

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KULUÇKA BAŞLANGICINDA YUMURTAYA VERİLEN
SUNSET YELLOW FCF'NİN (E110), TAVUKLARDA DALAĞIN
EMBRİYONİK GELİŞİMİ İLE PERİFER KAN T VE B-
LENFOSİT ORANLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Selime Özge ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK**

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KULUÇKA BAŞLANGICINDA YUMURTAYA VERİLEN
SUNSET YELLOW FCF'NİN (E110), TAVUKLARDA DALAĞIN
EMBRİYONİK GELİŞİMİ İLE PERİFER KAN T VE B-
LENFOSİT ORANLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Selime Özge ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK**

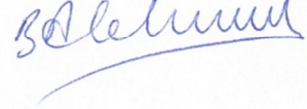
Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202020 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Selime Özge ÇELİK tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji Ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Belma ALABAY
Ankara Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. İlhami ÇELİK
Selçuk Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Yasemin ÖZNURLU
Selçuk Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

İnsanoğlu, tarihöncesi çağlardan beri, aralarında gıda maddeleri de olmak üzere gündelik hayatında kullandığı malzemeleri boyamaktadır. İlk gıda boyası kayıtları, hemen hemen aynı dönemden, M.Ö. 1500 yılından başlamak üzere Çin, Hindistan ve Mısır'dan kalmadır. O zamandan beri gıda boylarıyla gıdaların renklendirilmesi ilgi çekmiştir. Gıda maddelerinin seçimi ve tüketilebilir olduğunun tespitinde rengin önemli ve güçlü bir etkisi vardır. Renkler gıda maddelerini daha lezzetli gösterir. Gıdaların renklendirilmesinde on dokuzuncu yüzyılın ortalarına kadar doğal gıda boya maddeleri kullanılmaktaydı. Bunların çoğunluğu doğal kaynaklardan elde edilmekte ve başlıca kaynaklar da sebze ve hayvanlardan elde edilen ekstraktlardı. Fakat bunların yüksek fiyatlı olmaları, temindeki zorluklarla renklendiricilerin modern batılı ülkelerin gıda teknolojilerinde uydurulmasındaki zorluklara bağlı olarak sentetik yani yapay gıda boylarına doğru bir kayma olmuştur. Ticari gıda boylarının hemen hemen tamamı sentetik maddelerdir.

Günümüzde dünya genelinde gıda boylarının kullanımının kontrolü, Kodeks Komitesi'nin uluslararası araştırma ve tavsiyeleri esas alınarak belirlenen Ortalama kabul edilebilir Günlük Alım (ADI) dozu esas alınarak yapılmaktadır. Bununla birlikte, farklı ülkelerin kendi kanun ve yönetmeliklerine göre yapılan sıkı kontrollere rağmen, farklı gıda endüstrisi üreticileri, çekiciliği artırmak için ADI'yi dikkate almadan gıda boylarını belirlenen miktarlardan fazla kullanabilmektedir. Sentetik gıda boyları özellikle gıdaların rengine aldanan çocuklar tarafından çok fazla tüketildiklerinden, bu grupta bazı toksikolojik problemlere yol açabilmektedir.

Sentetik gıda boyları en tehlikeli gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir. Sentetik gıda boylarının son yıllarda dikkati çeken en önemli muhtemel tehlikelerinden biri, bu maddelerle dikkat yetmezliği hiperaktivite bozukluğu (ADHD) arasında bağıntı kurulmasıdır. Sentetik gıda renklendiricileriyle; özellikle çocuklarda davranış bozuklukları, alerjik reaksiyonlar ve diğer yan etkiler arasında da bağıntı kurulmuştur. Sunset Yellow FCF (E110), dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan bir gıda boyasıdır. Sunset Yellow FCF (E110) bir azo boyası olduğundan, salisilatlara duyarlı bireylerde duyarlılık reaksiyonları gelişebilmektedir. Ek olarak, bu boya bir histamin serbestleştiricisidir ve astım

semptomlarını güçlendirebilmekte, benzoatlarla birlikte alındığında çocuklarda hiperaktiviteyi tetikleyebilmektedir.

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında, dömlü tavuk yumurtasına hava kamarası yoluyla verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embiyosunda dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, kuluçka başlangıcında kuluçkalık yumurtaların hava kamarasına enjekte edilen farklı dozlardaki Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embriyolarında perifer kan lenfositlerinin enzimatik aktiviteleriyle dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir.

Bu çalışmayla Sunset Yellow FCF'nin (E110),perifer immün sistem organlarının en büyüğü ve en önemlisi olan dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin morfolojik bulgularının ortaya konması ve konu üzerinde daha sonra yapılacak olan çalışmalara hem yöntem ve hem de bulgu açısından temel veri sağlanması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyesi ve Danışmanım Prof. Dr. İlhami Çelik'e, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine; bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen aileme ve projeyi maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Sunset Yellow FCF (E110).....	2
1.1.1. Sunset Yellow FCF'nin (E110) Metabolizması ve Kısa Dönem Maruziyet Çalışmaları.....	3
1.1.2. Uzun Dönem Maruziyet Çalışmaları	6
1.1.3. İnsanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar	8
1.2. Dalak.....	9
1.2.1. Dalağın Embriyonik Dönemdeki Gelişimi.....	9
1.3. Alfa-Naftil Asetat Esteraz Enzimi.....	11
1.4. Asit Fosfataz Enzimi	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Yumurta Materyali.....	14
2.1.2. Sunset Yellow FCF (E110).....	14
2.2. Metot.....	14
2.2.1. Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Hazırlanması.....	14
2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Yumurtalara Verilmesi	15
2.2.3. Doku Örneklerinin Alınması	15
2.2.4. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Demonstrasyonu	17
2.2.5. Asit Fosfataz (ACPaz) Demonstrasyonu.....	17
2.2.6. Pappenheim'in Panoptik Boyasıyla Kesitlerin ve Kan Frotilerinin Boyanması...18	
2.2.7. İstatistikî Analizler.....	18
3. BULGULAR	19
3.1. Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular.....	19
3.2. Perifer Kan Bulguları.....	20
3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında Dalağın Embriyonik Gelişimi	28
3.3.1. Kuluçkanın OnbirinciGünü	28
3.3.2. Kuluçkanın Onbeşinci Günü	30
3.3.3. Kuluçkanın Onsekizinci Günü.....	32

3.3.4. KuluçkanınYirmibirinci Günü.....	34
4. TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
6. KAYNAKLAR	48
7. EK.....	54
Ek A: Etik Kurul Kararı.....	54
8. ÖZGEÇMİŞ	55



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.....	15
Çizelge 3.1. Kontrol ve deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları (%).....	20
Çizelge 3.3. Kontrol ve deney gruplarının, kuluçkanın 18.günündeki perifer kan lökosit oranlarıyla ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları (%).....	27
Çizelge 3.4. Kontrol ve deney gruplarının, kuluçkanın 21.günündeki perifer kan lökosit oranlarıyla ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları (%).....	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sunset Yellow FCF (E110)'un molekül yapısı.....	2
Şekil 3.1. 1.000 ng Sunset Yellow FCF (E110) verilen gruptan (D3 grubu) Schistosoma reflexuslu bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki makroskopik görünümü.	19
Şekil 3.2. Kuluçkanın 11. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, bir adet lenfosit morfolojisine sahip hücre (ok) dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.	21
Şekil 3.3.Kuluçkanın 11. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, bir adet iri, bazofilik hücre(ok) dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.	22
Şekil 3.4. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-2 grubundan bir hayvanın kan frotisinde bir monosit (ok) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm. .	22
Şekil 3.5. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın kan frotisinde bir lenfosit (ok) ve trombosit kümesi görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.	23
Şekil 3.6. Kuluçkanın 18. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, lenfosit (ok) ve granüositler de (yıldızlar) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.....	23
Şekil 3.8. Kuluçkanın 15. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. ANAE-pozitif lenfosit (ok) dikkati çekmektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.	25
Şekil 3.9. Kuluçkanın 15. gününde, kontrol grubundan (k-2) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. ACPaz-pozitif lenfosit (ok) dikkati çekmektedir. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.	25
Şekil 3.10. Kuluçkanın 11. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak taslağı kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfosit morfolojisine sahip hücreler (oklar) damar lümenlerinde görülmektedir May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.	29
Şekil 3.11. Kuluçkanın 11. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak taslağı kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfosit	

morfolojisine sahip bir hücre (ok) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.29

Şekil 3.12. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfositmorfolojisine sahip bir hücre (ok) ve arter kesiti (yıldız) görülmektedir. Arterin tunika adventisyasında az sayıda lenfoid hücre bulunmaktadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.30

Şekil 3.13. Kuluçkanın 15. gününde deney-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında morfolojisine sahip bir hücre (ok) lenfoid hücre az sayıda olup, damar lümenlerinde daha az sayıda hücre bulunmaktadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.31

Şekil 3.14. Kuluçkanın 15. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında ANAE-pozitif lenfositler (oklar) ve bir arter kesiti (yıldız) görülmektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.31

Şekil 3.15. Kuluçkanın 15. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında ACPaz-pozitif lenfositler (oklar) ve bir arter kesiti (yıldız) görülmektedir. Arterin tunika adventisyasında lenfoid hücre az sayıdadır. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.32

Şekil 3.16. Kuluçkanın 18. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Lenf foliküllerinin (yıldızlar) gelişmesi önceki dönemden daha ileri aşamdadır. PALS'ta (ok) lenfoid hücre az sayıdadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.33

Şekil 3.17. Kuluçkanın 18. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden dalak taslağında devam eden lenf folikülü (yıldızlar) gelişiminin kontrol grubuna göre daha geride olduğu dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.33

Şekil 3.18. Kuluçkanın 21. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Kapsül (K) organı sarmakta ve lenfoid doku damarları saran lenfatik kordon (ok başı) ile merkezi bölgeleri nispeten hücreden fakir olsa da germinal merkezleri belirgin olmayan lenf foliküllerinden (yıldızlar) oluşmaktadır. PALS'ta (ok) lenfoid hücre az sayıdadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm. 34

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP: Asit fosfataz

ANAE: Alfa naftil asetat esteraz

GC: Germinal merkez



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kuluçka başlangıcında Yumurtaya Verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), Tavuklarda Dalağın Embriyonik Gelişimi ile Perifer Kan T ve B-Lenfosit oranları Üzerindeki Etkisinin Histolojik ve Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

Selime Özge ÇELİK

Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2016

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında kuluçkalık yumurtaların hava kamarasına enjekte edilen farklı dozlardaki Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embriyolarında perifer kan lenfositlerinin enzimatik aktiviteleriyle dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Çalışmada, ticari bir işletmeden temin edilen Ross 508 hattı broyler anaçlardan elde edilen 250 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar her birinde 50 yumurta bulunan 5 gruba ayrıldı. Tüm enjeksiyonlar kuluçka başlangıcında, hava kamarası yoluyla gerçekleştirildi. Kuluçka işlemleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan 1,000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Veyisoğlu, İstanbul, Türkiye) optimum koşullarda (37.8°C sıcaklık ve %65 nispi nem) gerçekleştirildi.

Deney gruplarından 500ng/yumurta ve 1.000 ng/yumurta dozlarında verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embriyosunda dalağın embriyonik gelişimini baskıladığı, ANAE ve ACPaz-pozitif lenfosit oranlarından önemli düşümlere yol açtığı tespit edilmiş ve bu nedenle etkilenen hayvanların immün sistem fonksiyonlarında önemli bozukluklara neden olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Dalak; sunset yellow FCF(E110); T ve B-Lenfosit

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of the Effects of *in ovo* Given Sunset Yellow FCF (E110) on the Embryonic Development of the Spleen, and Peripheral Blood T- and B-Lymphocyte Frequencies by Means of Histological and Enzyme Histochemical Methods

Selime Özge ÇELİK

Department of Histology and Embryology (VET)

MASTER THESIS/ KONYA-2016

In this study, the effects of Sunset yellow FCF (E110), which was injected at different doses into the chicken eggs via air sac prior to incubation, were evaluated on the enzymatic activities of peripheral blood lymphocytes and embryonic development of chicken spleen by means of histological, histomorphometrical and enzyme histochemical methods.

In the study, 250 broiler hatching eggs obtained from a commercial broodstock were used. Eggs were divided into 5 groups with 50 eggs each. All injections were performed prior to incubation through the air sac. Incubation procedure were carried out in 1.000 egg- capacity incubator (Veyisoğlu, Istanbul, Turkey) in the Department of Histology and Embryology of S.Ü. Faculty of Veterinary Medicine under optimum conditions (temperature 37.8°C and 65% relative humidity).

In the experimental groups, in which Sunset Yellow FCF (E110) was injected at the doses of 500ng/egg and 1.000 ng/egg, embryonic development of the spleen retarded, ANAE and ACPaz-positive lymphocyte rates were significantly depressed. The refore, it was concluded that significant disturbances in the immune system function of the affected animals might be occurred.

Key Words: Spleen; sunset yellow FCF(E110); T and B Lymphocyte

1. GİRİŞ

Gıdaların cazibesini artırmak amacıyla kullanılan gıda boyaları, gıda katkı maddeleri içerisinde çok önemli bir gruptur. Gıda boyalarından ülkemizde en fazla ve en yaygın olarak kullanılanların tartrazin ve Sunset Yellow FCF (E110) olduğu bilinmektedir. Pek çok hazır gıda ve gıda katkı maddesinde renklendirici olarak uzun süredir kullanılmakta olan Sunset Yellow FCF (E110) bir azo boyadır. Kimyasal formülü $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$, molekül ağırlığı ise 452,38 g/mol'dür. Sunset Yellow FCF'nin (E110) en fazla ilave edildiği gıdalar portakal suyu, jel şekerlemeler, tahıl ürünleri, pasta, tatlı, çerez, dondurma ve konserve balık bulunmaktadır. Renklendirici olarak ilaçlara da katılmaktadır. Kabul edilebilir günlük alım miktarı 2,5 mg/kgvücut ağırlığıdır (Yentür ve Karakaya 1985, FAO 2001).

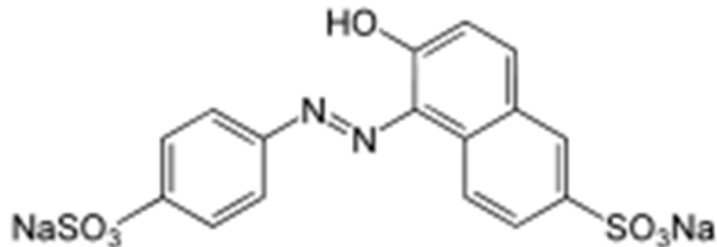
İzin verilen güvenli limitler aşılmadığında gıda boyalarının ve bu arada Sunset Yellow FCF'nin (E110) önemli yan etkilerinin olmadığı belirtilse de, uygulamada bu limitler çoğunlukla aşılmaktadır. Ayrıca, Sunset Yellow FCF (E110), muhtemel karsinogen olarak kabul edilen Sudan I'in sülfonatlı versiyonu olduğundan, arzu edilmemekle birlikte, üretim prosesi sonunda hazırlanan üründe belirli miktarda Sudan I de bulunmaktadır. Sunset Yellow FCF'nin (E110) kendisiyse aspirin intoleransı olanlarda gözlenen alerjik reaksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Gözlenen alerjik reaksiyonlar arasında, ishal, kusma, ürtiker, derinin anjiyo ödemi, nadir olarak da anaflaktik şok ve baş ağrısı en önemlileridir. Bahsedilen reaksiyonlar, aralarında Sunset Yellow FCF'nin (E110) de bulunduğu azo grubu gıda boyalarının sebep olduğu rahatsızlıkların ortak belirtileridir. Bunlara ek olarak azo grubu boyalarının neden olduğu reaksiyonlar arasında astım, rhinitis, anjiyoödem, vaskülitis, tromboksan sentezi inhibisyonu, purpura ve nadir olarak da anaflaktik şok, baş ağrısı ve diğer gastrointestinal bozukluklar da bulunmaktadır. Klinik tarama çalışmalarında ürtikerli veya anjiyoödemli hastaların bazılarında Allura Red AC, Amaranth, Sunset Yellow FCF (E110), Ponceau 4R ve tartrazine karşı hassasiyet tespit edilmiştir. Son yıllarda, Sunset Yellow FCF'nin (E110) çocuklardaki hiperaktiviteyle de ilişkisi olduğu ileri sürülmüştür. Boyanın alerjik reaksiyonları artırabileceği ve çocuklarda saldırganlığı tetikleyebileceği de ifade edilmektedir. Gerçekten de hiperaktif çocukların içeceklerinden yapay renklendiriciler (tartrazin, azorubin, Sunset Yellow FCF (E110), Ponceau-4R), koruyucu maddelerden de

sodyum benzoat çıkarıldığında, çocuklar normale dönmekte fakat bu maddeleri içeren içeceklerin tekrar verilmesiyle davranış bozuklukları yeniden ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda, kronik veya kronikleşmenin nüksettiği ürtikerli hastaların %4'ünde intolerans tanımlanmış ve bunun gıda katkı maddelerinden (benzoatlar, sorbik asit, tartrazine, sunset yellow) kaynaklandığı açıklanmıştır (Schultz-Ehrenburg ve Gilde 1987, Sardi ve ark 2010).

1.1. Sunset Yellow FCF (E110)

Orange Yellow S,FD&C Yellow 6,C.I. Food Yellow 3, C.I. 15985 veya INS No. E110 (CAS No. 2783-94-0) olarak da bilinen ve gıda boyası olarak E110 koduyla tanınan bu madde, gıda boyalarının en önemlilerinden biri olup, suda iyi çözünen sarı renkli toz formunda sentetik kimyasaldır. Oldukça kompleks kimyasal yapıya sahip bir azo boya olan Sunset Yellow FCF'nin (E110) kimyasal adı disodyum 6-hidroksi-5-(4-sülfenil)azo)-2-naftalen sülfonik asidin disodyum tuzudur (Şekil 1.1). Azo bileşikleri, bir azo köprüsüyle birbirine bağlı iki aromatik halka içerdiklerinden, genelde koyu renklidirler (Islam ve ark 2012)

Sunset Yellow FCF'nin (E110) üretimi sırasında düşük miktarda 3-hidroksi-4[(4-sülfenil)azo]-2,7-naftalen sülfonik asidin trisodyum tuzu ilave edilebilir. Yapısında bulunan diazo çekirdeği, (-N=N-) *p*-sülfonik asit grubuyla yer değiştirmiş bir benzen halkası ile *o*-hidroksi ve *p*'-sülfonik asit gruplarıyla yer değiştirmiş bir naftalen halkası içerir. Boyanın endüstriyel üretimi, diazotize sülfanilik asidin 2-naftol-6-sülfonik asitle birleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Boya sodyum tuzu halinde saflaştırılır ve kurutulur.



Şekil 1.1. Sunset Yellow FCF (E110)'un molekül yapısı.

Sunset Yellow FCF'nin (E110) 25°C'de sudaki çözünürlüğü 190,000 mg/L, 60°C'deki çözünürlüğü ise 200,000 mg/L, saf (%100) gliserinde 25°C'de 200,000 mg/L, 60°C'deki etil alkolde 10 mg/L'dir. Yüksek konsantrasyonlarda faz değiştirerek, izotropik sıvı fazından nematik likit kristal fazına geçer. Bu durum, oda sıcaklığında 0,8 M-0,9 M arasında gerçekleşmektedir. Sunset Yellow FCF (E110); suda hidrolize olan ester, amid, asetal, epoksit, lakton gibi fonksiyonel grupları içermediğinden, sudaki reaksiyon potansiyeli, aromatik sülfonik asitin veya bunun muadili olan sülfonik asit tuzunun desülfonasyonuna bağlıdır. Aromatik sülfonik asitler, sulu sülfürik asitte 100-175°C arasında desülfone oldukları ve bu koşullar doğal ortamda gerçekleşmediğinden, Sunset Yellow FCF (E110) ve bunun muadili tuzlar doğal koşullarda biyobozunur olmayıp, suda kararlı yapılarını sürdürme eğilimindedirler (Marmion 1991, Shaul ve ark 1991).

Sunset Yellow FCF (E110), ABD'de ilk defa 1929 yılında FD&C Yellow No. 6 olarak gıda boyası listesine alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Gıda ve Tarım Örgütü'nün Birleşik Gıda Katkı Maddelerini Değerlendirme Uzmanlar Komitesi (WHO/FAO JECFA), 1982 yılında Sunset Yellow FCF'nin (E110) güvenilirliğini değerlendirmiş ve ortalama günlük tüketim miktarını (Average Daily Intake, ADI) 0-2,5 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiştir. Sunset Yellow FCF (E110) sıklıkla Amaranth (E123) ile birlikte, çikolata ve karamelde kahverengi renk elde etmek için kullanılmaktadır. Ülkemizde alkolsüz içeceklerde en fazla kullanılan gıda boya boyalarının tartrazin ve Sunset Yellow FCF (E110) olduğu saptanmıştır (Dinç ve Arıcı 2008)

Sunset Yellow FCF (E110)'nin farmakokinetiği ve metabolizması üzerinde yapılan çalışmalar kısa ve uzun dönem çalışmaları olmak üzere 2 bölümde ele alınmaktadır;

1.1.1. Sunset Yellow FCF'nin (E110) Metabolizması ve Kısa Dönem Maruziyet Çalışmaları

Metabolizma çalışmalarında sıçanlara ağız yoluyla verilen 100 mg tek dozun sadece %0,8'i dışkıda gözlenmiştir. Ağız yoluyla alınan miktarın %3,6'sı sindirim kanalından emilmektedir. Boyanın parçalanmasındaki en önemli metabolik yol, muhtemelen aromatik amin ve aminosülfonik asitlerin yıkımını sağlayan bağırsak

bakterilerinin faaliyetidir ve oluşan ürünler bağırsaktan kısmen emilmektedir. Sıçanlara damar içi yolla verilen boyanın %22'si (%20-30) 6 saat sonra yıkılmadan safrayla atılmaktadır. İdrarla atılan miktarlar incelendiğinde; 2-25 mg arasında verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) 72 saat sonra %0,3 ve %1,5'i orijinal molekül halinde, %37'si de sülfanilik asitin muadilleri halinde idrarla atılmaktadır. Radyoaktif karbonla (¹⁴C) işaretli 2,7 mg (4.62 µCi) Sunset Yellow FCF (E110) verilmesinden 96 saat sonra idrarla atılan radyoaktivitenin; %8,5'nin 1-amino-2-naftol-6-sülfonik asit eşleniği, % 37,4'nün sülfonik asit eşleniği ve % 0,3'nün de yıkılmamış boya olduğu bulunmuş; Sunset Yellow FCF'nin (E110) safrayla atılma oranının %1,5 olduğu tespit edilmiştir. Sunset Yellow FCF (E110) verilen sıçanların 24 saatlik idrarında %40 oranında sülfanilik asit muadilleri bulunmuştur. Bu oran da, yıkılmamış dozun %1-2'sine karşılık gelmektedir (Ryan ve Wright 1961, Radomski ve Mellinger 1962, Honohan ve ark 1977).

Sunset Yellow FCF (E110)'nin (E110) LD₅₀ dozu olarak ifade edilen en düşük seviyeli oral akut toksik dozu farelerde >6,000 mg/kg, sıçanlarda >2, 000 ve >10,000 mg/kg olarak belirlenmiştir (Gaunt ve ark 1967).

Sunset Yellow FCF'nin (E110) hücre metabolizması üzerindeki etkilerini inceleyen, boyanın *in vitro* koşullarda gerçek ve yalancı kolinesterazları (ChEs) inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etki karışık etki tarzında olup; kompetitif ve non-kompetitif olmak üzere her iki tip inhibisyon da gerçekleşmektedir. Boyanın inhibisyon etkisi geri dönüşümlüdür (Osman ve ark 2002).

Sunset Yellow FCF'nin (E110) mutajenite ve klastojenitesi üzerinde yapılan çok sayıda çalışma vardır. Mutajenite ve DNA hasarı çalışmalarından uyumlu ve negatif sonuçlar elde edilmiştir. Çin hamster fibroblastları üzerinde yapılan çalışmada klastojenik aktivite testi ve mikronükleus testiyle pozitif sonuç bulunmuştur. Farklı laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda boyanın klastojenik etkisi gözlenmemiştir (Garner ve Nutman 1977, Price ve ark 1978, Bonin ve Baker 1980, Haveland-Smith ve Combes 1980, Ishidate ve ark 1984, Roychoudhury ve Giri 1989, Wever J 1989).

Boyanın kromozomlar üzerindeki etkileri konusunda yapılan bir çalışmada birçok kromozom bozukluğu gözlenmiştir. Genotoksisite belirleme amacıyla yapılan

in vitro kromozom hasarı test sonuçları oldukça çelişkilidir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, metabolik aktivasyona uğramamış Sunset Yellow FCF (E110), 6.000 µg/mL konsantrasyonda pozitif sonuç vermiş olmakla birlikte, başka bir testte metabolik aktivasyona uğramış ve uğramamış formlarının 5000 µg/mL konsantrasyonlarının genotoksik etkisi gözlenmemiştir. Sunset Yellow FCF (E110) ile yapılan kardeş kromatid değişimi analizinde (sister chromatid exchange, SCE assay) boyanın 5.000 µg/ml'ye kadarki konsantrasyonları çelişkili sonuçlar vermiştir (Ivett ve ark 1989, Kumar ve Srivastava 2011).

Kemiricilerde yapılan *in vivo* genotoksisite testlerinden mikronükleus (MN) indüksiyon testinde, erkek sıçanlara 10 ml/kg vücut ağırlığı hacminde olacak şekilde 500 veya 1,000 mg/kg dozunda oral yolla verilen Sunset Yellow FCF (E110), kemik iliğindeki polikromatofilik eritrositlerdeki MN frekansında artışa neden olmamıştır. Sunset Yellow FCF'nin (E110) 500 mg/kg vücut ağırlığında ağız yoluyla verilen dozu, DNA sentezi zamanlamasında değişikliğe yol açmamıştır. Tekrarlayan dozlarla yapılan *in vivo* çalışmalarda; gıdayla 0 ppm, 6.000 ppm, 12.500 ppm, 25.000 ppm, 50.000 ppm veya 100.000 ppm miktarında Sunset Yellow FCF (E110) 12 hafta süreyle verilmiştir. Erkek farelerden 100.000 ppm Sunset Yellow FCF (E110) alanlarda ortalama canlı ağırlık kazancı kontrollerden düşük bulunmuştur. Dişilerdeki canlı ağırlık kaybı 12.500 ve 100.000 ppm grupları arasında da gözlenmiştir. Hiçbir grupta Sunset Yellow FCF (E110) ile ilgili makroskopik histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Kabul edilen yan etki gözlenmeyen dozun (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), dişi sıçanlar için 6.000 ppm ve erkek sıçanlar için de 12.500 ppm olduğu belirtilmiştir (NTP 1981). Ağız yoluyla verilen Amaranth, Sunset Yellow FCF (E110) ve Tartrazin, genotoksik etkisiyle apoptozis üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, söz konusu gıda boyaları 2.000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 24 saat aralıklarla iki kez verilmiştir. Kolon epitel hücrelerinde mitoz sıklığı artmış olmakla birlikte, mikronükleus sıklığı artmamıştır (Westmoreland ve Gatehouse 1991, Sasaki ve ark 2000). Embriyotoksisite denemelerinde, Charles River CD sıçanlarına mide sondasıyla 100, 300 veya 1,000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda verilen Sunset Yellow FCF (E110)'nin embriyotoksisiteye neden olmadığı ifade edilmiştir. Benzer şekilde, Sunset Yellow FCF'nin (E110) reproduktif sistem üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı da bildirilmiştir. Sıçanlarda Sunset Yellow FCF'nin (E110) östrojenik etkisi

bulunmamıştır. Bununla birlikte, 250 ve 1.500 mg /kg vücut ağırlığı/gün Sunset Yellow FCF (E110) dozu karşılığındaki boyanın 90 gün boyunca verildiği sıçanlardan her iki grubun testislerinde önemli etkiler gözlemiştir. Bu iki dozdan 250 mg/kg vücut ağırlığı/gün Sunset Yellow FCF (E110) dozunun, zararlı etkinin gözlemlendiği en düşük doz (The lowest dose tested is a **Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL**) olduğu sonucuna varılmıştır. Bu doz daha önce JECFA tarafından kabul edilebilir günlük alım seviyesinin (ADI) hesaplanmasında yararlanılan 500 mg/kg vücut ağırlığı olarak kabul edilen yan etki gözlenmeyen doz (**No Observed Adverse Effect Level, NOAEL**) seviyesinden daha düşüktür (IRDC 1972a, Mathur ve ark 2005a, Mathur ve ark 2005b).

İçme suyuyla 10 ay süreyle %2'lik Sunset Yellow FCF (E110) verilen 16 sıçan grubunda genç hayvanların büyümesinin hızlandığını, yaşama kabiliyetlerinin arttığını bildirmiştir. Hayvanların karaciğerinde histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Bir başka çalışmada doksan gün süreyle Sunset Yellow FCF (E110) verilen 15'i erkek, 15'i de dişi toplam 30 sıçanın büyüme ve gıda dönüştürme oranlarında fark gözlenmezken, %3'ünde çalışma boyunca, %2'sinde de ilk haftalarda hafif ishal oluşmuştur. Hematolojik verilerde normalden sapma oluşmamış, hayvanların karaciğer ve böbrek fonksiyonları bozulmamıştır. Otopside, sekum %2-3 oranında, testisler %3 oranında büyümüştür. Bununla birlikte, Sunset Yellow FCF (E110)'den kaynaklandığı düşünülen histolojik değişiklikler gözlenmemiştir. Kobayda Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı aşırı duyarlılık görülmemiştir (Bär ve Griepentrog 1960, Manchon ve Lowy 1964, Gaunt ve ark 1967).

1.1.2. Uzun Dönem Maruziyet Çalışmaları

Erkek ve dişi sıçanlarda yapılan yüz üç hafta süren ve 12,500 ppm ve 50,000 ppm dozundaki yedirme denemelerinde Sunset Yellow FCF'nin (E110) karsinogenitesinin olmadığı bildirilmiştir (NTP 1982). Deriyaltı yolla 7 ay boyunca, 1 ml miktarında %1'lik Sunset Yellow FCF (E110) solüsyonu verilen 22 sıçana toplam 55 enjeksiyon yapılmış ve hayvanların sadece birinde periton tümörü gelişmiştir (DFG 1957).

Bir başka deneysel çalışmada, otuz hayvandan oluşan fare grubuna içme suyuyla %0.05'lik Sunset Yellow FCF (E110) 52 hafta süreyle verilmiş ve hayvanlar yaşam süreleri boyunca yaşatılmıştır. Hayvanların haftalık boya tüketimi 17 mg, toplam boya tüketimi ise 884 mg/fare olmuştur. Hayatta kalan 7 hayvanda 9 lenfoma tümörü ve bir malign bağırsak tümörü gelişmiştir. Kontrol olarak kullanılan 60 hayvandan 13'ünde ise 5 lenfoma ve 1 bağırsak tümörü gelişmiştir. Boyanın tümör oluşumunda etkisi olmadığını gösteren bildirimler de vardır. Seksen haftalık bir başka yedirme denemesinde ise, Sunset Yellow FCF'nin (E110) canlı ağırlık kazanma hızı ve organ ağırlıkları üzerinde olumsuz etkisi bulunmamıştır. Histopatolojik değişiklikler ve tümör şekillenmesi bakımından da kontrol grubuyla deney grubu arasında önemli fark bulunmamıştır (Gaunt ve ark 1974).

Hamsterlerde yapılan başka bir çalışmada ise, derialtı veya periton içi enjeksiyonla verilen 1,0 mg Sunset Yellow FCF (E110), 330 günlük dönemde mortaliteyi değiştirmemiş ve tümör oluşumuna yol açmamıştır (Price ve ark 1978).

Sıçanların yemine %4 oranında katılan Sunset Yellow FCF (E110) 18 ay boyunca yedirilmiş ve mide bez epitel hücrelerinde boyanma ve ince bağırsakta granüler birikmeler gözlenmekle birlikte, tümör oluşumuna rastlanmamıştır. Gıda ile 64 hafta süreyle 4 farklı dozda (%0, %0,03; %0,3 ve %1,5) Sunset Yellow FCF (E110) verilen sıçanlarda gıda tüketimi, büyüme, organ ağırlıkları, histopatoloji ve kan tablosu değişmemiş, tümör görülme sıklığı artmamıştır. Bununla birlikte, daha yüksek miktarlarda (%0, %0,5; %1,0; %2,0 ve %5,0) Sunset Yellow FCF (E110) verilen 24 sıçanda meme tümörü görülme sıklığı artmıştır. Tümör görülen hayvan sayısı gruplara göre sırasıyla 2, 1, 6, 3 ve 6 olarak bulunmuştur (Willheim R 1953, Mannell ve ark 1958).

Köpeklerde yapılan yedirme çalışmalarında, hayvanlar %1 ve %5'lik boya ilave edilen gıdayla 2-3 ay beslenmiştir. Beagle ırkı 4'er hayvandan oluşan iki gruptan %5'lik grupta 2, %1'lik grupta da 1 hayvan ilerleyici şekilde canlı ağırlık kaybetmiş ve 2-3 ay sonunda ötenazi edilmek zorunda kalmıştır. Genel olarak, gıdada %5 oranında bulunan Sunset Yellow FCF (E110) orta derecede, %1 oranındakiyse hafif derecede toksik olarak değerlendirilmiştir. Kilo kaybı ve ishal ana belirtilerdir. Kaba ve mikroskobik değişiklikler görülmekle birlikte, bulgular karakteristik değildir. Bununla birlikte, 5 Beagle ırkı köpekte yapılan çalışmada 7 yıl

süreyile verilen %2,0 oranındaki boyanın toksik etkisi bulunmamış ve histopatolojik değişikliklere yol açmadığı tespit edilmiştir (FDA 1964).

Stok gıdada %5 oranında bulunan Sunset Yellow FCF'nin (E110), sıçanlarda makroskopik olarak tespit edilebilen toksik etkilerinin olmadığını bildirmiş; ancak, pürifiye yemde aynı oranda bulunan Sunset Yellow FCF'nin (E110) 14 günlük deneme süresinde büyümede belirgin gerileme, tüylerin düzensizleşip dikleşmesi, %50'den fazla sıçanın ölümüyle sonuçlandığını tespit etmiştir. Gözlenen bu toksik etkilerin sarı psillium tohumu (*Plantago ovata*) tozu, havuç kökü tozu, yonca yaprağı ve buğday kepeğiyle zıt etkileşim sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Ershoff 1977).

Önerilen dozlarda kullanıldığında, Sunset Yellow FCF'nin (E110) hayvan ve insanlarda karsinogenik etkisinin olmadığı, sıçan ve köpeklerde önerilen dozun katlarının (1X, 10X, 30X ve 100X), nesiller boyu üreme üzerinde yan etkisinin olmadığı, E. coli ve Salmonella typhimuriumla yapılan çalışmalarda mutajenik ve teratojenik etkilerinin olmadığı ileri sürülmüştür. Tavşanlarda 100, 300 ve 1000 mg/kg/gün dozunda ve gebeliğin 6-18. günlerinde ağızdan verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110); vücut ağırlığı, corpus luteum gelişimi, erken ve geç embriyo rezorpsiyonu, canlı ya da ölü ortalama fetüs canlı ağırlığı, cinsiyet oranı, genel organ ve iskelet anomalileri üzerindeki etkileri incelenmiş ve sadece 1000 mg/kg/gün Sunset Yellow FCF(E110) verilen hayvanlarda tam olmayan yapışık ikizlik oranında artış dikkati çekmiştir (IRDC 1972a).

1.1.3. İnsanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde, gıdalarda yapılan bir tarama çalışmasında incelenen 29 dondurma örneğinin 16'sında Gıda Tüzüğü'ne göre izin verilmeyen çeşitli sentetik boyalara (Tartrazin, Sunset Yellow FCF (E110), Ponceau 4R, Ponceau SX) rastlanmıştır (Yentür ve Karakaya 1985).

Sunset Yellow FCF'yle (E110) yapılan deri testinde, p-fenilendiamine karşı ekzematöz aşırı duyarlılığı olan kişilerin Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı da çapraz duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çapraz reaksiyon, boya molekülünün, yapısal moleküllere bağlanan kinon yapısındaki bileşiklere kolayca dönüşebilmesiyle açıklanmaktadır (Baer ve ark 1948).

1.2. Dalak

Kanatlılarda plasenta bariyeri bulunmadığından, tavuk yumurtası, bağışıklık sisteminin embriyonik gelişmesi üzerinde dış etkenlerin olumsuz etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda sıkça tercih edilen bir test materyali haline gelmiştir. Dalak, ergin memeli ve kanatlı hayvan türlerinde en büyük lenfoid organıdır. Sekonder, yani perifer bir lenfoid organ olan dalak, kandaki yabancı organizmaların ve yaşlı alyuvarların dolaşım kanından uzaklaştırılmasını sağlar. Organın kapsülü ve bundan çıkan bağ dokusu trabeküllerinden oluşan destek sistemi, organın stromasını oluşturur. Memeli dalağının kapsül ve trabeküllerinde bol miktarda düz kas teli bulunduğundan, gerekli olduğunda kasılarak dolaşıma kan desteği sağlayabilir. Organ paranzimi, lenf folikülleri ve lenfatik kordonların oluşturduğu "beyaz pulpa" ile kırmızı pulpa alanları ve venöz sinusların oluşturduğu "kırmızı pulpa"dan meydana gelir. Beyaz pulpa, buradaki damarları saran lenfatik kordonlarla, arteria sentralisleri saran lenfatik kordonlardan oluşurken; kırmızı pulpa, bol miktarda kan hücresi içeren venöz sinüsler ve kırmızı pulpa alanlarından oluşur. Heriki pulpanın da çatısını retikulum hücreleri ile retikulum ipliklerinin oluşturduğu ağ şekillendirir (Kelly ve ark 1984).

Dalakta farklı kan hücresi tiplerinin tamamına rastlansa da en bol miktarda bulunan hücreler lenfositlerdir. Diğer sekonder lenfoid organlarda olduğu gibi dalakta da T ve B lenfosit bölgeleri ayırılmaz. T lenfositler arteria sentralis etrafında yerleşerek periarteriyoler lenfoid kılıfı (periarteriolar lymphoid sheat, PALS) oluştururken, B-lenfositler lenf foliküllerinin germinal merkezlerinde yerleşirler. Tavuklarda lenf yumrularının gelişmemiş olması ve sadece servikal, torakal ve lumbal bölgelerde bulunmaları, dalağın tavuk immün sistemindeki önemini artırmaktadır. Bu nedenle, embriyonik gelişim sırasında dalağın gelişiminde meydana gelen bozukluklar, kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde hem hücresel ve hem de humoral bağışıklık fonksiyonlarında önemli yetmezliklerle sonuçlanabilir (Kelly ve ark 1984)

1.2.1. Dalağın Embriyonik Dönemdeki Gelişimi

Dalağın periton örtüsü, embriyonik dönemde dorsal mezogastriyumdan köken alan dalak taslağının üzerindeki sölom epitelinden gelişmektedir. Organın

stromasının oluşumuna katılan retikulum hücreleri ve düz kaslar bölge mezenkiminden gelişirken; paraneoplastik oluşturan lenfoid hücreler olan T ve B lenfositler merkezi lenfoid organlar olan timus ve bursa Fabricii'den kan yoluyla organ taslağına gelerek buradaki retikulum iplikleri ve retikulum hücrelerinin oluşturduğu ağız gözeneklerine yerleşir. Arteria sentralis etrafında kümelenen bu hücreler lenf foliküllerini (Malpighi cisimcikleri) oluşturur T ve B lenfositlerin dalak ve diğer perifer lenfoid organlara göçü karnivorlarda gebeliğin 40-48.günlerinde, atlarda ise 120.gününde başlamaktadır. Tavuk embriyosunda ise B-lenfositlerin bursa Fabricii'den dalağına göçleri kuluçkanın 14.gününde başladığı bildirilmişse de, daha sonra kanatlılarda timusun embriyonik gelişimi üzerinde yapılan bir çalışmada organın medullasında tipik lenfosit morfolojisine sahip hücrelere kuluçkanın 10.gününde rastlandığı ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, olgun T lenfositlerine özgü bir enzim olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozitifitesinin timus medullasındaki lenfositlerde kuluçkanın 13.gününde ortaya çıktığı dikkate alınarak, timustan perifer lenfoid organlara T-lenfosit göçünün kuluçkanın 10-14.günlerinde başladığı kabul edilmektedir (Kocaöz ve ark 1997a, 1997b, Sandıkcı ve Çelik 2000).

Embriyonik gelişim sırasında kan dolaşımıyla dalak taslağına gelen lenfositler, organa özgü lenf foliküllerinin çatısını oluşturan retiküler iplik ağızın perifer bölgelerine yerleştiklerinden, histolojik kesitlerde foliküllerin merkezi bölgeleri hücreden fakir görünür ve soluk boyanır. Kuluçkadan çıkıştan sonra gerçekleşen antijenik uyarımlara karşı oluşan bağışıklık yanıtının erken dönemlerinde, buradaki hücreler hızla çoğaldıklarından, lenf foliküllerinin merkezi bölgeleri "germinal merkezler (GC)" ya da "reaksiyon merkezleri" olarak da bilinirler. Lenf foliküllerinin; germinal merkezleri çevreleyen, hücreden zengin ve koyu boyanan bölgeleri folikül korteksi olarak bilinmektedir. Germinal merkezlerin B lenfositlerin yerleştiği B bölgeleri, folikül korteksinin ve özellikle de PALS'ın T bölgeleri oldukları bilinmektedir (Kelly ve ark 1984).

Fötal veya kuluçkanın ileri döneminde, bir yandan göçle gelen lenfositler dalağına yerleşirken, diğer yandan kök hücrelerden monositler, granülositer lökositler, eritrositler ve megakaryositlerin yapımı gerçekleşir. Dalakta eritrosit ve granülositer lökositlerin yapımı doğumdan ve kuluçkadan çıkıştan sonra sona ererken; megakaryositlerden trombositlerin yapımı erişkin dönemde yalnızca rat ve kedilerde söz konusudur. Dalakta lenfosit ve monosit yapımı hayat boyunca sürer.

Beyaz pulpayı oluşturan lenf foliküllerinin germinal merkezleriyse, canlı antijenle karşılaştıktan sonra şekillenir (Kelly ve ark 1984).

1.3. Alfa-Naftil Asetat Esteraz Enzimi

Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi lizozomal bir enzimdir. Pratikte, bazı türlerin gerek doku kesitleri ve gerekse de perifer kan frotilerinde T lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde yararlanılan ANAE, timusta gerçekleşen T lenfosit olgunlaşması sırasında son dönemde kazanılan bir enzimdir (Knowles ve Holck 1978b, Basso ve ark 1980, Knowles ve Halper 1980a, Zicca A 1981).

Fetüslerde yapılan bir çalışmada, fütüslerin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60.gününde rastlanmış, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte ANAE pozitif lenfosit oranının da arttığı tespit edilmiştir. Bu enzimin, öteki esteraz grubu enzimler gibi, aktive olan T lenfositlerin sitotoksik fonksiyonlarıyla makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır. Başta insan olmak üzere, sığır, tavuk, köpek ve farede T lenfositlerin histolojik ayırımında yararlanılan bir enzimdir. ANAE pozitivitesi; lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. İnsan perifer kan lenfositlerinde; ilki, bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tarzındaki (Dot Like-Positivity) T lenfositlere özgü olan pozitive diğeri ise lenfosit morfolojisine sahip olan ve “Null Cells” olarak da adlandırılan hürelere özgü olduğu ifade edilen ince-granüler pozitivitedir. Monosit ve makrofajlarda ise sitoplâzmadaki diffüz ve güçlü bir pozitive gözlenmektedir (Mueller ve ark 1975, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991).

ANAE pozitif hürelere, lenf düğümlerinde parakortikal ve interfoliküler bölgelerde, tonsillalarda interfoliküler bölgelerde, dalakta arteriya sentralisi saran PALS'ta ve timus lopçuklarının medulla bölgesinde lokalize olmaktadır. Lenf yumruları, dalak ve tonsillaların lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki lenfositler ile kortikal timositler ANAE negatif reaksiyon vermektedir (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981).

Farklı türlerin perifer kanındaki ANAE pozitif lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermekte; insanda perifer kan lenfositlerinin %69-%75'i, köpeklerin perifer kan lenfositlerinin %56-%78'i, tavukların perifer kan lenfositlerinin %35'i ve sığırların perifer kan lenfositlerinin %47.7'si ANAE-pozitifdir (Ranki 1978, Wulff ve ark 1981, Kajikawa ve ark 1983, Pruthi ve ark 1987, Çelik ve ark 1991).

1.4. Asit Fosfataz Enzimi

Asit fosfataz (ACPaz) enzimi, miyelositler, polimorf nükleer lökositler (PMNL), lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulcukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir. Özellikle makrofajlar çok güçlü ACPaz aktivitesi gösterirler. İnsan timositlerince erken fetal dönemde kazanılan ACPaz pozitifitesinin, doğumdan sonra da perifer kan T lenfositlerinde güçlü bir şekilde varlığını sürdürdüğünü bildirmişlerdir (Li ve ark 1972, Basso ve ark 1980, Catowsky 1981).

İnsan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitifitesi, monositlerin ise soluk ve sitoplâzmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan diffüz pozitive göterdiklerini belirlemişlerdir. Enzimin memelilerde T lenfositlere spesifik olduğu bildirilirken, kanatlılarda B-lenfositler için spesifik olduğu ileri sürülmektedir. Neoplastik ve non-neoplastik insan lenf yumrularında yapmış oldukları bir çalışmada, ACPaz için biri hem lenf yumrusu ve hem de kan frotilerindeki T lenfositlerinde gözlenen globüler pozitive ile diğeri sadece lenf yumrularındaki T lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitive tiplerini gözlemişlerdir. Kobay, fare ve rat timositlerinde, bir ya da birkaç iri granül halinde veya sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüller tarzında ACPaz pozitifitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise diffüz nongranüler pozitive gözlenmektedir. Bazı araştırmacılar, neo-natal dönemde bursektomize ettikleri civcivlerin kan dokuları ile dalaklarındaki lenf foliküllerinin GC'lerinde ACPaz pozitif lenfosit oranlarında önemli düşüşler meydana geldiğini bildirmektedir. Bu nedenle ACPazın kanatlı olgun B lenfositlerine özgü bir olduğu kabul edilmektedir (Kaplow ve Burstone 1964, Yadav ve ark 1982, Slowik ve ark 1990, Graczyk 1994).

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan bir gıda boyası olan SunsetYellow FCF'nin (E110), tavuk T ve B lenfositlerinin yapımı ve olgunlaşması ile dalağın embriyonik gelişmesi üzerindeki etkisinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Yumurta Materyali

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun onayıyla (2013/044) gerçekleştirildi. Çalışmada, Bursa Has Tavuk İşletmesinden temin edilen Ross 508 hattı broyler anaçlardan elde edilen 250 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

Yumurtalar, m³ başına 130 ml 40%'lık formaldehit solüsyonuna atılan 80 g potasyum permanganat karışımıyla fumigasyona tabi tutularak dezenfekte edildi. Enjeksiyon işlemlerinden önce tüm yumurtalar hassas terazi (Sartorius, PT 120, Germany) ile tartıldı. Ağırlığı 50-60g arasında olan yumurtalar çalışmaya dahil edildi. Her yumurta kurşun kalemle işaretlendi.

Tüm enjeksiyonlar kuluçka başlangıcında, hava kamarası yoluyla gerçekleştirildi. Bu amaçla her yumurtanın küt ucu %96'lık etil alkolle silindi ve özel yumurta delicisiyle delindi. Delikler enjeksiyonu takiben hemen sıvı parafinle kapatıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikro pipetle (Sealpette, Jencons, Finland) gerçekleştirildi. Kuluçka işlemleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan 1,000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Veyisoğlu, İstanbul, Türkiye) optimum koşullarda (37.8°C sıcaklık ve %65 nispi nem) gerçekleştirildi. Yumurtalar 2 saatte bir kez çevrildi.

2.1.2. Sunset Yellow FCF (E110)

Çalışmada, kristalize haldeki boya oranı %90 (465224-25G, Sigma-Aldrich, USA) olan Sunset Yellow FCF (E110) kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Hazırlanması

Kristalize haldeki saf Sunset Yellow FCF (E110) standardı, steril distile su içinde çözdürülmek suretiyle, 10 µg/ml konsantrasyonunda Sunset Yellow FCF (E110) stok solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon, çalışmada kullanılacak olan her bir

konsantrasyon grubu için gerekli olan Sunset Yellow FCF (E110) içecek şekilde falcon tüplere konuldu ve tüpler alüminyum folyoya sarılarak, kullanıncaya kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edildi. Kullanımda önce solüsyonlar 0,2 µm’lik selüloz membran filtreden (WWR International, USA) geçirildi.

2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Yumurtalara Verilmesi

Bu amaçla 250 yumurta, her birinde 50 yumurta bulunan 5 gruba ayrıldı ve gruplara aşağıdaki çizelgede açıklanan işlemler uygulandı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar n=50	Yumurtalara Uygulanan İşlem
Kontrol-1 grubu	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Kontrol-2 grubu	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacminde distile su enjekte edildi.
Deney-1 grubu (100 ng/yumurta Sunset Yellow FCF enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacminde 100 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.
Deney-2 grubu (500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacminde 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.
Deney-3 grubu (1000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacminde 1.000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.

2.2.3. Doku Örneklerinin Alınması

Kuluçkanın 11, 15, 18 ve 21. günlerinde kontrol ve deney gruplarının gruplarının her birinde 8'er embriyo elde edilinceye kadar gereken sayıda yumurta makineden alınarak dijital teraziyle (Sartorius, PT 120, Germany) tartıldı ve açıldı. Çıkarılan embriyolar tartıldı ve embriyo ağırlıkları belirlenerek sonuçlar kaydedildi. Her yumurta için açıldığı andaki yumurta ağırlığı ve bundan çıkan embriyo ağırlığı

değeri kullanılarak rölatif embriyo ağırlığı hesaplandı. Bu amaçla “embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı X 100” formülünden yararlanıldı.

Embriyonik gelişme Hamburger-Hamilton skalasına göre değerlendirildi (Hamburger ve Hamilton 1951).

Tartım sonrası yapılan diseksiyonla her embriyodan kan ve dalak dokusu örnekleri alındı. Kalpten alınan kan örneklerinden hazırlanan frotiler formol-sükroz tespit solüsyonunda tespit edildi ve takiben distile suyla 3 kez yıkandı. Her hayvandan 6 frotiler hazırlandı ve havada kurutuldu. Frotilerden 2’si May Grünwald-Giemsa ile boyandı. Kalan frotilerin 2’ser adedi, ANAE ve ACPaz enzimlerinin demontrasyonunda kullanıldı.

Alınan dalak dokusu örneklerinin her biri üç parçaya ayrılarak; parçalardan biri %10’luk tamponlu formal-salinde (0,1 M, pH 7,4) tespit edildi. Bu doku örnekleri rutin histolojik uygulanarak yıkama, dehidrasyon, saydamlaştırma, parlatma işlemlerini takiben sert parafinle bloklandı. Hazırlanan bloklardan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitlerin bir kısmı Crossmon’un triple ve bir kısmı da Pappenheim’in panoptik boyama yöntemleriyle boyanarak ışık mikroskopik incelemeler için preparatlar hazırlandı. Diğer doku parçaları da aşağıda belirtilen ve her enzim için ayrı olarak hazırlanan tespit sıvılarında 24 saat süreyle tespit edildi. Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi için +4°C’deki formol-sükroz tespit solüsyonu, asit fosfataz (ACPaz) enzimi için formol-kalsiyum tespit solüsyonu hazırlandı. Tespiti takiben +4°C’deki Holt solüsyonuna alınan doku örnekleri bu solüsyonda 22 saat bekletildi. Süre sonunda doku örneklerinden dondurma mikrotomunda (Slee London) alınan 12 µm kalınlığında kesitler, önceden formol-jelâtinle muamele edilen lamlara çekilerek oda sıcaklığında (20°C’de) 30 dakika süreyle kurutuldu (Knowles ve Holck 1978b, Konuk 1981, Culling ve ark 1985).

Enzim histokimyasal yöntemlerle hazırlanan preparatlarda T ve B lenfositlerinin dokudaki yerleşimleri belilendi. Parafinde bloklanan kesitlerden hazırlanan preparatlarda organların embriyonik gelişimi histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle değerlendirildi.

2.2.4. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Demonstrasyonu

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0,8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, N-8505-Sigma, USA) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2,4 ml %4'lük sodyum nitrit (S-3421, Merck, Germany) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (P- 3750, Merck, Germany) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesi sonucunda elde edilen 4.8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,8'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan dokusu frotileri ve doku kesitleri kontrollü sürelerde bekletildi.

Enzimatik reaksiyon ürünü olan kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı ve sentetik yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı (Maiti ve ark 1990).

2.2.5. Asit Fosfataz (ACPaz) Demonstrasyonu

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan Michaelis'in Veronal-asetat tampon solüsyonuna substrat olarak kullanılan 1 ml N,N-dimetilformamid içerisinde çözdürülmüş 10 mg Naphthol AS-BI fosfat (N-2125, Sigma, USA) ilave edilerek karıştırıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu ve 13 ml distile su iyice karıştırıldıktan sonra 1,6 ml hekzazotize edilmiş (0,8 ml pararozanilin, 0,8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklendi. Karışımın son pH'sı 1 N NaOH solüsyonu ile 5,0'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri oda sıcaklığında 1 saat, doku kesitleri kontrollü bir şekilde bekletildi. Hücre sitoplazmasında spesifik kırmızı-pembe granüllerin oluşumunun ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi. Üç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-greenle çekirdek boyası uygulandı ve sentetik yapıştırıcı Entellan (Merck, Germany) yardımıyla lamelle kapatıldı.

2.2.6. Pappenheim'in Panoptik Boyasıyla Kesitlerin ve Kan Frotilerinin Boyanması

Perifer kan lenfosit oranlarının (%) belirlenmesi amacıyla modifiye May Grünwald-Giemsa boyama yöntemi uygulandı. Frotiler önceden süzülen May Grünwald (Merck, Germany) boyasıyla 3 dakika boyandı. Süre sonunda frotiler, boya ile eşit hacimde 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tampon solüsyonu (pH 5,2) ile muamele edildi. Frotilerin üzerinde metalik parlaklığa kadar (beş dakikayı aşmayacak bir süre) beklendi. Daha sonra boya solüsyonu döküldü. Distile suyla 3 kez yıkanan frotiler 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tamponunda (pH 5,2) hazırlanan %30'luk Giemsa (Merck, Germany) solüsyonuyla 20 dakika boyandı. Boyama sonunda distile suyla iyice yıkanan frotiler seri bir şekilde saf etanolden ve düşük dereceli alkollerden geçirilerek ksilolde şeffaflaştırıldı ve Entellanla (Merck, Germany) kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar dijital kameralı ışık mikroskopuyla (Nikon Eclipse, E-400 equipped with Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) incelendi gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

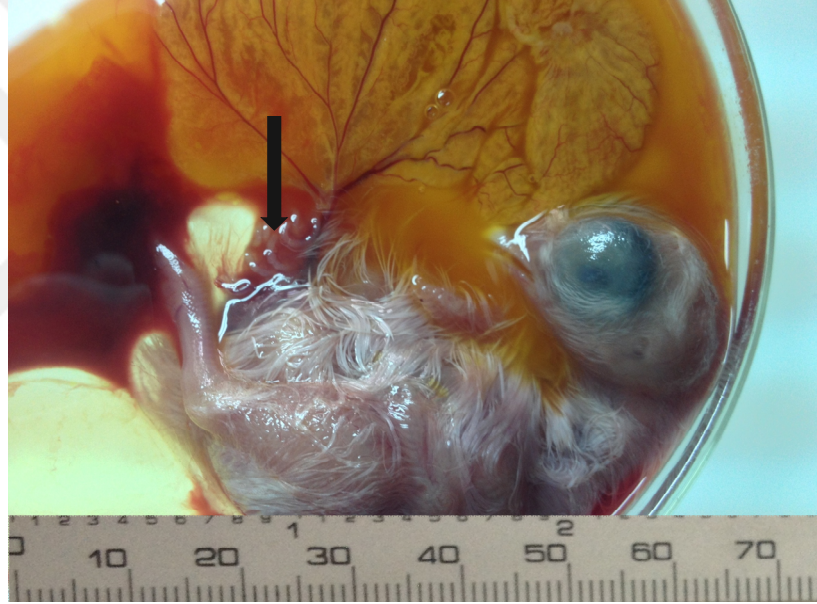
2.2.7. İstatistikî Analizler

Enzim histokimya yöntemiyle hazırlanan preparatlarda, ANAE-pozitif ve ACPaz-pozitif lenfosit oranları belirlendi ve sonuçlar istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek, grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri tespit edilerek $P < 0,05$ değeri önemli olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular

Çalışmada kullanılan 250 adet yumurtanın 230 adedinde embriyonik gelişim gerçekleşti. Kontrol-1, kontrol-2 gruplarıyla 100 ng ve 500 ng Sunset Yellow FCF (E110) gruplarındaki embriyoların gelişimi Hamburger-Hamilton(1951) skalasına uygun gerçekleştiği halde, 1000 ng Sunset Yellow FCF (E110) verilen grupta gelişme geriliği yanında karın duvarının kapanmaması sonucu karın organlarının dışarıda olduğu (*Schistosoma reflexuslu*) embriyolara da rastlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 1.000 ng Sunset Yellow FCF (E110) verilen gruptan (D3 grubu) *Schistosoma reflexuslu* bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki makroskopik görünümü.

Kuluçkanın 11. günündeki rölatif embriyo ağırlıkları dikkate alındığında; kontrol-1 ve kontrol-2 gruplarıyla deney-1 ve deney-2 gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları birbirine oldukça yakın olup, grupların ortalama değerleri arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildi ($P>0,05$). Deney-3 grubunun ortalama rölatif embriyo ağırlığı diğer gruplarınkinden önemli derecede ($P<0,05$) daha düşüktü. Kuluçkanın 15. günündeyse, deney-3 grubunun ortalama rölatif embriyo ağırlığı en düşük değere sahipken; kontrol-2, deney-1 ve deney-2 gruplarının ortalama rölatif

embriyo ağırlıkları birbirine yakın değere sahipti. Grupların, kuluçkanın 18. ve 21. günlerindeki ortalama rölatif embriyo ağırlıkları birbirine oldukça yakın olup, aradaki fark önemsizdi ($P>0,05$, Çizelge 3.1).

Çizelge3.1. Kontrol ve deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları (%).

Gruplar	11. gün	15. gün	18. gün	21. gün
	N=8	N=8	N=8	N=8
	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol- 1	7,53±0,1 ^a	29,20±1,2 ^{bc}	51,21±1,0 ^a	47,12±0,7 ^a
Kontrol- 2	7,35±0,1 ^a	32,35±0,7 ^a	50,96±0,6 ^a	48,48±0,9 ^a
Deney- 1	7,60±0,3 ^a	31,21±0,8 ^{ab}	52,09±1,2 ^a	46,41±0,7 ^a
Deney- 2	7,55±0,3 ^a	29,86±1,0 ^{abc}	51,21±1,4 ^a	45,93±1,0 ^a
Deney- 3	6,63±0,2 ^b	27,70±1,0 ^c	50,77±0,8 ^a	47,80±0,9 ^a

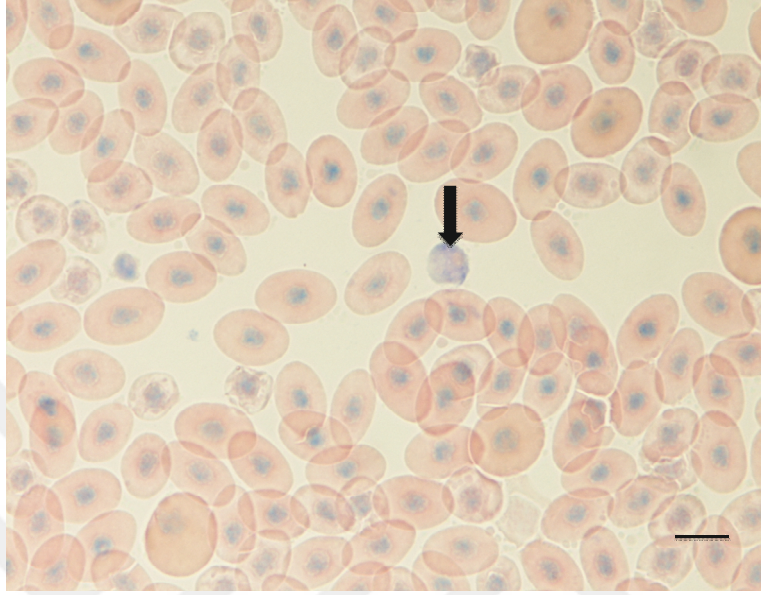
^{a,b} Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

3.2. Perifer Kan Bulguları

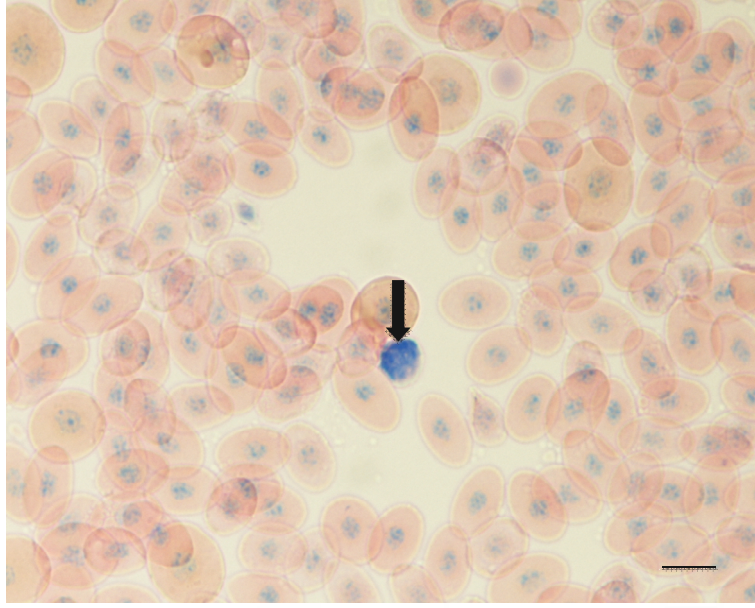
Kuluçkanın 11. Gününde, kontrol-1 ve kontrol-2 gruplarından alınan kan örneklerinden hazırlanan frotilerde baskın hücre tipi eritrositlerdi. Bu dönemde lenfosit morfolojisine sahip olan hücrelere nadiren rastlanırken, granülositer seri hücre tiplerine rastlanmadı (Şekil 3.2). Kan frotilerinde tek tük iri, bazofilik hücreler de görüldü (Şekil 3.3). Kontrol-1 ve kontrol-2 gruplarının kan örneklerinde lenfoid hücre morfolojisine sahip hücreler kuluçkanın 15.gününde daha bol miktardaydı. Kuluçkanın 15.gününde, kanda monositler sıklıkla gözlemlendiği halde, granülositlere rastlanmadı (Şekil 3.4). Kuluçkanın 15. ve 18. günleriyle çıkış günü hücre sayılarındaki belirgin artış yanında trombositler (Şekil 3.5) ve 21.gün kan örneklerinde diğer hücre tiplerine ek olarak granülositler de gözlemlendi (Şekil 3.6).

Deney gruplarından alınan kan örnekleri üzerinde yapılan incelemelerde, kontrol gruplarınınkinden farklı morfolojik özelliklere rastlanmadı. Bununla birlikte, kuluçkanın 15.gününde, 500 ve 1000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupların (deney-2 ve deney-3) alyuvarlarında sıklıkla mitotik figüre rastlandı (Şekil 3.7). Kuluçkanın 18. Ve 21. Günlerinde deney gruplarının kan örneklerinden

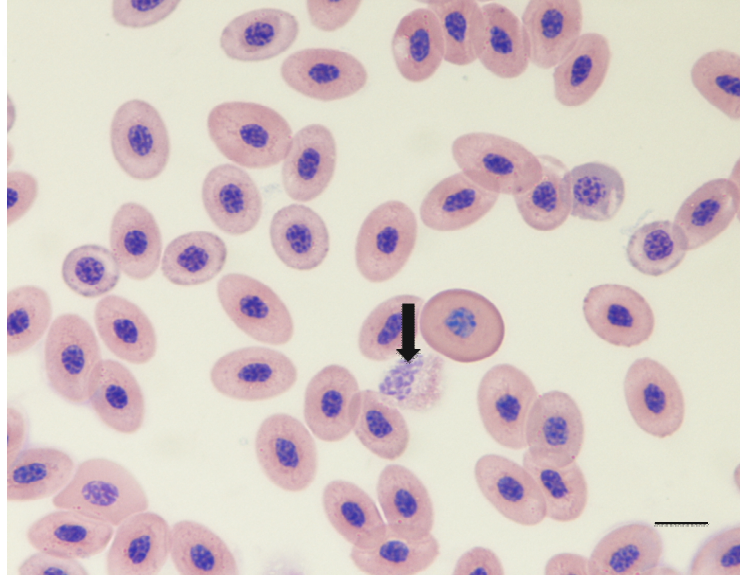
elde edilen morfolojik bulgular, aynı dönemlerdeki kontrol gruplarının bulgularına benzerdi.



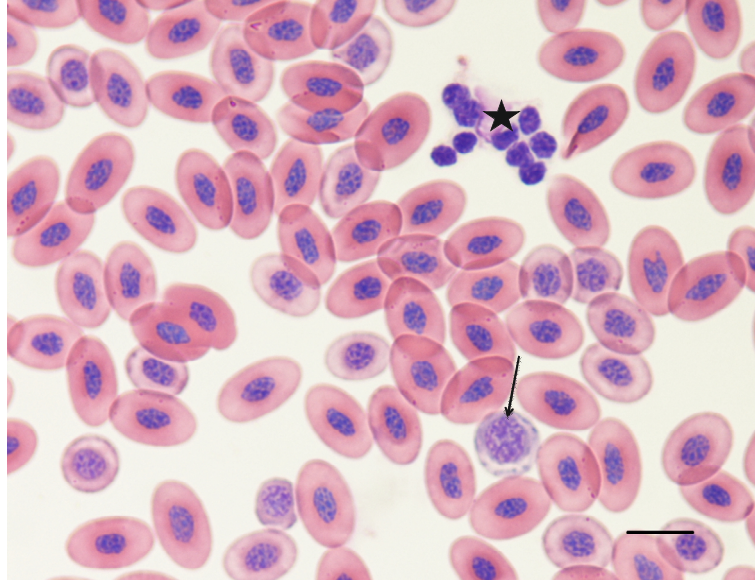
Şekil 3.2. Kuluçkanın 11. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, bir adet lenfosit morfolojisine sahip hücre (ok) dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 μ m.



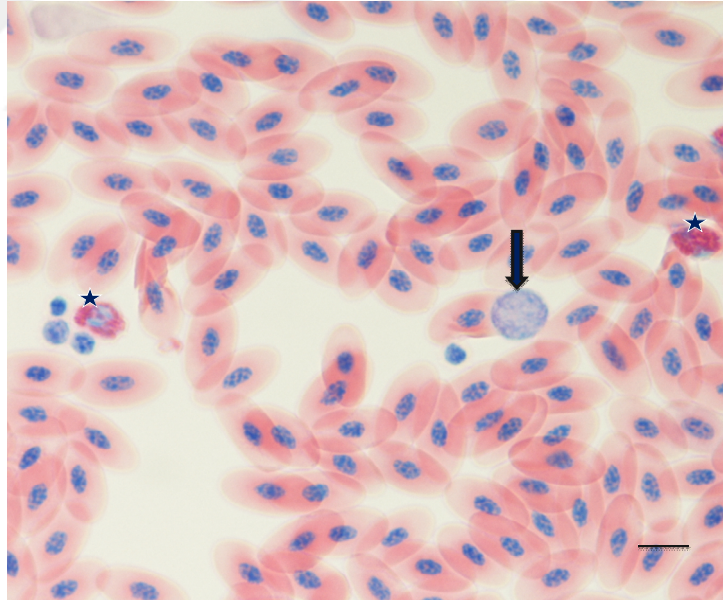
Şekil 3.3. Kuluçkanın 11. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, bir adet iri, bazofilik hücre(ok) dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.



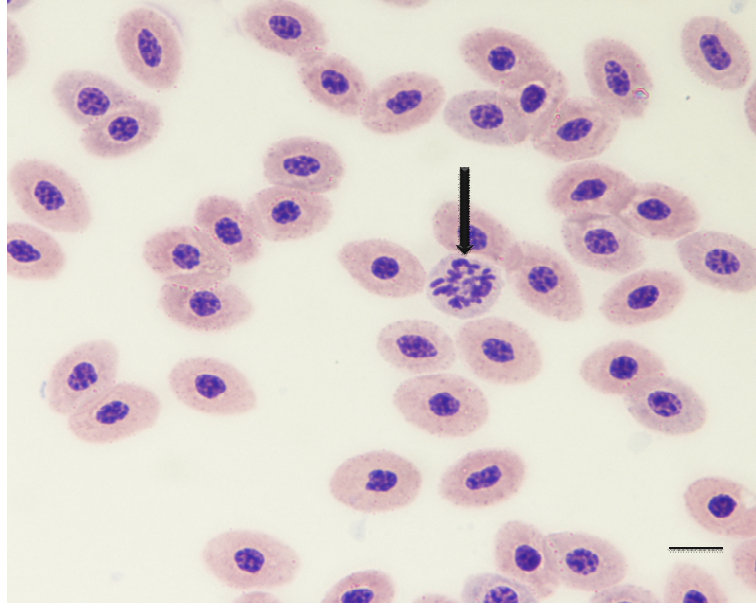
Şekil 3.4. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-2 grubundan bir hayvanın kan frotisinde bir monosit (ok) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.5. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın kan frotisinde bir lenfosit (ok) ve trombosit kümesi görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 μ m.

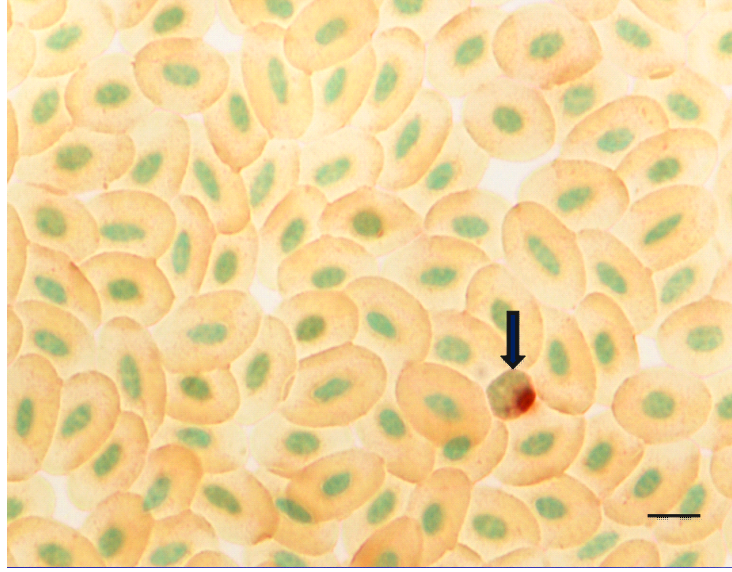


Şekil 3.6. Kuluçkanın 18. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. Baskın hücre tipi eritrositler olup, lenfosit (ok) ve granüositler de (yıldızlar) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 μ m.

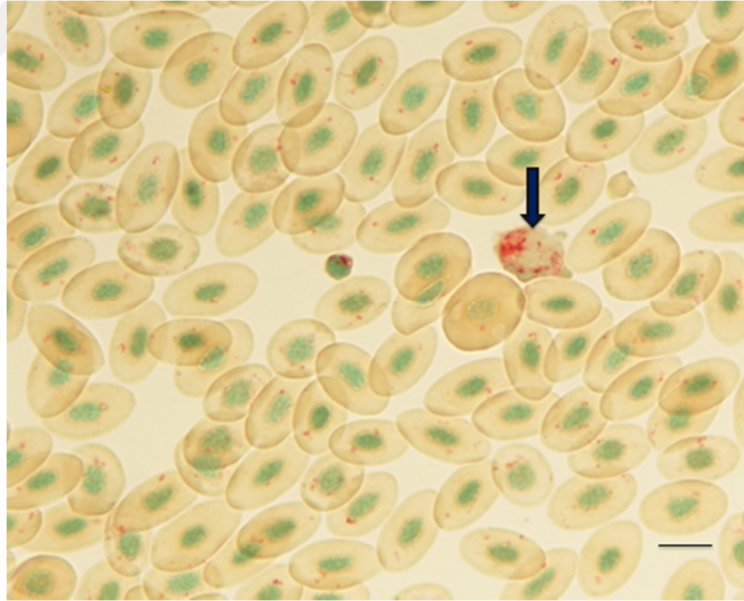


Şekil 3.7. Kuluçkanın 15. gününde deney-2 grubundan (500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grup) bir hayvanın kan frotisinde bir eritrositte mitotik figür (ok) dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 10 µm.

Kan örnekleri üzerinde yapılan enzim histokimyasal incelemelerde, ANAE ve ACPaz- pozitif enfositlere kuluçkanın 11. gününde rastlanmadı. Bu hücrelere kuluçkanın 15. gününden itibaren alınan kan örneklerinde rastlandı (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Kuluçkanın 15. gününde, kontrol grubundan (k-1) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. ANAE-pozitif lenfosit (ok) dikkati çekmektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 μ m.



Şekil 3.9. Kuluçkanın 15. gününde, kontrol grubundan (k-2) bir hayvanın kan frotisi görülmektedir. ACPaz-pozitif lenfosit (ok) dikkati çekmektedir. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 μ m.

Kuluçkanın 11. Gününde, tipik lökosit tipleriyle ANAE ve ACPaz-pozitif lenfositler gözlenmediğinden, oranları belirlenemedi. Kuluçkanın 15. günündeki kan

hücreleri oranları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Monosit ve eozinofiller dışında, deney ve kontrol gruplarının diğer hücre tiplerinin ortalama değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı ($P>0.05$). Bununla birlikte, deney gruplarının lenfosit ve heterofil oranları kontrol gruplarındakinden daha düşüktü. Deney-3 grubunun ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranlarının diğer gruplardan önemli derecede ($P<0,05$) düşük olduğu dikkati çekti (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kontrol ve deney gruplarının, kuluçkanın 15.günüdeki perifer kan lökosit oranlarıyla ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları (%).

Gruplar	Lenfosit	Pseudo Eozinofil	Monosit	Eozinofil	Bazofil	ACPaz+ lenfosit	ANAE+ lenfosit
N=8	X±SS	X±S	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol-1	36,68±3,4 ^a	58,86±6,3 ^a	0,00±0,0 ^c	0,80±0,4 ^b	3,66±1,4 ^a	40.52±2.1 ^a	5.02±0.9 ^a
Kontrol-2	36,48±2,7 ^a	59,36±2,7 ^a	0,00±0,0 ^c	2,00±0,4 ^a	2,16±0,5 ^a	39.38±1.6 ^a	5.06±0.4 ^a
Deney-1	35,64±3,1 ^a	58,08±4,5 ^a	1,20±0,6 ^b	2,38±0,7 ^a	2,79±0,7 ^a	37.12±2.1 ^a	4.98±0.8 ^a
Deney- 2	33,50±2,0 ^a	58,50±2,8 ^a	2,00±0,1 ^a	2,80±0,5 ^a	3,20±0,9 ^a	35.25±1.7 ^a	4.83±0.3 ^a
Deney-3	30,08±2,2 ^a	65,18±5,6 ^a	0,00±0,0 ^c	2,24±0,8 ^a	2,50±0,5 ^a	30.54±1.2 ^b	3.22±0.2 ^b

^{a-c} Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

Kuluçkanın 18. günündeki kan hücreleri oranları Çizelge 3.3’te verilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının monositler dışındaki lökosit tiplerinin ortalama değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Deney-2 ve deney-3 gruplarının kan monosit oranları diğer gruplarındakinden önemli derecede ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur. Bu dönemde deney-3 grubunun ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları diğer gruplardan önemli derecede ($P<0,05$) düşük bulunmuştur (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Kontrol ve deney gruplarının, kuluçkanın 18. günündeki perifer kan lökosit oranlarıyla ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları (%).

Gruplar	Lenfosit	Pseudo Eozinofil	Monosit	Eozinofil	Bazofil	ACPaz+ lenfosit	ANAE+ lenfosit
N=8	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol-1	38,68±3,5 ^a	55,28±3,3 ^a	1,14±0,5 ^b	2,56±0,7 ^a	2,34±1,0 ^a	22.05±1.6 ^a	6.01±0.9 ^a
Kontrol-2	39,48±2,5 ^a	56,36±2,7 ^a	0,60±0,6 ^b	1,40±0,7 ^a	2,61±1,9 ^a	23.21±1.8 ^a	5.98±0.7 ^a
Deney-1	37,64±3,2 ^a	56,10±4,5 ^a	1,20±0,2 ^b	2,96±1,4 ^a	2,10±0,9 ^a	21.98±1.1 ^a	4.65±0.9 ^a
Deney-2	36,23±2,2 ^a	56,50±2,8 ^a	2,35±0,3 ^a	2,44±1,1 ^a	2,48±1,3 ^a	20.19±1.7 ^a	4.44±0.9 ^a
Deney-3	36,08±2,4 ^a	56,65±5,6 ^a	2,51±0,2 ^a	1,58±0,8 ^a	3,18±1,4 ^a	16.43±0.9 ^b	3.12±0.3 ^b

^{a,b} Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Kuluçkanın 21. günündeki kan hücreleri oranları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Deney-2 ve deney-3 grubunun kan lenfosit oranları diğer gruplarından önemli derecede (P<0,05) düşüktür. Deney-2 grubu en yüksek monosit oranına sahip olup, bu değer diğer gruplarından önemli derecede (P<0,05) daha yüksekken, diğer deney gruplarının ortalama değerleri arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05). Deney-3 grubunun monosit oranı diğer gruplarından önemli derecede (P<0,05) yüksek bulunmuştur. Bu dönemde deney-2 ve deney-3 gruplarının ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları, deney gruplarından önemli derecede (P<0,05) düşük bulunmuştur (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Kontrol ve deney gruplarının, kuluçkanın 21.günündeki perifer kan lökosit oranlarıyla ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları (%).

Gruplar	Lenfosit	Pseudo Eozinofil	Monosit	Eozinofil	Bazofil	ACPaz+ lenfosit	ANAE+ lenfosit
N=8	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS
Kontrol-1	42,80±3,7 ^a	55,14±5,7 ^a	0,20±0,2 ^b	1,34±1,9 ^a	0,52±0,2 ^a	74,22±3,6 ^a	30,2±2,8 ^a
Kontrol-2	42,20±4,3 ^a	56,00±2,9 ^a	0,40±0,2 ^b	1,00±1,9 ^a	0,40±0,1 ^a	71,25±4,9 ^a	31,3±2,2 ^a
Deney-1	41,90±1,9 ^a	56,25±2,6 ^a	0,20±0,2 ^b	1,10±2,3 ^a	0,55±0,2 ^a	70,15±4,1 ^a	30,5±1,8 ^a
Deney-2	38,12±1,4 ^b	58,56±2,0 ^a	1,22±0,4 ^a	1,00±0,4 ^a	1,10±0,5 ^a	61,89±3,0 ^b	26,3±2,1 ^b
Deney-3	35,80±4,2 ^b	62,00±2,7 ^a	0,17±0,2 ^b	1,03±0,4 ^a	1,00±0,4 ^a	60,88±3,7 ^b	25,1±2,4 ^b

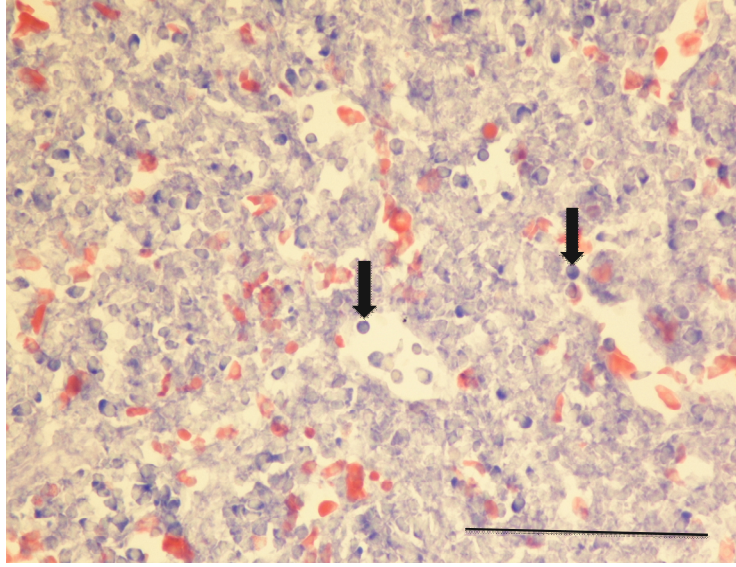
^{a,b} Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında Dalağın Embriyonik Gelişimi

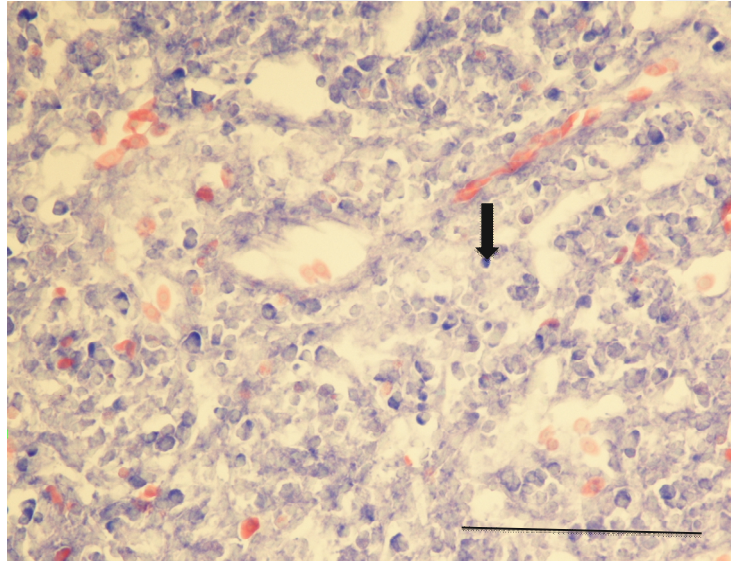
3.3.1. Kuluçkanın OnbirinciGünü

Kuluçkanın on birinci gününde; kontrol-1 ve kontrol-2 gruplarının dalak taslaklarında çok sayıda hemopoietik odağa ve çoğunlukla kan damarları lümenleriyle küçük çaplı arterterlerin tunika adventisya katmanlarına infiltre olmuş durumda lenfosit morfolojisine sahip olan hücreler gözlendi. Bu dönemde dalağa özgü, lenfoid doku henüz şekillenmemişti (Şekil 3.10) ve ANAE ve ACPaz pozitivitesi gösteren lenfositlere rastlanmadı.

Deney gruplarında ise dalak taslağının gelişimi kontrol gruplarındakine benzemekle birlikte, özellikle deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu dikkati çekti (Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Kuluçkanın 11. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak taslağı kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfosit morfolojisine sahip hücreler (oklar) damar lümenlerinde görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

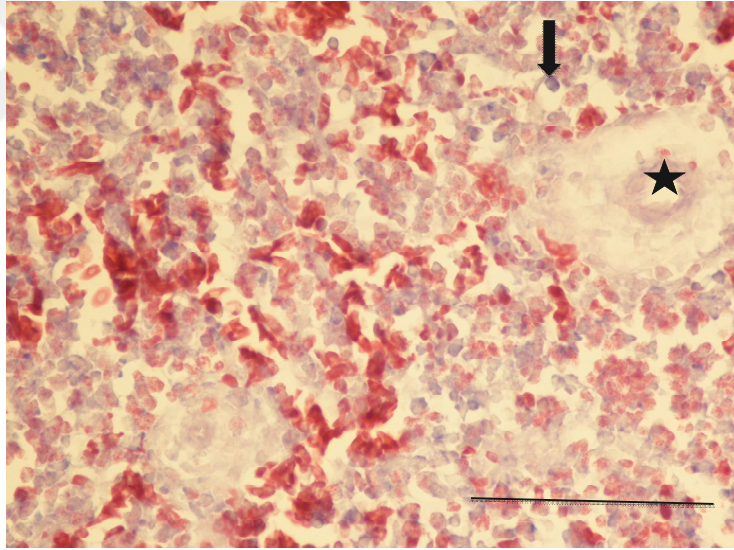


Şekil 3.11. Kuluçkanın 11. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak taslağı kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfosit morfolojisine sahip bir hücre (ok) görülmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

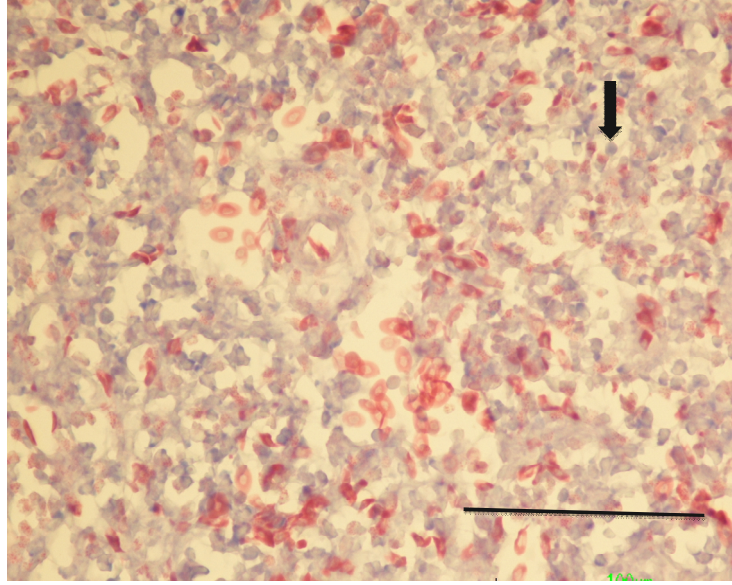
3.3.2. Kuluçkanın Onbeşinci Günü

Bu dönemde, dalağın histolojik organizasyonundaki ilerlemeye paralel olarak kontrol-1 ve kontrol-2 gruplarında lenfoid doku gelişiminin biraz daha ileri aşamada olduğu dikkati çekti. Periarterioller lenfatik kılıflar (PALS) şekillenme aşamasında olup, buralarda az sayıda ANAE-pozitif lenfositte rastlandı (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Bu dönemde, dalak taslağında gelişmekte olan venöz sinüsler yanında, az sayıda ANAE ve ACPaz pozitivitesine sahip lenfositte rastlandı.

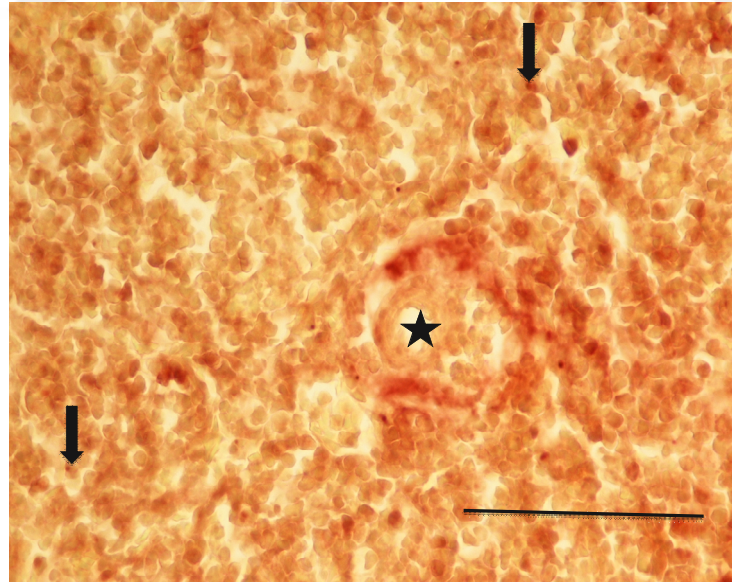
Deney gruplarının dalak taslaklarındaysa, embriyonik gelişimin kontrol gruplarındakine büyük oranda benzemekle birlikte, deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu dikkati çekti (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).



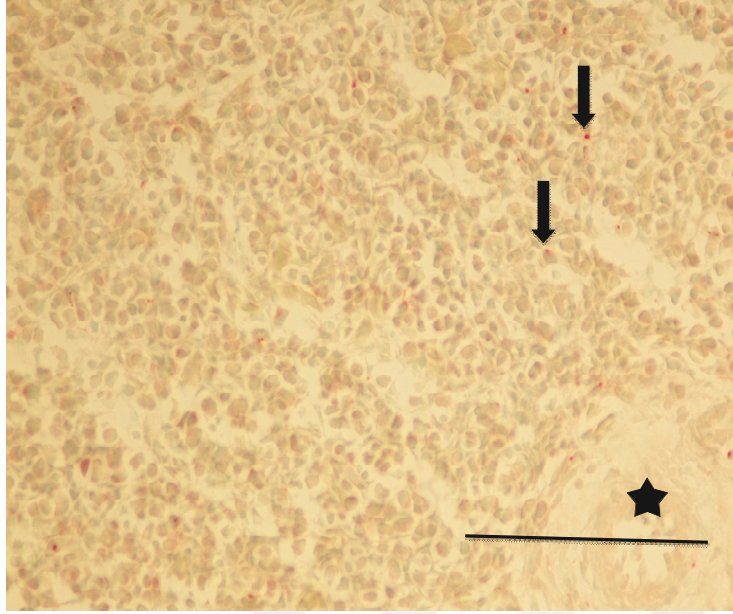
Şekil 3.12. Kuluçkanın 15. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında lenfositmorfolojisine sahip bir hücre (ok) ve arter kesiti (yıldız) görülmektedir. Arterin tunika adventisiasında az sayıda lenfoid hücre bulunmaktadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.13. Kuluçkanın 15. gününde deney-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında morfolojisine sahip bir hücre (ok) lenfoid hücre az sayıda olup, damar lümenlerinde daha az sayıda hücre bulunmaktadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 μ m.



Şekil 3.14. Kuluçkanın 15. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında ANAE-pozitif lenfositler (oklar) ve bir arter kesiti (yıldız) görülmektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

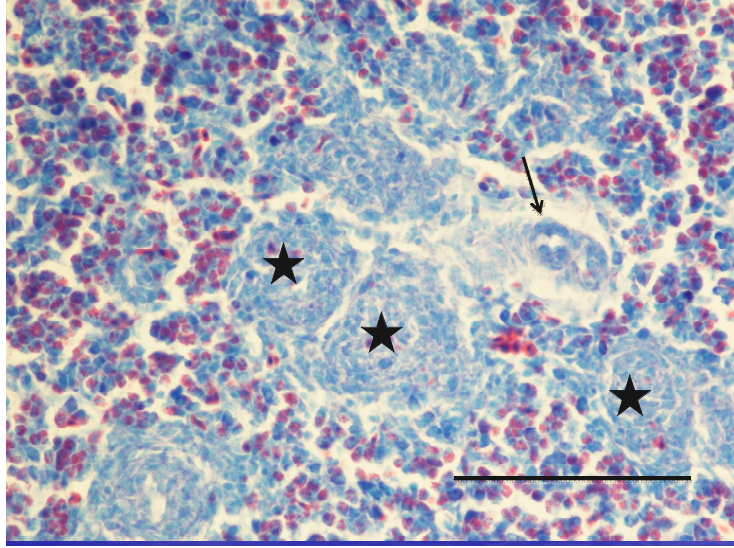


Şekil 3.15. Kuluçkanın 15. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden organ taslağında ACPaz-pozitif lenfositler (oklar) ve bir arter kesiti (yıldız) görülmektedir. Arterin tunika adventisyasında lenfoid hücre az sayıdadır. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

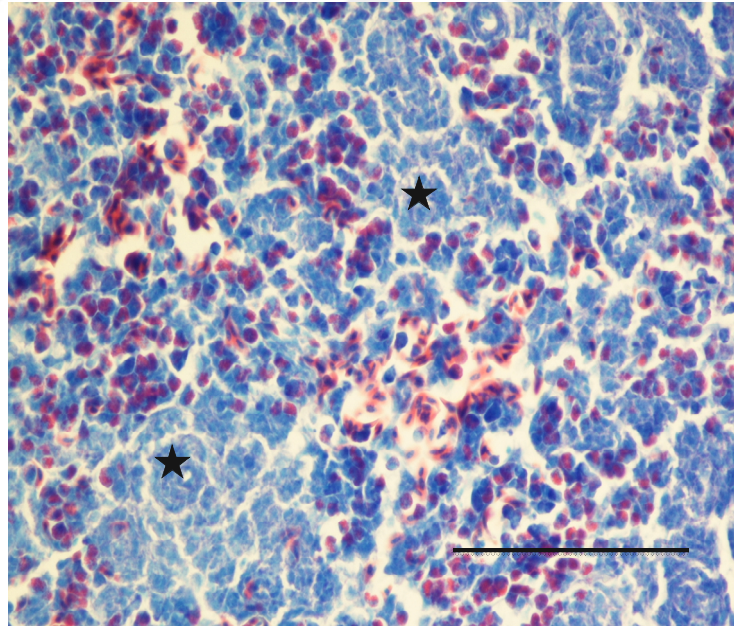
3.3.3. Kuluçkanın Onsekizinci Günü

Kuluçkanın 18. gününde, kontrol grubu dalak kesitlerinde çok yoğun eritropoietik odaklar yanında lenfoid doku gelişiminin oldukça ilerlemiş olduğu dikkati çekti. PALS'lardaki ANAE-pozitif hücrlerin sayısının önemli oranda artmış olduğu, lenfatik kordonların kalınlaştığı, lenf foliküllerinin histolojik organizasyonunun ilerlemiş olduğu gözlemlendi (Şekil 3.16).

Deney gruplarının dalak taslaklarında, embriyonik gelişimin kontrol gruplarındakine büyük oranda benzemektedir. Deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu dikkati çekti (Şekil 3.17).



Şekil 3.16. Kuluçkanın 18. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Lenf foliküllerinin (yıldızlar) gelişmesi önceki dönemden daha ileri aşamada değildir. PALS'ta (ok) lenfoid hücre az sayıdadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

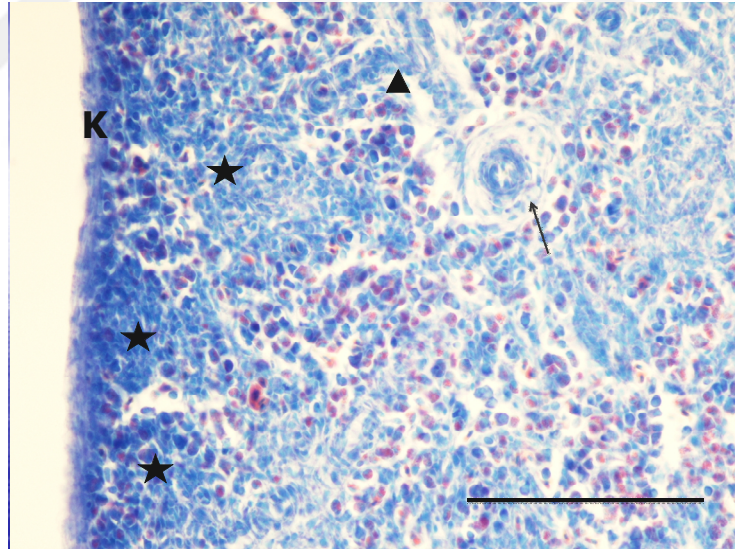


Şekil 3.17. Kuluçkanın 18. gününde deney-3 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Histolojik organizasyonu devam eden dalak taslağında devam eden lenf folikülü (yıldızlar) gelişiminin kontrol grubuna göre daha geride olduğu dikkati çekmektedir. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 μ m.

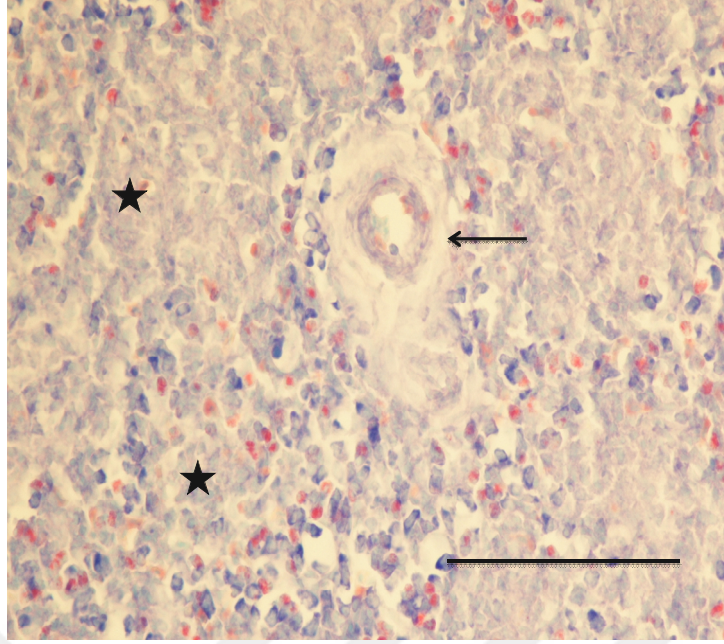
3.3.4. Kuluçkanın Yirmibirinci Günü

Kuluçkanın yirmibirinci gününde, kontrol gruplarında dalağın histolojik organizasyonu hemen hemen tamamlanmış durumdaydı. Bu dönemde lenfoid dokunun, lenf folikülleri ile lenfatik kordonlardan oluştuğu ve foliküllerin merkezi bölgelerinin biraz daha soluk boyandıkları tespit edildi (Şekil 3.18). ANAE pozitivitesine sahip lenfositler çoğunlukla arteriya sentralisler etrafında, ACPaz-pozitif lenfositler ise özellikle foliküllerin merkezi bölgelerinde lokalize olmaktadır.

Bu dönemde deney gruplarının dalak kesitlerinde yapılan incelemede, dalağın histolojik yapısının kontrol gruplarınıninkine büyük oranda benzemekle birlikte, deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu (Şekil 3.19) dikkati çekti. ANAE ve ACPaz-pozitif lenfositler daha az sayıdaydı.



Şekil 3.18. Kuluçkanın 21. gününde kontrol-1 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Kapsül (K) organı sarmakta ve lenfoid doku damarları saran lenfatik kordon (ok başı) ile merkezi bölgeleri nispeten hücreden fakir olsa da germinal merkezleri belirgin olmayan lenf foliküllerinden (yıldızlar) oluşmaktadır. PALS'ta (ok) lenfoid hücre az sayıdadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.19. Kuluçkanın 21. gününde deney-2 grubundan bir hayvanın dalak kesiti görülmektedir. Sayıca az olan ve hücreden fakir olduğu için soluk boyanmış olan küçük lenf folikülleri (yıldızlar) görülmektedir. PALS'ta (ok) lenfoid hücre az sayıdadır. May Grünwald-Giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.

4. TARTIŞMA

Gıda maddelerinin üretiminde kullanılan gıda boyaları, gıda tüketimini arttırdığından gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan gıda boyalarından biri Sunset Yellowdur (E110). Bu boya süt ürünleri, hazır gıdalar, reçel ve kuru içecek tozlarına ek olarak; sulu ilaç çözeltileri, tablet, kapsül, diş macunları gargaralar, saç bakım ürünleri ve kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır (Helal ve Abdel-Rahman 2005).

Gıda boyaları ve gıda koruyucularının zararlı etkileri üzerinde yapılan araştırmalar genellikle gıdalardaki miktarlarının tayini, klinik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalardır. Söz konusu çalışma sonuçları; gıda ve ilaçlarda yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinin, insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olduğunu veya bu rahatsızlıkları arttırdığını ortaya koymaktadır. Gıda boyalarının, bağışıklık sisteminin embriyolojik gelişmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin belirlenmesine yönelik deneysel çalışma bulunmamaktadır. Sunulan bu deneysel çalışmada, kuluçka başlangıcında dömlü tavuk yumurtasının hava kamarasına 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1000 ng/yumurta dozlarında enjekte edilen Sunset Yellow FCF (E110)'un, dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Değerlendirmede organın embriyonik gelişimi deney ve kontrol gruplarında belirlenerek, gruplar arasındaki morfolojik farklar belirlenmiş ve aynı zamanda kanatlı T lenfositlerine özgü ANAE enzimiyle, B lenfositlerine özgü ACPaz enzimleri demonstre edilerek, bu hücrelerin timus, perifer kanda ortaya çıkış dönemleri yanında dalaktaki lokalizasyonları embriyonik dönem boyunca belirlenmiştir.

Ülkemizde gıdalara katılacak boyaları düzenleyen Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (Anonim 2011) hangi boyaların hangi ürünlere ne düzeyde katılacağı üzerinde de öneriler getirmektedir. Ülkemizde farklı 27 alkolsüz içecek ve içecek tozu örneğinde yapılan taramada, 12 örnekte 4,18-18,07 ppm arasında Sunset Yellow tespit edilmiştir. Bu boyanın Avrupa Birliği yönetmeliğine göre 70 kg'lık yetişkin için ADI değeri 2,5 mg/kg/gündür (EFSA 2009). Araştırma sonuçlarına göre izin verilen renklendiriciler arasında ikinci sırada en fazla kullanılan suda çözünen sentetik boyanın Sunset Yellow (E110) olduğu tespit edilmiştir. Alkolsüz aromalı içeceklerin, yenilebilir buzların ve şekerlemelerin paketleri incelendiğinde etiket

bilgilerinde kullanılan renklendiricilerin miktarları bulunmamaktadır. Ayrıca bazı numunelerde etikette beyan edilmeyen renklendiriciler tespit edilmiştir. Özellikle çocukların sıklıkla tükettiği bu ürünlerin etiket bilgilerinde kullanılan sentetik renklendiricinin belirtilmesi gerekmektedir (Dinç ve Arıcı 2008).

Avrupa ülkelerinin çocukları (1-10 yaşlar) için, gıdayla alınan Sunset Yellow FCF (E110) seviyesi 0,3 -2,5 mg/kg vücut ağırlığı/gün ve 0,7- 6,7 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmıştır. İngiliz erişkinleri için alkolsüz içeceklerle alınan değer 0,5-1,1 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler genel olarak geçici ADI değeri olan 1 mg/kg/vücut ağırlığı/gün seviyesinden daha düşüktür. Bununla birlikte, yüksek seviyelere maruz kalan çocukların değerleri (0,2 - 2,1 ve 0,6-5,8 mg/kg vücut ağırlığı/gün) geçici ADI seviyesinin üzerinde veya onun üst sınırındadır. Sunset Yellow FCF (E110) için üst seviye sınırlarının belirlenmesinde, boyada kanun dışı olarak bulunan ve istenmeyen Orange II ve Sudan I gibi sülfonatlı boyalarla, temel renksiz maddeler olan sodyum klorür ve sodyum sülfat düzeylerinin de dikkate alınması gereklidir (EFSA 2009).

Avrupa Birliği ülkeleri İçecek Birliğinin (UNESDA) 2005 yılında yaptığı bir taramada, içeceklerdeki mevcut en yüksek Sunset Yellow FCF (E110) düzeyinin 50 mg/L olduğu bildirilmiştir.

Daha yakın bir zamanda UNESDA tarafından hazırlanan bir raporda kullanım düzeyleri 1- 48 mg/L olarak bildirilmektedir. Benzer seviyeler Avrupa Birliği Gıda ve İçecek Endüstrileri Konfederasyonu (CIAA) tarafından da açıklanmıştır. Avrupa Gıda Katkıları Federasyonu ve bazı diğer Avrupalı kuruluşlar gıdalardaki tipik Sunset Yellow FCF (E110) seviyelerini 4-50 mg/L arasında bildirmektedir.

Sunset Yellow FCF (E110)'nin bir karışımı olan Yumurta Sarısı'nın akut in vivo histolojik etkilerini rat dokularında araştırmıştır. Ağız yoluyla (5 ml suda eritilerek) 3 gün süreyle 500,1.000 veya 2.000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda boya verilen gruplardan 2.000 mg/kg vücut ağırlığı/gün doz grubunda mide antrumunda ülseratif lezyonlar ve kanamalar meydana gelmiştir. Çıplak gözle yapılan incelemede, 1.000 ve 2.000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda boya verilen hayvanlarda orta derecede splenomegali, hepatomegali, ve irileşmiş solgun böbrekler tespit edilmiştir. Mikroskopik incelemede, karaciğer, böbrek, dalak, mide ve ileumda

dozla ilişkili dejeneratif, ve karaciğerde nekrozu da kapsayan proliferatif lezyonlar gelişmiştir. Nekroz, dalakta, böbreklerde glomerulus ve papilla renaliste belirgindir. Yukarıdaki bulgulara rağmen, çalışmada saf Sunset Yellow FCF (E110) yerine karışım kullanıldığından, sonuçların direk olarak Sunset Yellow FCF (E110)'nin etkisine bağlanamayacağına dikkat çekilmiştir (Ching ve ark 2005, EFSA 2009).

Sunset Yellow FCF (E110)'nin kısa dönem toksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla domuzlarda yapılan bir başka çalışmada, her iki cinsiyetten eşit sayıdaki 6'şar hayvandan oluşan gruplara, 0, 250, 500 ve 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün oranındaki Sunset Yellow FCF (E110) 98 gün yedirilmiştir. Canlı ağırlık kazancı, hematolojik veriler, idrar yapma, organ ağırlıkları ile transaminazlar ve serum üre düzeyleriyle dokuların mikroskopik yapısında önemli değişiklik gözlenmemiştir. Yukarıdaki ve diğer bazı deneysel çalışma sonuçlarını dikkate alan SCF, kısa dönem test sonuçlarının, Sunset Yellow FCF'nin (E110) belirgin toksik etkilerinin olmadığını gösterdiğini belirtmiştir. Bununla birlikte, bir uzun dönem çalışmasında Sunset Yellow FCF (E110)'nin testisler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Gruplara 0 (kontrol), gıdanın % 0,5'i (250 mg/kg vücut ağırlığı/gün), % 3'ü (1500 mg/kg vücut ağırlığı/gün) oranında Sunset Yellow FCF (E110)'yi 90 gün yedirmişlerdir. % 0,5 doz grubunda bazı tubulus seminiferus kontortuslarda dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Birçok tubulusta spermatogonyumlarda distorsiyon ve maturasyonun durması en önemli bulgulardır. Olgun spermatozoon bulunmamakla birlikte, Leydig ve Sertoli hücreleri normaldir. %3'lük grupta dejeneratif değişiklikler artmıştır. Birçok tubulusu içine alan düzensiz nekroze alanlar gözlenmekte, etkilenen tubuluslarda spermatojenik hücreler dökülmüş durumdadır. Arada normal yapıdaki tubuluslar da gözlenmektedir. Testisteki tubulusların hemen hemen %50'sinde toksisite belirtileri görülmektedir. Her iki doz seviyesinde de serum alkalın fosfataz ve kolesterol seviyeleri önemli derecede artmış, serum protein düzey önemli derecede düşmüştür. Bu nedenle SCF, uzun dönem etkileri göz önüne alarak 250 mg/kg vücut ağırlığı/gün seviyesini En düşük Zararlı Etki Gözlenen Seviye (LOAEL) olarak belirlemiştir. Farelere, F0 jenerasyonunda 5 haftalıktan F1 jenerasyonunda dokuzuncu haftaya kadar gıdanın %0,15, %0,30 ve %0,60'ı olacak şekilde Sunset Yellow FCF (E110) verilen bir çalışmada yavru büyüklüğü, ağırlığı ve cinsiyet oranı üzerinde zayıf olumsuz etkiler tespit edilmiştir. Süt emme döneminde, her iki cinsiyetten yavruların ortalama vücut ağırlığı düşük ve orta doz

seviyelerinde önemli derecede artmıştır. Sinirsel davranışsal verilerden yüzme yönü erken emme döneminde her iki cinsiyette doz-bağımlı biçimde önemli derecede etkilenmiştir (Gaunt ve ark 1969, Tanaka 1996, Mathur ve ark 2005a).

Sunset Yellow FCF (E110)'nin genotoksitesisi üzerinde JECFA tarafından yapılan değerlendirmelerde 0,5 g Sunset Yellow FCF (E110)/100 mL'nin *Escherichia coli* üzerinde genotoksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. *Salmonella typhimurium* üzerinde demetabolik aktivasyon olsun veya olmasın genotoksik etkisi bulunmamıştır. Yapılan Ames testi'nde, 4 adet *Salmonella typhimurium* suşu üzerinde revers mutasyonlar gözlenmemiştir, *Saccharomyces cerevisiae* mitotik gen konversiyonunda artış saptanmamıştır. Bununla birlikte, standart Ames testinin bu boyanın genotoksitesinin belirlenmesinde kullanımının uygun olmadığına da dikkat çekilmiştir. TemaNord değerlendirme sistemine göre, yapılan çalışma sonuçları Sunset Yellow FCF (E110)'nin genotoksik etkilerinin olduğunu göstermemektedir. İn vivo kemik iliği mikronükleus testi sonuçlarına göre, ağız yoluyla verilen tek doz 2000 mg/kg vücut ağırlığı dozundaki Sunset Yellow FCF (E110) fare ve sıçanlarda mikronükleus sıklığını artırmamaktadır. Bu boyanın yüksek dozlarda alındığında kromozomal hasara yol açtığını gösteren çalışma sonuçları da vardır. Nitekim ağız yoluyla farelere 0,17 veya 1,7 mg/kg vücut ağırlığı dozunda verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) kromozomal hasara uğrayan hücre sayısını artırdığı gösterilmiştir. Farede *in vivo* Comet assay testiyle 2000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulanan Sunset Yellow FCF (E110)'nin, uygulamadan 3 saat ve 24 saat sonra DNA hasarına yol açtığını gözlemişlerdir. İnceleme sonuçlarına dayanılarak, Sunset Yellow FCF (E110)'nin 2000 mg/kg vücut ağırlığına kadarki akut oral dozunun genototoksik olmadığı sonucuna varılmıştır (Garner ve Nutman 1977, Viola M 1978, Sankaranarayanan ve Murthy 1979, Yoshimoto M 1984, Tennant ve ark 1986, Ashby ve Tennant 1988, McGregor ve ark 1988, Benigni 1989, Izbirak ve ark 1990, Westmoreland ve Gatehouse 1991, Durnev ve ark 1995, Rafii ve ark 1997, Sasaki ve ark 2002, EFSA 2009).

Daha önce yapılan bir çalışmada, Brilliant Blue ve Sunset Yellow FCF'nin (E110) perifer kan lenfositlerinde mikronükleus, mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve Brilliant Blue ile Sunset Yellow FCF'nin (E110) mikronükleus sıklığını arttırırken, mitotik indeks ve replikasyon oranlarını azalttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, elde edilen sonuçlara dayanarak söz

konusu gıda boyalarının yüksek konsantrasyonlarda alındığında potansiyel genotoksik ve sitotoksik etki gösterebileceğine dikkat çekmişlerdir. Sunset Yellow FCF (E110)'nin sarımsak (*Allium sativum*) kök ucu hücrelerinde mitoz üzerinde etki gösterdiği bildirilmiştir. Etki, doz ve etkiye süresine bağlıdır. Kısa süreli etki mitotik indeksi yükseltirken, uzun süreli etki baskılamaktadır. Doz arttıkça mitotik indeks düşmektedir. Yüksek dozlara maruziyette mitozu baskılayan etkiye süresi kısalmaktadır. Gözlenen etkinin muhtemelen DNA sentezinin baskılandığı G1 fazının blokajından veya hücrenin mitoz girişinin engellendiği G2 fazının bloke olmasından kaynaklanabileceği gibi S fazında DNA sentezinin bloke olmasından da kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. DNA sentezinin bloke olması ise muhtemelen ATP seviyesindeki düşüşten kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada, deney gruplarından alınan kan örnekleri üzerinde yapılan incelemelerde, kuluçkanın 15. gününde, 500 ve 1000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupların (deney-2 ve deney-3) alyuvarlarında sıklıkla mitotik figüre rastlandı. Bu da söz konusu dozların, kuluçkanın 15. gününde embriyonik hücrelerin mitotik aktivitesi üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Van't Hof 1978, Rencuzogullari ve ark 2001, Sudhakar ve ark 2001, Bhattacharjee 2014, Kus ve Eroglu 2015).

İlaç ve diğer kimyasal maddeler yanında Sunset Yellow FCF'nin (E110) embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde dömlü tavuk yumurtası da tercih edilen test materyallerinden biridir. Dömlü tavuk yumurtasının kullanıldığı Tavuk Embriyotoksitesite Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak adlandırılan bir metot geliştirmiş ve bu metot daha sonra yapılan bir çok embriyotoksitesite ve teratojenite çalışmasında da uygulanmıştır. Kuluçkalık tavuk yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonuçları memelilere de uyarlanabilmektedir. Çünkü CHEST ile belirlenen toksik dozun sulandırma konsantrasyonunun 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen değer, gebe memelilerde annenin canlı ağırlığının kg'mı başına alınması gereken toksik doz olarak kabul edilmektedir. Test uygulanması kolay ve ucuz olup, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta; canlı organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalarla farklı ülkelerin hayvan hakları koruma kanunlarına da aykırı düşmemektedir. Bu belirtilen nedenlerle Tavuk

Yumurta Testi (Hen's Eggs Test-HET) olarak da adlandırılan bir test geliştirmişler. Söz konusu testle elde edilen sonuçların memelilerde yapılan toksisite sonuçları ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986, Veselý ve Veselá 1991, Çelik ve ark 2000, Berktaş 2014).

Bir maddenin embriyotoksitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda, test edilecek maddenin farklı dozları denenmelidir. Her solüsyon için en az 2 farklı doz uyguladıkları halde, Brown ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmektedirler. Jelinek ise etkili dozun belirlenmesinde etkisiz en yüksek doz ile etkili en düşük doz arasındaki dozların denenmesi gerektiğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada ise 100 ng, 500 ng, 1000 ng/yumurta olmak üzere 3 farklı Sunset Yellow FCF (E110) dozu kullanıldı. Sonuçların güvenilirliği açısından her doz grubu için kullanılan yumurta sayısı da oldukça önemlidir. Bazı araştırmacılar her grupta en az 20 yumurta kullanılması önerirken; bu çalışmada, her grupta 50 yumurta kullanılmıştır (Verret ve ark 1964, Jelinek 1977, Brown ve ark 1986, Kemper ve Luepke 1986, Prelusky ve ark 1987).

Dalağın periton örtüsü, embriyonik dönemde dorsal mezogastriyumdan köken alan dalak taslağının üzerindeki sölom epitelinden gelişmektedir. Organın stromasının oluşumuna katılan retikulum hücreleri ve düz kaslar bölge mezenkiminden gelişirken; paraneoplastik oluşturan lenfoid hücreler olan T ve B lenfositler merkezi lenfoid organlar olan timus ve bursa Fabricii'den kan yoluyla organ taslağına gelerek buradaki retikulum ipliklerine ve retikulum hücrelerinin oluşturduğu ağın gözeneklerine yerleşir. Arteria sentralis etrafında kümelenen bu hücreler lenf foliküllerini (Malpighi cisimcikleri) oluşturur. T- ve B-lenfositlerin dalak ve diğer perifer lenfoid organlara göçü karnivorlarda gebeliğin 40-48. günlerinde, atlarda ise 120. gününde başlamaktadır. Tavuk embriyosunda ise B-lenfositlerin bursa Fabricii'den dalağına göçleri kuluçkanın 14. gününde başladığı bildirilmişse de daha sonra kanatlılarda timusun embriyonik gelişimi üzerinde yapılan bir çalışmada organın medullasında tipik lenfosit morfolojisine sahip hücrelere kuluçkanın 10. gününde rastlandığı ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, olgun T lenfositlerine özgü bir enzim olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozitifitesinin timus medullasındaki lenfositlerde kuluçkanın 13.gününde ortaya çıktığı dikkate alınarak, timustan perifer lenfoid organlara T-lenfosit göçünün

kuluçkanın 10-14. günlerinde başladığı kabul edilmektedir (Latshaw 1987, Kocaöz ve ark 1997a, Sandıkçı ve Çelik 2000).

Tavukta dalağın normal embriyonik gelişimi üzerinde yapılan bir çalışmada dalak gelişimini 3 temel evrede incelemiştir. Birinci evre kuluçkanın 4-6. Günleri arası olup, 4. günde dalak taslağı dorsal pankreas yakınındaki dorsal mezenteryumda hafif bir şişkinlik halindedir. Kuluçkanın 5. Gününde dalak taslağı kubbe şeklini alır. Bu dönemde taslağı oluşturan hücrelerin hemen hemen tamamı mezenşimal hücrelerdir. Dalak gelişiminin 2. Evresi kuluçkanın 7-15 günleri arasını kapsamaktadır. İki-üç sıra mezenşimal hücreyle sarılı olan arteriya trabekülaris taslağı, kuluçkanın 7-8. günleri arasında ortaya çıkmakta, kuluçkanın 8-9. Günleri arasında mezenşimal hücreler arter duvarının tunika medyasını oluşturmaktadır. Damarın dış katmanı olan tunika eksterna (*T. adventisya*), kuluçkanın 9-10. günlerinde şekillenmektedir. Büyük arterler etrafındaki trabeküler doku (lenfoid hücre topluluğu) kuluçkanın 14-15. günlerinde şekillenmektedir. Dalağın büyük venalarının gelişimi arterlerle aynı zamanda gerçekleşmektedir. Bazofilik sitoplâzmalı, bir-iki nükleoluslu iri ve ökromatik çekirdekli hemositoblastlar dalak taslağında ilk kez kuluçkanın 7. gününde damarların lümeninde, 8. Günden itibaren de mezenşimde gözlenmektedir. Kuluçkanın 10. gününde dalaktaki kan damarlarının lümeni ve mezenşimindeki hemositoblastların sayısı artmakta; fakat 14. günden itibaren hemositoblast sayısı azalırken, granülositer seri hücreleri daha fazla sayıda görülmektedir. Tavuk dalağının embriyonik gelişiminin 3. evresi, kuluçkanın 16. günüyle çıkış günü arsındaki dönemde gerçekleşir. Kılıflı kapillerler (kabuklu arteriyol) kuluçkanın 16-17. Günlerinde ortay çıkmaktadır. Kuluçkanın 18. gününde bu kapillerler etrafında 1-2 retikulum hücresi katmanı bulunur. Kuluçkanın 20. gününde, dalağın büyük bölümü kılıflı kapiller ve bunların elips biçimli kılıflarıyla doldurulmuş durumdadır. İri, yuvarlak veya oval çekirdekli bir çekirdekle eozinofilik granüllü miyelositler ilk defa kuluçkanın 9.gününden itibaren dalağın stromasında görülmeye başlar. Granülositer seri hücrelerinin sayısı kuluçkanın 12-19. Günleri arasında hızla artar ve kuluçkanın 19. gününden sonra azalır. Küçük eritropoietik odaklar kuluçkanın 7, 10, 12 ve 14. günlerinde görülmektedir. Lenfoid hücreler kuluçkanın yaklaşık 15. gününde belirli bölgelerde kümeleşmeyip rastgele dağılmış durumdadır. Bengladeş'in yerel evcil tavuk ırkı (*Gallus domesticus*) üzerinde yapılan bir çalışmada, embriyonik dalakta kırmızı-beyaz pulpa ayrımının

kuluçkanın 14. gününde yapılamadığı ve aynı zamanda kapiller damarlarla paranşimin ışık mikroskopik ayrımının da zorlukla yapılabildiği bildirilmektedir. Kırmızı-beyaz pulpa ayrımı kuluçkanın 20. gününden sonra yapılabilmektedir. Lenfositlere kuluçkanın 14. gününden itibaren rastlandığı, 20. günde bu hücre sayılarının hızla arttığı bildirilmiştir (Ogata ve ark 1977, Islam ve ark 2012).

Kanatlı embriyonik gelişimi esnasında pre-timik ve pre-bursal kök hücreler timus ve bursa Fabricii taslaklarına embriyonik süreç içerisinde, belirli dönemlerde gerçekleşen göç dalgaları halinde gelmekte. Timusa gelenler T-lenfositlerine özgü, bursa Fabricii'ye gelenler ise B-lenfositlerine özgü enzimleri ve yüzey reseptörlerini kazanarak, T- ve B-lenfosit olma yönünde farklılaşmaktadırlar. Kök hücrelerin 3 ayrı göç dalgası halinde embriyonik dönemin 6,5-8, 12-14 ve 18. günlerinde kan yoluyla, dalgalar halinde göç ederek timus ve bursa Fabricii taslaklarına geldiklerini ileri sürmektedir. Embriyonik dönemin 12-13. günlerinden önce gerçekleşen göç dalgası ile timus ve bursa Fabricii'ye gelen kök hücreler, muhtemelen birbirine benzer özelliklere sahip hücrelerdir. Perifer kandaki lenfosit morfolojisine sahip olan ve ACPaz pozitifitesi gösteren hücrelere en yüksek oranda embriyonik dönemin 13. gününde rastlanmakta; ikinci ve üçüncü göç dalgalarının ortasına denk gelen dönem (15. gün) ile üçüncü göç dalgasının başladığı 18. günde ise bu hücrelerin sayılarında belirgin bir azalma meydana gelmektedir. Üçüncü göç dalgasının ardından, 21. günde ise ACPaz pozitif lenfosit oranı tekrar artmakta ve kuluçkadan çıkışı takip eden 4. hafta sonunda ise bu oran daha da yükselmektedir. Sonuç olarak, tavuklarda perifer kan lenfositlerinde ACPaz pozitifitesi ilk kez embriyonik dönemin 12. gününde ortaya çıkmaktadır (Glick 1988).

Amaranth, Sunset Yellow FCF (E110) ve Curcuminin immün sistem üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada her 3 boyanın da ADI değerinin 3 katının hücresel bağışıklığı baskıladığı, humoral bağışıklık üzerinde etkilerinin olmadığı ileri sürülmüştür. Diğer bir çalışmada, Sunset Yellow FCF'nin (E110), toksik olmayan dozda bile dalak hücrelerinin fonksiyonunu bozduğu ileri sürülmüştür. Tavuk embriyosu timus kesitleri üzerinde yaptığı ışık mikroskopik incelemelerde, kontrol grubundaki hayvanların timuslarındaki değişikliklerin, Sandıkçı ve Çelik (2000)'in bulgularıyla uyumlu ve normal bir seyir takip ettiğini gözlemiştir. Bursa Fabricii'deki değişiklikler ise, Kocaöz ve ark (1997a) ile Dönmez ve Çelik (1998)'in bulgularıyla uyumludur. Aynı çalışmada, Sunset Yellow FCF

(E110) verilen yumurtalardan çıkan civcivlerin merkezi lenfoid organları olan timus ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimlerinin baskılanmış olduğu tespit edilmiştir. Bursa Fabricii'nin incelenmesinde organa özgü lenf foliküllerinin, kontrol grubundaki hayvanlardakinden daha küçük ve daha az sayıda olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Sunset Yellow FCF (E110) verilen hayvanların immün sistemlerinde önemli yetmezliklerin meydana gelebileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, yumurtaya kuluçka başlangıcında verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Zira dalak, merkezi lenfoid organlar olan timus ve bursa Fabricii'de olgunlaşan T ve B-lenfositlerin, kendilerine özgü bölgelerde lokalize olarak fonksiyonlarını gerçekleştirdikleri en önemli sekonder lenfoid organdır. Primer lenfoid organların embriyonik gelişiminde ortaya çıkacak bir aksaklık, sekonder lenfoid organların gelişiminde de olumsuz sonuçlara yol açacaktır. Bu çalışmada deney gruplarında yapılan incelemelerde, dalak taslağının gelişimi kontrol gruplarındakine benzemekle birlikte, özellikle deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Kuluçkanın onbeşinci ve onsekizinci günlerinde, deney-2 ve deney-3 gruplarında lenfoid doku belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahiptir. Kuluçkanın yirmibirinci gününde, deney-2 ve deney-3 gruplarındaki lenfoid dokunun belirgin biçimde daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu, ANAE ve ACPaz-pozitif lenfositlerin daha az sayıda olduğu dikkati çekmektedir (Yadav ve ark 1982, Kocaöz ve ark 1997a, Dönmez ve Çelik 1998, Sandıkçı ve Çelik 2000, Hashem ve ark 2010, Berktaş 2014).

Sunset Yellow FCF'nin (E110) tavuk embriyolarında mast hücresi degranülasyonu üzerindeki etkisini, 2,5 mg/kg dozundaki boyanın kuluçkanın 15. gününde vitellüs kesesine enjekte ederek belirlemiştir. Bu amaçla, enjeksiyondan 6, 12 ve 24 saat sonra dermal ve mukozal mast hücrelerindeki degranülasyonu incelenmiştir. Dermal mast hücrelerinin kısmi degranülasyonu Sunset Yellow FCF (E110) enjeksiyonundan 12 saat sonra, mukozal mast hücrelerindeki ise 6 saat sonra gerçekleşmiştir. En fazla degranülasyon deride enjeksiyondan 24 saat sonra, bağırsakta ise 12 saat sonra gerçekleşmiştir. Bu çalışma, söz konusu gıda boyasının daha çok mast hücresi degranülasyonu üzerindeki etkisine yönelik olmakla birlikte; Sunset Yellow FCF'nin (E110) merkezi lenfoid organlar olan timus, bursa Fabricii

ve dalakta neden olduğu fonksiyonel ve yapısal bozukluklarda dikkate alındığında, alerjik rahatsızlıklara neden olabileceği ve diğer immün sistem yetmezliklerine de neden olabileceği görüşünü desteklemektedir (Güler ve Başımoğlu Koca 2013).

Bu çalışmada elde edilen kan lökosit oranları verileri; kuluçkanın 11. gününde 1.000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupta ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranlarında önemli düşüşe yol açtığını ortaya koymaktadır. Kuluçkanın 18. ve 21. Günlerindeyse, 500 ng/yumurta ve 1.000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupların kan ACPaz ve ANAE-pozitif lenfosit oranları diğer gruplardan daha düşüktür. Başka bir çalışmada bursa Fabricii'de tespit edilen embriyonik gelişme geriliğinin kandaki lenfosit morfolojisine sahip ACPaz pozitif hücre oranlarındaki düşüşlerle paralellik göstermesi, Sunset Yellow FCF'nin (E110) humoral immün sistemin gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkisinin morfolojik kanıtlardan biri kabul edilebilir. Çünkü ACPaz pozitif lenfositler çoğunlukla bursa Fabricii kökenli olup (B-lenfositleri); antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşürler. Başka bir çalışmada neo-natal dönemde bursektomize ettikleri civcivlerin dalaklarındaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerinde, ACPaz pozitif lenfosit yoğunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, kuluçkadan çıkıştan hemen sonra bursektomize edilen ya da anti-bursa serumu verilen civcivlerin hem perifer kanlarındaki ACPaz pozitif lenfosit oranları ve hem de koyun eritrositlerine karşı üretilen antikor seviyesi ile dalaktaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki ACPaz pozitif lenfosit yoğunluğunun önemli oranda azalmış olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada da 500 ng/yumurta ve 1.000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplardan (deney-2 ve deney-3 grupları) elde edilen civcivlerin dalak dokularındaki lenf foliküllerindeki germinal merkezlerin, kontrol gruplarındakilerden daha az gelişmiş oldukları dikkati çekti. Sonuç olarak bursa Fabricii'deki lenfosit yapımını (B-lenfosit olgunlaşmasını) baskılayan Yellow FCF (E110), bursa Fabricii'de gelişme geriliğine neden olması yanında, dalaktaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki ACPaz pozitif lenfositlerin yoğunluklarında da belirgin azalmalara neden olmaktadır. Bu bulgu, etkilenen civcivlerin antikor yanıtında düşüslere neden olabileceğini göstermekte ve söz konusu maddenin immün sistem üzerindeki muhtemel olumsuz etkilerinin mekanizmasının açıklanmasında önemli yapısal ve morfolojik bilgiler sağlamaktadır (Graczyk 1984, 1987, Slowik ve ark 1990, Jain 1993, Berktaş 2014).

Nitrat ve nitritler gıdalara bazı özel amaçlarla ilave edilmektedir. Nitritlerin farklı memeli türlerindeki karsinojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, üreme fonksiyonlarını bozucu gelişme geriliğine neden olması, methemoglobinemi ve belli savunma faktörleri üzerindeki olumsuz etkilerini kapsayan toksik etkilerinin mekanizması daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Kilgore ve Li 1980, Ismail ve ark 2003).

Sodyum nitrit ve sunset yellow FCF'nin (E110) birlikte alınmasının, böbrek fonksiyonlarında önemli değişiklikler; serum ürik asit, üre, kreatinin, seviyelerinde yükselme ve aynı zamanda idrarda da önemli artışa yol açmaktadır (Hassan 2007).

Sunset Yellow FCF (E110), dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan bir gıda boyasıdır. Gıda boyalarının dikkati çeken en önemli olumsuz etkileri arasında çocuklarda dikkat yetmezliği hiper aktivite bozukluğu, çocuklarda davranış bozuklukları, alerjik reaksiyonlar ve diğer yan etkiler sayılmaktadır. Sunset Yellow FCF (E110) bir azo boyası olduğundan, salisilatlara duyarlı bireylerde duyarlılık reaksiyonları gelişebilmektedir. Ek olarak, bu boya bir histamin serbestleştiricisidir ve astım semptomlarını güçlendirebilmekte, benzoatlarla birlikte alındığında çocuklarda hiperaktiviteyi tetikleyebilmektedir. Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında, dömlü tavuk yumurtasına hava kamarası yoluyla verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embiyosunda dalağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkisi ve kan lenfotlerinin enzimatik aktiviteleri üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında, dömlü tavuk yumurtasına hava kamarası yoluyla 500ng/yumurta ve 1.000 ng/yumurta dozlarında verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embiyosunda dalağın embriyonik gelişimini baskıladığı, ANAE ve ACPaz-pozitif lenfosit oranlarından önemli düşüşlere yol açtığı tespit edilmiş ve bu nedenle immün sistem fonksiyonlarında önemli bozukluklara neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, Sunset Yellow FCF'nin (E110) etki mekanizması hakkında bilgi elde edilmemiş olmakla ve test materyali yumurta olmakla birlikte, belirlenen etkilerin insanlarda da ortaya çıkması muhtemel olduğundan, özellikle hamile ve çocukların gıda boyaları içeren içecekleri çok fazla tüketmemeleri ve belirlenen doz sınırlarının sıklıkla aşılabilceği hatırd tutulmalıdır. Çocukların bu ürünleri tüketimi ebeveynler tarafından kontrol altında tutulmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Anonim, 2011. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi, Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği. Resmi Gazete, www.food-info.net, 2002, Erişim tarihi: 05.04.2011., Tebliği. No:2002/55.
- Ashby J, Tennant RW, 1988. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.*, 204 (1), 17-115.
- Baer RL, Leider M, Mayer RL, 1948. Possible eczematous cross-hypersensitivity between pphenylenediamine and azodyes certified for use in foods, drugs and cosmetics. *Proc. Soc. exp. Biol. (NY)*, 67, 489-94.
- Bär F, Griepentrog F, 1960. Die Allergenwirkung von Fremden Stoffen in den Lebensmitteln. *Med. U. Ernähr.*, 1, 99-104.
- Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L, 1980. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol*, 44, 577-82.
- Benigni R, 1989. Analysis of the National Toxicology Program data on in vitro genetic toxicity tests using multivariate statistical methods. *Mutagenesis*, 4, 412-9.
- Berktaş E, (2014). Sunset Yellow FCF'nin (E110), Tavukların Timus ve Bursa Fabriciisinin Embriyonik Gelişimi Üzerindeki Etkisi Üzerinde Histolojik ve Enzim Histokimyasal İncelemeler, Yüksek Lisans Tezi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2014.
- Bhattacharjee M, 2014. Evaluation of mitodepressive effect of sunset yellow using *Allium sativum* ASSAY. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3, 3, 1120-30.
- Bonin AM, Baker RSU, 1980. Mutagenicity testing of some approved food additives with Salmonella/microsome assay. *Food Technol.Aust*, 32, 608-11.
- Brown LP, Flint OP, Orton TC, Gibson GG, 1986. Chemical teratogenesis: testing methods and the role of metabolism. *Drug metabolism reviews*, 17, 221-60.
- Catowsky D, 1981. Leucocyte cytochemical and immunological techniques, In "Practical Haematology, p. 143-174.
- Ching FP, Akpan JO, Ekpo MD, Ekanem IA, 2005. Acute in vivo histological effect of food colourants on some rat tissues. *Glob. J. Pure Appl. Sci*, 11, 241-7.
- Culling CFA, Allison RT, Barr WT, 1985. *Cellular Pathology Technique*, Butterworths and Co Ltd, London, p.
- Çelik İ, Aştı RN, Boyraz MÜ, Ergene N, 1991. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *SÜ Tıp Fak Derg*, 7, 4, 497-503.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet O, Boydak M, Dönmez HH, Sur E, Nizamlioğlu F, 2000. Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Br Poult Sci.*, 41, 4, 401-9.
- DFG, 1957. Bad Godesberg, Federal Republic of Germany, Farbstoff Kommission Mitteilung 6, p.
- Dinç M, Arııcı M. Gıdalara Katılan Suda Çözünen Bazı Sentetik Boyaların Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.

- Dönmez HH, Çelik İ, 1998. Erken embriyonal dönemde yumurtaya verilen testosteron propiyonat'ın tavuk bursa Fabricii'si üzerindeki etkileri. *Vet Bil Derg*, 14, 1, 119-32.
- Durnev AD, Oreshchenko AV, Kulakova AV, Beresten NF, 1995. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Vopr. Med. Khim*, 41, 50-3.
- EFSA, 2009. Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E110) (E E110) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) 2, 3. European Food Safety Authority (EFSA). *Italy EFSA Journal* 7, 11, 1330-48.
- Ershoff BH, 1977. Effects of diet on growth and survival of rats fed toxic levels of Tartrazine (FD&C Yellow No. 5) and Sunset Yellow FCF (FD&C Yellow No. 6). *Journal of Nutrition* 107, 5, 822-8.
- FAO, 2001. Sunset Yellow.
- FDA, 1964. Summary of toxicity data on colours: FD and C Yellow No. 6. Unpublished report from the U.S. Food and Drug Administration.
- Garner RC, Nutman CA, 1977. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mut.Res*, 44, 9-19.
- Gaunt IF, Farmer M, Grasso P, Gangolli SD, 1967. Acute (rat and mouse) toxicity studies on Sunset Yellow FCF. *Food Cosmet. Toxicol*, 5, 747-54.
- Gaunt IF, Kiss IS, Grasso P, Gangolli SD, 1969. Short-term toxicity study on Sunset Yellow FCF in the miniature pig. *Food Cosmet. Toxicol*, 7, 9-16.
- Gaunt IF, Mason PL, Grasso P, Kiss IS, 1974. Long-term toxicity of Sunset Yellow FCF in mice. *Food Cosmet. Toxicol*, 12, 1-10.
- Glick B, 1988. Bursa of Fabricius: Development, growth, modulation, and endocrine function, *CRC Critic Rew Poult Biol*, 1, 2, 107-32.
- Graczyk S, 1984. The effect of a single dose of sheep's erythrocytes on the activity of acid phosphatase in lymphocytes of peripheral blood in bursectomized chickens. *Folia Histochem Cytobiol*, 22, 2, 85-9.
- Graczyk S, 1987. Cytochemical examination of peripheral blood lymphocytes in bursectomized chickens. *Folia Histochem Cytobiol*, 25, 1, 44-59.
- Graczyk S, 1994. The effect of anti-bursa serum (ABS) on the intensity of acid phosphatase reaction in bursa-dependent structures of the spleen and on the level of antibodies in the blood serum. *Arch Vet Pol*, 34, 1-2, 25-36.
- Güler T, Başimoğlu Koca Y, 2013. Sunset Yellow FCF (E110)' Nin Tavuk Embriyosu Deri Ve Barsak Mast Hücrelerinin Degranülasyonu Üzerindeki Etkileri. *Kafkas Uni. Vet. Fak. Derg.*, 19, 5, 851-6.
- Hamburger V, Hamilton H, 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J Morphol*, 88, 49-92.
- Hashem MM, Atta AH, Arbid MS, Nada SA, Asaad GF, 2010. Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1581-6.
- Hassan HA, 2007. The possible protective role of bees honey against hazard effects of some E-synthetic food additives on the kidney functions of male rats. *J. Egypt. Soc. Toxicol*, 36, 13-21.

- Haveland-Smith RB, Combes RD, 1980. Screening of food dyes for genotoxic activity. *Food Cosmet. Toxicol*, 18, 215-21.
- Helal EGE, Abdel-Rahman M, 2005. Interaction of sodium nitrate and sunset yellow and its effect on some biochemical parameters in young albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 19, 156-167.
- Honohan T, Enderlin FE, Ryerson BA, Parkinson TM, 1977. Intestinal absorption of polymeric derivatives of the food dyes sunset yellow and tartrazine in rats. *Xenobiotica*, 7, 765-74.
- IRDC, 1972a. . FD & C Yellow No. 6. Teratology study in rats. 004, p.
- Ishidate MJR, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A, 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Fd. Chem. Toxic*, 22, 623-36.
- Islam MN, Khan MZI, Jahan MR, Fujinaga R, Yanai A, Kokubu K, Shinoda K, 2012. Histomorphological Study on Prenatal Development of the Lymphoid Organs of Native Chickens of Bangladesh. *Pakistan Veterinary Journal*, 32, 2, 175-8.
- Ismail AM, Mostafa AM, Abd El-Rahman GB, 2003. Microscopic studies of the effects of some food additives on the kidney of albino rat. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 12, 12-27.
- Ivett JL, Brown BM, Rodgers C, Anderson BE, Resnick MA, Zeiger E, 1989. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. *Environ Mol Mutagen.*, 14, 3, 165-87.
- Izbirak A, Sumer S, Diril N, 1990. Mutagenicity testing of some azo dyes used as food additives. *Mikrobiyol. Bul*, 24, 48-56.
- Jain NC, 1993. The lymphocytes and plasma cells, In: *Essentials of Veterinary Hematology*, Lea&Febiger, Philadelphia, p. 278-294.
- Jelinek R, 1977. The chick embryotoxicity screening test (CHEST), In “*Methods in Prenatal Toxicology*, Georg Thieme, Stuttgart, p. 381-386.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z, 1985. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian J Exp Biol*, 23, 588-95.
- Kajikawa O, Koyama H, Yashikawa T, Tsubaki S, Saito H, 1983. Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 44, 8, 1549-52.
- Kaplow LS, Burstone MS, 1964. Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haemopoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques. *J Histochem Cytochem*, 12, 2, 805-11.
- Kelly DE, Wood RL, Enders AC, 1984. Lymphatic organs, In “*Bailey’s Textbook of Microscopic Anatomy*, London, p.
- Kemper FH, Luepke NP, 1986. Toxicity testing by the hen’s egg test (HET). *Fd Chem Toxic*, 24, 6-7, 647-8.
- Kilgore WW, Li MY, 1980. *Food Additives and Contaminations*, New York: Macmillian, p. 593–607.
- Knowles DM, Halper JP, 1980a. Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. *J Immunol*, 125, 6, 2823-5.



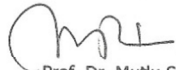
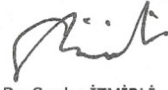
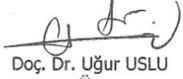

- Knowles DM, Holck S, 1978b. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase. *Lab Invest*, 39, 1, 70-6.
- Kocaöz N, Çelik İ, Ünsal S, 1997a. Tavuk bursa Fabricii'sinin embriyonal gelişmesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. *Vet Bil Derg*, 13, 1, 43-51.
- Kocaöz N, Çelik İ, Ünsal S, 1997b. Kuluçkadan çıkıştan sonra tavuk bursa Fabricii'sinde oluşan histolojik değişiklikler. *Vet Bil Derg*, 13, 1, 77-84.
- Konuk T, 1981. *Pratik Fizyoloji*, AÜ Basımevi, Ankara, p.
- Kumar G, Srivastava N, 2011. Genotoxic effects of two commonly used food additives of boric acid and sunset yellow in root meristems of *Trigonella foenum-graecum*. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng*, 8, 4, 361-6.
- Kus E, Eroglu HE, 2015. Genotoxic and cytotoxic effects of Sunset Yellow and Brilliant Blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pak J Pharm Sci*, 28, 1, 227-30.
- Latshaw WK, 1987. Mesenteries and compartmentalization, In "Veterinary Developmental Anatomy, Inc PO Box 30246, Philadelphia, Pennsylvania, p. 169-180.
- Li CY, Yam LT, Crosby WH, 1972. Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen. *J Histochem Cytochem*, 20, 12, 1049-58.
- Maiti NK, Saini SS, Sharma SN, 1990. Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Res Commun*, 14, 207-210.
- Manchon PH, Lowy R, 1964. Effet pseudovitaminique du jaune soleil sur la croissance du rat. *Food Cosmet. Toxicol.*, 2, 453-6.
- Mannell WA, Grice HC, Lu FC, Allmark MG, 1958. Chronic toxicity studies on food colours. Part IV – Observations on the toxicity of Sunset Yellow FCF, amaranth and Sunset Yellow in rats. *J. Pharm. Pharmacol*, 10, 625.
- Marmion DM, 1991. *Handbook of U.S. Colorants: Foods, Drugs, Cosmetics and Medical Devices*, John Wiley & Sons, Inc., New York, p.
- Mathur NRA, Chaudhary V, Mehta M, Gupta S, 2005b. Sunset Yellow induced changes in the lipid profile in male albino rat. *Biochem. Cell. Arch*, 5, 197-200.
- Mathur NRA, Chaudhary V, Mehta M, Krishnatrey R, 2005a. Effect of Sunset Yellow on testis in rats. *J. Ecophysiol. Occup. Health*, 5, 1-3.
- McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Caspary WJ, 1988. Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals *Environ. Mol. Mutagen.*, 12, 85-154.
- Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H, 1975. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol*, 5, 270-4.
- Ogata K, Sugimura M, Kudo N, 1977. Developmental studies on embryonic and posthatching spleens in chickens with special reference to development of white pulp. *Jap. J. Vet. Res.*, 25, 83-92.
- Osman MY, Sharaf IA, El-Rehim WM, El-Shharkawi AM, 2002. Synthetic organic hard capsule colouring agents: in vitro effect on human true and pseudo-cholinesterases. *British Journal of Biomedical Sciences*, 59, 212-7.

- Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL, Thompson BK, 1987. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *J Assoc off Chem*, 70, 6, 1049-55.
- Price PJ, Suk WA, Freeman AE, Lane WT, Peters RL, Vernon ML, Huebner RJ, 1978. In vitro and in vivo indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *Int. J. Cancer*, 21, 361-5.
- Pruthi AK, Gupta RKP, Sadana JR, 1987. Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens. *J Vet Med A*, 34, 390-2.
- Radomski JL, Mellinger TJ, 1962. Absorption, fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes, FD&C Red No. 2, FD&C Red No. 4, and FD&C Yellow No. 6. *J Pharmacol Exp Ther.*, 136, 259-66.
- Rafii F, Hall JD, Cerniglia CE, 1997. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 897-901.
- Ranki A, 1978. Non-specific esterase activity in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*, 10, 47-58.
- Rencuzogullari E, Kayraldiz A, Ila HB, Cakmak T, Topaktas M, 2001. The cytogenetic effects of sodiummetabisulphite, a food preservative inroot tip cells of *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology*, 25, 361-70.
- Roychoudhury A, Giri AK, 1989. Effects of certain food dyes on chromosomes of *Allium cepa*. *Mutation Research*, 223, 313-9.
- Ryan AJ, Wright SE, 1961. The excretion of some azodyes in rat bile. *J. Pharm. Pharmacol.*, 13, 492-6.
- Sandıkçı M, Çelik İ, 2000. Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetatin bu organ üzerine etkisi. *Vet Bil Derg.*, 16, 81-8.
- Sankaranarayanan N, Murthy MSS, 1979. Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Res.*, 67, 309-14.
- Sardi M, Haldemann Y, Nordmann H, Bottex B, Safford B, Smith B, Tennant DH, Howle J, Jasti PR, 2010. Use of retailer fidelity card schemes in the assessment of food additive intake: Sunset yellow a case study. *Food Additives & Contaminants*, 27, 11, 1507-15.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S, 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.*, 519, 103-19.
- Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S, 2000. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. *Crit Rev Toxicol*, 30, 629-799.
- Schultz-Ehrenburg U, Gilde O, 1987. Results of studies in chronic urticaria with special reference to nutritional factors. *Zeitschrift für Hautkrankheiten*, 62, 1, 88-95.
- Shaul GM, Holdsworth TJ, Dempsey CR, Dostal KA, 1991. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, 22, 1-2, 10-119.
- Slowik J, Kuryszko J, Graczyki S, Kuprowski M, 1990. Histochemical studies of acid phosphatase in the bursa-dependent lymphoid tissue of the spleen of chickens after bursectomy and stimulation with ovine erythrocytes. *Pol Arch Weter*, 30, 3-4, 75-87.

- Sudhakar R, Ninge Gowda KN, Venu G, 2001. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cell of *Allium cepa*. *Cytologia*, 66, 235-9.
- Tanaka T, 1996. Reproductive and neurobehavioral effects of Sunset Yellow FCF (E110) administered to mice in the diet. *Toxicol Ind Health*, 12, 1, 69-79.
- Tennant RW, Stasiewicz S, Spalding JW, 1986. Comparison of multiple parameters of rodent carcinogenicity and in vitro genetic toxicity. *Environ. Mutagen*, 8, 205-27.
- Van't Hof J, 1978. The action of IAA and Kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem. *Experimental Cell Research*, 51, 167-76.
- Verret MJ, Marliac JP, McLoughlin J, 1964. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. *J AOAC*, 47, 6, 1003-6.
- Veselý D, Veselá D, 1991. The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Vet Med Praha*, 36, 3, 175-81.
- Viola M NA, 1978. Application of the Ames test on some dyes. *Boll. Chim. Farm.*, 117, 402.
- Westmoreland C, Gatehouse DG, 1991. The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and FD & C Yellow No. 6 in vivo in the rodent micronucleus test (observations on species and tissue specificity). *Carcinogenesis*, 12, 8, 1403-7.
- Wever J MR, Renner HW, 1989. Testing of Sunset Yellow and Orange II for genotoxicity in different laboratory animal species. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 271-6.
- Willheim R IA, 1953. A preliminary study concerning the possibility of dietary carcinogenesis. *Gastroenterology*, 23, 1-19.
- Wulff JC, Sale GE, Deeg HJ, Storb R, 1981. Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. *Exp Hematol.*, 9, 8, 85-7.
- Yadav A, Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman R, Rappaport H, 1982. Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 78, 2, 141-9.
- Yentür G, Karakaya AE, 1985. Kullanımı yasaklanan aromatik azo yapısındaki gıda boyalarının bazı gıda maddelerinde araştırılması. *Gıda*, 10, 6, 371-6.
- Yoshimoto M YM, Hatano S, Watanabe T, 1984. Configurational changes in rat liver nuclear chromatin caused by azo dyes. *Food Chem. Toxicol.*, 22, 337-344.
- Zicca A ZA, Cadoni A, Franzi AT, Ferrarini M, Grossi CE, 1981. Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human Tm lymphocytes. *Am J Pathol.*, 105, 1, 40-6.

7. EK

Ek A: Etik Kurul Kararı

Toplantı Tarihi	27.12.2013	Toplantı Sayısı	2013/14	Karar Sayısı	2013/061
<p>S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlhami ÇELİK tarafından sunulan "Kuluçka Başlangıcında Yumurtaya Verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), Tavuklarda Dalağın Embriyonik Gelişimi ile Perifer Kan T- ve B-Lenfosit Oranları Üzerindeki Etkisinin Histolojik ve Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.</p> <p>Bu çalışma ile yaygın olarak kullanılan bir gıda boyası olan Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk dalağının embriyonik gelişimi üzerindeki etkisinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmesinin amaçlandığı belirtilmektedir. Projede 2013/11 tarihli ve 2013/044 karar sayılı olan projeden alınmış dokuların kullanılacağı belirtilmektedir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "Uygun olduğuna" oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan		 Doç. Dr. Ercan KURAR Başkan Yardımcısı			
 Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye		Ayşegül KURTBEOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)			
 Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye	 Doç. Dr. Uğur USLU Üye	 Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye			

8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra, 2012 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.

