

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

**TARTRAZİNİN *CYPRINUS CARPIO*' DAKİ  
GENOTOKSİK ETKİSİNİN  
MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Ümit YIRTICI**

**Tezi Yönetenler  
Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK  
Yrd. Doç. Dr. Muhammed GAFFAROĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2007  
KAYSERİ**

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

**TARTRAZİNİN *CYPRINUS CARPIO*' DAKI  
GENOTOKSİK ETKİSİNİN  
MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Ümit YIRTICI**

**Tezi Yönetenler  
Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK  
Yrd. Doç. Dr. Muhammed GAFFAROĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2007  
KAYSERİ**

Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK ve Yrd. Doç. Dr. Muhammed GAFFAROĞLU danışmanlığında Ümit YIRTICI tarafından hazırlanan “**Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemi ile araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

15/02/2007

**JÜRİ:**

Başkan : Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

Üye : Doç. Dr. Coşkun TEZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Didem AYDIN

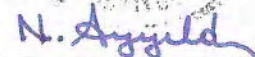


**ONAY:**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 20/02/2007 tarih ve 2007/06-03 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

20. / 02. / 2007.



  
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ  
Enstitü Müdürü

**TEŞEKKÜR**

Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde sürdürdüğüm yüksek lisans öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübeleriyle beni her konuda yönlendiren ve destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK'e, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ'a, göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı tüm Biyoloji Bölümü çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, Ahi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç .Dr. Muhammet GAFFAROĞLU'na ve Ahi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Elşad HÜSEYİN'e, tezin hazırlanması aşamasında her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Esra BÜBER'e ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Ümit YIRTICI**

**TARTRAZİNİN *CYPRINUS CARPIO*'DAKİ GENOTOKSİK ETKİSİNİN  
MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Ümit YIRTICI**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2007**

**Tez Danışmanları: Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK,**

**Yrd. Doç .Dr. Muhammet GAFFAROĞLU**

**ÖZET**

Kimyasal bileşiklerin genotoksik etkisini incelemek amacı ile kromozom hasarlarının bir göstergesi olan balık eritrositlerindeki mikronükleus yapıları kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'nun eritrositlerinde tartrazinin genotoksik etkisinin araştırılması amaçlandı. Uygulamalarda statik akut deney yöntemi ve genotoksik etkinin belirlenmesinde eritrosit mikronükleus testi kullanıldı. Tartrazin uygulaması ile oluşan mikronükleuslu hücreler incelendi ve tartrazinin genotoksik etkisi tespit edildi. Uygulamalar hem zamana hem de doza bağlı olarak yapıldı ve balıklar tartrazinin 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Mikronükleus frekansı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hem doza hem de zamana bağımlı bir artış gösterdi. Şimdiye kadar tartrazinin genotoksik etkileri, balıklar üzerinde incelenmemiştir. Bizim sonuçlarımız, tartrazinin *Cyprinus carpio*'da genotoksik etkisi olduğu yönündedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cyprinus carpio*, Tartrazin, mikronükleus yöntemi, genotoksisite.

**INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECT OF TARTRAZINE IN  
*CYPRINUS CARPIO* BY USING MICRONUCLEUS METHOD**

**Ümit YIRTICI**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**M. Sc. Thesis, January 2007**

**Thesis Supervisors: Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK,**

**Assist. Prof. Muhammet GAFFAROĞLU**

**ABSTRACT**

Micronucleus formation in fish erythrocytes, as an indicator of chromosomal damage, has been increasingly used to detect the genotoxic potential of chemical compounds. In this study, it is aimed to search the genotoxic effect of tartrazine in erythrocytes of *Cyprinus carpio*. Static acute experimental method was used for the treatments and erythrocytes micronucleus test was used to determine genotoxic effect. Micronucleated cells which are formed due to tartrazine exposure were investigated and genotoxic effect of tartrazine was determined. The treatments were carried out according to time and dose, and fish were exposed to 250, 500, 1000 and 1500 mg/L doses for 24, 48, 72 hours. It was found that micronuclei increased not only in a dose-dependent manner but also in a time-dependent way, compared with control group. Genotoxic effects of tartrazine have not been studied in fish yet. Our results revealed that tartrazine has genotoxic effects on *Cyprinus carpio*.

**Keywords:** *Cyprinus carpio*, Tartrazine (E 102), micronucleus test, genotoxicity.

**İÇİNDEKİLER**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
KABUL VE ONAY	I
TEŞEKKÜR	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
KISALTMALAR	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Genel Özellikleri	4
2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması ve Kullanım Amaçları	7
2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi	7
2.2. Renk Katkı Maddeleri	9
2.2.1. Tartrazin	14
2.2.1.1. Tartrazinin Yapısı ve Genel Özellikleri	14
2.2.1.2. Tartrazinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi	16
2.3. Genotoksisite	20
2.3.1. Genotoksisite Araştırmalarında Kullanılan Yöntemler	22
2.3.1.1. Mikronükleus (MN) ve MN Testi	24
2.3.1.1.1. Eritropoez ve MN testi	31
2.3.1.1.2. Test Protokolleri	32

	<b><u>Sayfa No</u></b>
3. BÖLÜM	
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	34
3.1. Gereçler	34
3.1.1. Kimyasal Maddeler	34
3.1.2. <i>Cyprinus carpio</i> (L., 1758 )	34
3.1.3. Aletler	37
3.2. Yöntemler	37
3.2.1. Tartrazinin Uygulanması	37
3.2.2. Wright Boyasının Hazırlanması	38
3.2.3. Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	38
3.2.4. Mikronükleus İncelemeleri	38
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizleri	39
4. BÖLÜM	
BULGULAR	40
4.1. <i>Cyprinus carpio</i> örneklerinin boy ve ağırlıklarının MN oluşumunda etkisinin incelenmesi	40
4.2. Tartrazin uygulaması sonrasında <i>Cyprinus carpio</i> 'dan elde edilen eritrositlerde gözlemlenen değişiklikler	42
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	



**KISALTMALAR**

LD <sub>50</sub>	Ortalama öldürücü doz
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alınabilecek Miktar (Acceptable Daily Intake)
CA	Kromozomal Aberasyonlar
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission)
CAS No	Kimyasal maddelerin servis kayıt numarası
CI	Renk Dizini (Color Index)
FAO	Gıda Tarım Örgütü ( Food and Agriculture Organization)
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
FD&C	Gıda, İlaç ve Kozmetikler (Food, Drug, and Cosmetics)
INS	Uluslararası Numaralama Sistemi
JECFA	Birleşik FAO/WHO Gıda Katkıları Uzmanlar Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
MN	Mikronükleus
NAS	Ulusal Bilimler Akademisi (National Academy of Sciences)
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health)
NRC	Ulusal Araştırma Konseyi (National Research Council)
NOAEL	Etkisiz Doz (No Observed Adverse Effect Level)
SCE	Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange)
SCF	AB Bilimsel Gıda Komitesi (EU Scientific Committee on Food)
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

**TABLolar LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No.</u></b>
Tablo 2.1. Gıdalarda kullanılan renk katkı maddelerinin tarihsel gelişim sürecinin çizelgesi	11
Tablo 2.2. Gıdalarda kullanılmasına izin verilmiş sertifikalı renk katkı maddeleri	13
Tablo 2.3. Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler Yönetmeliği'ne göre tartrazinin kullanılabilceği gıda maddeleri ve miktarları	17
Tablo 2.4. Sertifikalı gıda boyalarından bazılarının günlük alınabilecek miktarları	19
Tablo 4.1. Deney gruplarına ait cinsiyet, boy ve ağırlık verileri	40
Tablo 4.2. Tartrazinin farklı derişimlerinde <i>Cyprinus carpio</i> 'nun periferal eritrositlerdeki mikronükleus sayıları	46
Tablo 4.3. Tartrazinin derişimi ve süreye göre oluşan toplam MN sayıları	47
Tablo 4.4. Tartrazinin derişimi ile MN oluşumu arasındaki ilişkinin istatistik değerdendirmesi	48
Tablo 4.5. Zamana bağılı olarak MN oluşumunun istatistiki değerdendirmesi	49
Tablo 5.1. Farklı türlerden elde edilen verilere göre balık eritrositlerdeki spontan MN frekansları	54

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bir kimyasal maddenin gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilinceye kadar geçirdiği aşamalar	8
Şekil 2.2. Tartrazinin yapısı	14
Şekil 2.3. Tartrazinin metabolik indirgenme reaksiyonu	15
Şekil 2.4. Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması	21
Şekil 2.5. Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	25
Şekil 2.6. Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	25
Şekil 2.7. Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücrenin oluşumu	27
Şekil 2.8. Üç ayrı balık türüne ait periferel kan eritrositlerindeki mikronükleus oluşumları	30
Şekil 3.1. <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	35
Şekil 3.2. Yemliha (Yamula) Barajı haritası	36
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan akvaryum	37
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L tartrazin derişimleri uygulanmış balıkların boyları ve MN oluşum sayısı arasındaki ilişki	41
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L tartrazin derişimleri uygulanmış balıkların ağırlıkları ve MN oluşum sayısı arasındaki ilişki	41
Şekil 4.3. <i>Cyprinus carpio</i> 'nun eritrosit hücrelerinde tartrazin ile uyarılan mikronükleus oluşumları	43
Şekil 4.4. <i>Cyprinus carpio</i> 'nun eritrosit hücrelerinde tartrazin ile uyarılan çekirdek morfolojisindeki değişiklikler	44
Şekil 4.5. <i>Cyprinus carpio</i> 'da tartrazin ile uyarılan eritrosit hücrelerindeki morfolojik değişiklikler	45
Şekil 4.6. Farklı derişimlerde uygulanan tartrazinin MN oluşumuna etkisi	48
Şekil 4.6. Tartrazin uygulamasının zamana bağlı olarak MN oluşumuna etkisi	49

## 1. BÖLÜM

### GİRİŞ

Herhangi bir madde, işlenmiş gıdada belli bir amaca yönelik kullanıldığında genellikle “Gıda Katkı Maddesi” adını alır. Gıda katkı maddelerinin gıda endüstrisinde kullanımı teknolojik gereksinimlerden kaynaklanmıştır. Ancak bunun yanısıra; dünya nüfusundaki artışlar, gıda sektörünü besleyen hammadde kaynaklarındaki azalmalar, insanların yaşam standartlarını yükseltme eğilimleri gibi etmenler teknolojik buluşları yönlendirmiştir. Gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, buna göre ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi ve bilinçlenmesi, mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması, ürünlerde raf ömrünün uzatılması ve kalitede standardizasyon zorunluluğu, daralan gıda kaynaklarının rasyonel kullanımı gibi durumlar gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin dışında kalan kalite kavramı içine ürünün rengi, tat ve kokusu ve besleyici özellikleri girmektedir. Tüketici tarafından farkedilen kalite, daha çok duyuşal özelliklere ve bunun da ötesinde gıdanın rengine dayanmaktadır. Bu nedenle renk maddeleri kaybolan rengi geri vermek, kısmen kayba uğramış olan ya da hiç olmayan rengi yapıya kazandırmak amacı ile çok sık kullanılan gıda katkı maddeleridir. Bu maddeler gıda endüstrisinde çok yoğun kullanıldıkları için, bu konuda yapılan bütün çalışmalarda hareket noktası, kullanılan miktarın hiçbir şekilde toksik etki yaratmayacak düzeyde olmasıdır [1].

Epidemiyolojik kanıtlar bazı şartlarda boyalarının karsinojenik olabileceğini göstermektedir [2, 3]. Gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde yaygın olarak kullanılan renk katkı maddelerinden biri olan tartrazin, Ames testi gibi bazı kısa süreli testler ile yapılan çalışmalar sonucunda karsinojenik ve genotoksik olmadığı belirtilmiştir [4, 5]. Lenfositlerde yapılan bir çalışmada da bu boyanın klastojenik etkisi gösterilmiştir [6].

Tartrazinin mutajenik özelliği ile ilgili birçok in vitro çalışmada negatif bulgular elde edilmiştir [7]. Ancak daha sonra yapılan bir çalışmada, tartrazinin memeli hücrelerinde kromozomal hataları tetiklediği bulunmuştur [8].

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan tartrazin gibi kimyasal maddelerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amacı ile bazı prokaryotik ve ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında, genotoksik bileşiklerin düşük konsantrasyonlarına bile duyarlı ve biyoindikatör olarak kullanılabilir balıklar da tercih edilmektedir [9, 10].

Son yıllarda, genotoksisite çalışmalarında basit, güvenilir ve duyarlı bir test olan mikronükleus (MN) testi kullanılmaktadır [11]. Bu test, orjinal olarak farelerde uygulanmak üzere geliştirilmiştir; ancak daha sonra laboratuvar şartlarında balıklarla da çalışılmıştır [12].

Bu çalışmada, gıda maddelerinde renklendirici olarak kullanılan katkı maddelerinden tartrazin, farklı derişim ve sürelerde uygulanmış, *Cyprinus carpio* model organizma olarak kullanılmış ve mikronükleus testi ile tartrazinin genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. Gıda Katkı Maddeleri

##### 2.1.1. Tarihçe

Gıda katkı maddelerinin kullanımı, insanlık tarihi kadar eskidir. Tarihsel gelişmeler incelendiğinde, yaklaşık 10 bin yıl önce keşfedilen ve günümüze kadar kullanılan ilk gıda katkı maddeleri tuz, baharat ve sirkedir. M.Ö. 50’li yıllarda, Eski Romalılar tarafından sağlanan baharatların İngiltere’de “aroma verici” olarak kullanıldığı ve M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerinin uzun süre bozulmadan saklanmasında da tuzdan yararlandığı bilinmektedir. Yaklaşık 3500 yıl önce, Mısırlıların gıda boyası kullandıklarına dair kayıtlar da bulunmaktadır. Endüstri Devrimi ile birlikte, gıdaların renklerini korumak, lezzetlerini artırmak, bozulmadan saklanma süresini uzatmak için kullanılacak bazı kimyasal maddeler tespit edilmiştir [1, 13-15].

19. yüzyılda, teknolojik gelişmeler yanında popülasyonun yaşam standartlarındaki gelişmeler, özellikle 1950’li yıllarda gıda katkı maddelerinin kullanımını daha da artırmıştır. Yeni, lezzetli, besleyici ve ulaşılması kolay gıdalara olan talep, bugüne gelene kadar artmaya devam etmiştir. Bugün, sadece ABD’de 2500’den fazla katkı maddesi, 15.000 farklı gıdanın üretiminde kullanılmaktadır [13].

Bu tarihsel süreçte, gıdalarda kullanılan katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri daima tartışma konusu olmuştur. 1200’lü yıllarda bile, krallar gıdaların test edilmesinde farklı yöntemler kullanmışlardır. 1800’lü yıllarda, gıda güvenliği ile ilgili birkaç kitap yazılmıştır. Gıda katkı maddelerinin olumsuz etkileri hakkındaki sorunu ilk kez 1900’lerde ABD’de Dr. Wiley ifade etmiştir. Dr. Wiley’in çalışması, gıda katkı maddelerinin kullanımının düzenlenmesine aracılık eden ilk olaydır [13].

1931 yılında ABD’de Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kurulmuştur. Bu kuruluş, ABD’nin ulusal bir kurumu olmasına rağmen, değerlendirmeleri dünya ülkeleri tarafından referans olarak kabul edilmektedir.

Uluslararası düzeyde gıda katkı maddelerinin değerlendirilmesi, 1955 yılında İsviçre’de Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gerçekleştirilen gıda katkı maddeleri konulu ortak konferansın bir sonucu olarak başladı. Bu konferansta, gıda katkı maddelerinin değerlendirilmesi için bir uzmanlar komitesinin oluşturulması önerildi. Bu öneri, JECFA’nın gıda katkı maddelerinin güvenilirliğini değerlendirmek için 1956 yılında yapılan ilk toplantısının temelini oluşturur. Daha sonra, 1961 yılında WHO’nun desteği ile FAO tarafından gıda ile ilgili uygulamaların sağlık ve teknoloji yönünden standartlaştırılması amacı ile Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC) oluşturuldu. Katkı maddeleri hakkında bağımsız olarak çalışan ortak uzmanlar komitesi (JECFA), dünyada, her çeşit katkı maddesi ile ilgili yapılan toksikolojik çalışmaları değerlendirir; uluslararası CAC’a öneriler sunar [16, 17]. 1974 yılında da Avrupa Birliği’nin gıdalarla ilgili komitesi olan AB Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) kuruldu. SCF, raporlarında CAC, JECFA, FDA gibi kuruluşların dökümanlarından da yararlanmaktadır.

Türkiye’de AB standartları esas alınarak mevzuat hazırlanmaktadır. Ulusal gıda mevzuatının temeli, 5179 sayılı Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun ve buna dayalı olarak çıkartılan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne dayanır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nde çeşitli amaçlarla kullanılan 300 civarında gıda katkı maddesi yer almaktadır. Kullanım amacı, kullanılabileceği gıda maddeleri, kullanım miktarları ayrı ayrı listelerde belirtilen tüm katkı maddeleri, JECFA, FDA ve AB’nin çalışma sonuçları gözönüne alınarak belirlenmektedir [18].

### **2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Genel Özellikleri**

Gıda katkı maddeleri, gıdalara istenilerek katılan maddelerdir. İnsanlarda doğal beslenme bilinci oluşmaya başlasa da, hatta organik tarım ürünlerine talep artsa da bu talep yeterli ölçüde karşılanamamaktadır. Bu yüzden insanlar, gıda katkı maddeleri kullanılarak üretilen besinlerle hayatları boyunca beslenmek zorunda kalmaktadır. Bu durumun doğumdan ölüme kadar olduğu düşünülürse, kullanılan miktar ne kadar az

olursa olsun, karşımıza ciddi bir problem olarak ortaya çıkmakta, hatta vücutta zamanla biriken bu maddeler, başta mutajenik ve kanserojenik etkileri olmak üzere birçok hastalığa neden olabilmektedir. Bu yüzden bu maddelerin özellikleri ve gıdalarda kullanım sınırları başta WHO olmak üzere, diğer uluslararası ve ulusal, sağlık ve gıda otoriteleri, gıda katkı maddeleriyle ilgili güvenli kullanım şartlarını belirlemektedir [19, 20].

WHO/FAO'ya göre gıda katkı maddesi; “tek başına besin değeri olmayan, ancak gıda maddesine bilinçli bir şekilde doğrudan veya dolaylı yolla ilave edilen maddelerdir” [21].

Gıda katkı maddeleri başka bir tanımda ise, CAC tarafından; “gıdaların normal olarak yapısında bulunmayan ve ayrıca tek başlarına gıda olarak kullanılmayan, üretim, işleme, paketlenme, taşıma, koruma ve depolama gibi birçok işlem sırasında gıdalara teknolojik amaçlarla katılan veya gıdaların içerisinde doğrudan veya dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen maddelerdir” şeklinde tanımlanmaktadır [22].

Gıda katkı maddeleri Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde de şu şekilde tanımlanmaktadır: “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir” [18].

Gıda katkı maddelerinde bulunması gereken ortak özellikler şunlardır:

- Hangi amaç ile kullanılırsa kullanılsın, öncelikle insan sağlığı için zararsız olduğunun bilinmesi ve kullanılabilir dozun yasalarla belirtilmesi gerekir.
- Kullanıldığı gıda maddesinin beslenme değerini ve kalitesini düşürmemelidir.
- Mümkün olduğunca basit yapıda olmalıdır.
- Katıldığı gıdadaki varlığını ve niceliğini kolaylıkla tayin edebilmek için uygun analiz metodları geliştirilmiş olmalıdır.



- Tepkime alanı geniş olmalı ve ilave edildiği gıda maddesinin yapısına homojen olarak dağılabilmelidir.
- Çok amaçlı kullanıldığında, bir amaçla kullanıldığında gereken en fazla miktar diğer amaç için kullanımında sağlık açısından getirilen sınırı aşmamalıdır [1].

Gıda katkı maddelerinin; toksikolojik değerlendirmelerinin yapılmasına, kullanımdaki bütün katkı maddelerinin devamlı olarak kontrol altında tutulmasına ve kullanım şartlarının yeni bilimsel bulgular doğrultusunda gerekirse yeniden değerlendirilmesine, tavsiye listesinde veya gıda standartlarında yer alan bir katkı maddesinin kullanımının belirli gıdalar, belirli şartlar ve amaçlar için sınırlandırılmasına, istenilen etkiyi oluşturabilecek en düşük miktarlarda kullanılmasına, daha önce belirlenmiş olan günlük alınabilecek miktarına göre kullanılmasına dikkat edilmelidir [1, 23].

AB'nin belirttiği ve Birlik ülkelerince kullanımına izin verilen katkı maddelerinin numaraları önünde AB'yi temsil eden "E" harfi yer almaktadır. Güvenilir gıda katkı maddeleri listesinde yer alan tüm katkıları "E" kodunu taşır ve toksikolojik açıdan güvenilir katkılarıdır [1, 13].

CAC tarafından hazırlanan Uluslararası Numaralama Sistemi (INS)'e göre bu numaralar benimsenmiş olup, gıdaların etiketlerindeki içerik listesinde katkı maddelerinin uzun ve karmaşık kimyasal ifadeleri yerine, sayısal bir sistemle belirtilmesi amacı ile uygulamaya konulmuştur [13]. Aroma maddelerine E kodu ve numara verilmemiştir. Çünkü bu grup çok geniştir. Yaklaşık olarak 340 gıda katkı maddesi varken, aroma maddelerinin sayısı 1700 civarındadır [24].

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde çeşitli amaçlarla kullanılan 300 civarında gıda katkı maddesi yer almaktadır. Bunlar JECFA, FDA ve AB'nin çalışma sonuçlarına göre düzenlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre, besin etiketinde, içindikiler kısmında, besine katılmış olan katkı maddesinin fonksiyonu ile birlikte adı veya E kodunun yazılması zorunludur [18].

### **2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması ve Kullanım Amaçları**

Gıda katkı maddeleri ile ilgili araştırmalar incelendiğinde, bu konu ile ilgili tanım ve sınıflandırmaların zaman içinde değişikliğe uğradığı ve sürekli bir gelişme gösterdiği anlaşılmaktadır. Bazen, gıda katkı maddeleri ait oldukları madde grubuna göre, bazen kullanılma amacına göre, bazen de üretiminde kullanıldığı gıdaya göre gruplandırılmaktadır. 1992 yılında CAC tarafından yayınlanan rehberde gıda katkı maddeleri; antioksidanlar, asitliği düzenleyiciler, emülgatörler, koruyucular, lezzet artırıcılar, renklendiriciler, tatlandırıcılar gibi fonksiyonlarına göre sınıflara ayrılmıştır. Bu sınıflandırmada, kodeks sınıf ismi ve INS numaraları temel alınmıştır [1, 25, 26].

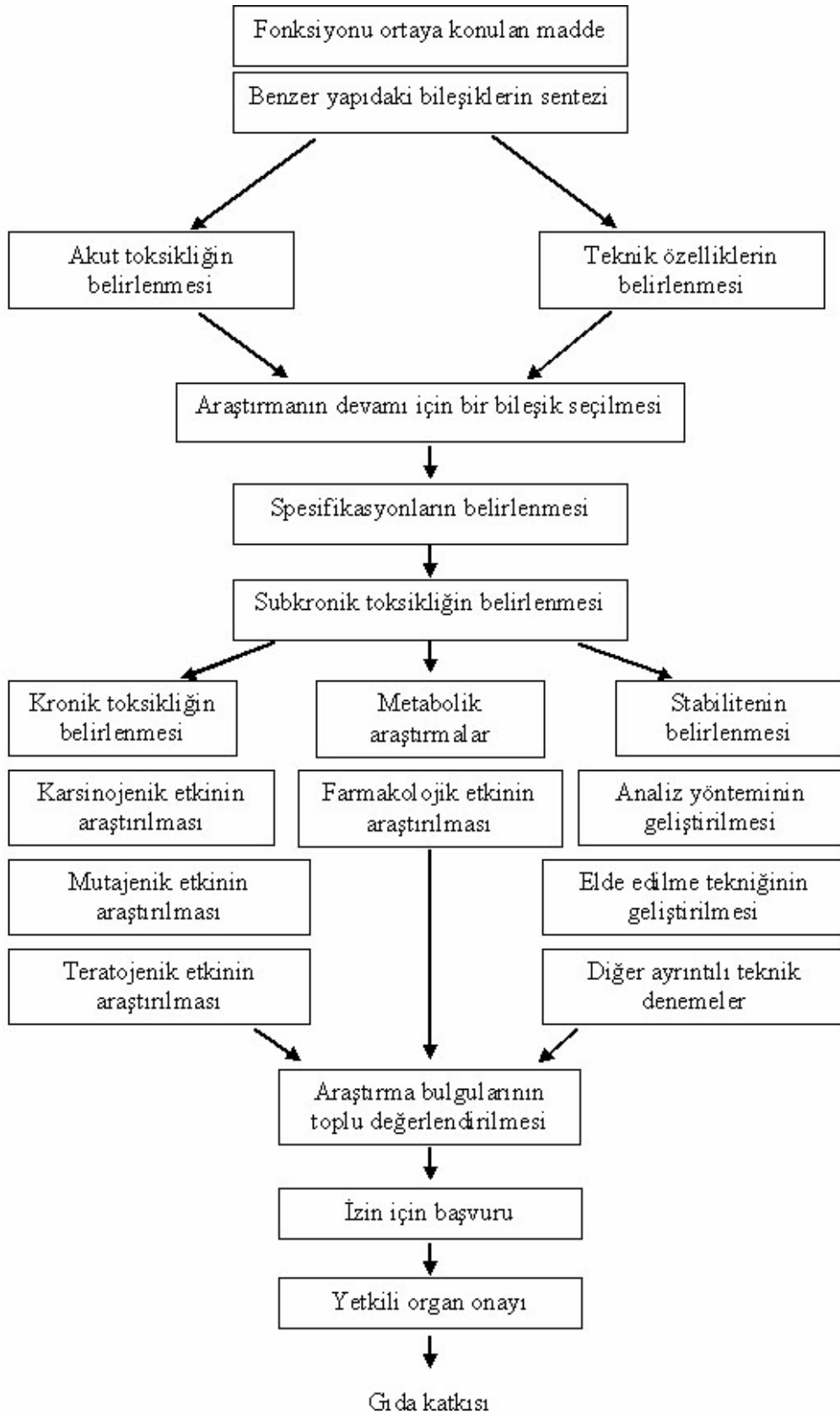
Katkı maddelerinin gıdalarda kullanılmasının beş ana nedeni vardır: Ürünün kıvamını artırmak, besin değerini korumak veya artırmak, lezzetini ve sağlığa yararlı halini muhafaza etmek, asitlik veya alkaliliğin sağlanmasını ve kontrol edilmesini temin etmek, lezzeti artırmak veya arzu edilen rengi vermek [27].

### **2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi**

Gıda katkı maddeleri, insanların karşılaştığı kimyasallar içerisinde farklı bir öneme sahiptir; çünkü insanlar bu maddelere doğuştan ölüme kadar kendi iradeleri dışında maruz kalabilmektedirler. Bu nedenle kullanım izni, ancak uluslararası ve ulusal sağlık kuruluşlarının yoğun çalışma ve incelemeleri sonucunda verilebilir. Bu süreçte, günümüz bilim ve teknolojisinin verdiği imkanlar kullanılarak pek çok araştırma yapılır. Gıda katkı maddeleri, insan sağlığının korunması yönünden en sıkı denetim altında tutulan kimyasal madde grubudur [25, 28].

Bir kimyasal maddenin gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilinceye kadar geçirdiği aşamalar, Şekil 2.1'de gösterilmiştir [29].

Her kimyasal madde doza bağımlı olarak toksiktir. Bu toksikoloji biliminin 400 yıl öncesinden beri bilinen temel yasasıdır. 16. yüzyılda Paracelsus tarafından "Her madde zehirdir, zehir ile zehir olmayanı ayıran dozdur" şeklinde ifade edilen bu gerçek, bugün de modern toksikolojinin temelini oluşturur. O halde, esas olan kimyasalların zararsızlık sınırlarının belirlenmesidir [28].



Şekil 2.1. Bir kimyasal maddenin gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilinceye kadar geçirdiği aşamalar [1].

Besinlere katılacak bir katkı maddesinin en yüksek miktarının belirlenmesinde ilk aşama, katkı maddesinin kabul edilebilir günlük alım miktarının (ADI) tespit edilmesidir. Katkı maddesinin ADI değeri toksikolojik testlerle saptanır. Deneysel hayvanlar üzerinde yapılan testlerde ana hedef, gözlenebilir kötü bir etki oluşturmayan düzeyin (NOAEL) tespit edilmesidir. NOAEL, deneysel hayvanlarında saptanabilir ters bir etki oluşturmayan, vücut ağırlığının kilogramı başına düşen en yüksek miligram madde miktarıdır. Daha sonra gıdalarda kullanılmasına izin verilecek katkı miktarı tespit edilmeye çalışılır. Elde edilen miktarların insanlar üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Deneysel, etik nedenlerle insanlar üzerinde yapılamayacağından, güvenlik faktörü kullanılır. Güvenlik faktörü genellikle 100'dür. Deneysel hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun güvenlik faktörüne bölünmesi ile elde edilen değer insanlar için kullanılabilir miktarı belirtir. Yani,  $ADI = NOAEL / 100$ . Böylece günlük alınabilecek miktar (ADI), insanın vücut ağırlığının kilogramı başına düşen miligram madde miktarı olarak belirlenir. **Günlük maksimum alım = ADI x Vücut ağırlığı** şeklinde saptanır [1, 30, 31].

ADI değeri, kapsamlı toksikolojik çalışmalar sonucu bulunmuş olmakla birlikte değişmez değildir. Yeni araştırma verilerine göre azaltılıp artırılabilir. Gıda katkı maddeleri ile ilgili çalışmalar süreklilik özelliği taşır [32].

## 2.2. Renk Katkı Maddeleri

İnsanlar, çeşitli duyu reseptörleri aracılığı ile bazı çevresel uyarıları algılayarak ses, koku, tat ve görüntüye dönüştürebilirler. Görmek, insan vücudundaki en karmaşık duyu sistemi olması yanında, insan beyninin merkezi işlem ünitesine de hükmeder. Görme ile ilgili bu niteliklerde en önemli faktör, maddelerin renkleridir [33].

Renk katkı maddeleri, insanlık kültürünün çok uzun yıllardır bir parçasıdır. Arkeologlar, bazı kozmetik boyalarının M.Ö. 5000 yıllarında kullanıldığını belirtmektedirler. Eski Mısırlıların da ilaçlarda renklendiriciler kullandıklarına dair bulgular vardır. Tarihçiler, gıda boyalarının da M.Ö. 1500 yıllarından beri kullanıldığını ileri sürmektedirler [34].

Teknik olarak renk katkı maddesi; bir gıdaya, ilaca, kozmetik ürüne veya insan vücuduna uygulandığı veya ilave edildiği zaman renk veren boya, pigment veya maddelere denir [34].

Renk katkı maddeleri, doğal veya sentetik olarak iki gruba ayrılır. Sentetik bir boya, 1856 yılında Sir William Henry Perkin tarafından keşfedilmiştir. Bu keşfi, daha sonra yeni ve farklı sentetik boyaların sentezi izlemiştir (Tablo 2.1). Bu boyalar, hayvanlar, bitkiler ve minerallerden elde edilen doğal ekstraktlar ile karşılaştırıldığında, renkleri ve kararlılıkları açısından daha üstün özelliklere sahiptir. Bu sentetik boyaların bazıları, Avrupa'da hemen kullanılmaya başlanmıştır. ABD'de ise ilk kez 1886 yılında tereyağında renk katkı maddesi kullanılmasına izin verilmesi ile gıdalarda sentetik organik boyaların kullanımı yasallaşmıştır. 1900'lü yıllarda yaklaşık 80 farklı gıda boyası ketçap, jöle, tereyağı, meyve suları, şarap, dondurma, peynir gibi pekçok üründe kullanılmaya başlanmıştır. ABD'de boya maddeleri kullanımı ile ilgili ilk kapsamlı yasalaşma, 1906'da 7 gıda boyasının kullanımına izin verilmesi ile olmuştur. Bu boyalar amarant, Ponceau 3R, eritrosin, indigotin, Light Green SF, Naphthol Yellow S ve Orange 1'dir. İzleyen yıllarda, bu listeye yeni boyalar eklenmiştir. 1938'de "Federal Food, Drug and Cosmetic Act" kabul edilmiştir [35].

Gıda maddelerine renk katkılarının eklenmesinin başlıca nedenleri şunlardır:

- Işık, hava, aşırı düşük veya yüksek sıcaklıklara, nem ve depolama şartlarına bağlı oluşan renk kaybını dengelemek.
- Renkteki tabii değişimleri düzeltmek. Normal rengini almamış gıdalar yanlış olan bir anlayışla düşük kaliteli olarak değerlendirilebilir. Mesela ağaçta olgunlaşan bazı portakallara Citrus Red No.2 boyası püskürtülerek benekler kapatılır veya tabii bir renk verilmeye çalışılır. Bu uygulama, boyaların istenmeyen bir kullanım alanı olmasına karşın düşük kaliteyi maskeler.
- Bir gıdada doğal olarak ancak düşük düzeyde oluşmuş olan rengi koyulaştırmak.
- Normalde renksiz olan bir yiyeceğe renkli bir kimlik kazandırmak.
- Bazı "eğlence gıdaları" na renkli bir görünüm sağlamak.
- Depolanma süresince güneş ışığından etkilenebilecek lezzet ve vitaminleri korumak.

Tablo 2.1. Gıdalarda kullanılan renk katkı maddelerinin tarihsel gelişim sürecinin çizelgesi [36].

İlk uygarlıklar	Şekerlerde boya maddesi kullanılması (Mısırlılar, M.Ö. 1500)
	Şaraplarda boya maddesi kullanılması (M.Ö. 400)
	Doğal renklendiricilerin kullanılması: Safran ve diğer bitki türleri, tereyağının renklendirilmesinde kullanıldı.
19. yüzyıl	Şeker ve turşu üretiminde inorganik pigmentlerin (örneğin, kurşun kromat, bakır sülfat) kullanılması
	W.H.Perkin, katrandan leylak rengi veya anilin moru sentezledi (1856).
	Peter Giess tarafından diazonyum bağlanma reaksiyonu (1860)
1905	Bazı kırmızı ve sarı renk veren boyalar sentezlendi (1895)
	Gıda, tıp ve kozmetik alanlarında bazı katran ve diğer petrol türevlerinin kullanımı
	Red 3 (toluidin red) sentezlendi.
1938	FDA tarafından yaklaşık 200 sentetik boya geçici olarak listelendi.
1960-1970	Gıda katkı maddelerine karşı eleştiriler: ana hedef fast-food, fakat renklendiriciler de eleştirilmektedir.
	Doğal boya piyasası, 250 milyon USD değer kazandı.
1994	Doğal boya piyasasının büyüme hızı %5-10 arasında iken, sentetik boya piyasasında sadece %3-5'tir.
2002	Doğal boya piyasası, 1 milyar USD değer kazandı.

Gıdalarda kullanılmasına izin verilen tüm renk katkı maddeleri "sertifikalı (yapay)" ve "sertifikasız (doğal)" olarak iki sınıfa ayrılır. Sertifikalı renk katkı maddeleri sentetiktir; üreticiler ve FDA tarafından test edilir. Gıdalarda kullanılmadan önceki onaylanma sürecinde, renk katkı maddesinin güvenilirliği (sağlık açısından), kalitesi, dayanıklılık ve kararlılığı kontrol edilir. ABD’de sertifikalı 9 adet renk katkı maddesi vardır. Sertifikasız renk katkı maddeleri sebzeler, mineraller veya hayvanlar ve tabii türevlerin sentetik kopyaları gibi doğal kaynaklardan elde edilir. Örneğin, karamel rengi, ticari olarak şeker ve diğer karbohidratların ısıtılmasıyla sıkı kontrol edilmiş şartlarda elde edilir ve soslar, salçalar, fırıncılık ürünleri ve diğer gıdalarda kullanılır. FDA tarafından onaylanmış dokuz adet sertifikalı renk katkı maddesinden yedi tanesi ve tarihsel süreçteki yerleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Herhangi bir renk katkı maddesinin sertifikalı veya sertifikasız olmasının genel anlamda onun güvenilirliği ile bir ilgisi yoktur. Her iki tip renk katkı maddesi de gıdalarda kullanımına izin verilmeden önce aynı standart sıkı araştırmaya tabi tutulur. Sertifikalı renk katkı maddeleri diğerlerine göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü bunların renklendirme kabiliyetleri, diğerlerine göre daha iyidir. Bu özelliklerinden dolayı da aynı etkiyi göstermesine karşın gıdaların içerisindeki miktarları daha düşüktür. İlave olarak sertifikalı bu renk katkı maddeleri daha kararlı, tek düze renk sağlamada daha iyi, farklı renk ve tonları oluştururken de daha kolay karışabilmektedir. Sentetik renk katkı maddeleri genel olarak gıdalara istenmeyen bir tat vermezler. Ancak şeker pancarı ve yabanmersini gibi gıdalardan elde edilen katkı maddeleri, istenmeyen etkilere neden olabilirler. Gıdalarda kullanılmasına izin verilen en yüksek miktarlar da ayrıca belirlenmiştir. Çok miktarda renk katkı maddesi kullanımı, hem gıdaların çekiciliğini kaybettirmekte, hem de maliyetini artırmaktadır.

Onaylanabilir renk katkı maddeleri, gıdaların içinde suda çözünen boya maddesi veya yağda çözünen boya maddesi olarak bulunur. Suda çözünebilir olan boyalar, toz, granül, sıvı veya diğer spesifik amaçlara uygun formlarda imal edilebilir. Bunlar içeceklerde, kuru karışımlarda, fırınlanmış gıdalarda, şekerlemelerde, süt ürünlerinde, ev hayvanları gıdalarında ve diğer çeşitli gıdalarda kullanılır. Yağda çözünen boyalar daha dayanıklıdır. Sıvı ve katı yağ içeren gıdaların renklendirmesinde veya suda çözünen boyaların çözünmesine yetecek derecede, nem içermeyen gıdalarda kullanılması idealdir [37].

Tablo 2.2. Gıdalarda kullanılmasına izin verilmiş sertifikalı renk katkı maddeleri [1, 13, 37].

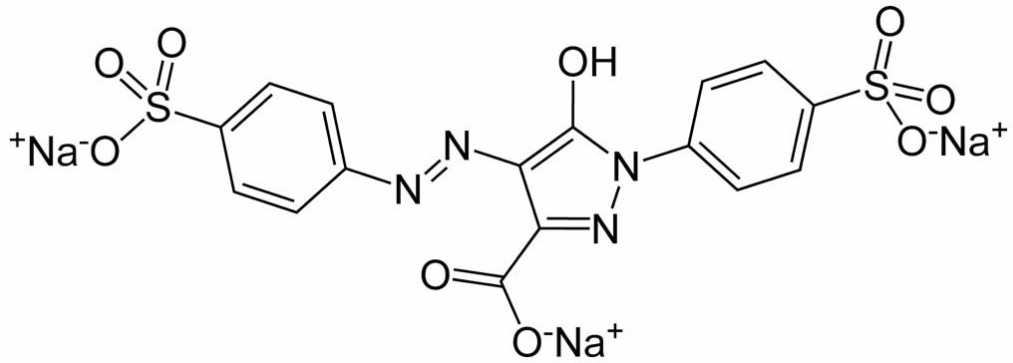
Renk katkı maddesi	FDA No.	AB No.	ABD’de kullanılmasına izin verildiği yıl	Renk	Kullanıldığı Gıda Maddeleri
Brilliant Blue FCF	FD&C Blue No.1	E133	1929	Parlak mavi	İçecekler, süt ürünlerinin tozları, jöleler, şekerlemeler, baharat ve soslar, şekerli kremalar, şuruplar, ekstreler.
Indigotin	FD&C Blue No.2	E132	1907	Canlı mavi	Piştirilmiş gıdalar, tahıl ürünleri, hafif yemekler, dondurma, şekerlemeler.
Eritrosin	FD&C Red No.3	E127	1907	Kiraz kırmızısı	Meyva kokteylleri, meyve salatası konserveleleri, şekerlemeler, piştirilmiş gıdalar, süt ürünleri.
Allura Red AC	FD&C Red No.40	E129	1971	Turuncu-kırmızı	Jelatinler, pudingler, süt ürünleri, şekerlemeler, içecekler, baharatlar ve soslar.
Fast Green FCF	FD&C Green No.3	-	1927	Deniz yeşili	İçecekler, pudingler, dondurmalar, şerbetler, şekerlemeler, piştirilmiş gıdalar.
Tartrazine	FD&C Yellow No.5	E102	1916	Limon sarısı	Krema ve muhallebiler, içecekler, dondurmalar, şekerlemeler, konserveleleri, tahıl ürünleri.
Sunset Yellow	FD&C Yellow No.6	E110	1929	Turuncu	Tahıl ürünleri, piştirilmiş gıdalar, dondurmalar, içecekler, şekerlemeler, tatlılar.



## 2.2.1. Tartrazin

### 2.2.1.1. Tartrazinin Yapısı ve Genel Özellikleri

Tartrazin pirazolin halkası içeren, monoazo yapıda, sertifikalı, sentetik bir boyadır (Şekil 2.2). Bu grupta yer alan boyalar,  $-N=N-$  grubu içerdiğinden azo boyası olarak da bilinir. Bu azo boyaları içerisinde en çok kullanılanlardan birisi de tartrazindir. Tartrazin, oksaloasetik ester ile fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonu sonucu sentezlenir. Reaksiyon ürünü, diazot içeren sülfanilik asit ile birleştirilir. Oluşan ester, sodyum hidroksit ile hidroliz edilir. Diğer bir sentezlenme yolu ise, bir mol dihidroksitartarik asit ile iki mol fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonudur [35, 38].



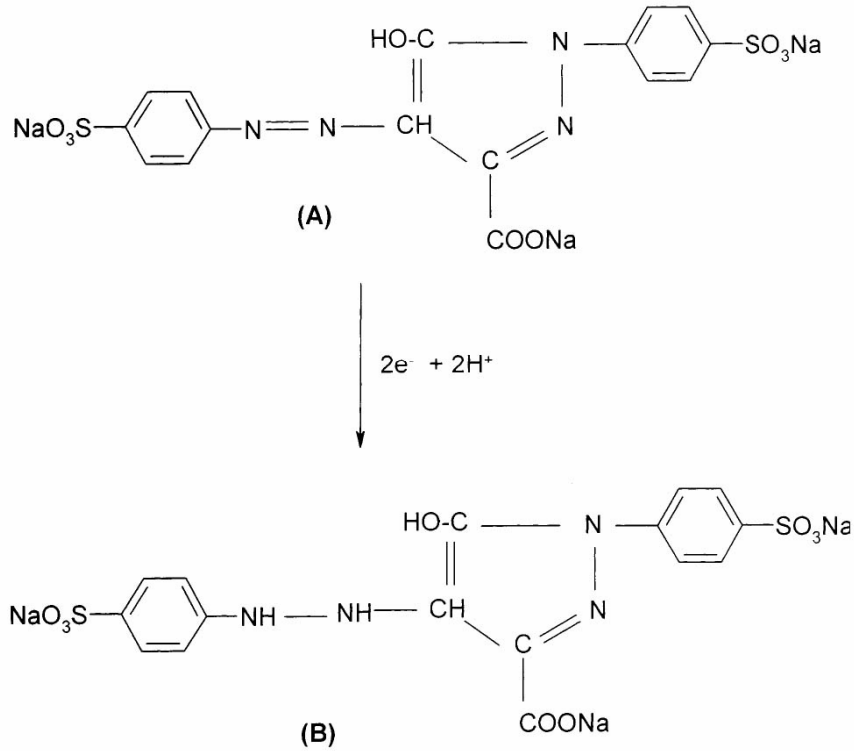
Şekil 2.2. Tartrazinin (trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo)-H-pirazol-3-karboksilat) yapısı [39].

Tartrazin; CI Food Fellow 4, FD&C Yellow No.5, Color Index (1975) No. 19140, INS No.102 gibi isimlerle de bilinir.

C.A.S. No	: 1934-21-0
Molekül formülü	: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
Molekül ağırlığı [40]	: $534.37 \text{ g mol}^{-1}$
Kullanıldığı alanlar	: Biyolojik boya, gıda boyası.

Tartrazin, turuncu-sarı renkte, toz halinde bir boyadır. Suda kolaylıkla çözünebilir ve altın sarısı renkte çözeltiler oluşturur [35].

Yapısındaki en dikkati çeken özellik, sülfat gruplarıdır. Bu gruplar oldukça polardır. Eritrosin (Red No. 3) ve Sunset Yellow (Yellow No. 6) gibi diğer boyalar ile çapraz reaktivite gösterebilir.



Şekil 2.3. Tartrazinin metabolik indirgenme reaksiyonu [41].

Tartrazinin olası indirgenme bölgeleri,  $-C=C-$ ,  $-C=N-$ ,  $-N=N-$  yapıları olabilir. Özellikle  $-N=N-$  yapısı, indirgenmeye daha duyarlıdır.

Gıda maddelerinde kullanılan azo boyaların kararlılığı, bazı parametrelere bağlıdır. Bunların en önemlisi, indirgeyici ajanların varlığıdır. Bu durum, azo çift bağlarının indirgenmesi ve anilin, sülfanilik asit, naftiyonik asit gibi bazı aminlerin oluşumu ile sonuçlanır. Bu ürünler, amonyağa kadar yıkılabilir [42].

Gıdalarla alınan tartrazinin sindirilmesinde rat, tavşan ve insanlardaki birincil mekanizma, bağırsak florasındaki bakteriyel azo redüksiyonudur [43, 44]. Tartrazinin

başlıca metabolizma ürünü sülfanilik asittir. Ratlar ve tavşanlar ile yapılan bir çalışmada, tartrazinin idrar ve safra yolu ile değişmeden atıldığı tespit edilmiştir [45].

Tartrazin gıdalarda, kozmetik ürünlerinde ve günümüzde 124 ilacın formülasyonunda kullanılmaktadır. ADI değeri 0-7,5 mg/kg'dır [46, 47].

Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler Yönetmeliği'nde tartrazinin Türkiye'de kullanılabileceği gıdalar ve sınırları Tablo 2.3'te gösterilmiştir [48].

### 2.2.1.2. Tartrazinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Tartrazine karşı aşırı duyarlılık reaksiyonları, her 10 bin kişide 1-10 arası insanı etkilemektedir. Bu reaksiyonlar; ürtiker, rinit, astım, sistemik anafilaksi şeklinde kendini gösterir. Aşırı duyarlılık reaksiyonları, en çok astımlı hastalarda ve aspirine duyarlı kişilerde görülmektedir. Çocuklarda hiperkinetik davranış, diğer gıda katkı maddelerinin etkisi yanında, tartrazinin toksik etkilerine de bağlıdır. National Institute of Health (NIH), 1982 yılında gıda katkı maddeleri ve renklendiricilerin hiperaktiviteye neden olduğuna dair destekleyici bir kanıt olmadığını açıklamıştır.

Tartrazine duyarlılığın mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok insan, diyetlerindeki antijenik maddelere immunolojik olarak aşırı duyarlılık gösterebilir; ancak bazı bireyler alerjik hastalıklara daha duyarlıdır. Bu reaksiyonlara tartrazinin bir metabolitinin de neden olabileceği düşünülmektedir (Tartrazin, redüktazlara sahip bağırsak florasındaki bakteriler tarafından metabolize edilmektedir). Ya da çocuklarda detoksifikasyon süreci daha yavaş ilerliyor olabilir [49].

Kemirgenler ile yapılan kronik toksisite ve karsinogenezite çalışmalarında tartrazin ile %5 düzeyinde bir beslenmenin herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir [45, 50]. Fareler ve tavşanlar ile yapılan tartrazinin mutajenik olup olmadığının incelendiği diğer bir çalışmada da olumsuz bir etkisi tespit edilememiştir [51-55]. FDA, elde edilen tüm bilimsel kanıtları değerlendirerek, tartrazinin karsinogenik ve genotoksik olmadığını açıklamıştır [35]. Ancak, tartrazinin bazı duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, astımı tetiklediği de gösterilmiştir [56-60].

Tablo 2.3. Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler Yönetmeliği'ne göre tartrazinin kullanılabilceği gıda maddeleri ve miktarları [48].

EC Kodu ve Renklendiricinin Adı	Gıda Maddesi	En yüksek miktar
E 102 Tartrazin	Bitter soda, bitter şarap	100 mg/l
	Bezelye konservesi	100 mg/kg
	Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
	Meyve ve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
	Korunmuş kırmızı meyveler	200 mg/kg
	Şekerlemeler	300 mg/kg
	Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
	Hafif fırıncılık ürünleri	200 mg/kg
	Yenilebilir buzlar	150 mg/kg
	Aromalandırılmış işlenmiş peynir	100 mg/kg
	Aromalandırılmış süt ürünleri dahil tatlılar	150 mg/kg
	Soslar	500 mg/kg
Hardal	300 mg/kg	
Balıkların ve kabuklu su ürünlerinin ezmeleri	100 mg/kg	

Tablo 2.3'ün devamı

EC Kodu ve Renklendiricinin Adı	Gıda Maddesi	Maksimum Doz
E 102 Tartrazin	Ön pişirme yapılmış kabuklu su ürünleri	250 mg/kg
	Somon balığı benzerleri	500 mg/kg
	Surimi	500 mg/kg
	Balık yumurtası	300 mg/kg
	Füme balık	100 mg/kg
	Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200 mg/kg
	Diğer çerezler	100 mg/kg
	Kilo kontrolü amaçlı komple formüller	50 mg/kg
	Tıbbi kontrol altında kullanılan komple formüller ve ek gıdalar	50 mg/kg
	Ek sıvı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	100 mg/l
	Ek katı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	300 mg/kg
	Çorbalar	50 mg/kg
	Bitkisel protein bazlı et ve balık analogları	100 mg/kg
	Alkollü içecekler (Bira, viski hariç.)	200 mg/l
Meyve şarapları (durgun ve köpüren )	200 mg/l	

Azo boyalar, özellikle tartrazin, ürtiker gibi immün mekanizmalar ile ilgili yan etkilere de neden olmaktadır [57, 59]. Gerber ve arkadaşları [61], aynı zamanda kronik ürtiker hastaları ile aspirine duyarlı bireylerde, astım hastalarında görülen bronkospazmlara benzeyen, immünolojik olmayan reaksiyonlar gözlemlemişlerdir. Miller [62], aspirine duyarlı ve astımlı bireylerde, bu reaksiyonların daha sık görüldüğünü belirtmiştir. Zlotlow ve Settipane [63], 16 yaşındaki bir erkek hastada, tartrazinin neden olduğu bir kronik ürtiker olgusu rapor etmişlerdir. ABD’de aspirine karşı duyarlılık reaksiyonu gösteren yaklaşık 1 milyon birey üzerinde yapılan populasyon çalışmalarında, bu bireylerin %15’inin tartrazine de duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir [64-66].

Loblay ve Swain [67] tarafından yapılan bir çalışmada, tartrazine duyarlılığın temelinde genetik faktörlerin olduğu belirtilmiştir. Tartrazin, siklooksijenazların etkisini inhibe etmez ve prostaglandin oluşumunu etkilemez. Morales ve arkadaşları [68], aspirine duyarlı kişilerde tartrazine de duyarlılık olmasının sürpriz olmadığını ifade etmişlerdir.

Tartrazin, 1916 yılından beri ABD’de ikinci en çok kullanılan gıda boyasıdır. Dünyada yaklaşık 60 ülkede kullanılmaktadır. Ancak, duyarlı bireylerdeki alerjik reaksiyonlar ile ilişkilendirilmesi nedeni ile kullanım sınırlarının belirlenmesi ya da gıda maddelerinde yer alan bileşenler listesinde tartrazinin belirtilmesi gerekmektedir [35]. Bazı sertifikalı gıda boyalarının günlük alınabilecek miktarları, Tablo 2.4’te gösterilmiştir [13].

Tablo 2.4. Sertifikalı gıda boyalarından bazılarının günlük alınabilecek miktarları.

Gıda renk katkı maddesi	Ortalama günlük alım (mg/kg) <sup>a</sup>	Kabul edilebilir günlük alım (mg/kg) <sup>b</sup>
FD&C Blue No. 1	16	12,5
FD&C Blue No. 2	7,8	5,0
FD&C Green No. 3	4,3	12,5
FD&C Red No. 3	24	0,05
FD&C Red No. 40	100	-
FD&C Yellow No. 5	43	7,5
FD&C Blue No. 1	37	5,0

<sup>a</sup>NAS/NRC verileri [69]; populasyonun %99’u için değerler.

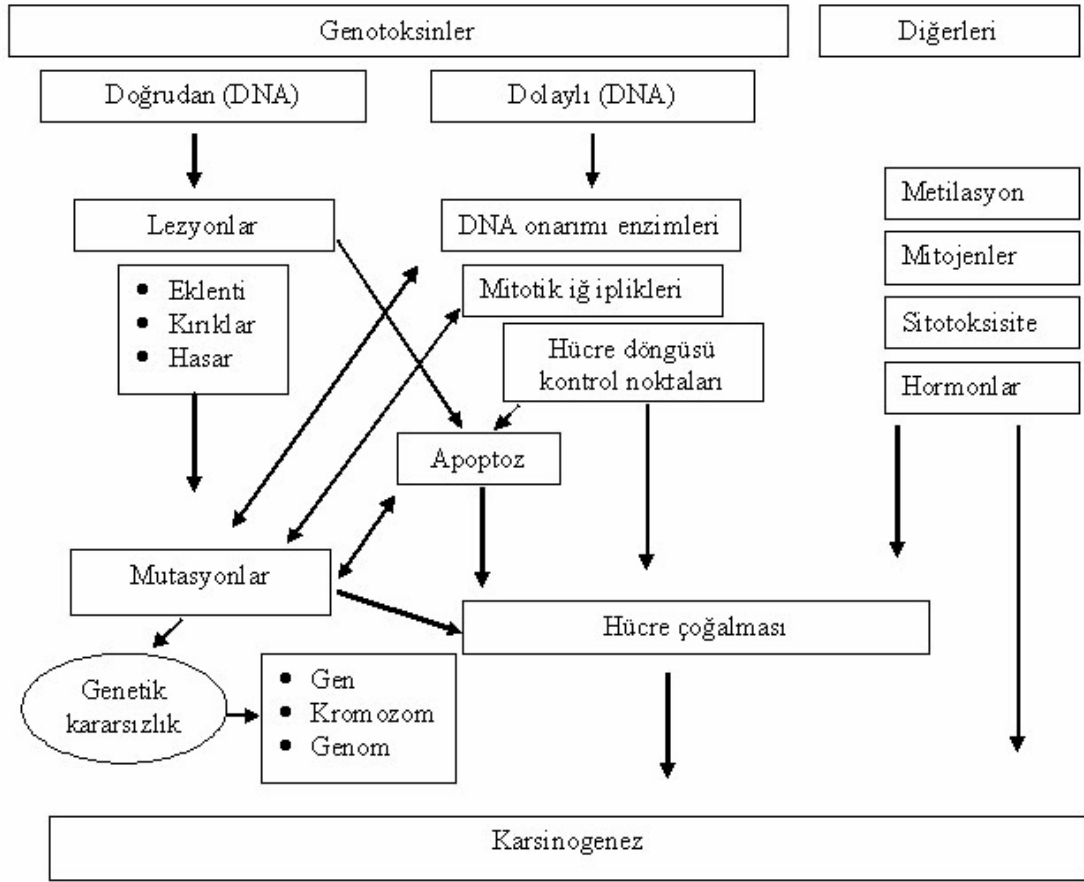
<sup>b</sup>FAO/WHO verileri [70].

### 2.3. Genotoksisite

Kalıtsal bilginin taşıyıcısı olan DNA gibi hücrel makromoleküllerin nükleofilik bölgelerine bağlanan elektrofilik özellikteki kimyasal ajanların oluşturduğu etki genotoksisite adını alır. Bu bilim dalı, genetik hasar oluşturabilecek özellikteki ajanların (genotoksinler) çalışıldığı, toksikoloji biliminin özelleşmiş bir alt dalıdır. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 1992 yılında yayınlanan bir raporda genotoksisite kavramı, geniş bir çerçevede ele alınmış ve bu tanımın DNA'daki doğrudan ve dolaylı etkileri kapsadığı ifade edilmiştir: (1) Moleküler düzeyde mutasyonların (gen, kromozomal, rekombinasyonel) indüksiyonu, (2) Mutagenез ile ilişkili dolaylı olaylar (örneğin, programlanmamış DNA sentezi) ve kardeş kromatid değişimi (SCE) veya, (3) sonuçta mutasyonlara neden olabilecek DNA hasarları (örneğin, DNA'ya eklentiler) [71].

DNA'nın yapısında meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Hücre ve/veya organizma popülasyonlarında, mutasyonların ortaya çıkmasına ve artışına neden olan kimyasal veya fiziksel ajanlar da mutajen veya mutajenik terimleri kullanılarak ifade edilir [71]. Genotoksinlerin kromozomlarda meydana getirdiği mutasyon, klastogenez adını alır [72, 73]. Mutasyonların vücut hücrelerinde ortaya çıkması ile organizmanın doğrudan kendisi etkilenirken, eşey hücrelerinde ortaya çıkması halinde sonraki nesillere geçebilir. Eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar, zigota aktarılarak sonraki nesillerde ortaya çıkabilir. Genotoksisite çeşitli mekanizmalarla tamir edilebilir özelliktedir ve her zaman mutasyon olarak ifade edilmez; bu nedenle mutajenisiteden ayrılır.

Mutajenlerin genotoksik etkisi, hücrel hedeflerine bağlıdır. Bazı kimyasal maddelerin mutajenik etkisini göstermesi için metabolize edilmesi gerekebilir. Mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterebilirler (Şekil 2.4). Örneğin, iyonlaştırıcı radyasyon, DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına neden olur. İyonlaştırıcı radyasyonun DNA üzerindeki dolaylı etkisi ise, bir fotonun su molekülleri ile etkileşerek hidrolizine neden olması sonucu oluşan serbest radikallerin daha sonra proteinlerin ve DNA'nın yapısını bozması ile gerçekleşir [74-76].



Şekil 2.4. Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması [75].

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan 39 farklı kimyasal maddenin genotoksisitesinin incelendiği bir çalışmada, gıda boyaları en genotoksik katkı maddesi olarak tespit edilmiştir. Amarant, tartrazin, eritrosin gibi boyaların mide, kolon ve/veya mesanede doza bağlı olarak DNA hasarlarını tetiklediği belirlenmiştir. Bu boyalar arasında özellikle amarant ve tartrazini de içeren 4 boya maddesinin, ADI değerlerine yakın miktarlarda uygulandığında kolonda DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur [77]. Patterson ve Butler tarafından yapılan bir çalışmada [8], tartrazin uygulanmasının memeli hücrelerinde kromozom anormalliklerini artırdığı tespit edilmiştir.

Genotoksisite ve karsinojenisite arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Birçok karsinojen; gen mutasyonları ve amplifikasyonlarına, kromozomal yeniden düzenlenmelere ve anöploidiye neden olur. İnsanlar için karsinojen olan pek çok bileşik, rutin testlerde genotoksik bulunmuştur. Karsinogenez, tümörü baskılayan genlerin



etkisiz hale getirilmesine ve/veya protoonkogenlerin etkinleştirilmesine neden olan kromozomal değişiklikleri ve /veya nokta mutasyonlarını kapsar. Kanseri, kararsızlık/değişkenlik sendromları ile ilişkilidir. Birçok karsinojen, tümörün hedef dokularının DNA'sına kovalent olarak bağlanabilecek elektrofilik ara ürünler oluşturur. DNA eklentileri, yanlış kodlamaya neden olarak mutasyonların ortaya çıkmasını sağlar.

Karsinogenezdeki genetik değişikliklerin rolü, olası karsinojenlerin tanımlanmasında genetik toksisite testlerinin önemini vurgular. Karsinogenezle ilgili olduğu varsayılan genotoksitenin etkilerini inceleyebilecek çeşitli kısa-sürelili test metodları geliştirilmiştir. Kısa-sürelili testlerle elde edilen sonuçları, kimyasal bileşiklerin karsinogenisitesi ile karşılaştırmak için kapsamlı incelemeler yapılması gerekir. Genel kanı, genetik etkilerin tamamı hakkında bilgi sağlayabilecek geçerlilikte tek bir testin olmadığı yönündedir; herbir kimyasal madde, birden fazla test kullanılarak değerlendirilmelidir [71].

### **2.3.1. Genotoksisite Araştırmalarında Kullanılan Yöntemler**

Kimyasal maddelerin hücreler üzerindeki genotoksik ve mutajenik etkilerini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [72]. Bir maddenin potansiyel bir mutajen olup olmadığının belirlenmesi için kromozom anormalliklerine neden olup olmadığına bakılmaktadır. Kimyasalın çeşitli doz ve sürelerde hücre kültürüne eklenmesinin ardından, elde edilen kromozom preparatlarının incelenmesi ile sonuca gidilmektedir. Kromozom anormalliklerinin genotoksik maddeler için indikatör olduğu, ayrıca insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri ile kanser oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmektedir [73].

Bir kromozomun morfolojisinde değişim olarak gözlenen yapısal kromozomal aberasyonlar (CA) ve kardeş kromatid değişimleri (SCE), mikroskopik olarak tanımlanabilir kromozomal hasarlardır. SCE, iki kardeş kromatid arasında kromozomal materyalin simetrik değişimidir. Mikronükleus (MN), asentrik kromozom parçaları veya geri kalmış tam bir kromozomdan oluşur.

Gıda endüstrisinde çok geniş bir kullanım alanına sahip olan gıda katkı maddelerinin genetik etkilerinin incelenmesinde, diğer kimyasal maddelerde olduğu gibi, farklı organizmalarda çeşitli testler kullanılmaktadır. DNA hasarlarının incelenmesinde en çok kullanılan yöntemler; mikronükleus (MN) ve kromozomal aberasyon (CA) testi ile kardeş kromatid değişimi (SCE) metodudur [78]. Ayrıca, tek hücre jel elektroforezi (SCGE), “Comet Assay” olarak da bilinir, oksidasyona neden olan, alkilleyici özellikteki kimyasalların neden olduğu DNA hasarlarını incelemek için kullanılan bir genotoksisite testidir [72]. Bunun yanında, genotoksisite testlerinde önemli bir yere sahip olan *Drosophila* ile gerçekleştirilen mutajenite testlerinde; somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), eşeye bağlı letalite testi, dominant letalite testi, toksisite testi ve sterilite testi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. *Bacillus subtilis* tamir testi ile *Salmonella typhimurium* bakterisinin kullanıldığı Ames testi ise bakterilerin test organizması olarak kullanıldığı yöntemlerdir. Genotoksisite testlerinde *Saccharomyces cerevisiae* türü maya da kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan genotoksisite testlerinden bir tanesi de *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Tradescantia* ve *Hordeum vulgare* gibi bitkilerin kullanıldığı Allium testidir [79-84].

Kromozomal anormalliklerin incelenmesinde kullanılacak test organizmasının kromozom sayısı, boyutu ve morfolojisi açısından analizi zor olmamalıdır. *Allium cepa*, *Tradescantia paludosa* ve *Vicia faba* az sayıda, göreceli olarak büyük monosentrik kromozomlara sahiptirler ve mutajenez çalışmaları için uygun test organizmaları olarak kabul edilirler. Birçok kirletici maddenin klastojenik etkisi, *A. cepa* ve *V. faba* kök hücrelerinde birkaç araştırmacı tarafından mikronükleus yöntemi ile incelenmiştir. Bu araştırmacılar, çok sık gözlemlenen kromozomal değişiklikler (kromozom kırıkları, iki çekirdek ve mikronükleus içeren hücreler gibi) bildirmişlerdir [85].

Periferal kan lenfositleri, kolay elde edilebilir olduklarından tarama çalışmalarında kullanmak için uygun hücrelerdir. Bir kimyasal mutajene maruziyet, kan lenfositlerindeki CA'ların ve SCE'lerin frekansını artırabilir.

Periferal kan lenfositlerinde sitogenetik testlerle genetik materyalin hasar gördüğü gösterildiği zaman, sonuçlar sadece populasyon düzeyinde risk hesaplamada kullanılabilir. Populasyondaki artan CA frekansı, kanser riskinin artışının bir işareti

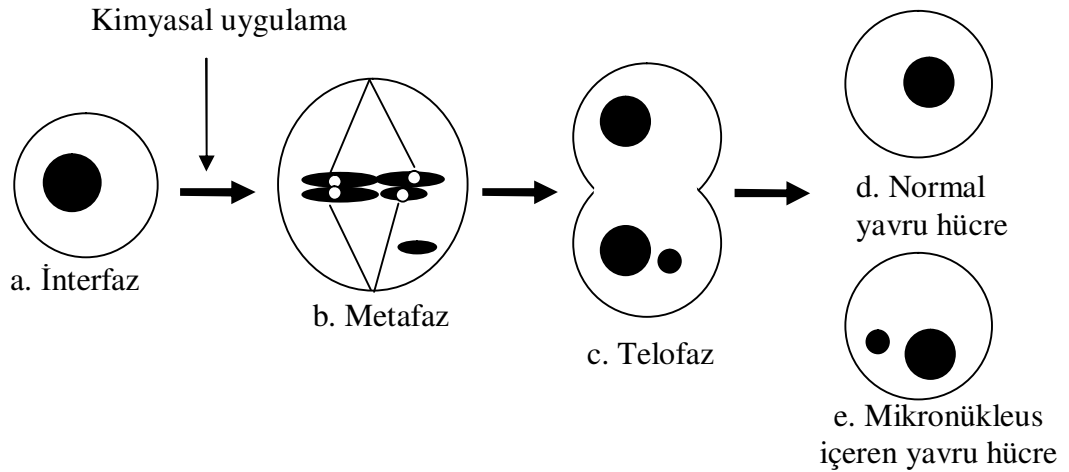
olarak dikkate alınmalıdır; fakat sitogenetik testler bireysel kanser riskinin tahminine izin vermez.

İnsanlarla yapılan çalışmalarda, çok dikkatli çalışma düzenleri gereklidir. Çünkü bireyler arası farklılıklar biyolojik cevabı etkileyebilir. Bu tip çalışmalar oldukça yorucu, birçok yönden zor ve dikkatli bir çalışma öncesi planlama gerektirir.

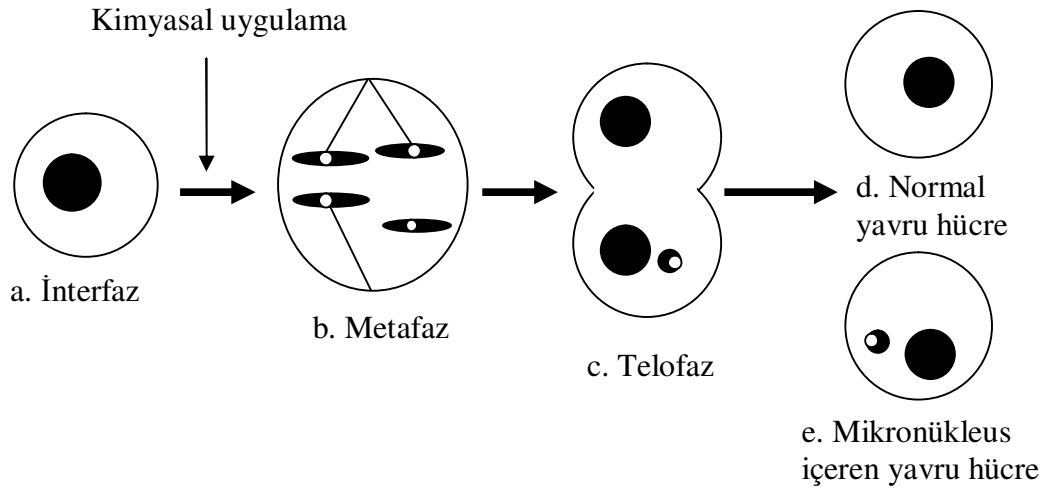
Sitogenetik biyotakip çalışmalarında dikkat edilmesi gereken noktalar; preparatların incelenmesi ve besiyeri, sıcaklık, kimyasalların konsantrasyonu gibi kültür şartları ile ilgili teknik faktörleri içerir. Ayrıca örnek alma zamanı, kromozom aberasyonunun verimini ve T- ve B-lenfositlerinin alt popülasyonundaki değişiklikler aracılığıyla SCE insidansının bulgularını etkileyebilir. Mikronükleus analizlerinde de metodolojik farklılıklar (sitokalazin-B ile oluşturulan iki çekirdekli hücrelerin kullanımı gibi) sayılan MN sayısını etkileyebilir [71].

### **2.3.1.1. Mikronükleus (MN) ve MN Testi**

Mikronükleus, asentrik kromozom parçalarının oluşmasına neden olan yapısal kromozom hasarlarından (Şekil 2.5) veya tam bir kromozom kaybına neden olan mitotik hedeflerdeki hasardan oluşan (Şekil 2.6), hücrenin ana çekirdeğinden ayrı, büyüklüğü ana çekirdeğin 1/3-1/16'sı arasında değişebilen oluşumlardır. Mikronükleusları oluşturan kromozom parçaları, DNA'da doğrudan çift zincir kırılmaları, tek zincirdeki kırıkların hücre replikasyonundan sonra çift zincir kırıklarına dönüşmesi veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu ortaya çıkabilir. İki kromozomdaki kırıkların yanlış tamir edilmesi, bir disentrik kromozom ve bir asentrik kromozom parçasının olduğu asimetrik kromozom düzenlenmelerine neden olabilir. Genel olarak bir hücre içinde bir MN oluşmasına karşın, genotoksinin etkisine bağlı olarak bazen bu sayı iki ya da daha fazla olabilir [75, 86-88].



Şekil 2.5. Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Asentrik kromatid parçasının oluşumu ile sonuçlanan interfaz evresindeki (a) yapısal kromozom hasarının uyarılması, kromozomlar mitozun metafaz evresinde (b) yoğunlaştığı zaman gözlenebilir. Kromatid parçasının etrafında çekirdek zarının yeniden oluşması ile hücrenin bölünmesinden (e) sonra ortaya çıkan yavru hücrelerde bir mikronükleus (c) gözlenir (88).



Şekil 2.6. Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Mitotik aygıtı hasarlı bir hücre, mikrotübüllere bağlanamamış tam bir kromozom içerebilir (b). Hücre bölündüğü zaman, bu kromozom anafaz sırasında geri kalacaktır ve yavru hücre çekirdeğine düzgün bir şekilde ayrılamayacaktır. Bu geri kalan kromozomun etrafında çekirdek zarının da oluşması ile yavru hücrelerden birinde ortaya çıkacak olan (e) mikronükleus meydana gelir (c). Sentromerler için özel boyama teknikleri, bu mikronükleustaki sentromerin varlığını tanımlamada kullanılabilir. Bu durum, asentrik bir kromatin parçasından oluşan mikronükleus (Şekil 2.5) ile tam bir kromozomdan (sentrik parça) oluşan mikronükleus arasındaki farkı ifade eder (88).

Mikronükleus, hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun (DNA hasarı veya mitotik hedeflerdeki hasar), hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir ve metafazda gözlenen kromozom aberasyonlarının özel tipleri, DNA hasarının G0/G1 (kromozom tipi aberasyonlar) veya S/G2 (kromatid tipi aberasyonlar) fazında ortaya çıkışı hakkında bilgi verir.

Poliploidi (tüm kromozomların ekstra kopyası yada kopyaları) ve endoreduplikasyon (önceki S fazından reduplikasyon) gibi sayısal kromozom değişiklikleri metafazda doğrudan gözlenir. Bu gözlemler, bir önceki mitozda mitotik hedeflerdeki hasar (poliploidi) veya replikasyon hatalarına neden olan hasarlar hakkında bilgi verebilir. Çünkü, mikronükleus ve kromozomal aberasyonlar sadece bölünen hücrelerde incelenebilir.

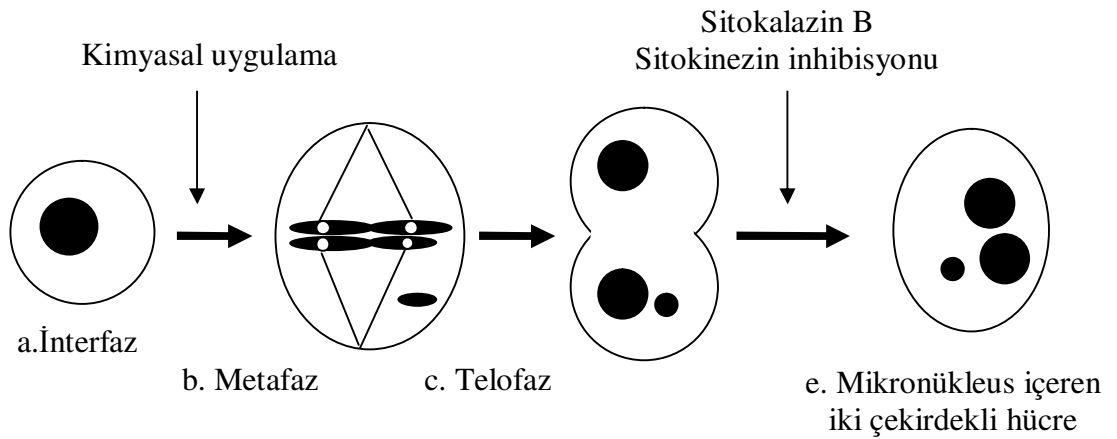
Mikronükleus, kimyasal bir madde uygulanmış hücrelerden oluşan yavru hücrelerde incelenir. Bu yapılar, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade eder. Bu durum, kimyasalla muameleden sonra hücrelerin ilk metafazlarında oluşan hasarın en iyi değerlendirildiği yer olan metafaz hücrelerindeki kromozom aberasyonlarının standart analizine terstir; bu bölünmemiş hücrelerdedir. Yavru hücrelere geçmiş metafazdaki aberasyonları (örneğin resiprokal translokasyon) değerlendirmek için floresan in situ hibridizasyon (FISH) kromozom boyaması gibi özel boyama yöntemlerini kullanmak gerekir [88].

Mikronükleus testi terimi, ilk kez 1970'li yıllarda Boller ve Schmidt [89] ile Heddle [90] tarafından önerilmiştir. Bu test, genotoksik etkiyi belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bazı kromozom anormalliklerinin tespit edilmesinin zor olduğu diğer metodlara göre daha uygun olması, daha çok sayıda hücrenin incelenebilmesi ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlaması nedeni ile, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak farklı ajanların mutajenik etkilerini değerlendirmek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır [91-93].

MN testi ile genotoksik ajanların mutajenik etkileri tespit edilirken, kullanılan test gruplarındaki MN oranı kontrol gruplarından daha fazla çıkar ise test edilen maddenin mutajenik olduğuna, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir farklılık meydana

gelmemişse mutajenik olmadığına karar verilir. Eğer uygulanan madde mevcut MN oranında azalmaya sebep oluyorsa maddenin anti-mutajenik olduğu anlaşılır. Ayrıca uygulanan maddenin toksik dozunun artmasıyla birlikte artan MN oluşumuna karşın, sonradan bir azalma meydana geliyorsa o zaman da aşırı toksik dozdan hücre ölümlerinin gerçekleşmeye başladığı düşünülebilir [94-96].

1985 tarihinde, Fenech ve Morley [86, 97] kültür ortamındaki hücelere sitokalazin B ekleyerek bölünen hüceleri tanımlamak üzere bir yöntem geliştirdiler. Sitokalazin B *Helminthosporium dematioideum*'un bir metabolitidir; sitokinezi bloklar, fakat çekirdek bölünür ve çekirdek bölünmesi geçiren hücelerden iki çekirdekli hücreler oluşur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücrenin oluşumu [88].

Sitokalazin B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikrofilamentleri oluşturacak aktin polimerizasyonuna neden olan plazma membranındaki molekül ağırlığı büyük yapılara bağlanarak sitokinezi inhibe eder. İki çekirdekli hücrelerdeki mikronükleusların sayılması ile araştırmacılar hücrenin bir kez bölünmüş olduğunu ispatlamış olurlar. Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücreler/iki çekirdekli hücrelerin oranı, mikronükleuslu hücrelerin frekansının doğru ölçülmesini sağlar. Frekans şöyle hesaplanabilir: mikronükleus içeren hücreler/toplam hücre sayısı (bölünmemiş ve MN oluşturma olasılığı olmayan hücreleri içerir).

Kromozom aberasyonlarının özel tiplerinin tanımlanabildiği ve ekstra kromozomların (örneğin poliploidi) varlığının kolaylıkla görülebildiği metafazda, mikronükleusun

kromozom içeriği doğrudan gözlenemez. Çünkü, çekirdek membranı birçok kromozom veya kromozom parçasının etrafında yeniden oluşabilir; bu nedenle bir MN'de birçok kromozom parçası bulunabilir. MN sayıları ile kromozom aberasyonunun derecesi her zaman eşit olmayacağı için, bir hücredeki kromozom hasarının miktarı tam olarak ölçülmek isteniyorsa MN testi bu noktada yetersiz kalır. Ayrıca, tüm kromozom aberasyonlarının MN oluşturması beklenemez. Asentrik kromatin parçaları oluşturan kromozom aberasyonlarının MN oluşturma olasılığı daha yüksektir, çünkü asentrik parçaların mitotik iğe bağlanması ve düzgün bir şekilde ayrılması sözkonusu değildir [88].

MN'li hücrelerin frekansını etkileyebilecek diğer faktörler:

1. MN'li hücrelerin daha fazla bölünmesi. Yavru hücelere MN ayrılması rastgele olduğu için, bir MN bulunduran ana hücrenin bölünmesi ile sadece bir yavru hücre mikronükleusu alacaktır ve diğer yavru hücre bir MN alamayacaktır. Bu da MN'li hücrelerin frekansını düşürecektir. Aksine, çok sayıda MN içeren ana hücre varsa, her iki yavru hücre de MN alacaktır, bu da MN içeren hücrelerin frekansını artıracaktır.
2. MN yapısındaki DNA, hücresel fonksiyonlar için esansiyel ise, MN'li hücrelerin tekrar tekrar bölünmesi öldürücü olabilir. Hücre ölümleri de gözlenen hasarın frekansını düşürür.
3. Mikronükleusun ana çekirdekle yeniden birleşmesi. Sonraki bölünmeler süresince, MN'den kromozom veya kromozom parçalarının sonraki telofaz boyunca ana çekirdek ile birleşme olasılığı vardır. Bu da popülasyondaki MN'li hücre frekansını düşürür.
4. Bir hücreden mikronükleusun çıkarılması. Bazı MN'ler, özellikle tam bir kromozom içeren daha büyük MN'ler, hücreden çıkarılabilir; bu da MN frekansını düşürür. Çoğalan DNA içeren MN, hücreden uzaklaştırılabilir.

Bu faktörlerden dolayı, MN'li hücrelerin frekansı, metafazdaki aberasyonlu hücrelerin frekansından daha az bulunabilir. Bu durum, metafaz testleri ile MN testlerinin sonuçları karşılaştırılmak istendiğinde önemli bir sorun ortaya çıkarır.

Mikronükleuslar kromatin kaybı sonucunda oluştuğu için, özellikle kayıp kromatin, tümör baskılayıcı genler gibi kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili bir gen ya da genleri yapısında bulunduruyorsa, bu bir risk göstregesi olabilir. Ancak, mikronükleusların biyolojik önemi ile ilgili henüz yeterli bilgiler elde edilememiştir. Kanser gibi hastalıklarda biyobelirteç olarak yararlarının etkinliği henüz tespit edilmemiştir [88].

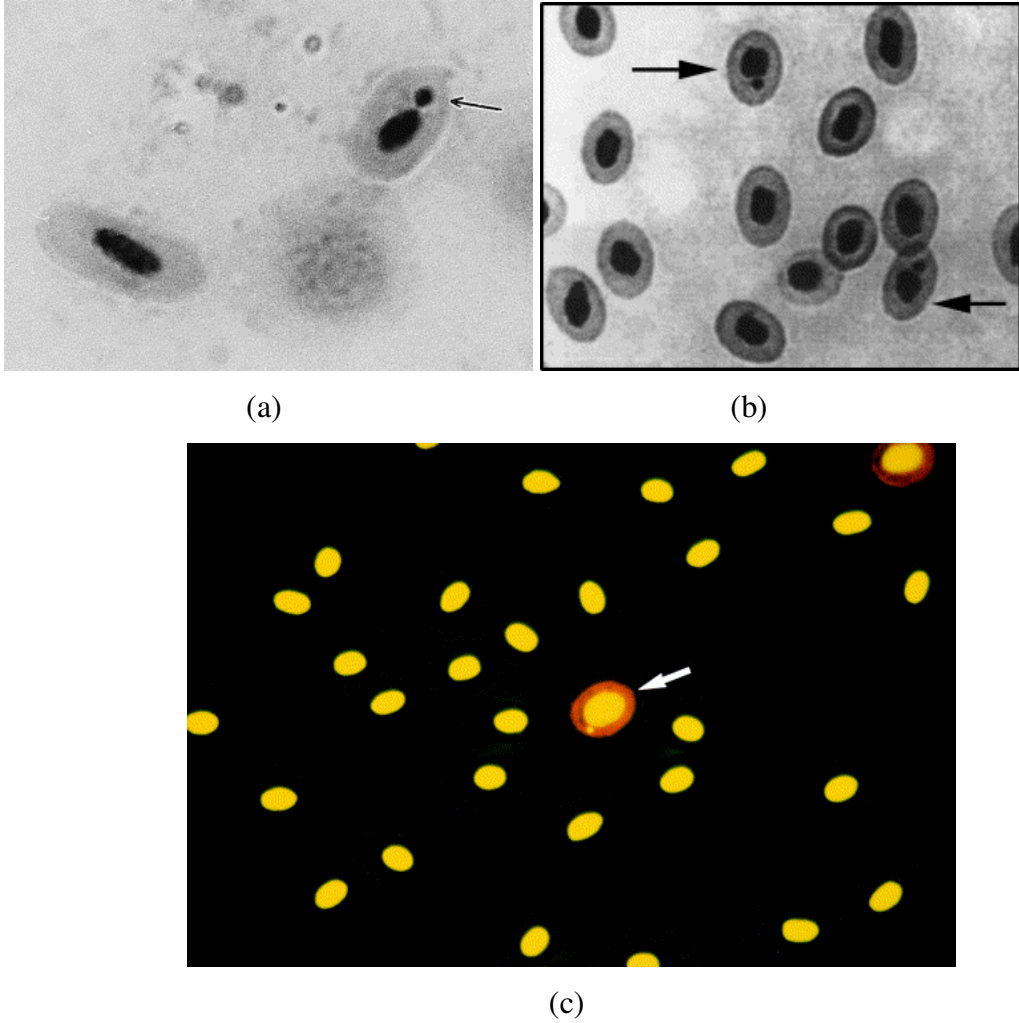
MN testi daha çok kan hücrelerinde ve kemik iliği hücrelerinde uygulanan bir yöntemdir (Şekil 2.8) [98-100]. Fakat bunların yanı sıra çeşitli çalışmalarda karaciğer, akciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, embriyo, ağız epitel hücreleri, üriner epitel hücreleri, deri fibroblastları ve yumurtalık hücreleri de kullanılmıştır. Farklı hücre çeşitlerinde uygulanabilen MN testi, farklı organizmalar üzerinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla insan lenfositleri, fare, sıçan, balık, kurbağa, midye, salyangoz ve bitkiler test organizması olarak kullanılmıştır [94, 95, 101-105].

Balıklarda MN testi, aflatoksin B1, PCB, benzopiren, kadmiyum, krom, civa, selenyum, mitomisin C, siklofosfamid, ve X-ışınının genotoksik potansiyelini değerlendirmede başarıyla kullanılmıştır [106].

Test organizması olarak balıkların kullanıldığı genotoksisite çalışmalarında, SCE gibi analizleri içeren metafaz teknikleri, birçok balık türü için pek kullanışlı değildir. Çünkü balık kromozomlarının genellikle oldukça küçük olmaları, sayılarının fazla olması ve poliploidinin sıkça görülmesi nedeniyle bu tür sitogenetik çalışmalarda çeşitli zorluklar meydana gelmektedir [78]. Buna karşılık birçok balık türünde eritrositlerin oldukça iri olması ve büyük bir nükleus bulundurmasından dolayı balıklarda MN incelemeleri daha kolay ve hızlı yapılabilmektedir [94]. Bu nedenle, bir çok fiziksel ve kimyasal maddenin balıklar üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılmasında MN testi sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur [10, 95, 107-113].

Periferal kan örneklerinde eritrositler ile yapılan çalışmalar oldukça yaygındır. Eritrositleri üreten dokular hemopoietik organlardır. Balıklarda, esas olarak sefalik böbrek hemopoietik organdır; ancak tek hemopoietik organ değildir. Örneğin, Agnatha'da intestinal hemopoez; Chondrichthyes, Dipneustei ve bazı teleostlarda splenik hemopoez gözlenir. *Perca fluviialis*'de dalak, tek hemopoez yeridir. Hemopoez için ikincil yerler; timus ile kalp ve kan damarlarının endotelidir [106].





Şekil 2.8. Üç ayrı balık türüne ait periferel kan eritrositlerindeki mikronükleus oluşumları; (a) *Cheirodon interruptus interruptus* (b) *Garra rufa* (c) *Cyprinus carpio* [98-100].

Hemopietik organlardaki mikronükleuslu eritrositler, hücre siklusuna eşit bir zaman boyunca meydana gelen genotoksik bir hasarı ifade ederken, periferel dolaşımdaki eritrositler, dolaşım eritrositlerinin yaşam döngüsüne eşit bir zamanda meydana gelen olayları yansıtır. Bu nedenle, periferel kan örneklerinde MN testi, özellikle kronik maruz kalma şartlarının bir göstergesidir. MN testi, sadece mikronükleuslu eritrosit frekansının gözlenmesini değil, aynı zamanda bu frekansların değişimleri ile ilgili çalışmaları da kapsar. Karşılaştırma, kontroller ve maddeye maruz kalan hayvanlar arasında yapılır [106].

OECD'nin bir deklarasyonunda: “dalak tarafından mikronükleuslu eritrositlerin uzaklaştırılmadığı türlerin kullanılması uygundur” denilmektedir [114]. Mikronükleusların splenik uzaklaştırılması, birkaç türde farklı metodlarla gösterilmiştir [115-117]. Bazı türlerde dalak kırmızı pulpu, pulp toplardamarı ile drene edilir; diğer türlerde pulp sinüsler görülür. Küçük toplardamar delikleri, eritrositlerin geçmesine izin verecek kadar büyük iken, pulp sinüslerin duvarında eritrositlerin sızabileceği dar interendotelyal yarıklarla delikler açılmıştır. Mikronükleuslu eritrositler, bu yarıklardan geçebilir, fakat sert oluşumlar (mikronükleus) geçemez. Memeliler haricindeki türlerin kırmızı pulplarında, çekirdekli eritrositler interendotelyal yarıklardan geçemeyeceği için sinüsler yoktur [106].

### **2.3.1.1.1. Eritropoez ve MN testi**

MN testi uygulanacağı zaman kullanılacak test organizmasında, eritrositlerin yaşam döngüsü dikkate alınmalıdır.

MN testi, mitoz geçiren hücre popülasyonu gerektirir. Bu nedenle hücre döngüsünün süresi bilinmelidir. Bu süre, türler arasında farklılık gösterir. Balıklar poikiloterm hayvanlardır. Bu nedenle yaşam alanlarının sıcaklığı önemlidir. Hücreler, retikülosit evresindeyken (mutagenizde polikromatik eritrositler olarak bilinir) normokromatik eritrositlere olgunlaşacağı yer olan periferel dolaşıma salınır.

Toksik bir ajana maruz kalıdıktan sonra mikronükleuslu eritrositlerin en çok bulunduğu zaman aralığı 1-5 gündür; fakat genelde 2 veya 3 gündür. MN testinde polikromatik (olgunlaşmamış) ve normokromatik (olgun) eritrositler ayrı ayrı sayılmalıdır. Periferel kandaki mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin frekansı sefalik böbrekte sayılan frekansa bilgi sağlayacak düzeyde analogtur. Farklı olarak, mikronükleuslu normokromatik eritrositlerin frekansı dolaşımdaki eritrositlerin yaşam döngüsüne eşit bir zamanda meydana gelen olaylar hakkında bilgi verir. Balıklarda, bu süre memelilerden daha uzundur: örneğin aynalı sazanda 310 gündür.

Bazı genotoksik ajanlar, belirli derişimlerde eritropoezin durmasına neden olur. Bu nedenle, sadece eritrosit üretimi değil, aynı zamanda mikronükleuslu eritrosit oluşumunun sonlanması sonucunda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Diğer

tarafından, deney hayvanından çok sık aralıklarla kan alınırsa eritropoez uyarılır; sonuçta periferik dolaşım polikromatik eritrositlerin baskınına uğrar. Bu da, önceden oluşmuş mikronükleuslu eritrositlerin frekansını düşürerek seyreltir [106].

### 2.3.1.1.2. Test protokolleri

Mikronükleus testi iki şekilde uygulanabilir: İlk yol, hayvanlara bir test kimyasalının bir kez uygulanması ve örneklerin en az iki kez alınması yoluyla yapılır. İlk örnek uygulamadan sonraki 24 saatten önce alınmaz; sonraki örnek 48. saatte alınır. 3 doz düzeyi yanında pozitif ve negatif kontroller de gereklidir. İkinci bir yaklaşım da, hayvanlara iki veya daha fazla ardışık günde uygulama yapılır ve kemik iliği için son uygulamadan sonraki 18-24 saatler arasında, periferik kandan da 36-48. saatler arasında olmak üzere örnekler bir kez alınır. Kemik iliği hücreleri, genellikle femur veya tibia dan; periferik kan örnekleri ise rutin olarak kuyruk veninden sağlanır.

Deneyde kullanılacak türler, karyotipleri de dikkate alınarak seçilmelidir. Teleost balıkların çoğu, küçük ve çok sayıda kromozom ile karakterizedir. Klastogenik bir olaydan sonra oluşan mikronükleusların boyutlarının çok küçük olması olasıdır ve ışık mikroskobu altında görülemeyebilir. Bu nedenle, daha az sayıda, fakat daha büyük kromozomlu türler, *Aphyosemion christyi* ( $2n = 18$ ), *Galaxias maculatus* ( $2n = 22$ ), *Nothobranchius rachowi* ( $2n = 16$ ), *Spharichthys osphoromoides* ( $2n = 16$ ), *Umbra limi* ( $2n = 22$ ) ve *Umbra pygmaea* ( $2n = 22$ ) gibi türler önerilmektedir [119]. Ya da çok küçük mikronükleusların incelenmesinde floresan boyama yöntemleri kullanılmalıdır. Türler seçildikten sonra araştırmacılar; yaş, cinsiyet, sıcaklık ve beslenme gibi faktörlerin kontrol ve deney grubunda aynı olup olmadığına dikkat etmelidirler. Örneğin, beslenme faktörü, eritrosit yaşam döngüsünü etkileyebilir [120].

MN testi, farklı bölgelerden alınan hayvanların mikronükleus frekanslarını karşılaştırmak için in situ (yerinde) ya da laboratuvar ortamında yapılabilir. Bu deney ile henüz onaylanmamış yeni bir kimyasal veya karışım çalışılıyorsa, bir deney grubu ve negatif kontrol grubu yanında pozitif kontrol grubu da oluşturulmalıdır. Bu amaçla çok iyi bilinen mutajenler, siklofosamid, etilmetan sülfonat, kolşisin veya X-ışınları kullanılabilir.

Laboratuvarlarda balıklar iki hafta ortama alıştırılmalıdır. Kimyasal madde, ya tek bir doz, ya tekrarlanan dozlar, ya da devamlı (örneğin suda devamlı maddenin bulunması gibi) şekilde uygulanabilir. Kan örneklerinin alınması, tek bir kez veya tekrarlı olabilir. Eritropoezin süresi bilinmelidir. Tek bir doz kullanıldığında, sefalik böbrekten örnek alınması için en uygun zaman 2-3 gün sonrasdır. Periferal kanda mikronükleus artışının en çok olduğu zaman, teleostlar arasında çeşitlilik gösterir. Bu nedenle, tekrarlı örnekleme önerilir.

Örneklerin alınmasından sonra preparatlar kodlanmalı ve sayma işlemi aynı kişi tarafından yapılmalıdır. Sayılacak alan mikroskopta büyütülmeden ayarlanmalı, sonra mikronükleuslu hücre frekansı 1000x mercekle sayılmalıdır. Polikromatik ve normokromatik hücreler ayrı ayrı sayılmalıdır. Eritrositlerin bu iki türü arasındaki oran, sitotoksisite indeksi olarak kullanılır. Akridin orange boyama, polikromatik ve normokromatik balık eritrositlerinin ayırt edilmesinde en etkin yöntemdir [121]. Her hayvandan en az 2000 eritrosit sayılmalıdır. Ancak, birçok tür için spontan mikronükleus frekansı çok düşük olduğundan, zayıf bir genotoksik ajan test ediliyor ise, istatistik analizlerin gücü zayıflayacaktır. Bu durumda, her hayvandan daha çok sayıda hücre sayılmalıdır [112].

### 3. BÖLÜM

#### GEREÇLER VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Aseton, % 95 etanol, entellan, wright boyası (Merck, Almanya); ksilen (British Drug Houses Ltd., İngiltere); metanol (Riedel De-Haen, Almanya), tartrazin, immersiyon yağı (Sigma Chemical Company, ABD); bunların yanında, sarf malzemesi olarak lam, lamel, pastör pipeti, enjektör, çeşitli cam malzemeler, 100 asalık renkli fotoğraf filmi kullanıldı.

##### 3.1.2. *Cyprinus carpio* L., 1758

---

Alem	Animalia
Şube	Chordata
Üst sınıf	Pisces
Sınıf	Actinopterygii
Takım	Cypriniformes
Familya	Cyprinidae
Cins	<i>Cyprinus</i>
Tür	<i>C. carpio</i>

---

*Cyprinidae* familyası 29 cins, 62 tür ve 22 alt tür ile ülkemizde yaşayan kemikli balıkların büyük bir kısmını oluşturur. Çok değişik coğrafi yapıların görüldüğü ülkemizde 149 değişik türde balığın 26 havzada dağılım gösterdiği belirtilmektedir [122].

*Cyprinidae* familyasının en çok bilinen türlerinden biri olan sazan (*Cyprinus carpio* L.,1758), iç sularımızın hemen tamamında yaşayabilen, suni göletlerde üretilebilen ve halkımız tarafından bol miktarda tüketilen, ekonomik öneme sahip bir balık türüdür.

Uzun gövdeli; solucan, böcek larvaları ve bitkilerle beslenen bir dip balığıdır. 1,5 metre boyunda, 35 kg ağırlıkta olanları vardır. Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi haricinde Türkiye'nin her bölgesinde bulunur.

Bu familyadaki balıkların ortak özellikleri, çenelerinde dişlerinin bulunmaması, bunun yerine kursak kemiklerinin üstünde farinks dişlerinin olmasıdır (bunlar ayrıca birbirlerine çok benzeyen sazangiller türlerini birbirlerinden ayırt etmek için incelenir). Tam gelişmiş bir mideleri yoktur, sadece bazen incelen ve kalınlaşan bir bağırsakları vardır. Pullu ve puluz birçok çeşidi vardır. Pullu türleri iri pulludur. Renk ve biçimleri yaşadıkları ortama göre değişir. Genellikle sırtı koyu yeşil, yanları ve karın altı yeşilimtrak kahverengidir. Küçük ağızlı, kalın ve oynak dudaklıdır. Üst çenelerinden dört bıyık sarkar. Bıyıkları dokunma organı olarak görev yapar.



Şekil 3.1. *Cyprinus carpio* L., 1758.

**Tuza dayanıklılığı:** Sazan balığı, genellikle tatlı sularda yaşar. Tuz derişimi yüksek olan deney şartlarında, genç balıkların beslenme oranları ve gelişim hızları azalır. Ancak, hafif tuzlu sulara uyum sağlayabildikleri de rapor edilmiştir.

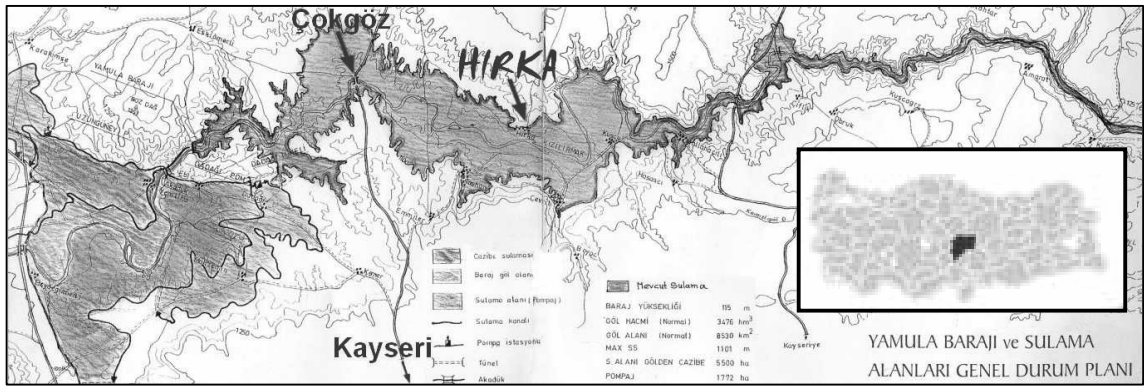
**Sıcaklığa dayanıklığı:** Genellikle ılıman sularda yaşarlar. Ancak yumurtlamak için sıcak suları tercih ederler. Yumurtlamak için gerekli olan en düşük sıcaklık 17 °C olarak rapor edilmiştir [123].

*Cyprinus carpio*'nun karyotip analizlerinde farklı bulgular elde edilmiştir. Al-Sabti [124], kromozom sayısını  $2n=98$  olarak tespit etmiştir. Rukhsana ve Malgorzata [125],

kromozom sayısını  $2n=100$  olarak bulmuşlardır. Pekol yapmış olduğu iki çalışmasında [126, 127] *Cyprinus carpio*'nun kromozom sayısını  $2n=100$  olarak bulmuştur.

Bu çalışmada kullanılan *Cyprinus carpio* türlerinin teşhisi, Geldiay ve Balık [128] tarafından, Türkiye tatlı su balıkları için hazırlanmış olan anahtardan yararlanılarak, metrik ve meristik karakterlere göre yapıldı.

Balıklar Yemliha (Yamula) Baraj Gölü'nden ıgırıp ve germe ağlar kullanılarak yakalandı. Yemliha Barajı, Kayseri'nin 30 km kuzeybatısında, Yemliha Kasabası civarında, Kızılırmak nehri üzerinde yer almaktadır [129].



Şekil 3.2. Yemliha (Yamula) Barajı haritası.

Yakalama sırasında balıkların özellikle ağdan çıkarılırken zarar görmemelerine dikkat edildi. Yakalanan balıklar daha sonra havalandırılmalı taşıma bidonlarına konuldu ve hızlı bir şekilde laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen balıklar, 3 gün süreyle dinlendirilmiş çeşme suyu bulunan 50x100x50 cm ebatlarındaki havalandırılmalı akvaryumlara yerleştirildi. Her deney grubu için akvaryumlara 5'er balık örneği konuldu. Akvaryumların sıcaklığı ise 22-23 °C'ye ayarlandı.

### 3.1.3. Aletler

Akvaryum, manyetik karıştırıcı, mikroskop (Olympus BH-2), hassas terazi (Mettler), buzdolabı.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan akvaryum.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Tartrazinin Uygulanması

Akvaryuma yerleştirilen balıklar, stresten uzaklaşmaları ve laboratuvar ortamına uyum sağlamaları için 3-4 gün bekletildi. Bu süre içerisinde balıklar belirli bir zaman aralığı dikkate alınarak günde bir defa yemlendi. Deneyden 24 saat önce yem verme işlemi durduruldu ve deneyler süresince de balıklara yem verilmedi [130]. Deneylerde, eşey ayrımı gözetilmeksizin yaşları 1-1+, ağırlıkları 83-100 g ve boyları 18-21 cm arasında değişen sağlıklı *Cyprinus carpio* örnekleri kullanıldı. Her bir tartrazin derişimi için 15, herbir zaman dilimi için 5 balık deneye alındı. Tüm çalışmada toplam 80 balık incelendi.

Bu çalışmada statik akut deney yöntemi kullanıldı. Bu yönteme göre deney çözeltisi (içinde uygun derişimde tartrazin çözülmüş su) ve balıklar akvaryuma konuldu; deney süresince bekletildi [130].



Bu çalışmada, uygulamalar hem zamana, hem de derişime bağlı olarak yapıldı. Tartrazin derişimleri, tartrazinin ADI değeri dikkate alınarak hesaplandı [47]. Akvaryumlara 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L derişiminde tartrazin eklendi. Balıklar 24, 48 ve 72 saat süre ile belirtilen derişimlerdeki tartrazine maruz bırakılarak yaşıatıldı. Kontrol grubundaki balıklar da 3 gün dinlendirilmiş çeşme suyunda hiç bir maddeye maruz bırakılmadan aynı deney grubu gibi 24, 48 ve 72 saat süre ile yaşıatıldı.

### **3.2.2. Wright boyasının hazırlanması**

1 gram Wright (Merck) tartıldıktan sonra 15-20 ml metil alkolle havan içerisinde ezildi ve hacim 400 ml olana kadar metil alkol ilave edildi. Çözelti 1-2 gün +4 °C'de bekletildikten sonra başka bir kaba süzüldü. Hazırlanan boya koyu renkli bir cam şişeye konularak ağzı iyice kapatıldı ve +4 °C'de saklandı [130].

### **3.2.3. Preparatların hazırlanması ve boyanması**

Uygulamalar sonucunda, balıkların kuyruk veninden elde edilen kan örnekleri kullanılarak yayma preparatlar hazırlandı.

Bunun için lam üzerine bir damla kan kondu ve bir lamelle 45<sup>0</sup>'lik açı yapacak şekilde yayma yapıldı. Her bir örnek için 3 yayma preparat hazırlandı; 3 gün süre ile havada kurumaya bırakıldı. Kurutulan preparatlar 1 dakika metanol ile fikse edilerek yatay platform üzerine dizildi ve üzerine Wright boyası damlatılarak 4-5 dakika bekletildi. Ardından distile su ilave edilerek 5-7 dakika beklendi. Lamaların kenarlarında yeşilimsi metalik bir renk ve ortada kırmızı-pembe arası bir renk görülene kadar boyandı. Preparatlar distile su ile yıkanarak aseton ve ksilende 1'er dakika tutuldu. Havada kurumaları beklendikten sonra entellan (kanada balsamı) ile kapatıldı [130].

### **3.2.4. Mikronükleus İncelemeleri**

Preparatlar hazırlandıktan sonra sayımların daha kolay yapılabilmesi için her preparat rastgele 4 bölgeye ayrıldı ve her bölgeden 250 eritrosit hücresi araştırma mikroskopunda tarandı. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı. Her örnekten 3000 hücre, her tartrazin derişimi için toplam 15000 hücre sayıldı.

MN'ler morfolojik olarak çekirdekle aynı ancak çekirdekten küçük yapılardır. MN incelemelerinde aşağıdaki özelliklere dikkat edildi:

- MN'ler kırılğan olmamalı, böylece boyanan partiküller gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilmelidir.
- MN'ler ana çekirdek ile bağlantılı olmamalıdır.
- MN'ler ana çekirdeğe temas edebilir; ancak üst üste çakışmamalı ve mikronükleer sınır, çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
- MN'ler genellikle çekirdek ile aynı yoğunlukta boyanmalıdır; ana çekirdek bazen daha yoğun boyanabilir.

Bu çalışmada, MN incelemeleri yapılırken ana çekirdeğin yanında MN bulunan eritrositler kaydedildi. Ayrıca boya partikülleri gibi diğer bazı yapılar sayımlar sırasında yanlışlara sebep olabileceğinden, ilgili yapıların tam olarak MN özelliği taşıyıp taşımadığına dikkat edildi. Özellikle ana çekirdek ile aynı kırınımı gösteren yapılar MN olarak kaydedildi; şüpheli durumda olanlar dikkate alınmadı [10, 131, 132].

### **3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik analizleri**

Bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'dan elde edilen örnekler mikronükleus testi kullanılarak ve doz-cevap ilişkisi dikkate alınarak değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde;

- Kontrol grupları ile her bir deney grubu kendi içerisinde,
- Aynı sürelerde tartrazine maruz bırakılan balıkların farklı derişimleri,
- Bir dozun üç farklı süresi kendi aralarında karşılaştırıldı.

İstatistiksel analizde SPSS 10.0 versiyonu kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Eritrosit MN sayıları tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Gruplar arası istatistik değerlendirmesi Tukey çoklu karşılaştırma testi, Duncan ve Dunnett testleri ile yapıldı.  $P < 0,05$  seviyesinde bulunan farklar anlamlı olarak kabul edildi. Bütün veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi.

## 4. BÖLÜM BULGULAR

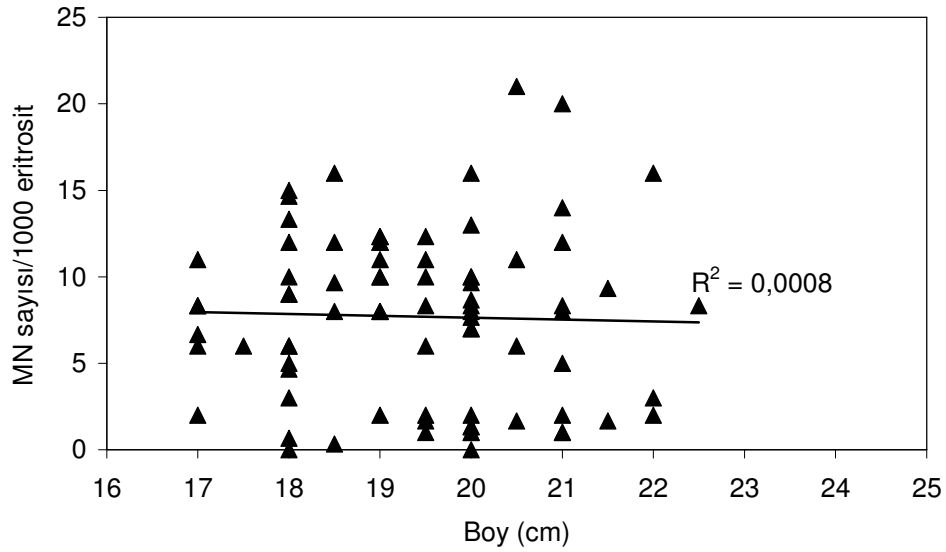
### 4.1. *Cyprinus carpio* L., 1758 örneklerinin boy ve ağırlıklarının MN oluşumunda etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada, farklı derişimlerde uygulanan tartrazinin genotoksik etkisini incelemek amacı ile, her bir zaman dilimi için 5 balık ve tüm gruplarda toplam 80 balık incelendi. Balıklar arasında, cinsiyet, boy ve ağırlık gibi özelliklerin, mikronükleus oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amacı ile tüm deney gruplarındaki deneklerin boy ve ağırlıkları tayin edildi. Bu gruplarla ilgili bulgular Tablo 4.1.'de görülmektedir.

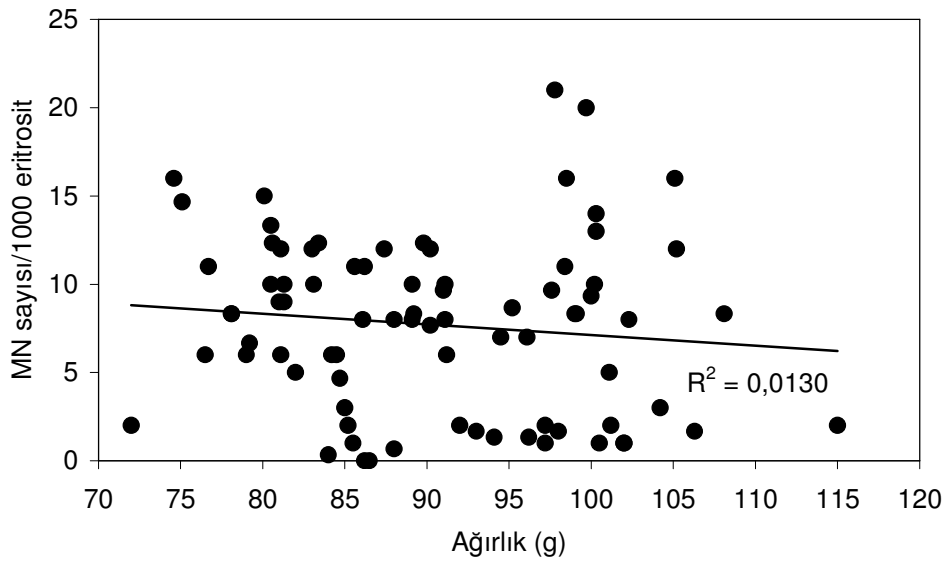
Tablo 4.1. Deney gruplarına ait cinsiyet, boy ve ağırlık verileri.

Tartrazin Derişimi (mg/L)	Zaman (saat)	Denek sayısı	Cinsiyet	Boy (cm)	Ağırlık (g)
0	0	5	♀♀♀♀♂	20,5±1,00	94,9±8,52
	24	5	♀♀♀♂♂	19,9±0,96	95,3±7,38
	48	5	♀♀♂♂♂	19,6±2,07	94,3±16,23
	72	5	♀♀♂♂♂	19,8±1,25	95,7±6,78
250	24	5	♀♀♀♀♀	19,0±1,62	87,2±8,42
	48	5	♀♀♂♂♂	17,9±0,55	83,0±3,46
	72	5	♀♀♀♀♂	20,1±1,19	95,4±5,64
500	24	5	♀♀♀♀♂	19,2±1,30	91,2±8,31
	48	5	♀♀♀♂♂	19,7±0,84	91,8±6,91
	72	5	♀♀♀♂♂	18,9±0,89	84,6±6,28
1000	24	5	♀♀♂♂♂	18,8±0,84	85,3±4,32
	48	5	♀♀♀♂♂	18,2±1,30	85,0±9,07
	72	5	♀♀♀♂♂	19,2±1,64	92,2±12,85
1500	24	5	♀♀♀♂♂	19,5±1,12	86,2±9,33
	48	5	♀♂♂♂♂	19,2±0,84	84,8±8,90
	72	5	♀♀♀♂♂	21,0±1,37	100,1±7,08

Bu çalışmada kullanılan balıkların boy ve ağırlıkları ile mikronükleus oluşumu arasındaki ilişkinin belirlenmesinde öncelikle Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'deki veri-dağılım grafikleri çizildi. Bu grafikler, çalışmaya dahil olan tüm balıkların boy ve ağırlıkları ile bu balıklardan alınan periferal kan örneklerinde tespit edilen MN sayılarına göre çizildi. Boy ve ağırlık parametreleri ile MN sayısı arasındaki regresyon katsayısı ( $R^2$ ) sırasıyla 0,0008 ve 0,0130 olarak tespit edildi.



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L tartrazin derişimleri uygulanmış balıkların boyları ve MN oluşum sayısı arasındaki ilişki.



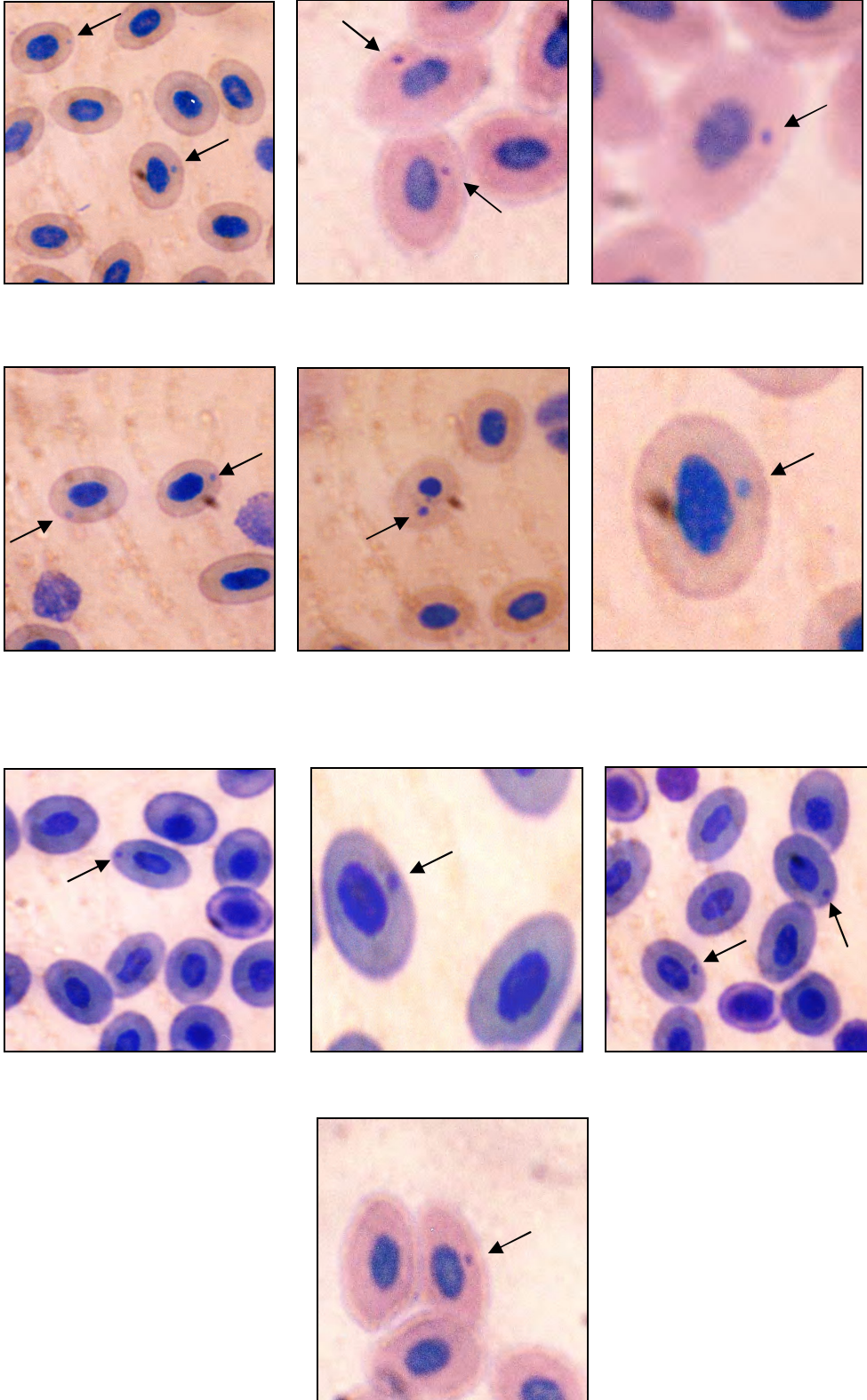
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L tartrazin derişimi uygulanmış balıkların ağırlıkları ve MN oluşum sayısı arasındaki ilişki.

Sonuç olarak, çalışmada denek olarak kullanılan balıkların ölçümle belirlenen boy ve ağırlıkları ile bu balıklarda tartrazin ile tetiklenen MN oluşumu arasında doğrusal bir ilişki olmadığı tespit edildi.

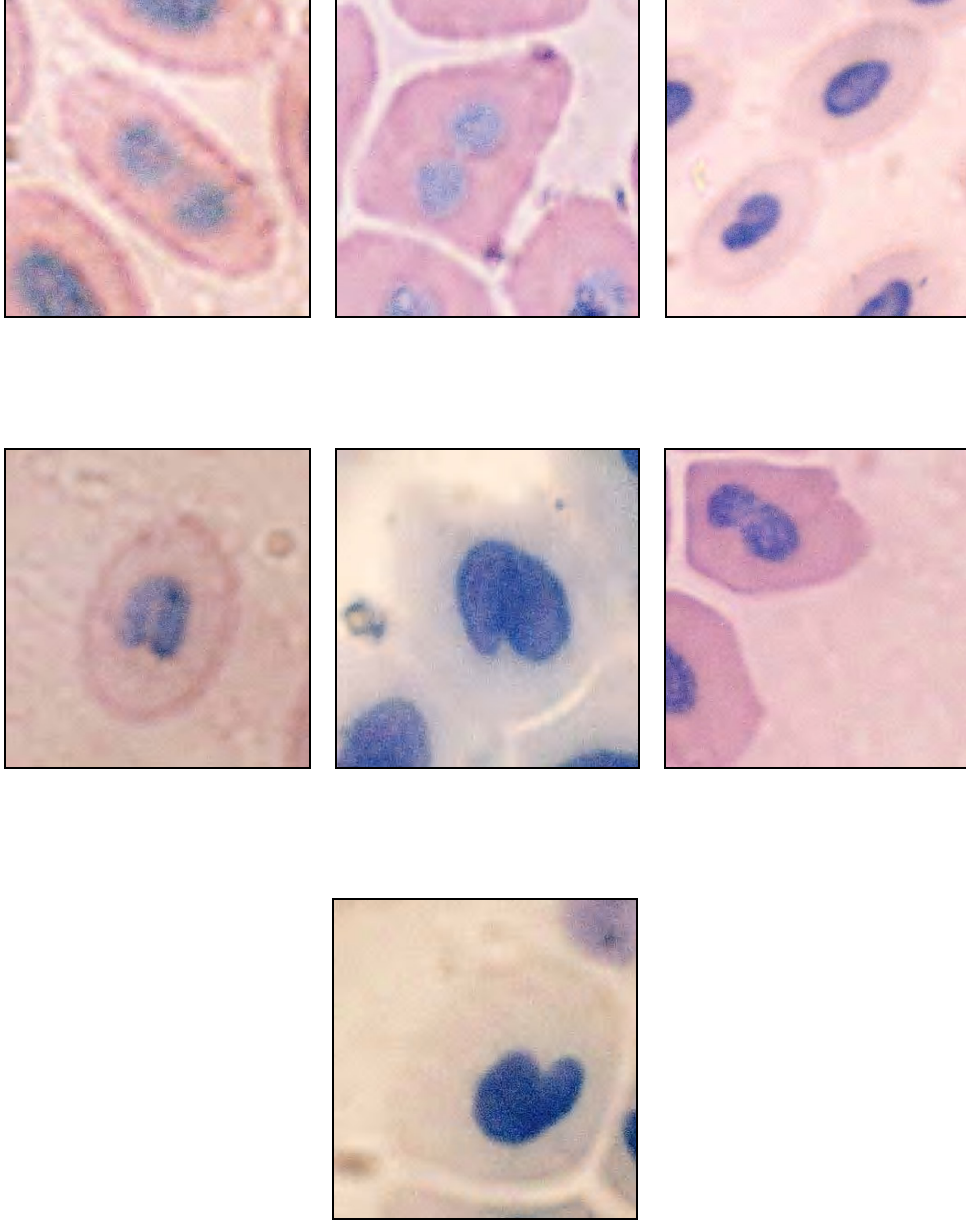
#### **4.2. Tartrazin uygulaması sonrasında *Cyprinus carpio* L., 1758'dan elde edilen eritrositlerde gözlemlenen değişiklikler**

Bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'nun periferik eritrositlerinde tartrazin uygulanmadan önce ve sonra meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde mikronükleus yöntemi kullanıldı. Kontrol grubu ile tartrazin 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L derişimlerde uygulandığı deney gruplarında, her grupta 5 denek olacak şekilde çalışıldı. Tartrazin uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra, her gruptaki 5 balıktan 3'er örnek olacak şekilde, toplamda bir deney grubu için 15 örnek alındı. Bu örneklerde, her bir örnekten 1000 hücre sayılarak toplam 15,000 hücre incelendi. Mikroskopik inceleme aşamasında elde edilen görüntüler Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

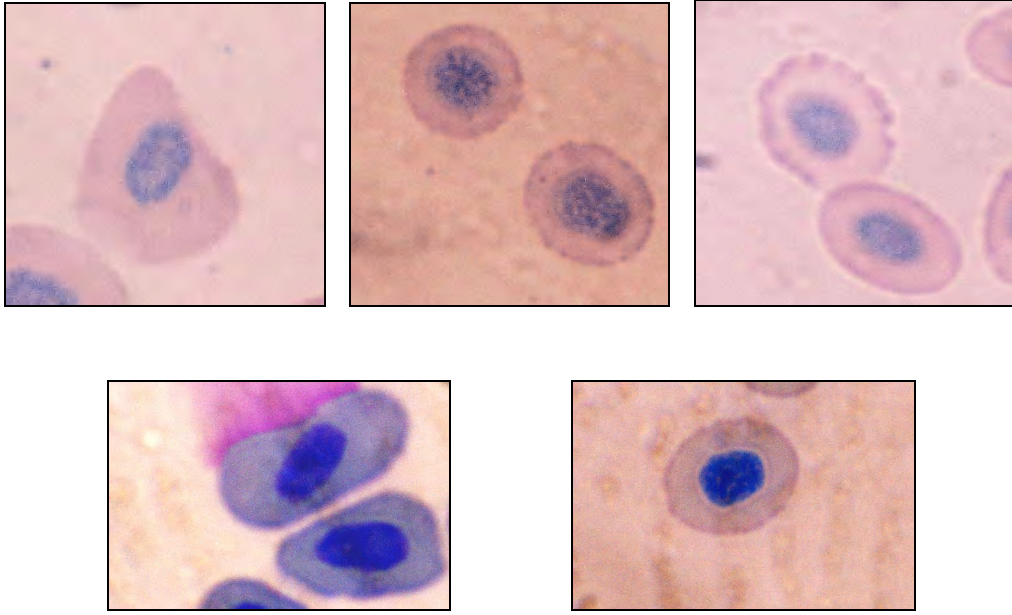
Mikronükleus incelemeleri sırasında eritrosit ve çekirdek morfolojisinde bazı anormallikler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Hücrelerdeki bu morfolojik ve yapısal değişiklikler, bu çalışmanın kapsamında olmadığından değerlendirilmedi. Ancak, MN sayımları sırasında sıklıkla bu tür yapılarla karşılaşıldı.



Şekil 4.3. *Cyprinus carpio*'nun eritrosit hücrelerinde tartrazin ile uyarılan mikronükleus oluşumları.



Şekil 4.4. *Cyprinus carpio*'nun eritrosit hücrelerinde tartrazin ile uyarılan çekirdek morfolojisindeki değişiklikler.



Şekil 4.5. *Cyprinus carpio*'da tartrazin ile uyarılan eritrosit hücrelerindeki morfolojik değişiklikler.

Bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'dan elde edilen örnekler mikronükleus testi kullanılarak ve doz-cevap ilişkisi dikkate alınarak değerlendirildi (Tablo 4.2). Buna göre; uygulama gruplarının hepsinde, MN oluşumundaki artışın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0,05$ ).



Tablo 4.2. Tartrazinin farklı derişimlerinde *Cyprinus carpio*'nun periferel eritrositlerindeki mikronükleus sayıları.

Tartrazin Derişimi (mg/L)	Zaman (saat)	Ortalama $\pm$ Standart sapma	Örnek sayısı
0	0	4,2 $\pm$ 3,42	5
	24	3,6 $\pm$ 1,95	5
	48	3,8 $\pm$ 2,49	5
	72	4,4 $\pm$ 1,52	5
250	0	4,2 $\pm$ 3,42	5
	24	17,6 $\pm$ 5,68	5
	48	19,6 $\pm$ 5,68	5
	72	25,4 $\pm$ 3,21	5
500	0	4,2 $\pm$ 3,42	5
	24	19,2 $\pm$ 4,09	5
	48	21,6 $\pm$ 5,77	5
	72	31,8 $\pm$ 5,22	5
1000	0	4,2 $\pm$ 3,42	5
	24	22,2 $\pm$ 11,14	5
	48	28,8 $\pm$ 6,38	5
	72	40,2 $\pm$ 6,22	5
1500	0	4,2 $\pm$ 3,42	5
	24	36,6 $\pm$ 6,54	5
	48	38,0 $\pm$ 5,79	5
	72	46,6 $\pm$ 15,88	5

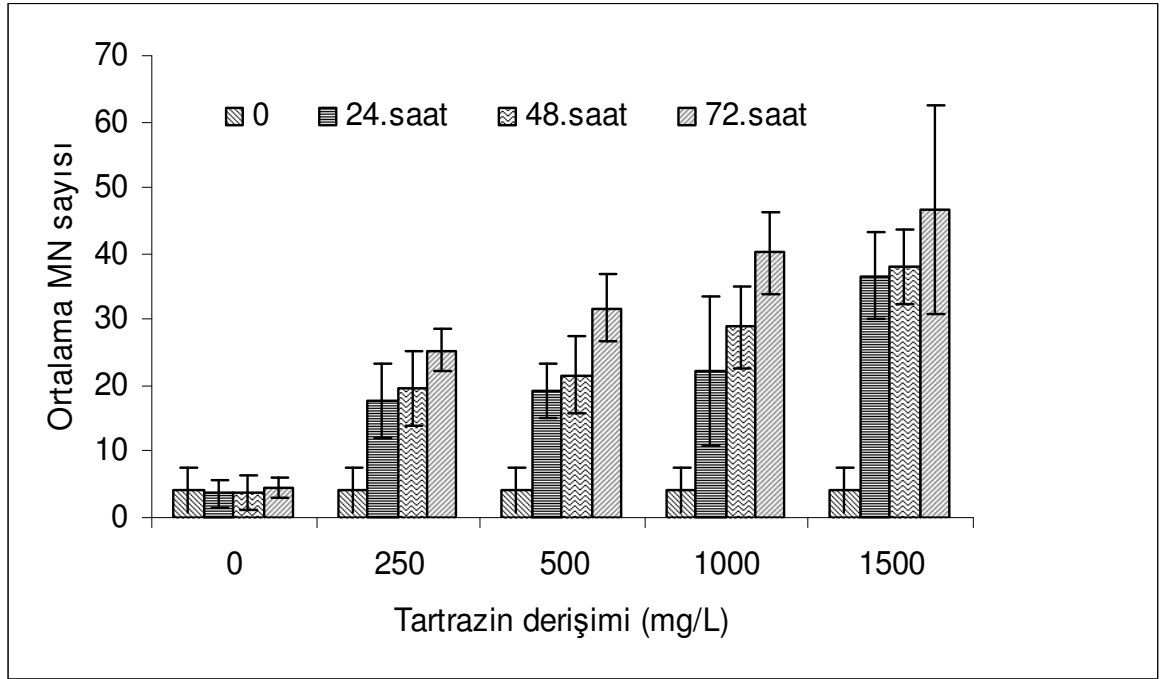
Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, kontrol grubunda incelenen tüm balıklarda toplam MN sayısı 21, negatif kontrolde 24. saatin sonunda 18, 48. saat sonunda 19 ve 72. saatte alınan örnekte de 22 olarak tespit edilmiştir. 250 mg/L tartrazin uygulandığında, kontrol grubunda 21 olan MN sayısı, 24. saatte 88'e, 48. saatte 98'e ve 72. saatte 127'ye yükselmiştir. Buradan da açıkça görülebileceği gibi, 250 mg/L tartrazin uygulanan balıklarda MN oluşumu artmaktadır.

Tablo 4.3. Tartrazin derişimi ve süreye göre oluşan toplam MN sayıları.

Tartrazin derişimi (mg/L)	Zaman (saat)			
	0	24	48	72
0	21	18	19	22
250	21	88	98	127
500	21	96	108	159
1000	21	111	144	201
1500	21	183	190	233

500 mg/L derişimde tartrazin uygulandığında ise, MN sayıları 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 96, 108, 159 olarak bulunmuştur. Diğer bir doz grubu olan 1000 mg/L tartrazin uygulaması sonucunda yine sırasıyla 111, 144 ve 201 MN oluşumu tespit edilmiştir. Son olarak, 1500 mg/L tartrazin uygulandığında da, sırasıyla 183, 190 ve 233 MN sayısı tespit edilmiştir.

Tartrazin'in dört farklı derişimde uygulanması sonucu elde edilen tüm bulgular incelendiğinde (Şekil 4.6), 250 ve 500 mg/L ile 500 ve 1000 mg/L arasındaki artışlar anlamlı bulunmazken ( $p>0,05$ ), 250 ile 1000 ve 1500 mg/L arasındaki fark ve 1000 ile 1500 mg/L arasındaki farklar anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.4).

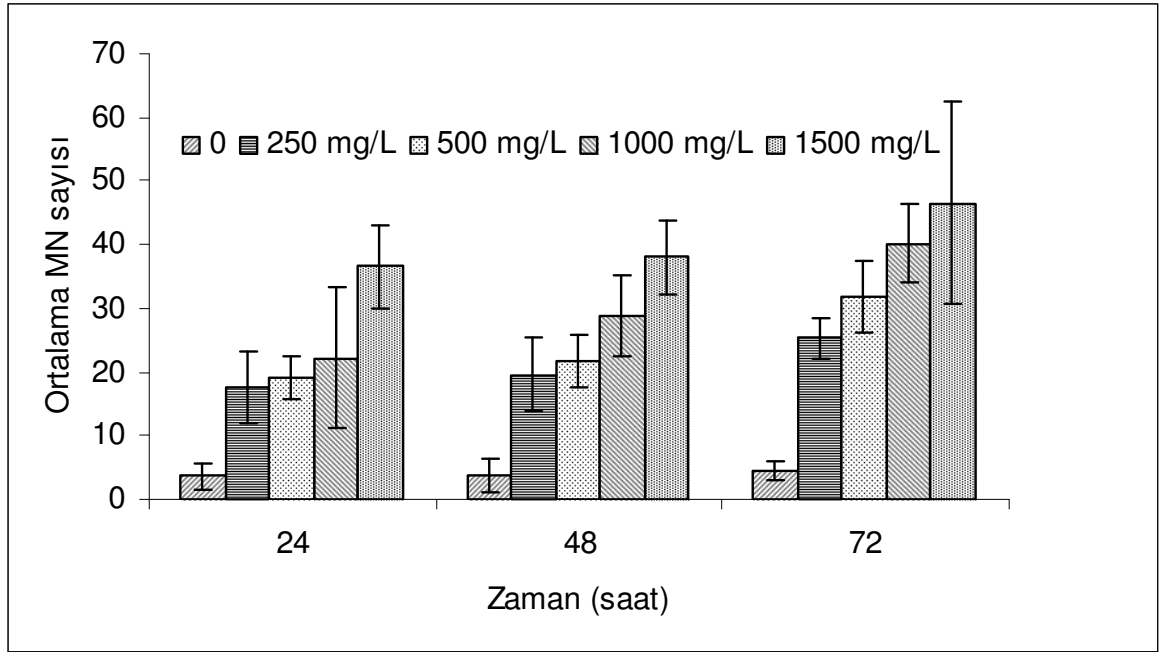


Şekil 4.6. Farklı derişimlerde uygulanan tartrazinin MN oluşumuna etkisi.

Tablo 4.4. Tartrazin derişimi ile MN oluşumu arasındaki ilişkinin istatistik değerlendirmesi

Tartrazin Derişimi (mg/L)	Örnek sayısı	Ortalama ± Standart sapma	İstatistik
0	20	4,0 ± 2,27	a
250	20	16,7 ± 9,04	b
500	20	19,2 ± 11,01	b, c
1000	20	23,9 ± 14,98	c
1500	20	31,4 ± 18,59	d

İstatistik sütununda aynı harflerle gösterilen değerlerin ortalaması arasındaki fark varyans analizi ve Duncan testine göre anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.7. Tartrazin uygulamasının zamana bağlı olarak MN oluşumuna etkisi.

Çalışmalar sonunda elde edilen tüm bulgular zaman artışı açısından değerlendirildiğinde (Şekil 4.7), kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerdeki farklar anlamlı bulunurken ( $p < 0,05$ ), 24 ile 48 ve 48 ile 72. saatler arasındaki farklar kendi içlerinde anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Ancak, 24 ile 72. saatler arasındaki farklar da anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Zamana bağlı olarak MN oluşumunun istatistiki değerlendirmesi

Zaman (saat)	Örnek sayısı	Ortalama ± Standart sapma	İstatistik
0	25	4,2 ± 3,12	a
24	25	19,8 ± 12,34	b
48	25	22,4 ± 12,55	b, c
72	25	29,7 ± 16,61	c

İstatistik sütununda aynı harflerle gösterilen değerlerin ortalaması arasındaki fark varyans analizi ve Duncan testine göre anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda maddelerinin üretimi sırasında kullanılan boyalar, istenilen kalitenin elde edilmesini sağlayarak tüketimi artırdığı için gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Herhangi bir katkı maddesinin gıdalarda kullanılabilmesi için, bu maddelerin gıda ile ilgili yasalarda onaylanmış olmasına, belirlenen miktarların üzerinde kullanılmamasına dikkat edilmelidir [133].

Gıda katkı maddelerinin insanlar üzerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesinde laboratuvarlarda yapılan toksikolojik çalışmalar oldukça önemlidir. Genellikle kimyasal genotoksisiteyi değerlendirmek için in vitro ve in vivo testlerden faydalanılır; özellikle in vivo testler bileşiklerin emilimi, dağılımı, vücuttan atılımı ve metabolizması hakkında bilgiler elde edilmesine yardımcı olur [134].

Bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'nun periferal eritrositlerinde genotoksik etkisi araştırılan tartrazin, gıda maddelerinde, kozmetik ürünlerinde ve günümüzde 124 ilacın formülasyonunda kullanılmaktadır. İnsanların günlük ihtiyaçları çerçevesinde bu ürünleri düzenli olarak tükettikleri düşünüldüğünde, toksik bir bileşiğin toksisitesinin de doza bağımlı olduğu göz önüne alındığında, her bir tüketim ürününde ayrı ayrı zararsız düzeyde bulunan katkı maddelerinin bir arada tüketilmesi ile toksik etkilerinin ciddi boyutlara ulaşması mümkündür.

Tartrazin, FDA tarafından karsinojenik ve genotoksik olmayan bir madde olarak tanımlansa da [35] bu konuda araştırmalar halen devam etmektedir. Münzner ve Wever tarafından yapılan bir çalışmada [135], tartrazinin ratlara oral yolla uygulanmasından sonra, safra ve feçes mutajenik aktivite açısından Ames testi kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada feçesde zayıf bir aktivite gözlenirken, safrada mutajenik aktivite tespit edilmemiştir. Henschler ve Wild [136], Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA 98

suşu için tartrazin verilmiş ratların idrarının mutajenik olduğunu tespit etmiştir. Amarant ve tartrazinin genotoksik etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada da [137], her iki boyanın da mutajenik ve genotoksik özelliklerinin olmadığı bulunmuştur. Davis ve ark. [138], ratlarda kronik toksisite çalışmasında (2 yıl) diyetle %0,5-5,0 tartrazin uygulamasının tümör insidansını etkilemediğini göstermiştir. Tartrazinin ADI değerinin üzerinde uygulanması ile laktasyon dönemi boyunca farelerin nörodavranışsal parametrelerinde değişiklikler tespit edilmiştir [139]. Bir başka çalışmada; amarant, tartrazin, eritrosin gibi boyaların mide, kolon ve/veya mesanede doza bağlı olarak DNA hasarlarını tetiklediği belirlenmiştir. Bu boyalar arasından özellikle amarant ve tartrazini de içeren 4 boya maddesinin, ADI değerlerine yakın miktarlarda uygulandığında kolonda DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur [77]. Patterson ve Butler tarafından yapılan bir çalışmada da [8], tartrazin uygulanmasının in vitroda memeli *Muntiacus muntjac* fibroblast hücrelerinde kromozom anormalliklerini artırdığı tespit edilmiştir.

Renk katkı maddeleri olarak kullanılan azo boyaların çoğu, laboratuvar hayvanları ile yapılan çalışmalarda karsinojenik, kısa-sürelili genotoksisite çalışmalarında ise genotoksik bulunmuştur. Bununla birlikte, karsinojenik bazı azo boyalar, in vitro testlerde azo bağı kimyasal olarak indirgenip mutajeniteye neden olan aminler açığa çıkmadıkça mutajenik özellikleri tespit edilememektedir. Amarant, Sunset Yellow, tartrazin gibi azo boyalar ile insan lökositleri ve mikronükleus testi kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu boyaların kromozom hasarlarına neden oldukları tespit edilmiştir. Tartrazinin de içinde bulunduğu grupta yer alan boyalar, karsinojenik olduğu ispatlanmasına rağmen, bu boyalar en az bir tane kısa-zamanlı testte pozitif sonuç vermiştir [140].

Bu çalışmada da, tartrazinin 250, 500, 1000 ve 1500 mg/L derişimlerde uygulandığı *Cyprinus carpio* eritrosit hücrelerinde, mikronükleus yöntemi kullanılarak elde edilen veriler değerlendirildiğinde, her dört derişim grubu ve her üç sürede (24, 48 ve 72. saatler) kontrole göre mikronükleus sayısında bir artış tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.2.). Ancak, gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında, 250 ile 500 mg/L ve 500 ile 1000 mg/L derişimler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). 250 ile 1000 ve 1500 mg/L, 500 ile 1500 mg/L ve 1000 ile 1500 mg/L arasındaki fark anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Sonuç olarak, uygulanan derişimlerdeki tartrazinin kontrole göre değerlendirildiğinde, balıklarda genotoksik etkisinin olduğu söylenebilir.

Günümüzde, balıkların periferal eritrositleri kullanılarak yapılan mikronükleus testleri oldukça yaygındır. Özellikle bu testlerde *Cyprinus carpio* tercih edilmektedir [141]. Çünkü, kemikli balıklar düşük derişimlerdeki genotoksinlere duyarlıdır. Bu nedenle, biyoindikatör olarak da uygun organizmalardır. Ayrıca bu organizmalar, insanlar için potansiyel olarak teratojenik, karsinojenik ve mutajenik bazı maddelerin değerlendirilmesinde, bu toksik ajanlara karşı daha yüksek omurgalılara benzer cevaplar verirler. Örneğin, balıklardan elde edilen bulgular, karsinojenlerin metabolize edilmesinde memeli ve balıklar arasında benzerlikler olduğunu göstermektedir. Bailey ve ark. [142, 143], alabalıklarda karsinogenez ve antikarsinogenez üzerine yaptıkları bir çalışmada, bu organizmaların omurgalılara alternatif bir model olarak kullanılabileceğine dikkat çekmişlerdir. Balıklar ve memeliler arasında, DNA tamiri de karşılaştırılabilir. Nakatsuru ve ark. [144], balık ve rodentlerde O<sup>6</sup>-Metilguanin DNA metiltransferaz enziminin karşılaştırılabilir düzeylerde olduğunu bulmuştur.

Bu çalışmada da, yukarıdaki gerekçeler yanında ülkemizde bol miktarda bulunması ve bu sayede deney hayvanı olarak temin edilmesinin kolay olması nedeni ile *Cyprinus carpio* tercih edilmiştir.

Balıklarda sitogenetik analizler kullanılarak yapılan genotoksisite çalışmalarından bu organizmaların duyarlılığı hakkında yeterli bilgi elde edilmiştir. Günümüzde kullanılan uygun testler arasından mikronükleus yöntemi, balık türleri için uygun olduğundan en çok tercih edilen metotlardandır. MN testi klastojenik ve anojenik etkilerin her ikisini birden inceler ve bu sayede çok geniş bir aralıkta yer alan bileşiklerin birçoğunun genotoksisitesinin incelenmesine olanak sağlar. Farklı genotoksik bileşiklerle karşılaşan balıkların hücrelerinde MN sayısında artış olduğu, hem laboratuvar şartlarında hem de doğal ortamlarında gösterilmiştir [78, 145].

MN testinin çoğalan herhangi bir hücre popülasyonuna interfazda uygulanabilmesi önemli bir üstünlüktür. MN testi, balıklarda genellikle kolay elde edilebilen periferik kan eritrositlerinde incelenir. Eritrositlerin yanında, solungaç ve karaciğer hücresi gibi başka hücre tipleri de eritrositlere alternatif olarak bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır [146-148]. Karaciğer, ksenobiyotik metabolizmanın merkezi olduğundan mikronükleus testleri için uygun bir doku olarak değerlendirilebilir. Ancak, MN yöntemi için karaciğer hücrelerinin kullanılması, mitotik indekslerinin düşük

olması nedeni ile uygun değildir. Diğer taraftan, solungaç hücreleri kirleticilere doğrudan maruz kaldıklarından ve devamlı olarak bölündükleri için uygun test hücreleri gibi görünse de MN analizleri için elde edilmesi ve hazırlanması kolay değildir [78, 149]. Periferik eritrositlerin kullanıldığı çalışmalarda hücre hazırlama ve deney hayvanlarından doku çıkarılması gibi karmaşık işlemler yoktur. Ayrıca, hemotopietik dokuların mitotik oranı yüksek olduğundan genotoksik ajanların etkilerine hızlı cevap verirler.

Farklı balık türlerinin eritrositleri ile yapılan genotoksisite çalışmalarından elde edilen veriler karşılaştırıldığında 1000 eritrositte 0.1'den daha az MN'li hücreye rastlanabildiği gibi, 10 taneden daha fazla MN içeren veriler de elde edilmiştir (Tablo 5.1) [10].

Eritrosit mikronükleus yöntemi kullanılarak birçok kimyasal ya da fiziksel etmenin genotoksik etkileri araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bahari ve ark. [150] 9 Gy'lık radyasyona maruz bıraktıkları *Clarias gariepinus* eritrositlerinde 96 saat sonunda en yüksek MN frekansını % 0,4 ve mitomisin C'ye maruz bırakılan *C. gariepinus*'larda ise % 0,6 olarak belirlemiş ve ayrıca doz artışına bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit frekansında artış olduğunu bildirmişlerdir. Ergene-Gözükara ve ark. [121], yaptıkları bir çalışmada, 100 ppm'lik methamidophosa maruz bırakılan *C. lazera*'da MN frekansının % 1,92 iken, 200 ppm'lik dozda %3,26'ya çıktığını tespit etmişlerdir. Yine Al-Sabti [151], *Carassius auratus*'da selenyum, civa ve metil civanın eritrositlerde mikronükleus oluşumunu indüklediğini göstermiş, çalışmada 50 ng/5 ml konsantrasyonda civaya maruz bırakılan *C. auratus*'ların eritrositlerindeki MN frekansını %69,3, aynı konsantrasyonda metil civa maruz bırakılan balıklarda %113,1 ve 1000 ng/ 5 ml'lik konsantrasyonda selenyuma maruz bırakılan balıklarda ise %69,2 olarak belirlemiştir.

Bunların yanında su kirliliğinin belirlenmesi amacı ile doğrudan doğal ortamlarından toplanan balıklarda yapılan in situ çalışmalarda da MN testlerinden faydalanılmaktadır. Değişik çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, çalışılan bölgeye, maruz kalınan kirleticiye, çalışılan canlı türüne, canlının genetik yapısına, eşeye ya da yaş ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gözlenebilmektedir. Ancak sonuçta kirleticiye maruz kalan balıkların kalıtsal yapısında küçük ya da büyük oranlarda bir değişiklik olduğunu MN testi göstermektedir [131].



Tablo 5.1. Farklı türlerden elde edilen verilere göre balık eritrositlerindeki spontan MN frekansları [10].

MN frekansı aralığı /1000 hücre	Türler	MN frekansı/1000 hücre
13-1,0	<i>Cyprinus carpio</i>	6,2
	<i>Esox lucius</i>	5,3
	<i>Carassius auratus gibelio</i>	13 ; 10; 5,2
	<i>Salmo trutta fario</i>	2,8–0,75
	<i>Cyprinus carpio</i>	1,2
	<i>Oncorhynchus</i>	1
	<i>Rutilus rutilus</i>	13–3
	<i>Perca fluviatilis</i>	10–9
0,9-0,09	<i>Phoxinus phoxinus</i>	0,3–0,7
	<i>Poecilia latipinna</i>	0–0,4
	<i>Cheirodon interruptus interruptus</i>	0,0–1,0
	<i>Heteropneustes fossilis</i>	0,25
	<i>Genyonemus lineatus</i>	0,8
	<i>Paralabrax clathratus</i>	0,8
	<i>Ictalurus nebulosus</i>	0,14
	<i>Umbra limi</i>	0,14
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,33
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,12
	<i>Carassius auratus</i>	0,18; 0,0
0,09-0,00	<i>Umbra pygmaea</i>	0,0
	<i>Barbus plebeius</i>	0,05
	<i>Cyprinus carpio</i>	0,03
	<i>Cyprinus carpio</i>	0,02

In vitro ve in vivo genotoksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik hasarı tetikleyen bileşiklerin incelenmesinde kullanılırlar. Tüm genotoksik ajanların incelenmesinde tek bir test kullanılamayacağı için, genel yaklaşım uygun testlerin bir arada kullanılmasıdır. Mikronükleus testi, klastojenik aktiviteyi incelemeye oldukça duyarlı ve yararlı bir yöntemdir [78].

Genotoksik özelliğe sahip ajanların canlılarda, mikronükleus oluşumu yanında, hücrelerin ve çekirdeğin morfolojik özelliklerinde de değişikliklere neden olduğu bilinmektedir [152, 153]. Bu çalışmada da, dünya genelinde yaklaşık 60 ülkede kullanımına izin verilen bir azo boya olan tartrazinin, doz ve zaman artışına bağlı olarak *Cyprinus carpio*'nun genetik yapısını etkilemiş olduğu, mikronükleuslu eritrosit sayısındaki artış ile birlikte eritrosit hücrelerinin ve çekirdeklerin morfolojisindeki değişimlerden de anlaşılmaktadır. Hücrelerdeki morfolojik ve yapısal bazı değişiklikler ve anormallikler, bu çalışmanın kapsamında olmadığından değerlendirilmemiştir. Ancak, MN sayımları sırasında sıklıkla bu tür yapılarla karşılaşmıştır. Literatür bilgileri ve bu çalışmadan edinilen veriler doğrultusunda, ileride yapılacak çalışmalarda bu yapıların dikkate alınmasının, MN sayımı yanında hücre morfolojisindeki ve çekirdek yapısındaki diğer anormalliklerin de sayısal olarak değerlendirilmesinin, genotoksisite hakkında daha aydınlatıcı bilgiler vereceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, gerek laboratuvar koşullarında gerekse doğal ortamlarında, balık eritrositlerinde yapılacak in vivo MN denemelerinden elde edilecek veriler ile, genotoksinlerin tespit edilmesinde, ayrıca toksik dozlarının belirlenmesinde, sucul ortamlardaki toksik maddelerin genotoksik etkileşimleri hakkında bilgi edinilmesinde, zahmetli ve ekonomik olarak maliyeti yüksek diğer yöntemlere göre, daha kolay ve ucuz bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, tartrazinin derişimi artırılarak *Cyprinus carpio* eritrosit hücrelerinde MN oluşumu yanında diğer yapısal ve morfolojik değişikliklerin de incelenmesi, ayrıca toksik dozun belirlenmesi sağlanabilir. Bunun yanında, aynı genotoksinin farklı organizmalardaki toksik etkileri de incelenebilir. Ayrıca, bazı bileşiklerin memelilerde toksik etkiye sahip olan yapılarının metabolize edildikten sonra ortaya çıktığı dikkate alınarak, indirgenme ürünleri ile ilgili de detaylı araştırmalar yapılabilir.

Çevresel kirleticiler, gıda katkı maddeleri gibi genotoksik ve toksik bileşiklerin etkilerinin araştırılmasında, kan hücrelerinin oransal olarak değişmesi ve sitogenetik etkilerinin incelenmesi yararlı bulgular elde edilmesini sağlar. Mikronükleus yöntemi kullanılarak yapılan bu tip araştırmalarda akış sitometresi (flow cytometry) veya görüntü analizi gibi otomatik sistemlerin kullanılması, geleneksel mikroskopik yöntemlere alternatif olacaktır. Bu metodoloji kullanılarak, populasyonların sağlık durumlarını etkileyebilecek, sitogenetik ve hematolojik değerlerde değişikliklere neden olan kirleticilere ve katkı maddelerine maruz kalmanın etkileri, daha güvenilir olarak daha kısa sürede incelenebilir [154].

## KAYNAKLAR

1. Saldamlı, İ., Uygun, Ü., Gıda Kimyası, “Gıda Katkı Maddeleri”, Bölüm 10, s. 533-577, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2005.
2. Bonin, A.M., Baker, R.S.U., mutagenicity testing of some approved food additives with the *Salmonella*/microsome assay, Food Technol Aust, 32; 608-611, 1980.
3. Price, P.J., et al., *In vitro* and *in vivo* indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes, Int J Cancer, 21; 361-367, 1978.
4. Combes, R.D., Haveland-Smith, R.B., A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes, Mutat Res, 98; 101-248, 1982.
5. Giri, A.K., Food dyes in India:mutagenic and clastogenic potentials-A review, Proc Indian Natn Sci Acad, B57; 183-198, 1991.
6. Tice, R.R., Ivett, J.L., Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: Toxicology of the Blood and Bone Marrow, RD Irons (Ed.). New York: Raven Press. pp. 119-140,1985.
7. Haveland-Smith, R.B., Combes, R.D., Screening of food dyes for genotoxic activity, Food Cosmet Toxicol 8; 215-221,1980.
8. Patterson, R.M., Butler, J.S., Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells, Food Chem Toxicol 20; 461-465,1982.
9. Klingerman, A., Fishes as a biological detector of the effects of genotoxic agents, in : J.A. Heddle (Ed.), Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology, Academic Press, New York, pp. 435-453, 1982.
10. Gustavino, B., et al., Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine, Mutat Res, 494, 151-159, 2001.

11. Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, *Mutat Res* 467, 177-186, 2000.
12. Hoofman, R.N., de Raat, W.K., Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, *Mutat Res* 104, 147-152, 1982.
13. Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., Thorngate, J.H., *Food Additives (Second Edition, revised and expanded)*. Marcel Dekker, New York, 2001.
14. [www.saglikvakfi.org/html/gkmy.asp?id=65#k1#k1](http://www.saglikvakfi.org/html/gkmy.asp?id=65#k1#k1)
15. Karaali, A., *Gıda Katkı Maddeleri, Seminer Notları, İTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü*, 2006.
16. MacNeil, J.D., The Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on food additives and its role in the evaluation of the safety of veterinary drug residues in foods, *The AAPS Journal* 7 (2) 28, E274-E280, 2005.
17. WHO web page, [http://www.who.int/entity/ipcs/food/jecfa/about\\_jecfa.pdf](http://www.who.int/entity/ipcs/food/jecfa/about_jecfa.pdf)
18. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, T.C. Resmi Gazete, Sayı: 23172 ; T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, II. Tarım Şurası, Gıda Güvenliği Komisyonu Çalışma Belgesi, 16 Kasım 1997.
19. Kılıç, O., *Katkı maddelerinin gıda işlemlerinde kullanımları*, Fatih Yıldız (Editör), *Gıda Teknolojisinde Yeni Gelişmeler Sempozyumu*. Bizim Büro Basımevi, 72-80, Ankara, 1986.
20. <http://www.ido.org.tr/default.asp?ID=1149>, Gıda katkı maddesi deyince akla gelenler, 2005.
21. Saldamlı, I., *Food additives and ingredients*. Önder Matbaası, Ankara, 1985.
22. Altuğ, T., *Gıda Katkı Maddeleri*, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri B, 12 (1-2); 181-188, 1994.
23. Altuğ, T., *Gıda Katkı Maddeleri*, *Hekim ve Yaşam*, Mayıs-Haziran, 29-31, 1999.
24. Thomas, B., *Manual of Dietetic Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988.
25. Altuğ, T., *Gıda Katkı Maddeleri*. Meta Basım, İzmir, 2001.

26. Codex Alimentarium web page
27. FDA/IFIS Brochure, Food Additives, January 1992.
28. <http://www.turktox.org.tr/gida/fr.1-link.htm>
29. Ekşi, A., E Paniği ve Gıda Katkıları, Gıda, Dünya Yayıncılık, 4-6, 1997.
30. Gürcan, T., Gıda Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi, Gıda Sanayii 7(2): 29, 1993.
31. Renwiek, A.G., The Use of an Additional Safety or Uncertainty Factor for Nature of Toxicity in the Estimation of Acceptable Daily Intake and Tolerable Daily Intake Values, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 22:250, 1995.
32. <http://www.saglikvakfi.org.tr/k1a.asp?newsid=-2109995427&pg=1>, 2005.
33. Mason, C., Kandel, E.R., Central visual pathways, In: Principles of Neural Science, 3rd ed., Elsevier, New York, pp. 420–439, 1991.
34. Hankal, J., Color Additives Fact Sheet, US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Cosmetics and Colors Fact Sheet, 1993.
35. Deshpande, S.S., Handbook of Food Toxicology, Marcel Dekker, Inc., 2002.
36. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O., Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, CRC Press, 2003.
37. U. S. Food and Drug Administration FDA /IFIC Brochure: January 1993.
38. Karaali, A., Özçelik, B., Gıda katkısı olarak doğal ve sentetik boyalar. Gıda, 18 (6): 389-396, 1993.
39. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tartrazine>
40. [http://www.dartmouth.edu/~chemlab/chem6/dyes/full\\_text/chemistry.html](http://www.dartmouth.edu/~chemlab/chem6/dyes/full_text/chemistry.html)
41. Jain, R., Bhargava, M., Sharma, N., Electrochemical studies on pharmaceutical azo dye: tartrazine, Ind Eng Chem Res, 42, 243-247, 2003.
42. Nursten, H.E., Williams, G., The stability of coal tar food colours permitted in the UK, Chemistry and Industry, 1798-1803, 1969.
43. Allen, R., Roxon, J., Metabolism by intestinal bacteria: The effect of bile salts on tartrazine azo reduction, Xenobiotica, 4: 637, 1974.
44. Dubin, P., Wright, K., Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*, Xenobiotica, 5: 563, 1975.

45. Borzelleca, J.F., Hallagan, J.B., Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD&C Yellow No. 5 (tartrazine) in rats, *Food Chem Toxicol*, 26:179–188, 1988.
46. Reynolds, J.E., Martin Dale, The extra pharmacopoeia, thirtieth edition, The Pharmaceutical Press, p.701, 1132-1133, 1993.
47. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [JECFA]. Summary of evaluations performed by the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) 1956–1995 (first through 44th meetings). International Life Sciences Institute (ILSI) Press, Washington, DC, p. T-3, 1996
48. <http://www.kastamonu-ilkontrol.gov.tr/kodex/ek1-11.htm>
49. Seney, C., Color Additives: Could Chemical Food Additive Exposure Be Toxic? Seminer Notları, 2005.
50. Borzelleca, J.F., Hallagan, J.B., A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD&C Yellow No. 5 (tartrazine) in mice, *Food Chem Toxicol*, 26:189–194, 1988.
51. Burnett, C., et al., Teratogenic studies with certified colors in rats and rabbits, *J Toxicol Appl Pharmacol*, 29:121–128, 1974.
52. Cordas, S., Experimental and clinical considerations with regard to tartrazine (FD&C Yellow No. 5), *J Am Osteopath Assoc*, 77: 696–707, 1978.
53. Pierce, E., et al., Multigeneration reproduction studies with certified colors in rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 29:121–135, 1974.
54. Sobotka, T.J., Brodie, R.E., Spaid, S.L., Tartrazine and the developing nervous system of rats, *J Toxicol Environ Health*, 2: 1211–1217, 1977.
55. Brown, J.P., Dietrich, P.S., Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the salmonella microsome assay: Use of aerobic and anaerobic activation procedures, *Mutat Res*, 116: 305–315, 1983.
56. Kevansky, H., Kingsley, H.J., Fixed drug eruption caused by dyes, *S Afr Med J*, 88; 216, 1964.
57. Chafee, F.H., Settupane, G.A., Asthma caused by FD&C approved dyes. *J Allergy*, 40: 65–72, 1967.
58. Mitchell, J.C., The skin and chemical additives in foods, *Arch Dermatol*, 104: 329–330, 1971.

59. Lockey, S.D., Sensitizing properties of food additives and commercial products, *Ann Allergy*, 30: 638–641, 1972.
60. Weber, R.W., et al., Incidence of bronchoconstriction due to aspirin, azo dyes, nonazo dyes, and preservatives in a population of perennial asthmatics, *J Allergy Clin Immunol*, 64: 32–37, 1979.
61. Gerber, J.G., et al., Tartrazine and the prostaglandin system, *J Allergy Clin Immunol*, 63: 289-294, 1979.
62. Miller, K., Sensitivity to tartrazine, *Br Med J*, 285: 1597-1598, 1982.
63. Zlotlow, M.J., Settupane, G.A., Allergic potential of food additives, A report of a case of tartrazine sensitivity without aspirin intolerance, *Am J Clin Nutr*, 30: 1023–1025, 1977.
64. Chafee, F.H., Settupane, G.A., Aspirin intolerance, I. Frequency in an allergic population, *J Allergy Clin Immunol* 53:192-199, 1974.
65. Settupane, G.A., Chafee, F.H., Klein, D.E. Aspirin intolerance, II. A prospective study in an atopic and normal Population, *J Allergy Clin Immunol* 53: 200–204, 1974.
66. Tse, T.C.S., Food products containing tartrazine, *N Engl J Med* 306: 11-13, 1982.
67. Loblay, R.H., Swain, A.R., Adverse reactions to tartrazine, *Food Technol (Aus.)*, 37: 508–510, 1985.
68. Morales, M.C., Basomba, A., Pelaez, A., Challenge tests with tartrazine in patients with asthma associated with intolerance to analgesics (ASA-Triad), *Clin Allergy* 15: 55-59, 1985.
69. Newsome, R.L., Natural and synthetic coloring agents. In *Food Additives*, ed. A. L. Branen, P. M. Davidson, and S. Salminen, pp. 231-258, Marcel Dekker, New York, 1990.
70. Vettorazzi, G., *Handbook of International Food Regulatory Toxicology*, Vol. 1. Evaluations, SP Medical and Scientific Books, New York, 1980.
71. <http://www.ilo.org/encyclopedia/?doc&nd=857400278&nh=0>.
72. Başaran, A.A., Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eds. K.H.C.Başer, N.Kırimer, Eskişehir, 29-31 Mayıs 2002.



73. Taner, G., Genotoksikoloji, (Danışman: Prof. Dr. Fatma Ünal), Bilim ve Teknik, Eylül 2004.
74. Kirsch-Volders, M., et al., Indirect mechanisms of genotoxicity, *Toxicol Lett* 140–141, 63-74, 2003.
75. Mateuca, R., et al., Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 2006, in press.
76. Nias, A.H.W., in: *An Introduction to Radiobiology*, second ed, In Wiley, Chichester, England, p. 4, 1998.
77. Sasaki, Y.F., et al., The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat Res* 519 (1-2): 103-119, 2002.
78. Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D., Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat Res*, 343: 121-135, 1995.
79. Yılmaz, S., Ünal, F., Sitrik asitin (Gıda katkı maddesi) *Allium sativum* L. kök ucu hücrelerinde ve insan periferik lenfosit kültüründe etkileri, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adana, 2004.
80. Mukherjee, A., et al., Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo in mice, *Toxicol Lett*, 42: 47-53, 1988.
81. Hasegawa, M.M., et al, Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese hamster cells, *Food Chem Toxic*, 22 (7): 501-507, 1984.
82. Sarıkaya, R., Çakır, Ş., Solak, K., Gıda katkı maddelerinden sodyum nitrat ve sodyum nitritin genotoksik etkisinin *Drosophila melanogaster*'de SMART yöntemi ile araştırılması, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, Malatya, 32, 2002.
83. Dönbak, L., Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., The cytogenetic effects of the food additive boric acid in *Allium cepa* L., *Cytologia*, 67: 153-157, 2002.
84. Rencüzoğulları, E., et al., Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative, *Mutat Res*, 490: 107-112, 2001.
85. Matsumoto, S.T., et al., Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1, 148-158, 2006.

86. Fenech, M., Morley, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat Res* 147: 29-36, 1985.
87. Leach, N.T., Jackson-Cook, C., Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei?, *Mutation Research* 554: 89-94, 2004.
88. Aardema, M.J. , Kirsch-Volders, M., *The In Vitro Micronucleus Assay, Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Choy, Wai Nang (Editor), New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, 2001. p. 163. <http://site.ebrary.com/lib/hacettepe/Doc?id=10051304&ppg=178>,
89. Boller, K., Schmid, W., Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon, *Humangenetik* 11 (1), 35-54, 1970.
90. Heddle, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage, *Mutat Res*, 18: 187-190, 1973.
91. Sgura, A., et al., Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment, *Mutat Res*, 392: 97-107, 1997.
92. Sarto, F., et al., Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antineoplastic therapy, *Mutat Res*, 228: 157-169, 1990.
93. Rajaguru, P., et al, Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test, *Mutat Res*, 444: 175-180, 1999.
94. Al-Sabti, K., Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals, *Cytobios*, 47: 147-154, 1986.
95. Aydemir, N., Bazı kimyasalların klastojenik etkilerinin fare kemik iliği metafaz analizi ve mikronükleus testlerinde karşılaştırmalı olarak araştırılması, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 162-176, 2001.

96. Heddle, J.A., et al., Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present, and, future, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277-291, 1991.
97. Fenech, M., Morley, A.A., Solution to the kinetic problem in the micronucleus test, *Cytobios* 43: 233-246, 1985.
98. Campana, M.A., et al., Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*, *Mutat Res*, 438: 155–161,1999.
99. Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells *Mutat Res*, 534: 93–99, 2003.
100. Hayashi, M., et al., Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutat Res* 399, 125–133, 1998.
101. Al-Sabti, K., Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 149-155, 2000.
102. Sanchez-Galan, S., et al., Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 139-143, 2001.
103. Djomo, J.E., Ferrier, V., Bekaert, C., Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters, *Bull Environ Contam Toxicol*, 65: 168-174, 2000.
104. Pavlica, M., et al., Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol, *Mutat Res*, 465: 145-150, 2000.
105. Cotelle, S., Masfaraud, J., Ferard, J., Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium* / *Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays, *Mutat Res*, 426: 167-171, 1999.
106. Udroi, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquatic Toxicology* 79, 201-204, 2006.
107. Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 42–52, 2005.

108. Grisolia, C.K., A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, *Mutat Res*, 518: 145-150, 2002.
109. Nepomuceno, J.C., et al., Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury, *Environmental and molecular Mutagenesis*, 30: 293-297, 1997.
110. Buschini, A., et al., Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutat Res*, 557: 119-129, 2004.
111. Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish, *Gen Mol Biol*, 23 (1): 235-239, 2000.
112. Ahmad, W., et al., Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*, *Chromosoma*, 110: 570-574, 2002.
113. Ateeq, B., et al., Induction of micronuclei and erythrocytes alterations in the cat fish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor'', *Mutat Res*, 518: 135-144, 2002.
114. OECD guideline 474. Guideline for the testing of chemicals mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD, 1997.
115. Schlegel, R., MacGregor, J.T., The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: implication for cytogenetic screening, *Mutat Res* 127: 169-174, 1984.
116. Ramirez-Munoz, M.P., et al., Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model, *Lab Anim Sci* 49: 418-420, 1999.
117. Cristaldi, M., Ieradi, L.A., Udroui, I., Zilli, R., Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals, *Mutat Res* 559: 1-9, 2004.
118. Gad, S.C., *In Vitro Toxicology* (2nd Edition), Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC, 2000, p. 122.

119. Kligerman, A.D., 1982. Fishes as a biological detector of the effects of genotoxic agents. In: Heddle, J.A. (Ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press, New York, pp. 435–453.
120. Soldatov, A.A., 1995. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41, 272–281.
121. Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. Pharm.* 191, 107–111.
122. Pekol, S., Kastamonu Beyler ve Germeçtepe Barajı'ndaki *Cyprinus carpio* (L.,1758) populasyonlarının karşılaştırmalı nor fenotipi, *Kastamonu Eğitim Dergisi Cilt:14 No:1* 185-194, 2006
123. [http://nis.gsmfc.org/nis\\_factsheet.php?toc\\_id=183](http://nis.gsmfc.org/nis_factsheet.php?toc_id=183)
124. Al-Sabti, K., Karyotypes of *Cyprinus carpio* and *Leuciscus cephalus*, *Cytobios*, 47, 19-25, 1986.
125. Rukhsana, A., Malgorzata, J. Spontaneous Triploid Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in a Farm Population, *Cytobios*, 78, 153-157,1994.
126. Pekol, S., Kastamonu Beyler ve Germeçtepe Barajlarındaki *Cyprinus carpio*(L.,1758) Populasyonlarının Karşılaştırmalı Analizi, *Kastamonu Eğitim Derg.* 7, 2, 3-8, 1999.
127. Pekol, S. Beyler Barajında (Kastamonu) Yaşayan *Cyprinus carpio* (L.,1758)'nun Karyotip Analizi, *Kastamonu Eğitim Derg.* 7, 1, 173-178, 1999.
128. Geldiay, R., Balık, S., Türkiye Tatlısu Balıkları, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 355, 1988.
129. Özaslan M., Şeftalici, H., Kayseri İl Gelişme Raporu,Bölgesel Gelişme ve Yapısal Uyum Genel Müdürlüğü, Nisan 2002.
130. Koçak, Y., Sitrik asitin *Tinca tinca* (L., 1758) (Pisces: Cyprinidae) üzerindeki genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2005.
131. Ergene, S., ve ark., Methamidophos'un *Clarias lazera* (Valeciennes, 1840) üzerindeki genotoksik etkilerinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi, *G.Ü. Eğitim Fakültesi Dergisi*, 19 (1): 27-34, 1999.

132. Fenech, M., The in vitro micronucleus technique, *Mutat Res*, 455: 81-95, 2000.
133. Tripathi, M., Khanna, K.S., Das M., Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis prevention of food adulteration act of India, *Food Control* 18, 211-219, 2007.
134. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Topic 2B Genotoxicity: A standart Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, ICH step 4 guideline, 1997.
135. Münzner, R., Wever, J., Mutagenic activity of the feces of rats following oral administration of tartrazine, *Arch Toxicol* 60, 328-330, 1987.
136. Henschler, D., Wild, D., Mutagenic activity in rat urine after feeding with the azo dye tartrazine, *Arch Toxicol* 57, 214-215, 1985.
137. Das, A., Mukherjee, A., Genotoxicity testing of the food colours amarath and tartrazine, *Int J Hum Genet* 4(4), 277-280, 2004.
138. Davis, K.J., Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A., Chronic rat and dog toxicity studies on tartrazine, *Toxicol Appl Pharmacol* 6, 621-626, 1964.
139. Tanaka, T., Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet, *Food Chem Toxicol* 44, 179-187, 2006.
140. İzbrak, A., Sümer, S., Diril, N., Gıdalara katılan bazı azo boyalarının mutajenik etkilerinin test edilmesi, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24, 48-56, 1990.
141. Al-Sabti, K., Clastogenic effect of five carcinogenic-mutagenic chemical on the cells of the common carp *Cyprinus carpio* L., *Comp Biochem Physiol* 85; 5-9, 1986.
142. Bailey, G., Hendricks, J., Dashwood, R., Anticarcinogenesis in fish, *Mutat Res* 267, 243-250, 1992.
143. de Lemos, C.T., et al., River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes, *Ecotoxicol Environ Safety*, in press.
144. Nakatsuru, Y., et al., O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA methyltransferase activity in liver from various fish species, *Carcinogenesis* 8, 1123-1127, 1987.
145. Cavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V., Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to

- cadmium chloride and copper sulphate, *Food Chem Toxicol* 43, 569-574, 2005.
146. Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent, *Mutat Res* 538, 1-2, 81-91, 2003.
  147. Pietrapiana, D., et al., Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW Mediterranean), *Marine Pol Bull*, 238–243, 2002.
  148. Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells, *Mutat Res* 534, 93-99, 2003.
  149. Bolognesi, C., et al., Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions, *Aquatic Toxicology* 78S, S93-S98, 2006.
  150. Bahari, I.B., Noor, F.M., Daud, M.N., Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*, *Mutat Res* 313, 1-5, 1994.
  151. Al-Sabti, K., Micronuclei induced by selenium, mercury, methyl mercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells, *Mutat Res*, 320, 157-163, 1994.
  152. Ateeq, B., et al., Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor, *Mutat Res* 518, 135-144, 2002.
  153. Guha, B., Khuda-Bukhsh, A.R., Ameliorating effect of beta-carotene on ethylmethane sulphonate-induced genotoxicity in the fish *Oreochromis mossambicus*, *Mutat Res* 542, 1-13, 2003.
  154. Llorente, M.T., Martos, A., Castona, A., Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of Carp, *Ecotoxicology*, 11, 27-34, 2002.

## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 1994 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 1998 yılında aynı bölümden mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisansa başladı. “Tartrazinin *Cyprinus carpio*’daki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Yöntemi İle Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezini hazırladı. Yabancı dili İngilizce’dir.

### İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres: Yenişehir Mah.Selim Sok. No:20

Kocasinan/ KAYSERİ

TEL: 0352 339 75 96

EMAİL:umityirtici@yahoo.com