

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DOĞUM ÖNCESİ NOAEL (NO OBSERVED ADVERS EFFECT
LEVEL-GÖZLENEBİLİR YAN ETKİ OLUŞTURMAYAN
DÜZEY) DÜZEYİNDE SENTETİK GIDA BOYALARINA
MARUZİYETİN ERİŞKİN DÖNEMDE ÖĞRENMEYE
ETKİLERİ**

Dr. Firdevs AYLAK

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN

ISPARTA 2012

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DOĞUM ÖNCESİ NOAEL (NO OBSERVED ADVERS EFFECT
LEVEL-GÖZLENEBİLİR YAN ETKİ OLUŞTURMAYAN
DÜZEY) DÜZEYİNDE SENTETİK GIDA BOYALARINA
MARUZİYETİN ERİŞKİN DÖNEMDE ÖĞRENMEYE
ETKİLERİ**

Dr. Firdevs AYLAK

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 3110-TU-12 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ISPARTA 2012

ÖNSÖZ

Dört yıl süren Tıbbi Biyokimya Uzmanlık eğitimim süresince ve uzmanlık tezimin hazırlanmasında, bilgi ve deneyimleriyle benden hiçbir desteği esirgemeyen tez danışmanım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Fatih Gültekin'e, gerek uzmanlık tezimin hazırlanmasında gerekse eğitimim süresince bilgisi, önerileri ve hoşgörüsüyle her zaman bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Duygu Kumbul Doğuç'a, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Hüseyin Vural'a, Prof. Dr. İrfan Altuntaş'a, Prof. Dr. Recep Sütçü'ye, Doç. Dr. Efkân Uz'a ve Doç. Dr. Mehmet Akdoğan'a, istatistiksel analizlerde tecrübesini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Esin Kulaç'a, dört yıl boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman sevgi ve destekleriyle yanımda olan aileme, projemi yürütmemde katkılarından dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Danışma Kurulu'na sonsuz sevgilerimi, saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Firdevs AYLAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	4
2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı	4
2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları.....	4
2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinde Aranan Nitelikler ve Kullanımlarındaki Temel İlkeler	5
2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslar Arası ve Ulusal Kuruluşlar ve Yasal Düzenlemeler	6
2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirme .	10
2.1.6. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması	12
2.2. Gıda Boyaları (Renklendiricileri)	13
2.2.1. Gıda Boyalarının Sınıflandırılması	13
2.2.1.1. Doğal Boyalar	14
2.2.1.2. Yapay (Sentetik) Boyalar.....	14
2.2.2. Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Boyalar ve Özellikleri.....	15
2.2.3. Sentetik Gıda Boyalarının Endüstriyel Kullanım Alanları.....	16
2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sistemler Üzerine Etkileri.....	17
2.4. Öğrenme ve Hafıza	18
2.4.1. Hafızanın Sınıflandırılması	18
2.4.1.1. Kalıcılık Süresine Göre Hafıza Türleri	19
2.4.1.2. İçeriğine Göre Hafıza Türleri	20
2.5. Hipokampusün Yapısı ve Fonksiyonları.....	22
3. MATERYAL ve METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Deney Hayvanları.....	23

3.1.2. Sentetik Gıda Boyaları	24
3.2. Metod	24
3.2.1. Öğrenme ve Davranışsal Testler	24
3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze.....	24
3.2.1.2. Açık Alan Testi - Open Field Test.....	26
3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi - Forced Swim Test.....	27
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28
5. BULGULAR	30
5.1. Morris Su Labirenti Verileri.....	30
5.1.1. Hedef Platformu Bulma Süresi.....	30
5.1.2. Probe Test.....	34
5.1.3. Görünür Platform Testi (Visible Platform Test)	35
5.2. Açık Alan Testi (Open Field Test) Verileri	38
5.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test) Verileri	39
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
ÖZET.....	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57

KISALTMALAR

ADI	: Acceptable Daily Intake- Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
CAC	: Codex Alimentarius Commission-Uluslar arası Gıda Kodeks Komisyonu
CCFAC	: Codex Committee on Food Additives and Contaminants- Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi
DEHB	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
EFSA	: The European Food Safety Authority-Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: Food and Drug Administration- Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi
FAO	: Food and Agriculture Organization- Gıda Tarım Teşkilatı
GF	: Güvenlik Faktörü
GRAS	: Generally Recognize as Safe
INS	: International Numbering System- Uluslar arası Numaralama Sistemi
JECFA	: Joint Expert Committee on Food Additives- Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi
JMPR	: The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues
LTM	: Long Term Memory-Uzun Süreli Hafıza
MPI	: Maximal Permissible Intake Per Day- Günlük Alınmasına İzin Verilen Madde Miktarı
MPL	: Maximum Permissible Level in the Food- Gıdada Bulunmasına İzin Verilen En Yüksek Düzey
NOAEL	: No Observed Advers Effect Level- Gözlenebilir Yan Etki Oluşturmayan Düzey
SCF	: EU-Scientific Committe on Food- Avrupa Birliğine Bağlı Gıda Kontrol Komitesi
SSS	: Santral Sinir Sistemi
STM	: Short Term Memory-Kısa Süreli Hafıza
TGKY	: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
TMRI	: Therotical Maximum Residue Intake- Teorik Maksimum Kalıntı Miktarı
WHO	: World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Türk gıda kodeksine göre ülkemizde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri	9
Tablo 2. Tüm grupların hedef platformu bulma süreleri (sn).....	30
Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma süreleri (sn).....	32
Tablo 4. Tüm grupların probe test verilerinin karşılaştırılması.....	34
Tablo 5. Tüm grupların açık alan testi verilerinin karşılaştırılması	38
Tablo 6. Kontrol ve deney gruplarının açık alan testi verilerinin karşılaştırılması ...	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Uzun ve kısa süreli hafıza türleri	21
--	----

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1A. Tüm grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.....	31
Grafik 1B. Tüm grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.....	32
Grafik 2A. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması	33
Grafik 2B. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması	33
Grafik 3A. Tüm grupların probe test performanslarının karşılaştırılması	34
Grafik 3B. Kontrol ve deney gruplarının probe test performanslarının karşılaştırılması	35
Grafik 4A. Tüm grupların görünür platform performanslarının karşılaştırılması	36
Grafik 4B. Tüm grupların görünür platform testinde ortalama hızlarının karşılaştırılması	36
Grafik 4C. Kontrol ve deney gruplarının görünür platform performanslarının karşılaştırılması	37
Grafik 4D. Kontrol ve deney gruplarının görünür platform testinde ortalama hızlarının karşılaştırılması	37
Grafik 5A. Tüm grupların zorlanmış yüzme testi performansları	40
Grafik 5B. Kontrol ve deney gruplarının zorlanmış yüzme testi performansları	41

1. GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri, gıda güvenliğini arttırma, gıdaları tatlandırma, renklendirme ve raf ömrünü uzatmak için yüzyıllardır kullanılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin önemli bir sınıfını oluşturan gıda boyaları hava, ışık, nem ve aşırı ısıya maruziyetten kaynaklanan renk kaybını önlemek, tüketici için gıdayı daha çekici hale getirmek, geniş bir renk çeşitliliği sayesinde hoş gıdalar sağlaması nedeniyle gıdalara eklenmektedir. Doğal ve sentetik ürünler gıda boyası olarak kullanılmaktadır. Sentetik gıda boyaları yoğun ve tek tip renk sağlamaları, daha dayanıklı ve ucuz olmaları, gıdalarla daha kolay harmanlanarak çeşitli renkler oluşturabilmeleri sebebiyle gıda endüstrisinde daha çok tercih edilmektedir (1). Şekerlemeler, tatlılar, alkolsüz içecekler, pastalar, bisküviler, kuru toz içecekler, çorbalar, soslar, et ve balık ürünleri gibi pek çok üründe gıda boyaları kullanılmaktadır. Çalışmamızda günlük hayatta sık karşılaşılabilecek sentetik gıda boya larını içeren bir karışım uygulamaya çalıştık.

Bilimsel ve teknolojik gelişmelerin toplumsal yaşam şartlarını zamanla değiştirmesi, insanların beslenme şekillerini ve tercih ettikleri gıda tiplerini de eskiye göre oldukça farklı hale getirmiştir. Teknolojik işlemlerden geçmiş hazır gıdaların günlük hayatta tüketiminin artması sebebiyle, bu tür gıda maddeleri ve ürünlere katkı maddeleri eklemek de kaçınılmaz olmuştur. Yaşam boyu maruz kalınan bu hazır gıdalar ve bunlara eklenen katkı maddelerinin, insanlarda uzun süreli tüketiminin oluşturabileceği yan etkiler oldukça önem kazanmıştır. Bu katkı maddelerinin günlük tüketilen miktarları tam olarak tespit edilemediğinden maruz kalınan gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerinde uzun dönemde oluşturacağı yan etkiler de henüz tam olarak bilinmemektedir (2-4).

Öğrenme, deneyimlere dayalı olarak davranışın değiştirilmesi ve yeni bir bilgi kazanma veya bir yaşantı sonucunda davranış ve tepkilerin, gereksinimleri daha iyi karşılayacak şekilde değiştirilmesi ve yeni bir düzen içinde oluşumu şeklinde tanımlanabilmektedir. Kompleks bir fonksiyon olan öğrenme, sosyal ve fiziksel çevrenin yanında fizyolojik şartlardaki değişikliklerden etkilenir. Öğrenmenin biyolojik temelleri tam olarak açıklanamamıştır ve bu konuda hâlâ bilinmeyen çok

şey vardır. Öğrenme ve hafızanın altında yatan hücresel süreçlerin anlaşılması, öğrenme bozukluklarının giderilmesi için uygulanan tedavi yollarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Yapılan araştırmalarda tüketilen gıdaların da öğrenme üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (5)

Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB), çocuklarda en yaygın davranışsal bozukluklardan biridir. Hiperaktivite, engellenmeye düşük tahammül, dürtüsellik ve dikkatsizlik gibi semptomları içerir (1). DEHB'nun nedeni tam bilinmese de biyolojik ve multifaktöryel olduğuna inanılmaktadır. Semptomları, bozulmuş dopaminerjik ve noradrenerjik aktarım ile ilişkilidir. Hem genetik hem de çevresel faktörler anahtar rol oynuyor gibi gözükmektedir. İleri sürülen tartışmalı çevresel faktörlerden biri, belli gıdalara ve/ veya gıda katkı maddelerine hipersensitivite ve intoleranstır (6).

Dr. Benjamin F. Feingold yaptığı çalışmalarda gıdalardaki bazı küçük moleküllü maddelerin duyarlı çocuklarda hiperaktivite ve bazı nöropsikolojik bozukluklara neden olduğunu ileri sürmüştür. Bazı gıda katkı maddelerinden arındırılmış Feingold diyetini oluşturmuştur (7, 8). İlerleyen zamanlarda DEHB ile katkı maddeleri arasında da ilişki olabileceği düşünülmüş, bunun üzerine Feingoldun diyetini pek çok araştırmacı farklı klinik ve deneysel çalışmalarda uygulamıştır. Bu çalışmaların sonuçları bazen Feingoldun verilerini desteklese de pek çoğunda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (9-14).

Tanaka ve ark. farelerde birkaç nesil üzerinde çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalarda katkı maddelerinin annelerde üremeye etkilerini, yavrularda ise gelişimsel ve davranışsal etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda, bazı sentetik gıda boyalarının çeşitli konsantrasyonları ayrı ayrı uygulanarak bireysel etkileri ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Sonuçta bu sentetik gıda boyaları farelerin davranışsal parametrelerini ve öğrenme yetilerini olumsuz etkilemiştir. Bu etkiler cinsiyete ve tüketilen katkı maddelerinin miktarına göre farklılık göstermiştir (15- 22).

Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir deneysel çalışmada, Doğuç ve ark. dişi sıçanlara ADI (Acceptable Daily Intake- Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) düzeylerinde bir karışım olarak gıda boyalarını gebelik öncesi ve gebelik boyunca

uygulamışlar ve sonra yavrularda davranış ve mekansal çalışan hafıza üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Yaygın olarak kullanılan sentetik gıda boyalarının yavrularda mekansal çalışan hafıza ve depresif davranış üzerine herhangi bir yan etki oluşturmadığını fakat lökomotor aktivitede bazı parametreleri arttırarak birkaç anlamlı etki oluşturduğunu tespit etmişlerdir (23).

Gıda katkı maddelerinin kullanımlarına izin verilmeden önce toksisite ve güvenlik testleri yapılmaktadır. Ancak davranış modelleri ve öğrenme üzerine etkileri araştırılmamaktadır. Her ne kadar bugüne kadar yapılan çalışmalarda gıda katkı maddeleri ile DEHB bulguları arasında klinik düzeyde bir ilişki gösterilmiş olsa da; literatürde sentetik gıda boyalarının direkt öğrenme üzerine etkilerinin araştırıldığı çok da fazla deneysel çalışma bulunmamaktadır.

Sentetik gıda boyalarının davranış ve dikkat üzerine etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma sonuçları tüketicilerin aklını karıştırmıştır. Tüketiciyi aydınlatacak kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca hayvan modellerinin denek olarak kullanıldığı, sentetik gıda boyalarının davranış modelleri ve öğrenme üzerine etkilerinin değerlendirildiği kapsamlı deneysel çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu nedenle çalışmamızda doğum öncesi anne karnında NOAEL (No Observed Advers Effects Level - gözlenebilir yan etki oluşturmayan düzey) düzeyinde maruz kalınan sentetik gıda boyalarının, erişkin dönemde öğrenme üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Anne karnında gıda katkı maddelerine maruziyetin öğrenme ve hafıza olgularına etkisinin objektif veriler ile ortaya konması bu konuda çalışan araştırmacılara ışık tutmanın yanında, duyarlı tüketicilerin endişelerini gidermede bilimsel katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı

Gıda katkı maddeleri; hammadde hazırlık, imalat, paketlenme ve depolama gibi işlemler sırasında gıdaların bazı özelliklerini düzeltmek, iyileştirmek, biyolojik ve besleyici değeri korumak veya düzeltmek, bunun yanı sıra gıdada meydana gelebilecek istenilmeyen değişiklikleri engellemek, ürünün kalite ve raf ömrünü artırmak amacı ile bilinçli olarak kullanılan doğal ve yapay kaynaklı madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (24).

Gıda katkı maddeleri kavramı tesadüfen oluşmuş metal bulaşımını hiçbir zaman içermez. 2010 tarihli Resmi gazetede yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY)'nde ise "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, besleyici değeri olan veya olmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisi ya da yan ürünleri, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler" olarak tanımlanmıştır (25). Daha basit bir tanımla ise; doğal olarak besinlerin bileşiminde bulunan veya besinlerden çeşitli yöntemlerle saf olarak elde edilen veya kimyasal olarak yapıldıktan sonra, çeşitli amaçlar için besinlere katılan öğelere denilmektedir (24, 26).

Bütün bu tanımlamalardan anlaşılacağı üzere gıdaların yapısına giren her türlü maddeye gıda katkı maddesi gözüyle bakmak yanlıştır. Gıda katkı maddeleri yasaların ön gördüğü sınırlarda ve teknolojinin gerektirdiği ölçüde kullanmak zorunda olduğumuz maddelerdir. Etkileri spesifik ve çok amaçlı olabilmektedir (27).

2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçları aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir:

- Gıdanın besleyici değerinin korunması, kayıpların azaltılması ve raf ömrünün uzatılması

- Gıdaların duysal özelliklerinin düzeltilmesi ve geliştirilmesi
- Gıda kalite karakteristiklerinin muhafaza edilmesi
- Gıda hazırlamaya yardımcı olmak
- Besleyici değerin korunması
- Gıdada hastalık yapıcı mikroorganizmaların gelişmelerinin önlenmesi
- Özgün diyet ihtiyaçları olanlar için özel bir gıda üretim imkânının sağlanması
- Gıda çeşitliliğinin sağlanması (26, 28, 29).

2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Nitelikler ve Kullanımlarındaki Temel İlkeler

Gıda katkı maddelerinin; gıda satışını kolaylaştırmak maksadı ile kötü kalitede veya bozulmuş gıdayı maskeleyerek veya hatalı ürün elde etme tekniğini gizleme, taklit gıda yapımı ve tüketiciyi aldatma, ürünün besleyici değerini azaltma ve istenilen etkiyi oluşturacak teknik miktardan fazla miktarlarda kullanma gibi amaçlar ile gıdaya katılmaları yasal olmayan uygulama biçimleridir. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin ticari amaçlı kullanılabilmesi için bazı nitelikleri ve temel ilkeleri taşıması gerekmektedir (24, 26). Bu ilkeler ve temel nitelikler aşağıdaki şekilde özetlenebilmektedir:

- Gıda katkı maddeleri hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın, her şeyden önce tüketici açısından zararsız olduğunun bilinmesi, kullanılma miktarının yasalarla belirtilmiş ve onaylanmış olması gerekir.
- Halen kullanılmakta olan ve kullanılması önerilen tüm gıda katkı maddelerine toksikolojik değerlendirme uygulanmalıdır. Sadece Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA) tarafından elde edilen veriler doğrultusunda önerilen düzeylerde kullanıldıklarında tüketici sağlığına zarar vermeyecekleri belirlenen katkı maddelerinin kullanımına izin verilmelidir.
- Bir gıda katkı maddesinin tavsiye listesinde veya gıda standardında yer alabilmesi için, söz konusu katkı için belirlenen kabul edilebilir günlük alım miktarı (Acceptable Daily Intake- ADI) veya buna benzer eşdeğer

değerlendirme ile birlikte tüm kaynaklardan günlük olarak vücuda alımı mümkün olan miktarının da dikkate alınması gerekmektedir.

- Gıda katkı maddesinin özel tüketici grupları tarafından tüketilmesi söz konusu olduğunda, günlük olarak tahmini tüketme miktarı göz önünde bulundurulmalıdır.
- Gıda katkı maddeleri istenilen etkiyi oluşturacak en düşük miktarlarda kullanılmalıdır.
- Gıda katkı maddelerine ait pozitif listeler uluslar arası gıda mevzuatında yer almasının yanı sıra ulusal mevzuatlarda da kabul edilmiş olmalıdır.
- Bu ürünler gıda maddesinin görünüşünü, kalitesini ve doğal besleyici değerini düşürmemelidir.
- Yeterli ve ilgili kurumlarca saptanmış bütün teknik özellikleri yapısında taşınmalıdır.
- İmalatçı tarafından rahatlıkla satın alınabilmeleri için de ekonomik olmalıdır.
- İçine konulduğu gıda maddesinin içinde homojen olarak dağılabilmelidir (24, 26, 28, 30).

2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslar Arası ve Ulusal Kuruluşlar ve Yasal Düzenlemeler

Gıda sanayinin hızla ilerlemesi nedeni ile katkı maddelerinin kullanımındaki artış, bu konuda yasal düzenlemelerin gerçekleştirilmesini gerektirmiştir (31).

Katkı maddelerinin sistematik bir şekilde ele alınması ilk olarak 1956'da WHO ve Gıda Tarım Teşkilatı (Food and Agriculture Organization-FAO) tarafından 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleşmiştir. Bu çalışmada 200'e yakın kimyasal maddenin gıda maddelerinde kullanımda olduğu tespit edilmiştir (32).

Sonraki yıllarda gıda katkı maddelerinin güvenli kullanımı için oluşturulan uluslar arası kuruluşların önde gelenleri ve bu kuruluşların görevleri aşağıdadır:

1. CAC (Codex Alimentarius Commission- Uluslar arası Gıda Kodeks Komisyonu): WHO ve FAO'nun gıda sanayisine rehberlik etmek ve tüketici

sağlığını korumak amacıyla 1963 yılında müştereken oluşturduğu Gıda Standartları Programını yürütmek üzere kurdukları Birleşmiş Milletlere bağlı uluslar arası bir kuruluştur. Bu komitenin amacı, kaliteli ve güvenli ürünlerin üretilmesi ve tüketicilere sunulmasının sağlanması yanında dünya gıda ticaretinde yer alan gıda maddelerinin kalite ve hijyen kriterlerinin belirlenmesi, teknoloji ve sağlık açısından standardize edilmesidir.

2. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants- Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi): CAC'ın bünyesinde oluşturulan bu komite, katkı maddelerini ilgilendiren tüm konularda öneri ve tavsiyeler veren bir kuruluştur.

3. JECFA Birleşmiş Milletlere bağlı FAO/WHO bünyesinde müştereken kurulan ve CCFAC'ın bir alt komitesi olan JECFA, gıda katkıları konusunda uzmanlık düzeyinde bilgiye sahip kişilerden oluşmaktadır. Bu komite gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan güvenilirliği ile ilgili çalışmalar ve değerlendirmeler yapmaktadır. Genetik ve farmokokinetik çalışmalar ile mutajenik, teratojenik ve kanserojenik araştırmalar da yürütmektedir. Ayrıca bu kurum gıda katkı maddelerinin kimyasal özelliklerini belirlemekte ve ADI değerlerini tespit etmektedir. JECFA'nın raporları CCFAC tarafından değerlendirilerek her gıda ürün grubunda kullanılacak katkıları ve üst limitleri belirlenmekte ve ilgili Kodeks dokümanına dâhil edilmektedir.

4. JMPR (The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues): Bu kuruluş gıda ürünlerindeki böcek ilacı kalıntılarını değerlendiren ve gıdalarda günlük alımda insan sağlığına zarar vermeyecek maksimum pestisit miktarlarını belirleyen bir kuruluştur.

5. SCF (EU-Scientific Committee on Food- Avrupa Birliğine Bağlı Gıda Kontrol Komitesi): Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme konularında yetkili olan komitesidir.

6. FDA (Food and Drug Administration- Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi): Yukarıda bahsedilen kuruluşlar arasında en eski tarihe sahip olan kuruluştur.

ABD'nin ulusal kuruluşu olsa da tüm dünyada referans olarak gösterilen bir kurumdur (26, 30, 32, 33).

7. EFSA (The European Food Safety Authority- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi): Avrupa Birliği Komisyonu tarafından 2000 yılında yayınlanan “White Paper on Food Safety“ isimli belgeye uygun olarak 2002 yılında kurulmuştur. EFSA, gıda zincirindeki her risk ile ilgili değerlendirme ve iletişim yapmakla görevlidir. Avrupa Komisyonu'na ve Avrupa Parlamentosu'na bilimsel danışmanlık yaparak gıda konusundaki politikaların ve Avrupa Topluluğu Direktifleri'nin oluşturulmasına yardımcı olur (34).

WHO'nun tüm dünya ülkeleri tarafından benimsenen ve imzalanan anlaşmaları gereği olarak, her ülke kendi ulusal mevzuatını hazırlarken CAC'ın dokümanlarını referans almak durumundadır. Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen katkı maddelerine bir “E” kodu verilmektedir. “E” harfi Avrupa Birliği'ni temsil etmektedir. “E” sistemi, üye ülkeler içinde bu katkıların güvenilir kabul edildiğini göstermekte olup, Amerika'daki GRAS (Generally Recognize as Safe) listesinin Avrupa'daki karşılığıdır. E numarası alan katkı maddelerinin sayısı sürekli değişmektedir. Halen kullanılmakta iken zararları ortaya çıkmış olanlar iptal edilirken yeni katkı maddeleri de ilave edilebilmektedir. Bir maddenin “E” numarasına sahip olması direkt olarak zararlı veya zararsız olduğu hakkında bilgi vermez. Ancak “E” numarası olmayanlara göre bir olumlu özellik olarak değerlendirilebilir. E listesinden ayrı olarak CCFAC, başka bir numaralama sistemi geliştirmiştir. Uluslar arası Numaralama Sistemi (International Numbering System - INS) adı verilen bu sıralama E listeleri esas alınarak hazırlanmıştır. INS, E listesinden daha geniş kapsamlıdır (26, 24).

Ülkemizde katkı maddeleri ile ilgili olarak ilk kez 1983 yılında Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı tarafından bir yönetmelik çıkarılmış ve 1984'te buna ek bir yönetmelik yürürlüğe girmiştir. 1990 yılında yine sağlık bakanlığı bu konu ile ilgili olarak yeni bir yönetmelik çıkarmış ve bunu takip eden yıllarda bu yönetmeliğe ekler getirilmiştir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca (yeni adı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı olmuştur) hazırlanmış olan ve 16 Kasım 1997 tarihinde yayınlanan Resmi Gazete ile yürürlüğe giren TGKY ile katkı maddelerinin kullanımları konusunda yeni

düzenlemeler getirilmiştir. Söz konusu kodekste gıda katkı maddeleri tanımlanmış ve bu maddelerin E kodları, adları, kullanılabilecekleri gıda grupları ve izin verilen maksimum miktarları listeler halinde açıklanmıştır (26).

Dünyadaki gelişmelere paralel olarak Türkiye'de de gıda güvenliği zamanla çok daha önem kazanmış 03.06.2011 tarihinde 639 sayılı “Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının teşkilat ve görevleri hakkında kanun hükmünde kararname” kabul edilmiş ve gıda güvenliğinin temini bu kanunun doğrudan amacı olmuştur. Bu kanun çerçevesinde bir dizi yönetmelik ve tebliğler yayınlanmıştır (35). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan 29 Aralık 2011 tarihli resmi gazetede yayınlanan Türk Gıda Kodeksi gıda katkı maddeleri yönetmeliğinde gıdalarda, gıda katkı maddelerinde, gıda enzimlerinde ve gıda aroma vericilerinde kullanılan katkı maddelerinin kullanım koşulları ve etiketleme kuralları belirlenmiştir(36).

Tablo 1. Türk gıda kodeksine göre ülkemizde kullanımına izin verilen gıda renklendiricileri (36)

Açıklama: Bu ekte yar alan renklendiricilerin karışımından hazırlanan Alüminyum Laklara izin verilmektedir.

EC Kodu	Genel Adı	Renk indeks numarası ve tanımı
E 100	Kurkumin	75300
E 101	Riboflavin Riboflavin-5'-fosfat	
E 102	Tartrazin	19140
E 104	Kinolin sarısı	47005
E 110	Sunset yellow FCF Orange yellow S	15985
E 120	Koşineal, Karminik asit, Karminler	75470
E 122	Azorubin, Karmosin	14720
E 123	Amarant	16185
E 124	Ponso(ponceau) 4R, Koşineal Red A	16255
E 127	Eritrosin	45430
E 128	Red 2G	18050
E 129	Allura Red AC	16035
E 131	Patent Blue V	42051
E 132	İndigotin (İndigo Karmin)	73015
E 133	Brilliant Blue FCF	42090
E 140	Klorofiller ve Klorofilinler (i)Klorofiller (ii) Klorofilinler	75810 75815

E 141	Klorofiller ve Klorofilinlerin bakır kompleksleri	75815
	(i) Klorofillerin bakır kompleksleri	
	(ii) Klorofilinler bakır kompleksleri	
E 142	Green S	44090
E 150a	Sade Karamel (1)	
E 150b	Kostik sulfit karamel	
E 150c	Amonyum karamel	
E 150d	Amonyum sülfid karamel	
E 151	Brilliant Black BN, Black PN	28440
E 153	Bitkisel karbon	
E 154	Brown FK	
E 155	Brown HT	20285
E 160a	Karotenler	75130
	(i) Karışım halindeki karotenler	40800
	(ii) Beta-karoten	
E 160b	Anatto, Bixsin, Norbixsin	75120
E 160c	Paprika ekstraktı	
	Kapsantin, Kapsorubin	
E 160d	Likopen	
E 160e	Beta-apo-8'-karotenal (C 30)	40820
E 160f	Beta-apo-8'-karotenik asidin etil esteri(C 30)	40825
E 161b	Lutein	
E 161g	Kantaksantin	
E 162	Pancar kökü kırmızısı, Betanin	meyve ve sebzeden fiziksel yollarla hazırlanan
E 163	Antosiyaninler	77220
E 170	Kalsiyum karbonat	77891
E 171	Titanyum dioksit	77491
E 172	Demir oksit ve hidroksitler	77492
E 173	Alüminyum	77499
E 174	Gümüş	
E 175	Altın	
E 180	Litolrubin BK	

(1) Karamel ifadesi renklendirme amaçlı olan, açık veya koyu kahverengi ürünler için kullanılmakta; gıdalara aroma vermek amacıyla kullanılan şekerin ısıtılması ile elde edilen, şekerimsi aromatik ürünler için kullanılmamaktadır.

2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirme

Gıda katkı maddeleri ilaçlar gibi vücuda dışarıdan alınarak metabolize edilen maddeler olarak kabul edilmektedir ve tavsiye edilen dozlardan daha yüksek miktarda kullanıldıklarında toksik etki oluşturmaları söz konusu olabilmektedir. Gerek katkı maddeleri kullanımında, gerekse genel anlamda gıda tüketiminde toksikoloji biliminin öncülerinden Paracelcus'un (1493-1541) "Her madde toksindir, ancak toksin ile ilacı birbirinden ayıran dozudur" sözü gıda katkı maddesinin güvenilirliğinin temelini oluşturmaktadır (37).

Gıda maddelerinde herhangi bir nedenle yer alan ve son üründe varlığı saptanan bir kimyasal bileşiğin sağlık açısından güvenilirliği konusuna, temelde deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen toksikolojik bazı testler ile karar verilmektedir.

Toksikolojik çalışmalarda aşağıda verilen parametreler değerlendirilmektedir:

1. Maddenin biyokimyasal özellikleri (Emilimi, dağılımı ve atılımı, biyotransformasyonu ve enzimler üzerine etkileri)

2. Deney hayvanları üzerindeki toksikolojik etkiler

Aşağıda belirtilen testler doğrultusunda mutajenik, karsinojenik, teratojenik immünotoksik, nörotoksik ve üreme fonksiyonları üzerine olan toksik etkiler ortaya konmaktadır.

- **Akut toksisite testi:** En az üç doz ve tek seferde uygulanan ve 1, 2, 24, 48, 72 ve 96 saat gibi kısa süreler içinde uygulanan testlerdir.
- **Subakut toksisite testi:** Kimyasal madde deney hayvanlarına her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde verilir. Test süresi 1-3 haftadır.
- **Subkronik toksisite testi:** Sıçan ve köpek gibi deney hayvanlarının seçildiği bu testte deney süresi 3 aydır.
- **Kronik toksisite testi:** Deneyde kullanılan hayvanın tüm ömrünce maruz kaldığı kimyasal maddenin yol açtığı toksik etkilerin değerlendirildiği testlerdir. Bu süre sıçanlarda yaklaşık 2 yıl, köpeklerde ise 5-7 yıl kadardır (24, 32).

Ayrıca toksikolojik değerlendirmeler kapsamında maddenin alerji veya tolerans yetersizliği gibi etkilerini araştırmak üzere insanlar üzerinde de çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir (24, 26, 32).

Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen toksikolojik testlerin genel hedefi, NOAEL değerini belirlemektir. NOAEL, deney hayvanlarında ters bir etki oluşturmayan, kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına düşen maksimum mg madde miktarıdır. Diğer bir ifade ile diyetle çeşitli konsantrasyonlarda yer alan bir maddenin, daha yüksek dozlarda gösterdiği olumsuz (toksik) etkiye neden olmayacak minimum dozu olarak açıklanmaktadır. Deneysel toksikolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen NOAEL dozu, insana yönelik olarak

hesaplanırken, “güvenlik faktör”lerine (GF) bölünmektedir. İnsan gıdalarında katkı olarak kullanılması planlanan bir maddenin hayvan deneyleri sonucunda elde edilen NOAEL değeri, 100 olarak kabul edilen GF’ye bölünerek, söz konusu maddenin günlük alınabileceği miktar yani ADI değeri hesaplanmaktadır. ADI değeri yetişkin bir insanın kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına bir ömür boyunca hiçbir zararlı etki görmeden tüketebileceği bir katkı maddesinin miligram cinsinden değeridir (24, 26).

$$\text{ADI (mg/kg insan vücut ağırlığı)} = \text{NOAEL (mg/kg hayvan vücut ağırlığı)}/\text{GF}.$$

Gıda toksikolojisi ile ilgili diğer iki parametre MPI (Maximal Permissible Intake Per Day- Günlük alınmasına izin verilen madde miktarı) ve MPL (Maximum Permissible Level in the Food- Gıdada bulunmasına izin verilen en yüksek düzey) değerleridir. Bu değerler, ADI, gıda faktörü ve 60 kg olarak kabul edilen yetişkin vücut ağırlığı dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Gıda faktörü bir gıda maddesinin günlük diyetle kabul edilen ortalama alım miktarıdır (24).

$$\text{MPI (mg/gün)} = \text{ADI} \times 60$$

$$\text{MPL (mg/kg)} = \text{MPI} / \text{gıda faktörü}$$

Bir günlük diyetle, söz konusu gıda katkı maddesini içeren et, sebze, meyve ve içecekler gibi fazla sayıda gıda çeşidi yer alıyorsa, diyeti oluşturan her çeşidin tüketimdeki katkısının dikkate alınması gerekmektedir. Bu durumda ise TMRI (Theoretical Maximum Residue Intake- Teorik maksimum kalıntı miktarı) değerinden söz edilmelidir. TMRI değeri, MPI’ yı geçmesine izin verilmeyen ve diyetle yer alan teorik maksimum kalıntı miktarıdır (24, 26).

2.1.6. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması

Gıda katkı maddeleri farklı şekillerde sınıflandırılmakla beraber fonksiyonel olarak şu şekilde sınıflandırılmaktadır: Antioksidanlar, asit, asit düzenleyici, emülgatör, emülsifiye edici tuzlar, hacim arttırıcılar, itici gazlar, jelleştirme ajanları, kabartma ajanları, kalınlaştırıcılar, koruyucular, köpürtme ajanları, köpürmeyi önleyici ajanlar, lezzet arttırıcılar, nem vericiler, parlatma ajanları, renklendiriciler,

renk stabilizasyon ajanları, sıkılaştırıcı ajanlar, stabilizör, tatlandırıcılar, topaklanmayı önleyiciler, un işleme ajanları (26, 30, 32).

2.2. Gıda Boyaları (Renklendiricileri)

Gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin dışında kalan kalite kavramı içine ürünün rengi, tat-kokusu, görünümü ve besleyici özellikleri girmektedir. Gıdanın albenisini artıran özelliği rengidir ve hemen her gıda maddesi için alışılmış bir renk istenmektedir. Bundan dolayı tüketici açısından fark edilen kalite daha çok duysal özelliklere ve bunun da ötesinde gıdanın rengine dayanmaktadır. Duysal açıdan renk lezzet açısından beklenti oluşturmaktadır. Gıdanın tüketim öncesi gözlenen bu özelliği hammaddenin yetiştirilmesi sırasındaki etmenlerle ve imalat sürecindeki üretim parametrelerinin etkisi ile değişime uğrayabilmektedir (26, 38). Renkte görülen bu farklılaşmalar, tüketici tercihini genellikle olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle renk maddeleri, teknolojik işlem görmüş et, meyve ve sebze, unlu mamüller, süt ürünlerinde ve şekerleme endüstrisinde kaybolan rengi geri vermek, kısmen kaybolmuş olan veya hiç olmayan rengi yapıya kazandırmak amacı ile çok sık kullanılan gıda katkı maddeleridir (38- 40).

2.2.1. Gıda Boyalarının Sınıflandırılması

Renklendirici maddelerin sayıca çok oluşu, kimyasal yapılarının, fiziksel özelliklerinin ve elde edilme yöntemlerinin farklı oluşu bu maddelerin sınıflandırılmasında güçlükler yaratmaktadır. Bu nedenle literatürde renklendiriciler ile ilgili çeşitli sınıflandırmalar ile karşılaşmaktadır. Elde edilme şekillerine göre renklendiriciler doğal ve yapay renklendiriciler olarak sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte bazı doğal renklendiriciler yapay olarak da elde edilebilmektedir. Bu durumda bu maddeler doğala özdeş renklendiriciler olarak sınıflandırılmaktadır. E kodlama sistemine göre gıda boyalarının uluslararası numaralandırılması E100 – E180 aralığında belirlenmiştir (24, 39, 41).

2.2.1.1. Doğal Boyalar

Mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigmentlerdir. Renk aralıkları sınırlı ve dayanıklılığı az olan bu maddeler, zayıf bir renklendirme özelliğine sahiptir ve ışık, sıcaklık, pH ve redoks ajanlarına daha hassastırlar. Gıdalarda 1800'lerin ortalarına kadar, sadece safran, havuç, dut, çiçek, bakır ve demir cevherlerini içeren mineraller, hayvansal ürünler ve sebzeler gibi doğal kaynaklardan elde edilen renklendiriciler kullanılmıştır. Eski çağlardan itibaren çeşitli şekillerde kullanılan bu renk maddeleri, günümüzde gelişen teknolojilere bağlı olarak birçok doğal kaynağın özütü olarak hazırlanmaktadır. Bu grupta yer alan renk maddelerinin çok az bir kısmı suda çözünebilmektedir. Bu da doğal renklendiricilerin renk çeşitliliği sağlamasını sınırlamaktadır. Bu nedenle yağda çözünen doğal renk maddeleri, uygun bir emülsifiye edici ajanla işlenerek su esaslı gıdalarda kullanılabilir bir yapıya dönüştürülebilmektedir. Doğal renklendiriciler organik ve inorganik olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (38, 40).

2.2.1.2. Yapay (Sentetik) Boyalar

Yapay renklendiriciler, kimyasal yapıları itibarıyla doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilebilen renk maddeleridir. Sentetik renklendiricilerin gıda sanayisinde kullanımı, güvenilirliği hakkında herhangi bir bilgi olmaksızın 1800'lerin sonlarında başlamıştır. İlk sentetik boya organik kömür katranından türetilmiştir ve ilk olarak tereyağı ve peynirlerde kullanılmıştır. Son yıllarda tüketici sağlığı açısından izin verilen sentetik boyaların sayıları azalmasına rağmen, çok çeşitli sentetik gıda boyaları düşük maliyetleri, yüksek etkinliği ve mükemmel dayanıklılığına bağlı olarak dünyanın her yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (29, 40).

Yapay renklendiricilerin hemen hepsinin sentezinde başlangıç materyali olarak kömür kullanılmaktadır. Doğal renklendiricilerle karşılaştırıldığında renk verme güçleri, renk aralıkları, dayanıklılıkları, kullanım kolaylıkları ve fiyat uygunlukları gibi faktörler açısından üstünlük sağlamaktadırlar. Yapay renklendiriciler çok yüksek oranlarda suda çözünme özelliğine sahiptirler. Pek çoğu ısıya, ışığa, asitlere, alkalilere ve koruyucu maddelere karşı dayanıklıdır. Bu nedenle

raf ömürleri de oldukça uzundur. Ürüne konuldukları miktarlarda zamana bağlı bir azalma görülmemektedir. Bu konuda yapılan araştırmalara göre 15 yıl süre ile depolanan gıdalara konulan renk katkılarında miktar azalması ve bir değişme saptanmamıştır (38, 39, 40).

Yapay renklendiricilerin sınıflandırılmasında kimyasal özellikleri açısından çözünürlükleri önem kazanmaktadır. Buna göre yapay renklendiriciler suda çözünenler, yağda çözünenler ve lake renklendiriciler olmak üzere üç grupta toplanmaktadır (39).

2.2.2. Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Boyalar ve Özellikleri

Eritrosin (E127): Kırmızı renkte, kokusuz, toz ya da granül halinde bulunan bir ksantin boyadır. ADI değeri 0,1 mg/kg olup molekül ağırlığı 879,84 g/mol'dür(42).

Ponso 4R (E124): Kırmızımsı toz veya granüller halinde bulunan bir azo boyadır. Suda çözünür nitelikte olup etanolde çok az çözünmektedir. ADI değeri 0,7 mg/kg olup molekül ağırlığı 604,48 g/mol'dür (43).

Allura Red AC (E129): Koyu kırmızı renkte toz veya granül halde bulunan bir azo boyadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde %50 etanolde çok az çözünür. ADI değeri 7 mg/kg olup molekül ağırlığı 496,43 g/mol'dür (44).

Sunset Yellow FCF (E110): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Turuncu-kırmızı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI değeri 2,5 mg/kg olup molekül ağırlığı 452,38 g/mol'dür (45).

Tartrazin (E102): Açık turuncu renkte toz veya granüller halinde bulunan bir azo boyadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde biraz çözünmektedir ADI değeri 7,5 mg/kg olup molekül ağırlığı 534,36 g/mol'dür (46).

Amarant (E123): Kırmızı- kahverengi renkte toz veya granül halde bulunan bir kırmızı- monoazo boyadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünür ve bitkisel yağlarda çözünmez. Normalde sodyum, potasyum ve kalsiyum

tuzları halinde bulunmakla birlikte solüsyonda mavimsi-kırmızı renktedir. ADI değeri 0,15 mg/kg olup molekül ağırlığı 604,49 g/mol'dür (47).

Brilliant Blue FCF (E133): Mavi renkte toz veya granüller halinde bulunan bir triaril metan gıda boyasıdır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde az çözünmektedir. ADI miktarı 6 mg/ kg olup molekül ağırlığı 792,85 g/mol'dür (48).

Azorubin/Karmozin (E122): Kırmızımsı kahverengi/koyu kırmızımsı kahverengi toz veya granül halde bulunan bir azo boyadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI miktarı 4 mg/kg olup molekül ağırlığı 502,44 g/mol'dür (49).

İndigotin (E132): İndigoid sınıfından bir renklendiricidir. Mavi renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI miktarı 5 mg/kg olup molekül ağırlığı 466,36 g/mol'dür (50).

2.2.3. Sentetik Gıda Boyalarının Endüstriyel Kullanım Alanları

Gıda boyaları alkolsüz içecek endüstrisinde sık olarak kullanılmaktadır. Gazlı içeceklere vitamin aktivitesi ve antioksidan özelliğinden dolayı askorbik asidin eklenmesi sentetik boyaların verdiği renkte açılmaya neden olmaktadır bu da doğal boyaların kullanılmasını gerektirmektedir. Meyve aromalı birçok içecekte ise yapay renklendiriciler kullanılırken, kola ve birada renk verici olarak karamel tercih edilmektedir (39).

Gıda boyalarının bir diğer sık kullanım alanı da unlu mamullerdir. Hamurların yüksek nem içeriği nedeni ile boya katılmasında fazla problem olmamakta ancak istenen renk tonunu elde etmek zor olmaktadır. Bu da koyu renkli bazı ürünlerde fazla miktarda renklendirici kullanımına yol açmaktadır. Bu tip ürünlerde yapay ve doğal boyaların birlikte kullanımı önerilmektedir. Ponso 4R, allura red AC, sunset yellow FCF, tartrazin ve Brown HT unlu mamullerde en sık kullanılan yapay boyalardır (39).

Süt ürünlerinde de gıda boyaları kullanılmaktadır. Birçok dondurma çeşidinde yapay boyalar tercih edilmektedir. Peynir, margarin ve tereyağında yapay

boyalar dayanıklı olmadığı için β -karoten ve Anatto gibi doğal boyalar tercih edilmektedir. Buz kremlerde, sütlü bazı soslarda ve meyveli yoğurtlarda ise lake renklendiriciler önerilmektedir (39).

Şekerleme ürünlerinde, kuru toz içecekler, tatlılar, krema tozu, çorba ve soslarda daha çok lake renklendiriciler tercih edilmektedir. Et ve balık ürünleri ile konserve meyve ve sebzelerde ise yapay renklendiricilerin yanı sıra doğal renklendiriciler de kullanılmaktadır (39, 40).

2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sistemler Üzerine Etkileri

Günümüzde gıda katkı maddelerinin kullanımı kaçınılmaz bir gereksinimdir. Tüketimdeki hızlı tırmanmaya paralel olarak ve bilinçsizce veya önerilenden daha fazla miktarda tüketildiklerinde organizma üzerinde tehlikeli olabilecek bir takım istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Bu etkiler ürtiker, anjiyoödem, anafilaksi, makülopapüler döküntü, astım, pruritus ve kutanöz vaskülit gibi akut alerjik reaksiyonlardan çocuklarda davranış bozukluğu, hiperaktivite, dikkat eksikliği, algılama ve öğrenme zaafına ve hatta kromozomal anomalilerden kanser gelişimine kadar değişkenlik gösterebilmektedir (2, 9, 51, 52).

Tüm dünyada 2.000-20.000 arasında katkı maddesinin besin endüstrisinde kullanıldığı tahmin edilmektedir. Bu kadar çeşitlilik gösteren katkı maddesi, duyarlı kişilerde ölüme kadar varabilen çok ciddi alerjik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Toplumdaki görülme sıklığı kesin olarak bilinmiyorsa da katkı maddelerine bağlı alerjik reaksiyonlar inanılanın aksine çok yüksek değildir. Çocuklarda yapılan araştırmalarda prevalansın % 1-2 arasında olduğu gösterilmiştir (2).

Avrupa Birliği tarafından tüketimi onaylanan tüm gıda katkı maddeleri ve bunların tüketimiyle oluşabilecek yaygın ve ciddi alerjik reaksiyonlar gözden geçirildiğinde, gıda katkı maddelerinin alerjik reaksiyonlara neden olmaktan ziyade duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonları başlatan ya da alevlendiren faktör olabileceği sonucuna varılmıştır (53).

2.4. Öğrenme ve Hafıza

Beynimiz sinir hücreleriyle örülmüş bir ağ gibidir. Bu ağ sayesinde yeni bilgilerin önceki bilgilerle birleştirilmesi, daha önce edindiğimiz bilgilerin geri çağırılması sağlanmaktadır. Tecrübeyle ve çevreden edindiğimiz bilgileri depolama yeteneği beynin karmaşık işlevlerinden biridir. Birçok bilişsel işlev eğer bu yetenek olmasaydı gerçekleştirilemezdi. Sinir sistemi iç ve dış olayları algılar ve tepkide bulunur. Bu içsel ve dışsal olayları duyu organları algılar. Bilgi, duyu organları tarafından beynin arka kısmında omurilikteki çok sayıda sinir ağlarının yardımıyla merkezi sinir sistemine iletilir. Başka bir ifadeyle bilinç için önemli olan bilgi seçilmektedir (54).

Beyindeki temel birimler, nöronlar ve sinapslardır. Nöronların oluşturduğu ağ örüntü sayısı ne kadar fazla olursa, bilgi işleme süreci o kadar güçlü olur (55).

Memelilerde davranışın belirlenmesindeki en önemli etken çevresel şartlar hakkında yeni bilgiler edinilmesi ve bu bilgilerin saklanmasıdır. Öğrenme, çevre hakkında bilgi edinilmesi işlemi; hafıza ise edinilen bilgilerin tekrar hatırlanabilecek bir biçimde şifrelenerek depolanmasıdır (56).

Zihinde bazı anılar sadece birkaç saniye kalırken, bazıları dakikalar, günler, aylar ve hatta yıllar boyunca kalırlar. Bellek başlangıçta bozulmaya elverişlidir. Yani benzer başka bir materyalin öğrenilmeye çalışılması, ilk materyale ait bilginin tutulduğu belleği bozabilir. Günler ve haftalarca devam eden bilginin belleğe alınması ve saklanması ancak zamanla sağlamlaşır (konsolide) olur. Ayrıca beyin bilgileri belleğe kaydederken, işlerken ve depolarken, bilgilerin belirli ve benzer özelliklerine göre sınıflama yapar. Bilgilerin daha uzun süre bellekte saklanması için tekrarlama çok önemlidir. (54, 57, 58).

2.4.1. Hafızanın Sınıflandırılması

Hafıza, kalıcılık süresine ve içeriğine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1).

2.4.1.1. Kalıcılık Süresine Göre Hafıza Türleri

Öğrenilen bilginin ne kadar süre ile hafızada tutulduğuna dayanarak uzun süreli hafıza ve kısa süreli hafıza türleri tanımlanmıştır.

1. Uzun süreli hafıza (LTM – Long term memory) edinilen bilginin yıllarca, hatta yaşam boyu depolandığı hafıza türüdür.

2. Kısa süreli hafıza (STM – Short term memory) kısa sürede kazanılan bilginin birkaç saat kadar hatırlanabildiği hafıza türüdür (59).

Kısa süreli hafıza iki alt bileşene ayrılır:

Çok kısa süreli hafıza (*Immediate memory*): Bilginin alındığı andan itibaren akılda aktif bir şekilde tutulmasından sorumlu sistemdir. Şu anki dikkatimizin odaklandığı bilgiyi tutar. Kapasitesi çok azdır, tekrarlama yapılmadığı takdirde 30 sn'den kısa sürelidir.

Çalışan hafıza (*Working memory*): Çok kısa süreli hafıza'daki bilgi aktif bir şekilde tekrarlanırsa, bellekte tutulma süresi uzatılabilir (dakikalarca). Çok kısa süreli hafıza'nın bu şekilde uzatılmış şekline çalışan hafıza adı verilmektedir. Kısa süreli bellekteki bilgi sürekli tekrarlanırsa, uzun süreli belleğe aktarılmış olur. Kısa süreli belleğin oluşumunda sinapslardaki kimyasal değişiklikler rol oynamaktadır. Kısa süreli bellekteki bilgiler bir süre hipokampüste saklandıktan sonra uzun süreli belleğe aktarılmaktadır (54, 57, 60).

Çalışan hafıza, bilgiyi kalıcı hafızaya (uzun süreli hafıza) aktarmak için gerekli işlemlerin, çağrışımların, ilişkilerin yapıldığı bölümdür. Çalışan hafızadaki bilgi belli bir süre kalır ve gerekli işlemler yapılmadığı takdirde kaybedilir.

Çalışan hafıza, mekansal ve mekansal olmayan hafıza olarak iki ayrı şekilde değerlendirilir. *Mekansal hafıza*, canlının çevresiyle ilgili duyuşsal verileri kullanarak çevresel konum ve oryantasyon bilgisinin kaydedilmesini ifade eder. *Mekansal olmayan hafıza* ise daha çok objelerin, yüzlerin, sayısal ve anlamsal ifadelerin hatırlanmasıyla ilgilidir.

Bilgiyi kalıcı hafızaya aktarmak için yapılması gereken temel işlem, yeni gelen bilginin hafızadaki mevcut bilgilerle ilişkilendirilmesi, sık tekrar edilerek

kullanılması ve kodlanmasıdır. Çalışan hafıza insan beyninde genişçe bir alana dağılmış nöronal haberleşmeyi sağlayan taşıyıcı yapılarla yani *nörotransmitterlerle* düzenlenir ve beynin ön lobu özellikle dorsolateral prefrontal korteks ile bağlantılıdır.

Bilginin kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya aktarılmasında ise hipokampus rol oynar. Çalışan hafızada görevli nörokimyasal sistem içerisinde dopamin, serotonin, noradrenalin, asetilkolin, GABA ve glutamat gibi nörotransmitterler yer almaktadır (61, 62).

Uzun süreli hafızayı kısa süreli hafızadan ayıran özelliklerden biri, bilginin daha uzun süre saklanması, depolanması ve gerektiğinde geri çağrılabilmesidir. Kısa süreli hafızanın aksine sınırsız bir kapasitesi vardır. Uzun süreli hafızanın oluşumunda sadece sinapslardaki kimyasal mekanizmalar değil, aynı zamanda gerçek yapısal değişiklikler de rol oynamaktadır. Bilgilerimizi ömür boyu saklayabiliriz ve potansiyel olarak bu bilgilere ulaşabiliriz ancak her zaman geri çağıramayabiliriz. Bir bilginin uzun süreli hafızada saklanması ancak beynimizdeki nöral bağlantılarda meydana gelen kalıcı fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal değişikliklerle mümkün olabilmektedir (54, 57, 60).

Kısa süreli hafızada edinilmiş bilgi, travmalara veya çeşitli ilaçlara bağlı olarak bozulabilirken, uzun süreli hafıza bozulmaya karşı belirgin olarak dirençlidir (56, 63).

2.4.1.2. İçeriğine Göre Hafıza Türleri

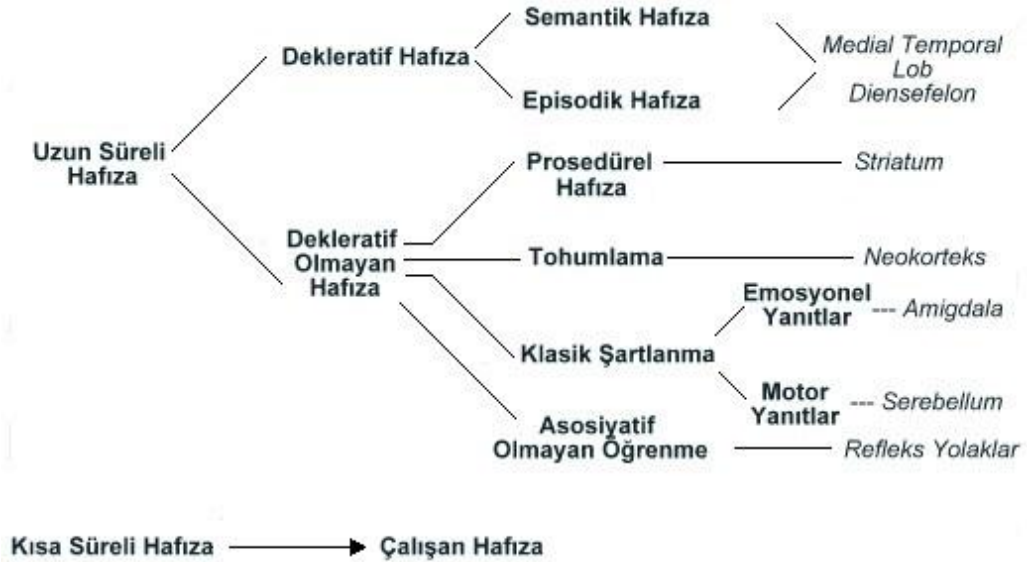
İçeriğine göre hafıza temel olarak ikiye ayrılmıştır:

İmplicit Hafıza (Dekleratif Olmayan Hafıza, Refleksif Hafıza, İşlemsel Hafıza)

İmplicit hafıza, bir kez kazanıldıktan sonra otomatik olarak gerçekleşen beceri ve alışkanlıkları kapsar. Bu hafıza türü fazla esneklik göstermez, katıdır ve öğrenmenin gerçekleştiği orijinal uyaran koşullarına sıkı sıkıya bağlıdır. İmplicit hafızanın tohumlama, prosedürel, asosiyatif ve asosiyatif olmayan olmak üzere dört alt türü mevcuttur (56, 63).

Eksplisit Hafıza (Dekleratif Hafıza, Bilinçli Hafıza ve Tanıma Hafızası)

Eksplisit hafıza implisit hafızadan farklı olarak karmaşık, bilince eşlenik, esnek ve değişmeye açıktır. Bilgi hipokampus ile beynin medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolanmaktadır. İnsanlar, mekanlar ve tarih gibi çeşitli bilgi türleriyle ilişkili olup semantik ve episodik hafıza olarak ikiye ayrılmaktadır. Semantik hafıza genel kabul gören bilgileri kapsarken, episodik hafıza kişisel deneyim ve olaylara ilişkin bilgileri içermektedir. Semantik ve episodik hafızanın oluşumu için birbiriyle ilişki içinde fakat ayrı olan en az dört işlem gerekmektedir. Bu işlemler sırasıyla kodlama (encoding), pekiştirme (consolidation), depolama (storage) ve geri çağırma (retrieval). Kodlama, ilk defa karşılaşılan bilginin işlenip hafızaya alınma sürecidir. Bu işlemin kapsamı ve doğası öğrenilen bilginin ilerleyen zamanlarda ne kadar iyi hatırlanabileceğinin belirlenmesinde kritik önem taşımaktadır. Pekiştirme, yeni kodlanmış ve henüz yerleşmemiş olan bilgilerin uzun süreli depolanabilmesi, daha yerleşik duruma getirilmesi için gereken işlemleri kapsamaktadır. Depolama, hafızanın uzun süre boyunca korunmasını sağlayan mekanizmalardan oluşmaktadır. Geri çağırma ise, depolanan bilgilerin hatırlanması ve kullanılmasıdır (59).



Şekil 1. Uzun ve kısa süreli hafıza türleri (59)

Hafıza beynin çeşitli bölgelerinin integrasyonunu gerektiren kompleks bir işlemdir ve farklı hafıza işlemlerinde bazı serebral bölgeler diğer bölgelerden daha baskın görevlere sahiptir (Şekil 1).

2.5. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır (64) ve limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır. Hipokampüs ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve “hipokampal formasyon” adını alır (65).

Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, santral sinir sisteminin (SSS) birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampüsü etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyonun sol hipokampüste olduğu zamanda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. Hipokampüsün değişik alanlarının uyarılması durumunda hiddet, edilgenlik, hiperseksüalite gibi davranış biçimleri görülür. Hipokampüs, hiperseksüalite özelliğine sahiptir. Hafif elektriksel uyarılmasında, uyarı bittikten sonra saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampüsün normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (65).

3. MATERYAL ve METOD

Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3110-TU-12 proje numarası ile desteklenen çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezi ve Tıbbi Biyokimya Öğrenme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada uygulanan tüm materyal ve testler SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan 24.07.2012 tarih ve 06 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel Hayvanları

Çalışmada Wistar Albino cinsi dişi sıçanlardan genetik çeşitliliğin sağlanması için başlangıçta toplam 30 adet kullanılmıştır. Bu sayede daha çok anneden yavru alınarak daha karma gruplar oluşturulması amaçlanmıştır.

Deneysel boyunca sıçanlar standart ışık (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) ve ısı (23°C) koşullarında yaşatılmış, yeteri kadar su ve yem (Korkutelim Yem, Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Sıçanlar rastgele 'Kontrol' ve 'Gıda Boyası' grupları olarak 15'erli 2 gruba ayrılmıştır. Her bir sıçan ayrı bir kafese konulmuştur. Gıda boyası grubuna gıda boyası karışımı, kontrol grubuna ise içme suyu deneysel hayvanlarının gebe kalmalarından 1 hafta öncesinden itibaren verilmeye başlanmış ve doğuma kadar devam edilmiştir.

Birinci haftanın sonunda her bir kafese çiftleşmenin sağlanması için birer erkek sıçan 7 gün süreyle bırakılmıştır. Gıda boyası ve kontrol grubu sıçanlarının gebe kalmaları bu şekilde sağlanmıştır. Erkek sıçanların kafeslere konulduğu gün gebeliğin 1. günü kabul edilmiştir. Gıda boyası grubundan 13 sıçan, kontrol grubundan da 12 sıçan doğum yapmıştır. Doğum sonrasında yavrular 1 ay süreyle annelerle beraber kaldıktan sonra (emzirme dönemi) 'gıda boyası' ve 'kontrol' gruplarından 24'er adet sıçan alınmıştır. Sıçanlar seçilirken her anneden en az bir erkek, bir dişi yavru alınmasına özellikle dikkat edilmiştir. Böylelikle grupları

oluşturan 12 sıçanın her birinin farklı bir anneden gelmesi sağlanmıştır. Erkek ve dişi yavrular arasından seçim rastgele yapılmıştır. Sonuçta her biri 12 sıçandan oluşan dört grup Kontrol Dişi (KD, n=12), Deney Dişi (DD, n=12), Kontrol Erkek (KE, n=12) ve Deney Erkek (DE, n=12) şeklinde oluşturulmuştur. Sıçanlar 3 aylık oluncaya kadar laboratuarda barındırılmışlardır.

Sıçanlar 3 aylık olduklarında, Tıbbi Biyokimya Öğrenme Laboratuvarına transfer edilmiş ve adaptasyonu için 5 gün beklenmiştir. Ardından Morris Su Labirenti, Açık alan testi, Zorlanmış Yüzme testi şeklinde bazı öğrenme ve davranışsal testlere tabi tutulmuşlardır.

3.1.2. Sentetik Gıda Boyaları

NOAEL değerleri temel alınarak her bir sıçanın ağırlığına göre günlük alabileceği maksimum doz hesaplanmıştır. NOAEL değerleri, ADI değerlerinin 100 katıdır (12, 14, 51).

Kullanılan boya karışımı içeriği ve NOAEL değerleri şöyledir: Eritrozin 10 mg/kg/gün (42), ponso 4R 70 mg/kg/gün (43), allura red AC 700 mg/kg/gün (44), sunset yellow FCF 250 mg/kg/gün (45), tartrazin 750 mg/kg/gün (46), amarant 15 mg/kg/gün (47) brilliant blue FCF 600 mg/kg/gün (48), azorubin/karmozin 400 mg/kg/gün (49) ve indigotin 500 mg/kg/gün (50).

Boya karışımı, sıçanların her 100 gr ağırlığı başına 1 ml olacak şekilde ve günde tek seferde oral gavaj ile her gün verilmiştir. Gıda boyası karışımı, içme suyunda çözdürülerek haftalık olarak hazırlanmış ve hafta boyunca buzdolabında saklanmıştır. Gıda boyası grubu ile eş zamanlı olarak kontrol grubuna da oral gavaj ile her gün aynı hacimde içme suyu verilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Öğrenme ve Davranışsal Testler

3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze

Kognitif (bilişsel, kavramsal) fonksiyonun ölçütü olarak kullanılır ve hipokampusu bağımlı mekansal hafızayı değerlendiren bir düzenektir. Morris su

labirenti 150 cm çapında, 80 cm yksekliginde, i yüzeyi beyaza boyanmiş dairesel bir havuzdur. Deney mekanı, güneş işiğı almayan bir odadır ve su labirentini çevreleyen, işiğı duvara yansıtın dört adet halojen lamba ile aydınlatılmıştır. Labirentin çevresinde çeşitli görsel ipuçları (tablo, sandalye, masa) sabit tutulmaktadır. Havuzdaki suyun sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanır ve her deney günü ölçülür. Su toksik olmayan koyu sarı boya ilave edilmesiyle opaklaştırılmıştır. Bu düzenekte, su seviyesinin 2 cm altında kalacak şekilde gizli bir platform yerleştirilmiştir. Sıçan labirente konulduğunda görevi saklı platformu bulmaktır.

Deney prosedürü:

Her deney, su labirentindeki tüm egzersizler boyunca zamanı ve izlenen yolu kaydeden bir bilgisayarla bağlantılı olan havuzun üzerine yerleştirilmiş bir kamera ile kaydedilmiştir. Çalışmamızda Smart Versiyon 2.5 programı kullanılmıştır (Smart Video-Tracking, Panlab, Barcelona, İşpanya). Bu proram yardımıyla labirent zon 1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılmış dört eşit büyüklükteki sanal kadrana bölünmüştür. Hedef kadrın 4. kadrın olarak belirlenmiş ve tüm egzersizlerde platform 4. Kadrandaki tutulmuştur. Deney boyunca hayvanlar her gün yüzü labirentin duvarına dönmüş şekilde 4 kadrının her birinden bir kere havuza bırakılmışlardır. Günlük eğitimler 4 rastgele başlangıç pozisyonundan (zon1, 2, 3 ve 4) ratların suya bırakıldıkları 4 egzersizden oluşmuş ve platforma erişme süreleri kaydedilmiştir. Başlangıç yerleri havuzun vresinde eşit şekilde yerleştirilmiştir. Bu uygulamaya 5 ardışık gün devam edilmiştir. Morris'in protokolü ile mekansal ipuçlarını ve yönsel stratejileri kullanarak platformun yerini öğrenme egzersizi 1-5. günlerde yapılmıştır (66). Sonra 6. günde mekansal hafıza ölümü için 'Probe Trial' adı verilen test yapılmıştır. Testin ilk gününde sıçanlara yüzmeleri için 60 sn'lik bir süre tanınmıştır. Eğer bir sıçan saklı platformu 60 sn'de bulamazsa hedef platforma yönlendirilmiş, platformu tanınması ve platformun sudan kurtuluş anlamına geldiğini göstermek için platformda 30 sn bekletilmiştir. Saklı platformu bulma süresi 60 sn'de gerçekleşememiş ise 70 sn olarak kaydedilmiştir. Deneyin 2-5. günlerinde bir sıçan 60 sn'de platformu bulamaz ise araştırmacı tarafından platforma yönlendirilmiştir ancak bu kez platformda 15 sn kalmalarına izin verildikten sonra araştırmacı tarafından kafesine geri konulmuştur. Her sıçan için egzersizler arasında en az 20 dk'lık aralar olmasına

dikkat edilerek, her gün 4 egzersiz yaptırılmıştır. Egzersizlerden sonra sıçanlar kafeslerine geri bırakılmadan önce bir havlu ve 40-W beyaz ampul (OSRAM) altında tutularak kurutulmuşlardır. Beşinci günün sonunda her sıçan toplamda 20 kez öğrenim egzersizi yapmış ve eğitim dönemini tamamlamıştır.

‘Probe trial’ adı verilen test 6. günde saklı platform kaldırılarak, sıçanlar saklı platformu içermeyen diğer 3 kadrandan bırakılmıştır. Sıçanların daha önceden saklı platformun olduğu hedef kadranda geçirdikleri süre kaydedilmiştir. Bu süre mekansal hafızanın ölçütü olarak hesaplanmıştır.

Sıçanlara 7. günde bu deneyin ipucu içeren versiyonu ‘Visible (görünür) Platform’ prosedürü uygulanmıştır. Bu versiyon kullandığımız boyaların, görmeye negatif etkileri, motivasyonu azaltıcı etkileri, artmış anksiyete gibi etkileri olup olmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Her deneyde görünür platform farklı kadrana taşınarak (4. kadrana hariç) sıçanlar 4. (hedef) kadrandan bırakılmıştır. Görünür platformu bulma süreleri kaydedilmiştir (66).

3.2.1.2. Açık Alan Testi - Open Field Test

‘Açık alan testi’ lokomotor, eksploratuar (keşifçi) ve anksiyete ilişkili davranışları değerlendirmek için kullanılmıştır. Aparat 100x100 cm’lik kare bir alan ve 40 cm yükseklikte duvara sahip, siyah renkli, ahşaptan yapılmış bir aпарattır. Zemin beyaz çizgilerle ayrılmış 16 eşit kareden oluşmuştur. Aparatı çevreleyen 4 halojen lamba duvara yansıtılarak indirekt ve diffüz aydınlanma sağlanmıştır. Hayvanlar sessiz bir ortamda teste tabi tutulmuşlar ve 5 dk’lık periyot boyunca lokomotor aktiviteleri tepedeki videokamera yardımıyla kaydedilmiştir (Sony SSC-DC398P, Japon). Her sıçan ‘açık alan testi’nde tek tek değerlendirilmiştir. Her hayvanın 5 dk boyunca alanı keşfetmesine izin verilmiş ve davranışları skorlanmıştır. Davranış skorlaması şu şekilde yapılmıştır: en az 3 ayağıyla geçtiği çizgi (line crosses) sayısı, şahlanma (rearing) ve duvara tırmanma (walling) sayıları, aparatın kenarında geçirdiği süre (edge duration) ve aparatın merkezinde geçirdiği süre (centre duration) ve merkez karedeki aktivite sayısı (center square activity) hayvanların kafeslerindeki durumlarını bilmeyen bir kaydedici tarafından kaydedilmiştir. Geçtiği çizgilerin sayısı (line crossing), sıçanın lokomotor

davranışının (horizontal lokomotor aktivite) bir formudur. Şahlanma hareketi hayvanın arka ayakları üzerinde yukarıya kalkması olarak tanımlanmıştır. Duvara tırmanma hareketi hayvanın ön ve arka ayakları üzerinde labirent duvarında yukarı kalkması olarak tanımlanmıştır. Merkezden geçme sayısı ise kare alanın tam ortasına çizilmiş 25cmx25cm'lik bir kareden geçme sayısını ifade eder. Merkezde kalma süresi yine merkez karede geçirilen süreyi ifade eder. Dış kadranda kalma süresi (edge duration), dış karede geçirilen süreyi ifade eder. Geçtiği çizgi sayısı, şahlanma sayısı, duvara tırmanma sayısı, aparatın kenarında geçirdiği süre, merkez karedeki aktivite sayısı ve aparatın merkezinde geçirdiği süre; lokomotor aktiviteyi, keşifçi davranışı ve anksiyeteyi yansıtan ölçütler olarak kullanılırlar. Geçtiği çizgi sayısının, şahlanma sayısının, duvara tırmanma sayısının, merkez karedeki aktivite sayısının ve aparatın merkezinde geçirdiği sürenin artışı artmış lokomotor aktivite ve eksplorasyonu ve de azalmış anksiyeteyi ifade etmektedir. Aparatın kenarında geçirdiği sürenin artan sıklığı, azalmış keşifçi davranışı ve yüksek anksiyeteyi ifade eder (67, 68).

3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi - Forced Swim Test

Sıçanlar kaçış olmayan bir ortamda yüzmeye zorlandıklarında, başlangıçtaki kuvvetli aktivitelerinden sonra hareketsiz olma eğilimi gösterirler. Bu hareketsizlik süreci davranışsal çaresizliğin semptomu olarak tanımlanmıştır (69, 70). Bu çalışma, Porsolt'un methodunun bir modifikasyonu kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, sıçanlar tek tek 50 cm yüksekliğinde, 20 cm çapında ve 30 cm'ye kadar su ile dolu polietilen, şeffaf, silindirik bir tanka arka ayakları tankın zeminine değmeyecek şekilde bırakılmışlardır (Any Maze, Wood Dale, Amerika). Su 23°C'ye ayarlanmış ve sıçanlar tanka bırakılarak 6 dk boyunca aktiviteleri kaydedilmiştir (71). Ardından, kaydedilen davranışlar hareketsiz (immobil) ve hareketli (mobil) faz olmak üzere kaydedilmiştir. 'hareketsiz olduğu süre' (Immobility time) sıçanın hiç hareket etmediği ve sadece suyun yüzeyinde kalması için gerekli minimum hareketler yaptığı durum olarak tanımlanmıştır. 'Hareketli olduğu süre' (mobility time) aktif ve kaçma yönelimli davranışlar olarak kabul edilen yüzme, sıçrama, şahlanma, koklama ya da dalma hareketleri olarak tanımlanmıştır. Tüm bu hareketler Smart Version 2.5 bilgisayar programı kullanan bir bilgisayarla bağlantılı tepe kamerası (Sony SSC-DC398P) ile kaydedilmiştir.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Öğrenme ve Hafıza Deneyleri ile Anksiyete Deneyleri verileri SPSS 15 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar dörtlü (KD, KE, DD, DE) ve ikili (Kontrol ve Deney) olmak üzere farklı şekillerde karşılaştırılmıştır. Tüm verilerin homojen dağılıma uyup uymadıklarını değerlendirmek üzere Levene Homojenite testi yapılmıştır.

Morris su labirenti verilerinden 'platformu bulma süresi'ne zamanın etkisini değerlendirmek için (grup içi karşılaştırma) Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi (Repeated Measure ANOVA) kullanılmıştır. Mauchly'nin küresellik testi uygulanmış ve Green House-Geisser çözümlenmesi dikkate alınmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farkın hangi günden kaynaklandığını anlamak için Bonferroni düzeltmeli t-test uygulanmıştır ve $p < 0,01$ anlamlı kabul edilmiştir.

Morris su labirenti verilerinden 'Platformu bulma süresi', 'Probe test', 'Görünür platformu bulma süresi', 'Ortalama hız', 'Katedilen mesafe' açısından grupların karşılaştırılması Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) ile yapılmıştır ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Kontrol ve Deney grubu olarak istatistiksel analiz t-testi ile yapılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Açık alan testi verilerinden 'dış zonda, iç zonda ve merkez karede geçirdiği süreler', 'katettiği yol', 'ortalama hız', 'merkezden geçme sayısı' ve 'dışkılama sayısı' açısından veriler homojen olmadığı için bu parametreler non-parametrik bir test olan Kruskal Wallis ile değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Mann Whitney U test ile ikili karşılaştırmalar yapılmış ve $p < 0,01$ anlamlı kabul edilmiştir. Geçtikleri çizgi sayıları (line crosses), duvara tırmanma sayıları (walling), şahlanma sayıları (rearing) ve idrar yapma sayılarını kapsayan veriler homojen dağılım gösterdiği için Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiş, anlamlı veriler için posthoc test olarak Bonferroni düzeltmesi yapılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Aynı verilerin kontrol ve deney grubu olarak istatistiksel değerlendirmesi için t- testi kullanılmıştır ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test) verileri ('Hareketli oldukları süre' ve 'hareketsiz oldukları süre') Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiştir. Anlamli verilerin hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için posthoc test olarak Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ve $p < 0,05$ anlamli kabul edilmiştir. Aynı verilerin kontrol ve deney grubu olarak istatistiksel değerlendirmesi için t-testi kullanılmıştır ve $p < 0,05$ anlamli kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Morris Su Labirenti Verileri

5.1.1. Hedef Platformu Bulma Süresi

Grup içi günden güne değişimlerinin istatistiksel değerlendirmesi için Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Tüm gruplarda günden güne hedef platformu bulma süreleri açısından anlamlı fark saptanmıştır. Green House-Geisser çözümlemesi dikkate alınmış ve tüm gruplarda anlamlı değişiklikler saptanmıştır (KD: $F= 29,287$ $p= 0,0001$; KE: $F= 41,76$ $p= 0,0001$; DD: $F= 53,18$ $p=0,0001$; DE: $F= 24,96$ $p= 0,0001$). İstatistiksel olarak anlamlı farkın hangi günden kaynaklandığını anlamak için Bonferroni düzeltilmeli t-testi uygulanmıştır ve $p< 0,01$ anlamlı kabul edilmiştir. Tüm gruplarda 1. ile 2. gün arasında ($p= 0,0001$); 1. ile 3. gün arasında ($p= 0,0001$); 1. ile 4. gün arasında ($p= 0,0001$); 1. ile 5. gün arasında ($p=0,0001$) ayrıca KD grubunda ek olarak 2. ile 4.gün arasında ($p=0,004$) ve 2. ile 5. gün arasında ($p= 0,0001$); DD grubunda 2. ile 3. gün arasında ($p=0,008$), 2. ile 4. gün arasında ($p= 0,0001$) ve 2. ile 5. gün arasında ($p= 0,0002$); DE grubunda 2. ile 4. gün arasında ($p=0,002$) ve 2. ile 5. gün arasında ($p=0,003$) anlamlı fark saptanmıştır. Bu veriler tüm grupların sistemi 2. günden itibaren öğrendiğini ifade etmektedir. Tüm grupların hedef platformu bulma süreleri Tablo 2 ve Grafik 1A'da gösterilmiştir.

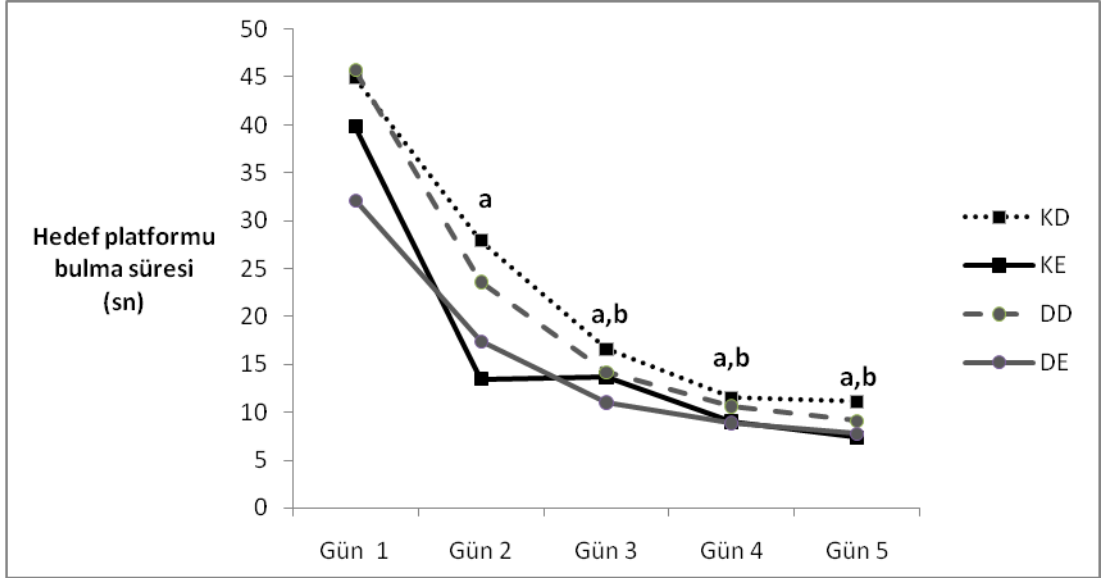
Tablo 2. Tüm grupların hedef platformu bulma süreleri (sn)

Gruplar	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4	Gün 5
KD	44,87±11,23	27,89±11,71 ^a	16,54±9,37 ^{a,b}	11,5±8,75 ^{a,b}	11,1±5,51 ^{a,b}
KE	39,87±11,25	13,5±7,42 ^a	13,66±8,41 ^a	9,06±4,4 ^a	7,41±2,08 ^a
DD	45,7±6,66	23,62±11,27 ^a	14,22±6,93 ^{a,b}	10,66±7,69 ^{a,b}	9,14±5,21 ^{a,b}
DE	32,14±7,92	17,41±9,08 ^a	11,04±6,75 ^{a,b}	8,89±4,22 ^{a,b}	7,79±3,35 ^{a,b}

a: Tüm gruplarda 1. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p< 0,01$).

b: KD, DD ve DE grupları için 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p< 0,01$). İstatistiksel değerlendirme Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi ile yapılmış, ardından Bonferroni düzeltilmeli t-testi uygulanmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Grafik 1A. Tüm grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması (Grup içi değerlendirme)



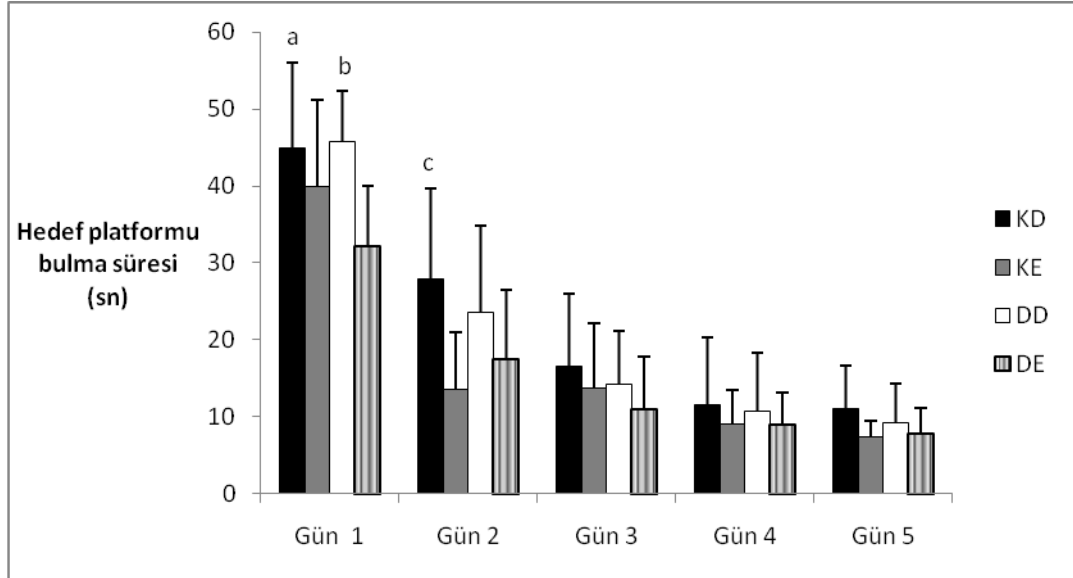
KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

a: Tüm gruplarda 1. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$).
b: KD, DD ve DE grupları için 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirme Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi ile yapılmış, ardından Bonferroni düzeltilmeli t-testi uygulanmıştır. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

Hedef platformu bulma sürelerinin gruplar arasında karşılaştırılması için öncelikle verilerin homojen dağılıp dağılmadığına Levene Homojenite testi ile bakılmıştır. Dağılım homojen olduğundan Tek Yönlü Varyans Analizi ile gruplar arası karşılaştırmalar yapılmış ve ardından anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını değerlendirmek için posthoc test olarak Bonferroni testi yapılmıştır ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

1. ve 2. gün verilerinin gruplar arası karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). Birinci günde KD ile DE ($p=0,012$) ve DD ile DE ($p=0,006$) grupları arasında, 2. günde ise KD ile KE ($p=0,006$) grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. Bu veri cinsiyetin öğrenme hızına etkisi olduğunu göstermektedir. Eğitimin 3., 4. ve 5. günlerinde ise hedef platformu bulma sürelerinde gruplar arası fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Grafik 1B).

Grafik 1B. Tüm grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması (Gruplar arası değerlendirme)



KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

'a' ve 'b': 1. Günde DE ile sırasıyla KD ve DD grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,05$). 'c': 2. günde KE ile KD grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,05$). İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analiziyle ve ardından posthoc test olarak Bonferroni testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

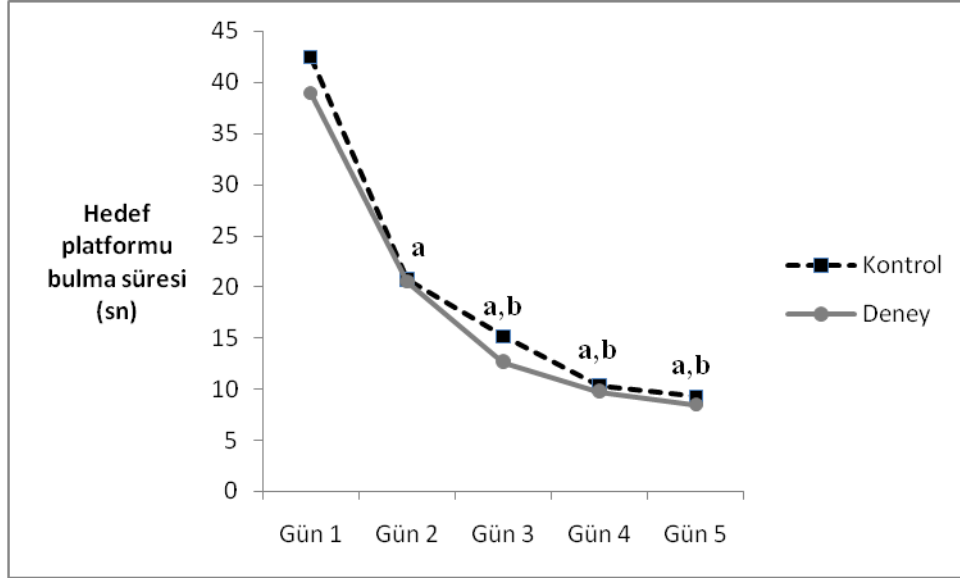
Kontrol ve Deney grubu olarak gruplar t-testi ile değerlendirildiğinde günden güne hedef platformu bulma süreleri açısından anlamlı fark saptanmıştır. Her iki grupta da 1. ile 2. gün, 1. ile 3. gün, 1. ile 4. gün ve 1. ile 5. gün arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Ayrıca 2. ile 3. gün ($p = 0,002$), 2. ile 4. gün ve 2. ile 5. günler ($p < 0,0001$) arasında her iki grupta da anlamlı fark saptanmıştır. Bu veriler her iki grubun da 2. günden itibaren sistemi öğrendiğini ifade etmektedir. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma süreleri Tablo 3 ve Grafik 2A'da verilmiştir.

Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma süreleri (sn)

Gruplar	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4	Gün 5
Kontrol	42,37±11,29	20,69±12,08 ^a	15,1±8,83 ^{a,b}	10,28±8,83 ^{a,b}	9,26±4,49 ^{a,b}
Deney	38,927±9,96	20,52±10,50 ^a	12,63±6,89 ^{a,b}	9,78±6,13 ^{a,b}	8,46±4,34 ^{a,b}

a: Kontrol ve deney gruplarında 1. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). b: Kontrol ve deney grupları için 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirme t-testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

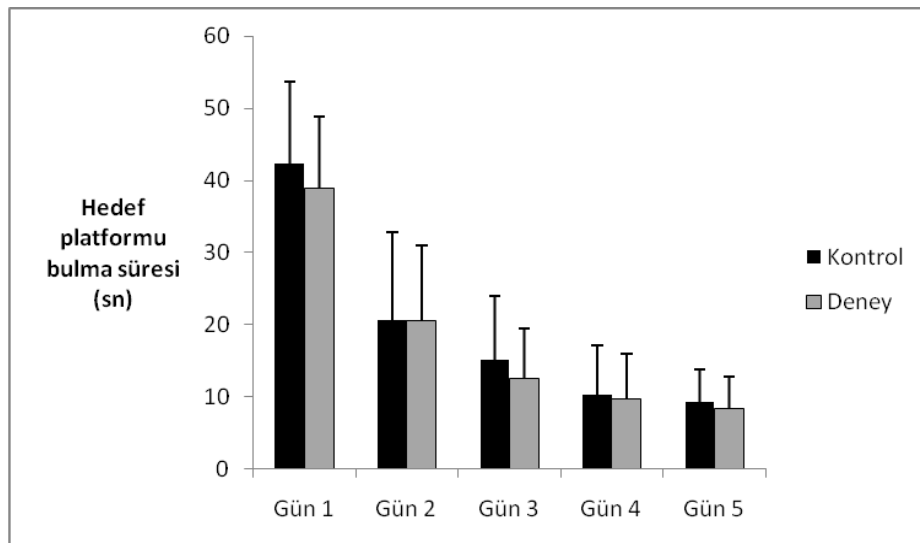
Grafik 2A. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması (Grup içi değerlendirme)



a: Kontrol ve deney gruplarında 1. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). b: Kontrol ve deney grupları için 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirme t-testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

Gruplar, Kontrol ve Deney grubu olarak t-testi ile karşılaştırıldığında tüm günlerde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır [1. Gün ($p=0,268$); 2. Gün ($p=0,957$); 3. Gün ($p=0,286$); 4. Gün ($p=0,792$); 5. Gün ($p=0,538$)] (Grafik 2B).

Grafik 2B. Kontrol ve deney gruplarının hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması (Gruplar arası değerlendirme)



Grupların karşılaştırılmasında t-testi kullanılmış ve değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

5.1.2. Probe Test

Probe test verilerinin Levene homojenite testiyle homojen olup olmadığı değerlendirilmiş, ardından veriler homojen olduğu için Tek Yönlü Varyans Analizi ile gruplar arası fark olup olmadığı değerlendirilmiştir.

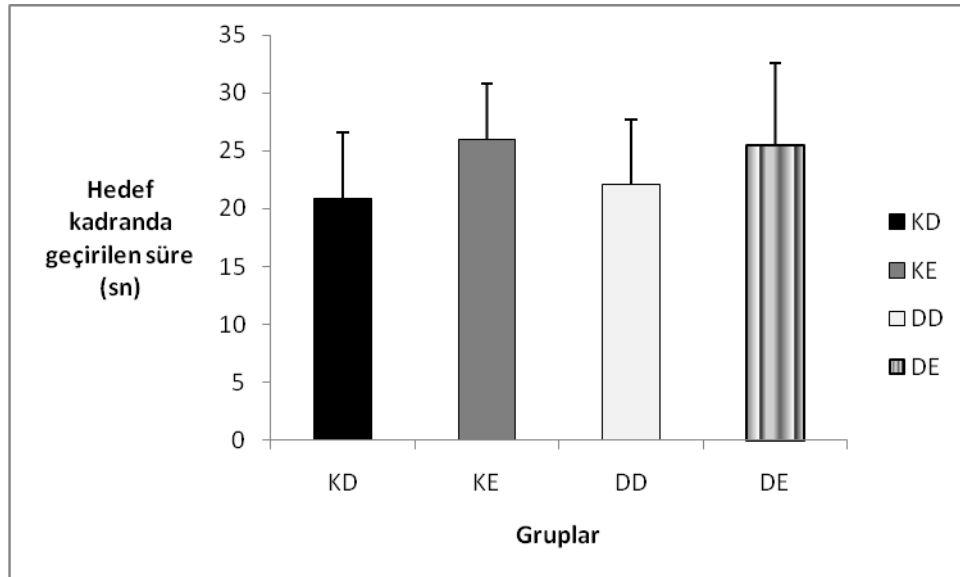
Hedef kadranda geçirilen ortalama süre açısından ($F=2,150$; $p=0,108$), ortalama hızları ($F=1,224$; $p=0,312$) ve katettikleri ortalama yol ($F=1,221$; $p=0,313$) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 2 ve Grafik 3A).

Tablo 4. Tüm grupların probe test verilerinin karşılaştırılması

İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek.

Gruplar	KD	KE	DD	DE
Hedef kadranda geçirilen ortalama süre (sn)	20,8±5,5	25,9±4,8	22±5,5	25,4±7,1
Ortalama hız (cm/sn)	23,6±2,8	22±2	22±1,7	22,4±2,7
Katedilen ortalama yol (cm)	1418,7±171	1323,9±125	1319,9±102	1346,4±166

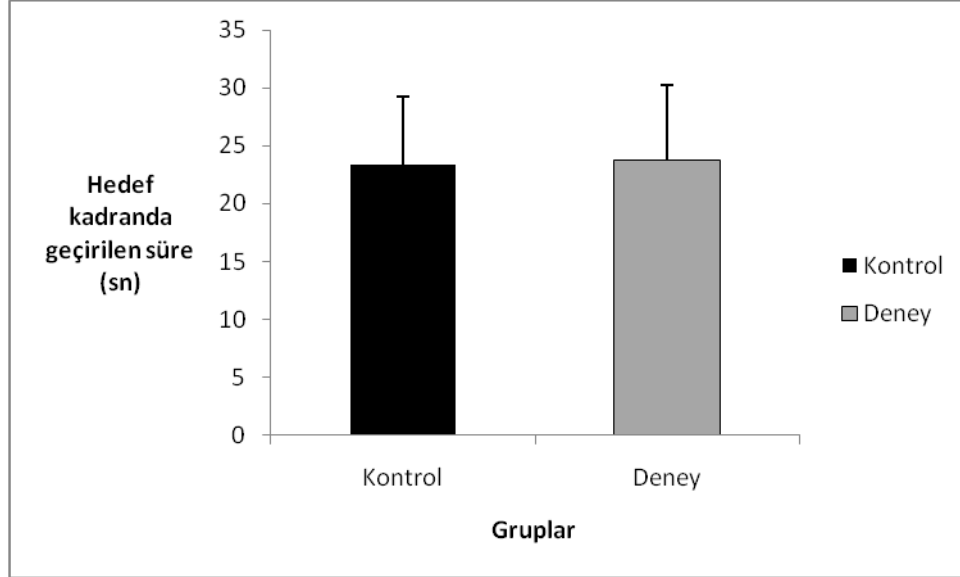
Grafik 3A. Tüm grupların probe test performanslarının karşılaştırılması



İstatistiksel değerlendirme Tek yönlü Varyans Analizi ile yapılmış ve değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

Deney ve kontrol grubu t-testi yapılarak karşılaştırıldığında, ‘hedef kadranda geçirilen ortalama süre’ ($F=0,994$; $p=0,851$), ‘katedilen ortalama yol’ ($F=1,476$; $p=0,366$), ‘ortalama hız’ ($F=1,473$; $p=0,370$) ve hedef kadranda ortalama katedilen mesafe ($F=1,665$; $p=0,933$) açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (Grafik 3B).

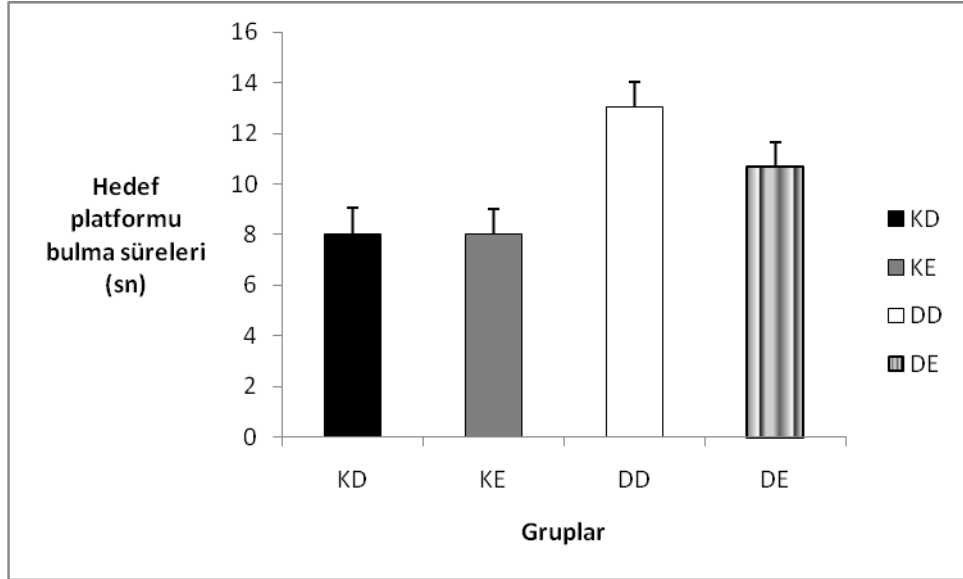
Grafik 3B. Kontrol ve deney gruplarının probe test performanslarının karşılaştırılması



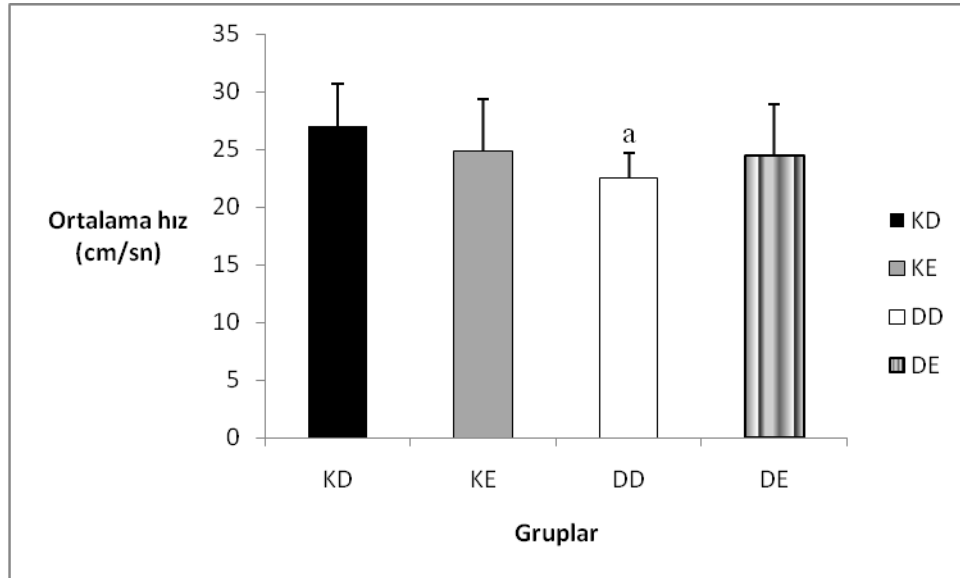
Kontrol ve Deney grubu karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

5.1.3. Görünür Platform Testi (Visible Platform Test)

Görünür platform protokolü için ‘görünür platformu bulma süresi’, ‘ortalama hız’ ve ‘katedilen yol’ verileri esas alınmıştır. Önce verilerin homojen dağılımını değerlendirmek için Levene homojenite testi yapılmış ve ardından verilerin gruplar arası karşılaştırılması için yine Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirme yapılmıştır. Platformu bulma süresi ($F=1,257$; $p=0,301$) ve katedilen yol ($F=1,108$; $p=0,356$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamış (Grafik 4A), ancak ortalama hız ($F=2,864$; $p=0,047$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır (Grafik 4B). DD grubunun ortalama hızı ($22,52\pm 2,14$) KD grubunun ortalama hızından ($27,06\pm 3,61$) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

Grafik 4A. Tüm grupların görünür platform performanslarının karşılaştırılması

İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

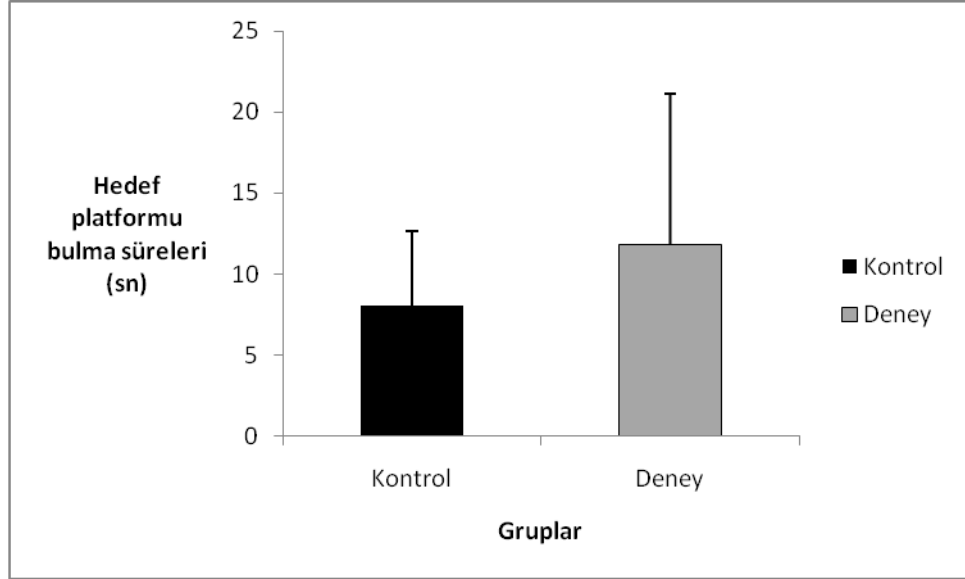
Grafik 4B. Tüm grupların görünür platform testinde ortalama hızlarının karşılaştırılması

a: KD grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı gösterir ($p < 0,05$). İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

Aynı veriler t-testi ile deney grubu ve kontrol grubu şeklinde karşılaştırıldığında; 'platformu bulma süresi' ($F=7,92$; $p=0,08$) ve 'katedilen yol' ($F=4,447$; $p=0,141$) açısından anlamlı bir fark saptanmamış ancak 'ortalama hız'

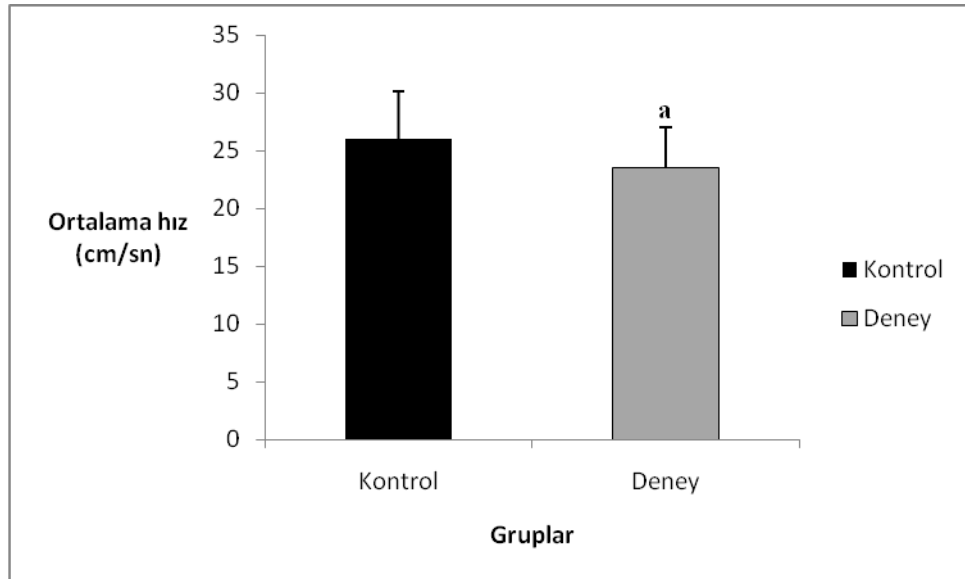
($F=1,518$; $p=0,03$) verisinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır (Grafik 4C ve 4D). Kontrol grubunun test boyunca ortalama hızı $25,97\pm 4,13$ cm/sn iken deney grubunun ortalama hızı $23,46\pm 3,6$ cm/sn şeklinde saptanmıştır.

Grafik 4C. Kontrol ve deney gruplarının görünür platform performanslarının karşılaştırılması



Kontrol ve Deney grubu karşılaştırılmasında t-test kullanılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Grafik 4D. Kontrol ve deney gruplarının görünür platform testinde ortalama hızlarının karşılaştırılması



a: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı gösterir ($p < 0,05$). Kontrol ve Deney grubu karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

5.2. Açık Alan Testi (Open Field Test) Verileri

Diğer verilerde olduğu gibi Açık Alan Testi verilerinin de homojen olup olmadığı Levene homojenite testi ile değerlendirilmiştir. Grupların dış zonda, iç zonda ve merkez karede geçirdiği süreler açısından, grupların katettiği yol, ortalama hızları, merkezden geçme sayısı ve dışkılama sayısı açısından verileri homojen olmadığı için bu parametreler non-parametrik bir test olan Kruskal Wallis ile değerlendirilmiştir. Geçtikleri çizgi sayıları (line crosses), duvara tırmanma sayıları (walling), şahlanma sayıları (rearing) ve idrar yapma sayılarını kapsayan veriler homojen dağılım gösterdiği için Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiştir.

Grupların dış zonda ($p=0,142$), iç zonda ($p=0,107$) ve merkez karede ($p=0,261$) geçirdiği süreler açısından, grupların katettiği yol ($p=0,152$) ve ortalama hızları ($p=0,145$), geçtikleri çizgi sayıları (line crosses) ($F=0,608$; $p=0,613$), duvara tırmanma sayıları (walling) ($F=1,224$; $p=0,312$), şahlanma sayıları (rearing) ($F=0,175$; $p=0,913$), merkezden geçme sayısı ($p=0,226$) ve idrar yapma sayıları ($F=1,705$; $p=0,180$) açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dışkılama sayısı açısından anlamlı bir fark elde edilmiş ($p=0,004$), ardından farkın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Mann Whitney U test ile ikili karşılaştırmalarda KD ile DE ($p=0,001$) grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. DE ($4,33\pm 0,482$) grubu KD ($1,75\pm 0,35$) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede fazla dışkılama sayısına sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 5. Tüm grupların açık alan testi verilerinin karşılaştırılması

Gruplar	KD	KE	DD	DE
Geçtikleri çizgi sayısı	38±15,3	33,5±10,4	41±13,3	35,8±16,7
Duvara tırmanma sayısı	13±6,2	12,1±4,5	12,3±4,7	9,4±3,9
Şahlanma sayısı	4,5±4,7	4±3,5	5,4±4,7	4,5±5,8
Merkezden geçiş sayısı	4,7±2,9	2,5±2,3	3,8±1,7	5±4
Dış zonda geçirdiği süre (sn)	289,7±15	296,5±3,8	292,5±7,4	280,2±19,5
İç zonda geçirdiği süre (sn)	8,6±13,4	2,6±3,2	5,6±7	14±13,4
Merkez karede geçirdiği süre (sn)	1,4±2	0,7±1,2	1,8±1,9	5,6±7
İdrar yapma sayısı	1,9±0,9	1,7±0,9	1,2±0,8	1,3±0,4
Dışkılama sayısı	1,7±1,2	3±2	4,6±2,7	4,3±1,6*

*: KD grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$). Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek.

Kontrol ve deney grubunun karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Bu değerlendirmede de dörtlü karşılaştırmaya benzer şekilde dış zonda ($p=0,095$), iç zonda ($p=0,183$) ve merkez karede ($p=0,031$) geçirdiği süreler açısından, katettiği yol açısından ($p=0,182$) ve ortalama hızları ($p=0,182$) açısından, geçtikleri çizgi sayıları (line crosses) ($p=0,515$), duvara tırmanma sayıları (walling) ($p=0,240$), şahlanma sayıları (rearing) ($p=0,607$), merkezden geçme sayısı ($p=0,389$) ve idrar yapma sayıları ($p=0,031$) açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dışkılama sayıları açısından değerlendirildiğinde anlamlı bir fark saptanmış ($p=0,001$), deney ($4,5\pm0,45$) grubunda, kontrol grubuna ($2,38\pm0,35$) göre dışkılama sayısının anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 6. Kontrol ve deney gruplarının açık alan testi verilerinin karşılaştırılması

Gruplar	Kontrol Grubu	Deney Grubu
Geçtikleri çizgi sayısı	35,7±13	38,4±15
Duvara tırmanma sayısı	12,5±5,3	10,8±4,5
Şahlanma sayısı	4,2±4,1	5±5,2
Merkezden geçiş sayısı	3,6±2,8	4,4±3,1
Dış zonda geçirdiği süre (sn)	293,1±11,2	286,3±15,7
İç zonda geçirdiği süre (sn)	5,6±10	9,8±11,3
Merkez karede geçirdiği süre (s)	1,1±1,6	3,7±5,3
İdrar yapma sayısı	1,8±0,9	1,2±0,6
Dışkılama sayısı	2,3±1,7	4,5±2,2*

*: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$). Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

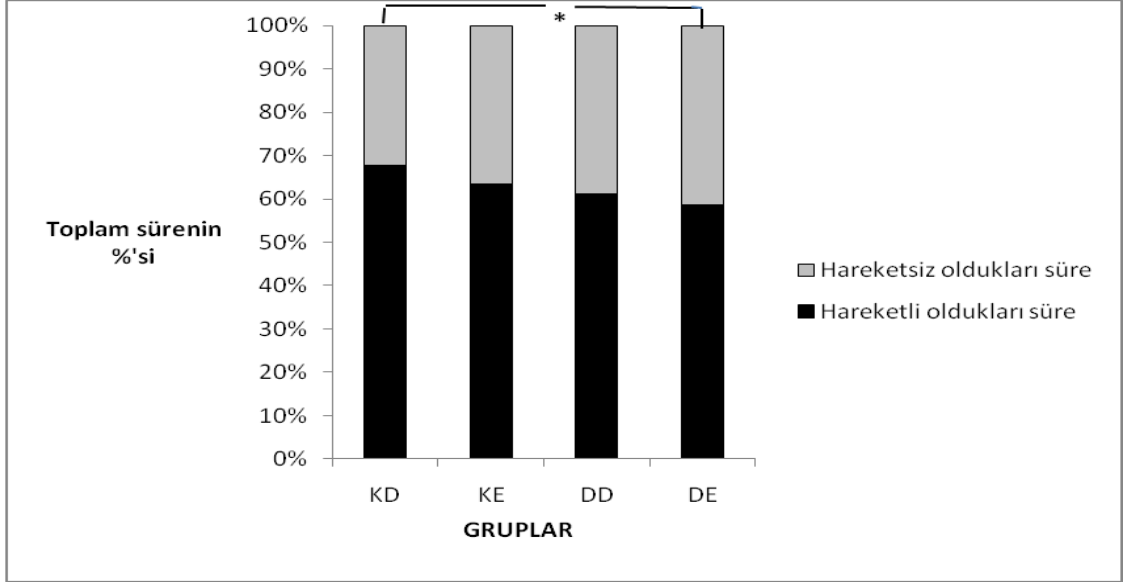
5.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test) Verileri

Veriler önce Levene homojenite testi ile değerlendirilmiş, veriler homojen dağılım gösterdiği için ardından Tek Yönlü Varyans Analizi testi ile ‘hareketli oldukları süre (mobility time)’ ve ‘hareketsiz oldukları süre (immobility time)’ açısından gruplar karşılaştırılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

‘Hareketli oldukları süre’ ($F=3,049$; $p=0,038$), ‘hareketsiz oldukları süre’ ($F=3,091$; $p=0,037$), ortalama hızları ($F=3,53$; $p=0,022$) ve katettikleri mesafe ($F=3,63$; $p=0,020$) açısından anlamlı farklar saptanmıştır. Verilerin posthoc değerlendirmesinde ‘hareketli kaldıkları süre’ ve ‘hareketsiz kaldıkları süre’

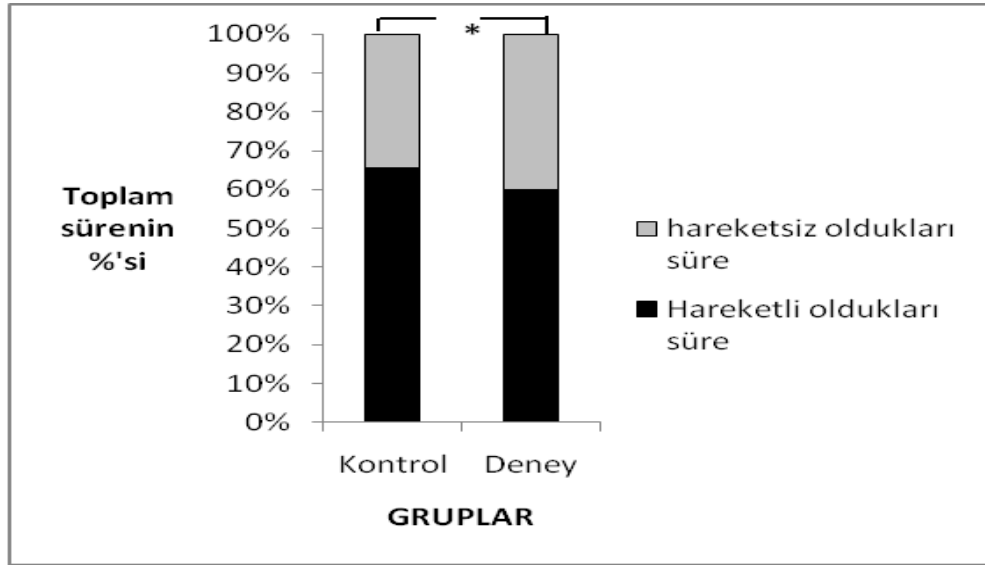
açısından KD ile DE grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,034$; $p=0,033$) (Grafik 5A).

Grafik 5A. Tüm grupların zorlanmış yüzme testi performansları



*:Karşılaştırıldığında anlamlı farkı gösterir ($p<0,05$). İstatistiksel değerlendirmede, Tek Yönlü Varyans Analizi ve ardından posthoc test olarak Bonferroni testi yapılmıştır. KD: Kontrol Dişi, KE: Kontrol Erkek, DD: Deney Dişi, DE: Deney Erkek

Deney ve kontrol grubu olarak ikili değerlendirme için t-testi kullanılmıştır. İkili değerlendirmede dördümlü karşılaştırma ile benzer şekilde 'hareketli oldukları süre' ($F=0,284$; $p=0,015$) ve 'hareketsiz oldukları süre' ($F=0,360$; $p=0,013$) açısından anlamlı fark tespit edilmiştir. Deney grubunun hareketli olduğu süre ($215,30\pm30,01$) kontrol grubuna ($235,74\pm26,10$) göre anlamlı düzeyde düşük iken hareketsiz olduğu süre ($144,68\pm30$) kontrol grubuna ($123,87\pm25,74$) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Grafik 5B).

Grafik 5B. Kontrol ve deney gruplarının zorlanmış yüzme testi performansları

*:Karşılaştırıldığında anlamlı farkı gösterir ($p<0,05$). İstatistiksel değerlendirilmede, Tek Yönlü Varyans Analizi ve ardından posthoc test olarak Bonferroni testi yapılmıştır.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaptığımız çalışmada sentetik gıda boyalarına anne karnında maruz kalan yavrular erişkin hale geldiklerinde, mekansal hafıza ve davranışsal bazı parametreler üzerine bu gıda boyalarının etkilerini araştırdık. Sonuçlarımız yaygın olarak kullanılan sentetik gıda boyalarının, NOAEL düzeylerinde bir karışım olarak uygulandıklarında sıçanlarda hipokampusu bağımlı mekansal öğrenme ve hafıza üzerine olumsuz bir etkilerinin olmadığını ancak motivasyonu azaltıcı etkileri olduğunu göstermiştir. Lokomotor aktivite, keşifçi davranış ve anksiyete değerlendirmesinde kullanılan testlerde sadece anksiyete parametrelerinden birinde (dışkılama sayısı) anlamlı artışa neden olmuştur. Cinsiyeti de dikkate alarak yapılan karşılaştırmalar, cinsiyetin öğrenme hızı ve anksiyete üzerine etkisinin olduğunu düşündürmüştür. Erkeklerde dişilere göre mekansal öğrenmenin daha hızlı olduğu ancak beraberinde anksiyete düzeyinin de biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Boyalara maruz kalanlarda anksiyete ve depresyona eğilimde artış olduğu, cinsiyet dikkate alındığında bu etkinin erkek cinsten kaynaklandığı gözlenmiştir. Boyalara maruz kalanlarda görülen ‘ortalama hız’ parametresindeki anlamlı düşüş de gıda boyalarının motivasyon üzerine olumsuz etkilerini düşündürmüştür. Verilerimizin ışığında sentetik gıda boyası karışımının cinsiyet faktörü ile değerlendirildiğinde anksiyete ve depresyona eğilimi arttırıcı etkisi olduğunu ve motivasyonu azalttığını söylemek mümkün olacaktır.

Öğrenme ve hafıza, SSS'nin birçok bölgesi ile ilgili kompleks fonksiyonları içerir (65). Kompleks bir fonksiyon olan öğrenme, sosyal ve fiziksel çevrenin yanında fizyolojik şartlardaki değişikliklerden de etkilenir. Yapılan araştırmalarda tüketilen gıdaların da öğrenme, hafıza ve bazı beyin fonksiyonları üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (5). SSS, gebeliğin 6. ayından doğumdan birkaç yıl sonrasına kadar olan kritik gelişme döneminde dışarıdan gelen uyarılara daha duyarlıdır. Gıda katkı maddelerine bu dönemde maruziyet, öğrenme ve davranış üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir (7, 8, 72). Deneysel ve klinik olarak yapılan çalışmalarda, çeşitli gıda boyaları ve katkı maddelerinin nöropsikiyatrik ve

nörotoksik etkilerinden bahsedilmektedir. (7, 8, 15-22). Ancak bu etkilerin öğrenme ve hafıza üzerinde ne gibi sonuçlara neden olabileceği net değildir. Gıda boyalarına anne karnında SSS'nin kritik gelişme döneminde maruziyetin öğrenme ve hafızayı etkileyebileceği düşünülerek bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Literatürde gıda boyalarının öğrenme üzerine direkt etkilerini değerlendiren deneysel çalışmalar sınırlı sayıdadır. Klinik çalışmalar ise daha çok gıda boyası ve DEHB arasındaki ilişkiyi değerlendirmektedir. Bu sebeplerden dolayı klinik araştırmalar yönünden tartışma daha çok DEHB ve gıda boyası ilişkili literatür üzerinden yapılmıştır.

Sentetik gıda boyaları ve katkı maddelerinin davranış üzerine olumsuz etkileri olduğuna dair iddialar, ilk defa 1970'lerin başında Dr. Benjamin Feingold tarafından ortaya atılmıştır. Feingold aspirine duyarlı hastaların doğal salisilat içeren gıdalara, bunun yanında sentetik gıda boyalarına ve tatlandırıcılara da duyarlı olduklarını gözlemlemiştir. Bunun üzerine araştırmacı doğal salisilatlardan, sentetik gıda boyaları ve tatlandırıcılardan arındırılmış Feingold diyetini oluşturmuştur. Bu eliminasyon diyetini uyguladığı hiperaktif çocukların %50'sinden fazlasında pozitif yanıt elde edilmiştir (7, 73). Feingoldun ardından günümüze kadar birçok araştırmacı eliminasyon ya da yükleme diyetleri oluşturarak onun hipotezini test etmiş ve genişletmişlerdir.

Connors ve ark. hiperaktif 15 erkek çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, sentetik renklendirici, tatlandırıcı ve salisilatlardan arındırılmış Feingold'un önerdiği diyeti uygulamalarının ardından çocukların hiperaktivite belirtilerinde öğretmen değerlendirmesine göre anlamlı ölçüde azalma tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ebeveyn değerlendirmesi esas alındığında ise belirtilerde herhangi bir değişiklik olmadığı sonucuna varılmıştır (10). Bir başka çalışmasında Connors, 4-11 yaş aralığında 16 hiperaktif çocuğa bu defa gıda boyalarından arındırılmış Feingold diyeti vermiş ve ebeveyn değerlendirmesine göre çocukların % 57'sinde, öğretmen değerlendirmesine göre ise % 34'ünde hiperaktif belirtilerde azalma gözlemlemiştir. Gıda boyasının diyete eklenmesiyle gıda boyası alımından 1 saat sonra yalnızca 3 çocukta görsel-motor dikkat performansında azalma tespit etmiştir (11).

Harley ve ark. gıda katkı maddelerinin Feingold hipotezinin aksine davranış üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Fakat bu hipotezlerini daha sonraki çalışmalarında destekleyememişlerdir (12, 13).

Spring ve ark. katkı maddeleri içermeyen diyeti önce 6 hiperaktif çocuğa uygulamışlardır. Bu çalışmada tüm ebeveynler bu diyetin etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Ancak diyete katkı maddesi eklenmesiyle yalnızca 1 çocukta hiperaktif belirtilerin arttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar Feingold'un hipotezini desteklemesi açısından bu verilerin yeterli olmadığını ileri sürmüşlerdir (14).

Weiss ve ark. diyetten belli gıdaları çıkararak sentetik gıda boyası karışımını belli aralıklarla 22 çocuğa uygulamışlardır. Ebeveyn gözlemine esas aldıkları çift kör çalışmalarında, bir çocuğun orta düzeyde diğer bir çocuğun önemli ölçüde etkilendiğini tespit etmişlerdir (74).

Mattes ve Gittelman, 11 hiperaktif çocuk üzerinde yaptıkları çalışmalarında birer hafta süre ile sırasıyla katkı maddelerinden arındırılmış Feingold diyeti, gıda boyası içeren diyet ve gıda boyası içeren ancak görüntü ve koku olarak gıda boyası içerdiği belli olmayan diyet (plasebo) vermişlerdir. Öğretmen, ebeveyn ve psikiyatrik verileri ve psikolojik testler ile belirti skorunu değerlendirmişlerdir. Feingold diyetinin belirtilerde belirgin bir değişikliğe sebep olmadığını gözlemlemişlerdir (75). Mattes, gıda katkı maddeleri ve hiperaktivite ilişkisini araştıran 1976 -1983 yıllarına ait tüm raporları incelemiş ve Feingold diyeti ile hiperaktif belirtilerde azalma arasında belirgin bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüştür(76).

Silver diyetten belirli sentetik gıda boyalarının çıkarılmasının çocukların çoğunda hiperaktif davranışın azalmasında majör bir faktör gibi gözükmediğini iddia etmiştir (77).

Borris ve Mandel, DEHB tanı kriterlerine sahip 26 çocuğun 19'unda Feingold diyeti ile DEHB belirtilerinde belirgin azalma gözlemlemişlerdir. DEHB ile birlikte atopisi de olan çocukların gıda katkı maddelerinden arındırılmış diyet tedavisine daha iyi yanıt verdiklerini bildirmişlerdir (72).

Ward, gıda katkı maddelerinin davranış ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkilerini araştırdığı kapsamlı klinik çalışmasına yaşları 7-13 arasında değişen 486 hiperaktif çocuğu dâhil etmiştir. Bu çalışmada anket değerlendirme sonuçlarına göre hiperaktif çocukların % 60'ında gıda katkı maddeleri ile davranış bozukluğu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda ise bu oran %12 olarak tespit edilmiştir (78).

Bateman ve ark. okul öncesi çocuklarda yaptıkları plasebo kontrollü çift kör bir çalışmada, başlangıçta bir hafta kimyasal renklendirici ve koruyuculardan arındırılmış gıda ve sonra üç hafta boyunca rastgele seçilen gruplara ayrı ayrı günlük 20 mg renklendirici (sunset yellow FCF, tartrazine, carmoisine, ponceau 4R) ve 45 mg koruyucu (sodyum benzoat) veya plasebo vermişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacı gözlemlerinin sonuçları, diyetin herhangi bir farklılığa neden olmadığını göstermiştir. Ancak ebeveyn gözleminin sonuçları, diyetten bu maddelerin çıkarılması ile hiperaktif davranışta anlamlı azalma olduğunu ve diyete bu maddelerin ilave edilmesiyle ise hiperaktif davranışta artış olduğunu göstermiştir. DEHB olan ya da olmayan çocuklar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir(79).

McCann ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 3 yaş ve 8-9 yaş grubundaki toplam 267 çocuğun diyetlerine farklı oranlarda katkı maddesi ihtiva eden iki ayrı karışım çift kör ve randomize olarak ilave edilmiştir (Karışım A: Tartrazine, ponceau 4R, sunset yellow FCF, carmoisine ve sodyum benzoat; karışım B: Kinolin sarısı, sunset yellow FCF, allura red, carmoisine ve sodyum benzoat). Bu çalışmada öğretmen gözlemi, ebeveyn gözlemi ve klinisyen gözlemi esas alınarak sentetik gıda boyaları ve koruyucuların davranış modelleri üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Diyetle bu 4 sentetik gıda boyası ile koruyucu sodyum benzoat karışımına maruziyetin genel popülasyonda 3 yaş ve 8-9 yaş çocuklarda artmış hiperaktiviteyle sonuçlandığını ortaya koymuşlardır. Çocuklarda gıda katkı maddelerinin en azından orta ergenlik dönemine kadar hiperaktif davranışı şiddetlendirdiği sonucuna varmışlardır. Bu bulgular yan etkilerin sadece aşırı hiperaktif çocuklarda (örn. DEHB) değil aynı zamanda genel popülasyondaki çocuklarda da şiddetli hiperaktiviteye varan düzeylerde yan etkiler görülebileceğini de göstermiştir (80).

Genetik faktörlerin sentetik gıda boyalarına yanıtta gözlenen farklılığa katkısı olabileceği ileri sürülmüştür. McCann ve Bateman'ın çalışmalarındaki çocukların genotipleme bilgilerini kullanarak yapılan bir çalışmada, çocukların bir kısmında saptanan Histamin degradasyon gen polimorfizminin (HNMT) DEHB üzerine gıda boyalarının yan etkilerini azalttığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada beyinde histamin reseptörlerinin bulunması, gıda katkılarının histamin salınımına neden olabildiği ve HNMT polimorfizminin histamin yıkımını azaltabildiğinin gösterilmesi indirekt olarak genetik faktörlerin etkisini desteklemiştir (1).

EFSA 2008 yılında düzenlediği panelde, McCann ve ark.nın genel popülasyondan seçilmiş bazı çocuklarda aktivite ve dikkat üzerine sentetik gıda boya karışımı ve sodyum benzoatın etkilerini araştırdıkları çalışmalarını değerlendirmiştir. Panel, küçük istatistiksel anlamlı sonuçların tespit edildiği fakat etkilerin tüm çocuklarda tüm yaş gruplarında gözlenmediği bu çalışmayla ilgili olarak sınırlı kanıt sağladıkları sonucuna varmıştır. Böylece bu bulguların, popülasyon içinde genel gıda katkı maddelerine veya belirli gıda boyalarına duyarlılığı olan spesifik bireylerle ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır (81).

İlerleyen yıllarda Pelsser ve ark. DEHB tanısı almış 27 çocuk hastada yaptıkları çalışmalarında, katkı maddeleri içermeyen diyet uygulamışlar ve hastalık semptomları üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada sonuçlar ebeveyn ve öğretmenler tarafından değerlendirilmiştir. Ebeveyn değerlendirmesine göre çocukların %73'ünde, öğretmen değerlendirmesine göre ise %70'inde hastalık semptomlarında gerileme saptamışlardır. Kontrol grubunda ise bu oranların sırasıyla %12 ve %0 olduğunu saptamışlardır (82).

Yapılan klinik çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalarda çalıştıkları popülasyonun tamamında olmasa da bir kısmında Feingold hipotezini destekleyici yönde artmış davranışsal özellikler bildirilmiş (10, 11, 72, 74, 78-80, 83, 84) olsa da diğer araştırmacıların çalışmaları buna destek sağlayamamışlardır (12-14, 75-77). Bu çelişkili sonuçlar araştırma protokollerindeki farklılıklarla açıklanabilir. Yapılan diyet uygulamalarında katılımcının diyetle sıkı şekilde uyması gerekmekte ve diyetle uyum çalışmanın sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Katılımcıların genellikle çocuk yaş grubunda olması ve çalışma sürecine ebeveynlerin de dâhil

olması araştırmacının araştırmanın gidişatı üzerinde kontrolünü engelleyerek diyet uygulamalarında birtakım hatalara ve birbirinden farklı klinik sonuçlara sebep olmuş olabilir. Çalışmaların bir kısmında çalışmaya dahil edilen grupların yaş dağılımı ve altta yatan başka hastalıklar vb yönlerden eşit olmaması yine farklı sonuçlara neden olmuş olabilir. Bazı çalışmalarda sonuçları değerlendirmede ebeveyn ve öğretmen izleminden de yararlanılması beklentiler doğrultusunda oluşmuş çok da objektif olmayan pozitif sonuçlara neden olmuş olabilir. Gıda boyalarını içeren ve içermeyen farklı diyetlerin uygulandığı çalışmalarda, tüketilen gıdaların lezzet, koku, görünüm vs yönünden katılımcıların tercihini etkileyebilmesi, diyetle tüketilen miktarların bireyler arasında farklı olmasına ve böylece küçük de olsa doz farklılıklarına neden olmuş olabilir. Ayrıca araştırmalarda tüketilen gıda içeriklerine bağlı olarak renklendirici ve diğer katkı maddelerinin yanında vitamin ve mineral gibi başka besin maddeleri de ilave edilmiş veya çıkarılmış olmaktadır. alışmalar arasında farklı sonuçların bir sebebi de bu besin maddeleri olabilir. Yine farklı çalışmalarda farklı sürelerde uygulanan diyetler akut ve kronik olarak uygulanmalarına bağlı olarak farklı klinik sonuçlara neden olmuş olabilir. Bazı çalışmalarda katılımcının standart diyetine birtakım yükleme diyetler yapılmıştır. Katılımcının standart diyeti boya ve diğer katkı maddelerini zaten yüksek oranda içeriyor olabilir. Ayrıca farklı çalışmalarda uygulanan boya dozlarının birbirinden farklı olması da farklı sonuçların nedeni olabilir. Farklı klinik sonuçların ortaya çıkmasında bireysel duyarlılık ve bireysel yanıt farklılıklarının altta yatan neden olabileceğini de göz önünde bulundurmak gerekir.

Klinik çalışmalarda olduğu gibi deneysel çalışmalarda da çelişkili sonuçlar ortaya koyulmuştur. Sobotka ve ark. sentetik gıda boyası tartrazin farklı dozlarını gebelik ve laktasyon boyunca sıçanlara uygulamışlar ve gelişmekte olan sinir sistemine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (85).

Shaywitz ve ark. sentetik gıda boyası karışımını (brilliant blue, indigotin, fast green, eritrozin, tartrazin, sunset yellow ve orange B) yavru sıçanlara 5. günden başlayarak 1 ay boyunca her gün oral olarak uygulamışlardır. Bir gruba da ocuklarda DEHB'na benzer semptomlarla birlikte hiperaktiviteye ve öğrenme bozukluğuna neden olduğu bilinen pozitif plasebo 6-hidroksidopamin vermişlerdir.

Kontrol grubuna ise sadece su vermişlerdir. T labirentte aktivite ve bilişsel performansı 21 gün boyunca değerlendirilmişlerdir. Hayvanlar erişkin hale geldiğinde genel motor aktivite tüm gruplarda artmıştır. Pozitif plasebo verilen grup beklendiği gibi kontrol grubuna göre daha aktif bulunmuştur. Gıda boyası verilen grupta anlamlı olarak artmış motor aktivite gözlenmiş ancak anlamlı doz-yanıt etkisi tespit edilememiştir. En yüksek dozdaki gıda boyası karışımının ‘aktivite alışkanlığı’ını (activity habituation) anlamlı düzeyde azalttığını ve düşük doz boya karışımının ‘öğrenmeden kaçınma’ davranışını (avoidance learning) etkilediğini saptamışlardır. Gıda boyalarının hem aktiviteyi hem de kaçınma performansını (avoidance performance) anlamlı olarak etkilediği sonucuna varmışlardır (86). Bu çalışmada kronik olarak uygulanan boya karışımının bizim çalışmamızdaki boyalardan farklı 2 boya içermesi, bizim sonuçlarımızla uyumlu olmayan olumsuz sonuçlarının nedeni olabilir. Ayrıca boyaların yavrulara uygulanma döneminin ve süresinin farklı olması, değerlendirmede farklı bir düzenek kullanılması gibi nedenler bizim çalışmamızla bu çalışmanın sonuçlarını birebir karşılaştırmada güçlüklerle neden olmaktadır.

Goldenring ve ark. azo gıda boyalarının (allura red, tartrazin ve sunset yellow) ana metaboliti olan sülfanilik asitin (p-amino-benzoik asit) gelişmekte olan sıçanlar üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında sıçanları dört gruba ayırarak gruplara ip olarak sülfanilik asit, serum fizyolojik (SF), 6-hidroksidopamin ve plasebo (SF+askorbik asit) günlük enjekte edilmiştir. Sıçanlar 12 günlükten 26 günlük oluncaya kadarki dönemde aktivite, şoktan kaçış ve şoktan kaçınma kör olarak değerlendirilmiştir. 6-hidroksidopamin verilen grubun SF verilen gruba göre anlamlı olarak daha aktif olduğu bulunmuştur. Aktivite sülfanilik asit verilen grupta da anlamlı olarak artmıştır. Sıçanlar 21 günlük iken sülfanilik asit alanlar SF alanlara göre %227 kat daha fazla şoktan kaçış hareketi göstermiştir. Çocuklarda DEHB da beyin katekolamin konsantrasyonunda azalma olduğu düşünülmesine rağmen, bu çalışmada sülfanilik asit ya da gıda boyası uygulanan grupta beyin dopamin ve norepinefrin düzeyleri anlamlı olarak etkilenmemiş fakat 6-hidroksidopamin verilen grupta anlamlı olarak daha düşük düzeylerde bulunmuştur (87). Bizim çalışmamızın aksine bu çalışmada sıçanlarda aktivitenin artmış bulunması; boya karışımı yerine direkt olarak metabolitinin uygulanmış olması, boyanın uygulama döneminin ve

yolunun farklı olmasından (ip) dolayı boyaların metabolizmasındaki bazı reaksiyonların atlanması ya da farklı biyokimyasal reaksiyonların oluşmasından kaynaklanıyor olabilir.

Reisen ve ark.nın sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, 7 sentetik gıda boyası içeren karışımı (brilliant blue, indigo carmine, fast green, eritrozin, allura red, tartrazin, sunset yellow ve orange B) 0, 2, 5 mg/kg dozunda doğumdan sonra 2. günden itibaren başlayarak erişkin dönemde testler tamamlana kadar oral şekilde uygulamışlar, ardından fiziksel ve motor gelişimleri üzerinde yetersizliğe neden olmadığını tespit etmişlerdir. Gelişme dönemi ve erişkin dönemde yapmış oldukları öğrenme düzeneklerinde de gruplar arasında bir fark gözlemlenmemişlerdir. Zaman örnekli gözlem (Time-sampled observation) ve açık alan testlerini 5 ayrı dönemde uygulamışlar ve oral düşük doz sentetik gıda boyası verilmesinin davranışsal değişikliklere neden olmadığını göstermişlerdir (88). Bu çalışma bizim çalışmamızdan farklı ilave bir boya içermesi ve farklı düzeneklerin olduğu davranış testlerinin uygulanması gibi deney prosedüründe bazı farklılıklara rağmen elde edilen sonuçlar yönünden bizim çalışmamızla uyumludur.

Tanaka farelerde iki nesil üzerinde çeşitli çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalarda, 5 haftalık dişi farelere çeşitli gıda boyaları ve katkı maddelerini uygulamıştır. Fareler 9 haftalık olduklarında gebe kalmaları sağlanmış, gebelik boyunca da uygulamaya devam edilmiştir. Doğan yavrulara da 9 haftalık oluncaya kadar gıda boyaları ve diğer katkı maddeleri verilmeye devam edilmiştir. Tanaka yaptığı bu çalışmalarında seçilmiş üremeye yönelik ve nörodavranışsal parametreleri değerlendirmiştir. Diyetle eritrozin, sunset yellow FCF, ponso 4R, amarant, allura red AC ve lac boya farklı dozlarda uygulanmıştır. Eritrozin ile olan çalışmada dişi sıçanlarda, duygusal ve hareket aktiviteleri doz ilişkili biçimde anlamlı olarak artmıştır. Bunun yanında T-maze'de hareket süresi ve ortalama hız yüksek doz grubunda anlamlı olarak artmıştır (19). Sunset yellow FCF için, farklı nörodavranışsal parametrelerin bir kısmı dişi ve erkek yavrularda erken laktasyon dönemi boyunca doza bağımlı bir biçimde etkilenmiştir. Orta ve yüksek doz grubunda üreyle ilgili (ortalama vücut ağırlığı) ve nörodavranışsal parametreler (yüzme yönelimleri (swimming direction), surface righting, negative geotaxis) doz

ilişkili olarak etkilenmiştir (17). Ponso 4R için birinci kuşak erkeklerde orta ve yüksek doz grubunda çoklu T su labirentinde süre, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha uzun bulunmuş ve bu etkilerin belirgin olarak doz ilişkili olduğu saptanmıştır (20). Tartrazin ile yapılan bir çalışmada, birinci kuşak erkek farelerde orta doz grubunda keşifçi davranışın göstergelerinden ‘dikey hareket aktivitesi’nde (vertical activity) anlamlı artış, erkek yavrularda yüksek doz grubunda davranışsal gelişim parametrelerinde postnatal 4. günde ‘surface righting’de doz ilişkili anlamlı artış ve orta doz grubunda postnatal 7. günde ‘uçurumdan kaçınma’ (cliff avoidance) davranışında da anlamlı artış, dişi yavrularda yüksek doz grubunda 4. günde ‘negatif geotaksi’ davranışında (negative geotaxis) anlamlı geçikme tespit edilmiştir. İkinci kuşak erkek yavrularda ‘keşifçi davranış’ın anlamlı düzeyde etkilendiği görülmüştür. Laktasyon döneminde doz ilişkili olarak nörodavranışsal parametreler olumsuz etkilenmiştir (21). Amaran, nörodavranışsal parametrelerden postnatal 4. günde surface righting dişi yavrularda ve her iki cinste koku oryantasyonunu anlamlı olarak etkilemiştir. Orta doz grubunda 3 haftalık erkek yavruların hareket aktivitelerini etkilemiş fakat dişilerde tüm gruplarda etkilememiştir. Amaran farelerde davranışsal gelişimi biraz olumsuz etkilemiştir (15). Allura red AC’nin laktasyon dönemi boyunca davranışsal gelişime herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir. Allura red AC’nin birinci kuşak farelerde her iki cinsiyette hem hareket aktivitesi hem de labirent öğrenmelerine olumsuz etkileri olmuştur (16). Bir doğal renklendirici olan lac boyası da farelerde nörodavranışsal ve üremeyle ilgili parametreleri etkilemiştir. Erkek yavrularda erken laktasyon döneminde yüzme esnasında su ile oluşan baş üçgeni (swimming head angle) doz ilişkili bir biçimde anlamlı olarak etkilenmiş ve dişi yavrularda koku oryantasyonu doz ilişkili bir biçimde anlamlı artmıştır (18).

Tartrazinin farklı dozlarının üç nesil boyunca verilerek keşifçi davranış üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarında, birinci kuşakta 5. haftadan itibaren gıda boyası verilmeye başlanmış ve üçüncü kuşakta 9 haftalık oluncaya kadar devam edilmiştir. Tartrazin farelerde kuşaklar boyunca nörodavranışsal parametrelerde birkaç olumsuz etki oluşturmuştur. İkinci kuşakta postnatal 7. günde erkek yavrularda ‘yüzme yönelimleri’ (swimming directions) doz ilişkili olarak anlamlı düzeyde etkilenmiş, dişi yavrularda ‘surface righting’ doz ilişkili olarak anlamlı

etkilenmiştir. Tartrazin uygulanan üç haftalık erkek yavrularda keşifçi davranışta anlamlı etkilenme gözlenmiştir. Üçüncü kuşakta ‘yüzme yönelimleri’ (swimming directions), ‘koku oryantasyonu’ ve ‘surface righting’ gibi davranışsal gelişim parametrelerinde erkek yavrularda doz ilişkili olarak artış gözlenmiştir. Üçüncü kuşakta 3 haftalık erkek yavrularda keşifçi davranışın hareket aktivitelerinde (katettikleri tüm yol, ortalama katettikleri yol ve ortalama hız) anlamlı azalış tespit etmiştir. Yan etkilerin doz ilişkili olduğunu ve dişi yavrularda daha az yan etki olduğunu tespit etmiştir (22).

Tanaka'nın çalışmalarında, gıda boyaları ve katkı maddelerinin doz ilişkili olarak nörodavranışsal parametreleri olumsuz etkilediği görülmüştür. Olumsuz etkiler, seçilmiş parametrelerde insan ADI değerinden daha yüksek olan orta ve yüksek dozlarda görülmüştür. Ayrıca farklı dozlar dişi ve erkek farelerde farklı etkilere neden olarak cinsiyetin nörodavranışsal parametreler üzerinde etkisi olduğunu düşündürmüştür. Tanakanın sonuçları gıda boyalarının nörodavranışsal parametreleri olumsuz etkilemesi yönüyle bizim sonuçlarımızla uyumsuz olsa da cinsiyetin nörodavranışsal parametrelerde farklı etkilere neden olması yönünden kısmen bizim sonuçlarımızla benzerdir. Tanakanın boyaları genelde tek tek uygulaması ancak bizim çalışmamızda bir karışım olarak verilmeleri boyaların etkileşime girerek ortaya çıkabilecek yan etkilerini bir şekilde engelleyebilmelerinden kaynaklanmış olabilir. Tanaka'nın çalışmalarının birkaç nesil üzerinde devam etmesi de boyalara maruziyet süresinin bizim çalışmamıza göre daha uzun olmasını ve birtakım ilave yan etkilerin oluşmasını sağlamış olabilir. Tanaka'nın bazı çalışmalarını fareler üzerinde gerçekleştirmiş olması türler arası genetik farklılığa bağlı boyalara farklı yanıtlar oluşmasına neden olmuş olabilir.

Laboratuvarımızda Doğuç ve ark. yaptıkları çalışmada, sentetik gıda boyalarını ADI düzeylerinde bir karışım halinde (eritroz, ponso 4R, allura red AC, sunset yellow FCF, tartrazin, amarant, brilliant blue, azorubin ve indigotin) dişi sıçanlara gebe kalmalarından 1 hafta öncesinden başlayarak gebelik boyunca uygulamışlar ardından bu sıçanların yavrularında davranış ve mekansal çalışan hafızaya etkilerini incelemişlerdir. Mekansal hafıza ve öğrenme üzerine etkilerini Morris su labirenti, davranışsal etkilerini ‘açık alan testi’ ve ‘zorlanmış yüzme testi’ ile

değerlendirmişlerdir. Bizim çalışmamızın ön basamağı niteliğindeki bu araştırmada bizim çalışmamızda kullanılan sentetik gıda boyalarına ADI düzeylerinde maruziyet sağlanmıştır. Bu maruziyetin hipokampusu bağımlı mekânsal öğrenme ve hafızayı olumsuz yönde etkilemediğini ve depresif davranışa neden olmadığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak lokomotor aktivite, eksplorasyon ve anksiyetenin değerlendirilmesinde daha farklı parametrelerde anlamlı artışlar saptamışlardır. Cinsiyet faktörü göz önünde bulundurularak yapılan karşılaştırma cinsiyetin anlamlılığa önemli bir katkısının olduğunu düşündürmüştür. Dişilerin belirgin olarak daha iyi keşifçi davranış ve lokomotor aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Fakat cinsiyet faktörü göz ardı edilerek yapılan karşılaştırmalarda, deney grubunda lokomotor aktivite ve eksplorasyon davranışın daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu yüzden cinsiyetin tek başına değil, sentetik gıda boyası karışımı ile birlikte lokomotor aktivite ve eksplorasyon davranışını sinerjistik olarak etkilemiş olabileceğini ifade etmişlerdir (23). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak bu çalışmada da cinsiyet öğrenme üzerinde etkili bulunmuştur ancak bizim çalışmamızda erkek cinsiyet olumsuz etkilenmiş olmasına rağmen bu çalışmada dişilerin lehine bir durum vardır.

Sentetik gıda boyalarının öğrenme üzerine etkilerinin hangi mekanizma ile gerçekleştiğini anlamaya yönelik laboratuvarımızda bir önceki çalışmanın devamı olarak yapılan başka bir çalışmada, doğum öncesi ADI düzeylerinde maruz kalınan sentetik gıda renklendiricilerinin öğrenmede rol alan reseptörler üzerine etkisi araştırılmıştır. Öğrenme ve davranışsal testlerin ardından Doğuç ve ark.nın çalışmalarındaki sıçanların hipokampuslarında öğrenmede rol alan reseptör düzeyleri incelenmiştir. Anne karnında ADI düzeyinde gıda boyalarına maruziyetin erişkin dönemde öğrenmede rol alan reseptörlerin bazılarının düzeylerini etkilediğini ortaya koymuşlardır. N-metil-D-aspartat reseptörlerinden (NMDAR) NR2B subtipi, Nikotinik Asetilkolin reseptörlerinden (nAChR) $\beta 2$ ve $\alpha 4$ izoformlarının etkilendiğini ve bu etkinin de cinsiyete göre farklılık gösterdiğini bulmuşlardır (89). Bizim çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da cinsiyet etkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda reseptör düzeyleri henüz çalışılmadığı için sonuçların bu açıdan karşılaştırılması mümkün olamamıştır.

Gao ve ark. sıçan ve farelere tartrazinin farklı dozlarını 30 gün boyunca uygulanmışlar, sırasıyla ‘açık alan testi’, ‘step-through test’ ve ‘Morris su labirenti testi’ ile öğrenme ve hafıza üzerine toksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Altta yatan muhtemel mekanizmaları açıklamak için de oksidatif stres biyobelirteçlerini ve histopatolojik değerlendirmeyi kullanmışlardır. Tartrazinin açık alan testinde artmış aktif davranışsal yanıt, Morris su labirentinde platform bulma sürelerinde artışa ve ‘step-through test’te gecikme süresinde anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Tartrazin verilen sıçanların beyin dokusunda katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde azalma, malondialdehit düzeylerinde artma tespit etmişler ve bu değişikliklerin beyin oksidatif hasarıyla ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Tartrazinin öğrenme ve hafıza üzerinde olumsuz etkisi olduğunu bulmuşlardır. Bu durumun, artan lipid peroksidasyon ürünleri ve reaktif oksijen türlerinin endojen antioksidan savunma sistemini inhibe ederek beyin dokusunda hasara yol açmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (90). Bizim çalışmamızla uyumsuz olarak bu çalışmada gıda boyasına maruz kalanlarda öğrenme ve hafıza olumsuz etkilenmiş, hiperaktivite ve keşifçi davranışta artış gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada da boyaya maruziyet korku ve anksiyetede artışa neden olmuştur.

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışma sonuçlarını tam olarak örtüştürmek mümkün değildir. Deneysel çalışmalarda nörodavranışsal etkileri değerlendirmek için kullanılan düzenekler direkt olarak DEHB ile ilişkili değildir, yapılan testler artmış lokomotor aktivite, depresyona eğilim, anksiyete ve mekansal öğrenme güçlüğü’nün belirlenmesine yardımcı olur. Gebelik boyunca NOAEL düzeylerinde tüketilen sentetik gıda boyaları yavrularda erişkin dönemde anksiyete ve depresyona eğilimde ve motivasyon üzerine bazı anlamlı olumsuz etkilere neden olmasına rağmen lokomotor aktivite, keşifçi davranış ve mekansal çalışan hafıza üzerine herhangi bir yan etki oluşturmamıştır. Erkeklerin sistemi daha hızlı öğrenmesi öğrenmede erkek cinsiyetin lehine bir durum olsa da, anksiyete ve depresyona eğilim erkeklerde daha fazla bulunmuştur. Bir etkenin erkek ve dişiler üzerinde farklı etkiler gösterebilmesi birçok nedenden kaynaklanabileceğinden bu durum direkt gıda boylarıyla ilişkilendirilemeyebilir. Sadece birkaç anksiyete ve

depresyona eğilim parametresi ve motivasyon üzerindeki değişikliğe bakarak kesin klinik sonuçlar çıkarmak doğru bir yaklaşım olmayabilir.

Bugüne kadar yapılmış olan deneysel ve klinik çalışmalar çeşitli katkı maddelerinin nöropsikiyatrik ve nörotoksik etkilerini ortaya koymaya çalışmıştır. Ancak bu etkilerin SSS’de hangi mekanizmalar ile ortaya çıkabileceğini açıklayacak deneysel çalışma çok az sayıdadır. Bizim çalışmamızda öğrenme ve davranışsal testlerin yardımıyla gıda boyalarına maruziyetin fonksiyonel etkileri değerlendirilmiş ve fonksiyonel anlamda belirgin bir olumsuz etki gözlenmemiştir. SSS’nin öğrenme ile ilgili bölümlerinde nöron hasarı olup olmadığının nöron sayımı ve histopatolojik incelemelerle değerlendirilmeli, öğrenmede rol alan reseptör düzeylerinin ve genetik faktörlerin incelendiği moleküler düzeyde yapılacak kapsamlı deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda, yaygın olarak karşılaşılabilecek sentetik gıda boyalarının deney hayvanları için güvenli kabul edilen NOAEL değerleri bir karışım olarak uygulanmıştır. Günümüzde katkı maddelerini içeren fazla miktarda hazır gıda tüketilmektedir. Bu yüzden bizim uyguladığımız gıda boyalarının haricindeki diğer katkı maddelerinin oluşturabileceği ilave ve artmış yan etkileri göz ardı edemeyiz. Netice itibariyle, sentetik gıda boyaları ve katkı maddelerini içeren hazır gıda maddelerinin daha az tüketimi güvenilir bir yaklaşım olabilir.

ÖZET

Doğum Öncesi NOAEL (No Observed Advers Effect Level-Gözlenebilir Yan Etki Oluşturmayan Düzey) Düzeyinde Sentetik Gıda Boyalarına Maruziyetin Erişkin Dönemde Öğrenmeye Etkileri

Günümüzde sentetik gıda boyalarının ve katkı maddelerinin tüketimi oldukça yaygındır. Yapılan araştırmalarda sentetik gıda boyalarına ve katkı maddelerine maruziyetin çocuklarda davranışı, gelişimi ve öğrenmeyi olumsuz etkilediği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada, anne karnında sentetik gıda boyalarına maruziyetin erişkin dönemde davranış ve hafıza üzerine etkilerini araştırdık.

Bu çalışmada kontrol grubu (n=15) ve gıda boyası grubu (n=15) olmak üzere 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Gıda boyası grubuna NOAEL düzeylerinde dokuz sentetik gıda boyası (eritrozin, ponso 4R, allura red AC, sunset yellow FCF, tartrazin, amarant, brilliant blue, azorubin, indigotin) karışım olarak, kontrol grubuna ise aynı miktarda içme suyu gebe kalmalarından bir hafta önce başlanarak doğuma kadar her gün oral gavajla verildi. Doğan yavrular erişkin hale geldiğinde gıda boyalarının mekansal öğrenme ve hafıza üzerine etkileri Morris su labirentiyle, davranışsal etkileri açık alan testi ve zorlanmış yüzme testiyle değerlendirildi. Hedef platform bulma süreleri açısından tüm grupların ayrıca kontrol ve deney grubunun grup içi değerlendirilmesinde, 2. günden itibaren anlamlı azalış ($p < 0,01$); gruplararası değerlendirmede ise 1. günde deney erkek grubunda kontrol dişi ve deney dişi gruplarına göre ve 2. günde kontrol erkek grubunda kontrol dişi grubuna göre anlamlı azalış ($p < 0,05$) gözlemlendi. Ortalama hız açısından tüm gruplar karşılaştırıldığında deney dişi grubunda kontrol dişi grubuna göre, kontrol ve deney grubu olarak karşılaştırıldığında da deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalış gözlemlendi ($p < 0,05$). Dışkılama sayısında gıda boyasına maruz kalanlarda ve erkek cinsiyette anlamlı olarak artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Hareketli oldukları süre açısından deney erkek grubunun kontrol dişi grubuna göre anlamlı düşük, hareketsiz oldukları süre açısından ise anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Yaygın olarak kullanılan sentetik gıda boyalarına NOAEL düzeyinde anne karnında maruziyet, erişkin dönemde hipokampusu bağımlı mekansal öğrenme ve hafızayı etkilememekte ancak motivasyon, anksiyete ve depresyon testlerinde bazı olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Bu etki cinsiyete göre farklılık göstermektedir.

Anahtar sözcük: Sentetik gıda boyaları, mekansal öğrenme, Morris su labirenti, açık alan testi, zorlanmış yüzme testi

SUMMARY

Effects of Artificial Food Colourings, Exposed During Prenatal Term Via Mothers Diet with The Dose of NOAEL, On Learning and Memory

Artificial food colourings and additives are among the most used items in today's daily life. Established findings achieved from some research studies suggest that exposure to artificial food colourings and additives can affect some processes such as behaviour, learning and development in children. In this study, we aimed to investigate the effect of exposure to artificial food colourings during intrauterine period on behaviour and memory in adult period.

A total of 30 Wistar albino female rats were included in this study. Animals were equally separated into two groups as follows: Controls (n = 15) and food colouring given group (n = 15). Treatment group was given a mixture of nine artificial food colourings (erythrosine, ponceau 4R, allura red AC, sunset yellow FCF, tartrazine, amaranth, brilliant blue, azorubine and indigotin) at NOAEL dose level and control group was administered only tap water in daily basis via oral gavage way beginning one week prior to pregnancy till delivery. When the offsprings have become adults, the possible effect of artificial food colourings on learning and memory functions was assessed by using Morris water maze and the behavioral outcomes were evaluated by performing open field and forced swimming tests. In-group comparison of daily performances of all groups and also experiment and control groups, there was a significant decrease for the data of latency to escape to the hidden platform beginning from day-2 ($p < 0.01$). Whereas in between-group comparison, there was a statistically prominent decrement in experiment male group compared to those of control and experiment female groups in day 1 and in male controls compared to those of female controls in day 2 for the data of latency to escape to the hidden platform ($p < 0,05$). There was also a significant decrease in mean speed values in experiment female group than female controls when all groups were compared within and in experiment group than the controls when experiment and control groups were compared ($p < 0,05$). There was a significant increase in defecation number in group exposed to food colourings and in male gender ($p < 0,05$). Male study group has had a significantly lower mobility time than the female controls, whereas they had a prominently higher immobility time ($p < 0,05$).

As a result, we have concluded that intrauterine exposure to widely used artificial food colourings at NOAEL dose level does not necessarily affect to the hippocampus-dependent spatial learning and memory, however it can lead to some negative outcomes in motivation, anxiety and depression tests and this effect may differ according to gender.

Keywords: Artificial food colourings, spatial learning, Morris water maze, open field test, forced swimming test.

KAYNAKLAR

1. Kanarek RB. Artificial food dyes and attention deficit hiperactivity disorder. *Nutrition Reviews* 2011; 69(7):385-391.
2. Yılmaz Ö, Türkteş İ. Besin katkı madde reaksiyonları. *T Klin Allerji-Astım* 2003; 5:91-95.
3. Mantovani A, Maranghi F, Purificato I, Macrì A. Assessment of feed additives and contaminants: an essential component of food safety. *Ann Ist Super Sanita* 2006; 42(4):427-432.
4. Wüthrich B. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy* 1993; 71:379-384.
5. Koçyiğit Ö. Yavru Erkek Sıçanlarda Vitamin E Uygulamasının Öğrenme Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Erciyes üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
6. Stevens LJ, Kuczek T, Burgess JR, Hurt E, Arnold LE. Dietary sensitivities and ADHD symptoms: Thirty-five years of research. *Clinical Pediatrics* 2011; 50(4):279-293.
7. Feingold BF: Hyperkinesis and learning disabilities linked to the ingestion of artificial food colors and flavors. *J Learn Disabilities* 1976; 9:19-27.
8. Feingold BF: Food additives and hyperkinesis: letter to the editor. *J Learn Disabilities* 1977; 10:64-66.
9. Eigenmann PA, Haenggeli CA. Food colourings and preservatives allergy and hyperactivity. *Lancet* 2004; 364:823-824.
10. Connors CK, Goyette CH, Southwick DA, Lees JM, Andrulonis PA. Food additives and hyperkinesis: a controlled double-blind experiment. *Pediatrics* 1976; 58(2):154-166.
11. Connors CK. *Food Additives and Hyperactive Children*. New York: Plenum Press, 1980:45-54.
12. Harley JP, Matthews CG, Eichman P. Synthetic food colors and hyperactivity in children: a double-blind challenge experiment. *Pediatrics* 1978a; 62(6):975-983.
13. Harley JP, Matthews CG. The hyperactive child and the Feingold controversy. *Am Pharm* 1978b; 18(6):44-46.
14. Spring C, Vermeersch J, Blunden D, Sterling H. Case studies of effects of artificial food colors on hyperactivity. *J Special Education* 1981; 15:361-372.
15. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of amaranth administered to mice in drinking water. *Toxicol Ind Health* 1993; 9(6):1027-1035.
16. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of Allura Red AC administered to mice in the diet. *Toxicology* 1994; 92(1-3):169-177.
17. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of Sunset yellow FCF administered to mice in the diet. *Toxicol Ind Health* 1996; 12(1):69-79.
18. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural effects of lac dye administered in the diet to mice. *Food Additives & Contaminants* 1997; 14(4):373-380.
19. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of erythrosine administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(5):447-454.

20. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol* 2006a; 44(10):1651-1658.
21. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 2006b; 44:179-187.
22. Tanaka T, Takahashi O, Oishi S, Ogata A. Effects of tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. *Reproductive Toxicology* 2008; 26:156-163.
23. Doguc DK, Ceyhan BM, Ozturk M, Gultekin F. Effects of maternally exposed colouring food additives on cognitive performance in rats. *Toxicol Ind Health* 2012.
24. Saldamlı İ, Uygun Ü. Gıda Katkı Maddeleri. In (içinde): Saldamlı İ, Ankara: 2007:533-577.
25. http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/kodeks_yonetmelik/gida_katki_maddeleri_yonetmelik.html (Erişim tarihi 14.08.2021)
26. Altuğ T. Gıda Katkı Maddeleri. In (içinde): Altuğ T. Üçüncü Baskı, İzmir: Sidas Medya Ltd Şti, 2009:1-16.
27. Saldamlı İ. Gıda Kimyası. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1998:489-495.
28. <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF679A66406202CCB03FBDDAD0B640C6A&Vurgulanacak=g%C4%B1da%20katk%C4%B1> (Erişim tarihi 14.08.2021)
29. Griffiths JC. Coloring foods and beverages. *Food Technology* 2005; 59:38-44.
30. Erdoğan Y. Çeşitli Gıda Katkı Maddelerinden Allium Cepa L.'de Mitöz Bölünme, Kromozomlar ve DNA Miktarı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
31. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/1c542dfe6e4fc3d_ek.pdf?tipi=14&sube (Erişim tarihi 14.08.2012)
32. Yılmaz S. Gıda Katkı Maddeleri ve Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
33. Çalışır ZE, Çalışkan D. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Ecz Fak Derg* 2003; 32(3):207-206.
34. <http://www.turktox.org.tr/Gida/index.php?p=kuruluslar> (Erişim tarihi 13.08.2012)
35. <http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kanun/639.html> (Erişim tarihi 14.08.2012)
36. <http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2002-55.html> (Erişim tarihi 17.09.2012)
37. Atman CÜ. Gıda katkı maddeleri ve gıda kontrolü. *STED* 2004;13(3):86-88.
38. Dinç M. Gıdalara Katılan Bazı Suda Çözünen Sentetik Boyaların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
39. Demirdağ K, Uysal V. Renklendiriciler. In (içinde): Altuğ T. Üçüncü Baskı, İzmir: Sidas Medya Ltd Şti, 2009:169-191.
40. Erdoğan Ş. Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
41. <http://www.food-info.net/tr/e/e100-200.htm> (Erişim tarihi 14.08.2012)
42. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1854.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).

43. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1328.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
44. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1327.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
45. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph5/additive-450-m5.pdf> (Erişim tarihi: 07.08.2012)
46. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1335.pdf> (Erişim tarihi: 07.08.2012)
47. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1649.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
48. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1853.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
49. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1332.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
50. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph10/additive-234-m10.pdf> (Erişim tarihi 07.08.2012).
51. Doğruyol H. Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları; Çocukluk Hiperaktivitesi. Güncel Pediatri 2006; 2:42-48.
52. Wilson BG, Bahna SL. Adverse reactions to food additives. Ann Allergy Asthma Immunol 2005; 95(6):499-507.
53. Gultekin F, Doguc DK. Allergic and immunologic reactions to food additives. Clinic Rev Allergy Immunol 2012.
54. Peker ÖG. Beyin Korteksi, Beynin Zihinsel İşlevleri, Öğrenme ve Bellek (Çeviri: Hayrünnisa Çavuşoğlu, Berrak Çağlayan Yeğen). Tıbbi Fizyoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:714-727.
55. Arıcanlı N. Selektif REM Deprivasyonunun Bellek Fonksiyonları Üzerine Etkisinde Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörü Sitalopramın Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
56. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. 4th ed, New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000.
57. Keleş E, Çepni S. Beyin ve Öğrenme. Türk Fen Eğitimi Dergisi 2006; 3(2):66-82.
58. Purves D. Chapter 30: Memory. In: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (Eds). Neuroscience 3rd Ed. Sinauer Associates Inc 2004:733-753.
59. Öncel GB. Deneysel Beyin İskemi Reperfüzyon Modelinde Öğrenme ve Hafıza Değişikliklerine Ghrelinin Etkisi ve Mekanizmaları. Yüksek Lisans Tezi, Antalya, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
60. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 2004; 82:171-177.
61. Ellis KA, Nathan PJ. The pharmacology of human working memory. Int J Neuropsychopharmacol 2001; 4(3):299- 313.
62. <http://egitimbilimleri.net/ogrenme-psikolojisi/bilissel-ogrenme-yaklasimi-bilgiyi-isleme-kurami/293-egitimbilimleri.html> (Erişim tarihi 23.08.2012)
63. Ganong WF. Review of Medical Physiology. 13th Ed, Norwalk, Conn.: Appleton & Lange, 1987.
64. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomi. 4. Baskı (çeviri), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.

65. Dere F. *Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji*. Birinci baskı, Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, 1990.
66. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11: 47–60.
67. Brotto LA, Alasdair MB, Boris BG. Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. *European Journal of Pharmacology* 2000; 402:87–93.
68. Ekong MB, Mesembe OE, Bisong SA, Ekeoma AO. Neurobehavioural activity in albino Wistar rats in the open field maze following long term tobacco diet ingestion. *The Internet Journal of Neurology* 2009; 10(2).
69. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1977; 229:327–336.
70. Porsolt RD, Anton G, Blaret N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978; 47:379–391.
71. Karolewicz B, Paul IA. Short communication; group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. *European Journal of Pharmacology* 2001; 415:197–201.
72. Boris M, Mandel FS. Foods and additives are common causes of the attention deficit hyperactive disorder in children. *Ann Allergy* 1994; 72(5):462-468.
73. Feingold BF. Hyperkinesis and learning disabilities linked to artificial food flavors and colors. *Am J Nurs* 1975; 75:797-803.
74. Weiss B, Williams JH, Margen S, Abrams B, Caan B, Citron LC, et al. Behavioral responses to artificial food colors. *Science* 1980; 207(4438):1487-9.
75. Mattes JA, Gittelman R. Effects of artificial food colorings in children with hyperactive symptoms. A critical review and results of a controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38(6):714-8.
76. Mattes JA. The Feingold diet: a current reappraisal. *J Learn Disabil* 1983; 16(6):319-23.
77. Silver LB. The ‘magic cure’: a review of the current controversial approaches for threatening learning disabilities. *American Journal of Diseases* 1986; 140:1045–1052.
78. Ward NI. Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. *J Nutrition Environ Med* 1997; 7:333-342.
79. Bateman B, Warner JO, Hutchinson E, Dean T, Rowlandson P, Gant C, et al. The effects of double blind, placebo controlled, artificial food colorings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Arch Dis Child* 2004; 89:506-11.
80. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* 2007; 370(9598):1560–1567.
81. EFSA Panel. Assessment of the results of the study by McCann et al. (2007) on the effect of some colours and sodium benzoate on children’s behaviour. *The EFSA Journal* 2008; 660:1–54.

82. Pelsser LM, Frankena K, Toorman J, Savelkoul HF, Pereira RR, Buitelaar JK. A randomised controlled trial into the effects of food on ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2009; 18(1):6112-719.
83. Kaplan BJ, McNicol J, Conte RA and Moghadam HK. Dietary replacement in preschool-aged hyperactive boys. *Pediatrics* 1989; 83:7-17.
84. Williams JI, Cram DM, Tausig FT and Webster E. Relative effects of drugs and diet on hyperactive behaviours: an experimental study. *Pediatrics* 1978; 61:811-817.
85. Sobotka TJ, Brodie RE, Spaid SL. Tartrazine and the developing nervous system of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1977; 2(5):1211-1220.
86. Shaywitz BA, Goldenring JR, Wool RS. Effects of chronic administration of food colorings on activity levels and cognitive performance in developing rat pups treated with 6-hydroxydopamine. *Neurobehav Toxicol* 1979; 1:41-47.
87. Goldenring JR, Batter DK, Shaywitz BA. Sulfanilic acid: behavioral change related to azo food dyes in developing rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1982; 4:43-49.
88. Reisen CA, Rothblat LA. Effect of certified artificial food coloring on learning and activity level in rats. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 1986; 8:317-320.
89. Ceyhan BM. Doğum Öncesi Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boylarının Öğrenmede Rol Alan Reseptörler Üzerine Etkisinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya anabilim Dalı, 2010.
90. Gao Y, Li C, Shen J, Yin H, An X, Jin H. Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved.