidali, (2011), yaptıkları çalışmada; pH 7.4'e 10 mM Tris-HCl'nin sulu çözeltisi içinde tartrazinin doğal dana timüs DNA'sı üzerindeki etkileşimi incelenmiştir. Tartrazinin DNA ile etkileşime girerek ($3.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ bağlanma sabiti ile) serbest radikallerin oluşumu ile oksidatif stresi indüklediği sonucuna varılmıştır.

Swaroop ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada; Hindistan'da izinli kullanılan bazı sentetik gıda renklendiricilerinin genotoksisitesi değerlendirilmiştir. Tartrazini de kapsayan 8 sentetik gıda boyası ve bunların kombinasyonlarının izin verilen dozlarda bile insan lenfositleri için genotoksik olabildiği ileri sürülmüştür. Bu çalışma, gelişmiş ülkelerde uygulanan gıda renklendiricilerinin kabul edilebilir günlük alım miktarlarının ve izin sınırının yeniden tanımlanması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Himri ve ark., (2012), yaptıkları çalışmada; kan hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda tartrazinin genotoksik etkisi, alkalik jel elektroforezi (comet testi) kullanılarak incelenmiştir. Kan hücreleri 1 saat boyunca 3-25 mM tartrazin dozlarıyla ön muamele edilmiştir. Sonuçlar, tartrazinin kan hücreleri üzerinde genotoksik olabileceğini göstermiştir.

Gomes ve ark., (2013), yaptıkları çalışmada; içerisinde tartrazinin de bulunduğu üç farklı gıda boyası kullanılmış ve bu boyaların 0.4 ve 4.0 ml dozları, 24 ve 48 saat boyunca *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerine uygulanmıştır. MI değerinin hesaplanması amacıyla her doz için toplam 5000 hücre değerlendirilmiş ve sonuçlar bu boyaların sitotoksik olduğunu göstermiştir.

Mahfouz ve Al-Shammrani, (2013), tartrazinin mısır bitkisinde (*Allium cepa* L.) MI'yi düşürdüğü, pek çok mitotik anormalliğin oluşumuna yol açtığı ve hücrel DNA ve RNA miktarlarını azalttığını ifade etmişlerdir.

Ultraviyole uyarısı sonrasında, tartrazinin Ames testinde mutajenik aktivite göstermediği ifade edilmiştir (dos Santos ve ark., 2014).

Soares ve ark., (2015), *in vitro* yaptıkları çalışmada; tartrazine maruz kalan insan lenfositlerinde tartrazinin sitotoksisite ve genotoksisite potansiyeli ile DNA onarımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Boyanın 0.25-64 mM arasında değişen farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuçlar tartrazinin sitotoksik etki göstermediği, ancak alkali comet testi sonucunda test edilen bütün konsantrasyonlarda genotoksik etkisinin olduğu görülmüştür. Oluşan çoğu hasarın tamir edilmesine rağmen, 24

saatlik tamir süresinin sonunda bazı hasarların pozitif kontrolden daha yüksek oranda kaldığı belirlenmiştir. Bu veriler tartrazinin sağlığa zararlı olabileceğini ve uzun süreli kullanımında karsinogenezi tetikleyebileceğini göstermektedir.

Basu ve Kumar, (2016), yaptıkları çalışmada; gıda katkı boyası olan tartrazin ile çift sarmal DNA'nın etkileşimini spektroskopik ve kalorimetrik tekniklerle incelemiştir. DAPI ve Hoechst 33258 testleriyle (spektroskopik ve kalorimetrik teknik sonuçları) tartrazinin DNA'nın küçük oluşuna bağlanabildiğini gösterilmiştir.

Bezerra ve ark., (2016), yaptıkları çalışmada; farklı şirketlerden alınan ve içlerinde tartrazin de bulunan bazı toz meyve sularının hücresel düzeyde toksisitesi *Allium cepa* kök meristem hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Toz meyve sularının hücrelerde antiproliferatif etkiyi, iğ ipliği değişimlerini ve MN oluşumunu önemli ölçüde artırdığı ve bu nedenle sitotoksik ve genotoksik sonucuna varılmıştır.

Görüldüğü gibi literatürde, tartrazinin genotoksisite ve karsinogenisite hakkında hem pozitif hem de negatif sonuçlar bulunmaktadır (Himri ve ark., 2012; Kirkland ve ark., 2011; Gomez ve ark., 2013; Mehedi ve ark., 2013; dos Santos ve ark., 2014; Soares ve ark., 2015). Bu farklı sonuçlar nedeniyle bu konuda net bir fikir birliği yoktur. Ancak belirlenen pozitif genotoksisite sonuçları daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmaların çoğu *in vivo* çalışmalar olup, *in vitro* çalışmaların sayısı sınırlıdır. Buna ek olarak, S9 karışımı varlığında insan periferik kan lenfositlerinde tartrazinin metabolitlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin, farklı genotoksisite testleri kullanılarak araştırıldığı detaylı araştırmalar bulunmamaktadır. Tartrazinin insan periferik kan lenfositlerindeki etkisinin araştırıldığı sadece bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada bizim önerdiğimiz genotoksisite testleri kullanılmamış olup, tartrazinin sadece sitotoksisitesi ve DNA bağlanması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle tartrazinin S9 karışımı varlığında ve yokluğunda insana ait hücreler üzerindeki sitotoksisite ve genotoksisitenin araştırılması oldukça önemlidir. Bu bilgi eksikliği dikkate alınarak bu çalışma ile S9 karışımı varlığında ve yokluğunda insan periferik kan lenfosit kültürlerinde tartrazinin sito-genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada test maddesi olarak tartrazin, materyal olarak ise sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamızın yapılabilmesi amacıyla Samsun Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (2015/149) izin alınmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Tartrazin

Çalışmamızda test maddesi olarak kullanılan sentetik bir azo boyasıdır ve Sigmadan temin edilmiştir.

Ticari Adı: Tartrazine (Tartrazin)

Kimyasal Adı: Acid Yellow 23 (Asit sarısı)

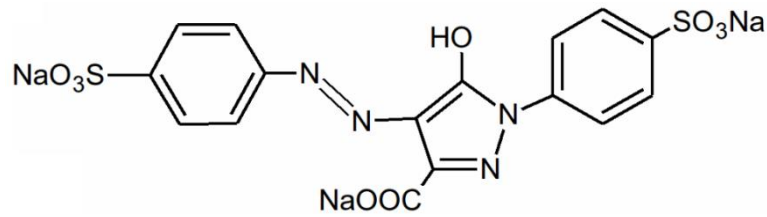
CAS no: 1934-21-0

Molekül Ağırlığı: 534.36

Saflık düzeyi: $\geq 98\%$

Erime Sıcaklığı: 572° F'dan fazla

Kapalı Formülü:



Açık Formülü: C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂

Renk İndeksi Numarası: 19140

E Numarası: E102

EC Numarası: 217-699-5

3.1.1.2. Saf Su

Tartrazinin çözünmesi için kullanılmıştır. Tartrazin saf suda çözülerek değişik konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.1.1.3. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Biological Industries firmasının ürettiği RPMI 1640 besiyeri (01-1061) hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. RPMI 1640 besiyerinin 100 ml'sinde aşağıdaki bileşimler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır.

RPMI 1640 (Biological Industries)	100 ml
Fetal Sığır Serum (Biological Industries).....	20 ml
Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (PSA) (Biological Industries).....	1 ml
Fitohemaglutinin M (PHA-M) (Biological Industries).....	1.2 ml
L-Glutamin (Merck).....	2 ml

Bu karışımdan steril kültür tüplerine 2.5 ml konulmuştur ve kullanılmıştır.

3.1.1.4. Mitomisin C (MMC)

Mitomisin C, bu çalışmanın S9 karışımının kullanılmadığı kültürleri için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve Sigma firmasından sağlanmıştır.

Kimyasal adı: Mitomisin C

Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

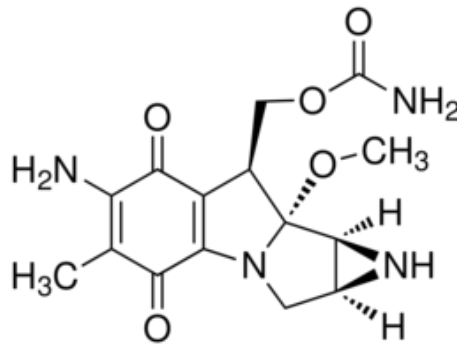
Erime noktası: 360°C

CAS No: 50-07-7

Safılık düzeyi: % 99

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü:



3.1.1.5. Sitokalsin B

MN testinde, hücre bölünmesi esnasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır ve Sigma'dan sağlanmıştır.

Kimyasal adı: Sitokalsin B

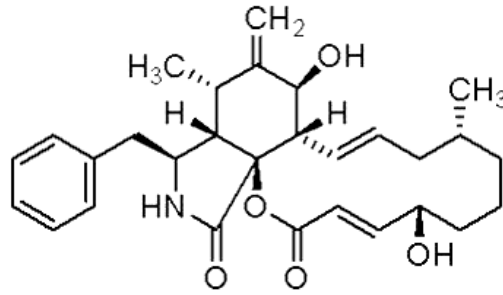
Molekül ağırlığı: 479.62 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: $C_{29}H_{37}NO_5$

Açık formülü:



3.1.1.6. Kolsemid (Kolşisin)

Kültürü yapılan hücreleri metafaz safhasında durdurmak için kullanılmıştır. Biological Industries firmasından sağlanmıştır. Kültürlerde kullanılan besiyerinin her ml'sinde 0.06 μ g olacak şekilde 2.5 ml'lik kültür tüplerine ilave edilmiştir.

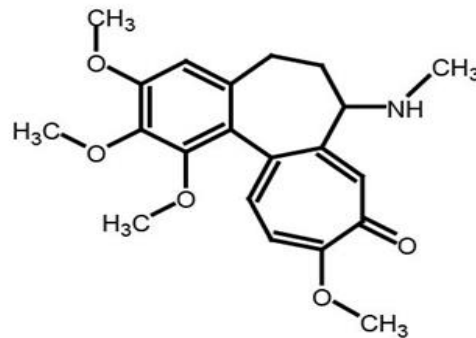
Kimyasal adı: Kolsemid, N-Deasetil-N-metil kolşisin

Cat. No: 12-004-10

Molekül ağırlığı: 399.4 g/mol

Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$

Açık formülü:



3.1.1.7. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak Merck'ten temin edilen KCl kullanılarak hazırlanan % 0,4'lük çözeltisi kullanılmıştır. Bidistile su içinde hazırlanan bu eriyik, kullanılmadan önce 37°C'deki inkübatörde ısıtılmıştır.

3.1.1.8. Fiksatif

KA deneylerinde 1 hacim asetik asit (Sigma) ve 3 hacim metanol'ün (Sigma) karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır. MN deneylerinde 1 hacim glasiyal asetik asit, 5 hacim metanol ve 6 hacim % 0.9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/% 0.9'luk NaCl) kullanılarak ilk fiksatif hazırlanmıştır. İkinci fiksatif ise, 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Her iki fiksatif de, kullanılmadan önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.9. Sorensen Tamponu

Bu eriyik, iki stok çözelti halinde hazırlanmış ve birbirleriyle karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 (Merck) 250 ml distile suda çözülmüştür.

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 250 ml distile suda çözülmüştür.

KH_2PO_4 çözeltisi, Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine ilave edilmiştir.

3.1.1.10. Giemsa

Merck firmasından temin edilmiştir ve % 5'lik Giemsa-Tampon (Sorensen) boya eriyiği şeklinde hazırlanmıştır. KA testinde kromozomları, MN testinde ise nükleus ve mikronükleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.11. Entellan

Merck firmasından temin edilen entellan, preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ve lameli birbirlerine yapıştırmak için kullanılmıştır.

3.1.1.12. Siklofosfamid (CP- cyclophosphamid monohydrat)

Siklofosfamid (CP) bu çalışmanın S9 karışımının kullanıldığı kültürler için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. CP'nin konsantrasyonu 50 ug/ml olacak şekilde kültürlerle ilave edilmiştir. 12.5 mg CP, 5 ml izotonik NaCl (% 0,9) içerisinde çözülüp bakteri filtresinden geçirilerek steril edilmiştir. CP, Fisher Scientific'den temin edilmiştir.

Kimyasal adı: *N-N*-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine-oxide

Molekül ağırlığı: 279.1 g/mol

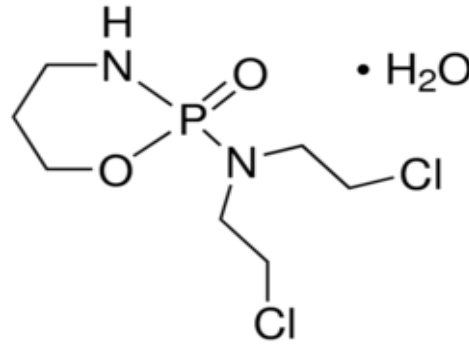
Erime noktası: 49-50 °C

CAS No: 6055-19-2

Safılık düzeyi: ≥98%

Kapalı formülü: C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P*H₂O

Açık formülü:



3.1.1.13. Standart Memeli Karaciğer Fraksiyonu (S9 karışımı)

In vitro çalışmalarda ortama karaciğer enzimleri eklendikten sonra ortaya çıkan genotoksik etkiler, test edilen kimyasal maddenin metabolize olması ile meydana gelen ara bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, tartrazinin karaciğerde metabolize olduktan sonra herhangi bir genotoksik etkiye yol açıp açmadığını gösterebilmek amacıyla S9 karışımı kullanılmıştır.

Çalışmamızda, tartrazinin metabolitlerinin genotoksik etkilerini de belirlemek yani indirekt genotoksik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla insandan elde edilmiş ve Gentest™ firmasından temin edilmiş karaciğer S9 fraksiyonu, NADPH-A ve NADPH-B solüsyonlarının 1X tris buffer (pH 7.6) içerisinde

hazırladığı S9 karışımı kullanılmıştır. Bu karışım kültür tüplerine, besiyeri miktarının % 2'si olacak şekilde eklenmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1. Hassas Terazı

Çalışmamızda kullanılan kimyasalların tartılması amacıyla, hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Radwag marka terazi kullanılmıştır.

3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini

Test solüsyonlarının hazırlanması, steril tüplere kan ekiminin yapılması ve test solüsyonlarının kültür tüplerine ilave edilmesinin steril şartlarda gerçekleşebilmesi için, ESCO marka Class-II biyogüvenlik kabini kullanılmıştır.

3.1.2.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin ısıtılmasında Binder marka inkübatör kullanılmıştır.

3.3.1.2.4. Santrifüj

Çalışmamızda kültür tüplerindeki hücreleri çöktürmek amacıyla MPW-351R marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı

Çalışmamızda kültür tüplerini dairesel salınımlı hareketler ile karıştırmak amacıyla BioCote (Stuart-SA8) marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.6. Mikroskop

Preparatları incelemek amacıyla Leica marka ışık mikroskobu ve görüntü analiz sistemi kullanılmıştır.

3.2. Deneylerde Kullanılacak Tartrazin Dozlarının Belirlenmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

3.2.1. Tartrazin Dozlarının Belirlenmesi

Deneylerimizde kullanacağımız tartrazin konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için bir seri hücre kültürü hazırlanmış ve bu kültürlerle 0, 50,100, 250, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000 µg/ml arasındaki değişik dozlarda tartrazin eklenerek sitotoksiteyi belirleyebilmek amacıyla iki farklı ön çalışma yapılmıştır. Hücre kültürleri 48 saat boyunca belirtilen konsantrasyonlarda tartrazin ile muamale edilmiş ve kültürlerden elde edilen preparatlar MI bakımından incelenmiştir. 2000 hücre sayılarak bölünme evresindekiler belirlenip MI hesaplanmıştır. 0, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000 µg/ml dozlarda saptanan MI değerleri sırasıyla: 84, 80, 75, 69, 58, 58, 43, 39, 33, 29 ve 26 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan ön çalışmada doz artışına paralel olarak MI değerinin azaldığı ve sitotoksitenin artış gösterdiği saptanmıştır. Tartrazinin test edilen konsantrasyonlarından, 2500 µg/ml dozun MI'de yaklaşık % 50 oranında azalmaya neden olmasından dolayı inhibitör konsantrasyon yani, IC50 değerı 100 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda en yüksek tartrazin dozu 2500 µg/ml olarak seçilmiştir. Çalışmamızda en düşük tartrazin dozu olarak IC50 değerinin 1/4'si olan 625 µg/ml'lik konsantrasyon ve ara doz olarak da IC50 değerinin 1/2'si olan 1250 µg/ml'lik konsantrasyon seçilmiştir. Dozlar belirlendikten sonra alınan kanlar ile kültürler hazırlanarak deneylere başlanmıştır.

3.2.2. Oluşturulan Deney Grupları

A. Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu: Kültür tüplerine sürenin bitimine 48 saat kala, etken maddemizin çözücüsü olan saf su ilave edilmiştir.

B. Pozitif Kontrol Grubu: Kültür tüplerine sürenin bitimine 48 saat kala; S9 kullanılmayan kültürlerle MMC (0.25 µg/ml), S9 kullanılan kültürlerle ise CP (50 µg/ml) ilave edilmiştir. Mutajenik etkisinin görülebilmesi için metabolik aktivatör gerektiğinden S9 karışımının kullanıldığı kültürlerde CP kullanılmıştır.

C. Tartrazin (TRZ) Grubu: Kültür tüplerine sürenin bitimine 48 saat kala ön çalışma sonucunda karar verdiğimiz tartrazinin 3 farklı konsantrasyonu (625, 1250 ve 2500 µg/ml) ilave edilmiştir.

3.3. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürlerinin Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Analizi

3.3.1. S9 Karışımı İlave Edilmeyen KA Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Periferik kan örneklerinden KA'ları saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Evans (1984) ve Perry ve Thompson (1984)'ın teknikleri kullanılmıştır. Sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı bulunmayan, rutin olarak herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan örnekleri alınmıştır. Alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda içerisinde 2.5 ml'lik besiyeri bulunan steril tüplere ekilmiştir. Hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat için inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir.

Çalışmamızda negatif kontrol, pozitif kontrol ve tartrazin grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubundaki kültür tüpleri besiyeri ve kan içermektedir. Tartrazin dışındaki tüm koşulları aynı olan negatif kontrol grubu, tartrazin uygulanan deney gruplarında tartrazinin etkisini karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Çünkü negatif kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması sonucunda, bu gruplar arasında istatistiksel farklılığın bulunması, bu farklılığın deney grubuna uygulanan tartrazinden kaynaklandığını gösterecektir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak, sitotoksik ve genotoksik hasar yaptığı bilinen MMC maddesi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan MMC, 0.25 µg/ml olacak şekilde kültürlerin 24. saatinde tüplere eklenmiş ve kültürler 48 saat boyunca MMC ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol grubu, test maddemiz olan tartrazin ile MMC arasındaki sitotoksik ve genotoksik etkileri karşılaştırabilmek amacıyla kullanılmıştır. Kültür süresinin bitimine 48 saat kala, test maddemiz olan tartrazinin ön çalışma sonucu belirlediğimiz ve suda çözerek hazırladığımız konsantrasyonları olan 625, 1250 ve 2500 µg/ml'lik miktarları kültür tüplerine ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitmesine bir saat kala (kültürün 71. saatinde) 0.06 µg/ml olacak şekilde kolşisin eriyiği tüplere eklenmiş ve hücreler kolşisin ile muameleye bırakılmıştır. Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş

ve altta biriken hücelere zarar vermeden süpernatant su trompu yardımıyla atılmıştır. Dipte kalan ve hüceleri ihtiva eden yaklaşık 1ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan % 0.4'lük KCl hipotonik solüsyonundan 5 ml damlalar halinde ilave edilmiştir. Tüplere hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler 37°C'de 10 dk hipotonik eriyikle muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda tüpler 15 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

Hücelerin fikse edilmesi için tüplere, 3:1 oranında hazırlanan ve buzdolabında muhafaza edilen soğuk tespit (fiksatif) çözeltisi (metil alkol: glisial asetik asit), 5 ml olacak şekilde damlalar halinde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 dk oda sıcaklığında fiksatif ile muamele edilen hüceler 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülünceye kadar bu işlem yaklaşık 3 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır.

Tüpteki süspansiyon pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra, daha önceden alkolle temizlenmiş ve buzdolabında saklanan soğuk lamlar üzerine damlatılarak hücelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Preparatlar kapalı bir yerde oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek kurumaya bırakılmıştır.

3.3.2. S9 Karışımı İlave Edilen KA Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Tartrazinin indirekt genotoksik etkisini yani metabolitlerinin genotoksitesini araştırmak amacıyla S9 karışımı kullanarak kültürlerin hazırlanması için Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD, 2014)'nün belirttiği protokol takip edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan kültürlere, kültürün bitiminden 24 saat önce 625, 1250 ve 2500 µg/ml tartrazin ve 50 µl S9 karışımı ilave edilmiştir. S9 karışımı kullanılmayan kültürlere benzer şekilde her bir deneyin saf su ilave edilmiş bir negatif kontrolü ve 50 µg/ml CP ilave edilen bir pozitif kontrolü bulunmaktadır. Uygun miktarda kan ilavesi yapılan ve inkübasyona bırakılan kültürlere; 48. saatte tartrazin ya da CP maddeleriyle birlikte S9 karışımı ilave edilerek 3 saatliğine 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüpler 2000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra her bir tüpe toplam hacim 2.5 ml oluncaya kadar

besiyeri ilave edilmiştir ve 24 saatliğine tekrar 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin bitiminden 1 saat önce her tüpe kolşisin eriyiği (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve hücreler kolşisin ile muameleye bırakılmıştır. 24 saat tamamlandığında kültürler sonlandırılmıştır. Kültürlerin sonlandırılması aşaması ve sonrasında yapılan tüm işlemler S9 karışımı kullanılmadan yapılan deneyler ile tamamen aynıdır.

3.3.3. KA Preparatlarının Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5’lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı yardımıyla bir şaleye süzölmüştür. Preparatlar Giemsa-Tampon boya eriyiğinde 4 dk boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan distile su ile yıkanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiş ve kuruduktan sonra mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.4. Mikroskobik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile X1000 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda MI ve KA değerleri belirlenmiştir. Mitoz geçiren hücrelerin kromozomları ve saptanan KA’lar yine X1000 büyütmede fotoğraflanmış ve bilgisayara aktarılmıştır.

3.3.5. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması

3.3.5.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

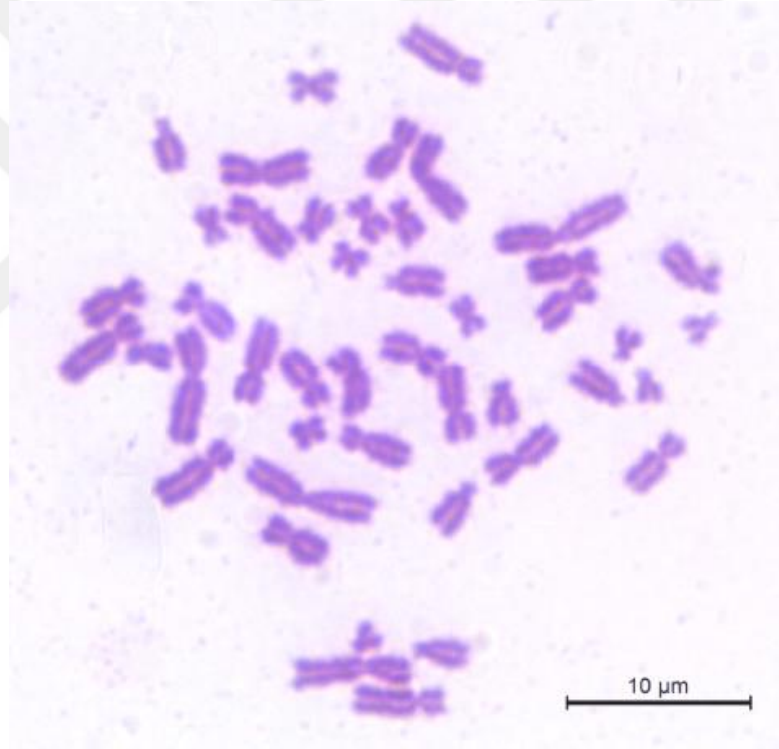
Tartrazinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her bir kişiye ait preparatlardan toplam 2000 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Her bir kişinin incelenen 2000 hücresi içinde bölünme halindeki (metafaz evresindeki) hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.3.5.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

KA’ların belirlenmesi amacıyla, her bir grup ve konsantrasyon için, her bir kişiden hazırlanan preparatlarda kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz plağı (4 kişiden toplam 400 hücre) incelenerek normal (Şekil 3.1) ve KA taşıyan metafaz plakları

tespit edilmiştir. Tespit edilen yapısal ve sayısal KA'lar, Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark., 2002; Konaş, 2012). İncelenen her 100 hücrede saptanmış olan KA'lar ve KA taşıyan anormal hücre ortalamaları (AHO) saptanmıştır.

Mace ve ark. (1978), elektron mikroskobu ile yaptığı çalışmalarda gap bölgelerindeki DNA ipliğinde kırık veya kırıklar olmadığını belirtmişlerdir. Bu sebeple yapılan pek çok çalışmada gaplar KA olarak değerlendirilmemektedir (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek Kasurka, 2010; Konaş, 2012). Bu nedenle çalışmamızda gaplar, KA olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 3.1. Normal metafaz plağı (X1000)

3.4. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Analizi

3.4.1. S9 Karışımı İlave Edilmeyen MN Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Çalışmamızda *in vitro* MN testi için hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Fenech (2000), Rothfuss ve ark., (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003)'nın kullandıkları tekniklerden faydalanılmıştır. Sigara içmeyen, ciddi bir hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan alınmıştır. İçerisinde 2.5 ml'lik besiyeri bulunan steril tüplere, alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda ekilmiştir ve hücre kültürü 37±1°C'de 68 saat için inkübasyona bırakılmıştır.

MN testi için de negatif kontrol, pozitif kontrol ve tartrazin grupları bulunmaktadır ve bu gruplara uygulanan tüm test maddeleri, KA testinde uygulanan konsantrasyon ve muamele süreleri ile aynıdır. Yani; saf sudan oluşan negatif kontrol grubu, Mitomycin C'nin 48 saatlik muamelesinden oluşan pozitif kontrol grubu ve test maddemiz olan tartrazinin suda hazırlanmış olan 625, 1250, 2500 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 48 saat boyunca muamelelerinin yapıldığı deney grupları, MN testi için de aynen kullanılmıştır.

İnkübasyona bırakılan tüm kültür tüplerine sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için kültürün bitimine 24 saat kala (inkübasyonun 44. saatinde) bütün tüplere 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B maddesi ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Tüpte kalan yaklaşık 1 ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan hipotonik eriyikten (% 0.4 KCl) 5 ml yavaş yavaş ilave edilmiştir. Tüpler bekletilmeden 1200 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş, tekrar süpernatant atılmıştır. Daha sonra glasiyal asetik asit/metanol/ % 0,9 NaCl (1/5/6 oranlarında) karışımından oluşan 5 ml soğuk fiksatif, hipotonik ilavesi gibi yavaş yavaş ve damlalar halinde tüpteki sıvının üzerine ilave edilmiştir. İlk fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk muamele edildikten sonra tüpler tekrar 1200 rpm'de 15 dk

santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra tüplere 1 kısım asetik asit ve 5 kısım metil alkolden (1/5) oluşan 5 ml ikinci fiksatif ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 20 dk muamele edilmiştir. Bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır ve tüplerdeki sıvı pasteur pipeti ile karıştırılarak resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu, daha önceden temizlenmiş ve alkol içerisinde buzdolabında saklanan soğuk lamaların üzerine damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kapalı bir yerde bir gece oda sıcaklığında bekletilerek kurumaları sağlanmıştır.

3.4.2. S9 Karışımı İlave Edilen MN Kültürlerinin Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Tartrazinin indirekt genotoksik etkisini yani tartrazinin metabolitlerinin genotoksitesini araştırmak amacıyla, kültürün bitiminden 24 saat önce 625, 1250, 2500 µg/ml tartrazin ve 50 µl S9 karışımı ile birlikte tüplere ilave edilmiştir. S9 karışımı kullanılmayan kültürlere benzer şekilde her bir deneyin saf su ilave edilmiş bir negatif kontrolü ve 50 µg/ml siklofosfamid (CP) ilave edilen bir pozitif kontrolü bulunmaktadır. Uygun miktarda kan ilavesi yapılan ve inkübasyona bırakılan kültürlere; 48. saatte tartrazin ya da CP maddeleriyle birlikte S9 karışımı ilave edilerek 3 saatliğine 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüpler 2000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra her bir tüpe toplam hacim 2.5 ml oluncaya kadar taze besiyeri ve Cytochalasin-B (8 µg/ml) ilave edilerek 24 saatliğine tekrar inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat tamamlandığında kültürler sonlandırılmıştır. Kültürlerin sonlandırılması aşaması ve sonrasında yapılan tüm işlemler S9 karışımı kullanılmadan yapılan deneyler ile tamamen aynıdır.

3.4.3. MN Preparatlarının Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı yardımıyla dik bir şaleye süzölmüştür. Preparatlar Giemsa-Tampon boya eriyiğinde 14 dk boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile sudan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar bir gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale

getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.4.4. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

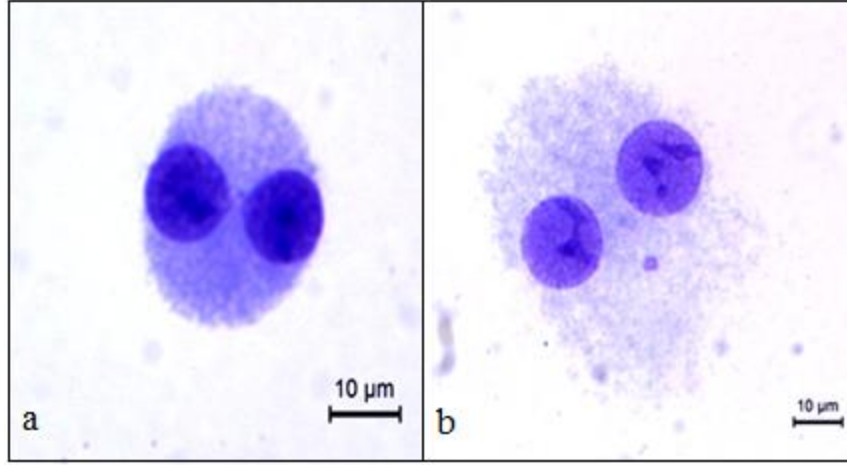
Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile X400 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) hücreler ile MN içeren binükleat (BN) hücreler tespit edilmiştir. X400 büyütme ile bir, iki, üç ve dört nükleuslu bazı hücrelerin ve MN bulunduran bazı BN hücrelerin fotoğraflama işlemi yapılarak görüntüler bilgisayara aktarılmıştır.

3.4.5. MN Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

MN sayısını belirlemek amacıyla daimi preparatlarda her kişi için, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (Şekil 3.2.a) toplam 2000 BN hücre incelenmiş ve bu BN hücreler içerisinde MN taşıyanlar (Şekil 3.2.b) belirlenmiştir. Ayrıca incelenen BN hücrelerdeki toplam MN sayısı ve % MN değerleri hesaplanmıştır.

BN hücre ve MN ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'in önerdiği kriterlere göre yapılmıştır. Bu kriterlere göre:

1. Hücreler belirgin bir sitoplazmaya ve yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır.
2. Nükleuslar, belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır.
3. MN olarak sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir.
4. MN'ler sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında dikkate alınmalıdır.
5. MN'ler ana nükleus ile aynı boyanmalıdır.
6. MN'ler ana nükleustan belirgin bir şekilde ayrılmış olmalıdır (Yavuz-Kocaman, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Kondaş, 2012).

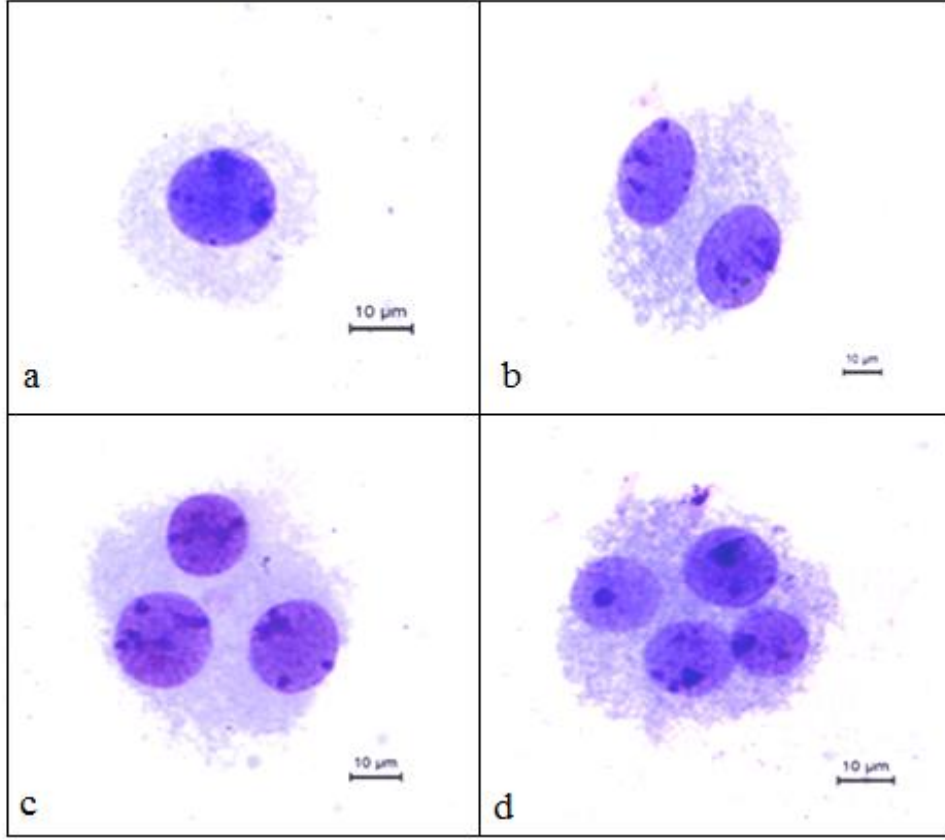


Şekil 3.2. Binükleat hücre (a) ve bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (b) (X400)

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 adet hücre (4 kişi, 4000 hücre) sayılarak, bu hücreler arasından bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu (Şekil 3.3) olanların oranı saptanmıştır. Bu orandan yola çıkılarak Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilmiş olan formüle göre Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) hesaplanmıştır (Yavuz-Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek-Kasurka, 2010; Kontaş, 2012). NBI, kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik ve sitostatik etkilerinin gösterilmesinde kullanılan bir parametredir (Fenech, 1997; Yavuz-Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek-Kasurka, 2010, Kontaş, 2012).

$$NBI = \frac{(MI+2MII+3MIII+MIV)}{N} \quad (3.1)$$

MI: Bir nükleuslu hücreler, **MII:** İki nükleuslu hücreler, **MIII:** Üç nükleuslu hücreler, **MIV:** Dört nükleuslu hücreler, **N:** Toplam hücre sayısı



Şekil 3. 3. Mononükleat (a), binükleat (b), trinükleat (c) ve tetranükleat (d) hücreler (X400)

3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen KA, MI, NBI ve MN parametrelerine ait veriler için her bir grubun ortalamaları ve standart hataları (SH) belirlenmiştir. İncelemeler sonucunda pozitif kontrole ve tartrazine ait elde edilen veriler ile çözücü kontrol grubu arasındaki farkın önemli olup olmadığı *t*-testi ile karşılaştırılmıştır. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (*r*) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak seçilmiştir.

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler şekiller halinde, istatistiksel bulgular ise çizelgeler ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

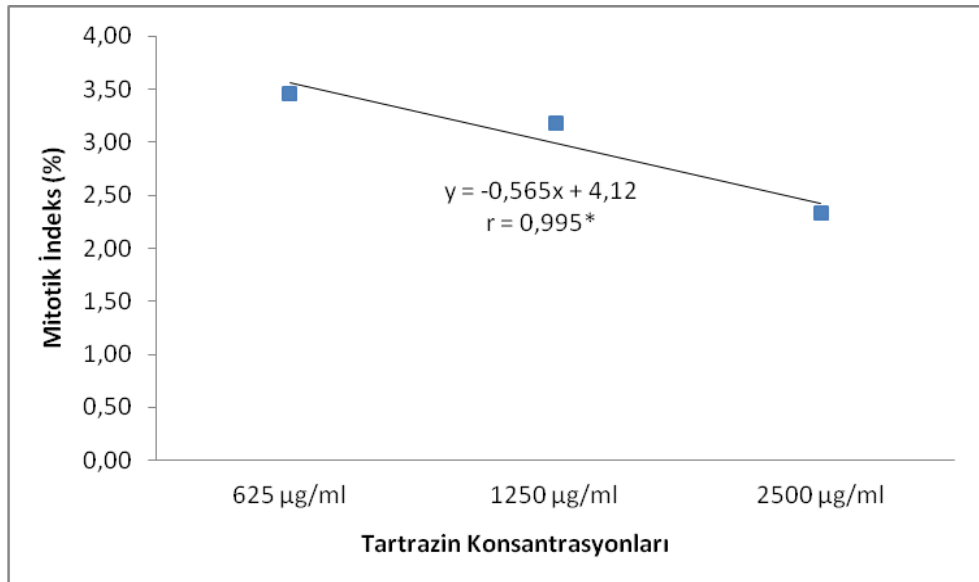
4.1. Tartrazinin İnsan Periferal Lenfositlerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri

4.1.1. Tartrazinin Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Tartrazinin mitoz bölünme üzerindeki etkisi mitotik indeks (MI) hesaplanarak belirlenmiştir.

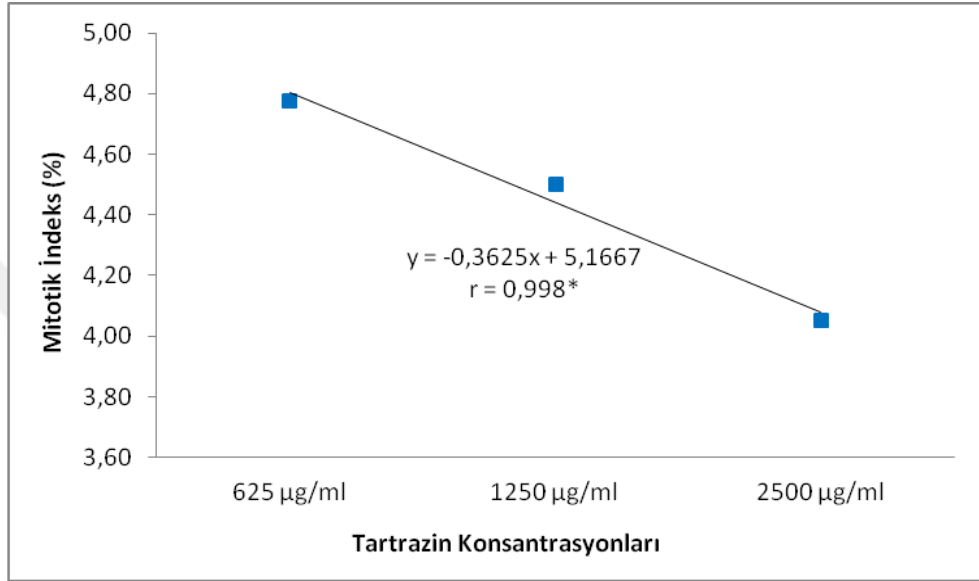
Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen 625, 1250 ve 2500 µg/ml dozlarının insan periferal lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, tartrazin dozunun artışına bağlı olarak MI'in düştüğü görülmüştür (Şekil 4.1, Çizelge 4.1). Bu nedenle tartrazin konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak MI'deki düşüşler arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Tartrazinin S9 karışımı bulunmayan 625 ve 1250 µg/ml konsantrasyonlarında MI'de ortaya çıkardığı düşüş negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemli bulunmazken, 2500 µg/ml konsantrasyonda MI'i negatif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olacak derecede düşürmüştür ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

S9 karışımı bulunan besin ortamında 3 saat tartrazin ile muamele edilen hücrelerde, tartrazin konsantrasyonunun artışı paralel olarak MI değerlerinin azaldığı görülmüştür ve tartrazin dozları ile MI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2, Çizelge 4.1). Ancak, çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, MI'de görülen doza bağlı bu düşüşler istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).



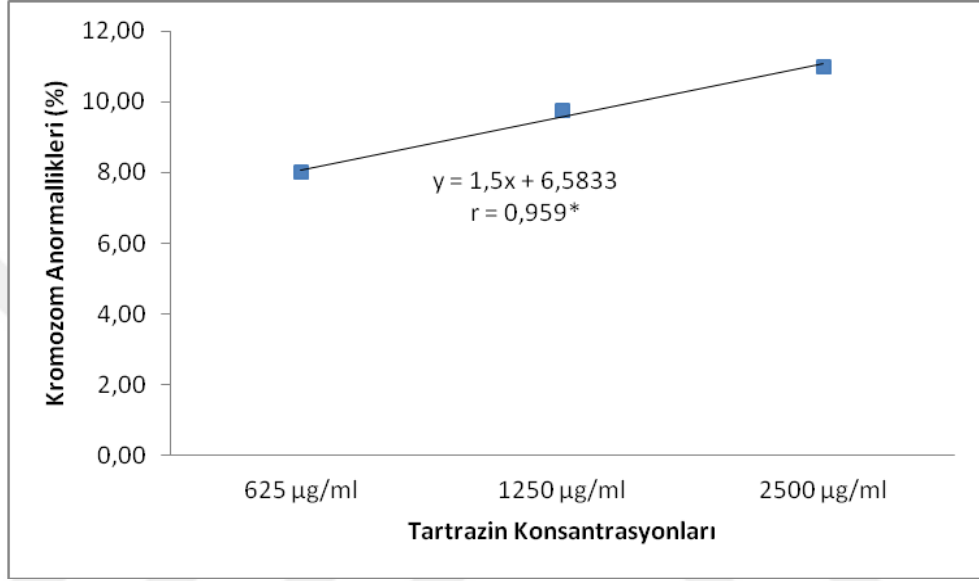
Şekil 4.2. Tartrazin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

4.1.2. Tartrazin Kromozom Anormallikleri (KA) ve Anormal Hücre Ortalaması (AHO) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

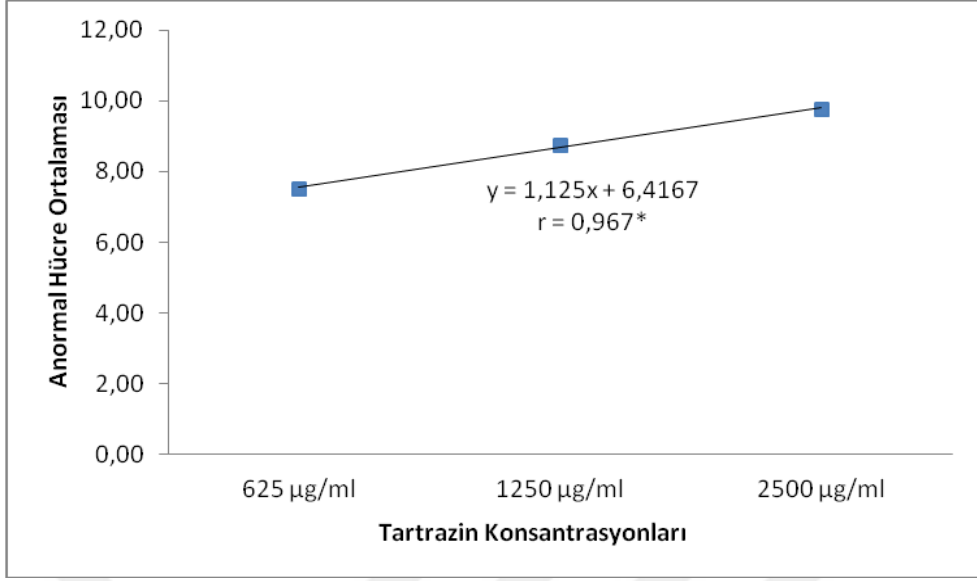
625, 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarındaki tartrazin insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, tartrazin dozundaki artışa paralel olarak KA ve KA içeren anormal hücre ortalaması (AHO) değerlerinin de arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Çizelge 4.1). Bu nedenle tartrazin konsantrasyonları ile KA ve AHO değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Tartrazin S9 karışımı kullanılmadan test edilen tüm dozlarında, doz artışına bağlı olarak toplam ve % KA ve AHO değerleri bakımından artışlar görülmesine rağmen, negatif kontrol ile kıyaslandığında, KA ve AHO değerlerinde görülen bu artışlardan 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).

625, 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarındaki tartrazinin, insan periferik lenfositleriyle 48 saat muamelesi sonucu, test edilen dozlarda; kromatid kırığı (Şekil 4.7), kromozom kırığı (Şekil 4.8), fragment (Şekil 4.9), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.10), disentrik kromozom (Şekil 4.11), poliploidi (Şekil 4.12) ve endoreduplikasyon (Şekil 4.13) gibi kromozom anomallikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.3. Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: p<0.05)

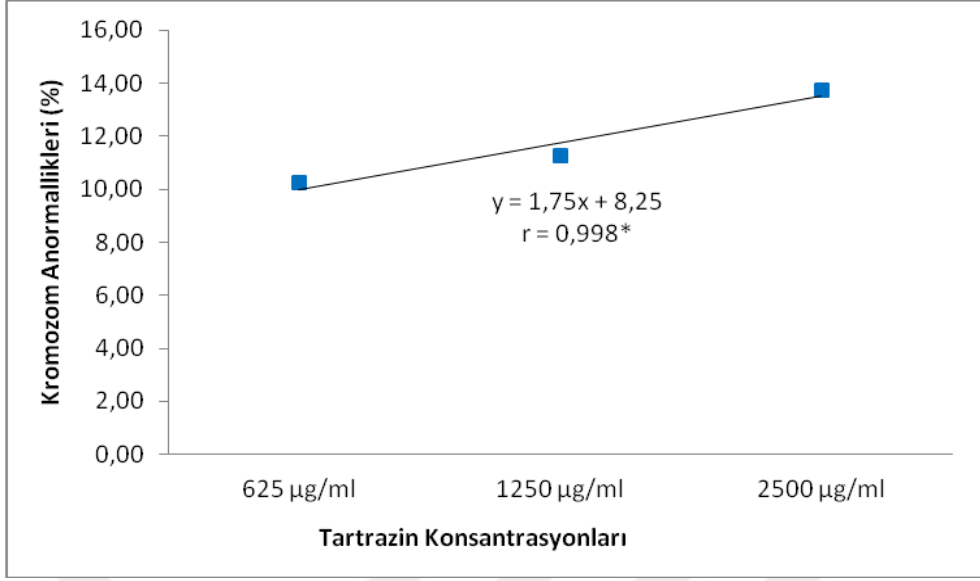


Şekil 4.4. Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

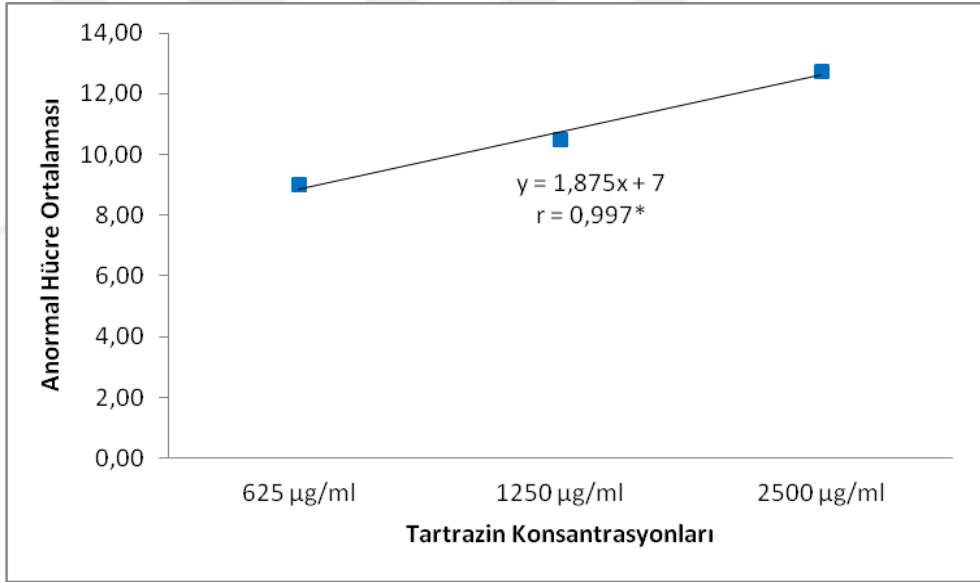
S9 karışımı bulunan besin ortamında 3 saat tartrazin ile muamele edilen hücrelerde, tartrazinin dozunun artmasına bağlı olarak KA ve AHO değerlerinin de arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Çizelge 4.1). Bu nedenle tartrazin dozları ile KA ve AHO değerleri arasında istatistiksel olarak önemli korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

İnsan periferel kan lenfositlerinde S9 karışımı varlığında tartrazinin test edilen tüm konsantrasyonlarının hem KA hem de AHO değerlerini artırmasına rağmen, çözücü kontrol ile kıyaslandığında 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarındaki artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).

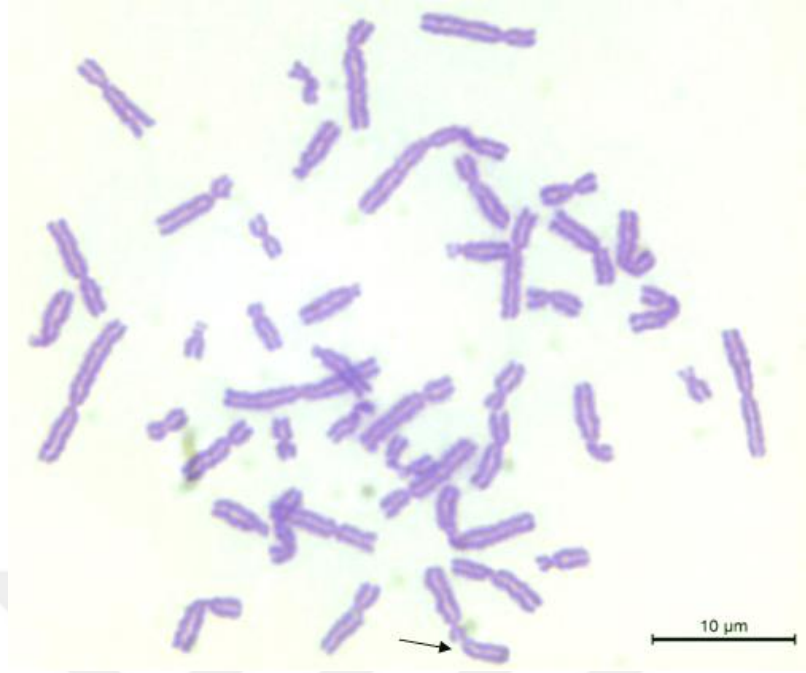
S9 karışımı bulunan besin ortamında kültüre edilen hücrelerde; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, disentrik kromozom ve poliploidi gibi kromozom anomalliklerine yol açtığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



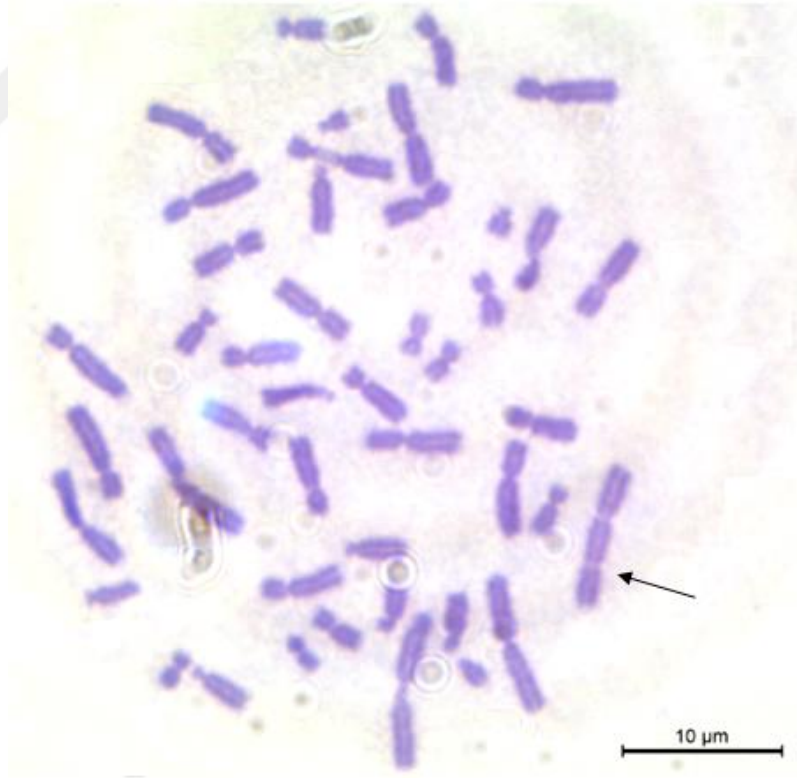
Şekil 4.5. Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)



Şekil 4.6. Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)



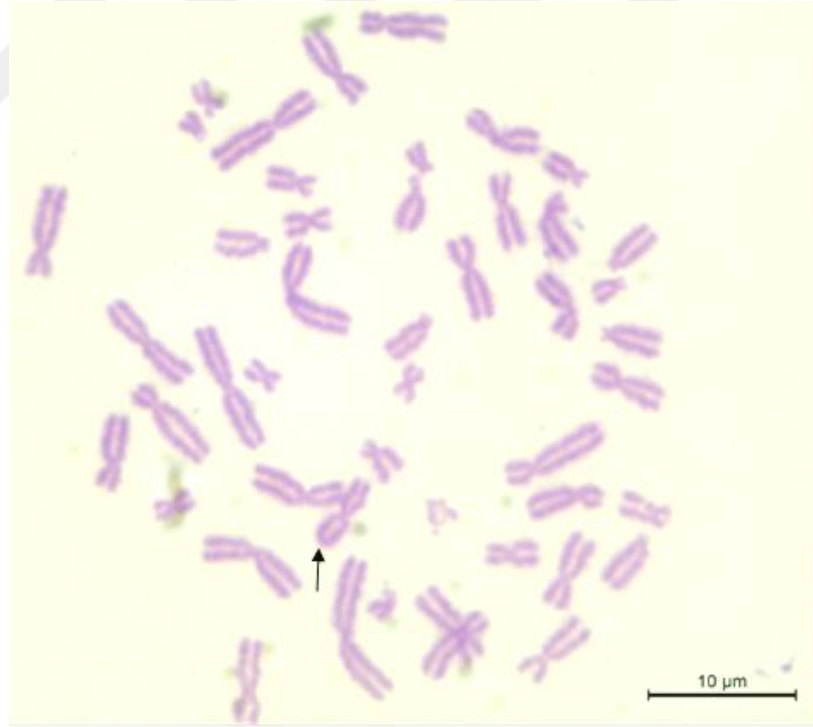
Şekil 4.7. Kromatid kırığı X1000 (2500 µg/ml tartrazin)



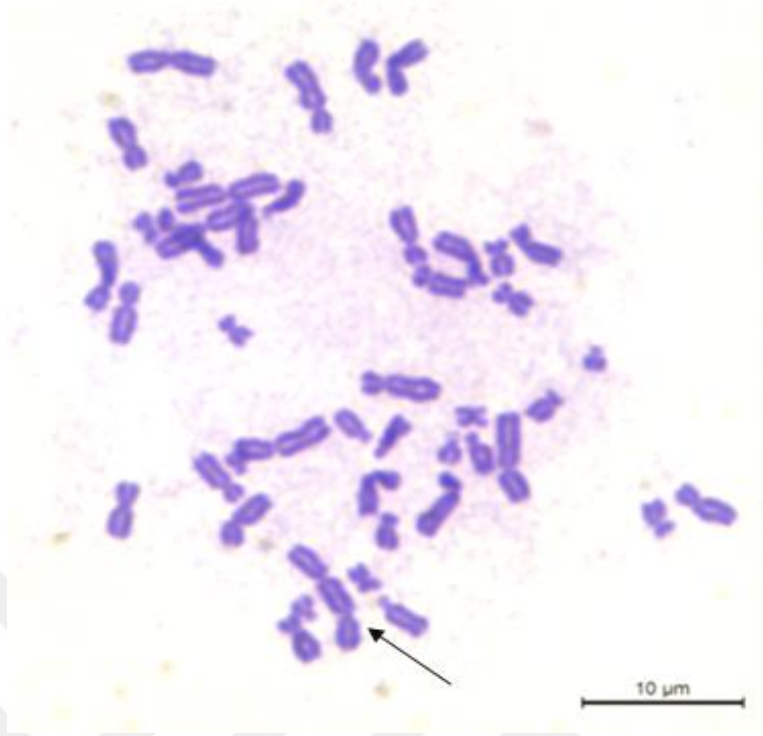
Şekil 4.8. Kromozom kırığı X1000 (1250 µg/ml tartrazin)



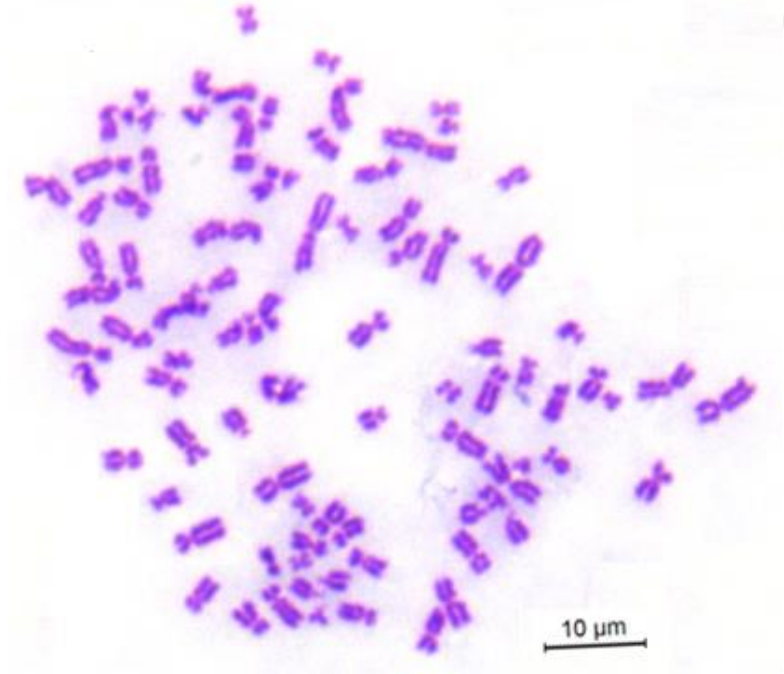
Şekil 4.9. Fragment X1000 (625 µg/ml tartrazin)



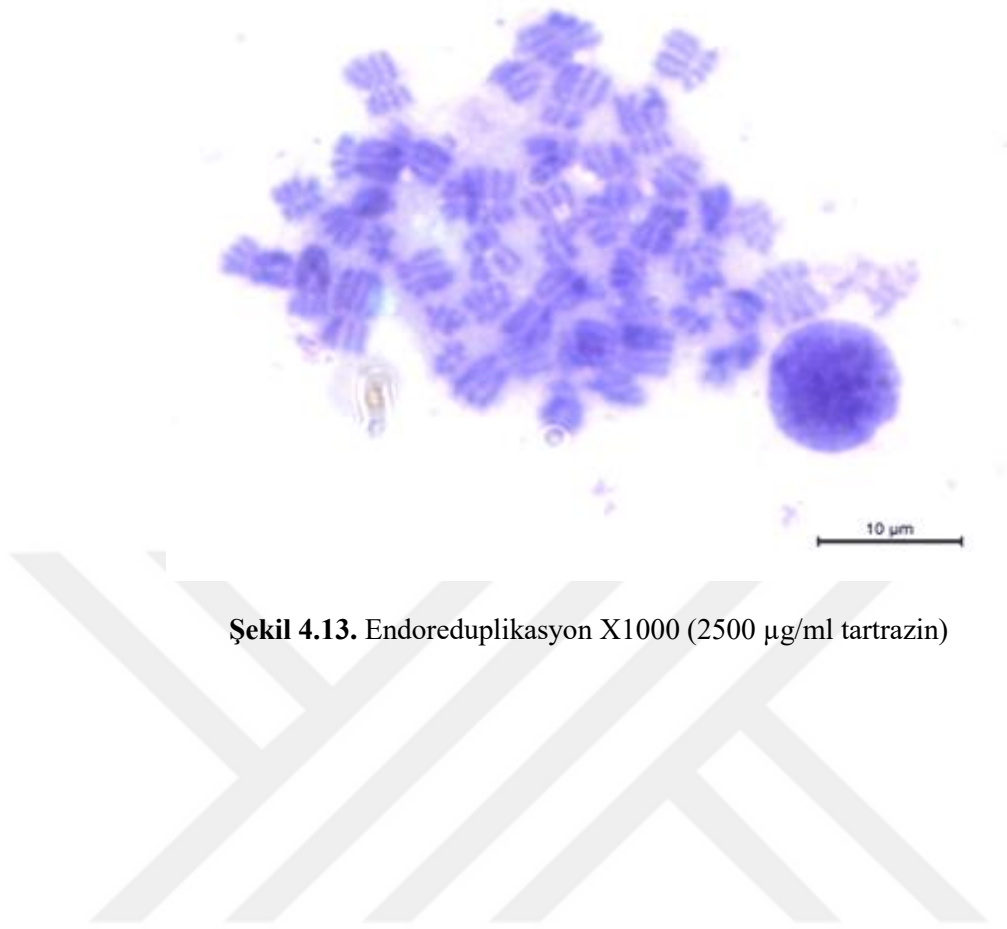
Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi X1000 (625 µg/ml tartrazin)



Şekil 4.11. Disentrik kromozom X1000 (1250 µg/ml tartrazin)



Şekil 4.12. Poliploidi X1000 (1250 µg/ml tartrazin)



Şekil 4.13. Endoreduplikasyon X1000 (2500 µg/ml tartrazin)

Çizelge 4.1. Metabolik aktivator (S9 karışımı) bulunan ve bulunmayan ortamda farklı dozlarda tartrazin ile muamele edilmiş insan periferik lenfosit hücre kültürlerindeki mitotik indeks (MI), kromozom anormallikleri (KA) ve anormal hücre ortalaması (AHO) değerleri

Test Maddesi	Muamele süresi	Konsantrasyon	MI% ± SE	KA								Toplam KA	KA% ± SE	AHO ± SE
				K'	K''	F	KKB	KD	DS	ERD	P			
DS	48 saat	10 µl/ml	4.31±1.15	10	3	3	6	-	-	-	5	27	6.75±0.85	5.75±0.48
MMC	48 saat	0.16 µg/ml	1.12±0.37*	44	37	15	2	5	4	-	3	110	27.50±4.03*	20.00±2.45*
TRZ	48 saat	625 µg/ml	3.46±1.07	6	6	6	9	-	-	-	5	32	8.00±0.71	7.50±0.65
TRZ	48 saat	1250 µg/ml	3.18±0.89	8	9	3	9	-	5	-	5	39	9.75±0.85*	8.75±0.25*
TRZ	48 saat	2500 µg/ml	2.33±0.66*	16	9	8	6	-	2	1	2	44	11.00±1.08*	9.75±0.85*
DS	3 saat	10 µl/ml	5.20±0.79	17	4	2	4	-	2	-	4	33	8.25±0.85	8.00±0.71
CP	3 saat	45 µg/ml	2.74±0.44*	23	19	16	2	2	15	1	10	88	22.00±1.08*	19.25±0.48*
TRZ	3 saat	625 µg/ml	4.78±0.78	14	5	6	6	-	7	-	3	41	10.25±0.63	9.00±0.71
TRZ	3 saat	1250 µg/ml	4.50±0.09	13	10	7	10	-	4	-	1	45	11.25±0.25*	10.50±0.65*
TRZ	3 saat	2500 µg/ml	4.05±0.93	22	12	6	9	-	6	-	-	55	13.75±0.85*	12.75±0.75*

KA: Kromozom anormallikleri, AHO: Kromozom anormallikleri içeren anormal hücre ortalaması, MI: Mitotik indeks, K': Kromatid kırığı, K'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: kromatid değişimi, DS: Disentrik kromozom, ERD: Endoreduplikasyon, P: Poliploidi.

Negatif (çözücü) Kontrol: Distile su (DS)

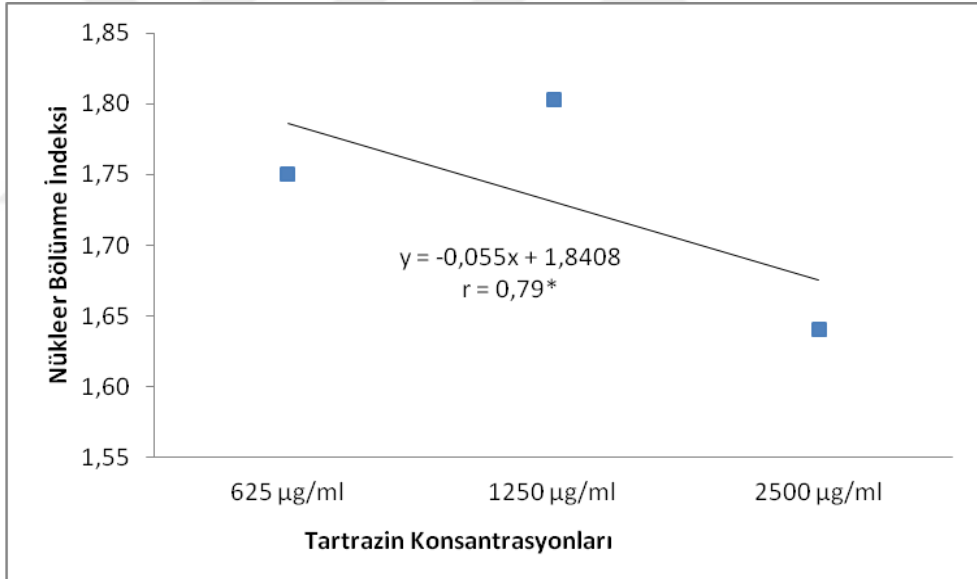
Pozitif kontrol: Siklofosamid (CP)

*: Çözücü kontrole göre anlamlı (P<0.05).

4.1.3. Tartrazinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Tartrazinin nükleus bölünmesi üzerindeki etkisi nükleer bölünme indeksi (NBI) hesaplanarak belirlenmiştir.

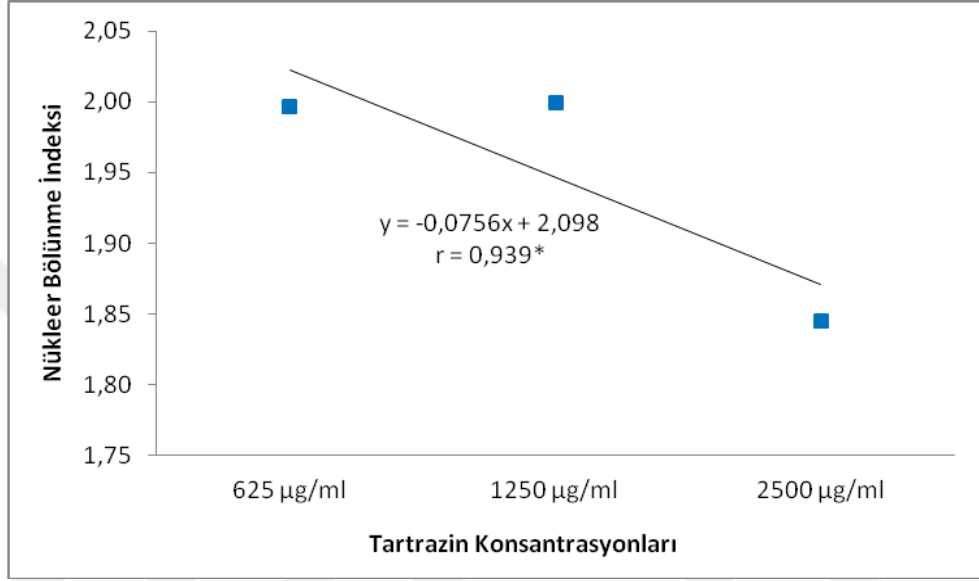
Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları çözücü kontrol ile kıyaslandığında, tartrazin ile muamele edilen hücrelerde NBI değerlerinde azalmalar görülmüştür (Çizelge 4.2). Ancak NBI değerlerindeki bu azalmalar tartrazin konsantrasyonunun artışına bağlı bulunmamıştır. Bu nedenle tartrazin konsantrasyonları ile NBI değerleri arasında istatistiksel olarak çok önemli bir korelasyon olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14). Ayrıca, test edilen tüm tartrazin konsantrasyonlarında NBI'nde görülen ve doza bağlı olmayan bu azalmalar, negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p < 0.05$). (Çizelge 4.2).



Şekil 4.14. Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

S9 karışımı bulunan besin ortamında 3 saat tartrazin ile muamele edilen hücrelerde, NBI değerlerinde ortaya çıkan değişimlerin tartrazinin konsantrasyonunun artışına bağlı olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). 625 ve 1250 µg/ml konsantrasyonlarındaki NBI değeri birbiri ile aynı ve çözücü kontrolden yüksek bulunmuştur. 2500 µg/ml konsantrasyondaki tartrazin uygulaması ise NBI değerinin

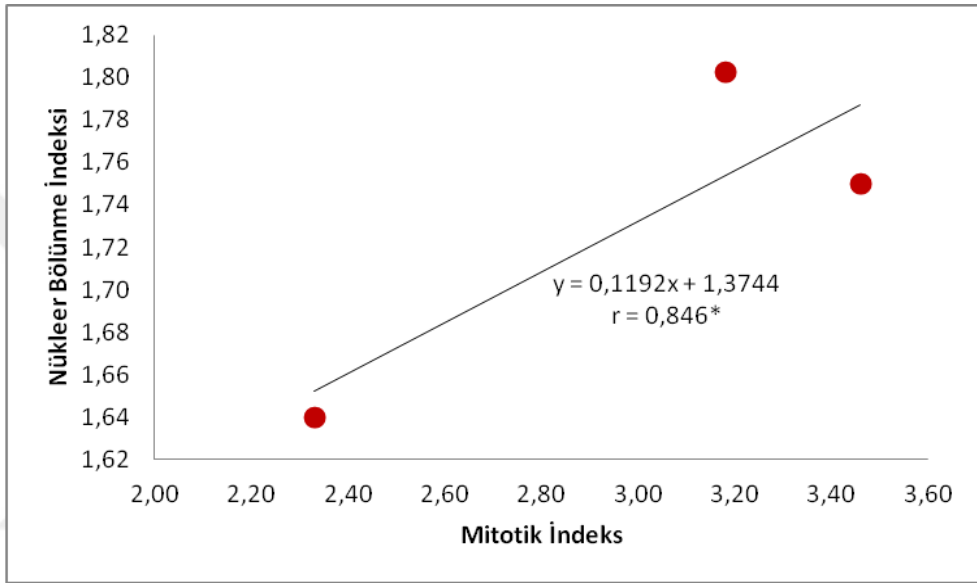
düşmesine neden olmuştur. Ancak çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek konsantrasyonda görülen bu düşüş istatistiki anlamda önemli bulunmamıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.2). 625 ve 1250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarındaki tartrazin muamelesi sonucu aynı NBI değerleri elde edilmesine rağmen, en yüksek dozdaki düşüşe bağlı olarak, tartrazin konsantrasyonları ile NBI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

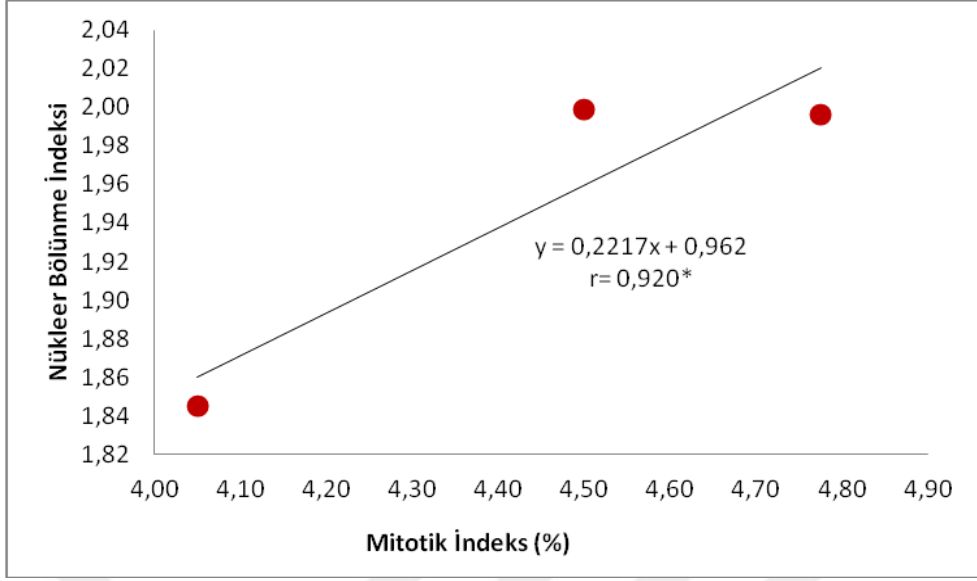
4.1.4. Tartrazin Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak MI ve NBI Arasındaki İlişki

Tartrazin ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde hem MI hem de NBI değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Tartrazin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MI değerleri azalırken, 1250 µg/ml konsantrasyondaki artıştan dolayı NBI değerlerindeki düşüşler konsantrasyon artışına paralel bulunmamıştır. Bu durum, tartrazin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MI ve NBI değerleri arasındaki ilişkiye dayanan korelasyonun biraz düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tartrazinin S9 karışımı kullanılmadan test edilen konsantrasyonları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: p<0.05)

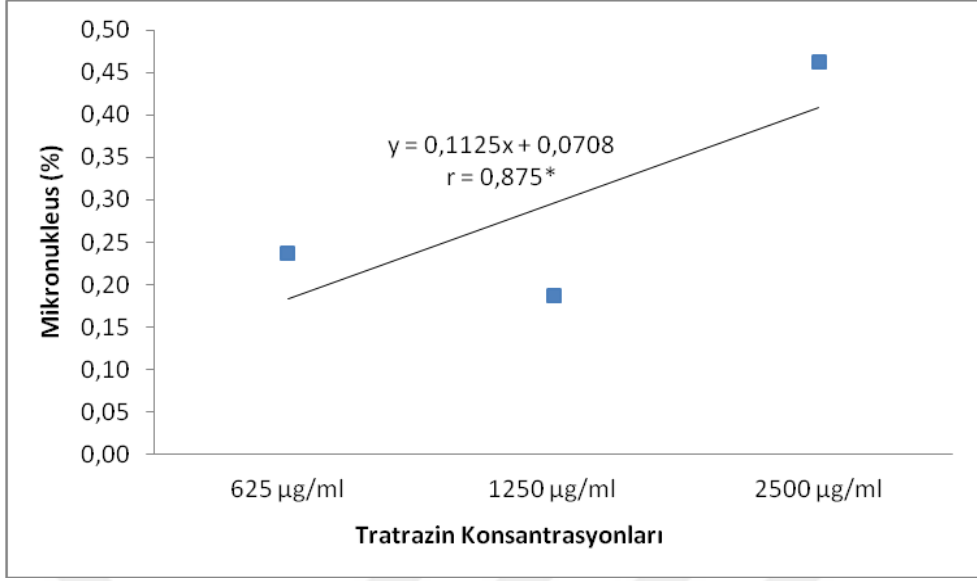
S9 karışımı varlığında tartrazin ile 3 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde, tartrazinin konsantrasyon artışına bağlı olarak MI değerlerini ve en yüksek konsantrasyonda (2500 µg/ml) NBI değerini düşürdüğü için, tartrazinin konsantrasyonlarına bağlı olarak bu parametreler arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

4.1.5. Tartrazinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

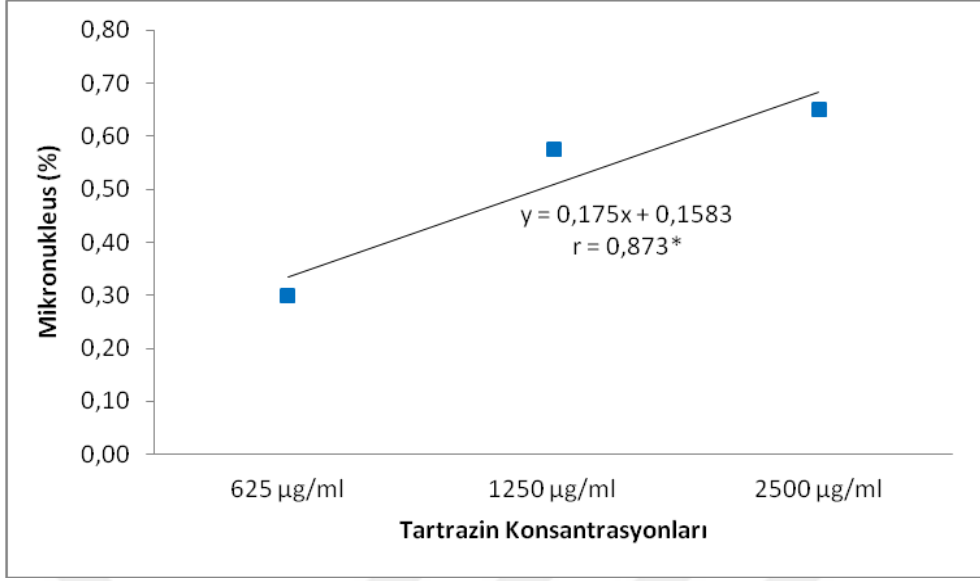
Tartrazinin 625 ve 2500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının insan periferik lenfositlerine 48 saatlik muameleleri sonucu MN oluşumunun arttığı görülmüştür. Tartrazinin 1250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu çözücü kontrol ile aynı % MN değerine sahip olduğu için, bu konsantrasyonun MN oluşumunu uyarmadığı sonucuna varılmıştır. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, tartrazinin sadece test edilen en yüksek dozu olan 2500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda ortaya çıkan MN yüzdesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). MN bulunduran BN hücrelerin toplam sayısı da, tartrazinin 625 ve 2500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının uygulaması sonucu artış göstermiştir. MN değerlerinde olduğu gibi tartrazinin 1250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda çözücü kontrol ile aynı BN hücre sayısı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). 1250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda artış olmadığı için, MN artışının tartrazin konsantrasyonunun artışına bağlı olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, tartrazin konsantrasyonları ile MN değerleri arasındaki korelasyonu istatistiksel olarak biraz zayıflatmıştır (Şekil 4.18).



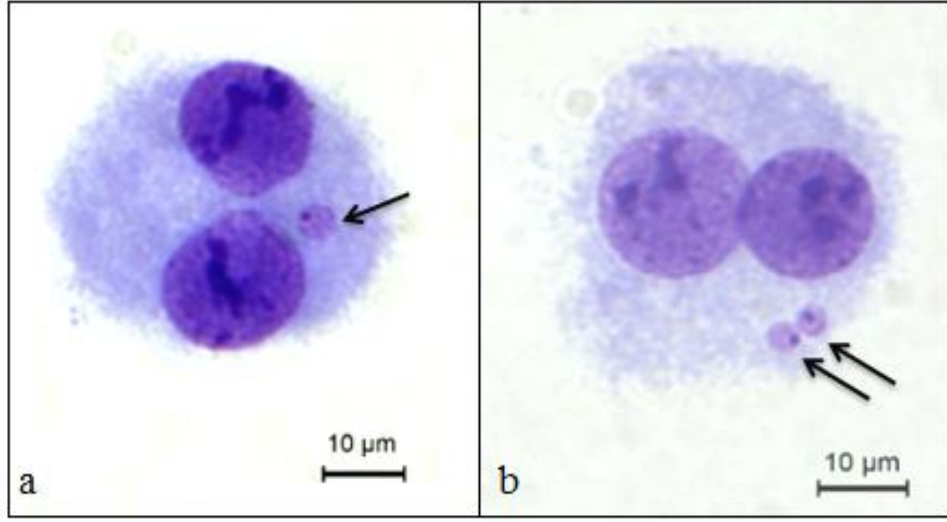
Şekil 4.18. Tartrazin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0.05$)

S9 karışımı bulunan besin ortamında tartrazin ile muamele edilen hücrelerde, konsantrasyon artışına bağlı olarak MN oluşumunun da arttığı görülmüştür. Ancak çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, bu artışlardan sadece en yüksek tartrazin konsantrasyonundaki % MN değeri istatistiksel açıdan anlamlı olmuştur ($p < 0.05$). Tartrazin konsantrasyonunun artması sonucu MN bulunduran BN hücrelerin toplam sayısının da artış gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Tartrazin konsantrasyonlarının artışına paralel olarak MN frekansında da artış olmasından dolayı, tartrazin konsantrasyonları ile MN değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.19).

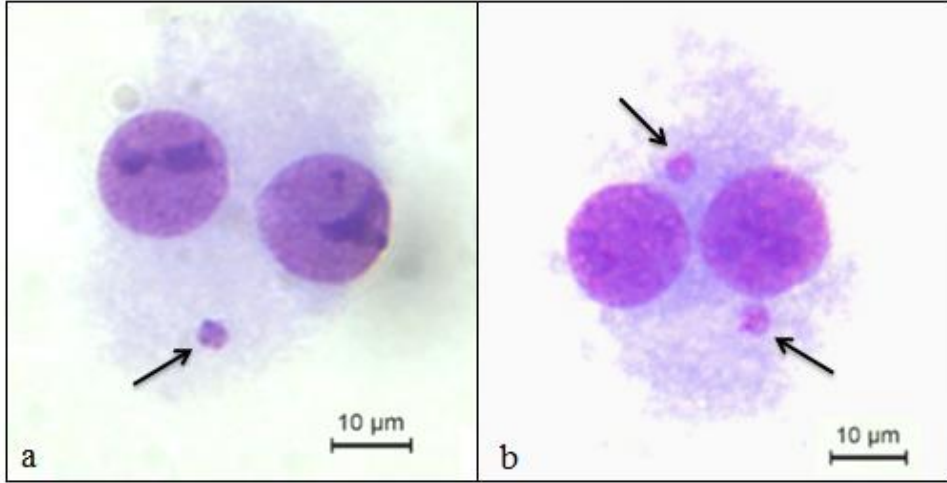
Tartrazin insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu oluşan MNBN'lere ait çeşitli örnekler Şekil 4.20, Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Tartrazin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: $p < 0,05$)



Şekil 4.20. Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (625 µg/ml tartrazin) X400



Şekil 4.21. Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (2500 µg/ml tartrazin) X400

Çizelge 4.2. Metabolik aktivator (S9 karışımı) bulunan ve bulunmayan ortamda farklı dozlarda tartrazin ile muamele edilmiş insan periferik lenfosit hücre kültürlerinde binükleat hücreler (BN), mikronükleus (MN) yüzdesi ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

Test Maddesi	Muamele Süresi	Konsantrasyon	MN Sayısına Göre BN Hücrelerin Dağılımı					MN % ± SE	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ± SE
			0	1	2	3	>3		1	2	3	4	
			DS	48 saat	10 µl/ml	7985	15		-	-	-	0.19±0.10	
MMC	48 saat	0.16 µg/ml	7482	503	14	1	-	6.46±1.55*	2102	1706	107	85	1.54±0.05*
TRZ	48 saat	625 µg/ml	7981	19	-	-	-	0.24±0.06	1113	2238	167	228	1.75±0.10
TRZ	48 saat	1250 µg/ml	7989	15	-	-	-	0.19±0.04	1434	2161	176	229	1.80±0.04
TRZ	48 saat	2500 µg/ml	7965	33	2	-	-	0.46±0.01*	1934	1726	195	145	1.64±0.08
DS	3 saat	10 µl/ml	7979	20	1	-	-	0.28±0.06	1102	2272	342	284	1.95±0.20
CP	3 saat	45 µg/ml	7914	80	5	1	-	1.16±0.09*	2329	1595	48	28	1.44±0.02*
TRZ	3 saat	625 µg/ml	7977	22	1	-	-	0.30±0.08	915	2488	294	303	2.00±0.15
TRZ	3 saat	1250 µg/ml	7958	40	1	-	1	0.58±0.21	959	2404	331	306	2.00±0.18
TRZ	3 saat	2500 µg/ml	7957	37	3	3	-	0.65±0.11*	1232	2345	234	189	1.85±0.10

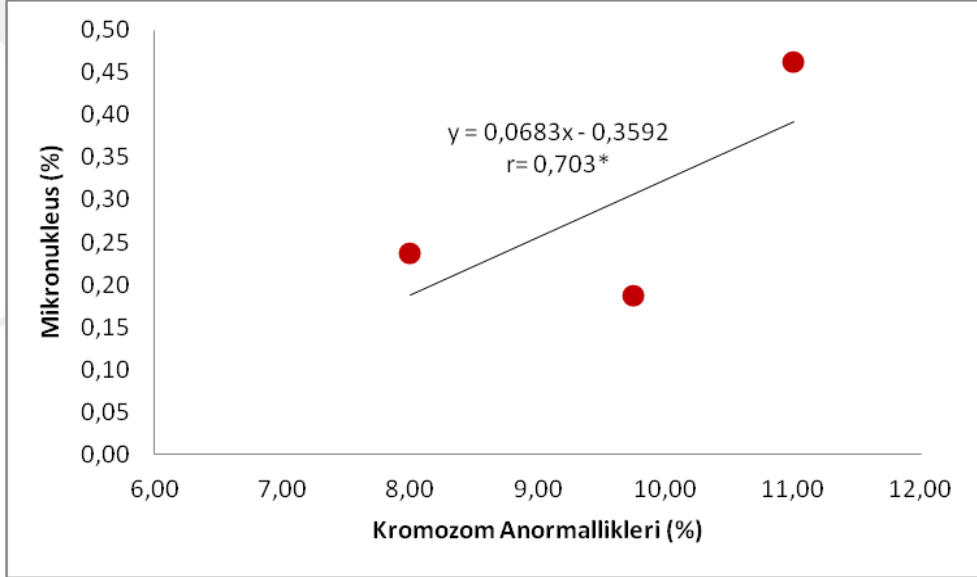
Negatif (çözücü) Kontrol: Distile su (DS)

Pozitif kontrol: Siklofosamid (CP)

*: Çözücü kontrole göre anlamlı, $P < 0.05$.

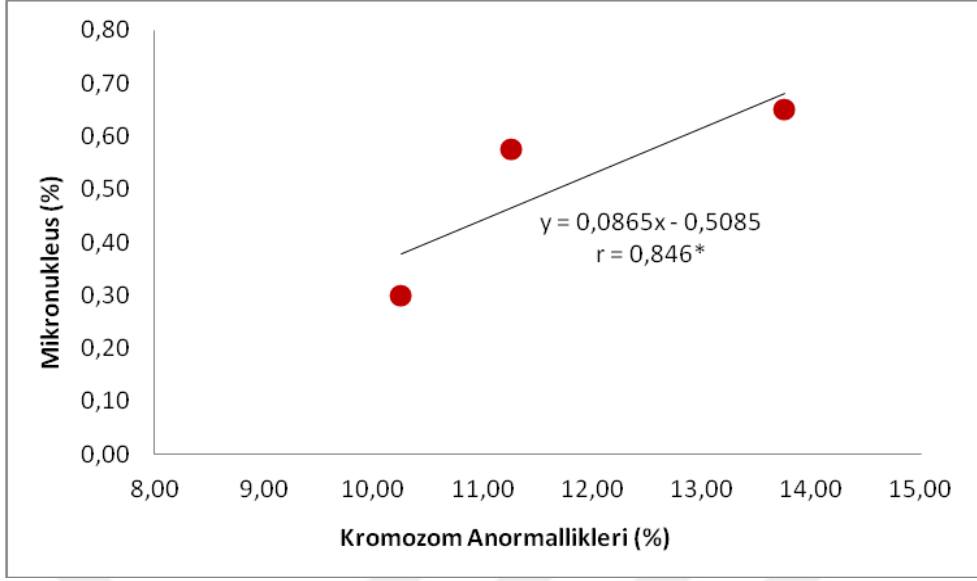
4.1.6. Tartrazin Dozlarına Bağlı Olarak KA ve MN Arasındaki İlişki

İnsan periferik lenfositlerine 48 saat boyunca uygulanan tartrazin KA ve MN oluşumunda artışa yol açabildiği görülmüştür. KA frekansındaki artışın konsantrasyon artışına bağlı olduğu saptanırken, MN frekansında konsantrasyon artışına bağlı bir artış görülmemiştir. Tartrazin 625 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarda MN oluşumunu artırmasına rağmen, 1250 µg/ml konsantrasyonu çözücü kontrol ile aynı MN değerini ortaya çıkardığı ve bu konsantrasyonda MN oluşumunu uyarmadığı görülmüştür. MN frekansındaki artışlar doza bağlı olmadığı için, istatistiksel olarak tartrazin konsantrasyonlarına bağlı olarak KA ile MN değerleri arasındaki korelasyon değeri biraz düşük bulunmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Tartrazin S9 karışımı kullanılmadan test edilen dozları ile % MN ve % KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: p<0.05)

S9 karışımı varlığında tartrazin ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak KA ve MN değerleri de arttığı için (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2), bu parametreler arasında istatistiksel anlamda önemli bir korelasyon saptanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Tartrazinin S9 karışımı ile test edilen dozları ile % MN ve % KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (*: p<0.05)

4.1.7. Tartrazinin Sitotoksite ve Genotoksitesinin S9 Karışımının Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Çalışmalarla Bu Çalışmanın Sonuçlarının Tartışılması

Hücre siklusu, proliferere olmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen, bir dizi biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü ve iki hücrenin oluşumuyla tamamlanan bir süreçtir. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (check-points) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Bu kontrol noktalarında varsa genetik defektler düzeltilir ve hücre siklusunun devam edip etmeyeceğinin kararı verilir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler. Radyasyon veya değişik mutajenlerle muamele edilen hücrelerde DNA'da meydana gelen hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları G1'den S fazına veya G2'den mitozaya geçişi engeller. Tanınan sürede DNA hasarı tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider (Vermeulen ve ark., 2003; Maddika ve ark., 2007; Cabadak, 2008; Foster, 2008; Konaş, 2012). Hücre siklusunun düzenlenmesindeki hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına ve kanser gelişimine neden olabildiği için, hücre siklusunu düzenleyen ve kontrol eden etkileşimler çok önemlidir (Cabadak, 2008).

MI değeri, hücre siklusundaki metafazda bulunani hücre yüzdesini gösterdiği için, MI'deki düşüşler hücre siklusundaki inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı yansıtmaktadır (Gökalp-Muranlı, 2006; Kontaş, 2012). MI'deki düşüş, hücre döngüsünün G2 fazının engellenmesi nedeniyle hücrenin mitozu geçememesinden veya ATP seviyesinin düşmesi ve enerji üretim merkezinin zorlanması gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Maddelerin antimitotik aktivitesi ise, hücre döngüsüne özgü enzimlerin ve proteinlerin inhibisyonu, DNA sentezinin veya iğ ipliklerinin inhibisyonundan kaynaklanabilir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Kontaş, 2012). NBI değerleri de çeşitli ajanların sitotoksik ve sitostatik etkileri hakkında önemli bilgiler vermekte ve hücre siklusu kinetiğinin ölçülmesine imkan sağlamaktadır (Laffon ve ark., 2001; Gökalp-Muranlı, 2006; Kontaş, 2012). Çünkü NBI'deki anlamlı azalmalar, hücre siklusundaki gecikmeleri de göstermektedir (Laffon ve ark., 2001; Eke, 2007; Kontaş, 2012).

Tartrazinin oral yoldan uygulandığı farelerde MI'de azalma tespit edilmiştir (Farag ve ark., 2001). Yapılan bir *in vitro* çalışmada, insan periferel kan hücrelerinde hücre bölünmesinde gecikmeler ortaya çıkardığı ve MI değerini önemli ölçüde azalttığı için tartrazinin sitotoksik potansiyele sahip olabileceği ileri sürülmüştür (Mpountoukas ve ark., 2010). Benzer şekilde, 0.4 ve 4 ml dozlarına 24 ve 48 saat maruz bırakılan *Allium cepa* kök meristematik hücrelerinde tartrazinin MI değerlerini düşürdüğü ve önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2013). Tartrazinin normal büyüme sürecindeki insan mide hücrelerinin yenilenebilme hızını da değiştirebileceği rapor edilmiştir (Gomes ve ark., 2013). Tartrazin konsantrasyonunun ve muamele süresinin artması ile *Allium cepa*'da pek çok mitotik anormallik ve değişimlerin oluştuğu, MI'de düşüş meydana geldiği ve DNA ve RNA miktarlarında azalma görüldüğü bildirilmiştir (Mahfouz ve El-Shammrani, 2013). İçlerinde tartrazin de bulunan bazı toz meyve sularının *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde sitotoksisiteyi artırdığı belirtilmiştir (Bezerra ve ark., 2016). Bu çalışmaların sonuçlarına benzer olarak bizim çalışmamızda da, S9 karışımı bulunmayan insan periferel lenfosit kültürlerinde en yüksek tartrazin konsantrasyonu MI'yi istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltmış ve bu nedenle sitotoksik ve sitostatik etki göstermiştir.

KA ve MN testleri, genotoksisitenin belirlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan testlerdir. KA'lar, DNA düzeyindeki hasarların sonucu olarak ortaya çıkarlar. KA'lardaki artış, klastojenitenin bir göstergesidir ve kanser ve diğer bazı genetik hastalıkların ortaya çıkma riskini artırmaktadır. Bu nedenle KA testi, mutajen ve karsinojenlerin genotoksik risklerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir (Anderson, 1988; Savage, 1993; Norppa ve ark., 2006; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012). MN testi de, genotoksisite ve karsinojenitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan sitogenetik yöntemlerdendir. MN'ler asentrik kromozomlardan ya da anafazda geri kalarak mitoz sırasında kutuplara gidemeyen kromozomdan oluşurlar ve ana çekirdekten daha küçük bir çekirdekçik olarak görülürler (Fenech ve Morley, 1985; Fenech, 2000; Kontaş, 2012). MN oluşumu ile kanser arasındaki ilişki açıkça desteklendiği için, MN testi ile bu tip genetik hasarların uygun ve güvenilir ölçümü sağlanmaktadır (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Fenech ve ark., 1999; Norppa ve Falck, 2003; Yavuz-Kocaman, 2007; Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kontaş, 2012).

Tartrazinin mutajenite ve genotoksisitesi ile ilgili hem negatif hem de pozitif sonuçlar veren çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalar tartrazinin, mutajenik genotoksik ve karsinojenik etkileri olduğunu gösterirken, bazı çalışmalarda bu tip etkiler göstermediğini bildirilmiştir (Himri ve ark., 2012; Kirkland ve ark., 2011; Gomez ve ark., 2013; Mehedi ve ark., 2013; Dos Santos ve ark., 2014; Soares ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda, S9 karışımının varlığında ve yokluğunda özellikle yüksek dozlardaki tartrazinin KA ve MN oluşumunu önemli ölçüde uyardığı ve hem tartrazinin hem de metabolitlerinin insan lenfositleri için genotoksik potansiyele sahip olabilecekleri belirlenmiştir. Bizim bulgularımızın aksine, daha önce yapılan bazı çalışmalar tartrazinin mutajenik, genotoksik ya da karsinojenik etkisinin bulunmadığını göstermiştir. *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de yapılan *in vitro* çalışmalarda tartrazinin yol açtığı herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır (Karpliuk ve ark., 1984; Henschler ve Wild, 1985; Pollastrini ve ark., 1990; Izbirak ve ark., 1990). Beş günlük tartrazin uygulamasının farelerde KA frekansını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmadığı görülmüştür (Durnev ve ark., 1995). Tartrazinin Ames testinde *S. typhimurium* suşlarında mutajenik olmadığı

ve fare kemik iliği hücrelerinde KA frekansını önemli ölçüde artırmadığı için genotoksik olmadığı belirtilmiştir (Das ve Mukherjee, 2004). Elhkim ve ark., (2007), tartrazinin *in vitro* veya *in vivo* mutajenik veya klastojenik potansiyeli olmadığını belirtmiştir. Tartrazinin farelerde MN oluşumunu önemli olacak ölçüde uyardığı ve bu nedenle genotoksik olmadığı ifade edilmiştir (Poul ve ark., 2009). S9 karışımı yokluğunda tartrazinin *S. typhimurium* üzerinde herhangi bir mutajenik aktivite göstermediği Ames testi ile belirlenmiştir (Öncül, 2009). Ames testi, fare lenfoma testi ve *in vivo* MN testi uygulamaları sonucu tartrazinin mutajenik ya da genotoksik etkiye sahip olmadığı ifade edilmiştir (Kirkland ve ark., 2011). Sıçanlar ve fareler ile yapılan bir kronik toksisite çalışmasında tartrazinin karsinojenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Mehedi ve ark., 2013). Ultraviyole uyarısına maruziyet sonrasında da tartrazinin mutajenik aktivite göstermediği Ames testi ile belirlenmiştir (Dos Santos ve ark., 2014).

Bu çalışmaların aksine, yapılan bazı çalışmalar tartrazinin DNA hasarına neden olabileceğini ve bu nedenle mutajenik, genotoksik ve karsinojenik potansiyelinin bulunduğunu göstermiştir. Tartrazinin Hint muncağı'nın (*Muntiacus muntjak*) fibroblast hücrelerinde KA frekansını artırdığı gösterilmiştir (Patterson ve Butler, 1982). Tartrazine maruz bırakılan Çin Hamster fibroblast hücrelerinde poliploid hücrelerin görülme sıklığında küçük bir artış olduğu bildirmiştir (Ishidate ve ark., 1984). Beslenme yoluyla tartrazine maruz bırakılan fare ve sıçanların kemik iliğinde KA ve KKD oranlarında önemli artışlar gösterilmiştir (Giri ve ark., 1990). Oral yoldan tartrazin uygulanan farelerde KA oluşumunda artış tespit edilmiştir (Farag ve ark., 2001). Tartrazine akut oral maruziyet sonrasında; mide, kolon ve mesanede doza bağlı olarak DNA hasarının arttığı Comet testi ile belirlenmiştir (Sasaki ve ark., 2002). Tartrazine maruz bırakılan *Cyprinus carpio*'nun eritrositlerinde MN frekansının hem doza hem de zamana bağlı olarak önemli bir artış gösterdiği ve tartrazinin bu balık türünde genotoksisiteyi uyardığı gösterilmiştir (Yırtıcı, 2007). Oral yolla tartrazin uygulanan farelerde, tartrazinin doz artışına bağlı olarak kemik iliği hücrelerinde KA oluşumunu artırdığı ve karaciğer ve böbrek hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu Comet testi ile belirlenmiştir (Hassan, 2010). İnsan periferik lenfositlerine uygulanan tartrazinin DNA'ya bağlanabildiği ve mitozda kromozomların paketlenmesini etkileyerek kromozomların kalitesi üzerine toksik

etkiye yol açtığı belirtilmiştir (Mpountoukas ve ark., 2010). Tartrazinin *in vitro* KA ve *in vivo* kromozom kırıklarını artırdığı da ifade edilmiştir (Kirkland ve ark., 2011). Tartrazinin DNA ile etkileşime girerek oksidatif stresin oluşumuna yol açtığı ileri sürülmüştür (Kashanian ve Zeidali, 2011). Tartrazinin de bulunduğu bazı sentetik gıda boyalarının ve bunların kombinasyonlarının izin verilen dozlarda bile insan lenfositleri için genotoksik olabildiği ileri sürülmüştür (Swaroop ve ark., 2011). Comet testi uygulanarak yapılan bir çalışma, tartrazininin kan hücreleri üzerinde genotoksik olabileceğini göstermiştir (Himri ve ark., 2012). Tartrazine maruz bırakılan insan lenfositlerinde; tartrazinin sitotoksik etki göstermediği, ancak genotoksik etkisinin olduğu görülmüştür (Soares ve ark., 2015). Tartrazinin DNA'nın küçük oluşuna bağlanabildiği için DNA ile etkileşime girebileceği gösterilmiştir (Basu ve Kumar, 2016). Tartrazin gibi boyar maddelerin bulunduğu bazı toz meyve sularının *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde MN oluşumunu önemli ölçüde artırdığı ve genotoksik oldukları bildirilmiştir (Bezerra ve ark., 2016). Daha önce yapılan bu çalışmaların sonuçları, bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Çünkü bizim çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyonlardaki tartrazin lenfosit kültürlerinde KA, AHO ve MN oluşumunu önemli ölçüde artırmıştır.

Tartrazinin gastrointestinal mikroflora tarafından metabolize edildikten sonra da sitotoksik potansiyel gösterebildiği rapor edilmiştir (Gomes ve ark., 2013). Belirtilen bu sonucun aksine, bizim çalışmamızda S9 karışımı ilave edilen insan lenfosit kültürlerinde tartrazinin, MI ve NBI değerlerinde istatistiksel açıdan önemli azalmalara yol açmadığı ve bu nedenle sitotoksikiteye yol açmadığını göstermiştir.

Tartrazin metabolitlerinin olası mutajenik potansiyeli ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. Tartrazinin sülfanik asit ve aminopiralozon gibi metabolitlerinin mutajeniteyi indüklemediği Ames testi ile belirlenmiştir (Chung ve ark., 1981; Münzner ve Wever, 1987). Ancak, başka bir çalışmada tartrazinin sadece görünür ışık ile bağlantılı mutajen olduğu Ames testi yoluyla saptanmıştır (Merville ve ark., 1984). S9 karışımı varlığında bazı *S. typhimurium* suşlarında tartrazin dozunun artışına bağlı olarak mutajenitenin de arttığı saptanmıştır (Henschler ve Wild, 1985). Fare karaciğer enzimleri varlığında (S9 karışımı varlığında) tartrazinin *S. typhimurium*'de mutajenik etki gösterdiği Ames testi ile belirlenmiştir (Öncül, 2009).

Tartrazinin, S9 karışımı bulunan ve bulunmayan ortamda Salmonella türünde mutajenik aktivite göstermediği Ames testi ile belirlenmiştir (Dos Santos ve ark., 2014). Ancak, S9 karışımı varlığında tartrazinin metabolitlerinin insan hücrelerindeki olası genotoksik potansiyeli hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda S9 karışımı ilave edilerek hazırlanan kültürlerde, tartrazinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda KA, AHO ve MN değerlerini önemli derecede artırması nedeniyle, tartrazinin metabolitlerinin de tıpkı tartrazin gibi insan lenfositlerinde genotoksik etkisinin bulunduğunu belirlenmiştir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, gıda boyası olarak sıklıkla kullanılan tartrazinin, insan karaciğer fraksiyonu yani metabolik aktivatör (S9 karışımı) bulunan ve bulunmayan ortamlarda *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Tartrazinin genotoksitesinin belirlenmesi amacıyla, sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerine *in vitro* KA ve MN testleri uygulanmıştır. Bu amaçla insan periferik lenfositleri 625, 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlardaki tartrazin ile S9 karışımı yokluğunda 48 saat, S9 karışımı varlığında ise 3 saat muamele edilmiştir. Sitotoksiteyi belirlemek için tartrazinin MI ve NBI üzerindeki etkileri ve bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Günümüzde gıda boyaları içeren besinlerin tüketiminin artışı, boyar maddelerin toksisitesileriyle ilgili şüpheleri de arttırmaktadır. Çünkü bazı gıda katkı maddelerinin tüketiminin, kullanım miktarlarından daha az miktarlarda bile olumsuz etkilere yol açabildiği belirtilmektedir. Tartrazin ile yapılan sitotoksikite ve genotoksikite çalışmalarında farklı araştırmacılar farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, S9 karışımı bulunmayan besin ortamında özellikle yüksek dozlarda MI değerini istatistiksel anlamda önemli olacak şekilde düşürdüğü için tartrazinin sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Benzer şekilde özellikle yüksek dozlarda S9 karışımı bulunan ve bulunmayan ortamlarda KA, AHO ve MN değerlerini istatistiksel olarak önemli ölçüde arttırdığı için tartrazinin ve metabolitlerinin genotoksik etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir. Daha önceden yapılan pek çok çalışma da bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak göstermektedir ki; tartrazin çeşitli hücreler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterebilir. Bizim sonuçlarımız, tartrazinin metabolitlerinin de lenfosit kültürlerinde genotoksik etkileri olabileceğini gösterdiği için, tartrazin ve metabolitlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin daha detaylı çalışmalar ile mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, daha önce yapılan çeşitli çalışmalarla tartrazinin, kanserin başlıca nedeni olarak kabul edilen DNA hasarının oluşumuna neden olabileceği de gösterildiğinden, tartrazin içeren besinleri tüketen insanlarda, özellikle çocuklarda olası bir risk değerlendirmesi yapılması çok önemlidir.

Sonuç olarak, gerek bizim gerekse başka araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulacak olursa; tartrazinin sitotoksitesisi, genotoksitesisi ve karsinojenitesi hakkında kesin yargıya varmak, etki mekanizmalarını ve bu mekanizmalar arasındaki ilişkileri belirlemek ve bu gıda boyasının kullanımı ile ilgili düzenlenmelerin yapılabilmesi için, farklı hücre hatlarının ve farklı genotoksite test sistemlerinin kullanıldığı daha detaylı *in vitro* ve *in vivo* sitogenetik çalışmalar yapılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Adams, J.B., Langley, F.M. 1995. Interaction between additives in food systems. Campden-Chorleywood Food Research Association, 20: 72-74.
- Akgün, M. 2002. Gıda boyalarının türev spektrofotometrik yöntem ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H.,Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. Ipcs guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research, 463 (2): 11-172.
- Altuğ, T., 2001. Gıda Katkı Maddeleri. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Meta Basım, İzmir, 286 s.
- Amin, K.A., Abdel-Hameid, H., AbdElsttar, A.H. 2010. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. Food and Chemical Toxicology, 48 (10): 2994-2999.
- Anderson, D., Jenkinson P.C., Dewdeney R.S., Franis A.J., Godbert P., Butterworth K.R., 1988. Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of u.k. population. Mutation Research, 204: 407-420.
- Atlı, B. 2010. Gıda boyaları. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Atlı-Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2011. Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi, 4 (3): 221-229.
- Bağcı, T. 1997. Gıda katkı maddeleri ve sağlığımız üzerine etkileri. Hacettepe Tıp Dergisi, 28 (1): 18-23.
- Banerjee, S., Fallis, A.G., Brown, D.L. 1997. Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. Oncology Research, 9(5): 237-248.
- Basu, A., Kumar, G.S. 2016. Studies on the interaction of the food colorant tartrazine with double stranded deoxyribonucleic acid. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 34 (5): 935-942.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M., 2004. DNA hasarı analizinde μ fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2 (3): 97-103.
- Bezerra, M.d.S., Malaquias, G.d.S., Sousa, J.M.d.C, Peron, A.P. 2016. Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. Food Science and Technology (Campinas), 36 (1): 49-55.
- Börçek-Kasurka, C. 2010. Antihistaminik ilaç olarak kullanılan feksofenadin etken maddesinin insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Cabadak, H. 2008. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (3): 51-61.
- Choy, W.N. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 390 pp.

- Chung, K.T, Fulk GE, Andrews, A.W. 1981. Mutagenicity testing of some commonly used dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 42 (4): 641-648.
- Çukadar, N. 2014. İçeceklerdeki tartrazin miktarının HPLC-UV yöntemi ile tayini. Bitirme Ödevi, Kayseri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- Das, A., Mukherjee, A. 2004. Genotoxicity testing of the food colours amaranth and tartrazine. *International Journal of Human Genetics*, 4: 277-280.
- Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D. 1998. Predictive value of *in vitro* models, systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38: 63-96.
- Demirkol, O., Zhang, X., Ercal, N. 2012. Oxidative effects of tartrazine (CAS No. 1934-210) and new coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 7: 229-236.
- Deshpande, S.S. 2002. *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, Inc., 880 pp.
- Dos Santos, T.C., Zocolo, G.J, Morales, D.A, de Aragao Umbuzeiro, G., Zanoni, M.V.B. 2014. Assessment of the breakdown products of solar/UV induced photolytic degradation of food dye tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 68: 307-315.
- Durnev, A.D., Oreshchenko, A.V., Kulakova, A.V., Beresten, N.F. 1995. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, 41: 50-53.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13: 34-43.
- Eke, D. 2007. Thimerosal'in insan lenfosit hücre kültürlerinde genotoksik, mutajenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
- Elhkim, M.O., Héraud, F., Bemrah, N., Gauchard, F., Lorino, T., Lambré, C., Frémy, J.M., Poul, J.M. 2007. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47: 308-316.
- El-Saadany, S.S. 1991. Biochemical effect of chocolate colouring and flavouring like substances on thyroid function and protein biosynthesis. *Die Nahrung*, 35: 335- 43.
- Erden-Çalışır, Z., Çalışkan, D. 2003. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3): 207-206.
- Esin, A. 1999. Gıda Katkı Maddeleri, Seminer, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı.
- Evans, H.J. 1984. *Handbook of mutagenicity test procedures: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests*, Ed.: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel C., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp: 405-427.
- Farag, I.M., Abdel-Aziz, K.B., El-Nahass, E., Zaher, M., Hegazy, M.A., Roshdy, H.M. 2001. 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.

- Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392 (1-2): 11-18.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455 (1-2): 81-95.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring dna damage in humans. *Mutation Research*, 428 (1-2): 271-283.
- Fenech, M., Morley, A.A. 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43 (172-173): 233-246.
- Foster, I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.
- Giri, A. K., Das, S. K., Talukader, G. and Sharma, A. 1990. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartrazine on mammalian cells *in vivo*. *Cytobios*, 62: 111-117.
- Gomes, K.M.S., de Oliveira, M.V.G. A., Carvalho, F. R. D., Menezes, C. C., Peron A. P. 2013. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33 (1): 218-223.
- Goodman, D. 1990. Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxytoluene (BHT). *Journal Allergy Clinical Immunology*, 86 (4): 570-575.
- Gökalp-Muranlı, F.D. 2006. Kültürü yapılan insan lenfositlerinde triasulfuron'un genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.
- Hassan, G.M. 2010. Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab Journal of Biotechnology*, 13 (1):13 24.
- Henschler, D., Wild, D. 1985. Mutagenic activity in rat urine after feeding with the azo dye tartrazine. *Archives of Toxicology*, 57 (3): 214-215.
- Himri, I., Souana, F., Aziz, M., Hakkou, A., Saalaoui, E. 2012. DNA Damage induced by tartrazine in rat whole blood using comet assay (single cell gel electrophoresis). *Advances in Environmental Biology*, 6 (11): 2875-2881.
- Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., Matsuoka, A. 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Cosmetics Toxicology*, 22 (8): 623-636.
- İzbrak, A., Sümer, S., Diril, N. 1990. Gıdalara katılan bazı azo boya ların mutajenik etkilerinin test edilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 48-56.
- Jones, R., Ryan, A.J. 1964. The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Food and Cosmetics Toxicology* 2: 447-52.
- Karaali, A., Özçelik, B. 1993. Gıda katkı s ı olarak dogal ve sentetik boyalar. *Gıda*, 18 (6): 389-396.
- Karpliuk, I.A., Volkova, N.A., Okuneva, L.A., Gogol, A.T., Rybakova, K.D. 1984. Mutagenic effect of the food-coloring agents tartrazine and indigo carmine. *Voprosy Pitaniia*, 2: 58-61.
- Kashanian, S., Zeidali, S.H. 2011. DNA binding studies of tartrazine food additive. *DNA and Cell Biology*, 30 (7): 499-505.

- Kaya, F.F. 2005. Gıda katkı maddesi olan potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde *in vitro* genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Kırca-Ekinci, N. 2011. Muhtelif gıda boyalarının *Pisum Sativum L.* üzerine genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.
- Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P. 2011. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutation Research*, 721: 27-73.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392 (1-2): 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141: 63-74.
- Kontaş, S. 2012. Loratadin'in insan periferik lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J. 2001. Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491 (1-2): 163-172.
- Larsson, K.S. 1975. A teratologic study with the dyes amaranth and porceau-4R in mice. *Toxicology*, 4: 75-82.
- Mace, M.L.J., Daskal, Y., Wray, W. 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research*, 52: 199-206.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M. 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are inter connected: implications for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 10 (1-2): 13-29.
- Mahfouz, H., Al-Shammrani, S. 2013. Protective action of vitamin C against mutagenic effects of synthetic food color tartrazine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7 (35): 2474-2483.
- Marmion, M.M. 1991. Handbook of U.S. colorants: foods, drugs, cosmetics and Medical Devices. John Wiley and Sons, New York, 592 pp.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88 (11): 1515-1531.
- Mehedi, N., Mokrane, N., Alami, O., Ainad-Tabet, S., Zaoui, C., Kheroua, O., Saidi, D. 2013. A thirteen week *ad libitum* administration toxicity study of tartrazine in Swiss mice. 12 (28): 4519-4529.
- Mervat, M.K., Heba, S.E. 2011. The potential health hazard of tartrazine and levels of hyperactivity, anxiety-like symptoms, depression and anti-social behaviour in rats. *Journal of American Science*, 7 (6): 1211-1218.

- Merville, M.P., Decuyper, J., Lopez, M., Piette, J., Van de Vorst, A. 1984. Phototoxic potentialities of tartrazine: screening tests. *Photochemistry and Photobiology*, 40 (2): 221-226.
- Miller, K. 1982. Sensitivity to tartrazine. *British Medical Journal*, 285: 1597-1598.
- Monoret-Vautrin, D.A. 1986. Food antigens and additives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 78: 1039-1046.
- Mortelmans, K., Rupa, S.D. 2004. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56: 379-401.
- Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., Mourelatos, C., Lambropoulou, V., Lialiaris, T. 2010. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2934-2944.
- Münzner, R., Wever, J. 1987. Mutagenic activity of the feces of rats following oral administration of tartrazine. *Archives of Toxicology*, 60 (4): 328-330.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, L., Hagmard, L., Stromberg, U., Rossner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A. 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, 600 (1-2): 37-45.
- Norppa, H., Falck, G.C.M. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18 (3): 221-233.
- OECD, 2014. OECD Guidelines for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oece/oece-tg487-2014-508.pdf>-(Erişim tarihi: 07.11.2016).
- Öncül, Ö. 2009. Bazı gıda boyalarının mutajenik potansiyellerinin ames/mikrozom testi ile araştırılması ve β -galaktozidaz üzerine etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Park, M., Park, H.R., Kim, S.J., Kim, M.S., Kong, K.H., Kim, H.S., Gong, E.J., Kim, M.E., Kim, H.S., Lee, B.M., Lee, J. 2009. Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72 (21-22): 1412-1423.
- Patterson, R.M., Butler, J.S. 1982. Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 20 (4): 461-465.
- Paz-y-Mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E. 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environmental Health Perspective*, 110 (11): 1077-1080.
- Peltek, H. 2012. Yüzey aktif katyonlarla modifiye edilmiş ünye bentonit ve tartrazin boyar maddesi arasındaki etkileşimlerin XRD, TG/DTA FTIR analiz tekniklerinin kullanılmasıyla ve adsorbsiyon verilerinin değerlendirilmesiyle incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Rize.
- Perry, P.E., Thompson, J. 1984. The methodology of sister chromatid exchanges: Handbook of mutagenicity test procedures, Ed.: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, pp: 495-529.

- Pollastrini, M.T., Barea, M., Salas, J. 1990. Genotoxic study of commercial dyes with Tartrazine base in *S. typhimurium* his- and *E. coli* trp. *Revista De Sanidad E Higiene Publica*, 64: 203-209.
- Poul, M., Jarry, G., Elhkim, M.O., Poul, J.M. 2009. 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.
- Radomski, J.L. 1974. Toxicology of food colors. *Annual Review of Pharmacology*, 14: 127-137.
- Revankar, S.M., Lele, S.S. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology*, 98: 775-780.
- Robinson, M.K., Cohen, C., Fraissinette, A.B., Ponc, M., Whittle, E., Fentem, J.H. 2002. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (5): 573-592.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G. 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Research*, 60: 390-394.
- Saldamlı, İ. 1985. Gıda katkı maddeleri ve ingrediyeuler. Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara, s: 197.
- Saldamlı, İ., Uygun, Ü. 2005. Gıda katkı maddeleri: Gıda Kimyası, Editör: Saldamlı,İ., Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ankara, s: 487-522.
- Sarıkaya, R., Çakır, Ş. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 424-430.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., Erkoç, F. 2012. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88: 974-979.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519: 103-119.
- Savage, J.R.K. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22 (4): 198-207.
- Saygı, Ş. 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3): 291-298.
- Seyhan, S. 2006. Bazı gıdalarda tartrazin ve indigotin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Soares, B.M, Araujo, T.M., Ramos, J.A., Pinto, L.C., Khayat, B.M., de Oliveira Bahia, M., Montenegro, R.C., Burbano, R.M., Khayat, A.S. 2015. Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research*, 35 (3): 1465-1474.
- Swaroop, V.R. Dinesh Roy D. Vijayakumar T. 2011. Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*, 1: 128-134.
- Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu Z. 2011. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4): 241-252.

- Şimşek, A. 2012. Gıda katkı maddeleri hakkında genel bilgiler: Gıda katkı maddeleri rehberi, Lemi Yayınları, Eskişehir, s: 17-73.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T. 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro and in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, 388 (1): 85-95.
- Üstün, F. 2007. Albendazolün olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., vanBockstaele, D.R. 2003. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36 (3): 165-175.
- Vural, N. 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 677s.
- Yavuz-Kocaman, A. 2007. Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferel lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Yavuz-Kocaman, A., Topaktaş, M. 2007. *In vitro* evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48 (6): 483-490.
- Yentür, G., Karakaya, A.E. 1985. Kullanımı yasaklanan aromatik azo yapısındaki gıda boyalarının bazı gıda maddelerinde araştırılması. *Gıda*, 10 (6): 371-376.
- Yılmaz, S. 2008. Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Yırtıcı, Ü. 2007. Tartrazin *Cyprinus caprio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Young, R.R. 2002. Genetic toxicology. *Toxicology*, 173: 103-121.
- Yurttagül, M., Ayaz, A. 2008. Katkı maddeleri, yanlıklar ve doğrular. T.C. Sağlık Bakanlığı, Beslenme Bilgi Serisi, Klasmat Matbaacılık, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H. 2006. Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604 (1-2): 53-59.
- Zeiger, E. 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 363-371.
- Zoli, W., Flamigni, A., Frassinetti, G.L., Bajorko, P., De Paola, F., Milandri, C., Amadori, D., Gasperi-Campani, A. 1995. *In vitro* activity of taxol and taxotere in comparison with doxorubicin and cisplatin on primary cell cultures of human breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 34 (1): 63-69.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Büşra GÜNEŞ
Doğum Yeri : Fatsa/ ORDU
Doğum Tarihi : 12/12/1989
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : gunes.busra52@gmail.com
İletişim Bilgileri : Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Hitit Üniversitesi	2008
Y. Lisans	Biyoloji	Ordu Üniversitesi	2013

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl

Yayımlar:

- 1.
- 2.