
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

CARMOİSİNE VE PONCEAU 4R GIDA BOYALARININ İNSAN LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

Sadriye Gökçe KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sadriye Gökçe KARA

20/07/2023

CARMOİSİNE VE PONCEAU 4R GIDA BOYALARININ İNSAN LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sadriye Gökçe KARA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2023

ÖZET

Günümüzde hazır gıdalar oldukça fazla tercih edilmekte ve bu gıdalara farklı katkı maddeleri eklenmektedir. Gıdalara eklenen renklendiriciler, renk vermek ve onları daha çekici ve lezzetli hale getirmek için kullanılmaktadır. Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R (E-124) en sık tercih edilen gıda boyalarındandır. Bu iki gıda boyasının *in vitro* genotoksik etkileri insan periferal lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla Carmoisine ve Ponceau 4R'nin dört farklı konsantrasyonu (37,5; 75; 150; 300 µg/mL) uygulanmıştır. Her iki gıda boyası da KA ve KKD frekanslarını yalnızca en yüksek konsantrasyonda anlamlı düzeyde artırmıştır. Mitotik indeks (Mİ) sonuçları incelendiğinde Carmoisine'nin 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon hariç bütün konsantrasyonlarda ve 48 saatlik uygulamasında en yüksek iki konsantrasyonda (150, 300 µg/mL) kontrole göre anlamlı düşüş olduğu görülmüştür. Ponceau 4R mitotik indeks değerlerinde 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon hariç kalan tüm konsantrasyonlarda ve 48 saatlik uygulamasında ise bütün konsantrasyonlarda kontrole kıyasla düşüşe neden olmuştur. Carmoisine ve Ponceau 4R, MN frekansını ise etkilememiştir. Comet testi sonuçlarına göre, Carmoisine en yüksek konsantrasyonda sadece kuyruk uzunluğunu istatistiksel olarak arttırmıştır. Ponceau 4R ise kuyruk uzunluğunu en yüksek iki konsantrasyonda, kuyruk momentini ise sadece en yüksek konsantrasyonda önemli ölçüde artırmıştır. Comet kuyruk yoğunluğu üzerinde her iki renklendirici de anlamlı bir etki göstermemiştir. Tüm genotoksisite testlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde bu iki renklendiricinin *in vitro* koşullarda özellikle yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Düşük konsantrasyonları ise genotoksik etki sergilemişlerdir.

Bilim Kodu	:	20316
Anahtar Kelimeler	:	Carmoisine, Ponceau 4R, genotoksisite, mutajenite, insan lenfositleri
Sayfa Adedi	:	95
Danışman	:	Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF CARMOISINE AND PONCEAU 4R FOOD DYES ON HUMAN LYMPHOCYTES

(M. Sc. Thesis)

Sadriye Gökçe KARA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2023

ABSTRACT

Today, ready-to-eat foods are highly preferred and different additives are added to these foods. Colourants added to foods are used to give them colour and make them more attractive and palatable. Carmoisine (E-122) and Ponceau 4R (E-124) are the most commonly preferred food colourings. The *in vitro* genotoxic effects of these two food dyes were investigated in human peripheral lymphocytes using chromosome abnormalities (CA), sister chromatid exchange (SCE), cytokinesis block micronucleus cytome (CBMN-Cyt) and comet assays. For this purpose, four different concentrations of Carmoisine and Ponceau 4R (37.5, 75, 150, 300 µg/mL) were applied to the lymphocytes. Both food colourings significantly increased CA and SCE frequencies only at the highest concentration. When the mitotic index (MI) results were analysed, it was observed that there was a significant decrease in all concentrations except the lowest concentration in 24 h treatment of Carmoisine and in 48 h treatment at the two highest concentrations (150, 300 µg/mL) compared to the control. Ponceau 4R caused a decrease in mitotic index values compared to the control at all concentrations except the lowest concentration in 24 h treatment and at all concentrations in 48 h treatment. Carmoisine and Ponceau 4R did not affect the MN frequency. According to the Comet test results, Carmoisine statistically increased only the tail length at the highest concentration. Ponceau 4R significantly increased tail length at the two highest concentrations and tail moment only at the highest concentration. Neither colorants had a significant effect on comet tail density. When the results of all genotoxicity tests are evaluated together, it is concluded that these two colourants have genotoxic and cytotoxic effects under *in vitro* conditions, especially at high concentrations. Low concentrations did not exhibit genotoxic effects.

Science Code : 20316

Key Words : Carmoisine, Ponceau 4R, genotoxicity, mutagenicity, human lymphocytes

Page Number : 95

Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince, tecrübesi, desteği, hoşgörüsü, sabrı ve her konuda anlayışıyla beni destekleyen, önerileri ile yol gösteren, hayatım boyunca örnek alacağım çok kıymetli hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; bilgilerini, görüşlerini ve tecrübesini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, tez çalışmamın her aşamasında emekleri ve yardımlarıyla her zaman yanımda hissettiğim bilgileriyle bana yol gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU-YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Anlayışı ve deneyimleriyle her konuda yardımını hissetiren hocam Araş. Gör. Ece AKBAŞ'a ve laboratuvarda hem yardımlarıyla yanımda olan hem de arkadaşlıklarıyla desteğini hissettiğim bütün öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman, her koşulda sevgileriyle beni destekleyen, her durumda desteklerini gösteren ve beni bu günlere getiren annem Hatice KARA'ya, babam Hasan KARA'ya ve bana hep destek olan ablalarıma minnetlerimi sunarım. Her anımda yanımda olan ve daima başaracağıma inanan sevgili kuzenim Seda Ülker'e varlığından dolayı çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET…….. iv
ABSTRACT…… v
TEŞEKKÜR…… vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ…… ix
ŞEKİLLER LİSTESİ…….. x
RESİMLERİN LİSTESİ……. xii
SİMGE VE KISALTMALAR…… xiii
1. GİRİŞ……..... 1
2. GENEL BİLGİLER……..... 5
2.1. Gıda ve Gıda Katkı Maddeleri…….. 5
2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması…… 6
2.2.1. E-Kodu……. 7
2.3. Gıda Boyaları…….. 8
2.3.1. Carmoisine (E-122)…….. 11
2.3.2. Ponceau 4R (E-124)……. 12
2.4. Genotoksisite Testleri……. 13
2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi…….. 14
2.4.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi…….. 15
2.4.3. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi……. 16
2.4.4. Comet testi…….. 17
2.5. Carmoisine ve Ponceau 4R Gıda Boyaları ile Yapılan Çalışmalar……... 18
3. MATERYAL VE METOT……..... 25
3.1. Materyal…… 25
3.1.1. Test materyalleri…… 25
3.2. Metod…… 27
3.2.1. Çalışmada kullanılan konsantrasyonların belirlenmesi……. 27
3.2.2. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar…… 28
3.2.3. Mikroskobik inceleme ve sonuçlarının değerlendirilmesi……. 30
3.2.4. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar……. 31
3.2.5. İstatistiksel analizler…….. 32

Sayfa

4. ARAŞTIRMA BULGULARI…… 33
4.1. Carmoisine Uygulamasının Sonuçları……..…… 33
4.1.1. Kromozomal anormallik (KA) testi sonuçları……. 33
4.1.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları…….. 36
4.1.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi sonuçları…… 39
4.1.4. Comet testi sonuçları…… 41
4.2. Ponceau 4R Uygulamasının Bulguları…… 44
4.2.1. Kromozomal anormallik (KA) testi sonuçları…….. 44
4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları…….. 48
4.2.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi sonuçları…… 50
4.2.4. Comet testi sonuçları…… 52
5. TARTIŞMA…….. 57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER……... 77
KAYNAKLAR……... 79
ÖZGEÇMİŞ…… 95

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Carmoisine'in EFSA (2009 ve 2013) raporunda yer alan genotoksisite çalışmaları 19

Çizelge 2.2. Ponceau 4R'nin EFSA (2009 ve 2013) raporunda yer alan genotoksisite çalışmaları 20

Çizelge 3.1. Carmoisine ve Ponceau 4R'nin LD50 dozları 27

Çizelge 4.1. Carmoisine'nin insan lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanmasıyla oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları……. 34

Çizelge 4.2. Carmoisine uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi……..... 37

Çizcelge 4.3. Carmoisine'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve proliferasyon indeksi üzerine etkisi..... 40

Çizelge 4.4. Carmoisine ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı…….……. 42

Çizelge 4.5. Ponceau 4R uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları…….. 45

Çizelge 4.6. Ponceau 4R uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi……. 48

Çizelge 4.7. Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve proliferasyon indeksi üzerine etkisi……... 50

Çizelge 4.8. Ponceau 4R ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı…….. 51

Çizelge 4.9. Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları ile yapılan KA ve KKD test sonuçları…… 56

Çizelge 4.10. Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları ile yapılan MN ve Comet test sonuçları…….. 56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması……. 7

Şekil 3.1. Carmoisine'nin yapısal formülü 25

Şekil 3.2. Ponceau 4R'nin yapısal formülü 26

Şekil 4.1. Carmoisine'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkileri…….. 34

Şekil 4.2. Carmoisine'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri…….. 35

Şekil 4.3. Carmoisine'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansları 38

Şekil 4.4. Carmoisine'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri 38

Şekil 4.5. Carmoisine'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 40

Şekil 4.6. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu değerleri 42

Şekil 4.7. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk uzunluğu değerleri 43

Şekil 4.8. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk momenti değerleri 43

Şekil 4.9. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkileri 46

Şekil 4.10. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri 46

Şekil 4.11. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansları 49

Şekil 4.12. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri 49

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.13. Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 51

Şekil 4.14. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu değerleri 53

Şekil 4.15. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk uzunluğu değerleri 53

Şekil 4.16. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk momenti değerleri 54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen Kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı b) kardeş kromatitlerde Birleşme c) fragment d) poliploidi…….. 36

Resim 4.2. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimlerine bir örnek..... 39

Resim 4.3. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde incelenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre örnekleri a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre c) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre..... 41

Resim 4.4. Carmoisine sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının Comet testi ile görünümünden örnekler a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA..... 44

Resim 4.5. Ponceau 4R uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) poliploidi d) fragment e) kardeş kromatitlerde birleşme f) disentrik kromozom..... 45

Resim 4.6. Ponceau 4R uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimlerine bir örnek..... 50

Resim 4.7. Ponceau 4R muamelesi sonucunda insan lenfositlerinde incelenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre örnekleri..... 51

Resim 4.8. Ponceau 4R sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümünden örnekler a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA..... 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
LD_{50}	%50 Letal doz
M	Molar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µg/mL	Mikrogram/Mililitre

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ADI	Günlük Alım Değeri
BN	Binükleat
BrdU	5-Bromo-2-deoksiuridin, Bromodeoksiüridin
CBMN-Cyt	Sitokinez blok mikronükleus sitom
Cyt-B	Sitokalasin-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EtBr	Etidyum bromür
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FDA	ABD Gıda İlaç Dairesi
H2O2	Hidrojen peroksit
KA	Kromozomal anormallik

Kısaltmalar	Açıklamalar
KA/hücre	Hücre başına düşen kromozom anormalliği
KCl	Potasyum klorür
KKD	Hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi sayısı
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
MN/hücre	Hücre başına düşen mikronükleus sayısı
NPK	Nükleoplazmik köprü
NT	Nükleer tomurcuk
OECD	Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü
Pİ	Proliferasyon İndeksi
PBS	Fosfat tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
SH	Standart hata
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
SSC	Salin sitrat tamponu
UV	Ultraviyole
UNS	Uluslararası Numaralandırma Sistemi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Son yıllarda tüm dünyada ve ülkemizde besin tercihleri hızla değişmektedir. Bununla birlikte, dünya çapında hızlı nüfus artışının da etkisiyle en temel ihtiyaçlarımızdan biri olan beslenmeye olan talep de hızla artmaktadır. Her gün birçok insan daha pratik, daha kolay kullanılan ve çoğunlukla hazır olan gıdalara yönelmektedir. Söz konusu hazır gıdalar ile birlikte çeşitli gıda katkı maddelerini de tüketmektedir. Ürünler ve hazır gıda sektörü böylece gün geçtikçe gelişmektedir. Dolayısıyla gıda katkı maddeleri gibi birçok kimyasal da daha fazla miktarlarda kullanılmaya devam etmektedir (Treudler ve Simon, 2022). İşlenmiş gıdalar genellikle gıda ürünlerinin güvenliğini, tazeliğini, tadını, dokusunu veya görünümünü iyileştirmek veya korumak için kullanılan yapay gıda katkı maddeleri gibi besleyici olmayan bileşenlerin bir karışımını içerir (Raoul ve diğerleri, 2022). Gıda katkı maddeleri, doğal maddelerin saflaştırılmasıyla veya yapay sentezlerden elde edilir (Zhou, Qiao, Wu ve Zhang, 2023).

Gıda üreticileri, gıda ürünlerinin tadı ve görsel görünümünü geliştirmek için tatlandırıcılar, koruyucular, renklendiriciler gibi çeşitli gıda katkı maddeleri kullanmaktadır. Gıda katkı maddeleri, üretim, işleme, paketleme ve benzeri aşamalarda koruma, stabilize etme gibi teknolojik amaçlarla gıdaya ilave edilen, tek başına gıda olarak tüketilmeyen, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni haline gelen maddelerdir (Zaifuddin, Othman ve Hassan, 2021). Gıda katkı maddeleri gıdanın daha uzun raf ömrüne sahip olmasını, besin değerini ve lezzetini kaybetmemesini ve çekici özellikte olmasını sağlarlar. Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA) gıda katkı maddesi veri tabanında yaklaşık 3000 bileşen listelenmiştir ve gıda ürünlerinde genel olarak kullanılan yaklaşık 2500 çeşit gıda katkı maddesi olduğu bilinmektedir (Mohammadi, Ahangari, Mousazadeh, Hosseini ve Dufossé, 2022). Gıda katkı maddelerinin özellikleri ve kullanılabilecek miktarları uluslararası kuruluşlar tarafından düzenlenmektedir (Özgün ve Seylan-Küşümler, 2020).

Renk, gıdaların daha parlak ve çekici görünmesini sağlayan önemli bir bileşendir. Dolayısıyla renklendiriciler; gıda, kozmetik ve ilaçlar gibi pek çok farklı alanda sıklıkla tercih edilir. Aynı zamanda gıda boyaları, gıda endüstrisi içerisinde yer alan katkı maddeleri arasında önemli bir yere sahiptir (El-Desoky, Wabaidur, AlOthman ve Habila, 2020). 19. yüzyıla kadar tüm boyalar, bitkisel özler ve hayvansal ürünler gibi doğal kaynaklardan elde edilmekteydi. Ancak bu malzemelerin hem sınırlı renk verdiği hem de kolayca solduğu bilinmektedir (Elder, 2022). Gıda endüstrisinin gelişmesiyle azo grubu

içeren yapay boyalar yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. En yaygın kullanılan boyalar arasında Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R (E-124) yapay boyaları yer almaktadır.

Carmoisine kırmızı renklidir, günlük yaşamda karşımıza çıkan pek çok gıda ürününde, meşrubatlar, paket çorba karışımları, jöleler, tatlı şekerlemeler, poğaça, pandispanya ve reçeller gibi birçok yiyeceğin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca Carmoisine, dondurma yapımında ve etin renklendirilmesinde de kullanılmaktadır. Ponceau 4R ise alkollü ve alkolsüz içecekler, şekerler, şuruplar, fırın ürünleri, domates sosu gibi çeşitli gıda maddelerine renk vermek için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Parlak kırmızı renkli, ucuz, yüksek çözünürlük ve güçlü stabiliteye sahip bir renklendiricidir. Gıdalara daha canlı renkler sağlayan sentetik organik boyalar sınıfındandır (Vasileva, Stoyanov, Chayleva, Staykova ve Ivanova, 2022; Alham, Ibraimov, Alimzhanova ve Mamedova, 2021).

Son yıllarda oldukça yaygın kullanılmakta olan gıda boyalarının birçok farklı hastalığa neden olabileceği, DNA hasarlarının indüksiyonu ve genotoksisite oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Bencherit, Laoues, Karboua ve Lounis, 2023). Genotoksisite, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen hasarları kapsar. Genetik toksikolojinin temel amacı, birçok farklı yöntem kullanılarak çeşitli çevresel etkenlerin neden olduğu genetik hasarın tespit edilmesidir. Dolayısıyla genotoksik maddeler, genomda mutasyona neden olan maddelerdir. Genotoksinler, DNA'da doğrudan kırılmalar veya kimyasal grup modifikasyonları gibi yollarla mutasyona yol açmaktadırlar. Hücre ölümüne neden olma veya kanserojen süreçleri artırma potansiyeline sahiptirler (Rashad ve diğerleri, 2021). Genotoksisite testleri fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek için geliştirilmiştir. Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması ve gereksiz maruziyetten korunmayı sağlamak amaçlanmaktadır (Topaktaş ve İstifli, 2022: 1,25).

Gıdalar hayatın vazgeçilmezi olup, son yıllarda giderek artan hazır gıda tüketimine paralel olarak her yaş grubundan insanın, kabul edilebilir dozun üzerinde gıda katkısına maruz kaldığı düşünülmektedir. Bu kimyasalların insan sağlığına verdiği zararlar ile ilgili tartışmalar giderek artmaktadır. Bu nedenle, gıdalarda sık kullanılan renklendiricilerin DNA hasarına neden olup olmadığı, DNA çift zincir kırıklarını artırıp artırmadığı ve klastojenik ve/ veya anojenik olup olmadığının belirlenmesi ve bu sayede etki

mekanizması hakkında da bilgilere ulaşılması genotoksisite testleriyle incelenmelidir. En sık kullanılan testler, insan periferal lenfositlerinde, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) ve sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleridir *(*Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2022; İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

Kromozom anormallik testi, kromozomal hasarı ve genom kararsızlığını değerlendirmek amacıyla genetik materyalde meydana gelen değişimleri incelemektedir. KA frekansındaki artış ile kanser arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. KKD testi, iki kardeş kromatid arasında meydana gelen DNA değişimlerini göstermektedir. Genotoksisiteye neden olan bir maddenin hücrede replikasyon mekanizmasına etkilerini ve DNA hasarı oluşturabilme kabiliyetini saptayan bir tekniktir. Sitokinez blok mikronükleus sitom testi, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenik veya anöjenik etkilerin saptanmasında güvenilir ve hassas bir testtir. MN frekansındaki artış ile kanser sıklığı arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir. Comet yöntemi ise, DNA hasarını ve tamirini ölçmek amacıyla kullanılan oldukça kolay, hızlı ve güvenilir bir testtir. Çok küçük düzeydeki DNA hasarlarını bile ayırt ederek hızlı sonuca ulaştıran, kansere neden olan çeşitli ajanların oluşturabileceği riski tespit etmede kullanılan önemli bir yöntemdir (Kılıçle ve Doğan, 2022; Göney, 2016).

Bu çalışmanın amacı, gıdalarda yaygın olarak tercih edilen fakat sağlığımıza etkileri açısından sınırlı sayıda çalışma bulunan gıda boyalarından Carmoisine ve Ponceau 4R'nin genotoksik etkilerini incelemektir. Bu çalışma sayesinde söz konusu renklendiriciler farklı ve birbirini destekleyen genotoksisite testleriyle incelenmiş olup genotoksik etkileri ve verebilecekleri hasar detaylı bir şekilde ortaya konmaktadır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçların ileride yapılacak pek çok çalışmaya ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda ve Gıda Katkı Maddeleri

Gıda, bir bireyin beslenme gereksiniminin giderilmesini sağlayan, yaşamın en önemli temel ihtiyacıdır. 19. yüzyıldan önce beslenme, çoğunlukla doğal yöntemlerle hayvanlar ve sebzelerden elde edilen gıdalarla sağlanmıştır. Sanayi devriminden sonra, gıda giderek daha fazla işlenir hale gelmiştir. Bilim ve teknolojideki gelişmeler, gıdanın yetiştirilme, işlenme, muhafaza edilme ve taşınma şeklini değiştirmede rol oynayan önemli etkilerden olmuştur (Nataraj, Ali, Beharel ve Yadav, 2020; Zhou ve diğerleri, 2023).

Gıdaya bileşen olarak eklenen yapay tatlar, kokular ve renkler gıda endüstrisinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda, bu sektördeki yeni teknolojilerin gelişimi, kimyasal katkı maddelerinin günlük tüketilen yiyeceklere daha fazla dahil olmasına neden olmuştur. Ne yazık ki, çeşitli parametreleri korumak veya artırmak için katkı maddelerinin dahil edilmesi, bunların insan sağlığı üzerindeki etkilerinin unutulmasına sebep olmaktadır. Ancak bunların vücuttaki davranışları ve sağlığa etkilerini belirlemeye yönelik yaklaşımlar birçok spekülasyona, çelişkiye, belirsizliğe de konu olmaktadır. Gıda katkı maddeleri, işlenmiş gıdaların önemli bir parçası haline gelmiştir. Gıdaların, paketlenmesi ve saklanması sırasında lezzet kalitesinin iyileştirilmesi ve görünümünün korunması için çeşitli gıda katkı maddelerinin eklenmesi gerekmektedir (Salam, Al-Senosy, Ebeed ve Fahmy, 2021; Blaznik ve diğerleri, 2021).

Normalde gıda olarak tüketilmeyen veya gıdaya bileşen olarak eklenmeyen maddelere, gıda katkı maddesi denilmektedir. Gıda maddelerinin üretimi, işlenmesi, hazırlanması, paketlenmesi, taşınması veya depolanması sırasında teknolojik bir amaç için kasıtlı olarak gıdaya eklenen maddelerdir. Gıda katkı maddeleri, gıda üretimi sırasında oldukça farklı amaçlar için kullanılmaktadır. İstenen etkiyi yaratmak, görünümü geliştirmek, tadını iyileştirmek gibi nedenlerle gıdalara sıklıklıkla birbirinden farklı katkı maddeleri eklenmektedir. Aynı zamanda gıdaların, saklanabilirliğini arttırmakta, koruyucu olarak kullanılmakta ve raf süresini uzatmaktadır (Sohrabi ve diğerleri, 2018; Boutillier, Fourmentin ve Laperche, 2022; George, Cherian, Benny, Varghese ve Hegde, 2023).

Tarihsel olarak, gıda katkı maddelerinin güvenliği Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından açıklanan risk değerlendirme raporuna göre değerlendirilmiştir. Gıda katkı maddelerinin güvenlik değerlendirmesi dört adımdan oluşur:

1- Tehlike tanımlama, yani, bileşiğin içsel toksik özelliklerinin değerlendirilmesi;

2- Doz-yanıt değerlendirmesini, kritik toksik son noktaların tanımlanmasını ve sağlığa dayalı kılavuz değerlerin türetilmesini içeren tehlike karakterizasyonu;

3- Maruz kalma değerlendirmesi, yani maruz kalma/alma tahmini;

4- Gıda katkı maddesine maruz kalmayla ilişkili riski değerlendirmek için önceki adımlardan gelen bilgileri birleştiren risk karakterizasyonu.

Tehlike karakterizasyonu içinde, kabul edilebilir bir günlük alım (ADI) değeri belirlenir ve bu değer, bir insanın ömrü boyunca günlük maruz kalma durumu söz konusu olursa tüketiciye zarar vermeyen maksimum alım seviyesi olarak tanımlanır. Bu nedenle tüketici gıda katkı maddesini, daha güvenli bir kullanımı olması bakımından günlük alım değerini aşmadan kullanmalıdır (Kramer ve diğerleri, 2019).

2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Son yıllarda, işlenmiş gıdaların tüketiminde küresel artışa neden olan daha uzun raf ömrüne sahip uygun ürünlere olan talebin artmasıyla birlikte, gıda katkı maddelerinin alımı artmıştır. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre gıda katkı maddesinin gıdadaki teknolojik fonksiyonunu ortaya koyan ve kullanımına izin verilen birden fazla fonksiyonel sınıfı mevcuttur (Cox, Sandall, Smith, Rossi ve Whelan, 2020; Türk Gıda Kodeksi, 2013).

Gıda katkı maddeleri, boyalar, koruyucular, asitlik düzenleyiciler, antioksidanlar, emülgatörler, stabilizatörler ve koyulaştırıcılar dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel sınıflara ayrılırlar. İnsan sağlığını ilgilendiren önemli bir konu da gıda ürünlerinin ambalajlarında bu katkı maddelerinin içeriğinin çok sık belirtilmemesidir. Buna ek olarak, izin verilen maksimum değerden daha fazla kullanılan katkı maddeleri için, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından daha kontrollü tüketim olması önerilmektedir (Halilčević ve diğerleri, 2022).

2.2.1. E-Kodu

Gıda katkı maddeleri için küresel olarak uyumlu bir numaralandırma sistemi üretmek amacıyla Uluslararası Numaralandırma Sistemini (UNS) önerilmiştir. Bu kod sistemiyle, kafa karıştırıcı olabilecek değişken ve uzun molekül adlarının yerine kodlar kullanılarak gıda etiketlerinin daha kısa ve kolay gösterilmesi sağlanmıştır. Önüne "E" harfi konur ve katkı maddeleri ambalaj üzerinde bu şekilde etiketlenir. Dolayısıyla gıda katkı maddelerini tanımlamak ve herhangi bir karışıklığa yol açmamak için kullanılan Avrupa Birliği'nin (EC) simgesi olarak E harfi ve üç rakamlı sayıdan ibaret kod bulunmaktadır (Cox ve diğerleri, 2020).

'E' numara sistemi ile gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflandırması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması

2.3. Gıda Boyaları

Gıda boyalarının herhangi bir besin değeri yoktur. Yiyecek, içecek, takviye ve ilaçların teknolojik olarak işlenmesi veya renklendirilmesi sırasında renk kaybını önlemek gibi amaçlarla kullanılmaktadırlar (Halilčević ve diğerleri, 2022). Renk, yiyecek ve içeceklerin önemli bir bileşenidir. Gıda boyası hem ticari gıda üretiminde hem de evde pişirme amaçlı kullanılmaktadır. Gıda teknolojisinde, çeşitli tiplerde gıda renklendiricileri, gıda ürününün işleme veya depolama sırasında etkilenebilecek veya kaybolabilecek özelliklerini geliştirmek ve korumak için gıdaya eklenen kimyasal maddelerdir (Dey ve Nagababu, 2022). Renk, gıda üretimi ve işleme sektöründe gıdanın duyusal niteliğine katkıda bulunan önemli bir rol oynar. Bir gıdanın tazeliğini, besin değerini, güvenliğini ve estetik değerini ifade eder, renkli gıda ürününün piyasa değerini doğrudan etkiler (Sen, Barrow, Deshmukh, 2019).

Yiyecek alışverişi yaparken tüketicilerin hissettiği ilk duyusal uyaran renktir. Yiyecekleri koklamadan veya tatmadan önce, gözler yiyeceğin görünümüne ilişkin bilgi gönderir. İnsan gözünün olağanüstü yeteneklerinden biri de renkleri tanımaktır; bu nedenle nesnelerin çekiciliğini artırmak için boyalar gibi bileşikler kullanılır. Renklendiriciler, adından da anlaşılacağı gibi, gıdalara renk vermek, istenmeyen renkleri maskelemek, rengi homojenleştirmek, belirli bir rengi zamanla yaymak veya sadece gıdanın doğal rengini az çok yoğun veya canlı hale getirmek için kullanılır. Bu katkı maddeleri, diğer teknolojik işlevlerin yanı sıra, tatlandırma, koruma, doku değiştirme, nemlendirme, kurutma gibi teknolojik bir işlevi yerine getirmek için gıdaya eklenen moleküllerdir (Durazzo ve diğerleri, 2022).

Tarihte çok eski çağlardan beri renklendirici maddeler insan yaşamında yer bulmuştur. İnsanlık tarihi kadar eski olan renklendirici maddeler önceleri doğal ürünlerden elde edilirken, daha sonraları yerini sentetik renklendiricilere bırakmıştır. Sanayi devrimi, organik kimyanın gelişmesi, tekstil ve ilaç endüstrileri ortaya çıkmasıyla sentetik renklendirici üretimi hızlanmıştır. Günümüzde gıda, ilaç, kozmetik, tekstil ve plastikte yaygın olarak kullanılan binlerce farklı boya türü bulunmaktadır, bunların bir kısmı toksik özellikleri nedeniyle insan ve çevre sağlığı için risk oluşturabilmektedir. Düşük maliyetli olmaları açısından gıda boyaları hem üreticilerin hem de tüketicilerin oldukça sık tercih

ettiği ürünler haline gelmiştir (Türkoğlu, 2021; Feng, Cerniglia ve Chen, 2018; Zhang ve diğerleri,2023).

Renkli gıda ürünleri, sentetik gıda boyaları ile hazırlandıkları için sağlıkla ilgili birçok soruna neden olabilmektedir (Kumar, Pandey, Tiwari ve Pandey, 2022). Geçmişte, renklendirici özelliklere sahip maddelerin doğal kaynaklardan elde edildiği görülmektedir, ancak yüksek maliyet ve bunları modern batı gıda işleme teknolojisine dahil etmenin zorluğu nedeniyle, bu durum sentetik gıda renklerinin kullanılmasına geçişle sonuçlanmıştır. Bugün ticari olarak temin edilebilen hemen hemen tüm boyalar sentetik maddelerden oluşmaktadır. Renklendiriciler aynı zamanda, çeşitli fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde kullanılan önemli gıda bileşiklerdir (Boncıu, 2019; Nabi ve diğerleri, 2023). Bu nedenle, yapay gıda boyalarının, tatlı, içecek, şekerleme vb. gıda ürünlerine çekici ve yatıştırıcı bir renk sağlamak için farklı şekillerde kullanımları çok yaygın hale gelmektedir (Kumar ve diğerleri, 2022).

Sentetik boya endüstrisinin gelişimi, dünya çapında seri üretim ve kitlesel pazarlamanın büyümesine paralel olmuştur. Yaygın kullanımlarına rağmen, bazı sentetik gıda boyalarının, özellikle petrolden elde edilenlerin, çocuklarda kanserojen etkilere sahip olduğu, aşırı duyarlılık reaksiyonlarına ve davranış sorunlarına neden olduğu bildirilmiştir (Istifli, Husunet, Misirli ve Ila, 2020).

Gıda endüstrisi, dünyanın en hızlı büyüyen ekonomik sektörlerinden biridir ve önemli karlar sağlar. Yiyeceklerimizin rengi görsel olarak istek uyandırdığından, üreticiler daha çekici hale getirmek için çeşitli yiyeceklere sentetik gıda boyaları eklemektedirler. Doğası gereği kimyasal olan sentetik gıda boyalarının insanlar için zararlı olması beklenmektedir. Çocukların parlak renkli katkı maddeleri içeren yiyeceklerden etkilenme olasılığı daha yüksektir ve bu onları yüksek risk altına sokar. Ayrıca bu renklendiricileri tüketmenin uzun vadeli etkileri bilinmemektedir (Bhattacharjee, 2022). Sentetik gıda boyaları, kömür katranı türevlerinden elde edilen ve çoğu azo grubu içeren kimyasallardır. Çok sayıda çalışma, sentetik gıda renklerinin gıda zehirlenmesinin ana kaynağı olduğunu ve oksidatif stres, kardiyovasküler hastalık riski gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açtığını doğrulamıştır (Dey ve Nagababu, 2022; Bender, Strassmann ve Golz, 2023).

Azo boyalar

Azo boyalar, tadı ve besin değeri olmayan, düşük maliyetli, sentetik gıda boyası katkı maddelerinin geniş bir grubudur. Unlu mamüller, şekerlemeler, tatlılar, sakızlar, soslar, reçeller, jöleler, erişteler, dondurulmuş tatlılar, içecekler, şarap, işlenmiş deniz ürünleri, günlük kullanılan cilt bakım ürünleri, el dezenfektanları, sabunlarda tüketicilerin ilgisini çekmek ve kabul edilebilirliğini artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Farheen, Mansoor ve Abid, 2021).

İlk azo boya Mene tarafından, 1861 yılında birincil aromatik aminin diazotizasyonu ve bir diazonyum tuzu ile sonuçlanan birleştirme kullanılarak sentezlenmiştir (Benkhaya vd., 2020). Bu sentetik bileşikler, iki simetrik ve/veya asimetrik azo alkil veya aril radikalini birleştiren bir veya birkaç fonksiyonel -N = N- grubu ile karakterize edilmekte ve azo bağlantılarının sayısına göre (monoazo, diazo, trisazo, poliazo ve azoik) farklı isimler almaktadır (Ramos-Souza, Bandoni, Bragotto ve De Rosso, 2023).

Gıda endüstrisinde en önemli ve yaygın olarak kullanılan gruplardan biri Azoik gruba aittir. Dünyada üretilen boyaların yüzde ellisi veya daha fazlası bu yoğun renkli sınıf içerisinde bulunmaktadır. Mevcut rengi geliştirmek, üretimi standardize etmek, işlemedeki kayıpları düzeltmek veya sadece son ürünü renklendirmek için endüstriyel gıdalara boyalar eklenir. Bununla birlikte "azo" grubu boyalar, aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilmektedir (Kamali ve diğerleri, 2023; de Souza ve diğerleri, 2022; dos Santos ve diğerleri, 2022). Bu boyaların gıdalarda kullanımının güvenliği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Dolayısıyla gıdalarda yapay azo boyaları tüketmenin risklerini anlamak ve yan etkilerini öğrenmek için toksikolojik testlerin sonuçları, maruz kalma seviyeleri ve tüketilmesinden kaynaklanan riskin karakterizasyonu ile ilgili çalışmaları değerlendirmek önemlidir (Ramos-Souza ve diğerleri, 2023). Azo boyalar tekstil, deri ve kağıt endüstrileri gibi farklı alanlarda da kullanılan sentetik boyalardır. Bununla birlikte, toksik ve kalıcı yapıları nedeniyle çevre sorunları oluşturabilmektedir. Gıda boyalarının genotoksisitesi ve metabolizmaları tarafından üretilen yan ürünler, esas olarak insan sağlığına yönelik riskleri bağlamında incelenmiştir. Bu nedenle, Tartrazine, Sunset Yellow, Amaranth, Ponceau 4R, Allura Red ve Carmoisine gibi çeşitli boyaları içeren *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite çalışmaları mevcuttur (Vaiano ve De Marco, 2023; Ramos-Souza ve diğerleri, 2023).

2.3.1. Carmoisine (E-122)

En yaygın kullanılan gıda boyalarından Carmoisine (E-122), azo boya grubundan kırmızıdan bordoya kadar değişen aromatik yapıya sahip bir gıda boyasıdır. Carmoisine genellikle bir disodyum tuzu formunda bulunur ve suda çözünür. Carmoisine, kozmetik, kağıt, tekstil, gıda, ilaç ve tarım kimyası endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, dondurma yapımında ve etin renklendirilmesinde de kullanılmaktadır. Aynı zamanda parfümeride, şekerleme üretiminde, marzipan ürünlerinde ve jöle katkı maddelerinde kullanılır. ABD'de Gıda ve İlaç Derneği'nin gıda endüstrisinde kullanımına izin verilen renklendiriciler listesine, güvenliği ile ilgili çalışmaların olmaması nedeniyle dahil edilmemiştir (Boyko ve Brygadyrenko, 2021). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın sınıflandırmasına göre, Carmoisine gibi azo boyalar kanserojen kategorisi 3'te yer almaktadır (Montaser ve diğerleri, 2018).

Söz konusu bu boya maddesinin düşük dozları bile vücudun önemli biyokimyasal belirteçlerini değiştirebileceği açıklanmıştır. Hemoglobinin yapısını değiştirebildiği, karaciğer ve mide üzerinde olumsuz etkilere neden olabildiği bildirilmektedir. Bu veriler azo boyaların toksik metabolizması ile oksidatif stresin indüklenebileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle hidrofobik azo boyaların, vücutta tümör oluşturma yetenekleri olabileceği ve bundan dolayı güvenli olmadıkları görüşü yaygındır (Kamali ve diğerleri, 2023).

Dünya sağlık örgütü (WHO), Carmoisine için kabul edilebilir günlük alım miktarını 4.0 mg/kg^{-1} olarak belirlemiştir (Saloğlu ve Şahin, 2021). Carmoisine astım hastalarında ve aspirine alerjisi olan kişilerde yan etkilere neden olabilmektedir. Daha büyük miktarlarda kullanıldığında, alerjik reaksiyonlara, anemiye, kan hemoglobinine bağlanmaya, böbrek ve karaciğer hastalıklarına, çocuklarda hiperaktivite ve hipereksitabiliteye, astıma yol açabileceği gösterilmiştir (Vasileva, Stoyanov, Chayleva, Staykova ve Ivanova, 2021).

2.3.2. Ponceau 4R (E-124)

Ponceau 4R, çilek kırmızısı rengi olan azo boya grubundan bir renklendiricidir. Bu renklendirici, gıdaların rengini, lezzetini ve genel olarak korunmasını artırmak için kullanılmaktadır. Ancak metabolizması nedeniyle oksidatif stres yoluyla tüketiciye zarar verebileceği düşünülmektedir (Kamali ve diğerleri, 2023). Yenilebilir sentetik azo renklendirici olarak Ponceau 4R, nispeten düşük fiyat, iyi suda çözünürlük, düşük mikrobiyolojik kontaminasyon ve yüksek stabilite gibi avantajları nedeniyle, gıda maddelerini daha çekici ve iştah açıcı hale getirmek için sıklıkla gıdalarda tercih edilmektedir (Qin ve diğerleri, 2020).

Ponceau 4R alkollü, alkolsüz içecekler, şekerleme ürünleri, dondurma, tatlılar, yenilebilir peynir kaplamaları, fırın ürünleri, domates sosu gibi çeşitli gıda maddelerine renk vermek için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Ponceau 4R agresif ortamlara dayanıklıdır ve pratik olarak güneş ışığının etkisi altında çökmez. Bu durum E124 gıda takviyesini çok kullanışlı hale getirir. Ancak yapısındaki aromatik halka ve azo-fonksiyonel grup nedeniyle insan vücuduna zararlı olabilir, genotoksisite ve sitotoksisiteye neden olabilir (Boyko ve Brygadyrenko, 2021; Alham, Ibraimov, Alimzhanova ve Mamedova, 2021).

Ponceau 4R, astım ve uykusuzluğa neden olabilir ve çocuklarda hiperaktivite ve intoleransı artırabilir. Bu nedenle, 2009'da Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi standart günlük alımı 4.0'dan 0.7 mg'a düşürmüştür (Askarniya, Baradaran, Sonawane ve Boczkaj, 2022).

Yiyecek ve içeceklere eklenen sentetik renklendiricilerin miktarları sıkı bir şekilde kontrol edilmekle birlikte izin verilen seviyeleri aşabilir. Bu nedenle, içecekler gibi yüksek tüketimli ürünlerde renklendirici düzeylerinin izlenmesi büyük önem kazanmaktadır. Renklendiriciler, insan sağlığını tehdit edebilecek potansiyel risk faktörü oluşturması nedeniyle içeriklerinin hassas, güvenilir ve basit yöntemlerle belirlenmesi gerekli ve önemlidir. Son yıllarda yayınlanan çalışmaların sayısı, bu sorunun önemini ve sentetik renklendirici analizleri için hızlı, doğru ve seçici tekniklerin geliştirilmesi ihtiyacını göstermektedir (Turak, Dinç, Dülger ve Özgür, 2014; Vaiano ve De Marco, 2023). Bu nedenle, bu azo boya katkı maddelerinin farklı hayati organlar üzerindeki etkilerini inceleyen daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kamali ve diğerleri, 2023).

2.4. Genotoksisite Testleri

Genetik toksisite testleri, genetik materyalde hasarlara sebep olan etkenleri tespit etmek amacıyla geliştirilen *in-vitro/ in-vivo* testlerden oluşmaktadır. Söz konusu testler farklı mekanizmaları belirleyebildiği gibi genotoksisitenin direkt ya da indirekt göstergesi olabilirler. Gıda boyalarının, hayvan, bitki hücreleri ve hücre kültürleri gibi çeşitli sistemlerde genotoksisite testleriyle değerlendirilmesi son derece önemlidir. Genotoksisite ile kanser arasında doğrusal bir ilişkinin varlığı açıklanmış ve çoğunlukla karsinojen olan ajanların genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Karsinojenlerin birçoğu, protoonkogenleri onkogenlere dönüştürerek, gen veya kromozom düzeyinde anormalliklere neden olarak karsinogenezin başlamasına ve gelişmesine neden olmaktadırlar. DNA'yı doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen birçok kimyasal, genotoksikolojik süreçlerde rol oynayabilmektedir. Genotoksisite testleri, bu maddeleri belirlemek ve etkilerini incelemek için yapılmaktadır (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2023; Topaktaş ve İstifli, 2022: 1,25).

Günümüzde insanlar çok sayıda kimyasala maruz kalmaktadır. Bu kimyasalların bazılarıyla yapılan çalışmalar genotoksik etkili olduklarını ve önemli sağlık sorunlarına neden olabileceklerini göstermektedir. Bu bulgular genotoksisite alanında yapılan çalışmalara hız vermiştir. DNA'da ortaya çıkan hasarı belirlemek ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini değerlendirmek için çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiştir. Bu testler; tarım ilaçları, endüstriyel kimyasallar, gıda katkı maddeleri, kozmetikte kullanılan kimyasallar ve ilaçlar gibi farklı kimyasalların genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak kabul görmektedir. Aynı zamanda hem hayvan hem de bitki materyallerinde DNA hasarlarını ve onarımını doğrudan belirlemek içinde sıklıklıkla bu testler kullanılmaktadır. Bu testlerle, kromozomal değişiklikleri ve nokta mutasyonları gibi birçok farklı DNA hasarı tipleri saptanabilmektedir. Kısa sürede sonuç veren testler olduğu için de eko-toksikolojik ve genotoksikolojik değerlendirmelerde kullanılması yaygındır (Wu, Zhang, Lv, Yu ve Shi, 2021; Şen, 2018; Özel ve diğerleri,2022; Alabi, 2023).

Genotoksisite değerlendirmesi, her biri farklı DNA hasarı türlerine karşı hassas olan çok çeşitli testlerin gerçekleşmesini içermektedir. Gen mutasyonlarının ve kromozomal hasarı tespit etmek amacıyla potansiyel mutajenleri veya insan kanserojenlerini belirlemek için

genotoksisite değerlendirmesi esas olmaktadır. Kimyasal maddelerin karsinojen ya da mutajen olabilme potansiyellerini belirlemek için kullanılan genetik toksisite testleri içerisinde yaygın olarak, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testleri görülmektedir (Yüzbaşıoğlu, Zengin ve Ünal, 2014; Rodriguez-Garraus ve diğerleri, 2023).

2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik testi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik moleküllerin genomda hasar meydana getirmesi sonucu oluşan sayısal veya yapısal kromozom değişimlerini tespit etmekte rol oynar. Kromozom ve kromatit kırıkları DNA'daki onarılmamış çift ve tek zincir kırıklarından, anormal yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki kırıkların yanlış onarılması sonucu ortaya çıkmaktadır. Kromozom anormallikleri testi, herhangi bir ajanın DNA düzeyindeki etkilerinin belirlenmesinde rol oynayan önemli ve faydalı bir biyogöstergedir. Böylece, çevresel ve genotoksik ajanlara maruziyet sonucu oluşan genotoksisitenin saptanmasında belirteç olarak kullanılmaktadır (Turan, 2021; Saygılı, Ünal ve Yüzbaşıoğlu, 2021; İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

OECD klavuzlarınada 473 No'lu kararıyla eklenmiş olup genotoksisite çalışmaları için kullanımı uygun görülmüştür. Hücresel düzeyde, kromozomal ve DNA hasarı oluşturan maddelerin genotoksik etkileri doğrulanmıştır. DNA hasarı, sadece nükleotit seviyesindeki değişiklikleri değil, aynı zamanda kromozomal seviyedeki hasarı ve kromozomal anormallikleri de içerir. Oksidatif strese, endojen ve ekzojen faktörlere (kimyasallar, ilaçlar, toksinler, ultraviyole ışık ve iyonlaştırıcı radyasyon) maruz kalma nedeniyle ve hatta sağlıklı kişilerde spontan olarak ortaya çıkarmaktadır. Kromozomal anormallikleri kanser riskini, tekrarlayan düşükleri, hızlı yaşlanmayı ve dejeneratif bozuklukları veya bağışıklık fonksiyon bozukluklarını tetiklemektedir (Han ve diğerleri, 2023; Holmannova ve diğerleri, 2022).

Çoğu yapısal anormallik, kromozomlar arasındaki değişimden veya oluşan hasardan dolayı kromozomların kırılıp anormal biçimde tekrar birleşmesiyle meydana gelir. Kromozomal anormallikler, kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişiklerdir. Kromozomal anormallikler iki temel gruba ayrılır: yapısal ve sayısal anormallikler. Yapısal kromozomal anormallikler, kromozom kırılmasının ve kromozomal segmentlerin

yanlış birleştirilmesinin sonucudur ve kromozom yeniden düzenlemelerini ve gen amplifikasyonunu içerir. Bununla birlikte, hücre bölünmesi sırasında rekombinasyon hatalarından kaynaklanan spontan yapısal yeniden düzenlemeler de vardır. Sayısal kromozomal anormallikler, iğ ipliklerinin bozulması ve kromozomal ayrılmama nedeniyle ortaya çıkar. Yapısal kromozom anormallikleri kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatit birleşmesi, kromatit değişimi, translokasyon, inversiyon, izokromozomlardan sayısal anormallikler ise poliploidi ve endoreduplikasyondan oluşmaktadır (Halıcı, Seyrek, Aykan, Ünal ve Yüzbaşıoğlu, 2021; Nagaraju, Kalahasthi, Balachandar ve Bagepally, 2022; Yüzbaşıoğlu, Engüzel-Alperen ve Ünal, 2018).

2.4.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Genotoksisite riskini belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri de kardeş kromatit değişimi testidir. Kardeş kromatit değişimleri ilk olarak 1938'de McClintock tarafından mısırın halka kromozomlarında gözlemlenmiştir. KKD testi, DNA hasarını niceliksel ve niteliksel olarak değerlendirmede kullanılmaktadır. Kardeş kromatitler arasında, kromozom morfolojisi değişmeden, homolog olan parçaların simetrik olarak değişiminin gerçekleştiği bilinmektedir. Kardeş kromatitler arasında gerçekleşen bu değişimler gen amplifikasyonu ve hücrelerdeki toksik etki oranı ile ilişkilendirilmiştir. Bu test DNA eşlenmesi ile etkileşime girmiş mutajenik bileşiklerin belirlenmesini amaçlamaktadır. Kardeş kromatit değişimi, genotoksisite ve hücresel homolog rekombinasyonların altında yatan nedenleri, biyokimyasal değişiklikleri belirlemek için kullanılmaktadır. Genotoksik ajanlar tarafından uyarılan çift zincir kırıkları şeklinde oluşan DNA hasarını tespit etmek amacıyla hem *in vitro* hem *in vivo* olarak memelilerde, hayvan ve bitki hücreleri gibi birçok farklı hücre hattında kullanımı mümkündür (Rajendran, Manoharan ve Subbiah, 2023; Çelik, 2022: 185,217).

Timin analoğu olarak bilinen BrdU kimyasalının tercih edilmesiyle, kardeş kromatit değişim sıklığını kolay bir şekilde ve hızlı gösterilmesi sağlanmıştır. Böylelikle KKD testi, BrdU kullanılmasıyla ve boyama yöntemlerinin geliştirilmesi ile önem kazanmış ve yaygın kullanılmaya başlamıştır. KKD, ajanın DNA'ya eşdeğer olacak şekilde bağlanması ya da DNA tamir mekanizmasını etkilemesi nedeniyle oluşmaktadır. Kimyasal veya fiziksel ajanlar, DNA zincirinde değişiklikler, DNA'da kırılmalar ve yeniden birleşmeler

oluşturarak KKD sıklığında artışlara neden olmaktadır (Mankan, 2020). KKD ile ortaya çıkan kromozom dengesizliği, replikasyon mekanizmasını ve DNA hasarının onarımını etkileyen herhangi bir maddenin olumsuz etkisi ile yakından ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2023).

Bu test, OECD'nin 479 No'lu kararıyla 2014 yılında test klavuzundan çıkarılmıştır. Etkilerinin ve mekanizmasının tam olarak bilinmesi hakkında belirsizlikler vardır. Artan KKD frekansı mutlaka genetik hasarı göstermez ki bu, testin en büyük dezavantajı olabilir. Bu nedenle KKD testi son yıllarda önemini yitirmiştir. Aslında bu eksiklik, bir kimyasalın hücre DNA'sı ile etkileşime girme yeteneğini test etmede hala en hassas testlerden biri olduğu gerçeğini değiştirmemektedir. Diğer bir deyişle KKD testi, genotoksik bir kimyasala maruz kalan hücreleri yüksek hassasiyetle saptamaktadır. Dolayısıyla çokça farklı genotoksik araştırmalarda kullanılmaktadır (Ataseven, Yüzbaşıoglu, Çelebi-Keskin ve Ünal, 2016; Duydu, 2022).

2.4.3. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi

Mikronükleus (MN) testi genotoksik ajanların hızla tespit edilebilmesi için, hassas kolay ve daha fazla sayıda hücre incelenebilmesi bakımından yaygın olarak kullanılan testler arasındadır. Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) yönergelerini (Test no: 487) takip edilerek yapılan bu test genotoksik potansiyeli olan maddeleri değerlendirmeyi amaçlamaktadır (Çelik ve Uysal, 2020; Sanz-Serrano, Garayoa, Vitas, Cerain ve Azqueta, 2023).

Mikronükleus testi, kromozom düzeyinde genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikronükleus oluşum sıklığı, genetik materyale verilen hasarın bir göstergesi olarak gösterilmektedir. Mikronükleuslar, sentrik veya asentrik kromozom parçalarından kaynaklanan, hücre bölünmesi sırasında oluşan mikroçekirdeklerdir. MN sıklığındaki artış; mitoz ve kontrol noktaları için gerekli olan proteinlerde genetik kusur meydana gelmesi, DNA onarım mekanizmalarında hata olması, kimyasal genotoksin ve çevresel ajanlara aşırı maruz kalmak, DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli faktörlerde eksiklik olması gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır (Zor ve Aslan, 2020; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-241; Munakata, 2023).

Mikronukleus, hücrelerin sitoplazmasında görülebilen küçük, kromatin içeren yuvarlak bir mikroçekirdektir. Mikronükleusun DNA hasarı veya genomik kararsızlıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak mikronükleus, metabolizma, yaşlanma ve farklı hastalıklar gibi doğal süreçler veya birçok çevresel faktör tarafından indüklenebilir. Mikronukleus yöntemi son yıllarda mutajenik ve/veya anöjenik etkilerin belirlenmesinde güvenilir ve hassas bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Bu test ayrıca mesleki ya da çevresel maruziyetin genotoksik etkilerini tespit etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Bazı genotoksisite çalışmaları ve epidemiyolojik çalışmalar MN frekansının insan periferal lenfositlerinde artması ile kanser oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermiştir. Çevresel kirleticiler, DNA molekülünün yapısı ile etkileşime girebilmekte, oksitlenmiş bazlar ve DNA sarmal kırılmaları gibi lezyonlara neden olabilmektedir. DNA lezyonları, metabolik, immünolojik, nörolojik, tümörijenik etkilere ve nihayetinde organizmanın ölümüne yol açabilen hücre stresi oluşturmaktadır. Ayrıca, üreme süreçlerini etkileyip sonraki nesillerin de etkilenmesine yol açmaktadır. Böylece MN gibi genotoksisite testleri bu açıdan oldukça önemli ve hassas yöntemlerdir (Boriollo ve diğerleri, 2021; Conway ve diğerleri, 2020; Soldi, Londero, Schavinski ve Schuch, 2023).

Sitokinez blok mikronükleus sitom testi (CBMN); DNA hasarını ve sitotoksisiteyi ölçmeyi sağlayan kapsamlı bir test yöntemidir. Bu test yöntemi ile kromozomal kırıklar veya tam kromozom kayıplarının göstergesi olan mikronükleusların, DNA tamiri hatalarının ve telomer uç-kırıklarının göstergesi olan nükleoplazmik köprülerin (NPBs) ve oluşan DNA ve/veya DNA tamir mekanizmalarının durması veya çalışmamasının bir göstergesi olan nükleer tomurcukların (NBUDs) tespit edilmesi sağlanır. CBMN testi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Çevresel ajanlara maruziyetin incelenmesi, sitogenetik etkinin karakterizasyonu, DNA hasarı ve onarımı ile ilgili çalışmalar, radyoterapi gören kişilerde ve genetik bozuklukları olan bireylerde radyosensitive çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Avuloğlu-Yılmaz, 2018; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,241).

2.4.4. Comet testi

Comet testi hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle sık tercih edilen testlerdendir. Bu test elektroforez koşullarında, agaroza gömülü hücrelerde DNA göçünü ölçmek ve hücresel seviyede DNA hasarını ve tamirini gözlemek esasına dayanmaktadır.

DNA parçaları büyüklüklerine göre jel üzerinde çekirdekten artı kutba doğru hareket etmektedir. Böylece bir baş ve bir de kuyruk yapısı oluşan ve kuyruklu yıldıza benzer bir görüntü ortaya çıktığından "Kuyruklu Yıldız Testi" adı verilmiştir. Meydana gelen kuyruk uzunluğu genotoksisiteye bağlı olarak artmaktadır. Bu nedenle, birçok biyoizlem çalışmasında DNA hasarlarını tespit etmek için tercih edilmektedir. Comet testinde farklı hücre örnekleri kullanılabilmekte, hem DNA hasarı hem de tamiri incelenebilmektedir. Bu test DNA zincir kırıklarını belirleyebilen, hücresel DNA hasarını tespit edebilen ve örnek içindeki heterojenliğin belirlenmesini sağlayan bir testtir (Higelin ve diğerleri, 2016; Bonassi, Ceppi, Møller, Azqueta ve Milić, 2021; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313,335).

Comet kuyruğundaki DNA yüzdesi, genellikle görüntü analizi yoluyla bildirilen farklı tanımlayıcı türleri arasında en kolay tanımlayıcı olarak kabul edilir. Comet testi, düşük seviyelerde DNA hasarını tespit etme konusunda kanıtlanmış bir duyarlılığa sahiptir. Aynı zamanda hem canlı hem de cansız hücreleri kullanma esnekliğini göstermektedir. Ucuzdur, kullanımı basittir ve kısa bir zaman almaktadır. Tek hücre düzeyinde elde edilen veriler, güçlü istatistiksel analize olanak sağlamaktadır. Bu yöntemle; çeşitli kimyasalların, fiziksel elementlerin, nanoparçacıkların, ilaçların vb. mutajenitesini incelenmektedir. Bu test, belirli genomik lezyon tiplerini ayırmak için kullanılabilmektedir (Jiang ve diğerleri, 2023; Glavini´c ve diğerleri, 2023). Comet testi, insan biyo-izleme çalışmalarında DNA'ya zarar veren maddelere maruz kalmanın bir biyolojik belirteci olarak ve çeşitli koruyucu organizmalarda yapılan ekotoksikolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Bu test OECD test kılavuzu yönergelerine göre kullanılan ve yaygın olarak tercih edilen genotoksisite/antigenotoksisite testlerinden biridir (Cordelli, Bignami ve Pacchierotti, 2021; Yüzbaşıoğlu, Dilek, Erikel ve Ünal, 2023).

2.5. Carmoisine ve Ponceau 4R Gıda Boyaları ile Yapılan Çalışmalar

Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R (E-124) renklendiricilerinin genotoksik etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Carmoisine'in EFSA (2009 ve 2013) raporu dikkate alınarak yapılan genotoksisite çalışmalarının sonuçları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları Carmoisine'in yapılan testlerin hemen hemen hepsinde genotoksik etki sergilemediğini göstermiştir. Ponceau 4R'nin EFSA (2009 ve 2013) raporu dikkate alınarak yapılan genotoksisite çalışmalarının sonuçları ise Çizelge

2.2'de sunulmuştur. Bu çalışmalardan önemli bir bölümü bu gıda boyasının genotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 2.1. Carmoisine'in EFSA (2009 ve 2013) raporunda yer alan genotoksisite çalışmaları

ÇALIŞILAN ORGANİZMA	TESTLER	DOZ	SONUÇ	KAYNAK
Escherichia coli	Test bilgisi bulunamadı	0,5 g /100 mL	-	Lück ve Rickerl, 1960
Salmonella typhimurium TA1538	Ames	50 µg/petri	-	Garner ve Nutman, 1977
Salmonella typhimurium TA1535, TA1538, TA100 ve TA98	Ames	1, 2, 20, 500 ve 1000 µg/petri	-	Viola ve Nosotti, 1978
Salmonella typhimurium TA1538	Ames	5 µg/petri	-	Haveland-Smith ve Combes, 1980
Saccharomyces cerevisiae	Test bilgisi bulunamadı	5 mg/mL	-	Sankaranarayanan ve Murthy, 1979
Fare	KA	1 ve 10 mg/kg	-	Durnev ve diğerleri, 1995
Salmonella typhimurium	Mikrozom	Doz bilgisine ulaşılamadı	-	Ashby ve diğerleri, 1988
Fare	TK +/-	Doz bilgisine ulaşılamadı	-	Benigni, 1989
Çin hamsteri	KA KKD	Doz bilgisine ulaşılamadı	-	Gulati ve diğerleri, 1989

Çizelge 2.2. Ponceau 4R'nin EFSA (2009 ve 2013) raporunda yer alan genotoksisite çalışmaları

ÇALIŞILAN ORGANİZMA	TESTLER	DOZ	SONUÇ	KAYNAK
Escherichia coli	Bakteriyel Mutajenite	5000 mg/L	-	Lück ve Rickerl, 1960
Fare	KA	4 mg/kg	+	Agarwal ve diğerleri, 1993
Fare	TK +/-	Doz bilgisine ulaşılamadı	+	Cameron ve diğerleri, 1987
Salmonella typhimurium	Ames	10 mg/petri	+	Cameron ve diğerleri, 1987
Oryzias latipes	Dominant öldürücü	200 mg/kg	-	Shimada ve Egami, 1984
Salmonella typhimurium	Ames	5 mg/petri	+	Ishidate ve diğerleri, 1984
S. typhimurium	Ames	5000 µg/ ml	-	Longstaff ve diğerleri, 1984
S. typhimurium TA1535-TA1538 ve *Escherichia coli*	Ames	10 000 µg/ml	-	Haveland-Smith ve Combes, 1980
Sıçan hepatositleri	HPC/DR	0.1 mmol/l	-	Kornbrust ve Barfknecht, 1985
Hamster fibroblastları	KA	%12 ve %13 oranında	+	Ishidate ve diğerleri, 1984
Fare	MN		-	Hayashi ve diğerleri, 1988
Fare	Comet	1, 10, 100 ve 2000 mg/kg	+	Tsuda ve diğerleri, 2001

2011 yılında yapılan bir çalışmada Carmoisine ve Ponceau 4R'nin mikronükleus testi ile genotoksisitesi incelenmiştir. İnsan periferik kan örneklerine gıda boyalarının 100, 200, 300 µg/mL konsatrasyonları uygulanmış ve sonuçta MN frekansında kontrole kıyasla anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Swaroop, Roy ve Vijayakumar, 2011). Söz konusu çalışmada tek donörden alınan hücreler kullanıldığı için donör farkından kaynaklanabilecek değişiklikler önlenememiştir. İnsan lenfositlerinde bu gıda boyalarıyla yapılmış başka bir genotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır.

Carmoisine, sodium benzoate ve aspartame gibi yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* kök meristem hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, dört farklı konsantrasyon (0.05, 0.1, 1, 10 g/L) kullanılmıştır. Sonuçta, C metafaz, vagrant (başıboş) kromozom ve mikronükleus frekanslarında artışlara neden olduklarından genotoksik risk taşıdıkları ve aynı zamanda sitotoksik oldukları tespit edilmiştir (Vasileva ve diğerleri, 2021).

Başka bir çalışmada Carmoisine'nin genotoksisitesi *Allium cepa* kullanılarak değerlendirilmiştir. *Allium cepa'*nın kök meristematik hücreleri 24 ve 48 saat süreyle bu azo boyanın %0.25, %0.50, %0.75 ve % 1.0'lik konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Mitotik indeks ve kromozomal sapmalar gibi bazı genotoksisite parametreleri incelenmiştir. Carmoisine'nin, mitotik indekste önemli bir azalmaya neden olduğu, yüksek konsantrasyonda ve uzun maruz kalma süresinde farklı tiplerde kromozomal anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir (Khan, Alia, Hamid ve Ganiec, 2020).

Carmoisine'nin içinde bulunduğu gıda katkı maddelerinin kombinasyonları albino ratlarda comet testiyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 14 farklı gıda katkı maddesi eş zamanlı olarak ratlara verilmiş olup çalışmanın sonucunda, beyin, böbrek ve karaciğerde farklı derecelerde genotoksik aktivite gözlenmiş ve katkı maddesi sayısı arttıkça genotoksik etkinin de arttığı rapor edilmiştir (Raya, Aboul-Enein, El-Nikeety, Mohamed ve Abdelwahid, 2020).

Yapılan bir çalışmada, aralarında Carmoisine ve Ponceau 4R bulunan farklı gıda renklendiricilerinin sıçan oral akut toksisitesini, hepatoksisiteyi, immünotoksisiteyi, genotoksisitesini ve metabolitlerinin ekotoksisitesini tespit etmek için *in silico* çalışma

yapılmıştır. Carmoisine ve Ponceau 4R 81-275 mg/kg olacak şekilde belirlenmiştir. Çalışma sonucunda bu iki gıda boyasının olumsuz bir etkisi olmadığı açıklanmıştır (Kargupta, Dutta, Roychoudhury, Rana ve Talapatra, 2022). Bu çalışmanın aksine Carmoisine'in farelere 120 gün boyunca 4, 200 ve 400 mg/kg olmak üzere üç farklı dozda oral olarak uygulandığı bir diğer çalışmada hayvan vücut ağırlığı, organ ağırlıkları, hematoloji, biyokimya ve moleküler biyoloji değerlendirmesi dahil olmak üzere temel toksikolojik incelemeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda, yüksek konsantrasyonda (400 mg/kg) Carmoisine muamelesinin böbrek yetmezliği ve hepatotoksisiteye neden olabileceği açıklanmıştır. RT-PCR sonuçları, Carmoisine ile muamele edilen fare karaciğer dokularında Bcl-x ve PARP geninin ekspresyonunun yoğun bir şekilde arttığını, p53 geninin ekspresyonunun ise azaldığını göstermiştir (Reza ve diğerleri, 2019).

Yapılan bir çalışmada Carmoisine ve Curcumin gıda boyalarının sıçanların spermlerindeki doğurganlık genleri üzerindeki etkisine bakılmıştır. 15, 30 ve 45 gün boyunca günlük alım değeriyle beraber bu değerin 5 ve 10 katı şeklinde 3 konsantrasyon olarak oral yolla bu gıda boyaları verilmiştir. Sperm analizi ve testis ekspresyon düzeyi, Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), tirozin kinaz reseptörü (c-KIT), folikül uyarıcı hormon reseptörü (FSHR), A kinaz ankor proteini 3 (PRKA3) gibi parametlere bakılmıştır. Çalışma sonucunda, zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde Carmoisine ile muamele edilmiş sıçanlarda test edilen genlerin önemli ölçüde regülasyonunu düşürdüğü ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, Carmoisine izin verilen kabul edilebilir günlük seviyeden (50 mg/kg vücut ağırlığı) daha yüksek konsantrasyonlarda tüketildiğinde doğurganlık üzerinde farklı seviyelerde tehlikeli etkilere neden olduğu gözlenmiştir (Montaser ve diğerleri, 2018).

Carmoisine'nin farklı canlılarda gelişim üzerine etkilerinin incelendiği iki çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan ilki Vorobey ve diğerleri'nin yaptığı bir çalışmadır. Bu çalışmada Carmoisine'nin sulu çözeltisi, soya fasulyesi bitkilerinin fizyolojik parametreleri üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmada *B. japonicum* 634b, 646, 614, M8, PC07, PC09, PC10 ve Tn5-mutantları B20, B78, B144 suşları test nesneleri olarak kullanılmıştır. +28 °C'de 8 gün boyunca bu besleyici ortamda oluşan, bakteriyel preparatdaki soya fasulyesi tohumlarının yüzeyine, Carmoisine eklenmiştir. Soya fasulyesi tohumlarının, bu renklendiricinin 100 ml'de 0,25, 0,5 ve 1,0 g olacak şekilde solüsyonlarıyla muamele edilip büyüme süreçlerindeki inhibisyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen veriler de sentetik

renklendirici olan Carmoisine'nin farklı olgunluk gruplarına ait soya fasulyesi çeşitlerinin çimlenmesi üzerinde fitotoksisitesinin olmadığı veya düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir (Vorobey, Kukol ve Pukhtaıevych, 2021). Gelişim üzerine etkisinin incelendiği diğer çalışma Kızıltan ve diğerleri (2022) tarafından gerçekleştirilmiştir. Carmoisine'nin Zebra balığında, önerilen ve aşırı maruz kalma dozları (4 ila 2000 ppm) kullanılmış ve maruz kalmanın zebra balığının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu amaçla 96 saat boyunca belirlenen dozlarda Carmoisine'e maruz bırakılan zebra balıklarında birçok morfolojik ve fizyolojik parametre incelenmiş ve bu parametrelerdeki değişikliklerin etki mekanizmaları belirlenen metabolit seviyeleri ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak, uygulanan Carmoisine'nin ciddi malformasyonlara, boy ve göz çapında azalmaya, serbest oksijen radikallerinin miktarında, apoptotik hücrelerde ve lipid birikiminde artışa, larva hareketliliğinde doza bağlı olarak azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Kızıltan ve diğerleri, 2022).

Tez kapsamında genotoksik etkisinin incelendiği Ponceau 4R boyası ile yapılmış çalışmalar da oldukça sınırlıdır. Santana ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, Ponceau 4R gıda boyasının *Allium cepa* L. kök meristematik hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 0.25, 0.50 ve 0.75 g/L'lik konsantrasyonlar 24 ve 48 saat süreyle kök uçlarına uygulanmış ve sonuçta, her üç konsantrasyonun da kontrole kıyasla tüm muamele sürelerinde mitotik indekste istatiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte mikronükleuslu hücrelere, gen amplifikasyonlarına ve telofaz-anafaz köprülerine neden olduğu gözlenmiştir (Santana, Sousa ve Peron, 2015).

Çetinkaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Ponceau 4R'nin incelenen konsantrasyonlarda (25, 50, 75 mg/ml) *Drosophila melanogaster'*in normal ve serrat kanatlarında mutajenik bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bulgu Ponceau 4R boyasının *Drosophila melanogaster* heterozigot larvalarının embriyonik gelişimi sırasında kanat yapısını oluşturan hücrelerde genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ek olarak, somatik hücrelerde meydana gelen mutasyon veya rekombinasyon sonucu mutant kanatların oluşmasında da rol oynadığı bildirilmiştir. Ponceau 4R ile muamele görmüş *Drosophila melanogaster*'in indüklenen mutant hücrelerinde, bu ajanın konsantrasyonuna bağlı olarak genotoksik aktivite belirlenmiştir (Yılmaz-Çetinkaya ve Yurtsever, 2021).

Carmoisine ve Ponceau 4R gibi birçok azo boyanın genotoksisite, üreme, gelişimsel toksisite, karsinojeniteye ve birçok sağlık sorununa neden olduğu ayrıca çocuklarda davranış değişikliklerine yol açtığı rapor edilmiştir. Bu nedenle, azo-boyaların canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkileri göz önüne alınarak bunları içeren gıdaların kesinlikle kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Yarima, Lawal, Gwaram ve Abdulkarem, 2021). Bu tür sentetik gıda renklendiricilerinin, hiperaktivite, alerjik durumlar ve hatta kanserler gibi zararlı etkileri olduğu bildirilmektedir (Sen, Barrow ve Deshmukh, 2019). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda renklendirici alımının yetişkinlerde baş ağrılarına neden olabildiği belirlenmiştir (Kucharska ve Grabka, 2010).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yapılan bu araştırmada, gıda boyalarından Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R (E-124)'nin insan periferal lenfositleri kullanılarak *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir. Periferik kan, herhangi bir ilaç tedavisine maruz kalmayan, sigara ve alkol kullanmayan, kronik bir hastalığı olmayan ve genotoksik bir ajana maruz kalmamış, 18-27 yaş arası gönüllü olan iki kadın donörden alınmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.03.2021-09 tarih ve sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Test materyalleri

E-122 Carmoisine

Kimyasal adlandırması: E-122 Carmoisine veya Azorubine

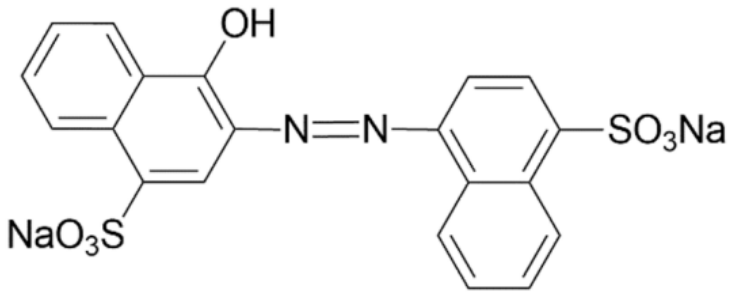
IUPAC adı: Disodyum;4-hidroksi-3-[(4-sülfonatonaftalen-1-il) diazenil] naftalen-1-sülfonat

Molekül ağırlığı: 502.43 g/mol

Molekül formülü: $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$

CAS No: 3567-69-9 (Sigma-Aldrich)

Yapısal Formülü: Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Carmoisine'nin yapısal formülü (Guerrero-Rubio ve diğerleri, 2023)

E-124 Ponceau 4R

Kimyasal adlandırması: E-124 Ponceau 4R

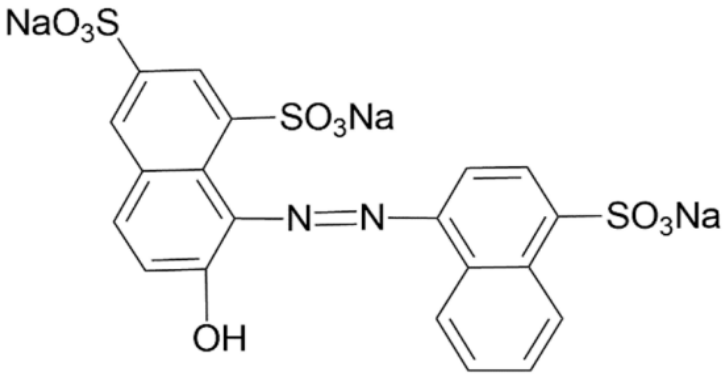
IUPAC adı: Trisodyum;7-hidroksi-8-[(4-sülfonatonaftalen-1-il) diazenil] naftalen-1,3-disülfonat

Molekül ağırlığı: 604,7 g/mol

Molekül formülü: $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$

CAS No: 2611-82-7 (Sigma-Aldrich)

Yapısal Formülü: Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Ponceau 4R'nin yapısal formülü (Guerrero-Rubio ve diğerleri, 2023)

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Sitokalasin-B (CAS No: 14930-96-2), Mitomisin-C (CAS No: 50-07-7), Bromodeoksiüridin (CAS No: 59-14-3) ve Kolkisin (CAS No: 64-86-8) Sigma'dan temin edilmiştir. Glasiyal asetik asit (CAS No: 64-19-7), Metil alkol (CAS No: 67-56-1), Entellan (CAS No: 1079610500) ve Giemsa (CAS No: 51811-82-6) Merck'ten, LymphoPlus Medium (CAS No: CY100-100)), Etilendiamintetraasetik asit (CAS No: 6381-92-6), NaOH (CAS No: 1310-73- 2), Tris (CAS No: 77-86-1), Triton X-100 (CAS No: 9002-93-1), dimetil sülfoksit (CAS No: 67-68-5), Low-Melting Agar (CAS No: 9012-36-6) Normal-Melting Agar (CAS No: 9012-36-6), ve etidyum bromür (CAS No:1239-48-8) ise AppliChem'den alınmıştır. Lymphocytes Seperation Media (CAS No: JO100-840) Cegrogen'den alınmıştır.

3.2. Metod

Carmoisine ve Ponceau 4R'nin *in vitro* genotoksik etkilerini incelemek amacıyla, kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD) ve sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testleri uygulanmış olup, izole insan lenfositlerinde ise comet testi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Çalışmada kullanılan konsantrasyonların belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak konsantrasyonları belirlemek için literatür taramalarından elde edilen Carmoisine ve Ponceau 4R'nin deney hayvanlarıyla yapılmış çalışmalarına ait LD_{50} dozları referans alınmıştır (Çizelge 3.1). Referans değerlerden yola çıkarak ön denemeler gerçekleştirilmiş ve mitotik indeks değerleri saptanarak, proliferasyon oranına göre konsantrasyonlar seçilmiştir. Bu amaçla, Carmoisine ve Ponceau 4R'nin 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 µg/mL'lik konsantrasyonları denenmiş ve bu ön denemelerin sonuçlarına göre 37,5; 75; 150; 300 µg/mL'lik konsantrasyonları seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Carmoisine ve Ponceau 4R'nin LD_{50} dozları

Test Materyali	Hayvan	Uygulama Şekli	LD_{50} değeri	Kaynaklar
Carmoisine	Rat	Oral	10 mg/kg	Gaunt ve Farmer (1967)
	Fare	Oral	8 mg/kg	Gaunt ve Farmer (1967)
Ponceau 4R	Rat	Oral	8 mg/kg	Gaunt ve Farmer (1967)

3.2.2. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) testleri

Kromozomal anormallik (KA) testi, Evans'ın (1984:405,424) yöntemine göre bazı modifikasyonlar ile (Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal ve Aksoy, 2006) uygulanmıştır. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemi kullanılarak bazı değişikliklerle (Speit ve Haupter, 1985) yapılmıştır.

Donörlerden alınan heparinize edilmiş periferik kan (0,2 mL), steril ortamda 2,5 mL'lik LymphoPlus Medium besi ortamının bulunduğu tüplere ekilmiştir. Sonrasında aynı tüplere BrdU (5-Bromo-2- deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan 10 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüpler 37ºC'deki etüvde 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Kültürün başlangıcından itibaren 24. ve 48. saatte Carmoisine ve Ponceau 4R'nin yukarıda belirtilen ön deneme sonucu seçilen dört farklı konsantrasyonu (37,5; 75; 150; 300 µg/mL) besiyerine eklenmiştir. Aynı zamanda distile su negatif kontrol olarak ve Mitomisin C ise pozitif kontrol (0,20 µg/mL,) olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Kültürün sonlandırılmasına 2 saat kala (kültürün 70. saatinde) tüm tüplere 0,06 µg/mL kolkisin ilave edilmiştir.

72 saatlik kültür süresi sonunda tüpler etüvden çıkarılmış ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kalan kısım üzerine 0,075 M KCl (Potasyum klorür) çözeltisinden ilave edilmiştir. Bu çözelti ile 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılan kültür tüpleri, süre bitiminde yeniden santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant kısmı atılmış ve hücreler üzerine soğuk 3:1 metanol: asetik asit karışımı ilave edilerek 45 dakika boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi, aynı şekilde 2 kez daha tekrar edilmiştir. Sonrasında pipetaj yöntemiyle tüpün dibindeki hücre süspansiyonu homojen hale getirilmiş ve soğuk lamlar üzerine üstüste düşmeyecek şekilde damlatılmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında 24 saat süreyle kurutulmuştur.

Sitokinez blok mikronükleus sitom testi (CBMN-Cyt)

Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi Fenech (2007)'in metodu ile Yüzbaşıoğlu ve arkadaşlarının (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,241) kullandığı bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Buna göre her donörden alınan heparinize

edilmiş 0,2 mL periferik kan, içerisinde 2,5 mL'lik LymphoPlus Medium besi ortamı bulunan tüplere ekilmiştir.

Kültür tüpleri 37ºC'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürün başlangıcından itibaren 24. saatte Carmoisine ve Ponceau 4R'nin yukarıda belirtilen dört farklı konsantrasyonu (37,5; 75; 150; 300 µg/mL) besiyerine eklenmiştir. Ayrıca bir pozitif (Mitomisin C, 0,20 µg/mL) ve bir de negatif kontrol (distile su) kullanılmıştır. İnkübasyonun 44. saatinde, kültür ortamına sitokalasin-B (5,2 µg/mL) ilave edilmesiyle sitokinez engellenmiştir. Daha sonra hücreler, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan süpernatant atılmıştır. Tüplere, 0,75 M KCI (Potasyum klorür) hipotonik solüsyonu ilave edilmiştir. Ardından ise yine soğuk 3:1 metanol: asetik asitten oluşan karışım ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilip tüpler +4°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Sonrasında formaldehit ilave edilmiş fiksatif ile fiksasyon gerçekleştirilmiş ve son kez santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibinde kalan hücre süspansiyonu pipetle homojenize edilip soğuk lamlar üzerine damlatılarak yayılmasıyla preparatlar hazır hale gelmiştir. Kurumaya bırakılan preparatlar 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Preparatların boyanması

Hazırlanan preparatlar %5'lik Giemsa boyası (pH=6,8) ile 15-20 dakika boyanarak kromozomal anormallikler, mitoz geçiren hücre miktarı, mikronükleuslar, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprüler incelenmiştir. Kardeş kromatit değişimlerinin gözlenmesi ve replikasyon indeksinin belirlenmesi için ayrılan diğer preparatlar ise Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta bazı modifikasyonlar yapılarak Floresan+Giemsa boyamasına tabi tutulmuştur (Speit ve Haupter, 1985). Bu uygulamaya göre preparatlar oda sıcaklığında 24 saat kurutulduktan sonra, düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6,8) ile kapatılmıştır. Daha sonra UV lambası (254 nm dalga boyu) ile 13 dakika ışınlanmıştır. Saf suda yıkanan preparatlar önceden 60 ºC sıcaklığa getirilmiş 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından tekrar distile su ile yıkanan preparatlar, %5'lik Giemsa boyasıyla (pH= 6,8) 25 dakika boyanmıştır. Kurumaya bırakılan preparatlar entellan ile daimi hale getirilip mikroskobik inceleme için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Mikroskobik inceleme ve sonuçlarının değerlendirilmesi

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin belirlenmesi

Kromozomal anormalliklerin ve Mitotik indeksin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için sayılan hücre miktarı aşağıdaki gibidir:

-KA için her bir donörden kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz (toplam 200 metafaz)

-Mİ için her bir donörden 1000 hücre (toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir.

Bu sayım sonuçları kullanılarak anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği miktarı belirlenmiştir. Mitotik indeks ise bölünen hücre sayısını toplam hücre sayısına bölerek ve yüzdesi alınarak hesaplanmıştır.

Kardeş kromatit değişimi ve replikasyon indeksinin belirlenmesi

Kardeş kromatit değişimini belirlemek için, DNA'nın yapısında bulunan timin bazının analoğu olan BrdU kültür tüplerine eklenmiştir. Böylece, hücre DNA'sını replike ettiği sırada yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçmiştir. Sonrasında UV ile ışınlama yapılmış, kromozomlarda BrdU içeren bölgeler açık renkte boyanırken, BrdU içermeyen bölgeler koyu renkte boyanmıştır. Böylece KKD, oluşan renk farklılığı sayesinde kolayca fark edilebilmekte ve ikinci mitozda ki metafaz hücrelerinde kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz evresindeki hücreler tespit edilebilmektedir.

Kardeş kromatit değişimi ve Replikasyon indeksi (Rİ)'nin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için sayılan hücre miktarı aşağıdaki gibidir:

-KKD için her bir donörden ikinci mitozdaki 25 metafaz (toplam 50 metafaz)

-Replikasyon indeksi (Rİ) için her bir donörden 100'er hücre (toplam 200 hücre)

Replikasyon indeksi (Rİ)=[1×(M1) +2×(M2)+3×(M3)]/N (N= incelenen toplam hücre sayısı) formülü (Schneider ve Lewis, 1981) kullanılarak hesaplanmıştır.

Mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü (NPK) frekanslarının ve Proliferasyon indeksinin (Pİ) belirlenmesi

Mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları, binükleat (çift çekirdekli) hücreler incelenerek değerlendirilmiştir. Binükleat hücreler, çekirdek bölünmesini tamamlamış fakat sitoplazmik bölünmesi inkübasyonun 44.saatinde eklenen Sitokalasin-B ile engellenmiş olan hücrelerdir. Bu hücreler aynı zamanda genotoksisitesi test edilmek istenen materyalin eklenmesinden sonra bölünen hücrelerdir.

MN, NT, NPK ve Pİ'nin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için sayılan hücre miktarı aşağıdaki gibidir:

-MN için her bir donörden 1000 binükleat hücre (toplam 2000) içindeki 1, 2 ve 3 mikronükleus sayısı

-NT ve NPK için her bir donörden 1000 binükleat hücre (toplam 2000)

-Pİ için her bir her bir donörden 500 (toplam 1000) hücre içindeki 1 çekirdekli (M1), 2 çekirdekli (M2), 3 çekirdekli (M3), 4 çekirdekli (M4) ve üzeri çekirdekli hücre sayısı

Hücre başına düşen mikronükleus sayısı [1x (1MN) +2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]/N (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak, Proliferasyon indeksi ise [1x(M1) +2x(M2)+3x(M3)+ 4x(M4)]/n (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak belirlenmiştir (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-241; Mamur, Yüzbaşıoğlu, Altok, Ünal ve Değer, 2019).

3.2.4. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Comet testi

Yapılan çalışmada, test materyali olarak kullanılan Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları izole insan lenfositlerinde uygulanmıştır. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis,SCGE) veya Comet tekniği, Singh ve arkadaşlarının (1988) uyguladığı metot ile Avuloğlu-Yılmaz ve arkadaşlarının (2017) kullandığı bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313,335). Buna göre; kan

örneklerinin 100'er µL'si Fosfat tamponu (PBS) ile karıştırılmış ve Lymphocytes Seperation Media lenfositler çözeltisi yardımıyla izole edilmiştir.

Tripan Blue Canlılık testi ≥ %97 bulunmuştur.

Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyalarının belirlenen konsantrasyonları ile izole lenfositler 1 saat muamele edilmiştir. Ardından agar ile kaplanmış lamlar üzerine yayım yapılmıştır. Bu preparatlar önce lysing işlemine ardından elektroforez tankında 25V 300 mA'de 20 dakika yürütme işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda Etidyum bromür (EtBr) ile boyanan preparatlar Comet ölçüm programı "Comet Assay IV" (Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak, floresan mikroskobunda incelenmiştir.

Comet kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinin belirlenmesinde her bir konsantrasyon için sayılan hücre miktarı aşağıdaki gibidir:

-her bir donörden 100'er hücre (Toplam 200 hücre)

3.2.5. İstatistiksel analizler

Kromozom anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet testlerine ait uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen değerler karşılaştırılmıştır.

Mitotik indeks, replikasyon indeksi, KKD/Hücre sayısı, MN/Hücre sayısı, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansı, nükleer bölünme indeksi, anormal hücre frekansı, KA/Hücre sayısı, % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 23.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansı ve proliferasyon indeksi (Pİ) sonuçları z testi ile, kardeş kromatit değişimi ve comet testi sonuçları One-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Carmoisine Uygulamasının Sonuçları

4.1.1. Kromozomal anormallik (KA) testi sonuçları

Carmoisine'nin kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde yapılan analiz sonuçlarına göre bütün uygulama saatlerinde (24 ve 48 saat) beş tip yapısal anormallik görülmüştür. Bunlar, kromatit kırığı (%57,63), kardeş kromatitlerde birleşme (%15,25), kromozom kırığı (10,17), fragment (%8,48) ve kromatit değişimi (1,70) dir. Sayısal anormalliklerden ise poliploidi (%6,77) gözlenmiştir. Bunlar arasında en fazla görülenler ise, kromatit kırığı ile kardeş kromatitlerde birleşmedir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

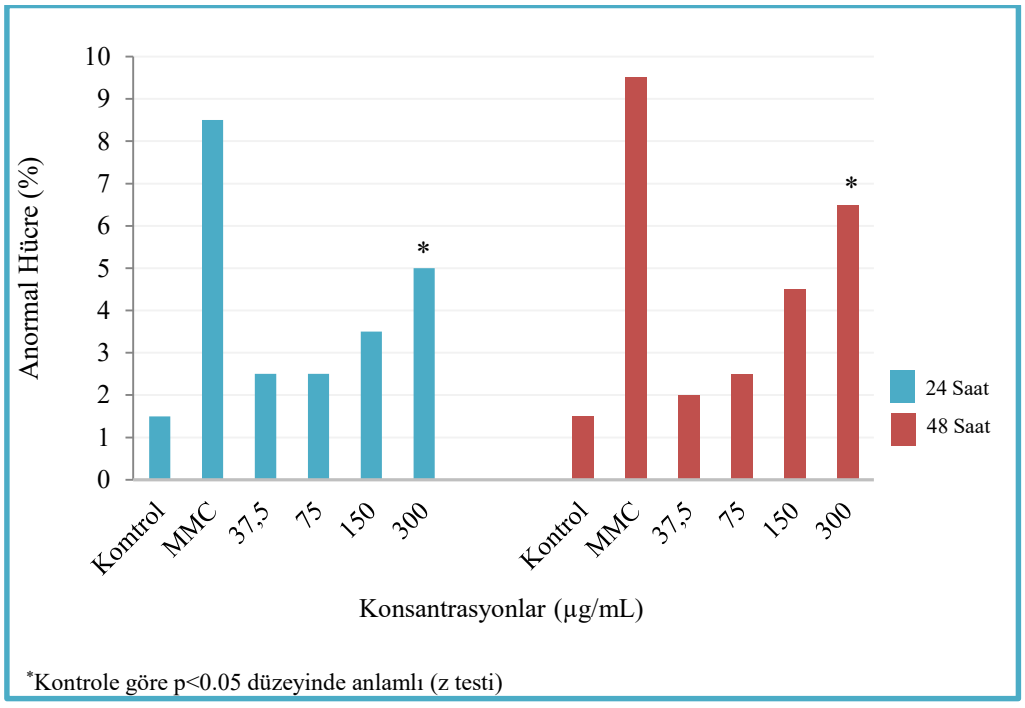
Carmosine'nin tüm muamele sürelerinde anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansını konsantrasyona bağlı olarak artırdığı (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısı için r=0,95. 48 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için r=0,95, hücre başına düşen anormallik sayısı için r=0,93) görülmüştür. Ancak bu artış her iki parametre için de sadece 300 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlıdır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Carmoisine'nin insan lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanmasıyla oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları

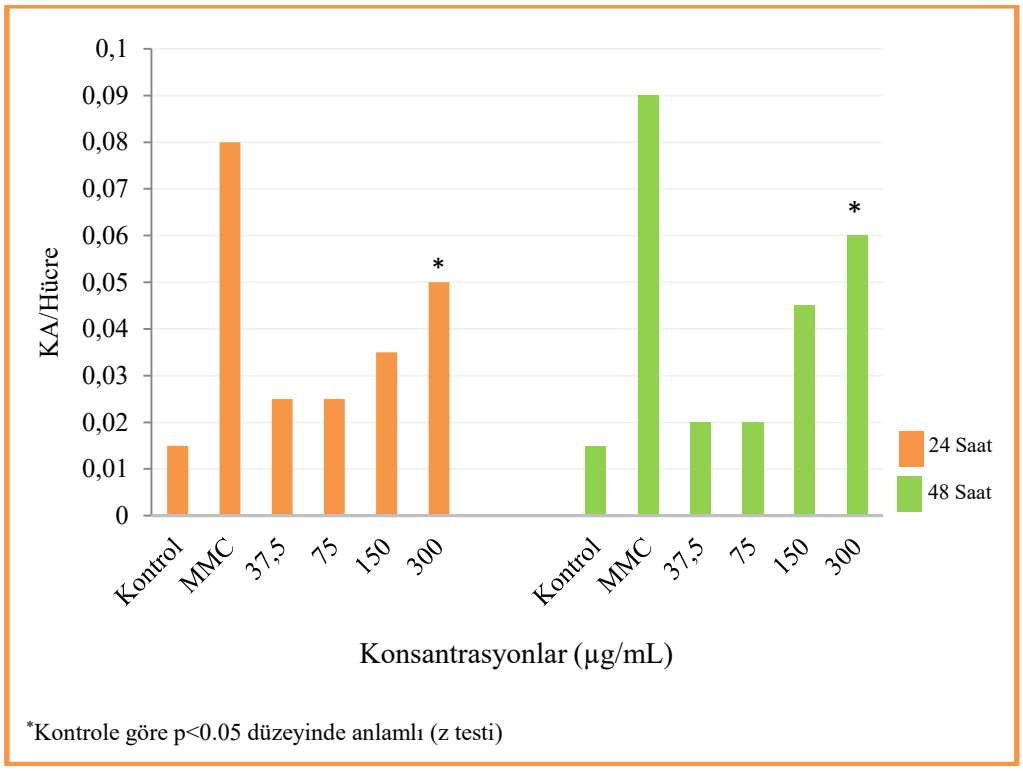
Test Maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ds	ktd	p		
Kontrol	24	0,00	2		1					1,50±0,86	0,015±0.008
MMC	24	0,20	9	2	1	2		1	2	8,50±1,97	0,080±0,019
Carmoisine	24	37,5	3			1			1	2,50±1,10	0,025±0,011
		75	4		1					2,50±1,10	0,025±0,011
		150	4	1		1			1	3,50±1,29	0,035±0,012
		300	6	1	1	2				5,00±1,54*	0,050±0,015*
Kontrol	48	0,00	2		1					1,50±0,86	0,015±0,008
MMC	48	0,20	10	3	1	2	1	1	1	9,50±2,07	0,090±0,020
Carmoisine	48	37,5	2		1	1				2,00±0,98	0,020±0,009
		75	3	1		2				2,50±1,10	0,020±0,009
		150	4	1	1	1		1	1	4,50±1,46	0,045±0,014
		300	8	2	1	1			1	6,50±1,74*	0,060±0,016*
Kromozomal anormallik yüzdesi			57,63	10,17	8,48	15,25		1,70	6,77		

ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, ds: disentrik, ktd: kromatit değişimi, p: poliploidi

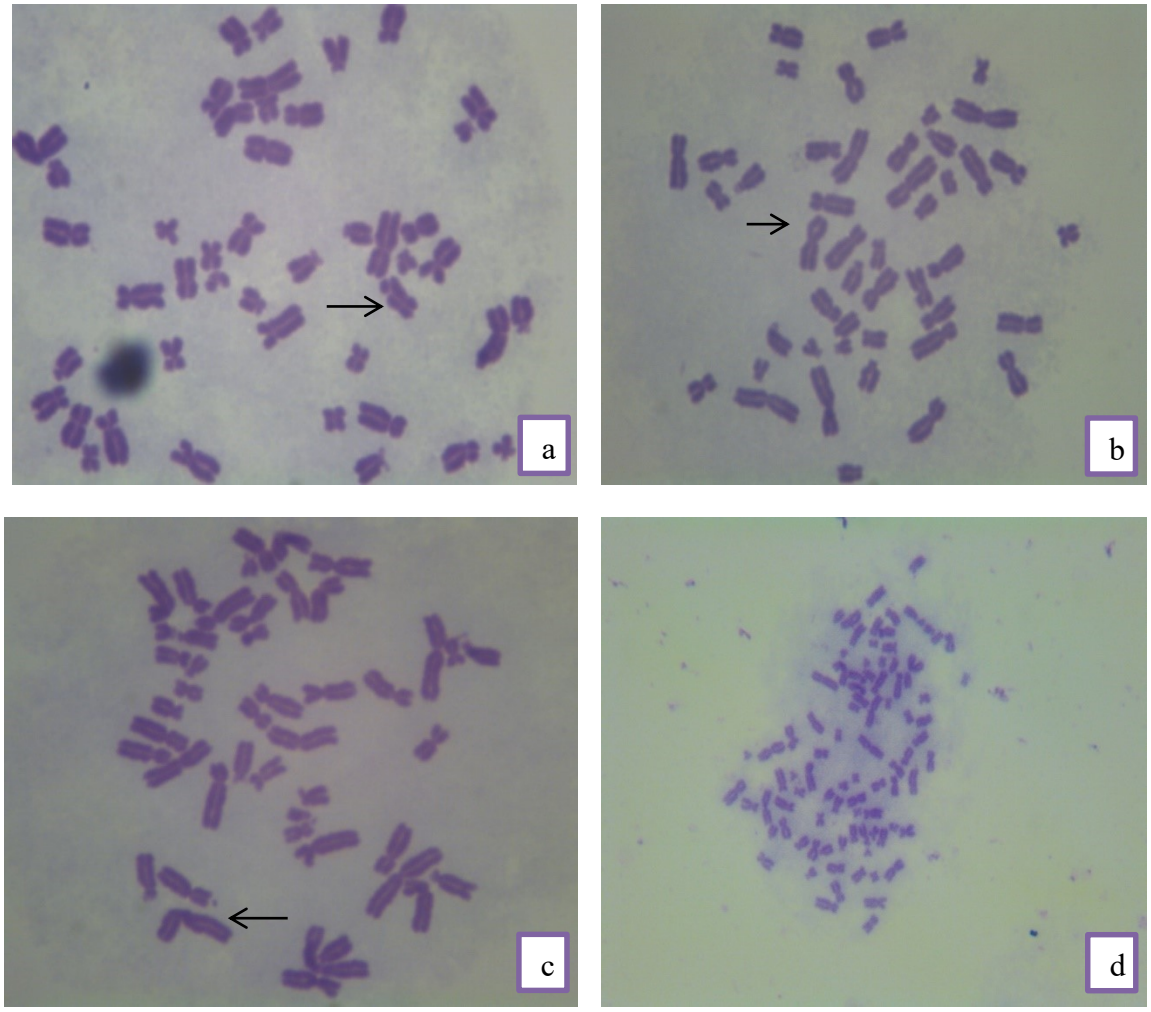
*Kontrole göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.1. Carmoisine'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkileri



Şekil 4.2. Carmoisine'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri



Resim 4.1. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı b) kardeş kromatitlerde birleşme c) fragment d) poliploidi

4.1.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları

Carmoisine'nin her iki 24 ve 48 saatlik muamele sürelerindeki, KKD frekansları, replikasyon ve mitotik indeks değerleri ile her bir konsantrasyon için birinci, ikinci ve üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Carmoisine'nin 24 saatlik uygulamasında, kontrole kıyasla en yüksek konsantrasyonda KKD oranında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür.

Aynı zamanda bu artışın konsantrasyonla güçlü bir ilişkisi vardır (r=0,82). 48 saatlik uygulamada ise kardeş kromatit değişim frekansı (KKD) kontrole kıyasla hiçbir konsantrasyonda anlamlı olarak değişiklik göstermemiştir.

Mitotik indeks 24 saatlik uygulamada hemen hemen tüm konsantrasyonlarda (en düşük konsantrasyon hariç), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda kontrole göre önemli oranda düşmüştür. Regresyon analizi, bu düşüşün konsantrasyonlara bağlı olduğunu (24 saat r = -0,76 ve 48 saat r = -0,89) göstermektedir (Çizelge 4.2, Şekil 4.3). Replikasyon indeksi (Rİ) ise tüm uygulama sürelerinde ve uygulanan konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı düzeyde değişmemiştir.

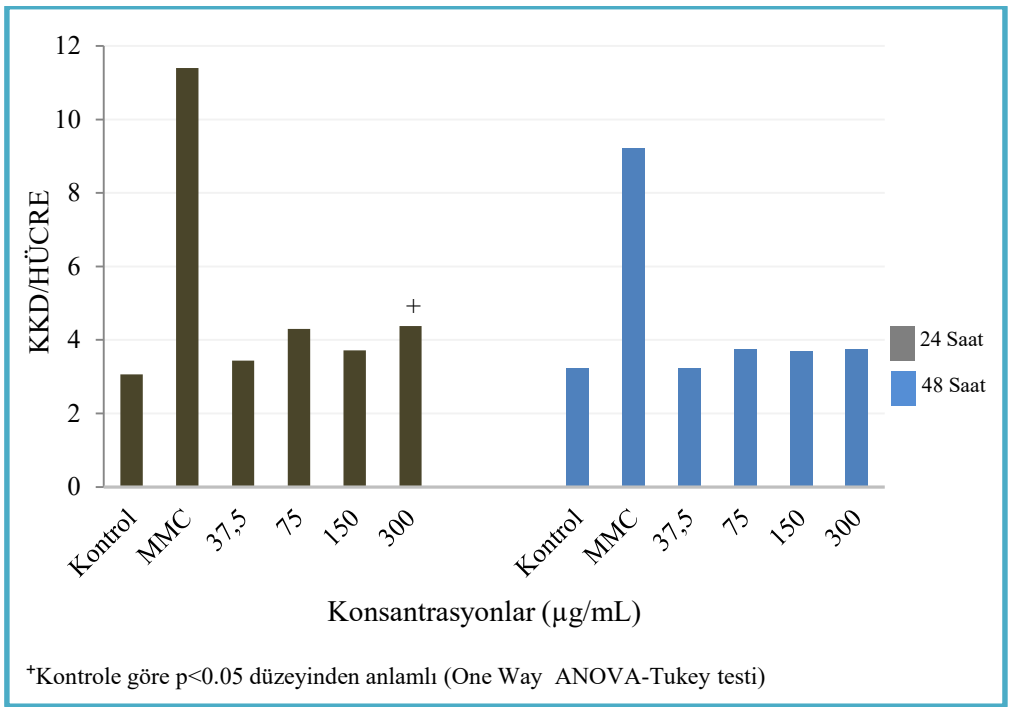
Çizelge 4.2. Carmoisine uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD hücre /±SH	M1	M2	M3	Rİ±SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg /mL)							
Kontrol	24	0,00	0-11	3,06±0,33	68	56	74	2,01±0,05	7,95±0,60
MMC	24	0,20	4-22	11,4±0,64	61	57	82	2,10±0,05	4,60±0,48
Carmoisine	24	37,5	0-9	3,44±0,31	71	55	74	2,01±0,06	6,65±0,55
		75	0-10	4,30±0,36	66	56	81	2,10±0,06	4,85±0,48***
		150	0-10	3,72±0,35	61	56	85	2,14±0,05	4,65±0,47***
		300	0-11	4,38±0,38+	55	57	88	2,16±0,05	5,65±0,51**
Kontrol	48	0,00	3-14	3,22±0,38	68	59	73	2,02±0,05	7,55±0,59
MMC	48	0,20	2-29	9,20± 1,09	80	53	67	1,93±0,06	3,55±0,41
Carmoisine	48	37,5	0-4	3,24±0,25	72	55	73	2,00±0,06	6,80±0,56
		75	1-11	3,74±0,27	72	53	75	2,01±0,06	6,80±0,56
		150	0-8	3,68±0,27	68	53	79	2,05±0,06	4,40±0,47***
		300	0-12	3,74±0,41	70	58	72	2,01±0,05	4,85±0,48***

** Kontrole göre p<0.01 düzeyinde anlamlı (z testi)

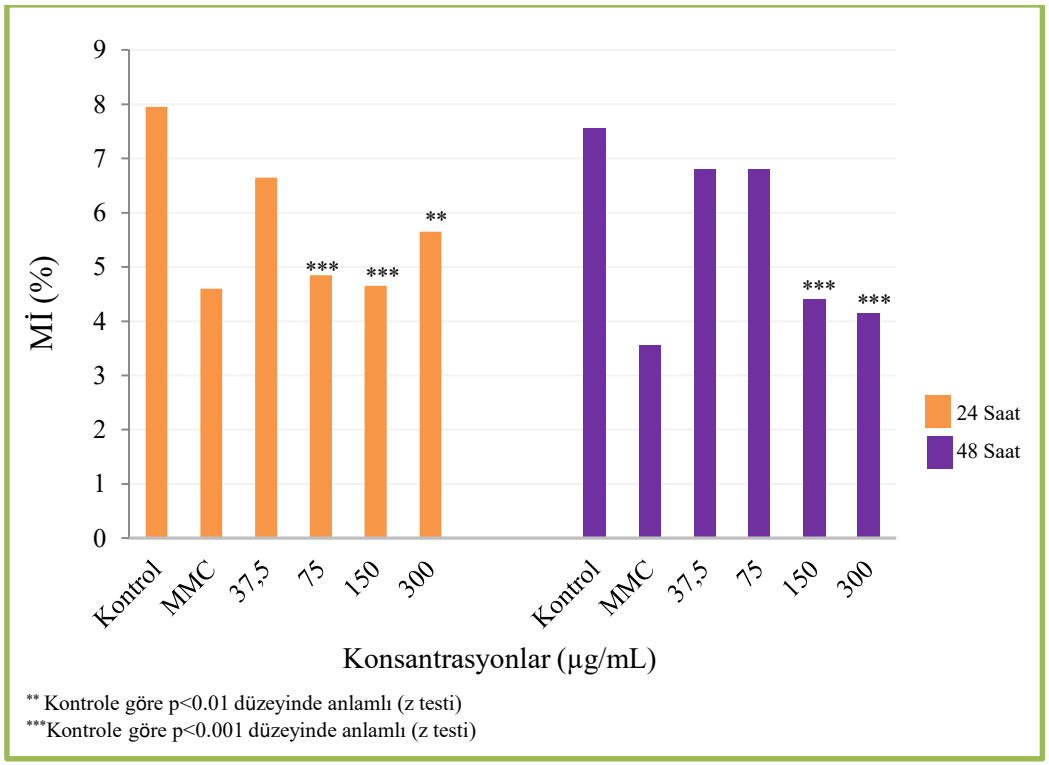
***Kontrole göre p<0.001 düzeyinde anlamlı (z testi)

+Kontrole göre p<0.05 düzeyinden anlamlı (One Way ANOVA-Tukey testi)



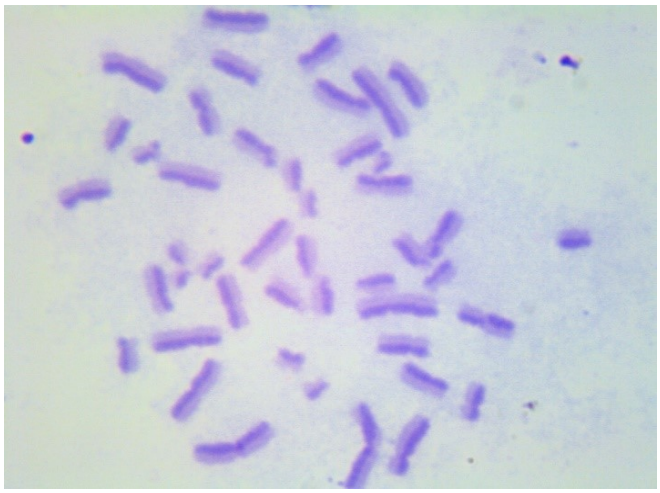
+Kontrole göre p<0.05 düzeyinden anlamlı (One Way ANOVA-Tukey testi)

Şekil 4.3. Carmoisine'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansları



** Kontrole göre p<0.01 düzeyinde anlamlı (z testi)
***Kontrole göre p<0.001 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.4. Carmoisine'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri



Resim 4.2. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimlerine bir örnek

4.1.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi sonuçları

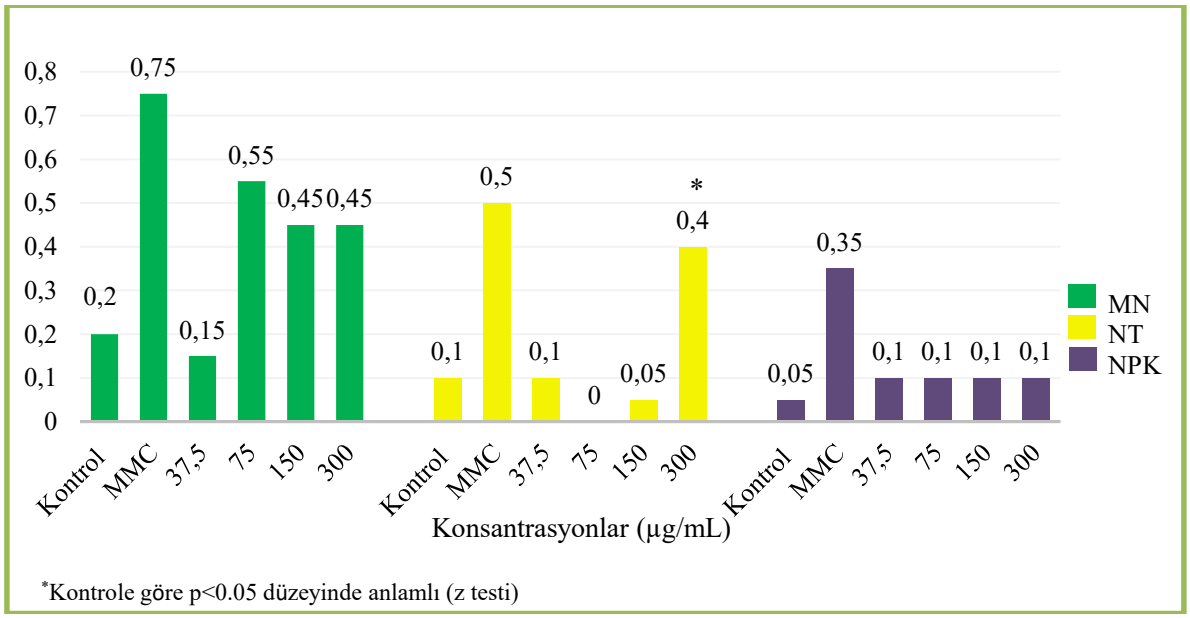
Carmoisine ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen binükleat hücrelerdeki mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü (NPK) frekansları ve proliferasyon indeksi (Pİ) Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Yapılan sitokinez blok mikronükleus sitom testinde değerlendirilen parametrelerden MN, NPK ve PI değerlerinde kontrole göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Yalnızca NT frekansında en yüksek konsantrasyonda (300 µg/mL) kontrole kıyasla anlamlı bir artış söz konusudur ve bu artışın konsantrasyonla ilişkisi zayıftır (r=0,55) (Çizelge 4.3, Şekil 4.5, Resim 4.3).

Çizcelge 4.3. Carmoisine'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve proliferasyon indeksi üzerine etkisi

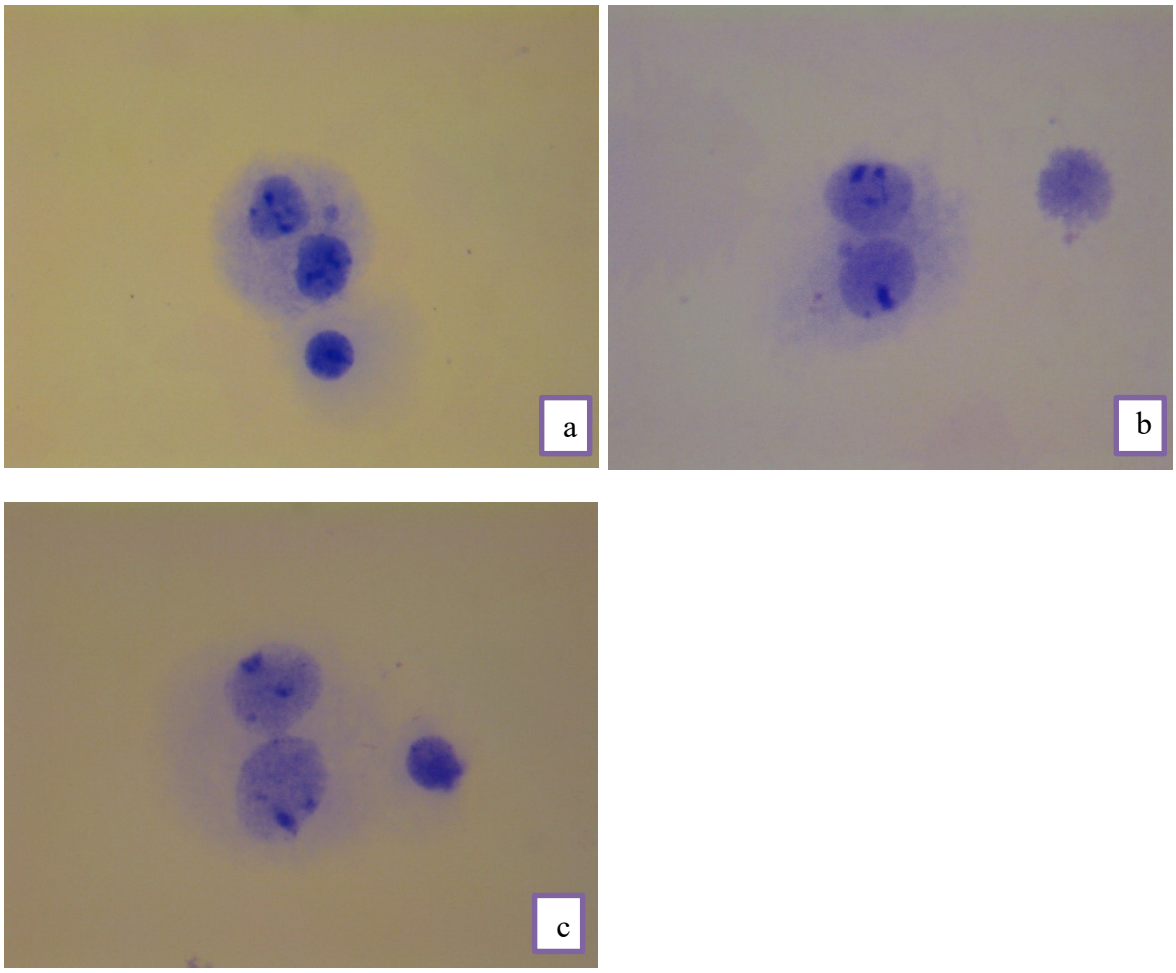
Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları		MN± SH (%)	Nükleer Tomurcuk (NT) ± SH (%)	Nükleoplazmik Köprü (NPK) ± SH (%)	Proliferasyon İndeksi (PI) ±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)				
Kontrol	48	0,00	2000	4	-	0,20±0,10	0,10±0,07	0,05±0,05	1,66±0,40
MMC	48	0,20	2000	15	-	0,75±0,19	0,50±0,15	0,35±0,13	1,61±0,39
Carmoisine	48	37,5	2000	3	-	0,15±0,08	0,10±0,70	0,10±0,07	1,67±0,40
		75	2000	11	-	0,55±0,16	0,00±0,00	0,10±0,07	1,58±0,39
		150	2000	9	-	0,45± 0,14	0,05±0,05	0,10±0,07	1,35±0,36
		300	2000	7	1	0,45±0,14	0,40±0,14*	0,10±0,07	1,47±0,38

*Kontrole göre p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)



*Kontrole göre p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.5. Carmoisine'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi



Resim 4.3. Carmoisine uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde incelenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre örnekleri a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre c) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre

4.1.4. Comet testi sonuçları

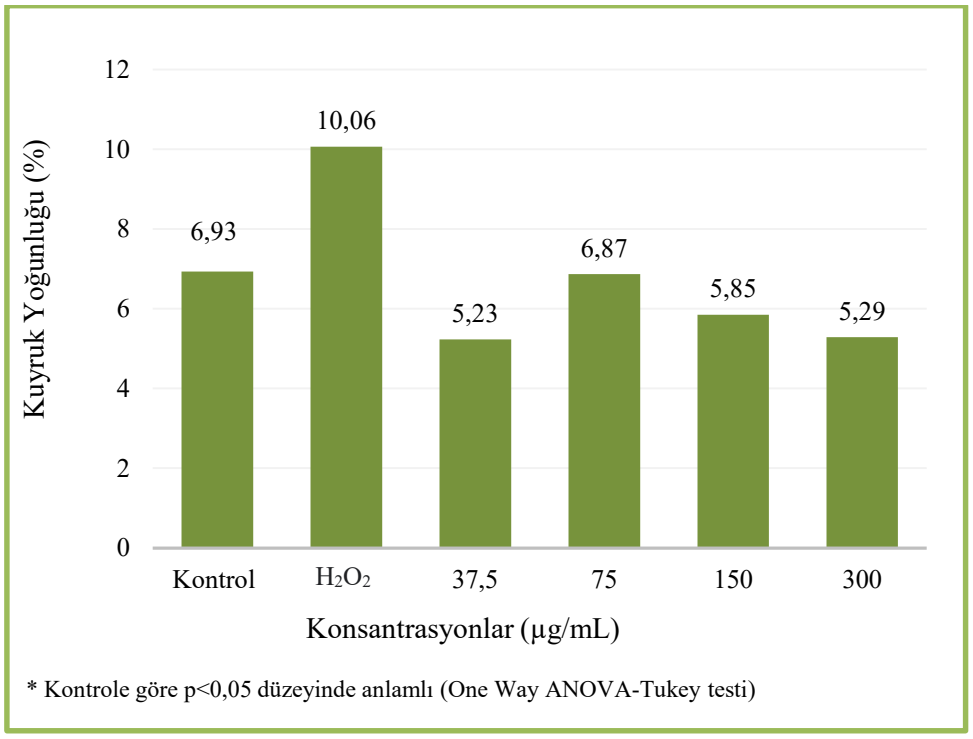
Comet testi parametrelerine ait sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı farklılık görülmemiştir.

Yalnızca kuyruk uzunluğu parametresinde, en yüksek konsantrasyonda (300 µg/mL) kontrole kıyasla anlamlı bir artış söz konusudur ve bu artışın konsantrasyonla ilişkisi güçlüdür (r=0,88).

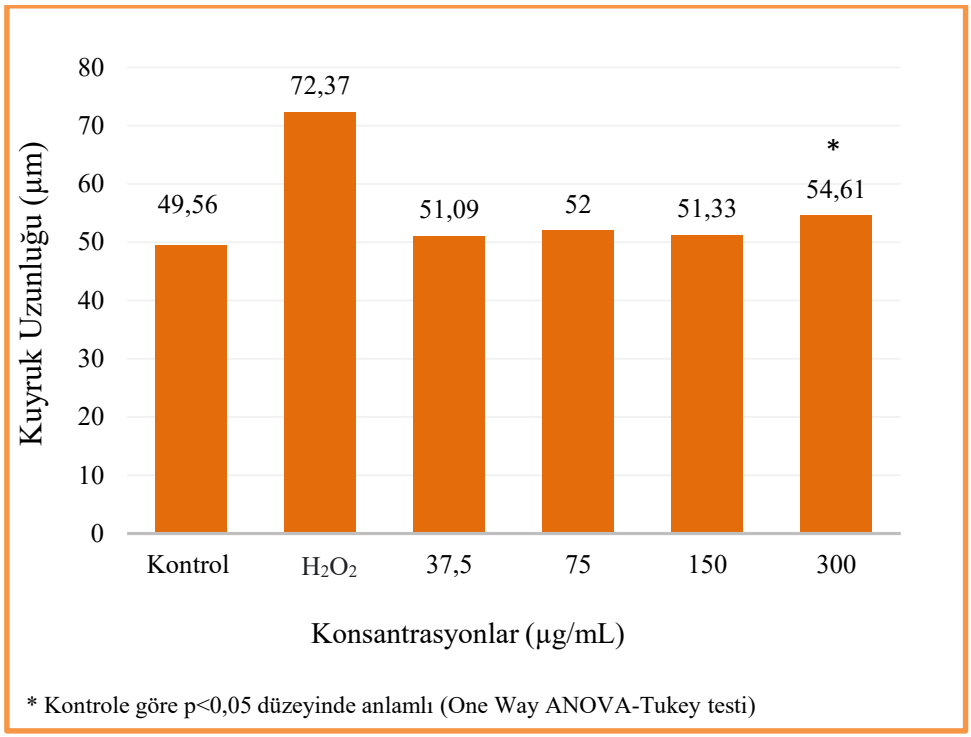
Çizelge 4.4. Carmoisine ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon			
Kontrol	1	0,0 µg/mL	6,93±0,65	49,56±0,92	1,46±0,13
H_2O_2	1	100µM	10,06±0,98	72,37±2,80	3,52±0,75
Carmoisine	1	37,5 µg/mL	5,23±0,62	51,09±0,92	1,13±0,14
		75 µg/mL	6,87±0,79	52,00±0,98	1,60±0,28
		150 µg/mL	5,85±0,61	51,33±0,91	1,34±0,15
		300 µg/mL	5,29±0,54	54,61±0,94*	1,22±0,12

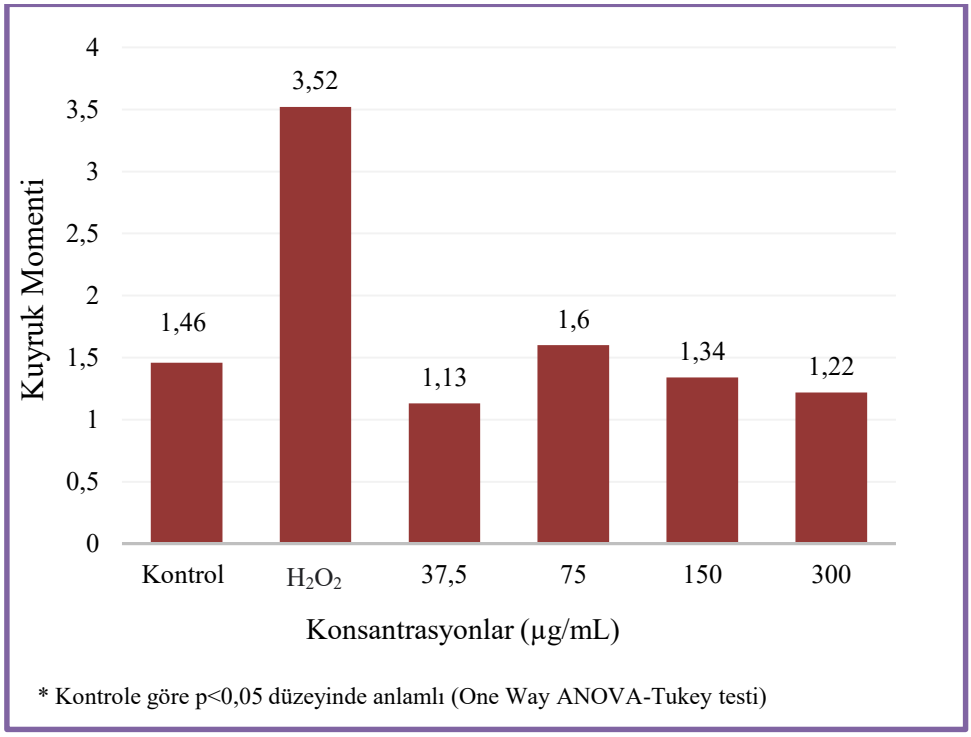
* Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey testi)



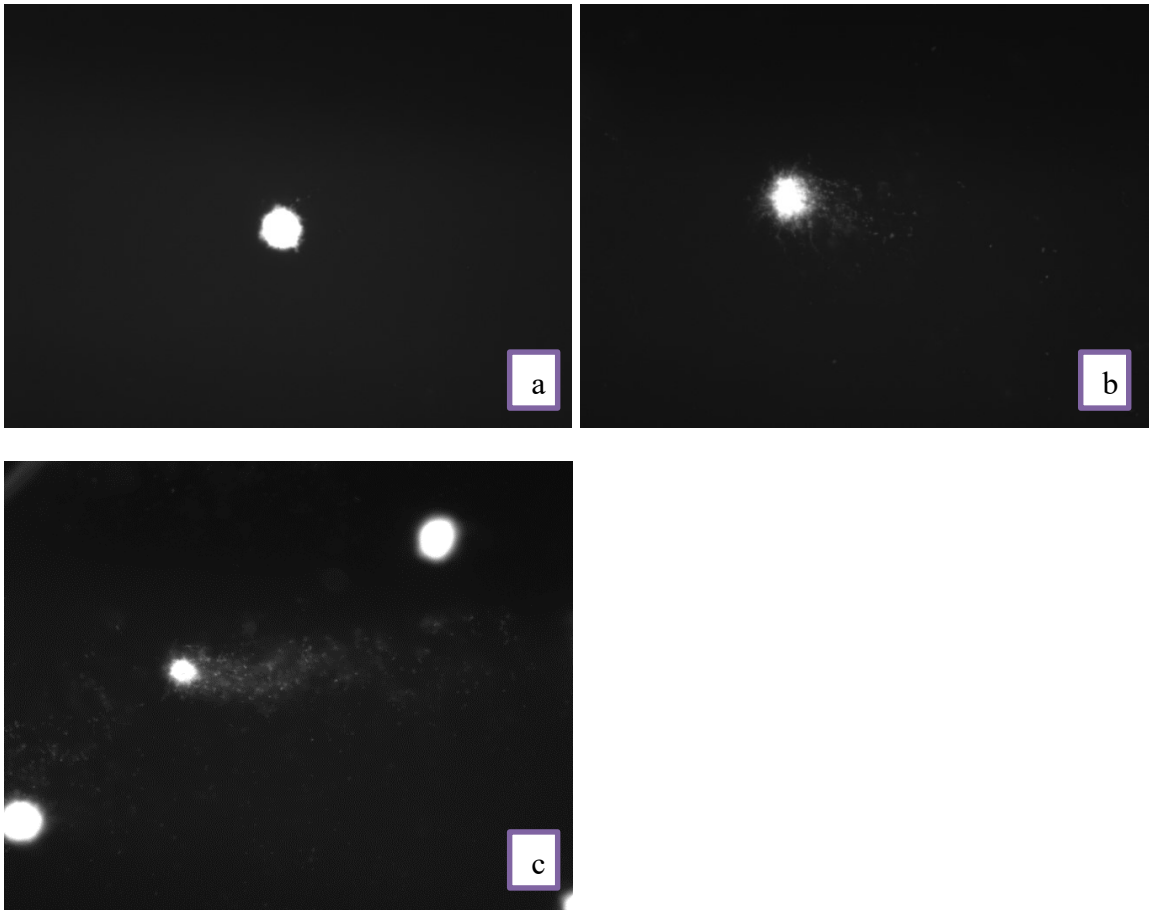
Şekil 4.6. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu değerleri



Şekil 4.7. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk uzunluğu değerleri



Şekil 4.8. Carmoisine uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk momenti değerleri



Resim 4.4. Carmoisine sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının Comet testi ile görünümünden örnekler a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA

4.2. Ponceau 4R Uygulamasının Bulguları

4.2.1. Kromozomal anormallik (KA) testi sonuçları

Ponceau 4R'nin kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yapılan analiz sonuçlarına göre 24 ve 48 saat uygulanması ile beş tip yapısal anormallik ve bir sayısal anormallik tespit edilmiştir. Bunlar, kardeş kromatitlerde birleşme (%40), fragment (%25,89), kromatit kırığı (%18,82), kromozom kırığı (2,35) ve disentrik kromozom (%2,35) tipi yapısal anormalliklerdir. Sayısal anormalliklerden ise poliploidi (%10,59) görülmüştür. En fazla görülen anormallikler ise yapısal anormalliklerde görülmüştür; fragment ve kardeş kromatitlerde birleşmedir (Çizelge 4.5, Şekil 4.9).

Ponceau 4R'nin tüm uygulama sürelerinde anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansını sadece 300 µg/ml'lik konsantrasyonda istatistiksel

olarak önemli derece artırdığı gözlenmiştir. Bu artışların kontrole göre anlamlı olduğu ve konsantrasyonla ilişkisinin güçlü olduğu görülmektedir (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdesi için r=0,85 ve hücre başına düşen anormallik sayısı için r=0,84 ve 48 saatlik uygulamada hem anormal hücre yüzdesi hem de hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı her iki değer için de r=0,90).

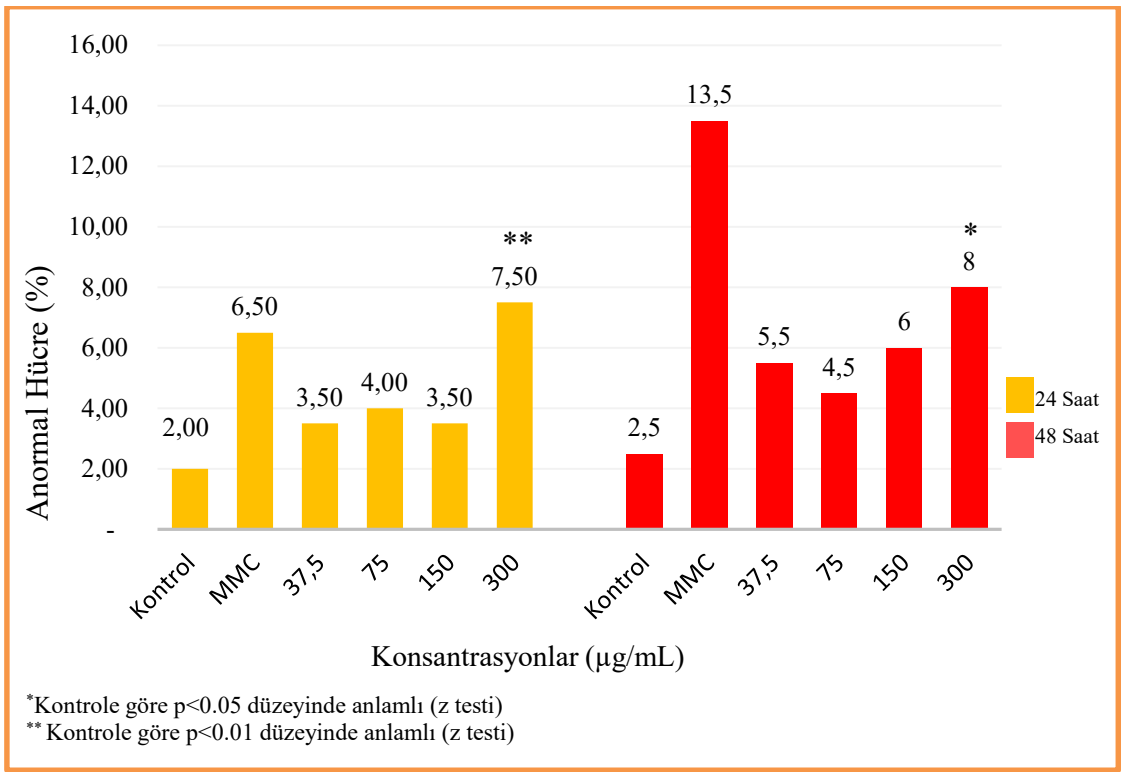
Çizelge 4.5. Ponceau 4R uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozom anormallikleri ve frekansları

Test Maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ds	ktd	p	h		
Kontrol	24	0,00	1			1			2		2,00±0,98	0,020±0,019
MMC	24	0,20	2		3	6			2		6,50±1,74	0,060±0,016
Ponceau 4R	24	37,5	2		3	1			1		3,50±1,29	0,035±0,012
		75	1		2	4			1		4,00±1,38	0,030±0,012
		150	2		3	1			1		3,50±1,29	0,035±0,012
		300	1	1	6	5			2		7,50±1,86**	0,065±0,017*
Kontrol	48	0,00	2			2			1		2,50±1,10	0,025±0,011
MMC	48	0,20	10	1	4	7		1	3	1	13,5±2,41	0,130±0,023
Ponceau 4R	48	37,5	2		4	3			2		5,50±1,61	0,055±0,016
		75	1		2	5			1		4,50±1,46	0,045±0,014
		150	4		1	6	1				6,00±1,67	0,060±0,016
Kromozomal anormallik yüzdesi		300	3	1	1	9	1		1		8,00±1,91*	0,080±0,019*
			18,82	2,35	25,89	40	2,35		10,59			

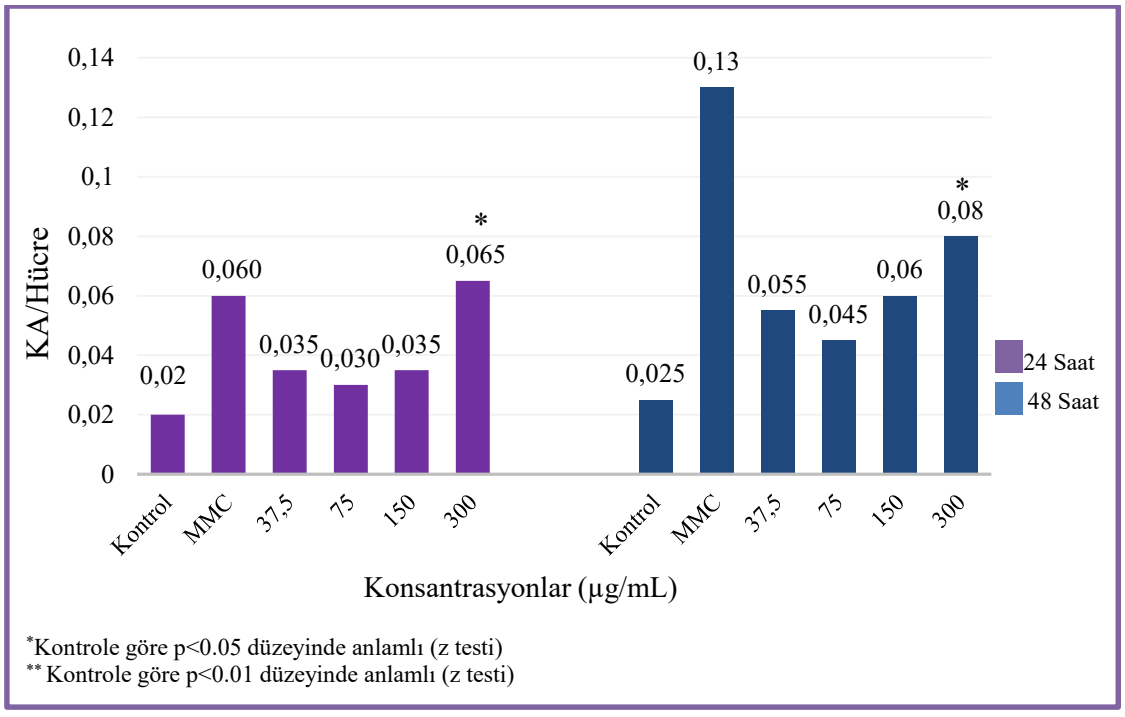
ktk: kromatit kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatitlerde birleşme, ds: disentrik, ktd: kromatit değişimi, h: halka kromozom, p: poliploidi

*Kontrole göre p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)

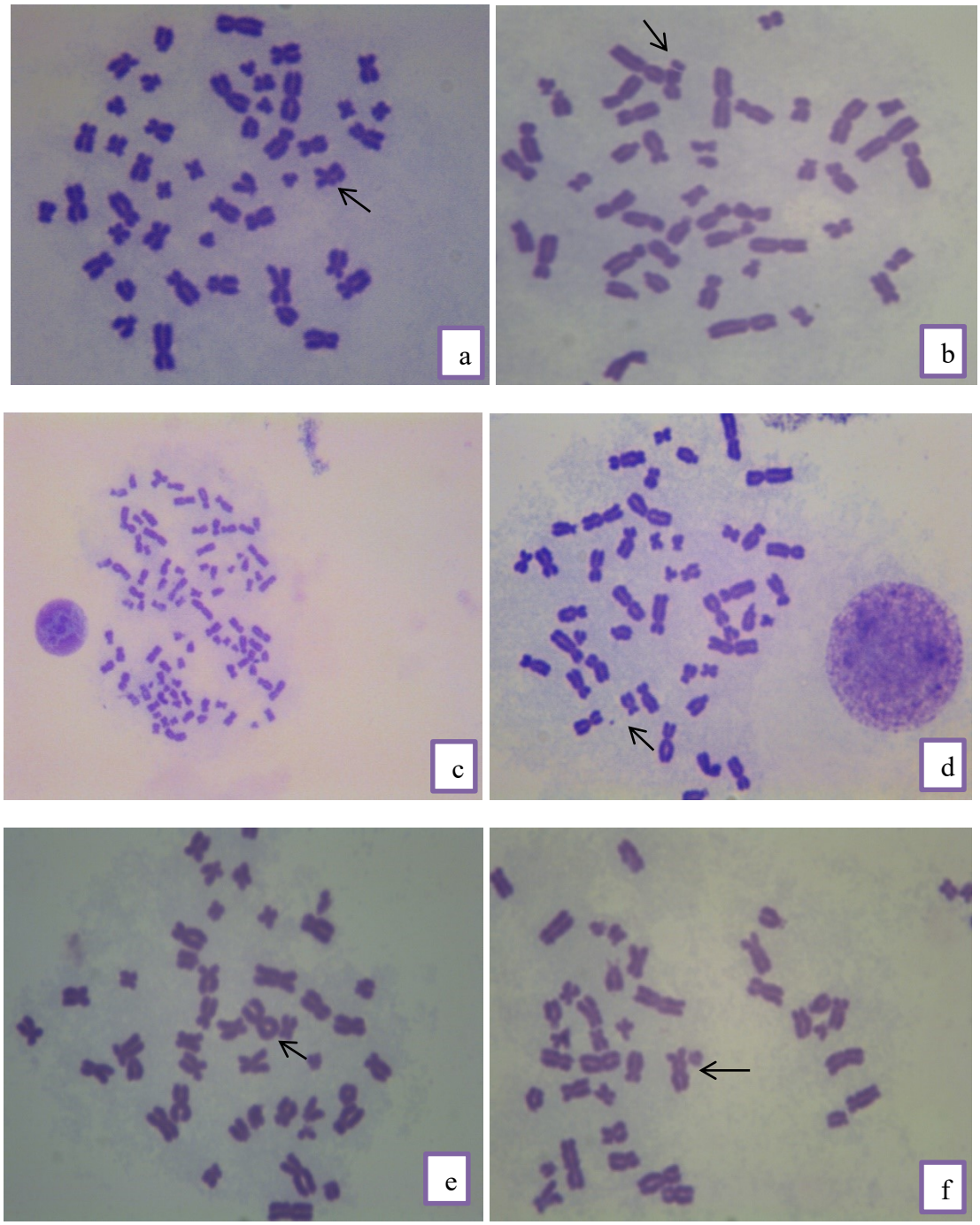
** Kontrole göre p<0.01 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkileri



Şekil 4.10. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri



Resim 4.5. Ponceau 4R uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı c) poliploidi d) fragment e) kardeş kromatitlerde birleşme f) disentrik kromozom

4.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi sonuçları

Ponceau 4R'nin KKD frekansları, replikasyon indeksi, mitotik indeks değerlerine 24 ve 48 saatlik muamele süresindeki etkisi Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Kardeş kromatit değişim frekansı için (KKD) 24 ve 48 saatlik uygulamada en yüksek konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir artış söz konusudur ve bu artışın konsantrasyonla ilişkisi güçlüdür (24 saat için r=0,96 ve 48 saat için r=0,89).

Mitotik indeks 24 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada ise bütün konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düşüş göstermiştir. Yapılan regresyon analizi sonucunda konsantrasyonlar ile bu düşüş arasında kuvvetli korelasyon (24 saat r = -0,76 ve 48 saat r = -0,89) olduğu tespit edilmiştir. Bütün uygulama süreleri incelendiğinde replikasyon indeksi'nin (Rİ) hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı düzeyde değişmediği görülmektedir.

Çizelge 4.6. Ponceau 4R uygulamasının insan periferal lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

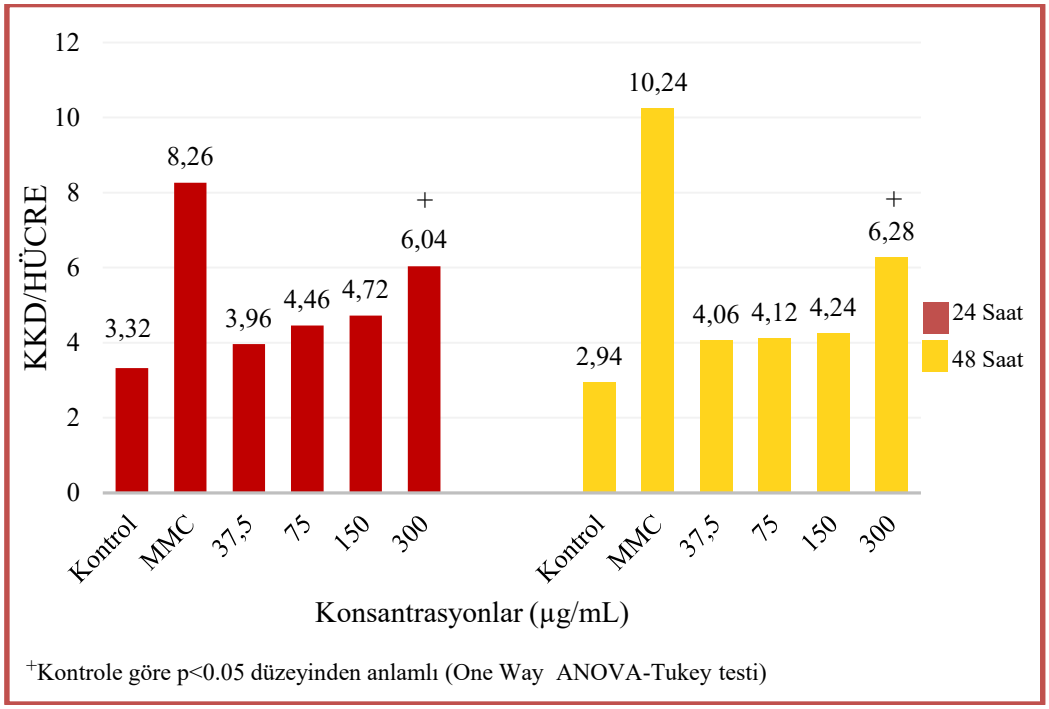
Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD hücre /±SH	M1	M2	M3	Rİ±SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg /mL)							
Kontrol	24	0,00	0-11	3,32 ±0,35	51	66	83	2,16±0,05	9,05±0,64
MMC	24	0,20	4-22	8,26± 0,55	61	67	72	2,05±0,06	4,45±0,46
Ponceau 4R	24	37,5	0-9	3,96±0,34	56	60	84	2,14±0,05	7,55±0,58
		75	0-10	4,46±0,34	62	57	81	2,09±0,06	7,20±0,57*
		150	0-10	4,72±0,35	57	62	81	2,12±0,05	6,65±0,55**
		300	0-11	6,04±0,41+	54	61	85	2,15±0,05	7,32±0,58*
Kontrol	48	0,00	3-14	2,94±0,29	56	65	79	2,11±0,05	8,30±0,61
MMC	48	0,20	2-29	10,24±0,75	62	67	70	2,03±0,05	4,10±0,44
Ponceau 4R	48	37,5	0-4	4,06±0,34	51	60	89	2,19±0,05	6,40±0,54*
		75	1-11	4,12±0,32	59	58	83	2,12±0,04	5,85±0,52**
		150	0-8	4,24±0,36	53	61	86	2,16±0,05	5,90±0,52***
		300	0-12	6,28±0,36+	55	62	83	2,14±0,05	5,45±0,50***

*Kontrole göre p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)

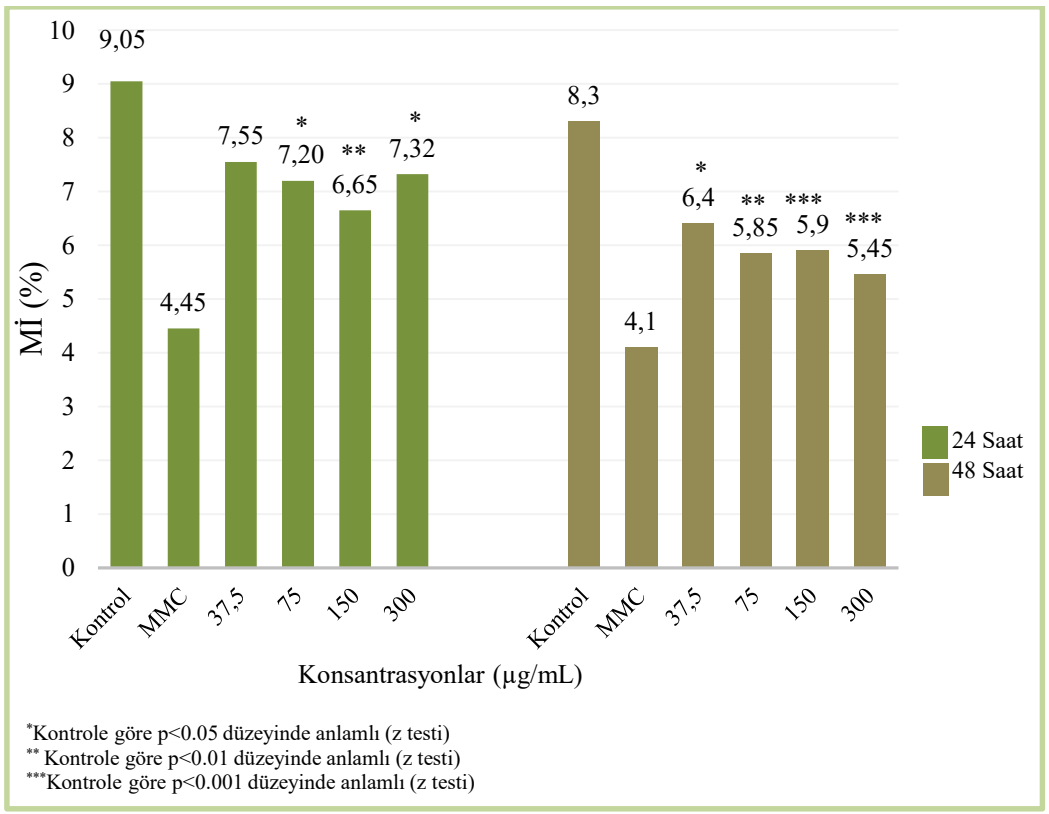
** Kontrole göre p<0.01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre p<0.001 düzeyinde anlamlı (z testi)

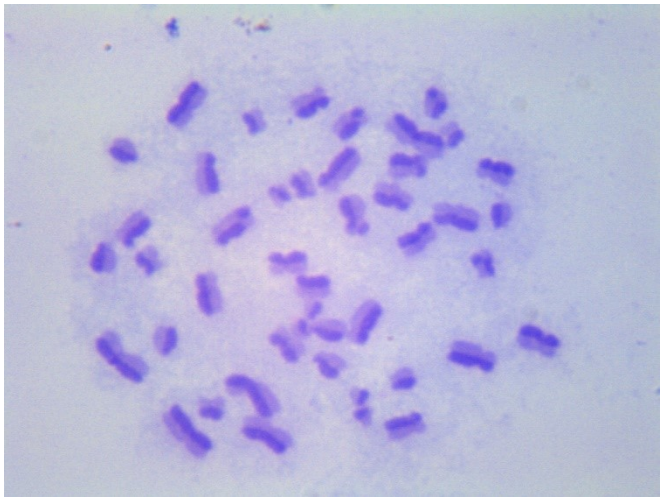
+ Kontrole göre p<0.05 düzeyinden anlamlı (One Way ANOVA-Tukey testi)



Şekil 4.11. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansları



Şekil 4.12. Ponceau 4R'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri



Resim 4.6. Ponceau 4R uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimlerine bir örnek

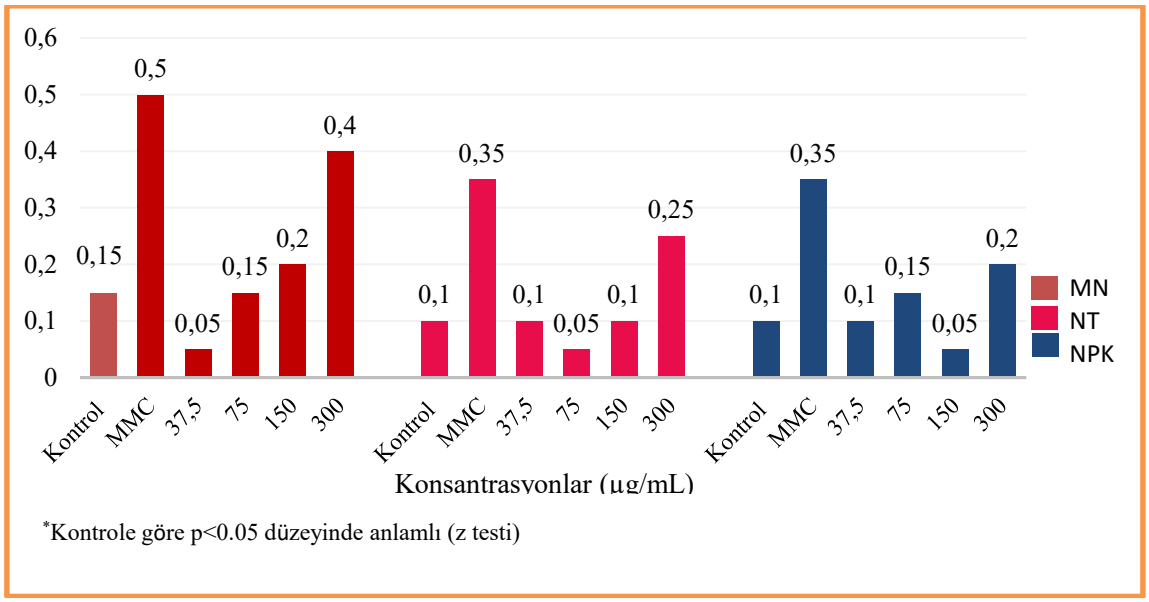
4.2.3. Sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi sonuçları

Ponceau 4R ile kültüre edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen binükleat hücrelerdeki mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü (NPK) frekansları ve proliferasyon indeksi (Pİ) Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

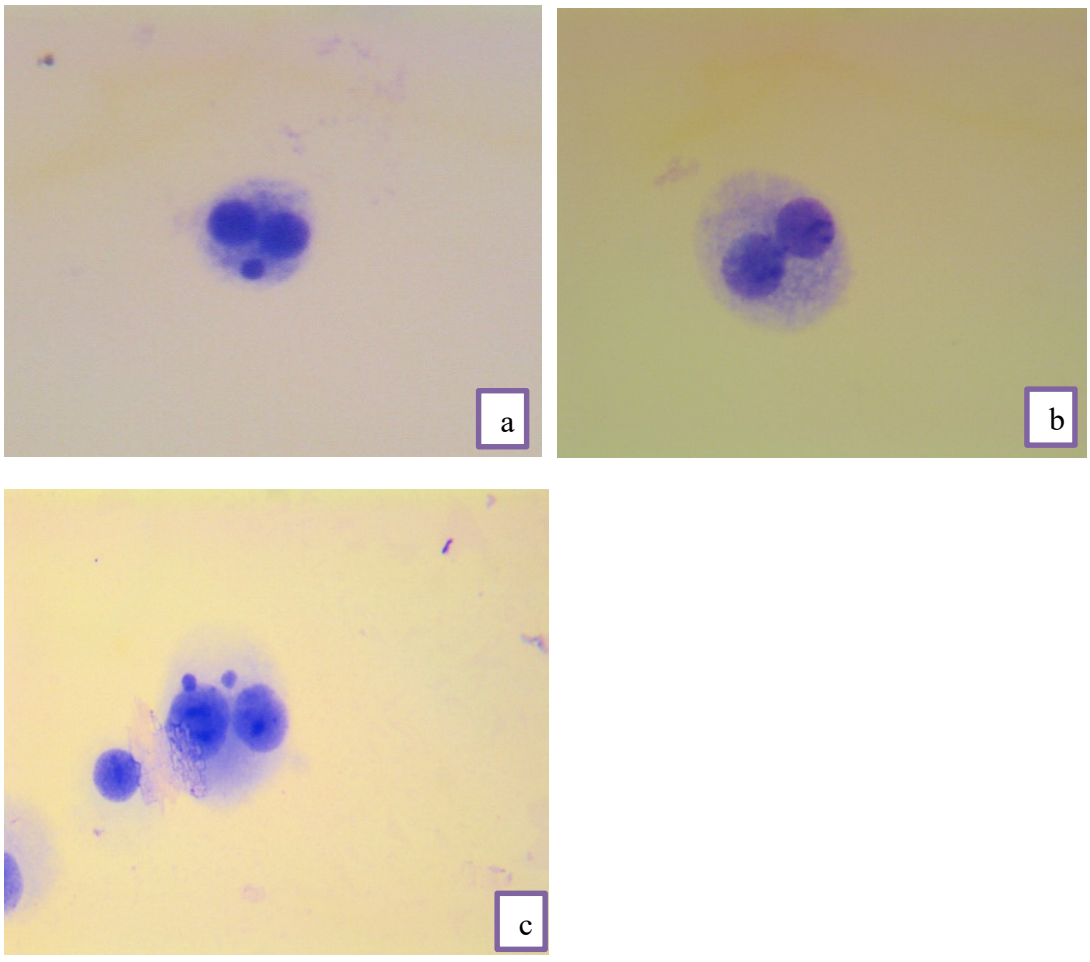
Ponceau 4R'nin, mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve proliferasyon indeksi etkileri incelendiğinde hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı düzeyde değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.13, Resim 4.7).

Çizelge 4.7. Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve proliferasyon indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları		MN± SH (%)	Nükleer Tomurcuk (NT) ± SH (%)	Nükleoplazmik Köprü (NPK) ± SH (%)	Proliferasyon İndeksi (PI) ±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µM /L)		(1)	(2)				
Kontrol	48	0,00	2000	3	-	0,15±0,08	0,10 ± 0,07	0,10 ± 0,07	1,75±0,41
MMC	48	0,20	2000	10	-	0,50±0,15	0,35±0,13	0,35±0,13	2,14±0,45
Ponceau 4R	48	37,5	2000	3	-	0,05±0,04	0,10±0,70	0,10 ± 0,70	1,63±0,20
		75	2000	11	-	0,15±0,08	0,15±0,08	0,05±0,04	1,55±0,39
		150	2000	9	-	0,20±0,09	0,05±0,04	0,10 ± 0,70	1,56±0,39
		300	2000	7	1	0,40±0,14	0,20 ± 0,09	0,25 ± 0,11	1,60±0,39



Şekil 4.13. Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi



Resim 4.7. Ponceau 4R muamelesi sonucunda insan lenfositlerinde incelenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre örnekleri

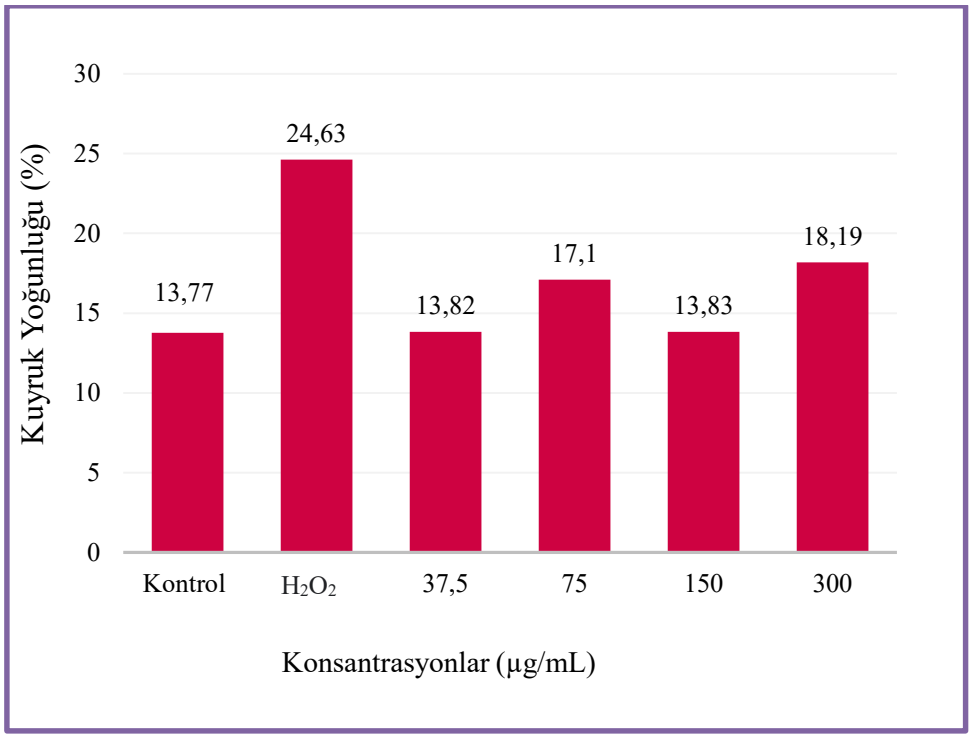
4.2.4. Comet testi sonuçları

Comet testi Ponceau 4R muamelesinde üç farklı parametre incelenmiştir (Çizelge 4.8). Kuyruk yoğunluğu parametresinde hiçbir konsantrasyon kontrole göre anlamlı farklılığa neden olmamıştır. Kuyruk uzunluğu parametresinde, en yüksek iki konsantrasyonda (150 ve 300 µg/mL) ve kuyruk momenti parametresinde en yüksek konsantrasyonda (300 µg/mL) kontrole kıyasla anlamlı bir artış görülmüştür. Ve bu artışların konsantrasyonla ilişkisi zayıftır (kuyruk uzunluğu parametresi r=0,68, kuyruk momenti parametresi r= 0,65).

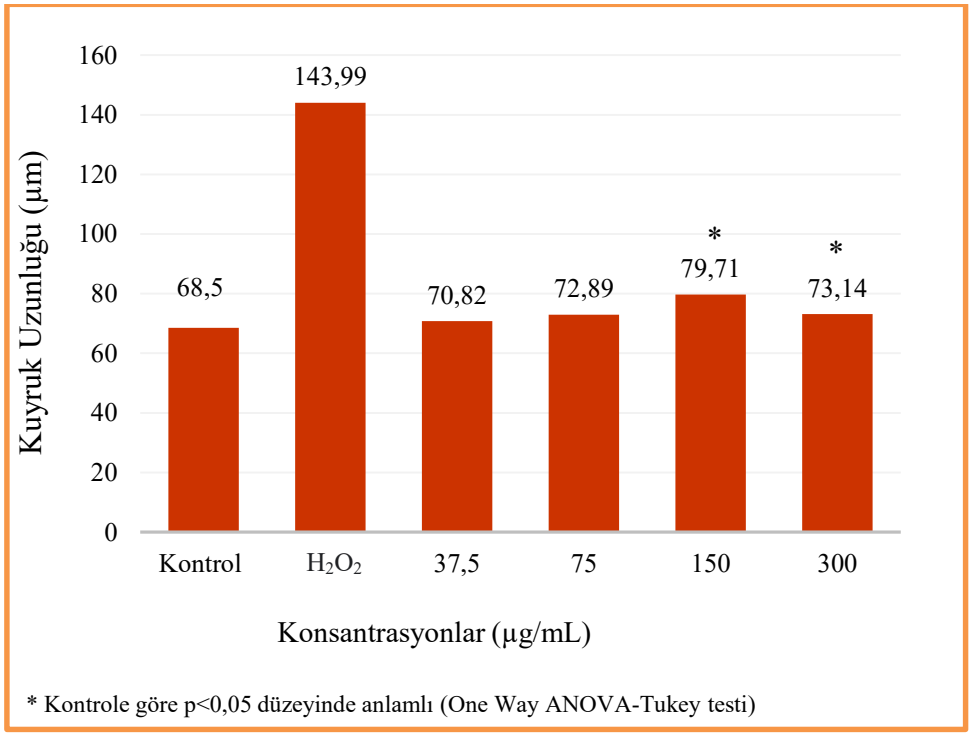
Çizelge 4.8. Ponceau 4R ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon			
Kontrol	1	0,0 µg/mL	13,77 ± 1,03	68,50 ± 0,81	3,41 ± 0,25
H_2O_2	1	100µM	24,63 ± 1,56	143,99 ± 6,45	10,68 ± 0,95
Ponceau 4R	1	37,5 µg/mL	13,82 ± 1,10	70,82 ± 1,36	3,90 ± 0,40
		75 µg/mL	17,10 ± 1,32	72,89 ± 1,27	4,62 ± 0,42
		150 µg/mL	13,83 ± 1,09	79,71 ± 1,69*	3,61 ± 0,28
		300 µg/mL	18,19 ± 1,21	73,14 ± 1,32*	4,89 ± 0,40*

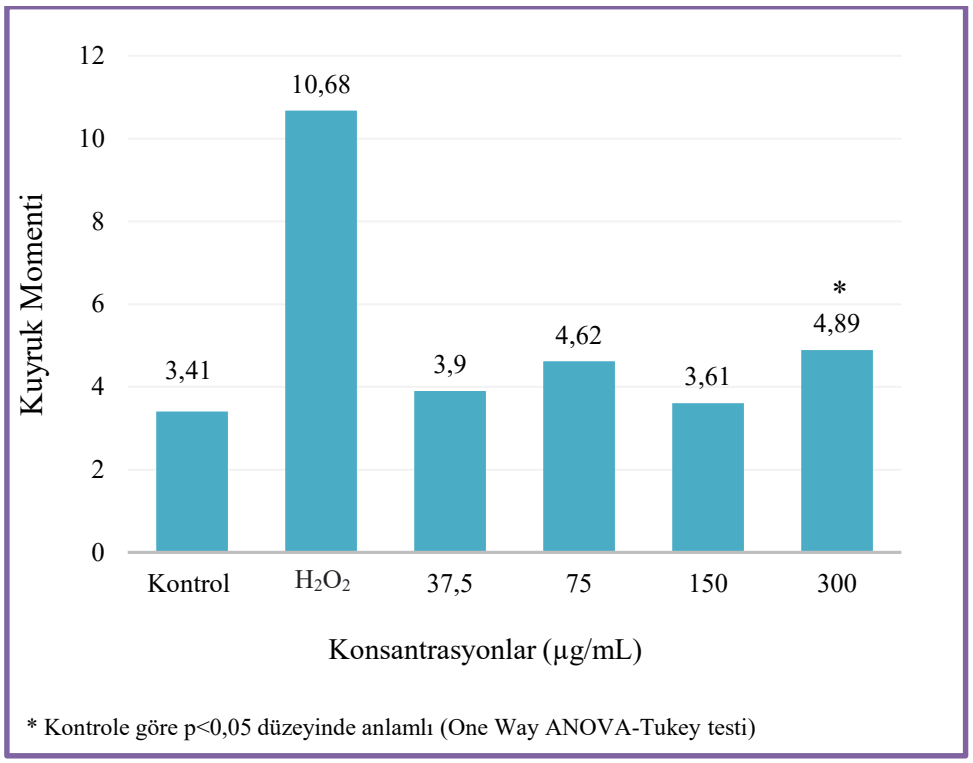
* Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey testi)



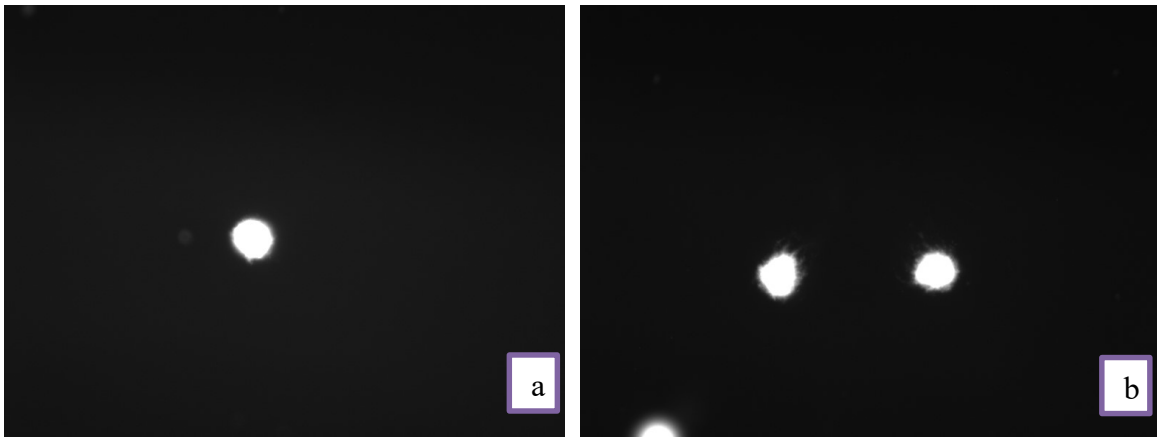
Şekil 4.14. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu değerleri



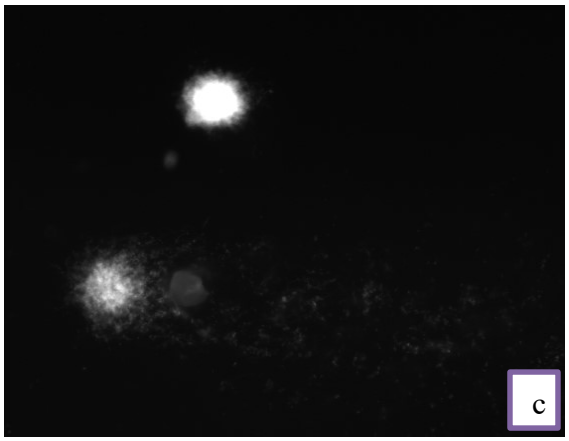
Şekil 4.15. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk uzunluğu değerleri



Şekil 4.16. Ponceau 4R uygulaması sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde comet kuyruk momenti değerleri



Resim 4.8. Ponceau 4R sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümünden örnekler a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA



Resim 4.8. Ponceau 4R sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümünden örnekler a) Hasarsız DNA b) Orta hasarlı DNA c) Çok hasarlı DNA

Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları ile yapılan KA, KKD, MN ve Comet testlerinin sonuçları topluca Çizelge 4.9 ve 4.10'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.9. Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları ile yapılan KA ve KKD test sonuçları

	CARMOİSİNE	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	KKD	Mİ	Rİ	PONCEAU 4R	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	KKD	Mİ	Rİ
24 SAAT	37,5 µg/mL						37,5 µg/mL					
	75 µg/mL				↓		75 µg/mL				↓	
	150 µg/mL				↓		150 µg/mL				↓	
	300 µg/mL	↑	↑	↑	↓		300 µg/mL	↑	↑	↑	↓	
48 SAAT	37,5 µg/mL						37,5 µg/mL				↓	
	75 µg/mL						75 µg/mL				↓	
	150 µg/mL				↓		150 µg/mL				↓	
	300 µg/mL	↑	↑		↓		300 µg/mL	↑	↑	↑	↓	

Çizelge 4.10. Carmoisine ve Ponceau 4R gıda boyaları ile yapılan MN ve Comet test sonuçları

	CARMOİSİNE	MN	NPK	NT	Pİ	Comet (1 Saat)			PONCEAU 4R	MN	NPK	NT	Pİ	Comet (1 Saat)		
						Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Momenti						Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Momenti
48 Saat	37,5 µg/mL								37,5 µg/mL							
	75 µg/mL								75 µg/mL							
	150 µg/mL								150 µg/mL						↑	
	300 µg/mL			↑			↑		300 µg/mL						↑	↑

5. TARTIŞMA

Dünya çapında modern gıda endüstrisindeki gelişmelerle birlikte katkı maddelerinin kullanımı oldukça artmıştır. Gıda katkı maddeleri, gıda tedariğinde çeşitli üretim yöntemlerini kolaylaştırmak ve tamamlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin temel işlevleri arasında yiyecekleri bakterilerden koruyarak, oksidasyonu ve diğer kimyasal değişiklikleri önlemek ve yiyeceklerin lezzetini arttırarak, ekstra tat vermek bulunmaktadır. Ayrıca yiyecekleri daha çekici hale getirmek de temel işlevleri arasında yer almaktadır (Zhang ve diğerleri, 2023).

Gıda katkı maddeleri, renklendirici maddeler, koruyucular, emülgatörler, asitlik düzenleyicileri ve tat modülatörleri gibi pek çok farklı sınıfa ayrılmaktadır. Tüm gıda katkı maddeleri arasında renklendirici boyalar oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda boyaları çoğunlukla hidrofiliktir, gazlı içecekler, salatalar, meyve suları, dondurmalar ve tatlılar gibi farklı gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Halilčević ve diğerleri, 2022; Khan ve diğerleri, 2020).

Renklendiriciler, çoğunlukla farklı maddelere yeni renk vermek ve onları daha çekici ve lezzetli hale getirmek için eklenen azo bileşikleridir. Tekstil firmaları, kâğıt üretim endüstrileri, gıda endüstrileri, kozmetik ve ilaç firmaları gibi farklı sektörlerde de kullanılmaktadır. Bu gıda boyaları, gıda ambalajlarının üzerinde renklendirici gıda katkı maddeleri olarak E kodu ile belirtilmiştir. Renklendiriciler E100 (Curcumin) ile E180 (Lithol Rubin) arasındaki numaraları almaktadır (Bişgin, 2023).

Renklendiriciler, doğal boyalar ve sentetik boyalar olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir. Gıda boyaları kullanılmaya başlandığı ilk zamanlarda minerallerden, bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen boyalar, halen doğal boyalar olarak kategorize edilmektedir. Sonrasında üretimin değişmesiyle yapay/sentetik boyalar kullanılmaya başlanmıştır. Sentetik boyalar, doğal boyalara göre daha ucuz, uygulaması kolay ve daha çabuk renk veren maddelerden oluşmaktadır. Doğal boyalara göre daha sık kullanılan sentetik boyalar, kanserojeniteye, çocuklarda hiperaktiviteye, bağışıklık tepkisinin zayıflaması gibi farklı hastalıklara neden olabilmektedir (Nabi ve diğerleri, 2023).

Yapay boyalar, renk özellikleri, tekdüzelik, kararlılık, düşük maliyet ve pek çok tonda bulunurlukları nedeniyle yaygın olarak kullanılmakta olup bu da genel olarak estetik kaliteyi arttırmaktadır. Bugün ticari olarak temin edilebilen hemen hemen tüm boyalar sentetik maddelerden oluşmaktadır (Boncıu, 2019). Bununla birlikte, uygulanan sentetik gıda boyalarının çoğunun, mutajenik kimyasallara benzer özelliklere sahip olduğu fark edilmiştir. Doğal boyaların kullanılması daha güvenli ve çevre dostu bir seçenek olsa da, oldukça maliyetli, uygulanması daha zahmetlidir. Aynı zamanda temin edilmesi daha zor ve istenen tonları elde etmek için ekonomik olmayan miktarlarda ham maddeye ihtiyaç duyulabileceği anlamına gelmektedir (Ngo ve Tischler, 2022; Durazzo ve diğerleri, 2022).

Renklendirme için kullanılan sentetik boyalar genellikle fonksiyonel azo gruplarına (-N=N-) sahip azo bileşikleridir. Gıda ve tekstil renklendirmesinde kullanılan tüm boyaların yaklaşık %70'inden fazlasını azo boyalar oluşturmaktadır. Bu boyalar, günlük hayatta sıklıkla karşılaştığımız ve birçoğu gıda endüstrisinde kullanılan maddelerdir. Son zamanlarda gıda boyaları ve sağlık üzerindeki etkileri hakkında birçok tartışma yapılmaktadır (Sevastre ve Hodorog, 2021). Azo boyalar kimyasal olarak sentezlendiğinden, kullanım ve bertarafında güvenliği sağlamak için dikkatli işlemlere ihtiyaç vardır. Aynı zamanda, bazı azo boyalar toksik, kanserojen ve mutajen olduğundan eser miktarda boya bile ciddi çevresel ve sağlık tehlikelerine yol açabilir. Bu sentetik boyaların varlığı çeşitli biyolojik aktiviteleri de engelleyebilir. Bu nedenle, bunların arıtılması ve bertarafı için sıkı düzenlemeler uygulamak önemlidir (Ngo ve Tischler, 2022; Durazzo ve diğerleri, 2022).

Renklendirici madde olarak en yaygın kullanılan gıda katkı maddelerinden biri Carmoisine (azorubine)'dir. Bu gıda renklendiricisi, hazır pek çok gıda ürününde (paket çorba karışımı, jöleler, tatlı şekerlemeler gibi) sıklıkla kullanılmaktadır. Carmoisine kimyasal olarak sentetik gıda katkı maddelerinin bir mono-azo bileşiği olarak sınıflandırılır (Boyko ve Brygadyrenko, 2021). Yüksek konsantrasyonda Carmoisine'e maruz kalmanın genel antioksidan kapasitenin yanı sıra dopamin ve serotonin düzeylerini azalttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalara göre, bu renklendirici maddenin aşırı kullanımı farelerde oksidatif stresi tetikleyerek anksiyojenik davranışa neden olabilmektedir. Ayrıca oksidatif stres yoluyla nörodavranışsal kalıplarda değişiklikler meydana getirebildiği bildirilmiştir. Bu gıda boyası nedeniyle reaktif oksijen türlerinin salınması, hücresel olaylar üzerinde oksidatif stres kaynaklı zararlı etkiye neden olabilmektedir. Merkezi sinir sistemi,

beyindeki oksidatif bozulmadan etkilenmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, oksidatif stresin yüksek kaygı düzeylerine katkıda bulunabileceği ve antioksidan düzeylerini düşürebileceği açıklanmıştır (Subramaniyan ve diğerleri, 2023). Bu renklendiricinin dikkat bozukluklarına neden olabileceği gibi nörolojik ve ayrıca alerjenik potansiyeli olduğu da bildirilmektedir (Labiod ve diğerleri, 2022).

Ponceau 4R, yaygın olarak bilinen sentetik gıda boyaları arasında yer almaktadır. Kömür katranından elde edilen bu boya kırmızı renkte görünmektedir. Ponceau 4R, mevcut rengi geliştirmek, üretimi standardize etmek, işlemedeki kayıpları düzeltmek veya sadece son ürünü renklendirmek gibi pek özelliği nedeniyle endüstriyel gıdalara eklenmektedir. Ancak bu boyanın kullanımı ve sonrasındaki etkileri ile ilgili bazı araştırmalar tartışmalara yol açmıştır. Azo boya sınıfına giren bu renklendirici, aşırı kullanımı ile çeşitli soruna neden olabilmektedir (Ramos-Souza ve diğerleri, 2023). Farklı gıda ürünleri ile fazla miktarda tüketildiğinde ciltte tahriş, kızarıklık, egzama, hiperaktif davranış bozuklukları, dikkat dağınıklığı gibi istenmeyen sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, günlük tüketilebilir miktarları sınırlı olan potansiyel olarak tehlikeli bir kimyasal olduğu bildirilmektedir (Hua, Liang ve Wei, 2022; Bişgin, 2023). Ponceau 4R'nin aromatik halka yapısı ve onun azo fonksiyonel grubunun insan vücuduna zararlı olabileceği ve genetik kusurlara ve sitotoksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu gıda boyalarının sulu çözeltilerinin atık çevre sularına karıştığı ve böylece ekolojik sorunlara da neden olabileceği belirtilmektedir (Ghalkhani ve diğerleri, 2022; Zarrin ve Sabz, 2022; Sabeen ve diğerleri, 2020).

İnsanların maruz kaldığı kimyasal, fiziksel birçok farklı ajan genotoksisiteye, infertiliteye ve kansere kadar birçok hastalığa yol açmaktadır. Kanser ve genotoksisite arasındaki bu bağ karsinojen olan maddelerin çoğunun aynı zamanda genotoksik etkiye de neden olduğunu göstermektedir. Bütün bu ajanlar, hastalıklara neden olabildiğinden genotoksisite testleri uygulanarak söz konusu etkilerinin tespit edilmesi gerekmektedir. *In vivo* veya *in vitro* olarak uygulanabilen bu testler, gıda katkı maddeleri gibi pek çok kimyasalın genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak tek bir testle toksik maddelerin mekanizmalarını ve özelliklerini anlamak mümkün olmamaktadır (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2023).

Genotoksisite, belirli bir maddenin, DNA mutasyonlarına veya kromozomal rekombinasyona ve yeniden düzenlemelere neden olarak hücrelerin genomunu değiştirme kabiliyetini ifade etmektedir. Bu etkilere sebep olan herhangi bir ajan, kromozomların yapısında parçalanma, bozulma, delesyon, duplikasyon ve kırılma gibi kromozomal kararsızlıklara neden olabilmektedir. Bu etkilerinin yanı sıra çeşitli hastalıklara yol açmakta, hücre transformasyonunu ve kanseri teşvik etmektedir. Kanserojenite için belirleyici birinci nokta, DNA hasarı olurken ikincisi ise, memelilerde mutasyonların birikimidir (Musto ve diğerleri, 2023). DNA, oksidatif, genotoksik ve metabolik stresler, telomer erozyonu ve onkojenik mutasyonlar gibi çeşitli endojen veya eksojen nedenlerle sürekli olarak hasar görebilir. DNA hasarını onarma süreçlerinin başarısız olması sonucu metabolik organ fonksiyonlarının bozulması kanser, yaşlanma ve metabolik hastalıkların başlamasına neden olur (Uzen ve diğerleri, 2023).

DNA'yı etkileyen birçok kimyasal, bireylerde ve sonraki nesillerinde etkili olabilen genotoksikolojik süreçlerde rol oynayabilir. Genotoksisite değerlendirmesi, her biri farklı DNA hasarı türlerine karşı hassas olan çeşitli testlerin yapılmasını içermektedir. Tek bir testin, gen mutasyonu, yapısal kromozomal hasar ve anöploidi gibi üç ana genetik hasar tipini güvenilir bir şekilde tespit edemediği bilinmektedir. En yaygın kullanılan *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir. Bu testler birlikte yapıldığında, doğrudan veya dolaylı olarak ve birbirlerinin sonuçlarını destekleyerek tüm bu etkileri belirlemektedir (Munakata ve diğerleri, 2023).

Bu testlerden, kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde, kromozomal anormallik, kardeş kromatit değişimi ve sitokinez blok mikronükleus sitom testleri uygulanırken, izole insan lenfositlerinde ise comet testi yaygın olarak gerçekleştirilen yöntemlerdir. Genotoksisite testleri, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genetik materyal üzerindeki hasarlarının mekanizmasını anlamamızı sağlamaktadır (İla ve Husunet, 2022:153,184).

Bu çalışmada gıda boyalarından Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R'nin (E-124) genotoksik etkileri *in vitro* koşullarda dört farklı genotoksisite testi ile (kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) ve comet) araştırılmıştır. Çalışmada her iki maddenin 37,5, 75, 150 ve 300

µg/mL'lik konsantrasyonları, KA, KKD ve CBMN-Cyt testlerinde kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerine uygulanmış, izole lenfositler ise comet testi için kullanılmıştır. Bu testlerle birlikte, Mitotik indeks, Replikasyon indeksi ve Proliferasyon indeksi değerleri de belirlenmiştir.

Kromozom anormallik testi, DNA hasarını tespit etme ve test edilen maddenin hem klastojenik hem de anöjenik etkilerini belirlemede etkili olmaktadır. Oldukça hassas, sık kullanılan ve kabul gören bir genotoksisite testidir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2023). Tez çalışmasında her iki renklendiricinin de 24 ve 48 saatlik uygulamalarında anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik frekanslarının en yüksek konsantrasyonda anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Bu iki gıda boyasının en sık oluşturduğu anormallik tipi yapısal anormalliklerden kromatit kırığıdır. Belirlenen diğer anormallikler ise; yapısal anormalliklerden, kardeş kromatitlerde birleşme, kromozom kırığı, fragment ve kromatit değişimi, sayısal anormalliklerden ise; poliploididir. Carmoisine'den farklı olarak Ponceau 4R uygulamasında halka kromozom da görülmüştür.

Hücre döngüsünde ortaya çıkan DNA çift zincir kırıkları kromozomal anormalliklere neden olmaktadır. G2 fazında DNA'da oluşan hasarın neredeyse tamamına yakını tamir edilmektedir. Dolayısıyla burada meydana gelen ve tamir edilemeyen hasarlar kromozom kırıkları, kromatit kırıkları gibi anormalliklerin oluşmasına neden olmaktadır. Kromozom veya kromatitlerin terminal bölgelerinde oluşan delesyonlar ve translokasyonlar fragmentlerin oluşmasına yol açmaktadır. Kardeş kromatitlerde birleşme, iki kardeş kromatitin uç bölgelerinde oluşan delesyonlar nedeniyle ortaya çıkar ve bu kırık uçların yeniden birleşmesiyle meydana gelmektedir. Kromatit değişimi, kromozomlar arası değişimler sonucu quadriradial (dörtlü) veya triradial (üçlü) kromozomlar şeklinde görülmektedir. Disentrik kromozom, sentromere sahip iki kırık kromozomun birleşmesiyle meydana gelmektedir. Halka kromozomlar her iki kromozomun uç bölgelerinde oluşan kırıklar nedeniyle halka şeklini alarak birleşmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Sayısal anormallikler ise, anormal kromozom bölünmesiyle ortaya çıkan kromozom sayısındaki değişikliklerdir. Poliploidi, haploid kromozom sayısında katlar şeklinde olan artışlardır (Russo ve diğerleri, 2019; van Gulik ve diğerleri, 2023; Xue ve diğerleri, 2020). Kromozomal anormallikler morfolojik ve kantitatif değişiklikleri içermektedir. DNA çift zincir kırılmaları, kromozomal morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Kromozomların kantitatif değişiklikleri arasında anöploidi ve poliploidi bulunmaktadır.

Sayısal kromozomal anormallikler, mitotik iğ aparatının bozulmasına bağlı olarak bozulmuş hücre ve kromozom bölünmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozomal anormallik oranındaki artış, incelenilen test materyallerinin karsinojenik potansiyelinin belirlenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Han ve diğerleri, 2023; Holmannova ve diğerleri, 2022).

Kromozomal anormallikler pek çok hastalığın göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Düşük vakaları için bilinen başlıca genetik nedenlerin %60 kadarını oluşturur (Boreiko ve Rossman, 2020; Kassa, 2021). Spesifik kromozom anormallikleri karsinojenez sırasında üretilse de, periferik kan lenfositlerindeki genetik hasarın karsinojenez geçiren farklı hedef hücrelerdeki benzer hasarı yansıtmasına dayanarak, kromozomal anormalliklerin sıklığının kansere yatkınlığın bir belirteci olduğu düşünülmektedir. Yapısal varyasyonları içeren kromozomal anormallikler, insan genetik hastalıklarının ana nedenleri arasında yer almaktadır (Mantere ve diğerleri, 2021; Toropov, Toropova, Raitano ve Benfenati, 2019).

Tez çalışmasında kardeş kromatit değişimi testi de uygulanmıştır. Kardeş kromatit değişim testi 2014 yılında OECD kılavuzlarından çıkarılmış olmasına rağmen diğer genotoksisite testlerinin sonuçlarını desteklemek için sıklıkla kullanılan bir testtir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak uygulanmaya devam etmektedir. Kromozom anormallik testi kadar DNA'daki hasarı belirlemede hassas olmasa da, kardeş kromatitler arasındaki genetik materyal değişimini belirlenmesi açısından önemlidir *(*Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2022). Kardeş kromatitlerde görülen parça değişimlerinin, çevresel, genotoksik, mutajenik ve kimyasal ajanlara maruziyet sonucunda arttığı ve böylece DNA'da ortaya çıkan hasarın etkilerini görsel olarak belirlediği bilinmektedir (Yüzbaşıoğlu, Dilek, Erikel ve Ünal, 2023). Kardeş kromatitler arasındaki homolog rekombinasyonun kardeş kromatit değişimi oluşumu için esas mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu test, DNA hasarını izlemek ve tespit etmek için kullanılan hassas yöntemler arasına girmektedir. Aynı zamanda klastojenik ajanların kromozomlar üzerindeki etkisini gözlemlemek için de kullanılan bir tekniktir. Kardeş kromatit değişimlerini indükleyen birçok ajan ve kimyasal madde iyi bilinen mutajen veya karsinojenler arasına girmektedir (Çelik, 2022: 185,217).

Carmoisine ve Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde kardeş kromatit değişimi sıklığı üzerine etkileri incelenmiştir. Carmoisine'nin sadece 24 saatlik uygulamada 300 µg/mL'lik konsantrasyonda ve Ponceau 4R'nin her iki uygulama periyodunda da yine sadece en

yüksek konsantrasyon olan 300 µg/mL'lik konsantrasyonda kontrole kıyasla KKD frekansını önemli oranda arttığı görülmüştür.

Sitotoksisitenin göstergesi olarak kabul edilen mitotik indeks, eğer kontrol grubuna kıyasla artarsa, hücre proliferasyonunun hızlı olduğunu göstermektedir. Mitotik indeksdeki azalma ise, hücre bölünme kapasitesinin kaybolması veya hücre ölümünde etkili olan mekanizmaların aktive olması gibi nedenlerle meydana gelebilmektedir. Replikasyon indeksi ise hücre bölünme kinetiğini ölçmektedir. Mitotik hücrenin kaç defa hücre döngüsü geçirdiğini değerlendirmektedir. Her iki indeks de genotoksik maddelerin ve kimyasalların sitostatik aktivitesini değerlendirmeye katkı sağlamaktadır (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2022).

Mitotik indeks sonuçları incelendiğinde Carmoisine'nin 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon hariç bütün konsantrasyonlarda ve 48 saatlik uygulamasında en yüksek iki konsantrasyonda (150 ve 300 µg/mL) kontrole göre anlamlı düşüş olduğu görülmüştür. Ponceau 4R mitotik indeks değerlerinde 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon hariç kalan tüm konsantrasyonlarda ve 48 saatlik uygulamasında ise bütün konsantrasyonlarda kontrole kıyasla düşüşe neden olmuştur. Bununla birlikte her iki gıda boyasının da replikasyon indeksi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında diğer bir genotoksisite testi olan ve son yıllarda özellikle insan lenfositlerinde yaygın şekilde tercih edilen sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testi de kullanılmıştır. Bu testte binükleat hücrelerde mikronükleusların yanı sıra nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk frekansları da belirlenmektedir. Ayrıca proliferasyon indeksi de hesaplanmıştır. Carmoisine sadece en yüksek konsantrasyonda (300 µg/mL) nükleer tomurcuk frekansında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Ponceau 4R uygulamasında ise hiçbir parametrede herhangi bir anlamlı artış gözlenmemiştir. Ayrıca her iki gıda boyası da proliferasyon indeksini etkilememiştir.

CBMN-Cyt testi, mikronükleus (MN), nükleoplazmik köprü (NPK) ve nükleer tomurcukların (NT) gözlenmesini sağlamaktadır. Mikronükleuslar kromozomal kırılmaların veya tam bir kromozom kaybının sonucunda oluşurken, nükleoplazmik köprüler yanlış DNA onarımının ve telomer uç bölgelerindeki kayıpların göstergesidir.

Nükleer tomurcuklar ise DNA onarım komplekslerinin nükleer eliminasyonunun ve amplifiye DNA'nın belirtecidir (Avuloğlu-Yılmaz, Yüzbaşıoğlu ve Ünal, 2022). CBMN-Cyt testinde sitokinezi inhibe etmek ve bölünen hücrelerin tanımlanmasını sağlamak için yaygın olarak bir aktin polimerizasyon inhibitörü olan Sitokalasin B kullanılmaktadır. Sitokinezini bloke ederek, nükleer bölünmesini tamamlayan hücrelerin ikiye ayrılmasını engeller ve iki çekirdekli hücreler meydana gelir. Bu test ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilir. Ayrıca, periferik kan lenfositlerinde artmış MN frekansı, insanlarda kanser riskininde göstergesidir (Siivola ve diğerleri, 2022; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,241). Mikronükleuslar iki yol ile ortaya çıkabilmektedir: klastojenik etki nedeniyle kromozomun kırılması ile oluşan asentrik fragmentlerden veya anöjenik etki sonucu iğ ipliği hatalarıyla kutuplara çekilemeyen tam bir kromozomdan. Nükleoplazmik köprüler, disentrik kromozomlardan köken alır, nükleer tomurcuklar ise, kromozomal kararsızlık ile ilişkilendirilmiştir. Nükleer tomurcukların, gen amplifikasyonunu indükleyen seçici koşullar altındaki kültürlerde ortaya çıktığı görülmüştür (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,241).

CBMN-Cyt testi ile proliferasyon indeksi de incelenmektedir. Proliferasyon indeksi yaygın olarak sitotoksisitenin bir ölçüsü olarak kullanılmakta olup aynı zamanda hücre bölünmesinin bir belirtecidir. Proliferasyon indeksinde meyda gelen azalma hücre döngüsündeki inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtmaktadır. Bu belirteç kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizmaları hakkında önemli bilgiler de vermektedir (Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219,241).

Bu çalışmada iki gıda boyasının da izole lenfositlerde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi için kuyruklu yıldız veya tek hücreli jel elektroforez testi olarak da adlandırılan comet testi gerçekleştirilmiştir. Comet testi sonuçlarına göre, Carmoisine'nin en yüksek konsantrasyonda sadece kuyruk uzunluğu parametresini istatistiksel olarak arttırdığı görülmüştür. Ponceau 4R ise kuyruk uzunluğunu en yüksek iki konsantrasyonda, kuyruk momentini ise sadece en yüksek konsantrasyonda önemli ölçüde artırmıştır. Diğer parametrelerde her iki madde için de bir değişiklik gözlenmemiştir.

Comet testi, DNA hasarının oranını ve onarımını incelemek için kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir testtir. Bu teknik ile hücrede tek ve çift DNA zincir kırıklarının

saptanması ve hücresel düzeyde ortaya çıkan DNA hasarının belirlenmesi amaçlanmaktadır (Cordelli ve diğerleri, 2021; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313,335). Comet testi, insan biyo-izlem çalışmaları, moleküler epidemiyoloji ve temel alanlardaki uygulamalarda DNA hasarını değerlendirmek ve onarımını araştırmak için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. "Comet" terimi başlangıçta agaroz jellerdeki DNA formunu karakterize etmek için kullanılmıştır. Kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu parametrelerine bakılarak comet sayısı ve genel DNA göçü seviyesinin nasıl olduğu ile ilgili sonuca ulaşılmaktadır. DNA hasarının derecesini tahmin etmek için sadece kuyruk uzunluğuna değil diğer parametrelere de bakılmaktadır (Jiang ve diğerleri, 2023). Aynı zamanda comet testi özellikle diğer teknikler kullanılarak kolayca değerlendirilemeyen organlar ve dokular için *in vivo* genotoksisitenin değerlendirilmesinde bir araç olarak da kullanılmaktadır (Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313,335; Zhanataev ve diğerleri, 2020).

Comet testi analiz için, az sayıda hücre gerektirmesi, hemen hemen her türden hücreyle uygulama yapılabilme esnekliği ve çeşitli DNA hasarlarını yüksek doğrulukla ölçme kapasitesi nedeniyle genotoksisite çalışmalarında ve klinik araştırmalarda vazgeçilmezdir. Bu yöntemle, çeşitli kimyasalların, fiziksel elementlerin, nanoparçacıkların, ilaçların vb. mutajenitesi incelenebilmektedir. Bu test, gerçekleştirilen tekniğe göre alkali ve nötral olarak ikiye ayrılmıştır. DNA'yı denatüre eden alkali elektroforez hem tek hem de çift zincir kırıklarının belirlenmesine izin vermektedir. Buna karşılık, uzun bir süre boyunca, nötr elektroforez protokolünün yalnızca çift zincir kırıklarının belirlenmesine izin verdiğine inanılıyordu. Bu görüşün tamamen doğru olmadığı ve nötral comet testinin tek zincir kırıklarını tespit etmek için de aynı derecede etkili olduğuna dair çok sayıda kanıt olduğu görülmektedir (Jiang ve diğerleri, 2023; Afanasieva Zazhytska ve Sivolob, 2010).

DNA hasarının ve onarımının araştırılması, insan yaşlanmasını ve kanseri anlamak için oldukça büyük öneme sahiptir. Comet testi, DNA hasarının birikimini ve onarımını incelemek için de geliştirilen bir testtir. Dolayısıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar DNA'da mutasyonlar üretebilir ve bunun sonucunda kanser ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle comet testinden elde edilen pozitif sonuçların kanser gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Glavini´c ve diğerleri, 2023).

Carmoisine (E-122) ve Ponceau 4R (E-124) renklendiricilerinin genotoksik etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. 2011 yılında yapılan bir çalışmada Carmoisine ve Ponceau 4R'nin mikronükleus testi ile genotoksisitesi incelenmiştir. İnsan periferik kan örneklerine gıda boyalarının 100, 200, 300 µg/mL'lik konsantrasyonları uygulanmış ve sonuçta MN frekansında kontrole kıyasla anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Swaroop, Roy ve Vijayakumar, 2011). Çalışmamızda CBMN-Cyt testi uygulanmış olup MN frekansında herhangi bir değişiklik görünmezken nükleer tomurcuk frekansında anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur.

Carmoisine ve Ponceau 4R'nin insan periferal lenfositlerinde genotoksisitesi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ancak bu iki gıda boyasının genotoksik etkilerinin farklı test sistemleriyle incelendiği çalışmalar bulunmaktadır.

EFSA Paneli 2009 ve 2013 raporuna göre, Carmoisine'nin genotoksisite açısından herhangi bir endişesinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Çünkü çalışmaların büyük bir bölümü genotoksik etkinin olmadığını göstermektedir. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium (*TA1535, TA1538, TA100 ve TA98 suşları) ile sitotoksisite ve mutajenite açısından test edildiğinde mutajenik etki bulunmamıştır (Viola and Nosotti, 1978). *Salmonella typhimurium*'un (TA1538) metabolik aktivasyonla veya metabolik aktivasyon olmadan Carmoisine'e maruz kalmasından sonra mutajenik potansiyele dair kanıt elde edilememiştir (Haveland-Smith and Combes, 1980). Carmoisine, mikrozomal aktivasyon olmadan *Saccharomyces cerevisiae*'de (BZ 34) mitotik gen dönüşümünü indüklemediği görülmüştür (Sankaranarayanan and Murthy, 1979). Bir *in vivo* çalışmada farelerde, kromozomal hasarı artırmadığı gözlenmiştir (Durnev ve diğerleri, 1995). Salmonella/mikrozom testi, fare lenfoması TK +/- testi, Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde kromozom anormallik ve kardeş kromatit değişim testi ve sıçan hepatosit/DNA onarım testi gibi bir çok çeşitli *in vitro* çalışmalar yapılmış fakat bunların hiçbiriyle ilgili daha fazla ayrıntıya yer verilmemiştir (Ashby ve diğerleri, 1988; Benigni, 1989; Gulati ve diğerleri, 1989).

Vasileva ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, Carmoisine ve sıklıkla kullanılan diğer gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* kök meristem hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada, dört farklı konsantrasyon (0.05, 0.1, 1, 10 g/L) kullanılmış, 72

saat boyunca gıda katkı solüsyonları içeren tüplere soğanlar yerleştirilmiştir. Kontrol grubu için distile su kullanılmış ve muamele süresi sonunda filizlenen kökler bistüri yardımıyla ayrılmıştır. Sonuçta C-metafaz, vagrant (başıboş) kromozom ve mikronükleus frekanslarında artışlar belirlenmiştir. Ek olarak hücre bölünmesinin baskılandığı ve mitotik indeksin azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle *Allium cepa'nın* kök meristem hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla Carmoisine'in genotoksik risk taşıdığı ve aynı zamanda sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (Vasileva ve diğerleri, 2021).

Farklı bir çalışmada Carmoisine ve Metanil sarısı olmak üzere iki gıda boyasının genotoksisitesi *Allium cepa* kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu iki azo boya, *Allium cepa*'nın kök meristematik hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca % 0.25, % 0.50, % 0.75 ve % 1.0 konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Hem Carmoisine hem Metanil sarısının mitotik indekste önemli bir azalmaya ayrıca çoğunlukla daha yüksek konsantrasyonda ve daha uzun maruz kalma süresinde farklı tiplerde kromozomal anormalliklere neden olduğu bulunmuştur. Bu iki gıda boyası ile muameleden sonra meristematik hücrelerde gözlenen farklı aberasyon türleri; metafazda yönelim bozukluğu, metafaz yapışkanlığı, anafaz yapışkanlığı, anafaz köprüsü, c-mitoz ve kromozom kırıklarıdır. Carmoisine'nin genotoksisitesi, tüm konsantrasyonlarda ve maruz kalma sürelerinde Metanil sarısına kıyasla çok yüksek bulunmuştur. Böylece mevcut çalışmadan Carmoisine ve Metanil sarısının genotoksik aktivitelere sahip olduğu, çok kontrollü ve sınırlı dozlarda kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Khan ve diğerleri, 2020).

Bir diğer çalışmada, çevreye salınan endüstriyel atık suların içinde bulunan katkı maddelerinin genotoksik etkisinin rizobakteriler (PGPR) üzerinde incelenmiştir. Sentetik gıda boyaları, endüstriyel atıklarda bol miktarda bulunmakta ve çevreye (su ve toprak) boşaltıldıklarında ışık penetrasyonunu azaltarak alglerin, su bitkilerinin, tarımsal ürünlerin performansını ve büyümesini engellemektedirler. Bitki büyümesini destekleyen rizobakteriler, toprak atmosferindeki nitrojen konsantrasyonunun mevcudiyetini artırma gücüne sahip olan rizosfer bakterileridir. Bu amaçla, söz konusu etkileri test etmek için Carmoisine E-122, Tartrazine E-102 ve Allura Red AC E-129 dahil olmak üzere ağırlıklı olarak kullanılan üç sentetik gıda boyası seçilmiştir. 24 ve 48 saat süreyle çeşitli konsantrasyonlarda (% 0.25, 0.50, 0.75, 1.0) Carmoisine E-122, Tartrazine E-102 ve Allura red E-129 boyaları bakterilere ayrı ayrı uygulanmıştır. Bakterilerin DNA

ekstraksiyonu ve konsantrasyonun belirlenmesi, değiştirilmiş bir spektrofotometri CTAB ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen bakteriyel DNA numunelerine, DNA hasarını tespit etmek için comet yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tüm gıda boyaları konsantrasyona ve maruz kalma süresine bağlı olarak DNA'da önemli hasara neden olmuştur. Carmosine'nin neden olduğu DNA hasarının kapsamı, diğer renklendiricilerle karşılaştırıldığında nispeten daha fazla olduğu görülmüştür (John ve diğerleri, 2023).

Raya ve arkadaşları, aralarında Carmoisine'nin de bulunduğu çeşitli gıda katkı maddesi karışımlarının güvenliğini değerlendirmek için albino ratlarda alkali comet testi gerçekleştirmişlerdir. Gıda katkı maddeleri farklı gruplara ayrılan ratlara otuz gün boyunca oral olarak verilmiştir. Hemoglobin, böbrek fonksiyonları, AST, ALT ve ALP aktiviteleri, toplam protein ve albümin seviyeleri gibi pek çok farklı parametrede etkisi olup olmadıkları incelenmiştir. Sonuçlar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında incelenen tüm gıda katkı maddelerinin kombinasyonlarının önemli oranda hemoglobin konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Gıda katkı maddesi sayısı arttıkça, beyin, böbrek ve karaciğerde farklı derecelerde genotoksik etkinin arttığı görülmüştür (Raya ve diğerleri, 2020).

Carmoisine ve Sunset Yellow, renklendiricilerinin oral tüketiminden sonra davranış değişikliklerinin altında yatan apoptotik etki, tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla ilgili olarak farelerde PCR analiz çalışması yapılmıştır. Elli yetişkin erkek fare üzerinde biyokimyasal ve moleküler biyolojik parametreler incelenmiştir. Çalışma, her birinde on fare bulunan 5 farklı grup üzerinde 3 ay da gerçekleştirilmiştir. Grup 1 kontrol grubu olarak, grup 2 Sunset Yellow'un günlük kabul edilebilir alım miktarı (ADI) ile muamele edilmiş, grup 3 bunun 10 katı (10x ADI Sunset Yellow) ile muamele edilmiştir. Grup 4 Carmoisine'nin günlük kabul edilebilir alım miktarı (4 mg/kg BW) ve grup 5 bunun 10 katı (10x ADI Carmoisine) ile muamele edilmiştir. Carmoisine'nin en yüksek konsantrasyonlarına maruz kalındığında, biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde değiştirdiği ve hem serotonin hem de dopamin seviyelerini ayrıca toplam antioksidan kapasiteyi de azalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle, hem Carmoisine'nin hem de Sunset Yellow'un yüksek konsantrasyonlarda oral uygulamasının apoptotik etkiye neden olabileceği ve kullanımlarına dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (Hussein, Arisha, Tayell ve Abdo, 2021).

2019 yılında Carmoisine'in toksisitesi ve karsinojenitesinin incelendiği bir çalışmada bu azo boyası, farelere 120 gün boyunca düşük, orta ve yüksek olmak üzere (sırasıyla 4, 200 ve 400 mg/kg/vücut ağırlığı) oral olarak uygulanmıştır. Temel toksikolojik değerlendirme yapılabilmesi için hayvan vücut ağırlığı, organ ağırlıkları, hematolojik, biyokimyasal ve moleküler incelemeler gerçekleştirilmiştir. Sonuçta Carmoisine'in orta ve yüksek dozda fare vücut ağırlıklarını, kontrole kıyasla önemli ölçüde azalttığı, trombosit, beyaz kan hücresi ve monosit sayıları önemli ölçüde yükselttiği, Hb ve kırmızı kan hücresi sayılarını kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca serum alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalin fosfataz, total protein, globulin, üre ve kreatinin seviyesi gibi biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde artarırken, serum kolesterol seviyesinin muameleden sonra kontrole kıyasla azaltığı tespit edilmiştir.

RT-PCR sonuçları, Carmoisine'in fare karaciğer dokularında Bcl-x ve PARP geninin ekspresyonunu önemli düzeyde arttığını ve p53 geninin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bu çalışma, yüksek doz (400 mg/kg) Carmoisine'in böbrek yetmezliği ve hepatotoksisiteye neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca karaciğer onkogenezinde etkisi olabileceği açıklanmıştır (Reza ve diğerleri, 2019).

Tez kapsamında genotoksik etkilerinin incelendiği diğer renklendirici olan Ponceau 4R'nin EFSA 2009 ve 2013 panelinde farklı genotoksisite çalışmaları yer almaktadır. *Escherichia coli* kültürlerinde, Ponceau 4R'nin mutajenik potansiyele sahip olmadığı açıklanmıştır (Lück and Rickerl, 1960). Erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde, minimum etkili intraperitoneal dozda klastojenik aktivite ve kromozom sapmaları kaydedilmiştir (Agarwal ve diğerleri, 1993). *Salmonella typhimurium'*un S9'lu ve S9'suz TA1535, TA1537, TA1538, TA98 ve TA100 suşları ile Ames testinde ve ayrıca fare lenfoma TK+/- testinde Ponceau 4R'nin mutajenitesi incelenmiştir. Ames testinde ve fare lenfoma testinde sonuçların negatif olduğu bildirilmiştir (Cameron ve diğerleri, 1987). Ponceau 4R'nin tatlı su balığı *Oryzias latipes* ile gerçekleştirilen dominant letal testte de negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Shimada ve Egami, 1984). *Salmonella typhimurium* TA92, TA1535, TA100, TA1537, TA94 ve TA98 suşları ile Ames testinde ve hamster fibroblastlarında kromozomal anormallik testi ile de incelenmiştir. Ponceau 4R'nin Ames testinde negatif etkili olduğu ve kromozomal anormallik testinde pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Ishidate ve diğerleri, 1984). Farelerde mikronükleus testi yapılmış ve Ponceau 4R'nin negatif etkili olduğu gözlenmiştir (Hayashi M ve diğerleri, 1988). Yine farelerde,

gerçekleştirilen comet testinde DNA hasarında önemli artışlara neden olduğu bulunmuştur (Tsuda ve diğerleri, 2001).

Ponceau 4R'nin *Allium cepa L.* kök meristematik hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki toksisitesi üç konsantrasyonda (0.25, 0.50 ve 0.75 g/L), 24 ve 48 saatlik maruz kalma sürelerinde incelenmiştir. 24 saatlik uygulama süresinde 0.75 g/L ve 48 saatlik uygulama süresinde 0,25 ve 0,50 g/L'lik konsantrasyonlarda mitotik indeks değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Ayrıca Ponceau 4R'nin mikronükleuslu hücrelere, gen amplifikasyonlarına ve anafaz-telofaz köprüleri gibi anormalliklere de neden olduğu belirtilmiştir (Santana, Sousa ve Peron, 2015).

2021'de yapılan bir çalışmada Ponceau 4R'nin üç farklı konsantrasyonunun (25, 50, 75 mg/ml) Somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi ile *Drosophila melanogaster'*in kanatlarında olası mutajenik etkisi incelenmiştir. Bu maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak genotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, Drosophila larvalarındaki glia hücrelerinin yetişkin aşamada vücut parçalarını oluşturmak için çoğalma ve farklılaşmaya gitmesi, kansere duyarlı birçok memeli hücresine benzer ve insan genetik hastalıklarında tanımlanan genlerin % 60'ından fazlası benzerlikleri yönünden ortaktır. Bu nedenle çalışmanın sonuçları insan sağlığını da yakından ilgilendirmektedir (Yılmaz-Çetinkaya ve Yurtsever, 2021).

2022 yılında yapılan bir çalışmada, birden fazla gıda boyası ve metabolit kullanılarak sıçanlardaki oral akut toksisite incelenmiştir. Aralarında Carmoisine ve Ponceau 4R'nin de bulunduğu bu gıda boyalarının sıçanlardaki toksisitesini, immünotoksikolojik, hepatotoksikolojik ve genotoksikolojik açılardan tespit etmek için *in silico* çalışma gerçekleştirilmiştir. Carmoisine ve Ponceau 4R'nin konsantrasyonlarının (81-275 mg/kg) oral olarak verildiği kabul edilmiştir. Çalışma sonucunda, gıda boyaları arasında sadece Aminopirazolon'un hepatotoksik etkisi olduğu ve Allura Red'in kanserojen olduğu görülmüştür. Carmoisine ve Ponceau 4R'nin ise aralarında olduğu diğer gıda boyalarının herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı açıklanmıştır (Kargupta ve diğerleri, 2022).

Ponceau 4R'nin genotoksik etkileri *in vivo* mikronükleus testi ile incelenmiştir. Swiss albino fare grupları 0.5, 1.0 ve 2 g/kg'lik dozlar ile muamele edilmiş, 24 ve 48 saatlik

etkileri belirlenmiştir. Kemik iliği polikromatik (PCE) ve normokromatik (NCE) eritrositleri ve mikronükleasyonlu PCE (MNPCE) istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Muamele edilen hayvan grupları için, MNPCE sıklığı ve PCE/NCE oranı analizleri, muamele grupları (0,5-2 g/kg) ile kontrol grupları (NaCl ve NEU) arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Ponceau 4R doza ve zamana bağlı genotoksisite; zamana ve cinsiyete bağlı sistemik toksisite göstermiştir. Veriler sistemik toksik riskleri güçlendirebilecek potansiyel klastojenik ve/veya aneugenik etkilere işaret etmektedir (de Souza ve diğerleri, 2022).

Bir diğer çalışmada Ponceau 4R'nin erkek ddY farelerin hücrelerindeki genotoksisitesi comet testi ile değerlendirilmiştir. Ponceau 4R'ye maruz kaldıktan sonra mide hücrelerinde ve kolon hücrelerinin DNA lezyonları tespit edilmiştir. Ayrıca, Ponceau 4R mesane, karaciğer, böbrek ve akciğer hücrelerinde DNA lezyonları oluşturmuştur. Ancak zaman ve muameleden bağımsız olarak kemik iliği ve beyin hücreleri için genotoksik olmadığı belirlenmiştir. Histopatolojik inceleme ve nekropsi sırasında, incelenen hayvan organlarında herhangi bir hasar rapor edilmemiştir (Sasaki ve diğerleri, 2002).

Carmoisine ve Ponceau 4R'nin dahil olduğu azo boyalar sınıfındaki renklerdiricilerin genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada Tartrazin gıda boyasının, potansiyel *in vitro* sitotoksisite, genotoksisite ve boyaya maruz kalan insan lenfositlerinin DNA onarımı üzerindeki etkilerini değerlendirilmiştir. Tartrazin'in sitotoksisitesini 3-(4,5-Dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi ile ve DNA onarımı tepkisini comet testi ile değerlendirilmiştir. 0.25-64.0 mM arasında değişen farklı konsantrasyonlar seçilmiştir. Sonuçlar, Tartrazin'in sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak, bu boyanın test edilen tüm konsantrasyonlarda önemli bir genotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Hasarın çoğu tamir edilebilir olmasına rağmen, bazı hasarlar 24 saatlik muameleden sonra pozitif kontrolden daha yüksek çıkmıştır. Bu veriler, Tartrazin'in sağlığa zararlı olabileceğini ve uzun süreli kullanımının karsinojenezi tetikleyebileceğini göstermektedir (Soares ve diğerleri, 2015).

Başka bir çalışma tartrazinin insan lenfosit kültüründeki genotoksik potansiyelini ve insan lenfositleri ve melanom GR-M hücre hattındaki sitotoksik potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamıştır. İnsan lenfosit kültüründe genotoksik ve sitotoksik potansiyelini test etmek için kromozom anormallik testi ve sitokinez-blok mikronükleus sitom testi kullanılmıştır. İnsan melanom hücre kültüründeki etkileri 2.5, 5, 10 mM konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve yapılan istatistiksel analizler, Tartrazin'in test edilen konsantrasyonlarının insan lenfositlerinde genotoksik olmadığını göstermiştir (Haverić ve diğerleri, 2018).

Bir diğer araştırmada Tartrazine'in, 25, 500, 2000 mL/kg konsantrasyonları farelerde mikronükleus ve comet testlerinde incelenmiştir. Kemik iliği mikronükleus testinde, karaciğer, mide ve kolon comet testinde kullanılmıştır. Tartrazine için genotoksik aktivitenin açık bir şekilde olmadığı bildirilmiştir. Gıda katkı maddeleri WHO/FAO Komitesi'de (JECFA) bu verileri gözden geçirmiştir ve Tartrazine için herhangi bir genotoksisite endişesi olmadığı sonucuna varılmıştır (Bastaki ve diğerleri, 2017).

Amaranth, Eritrosin ve Tartrazin gibi çeşitli gıda boyaları ile yapılmış bir çalışmada, insan periferik kan hücrelerinde 0,02-8mM arası konsantrasyonların genotoksisitesi ve sitotoksisitesi kardeş kromatit değişimi, comet ve PCR ile incelenmiştir. KKD frekansında kontrol seviyesine göre artış görülmüştür. 2, 4 ve 8 mM konsantrasyonlarda yüksek sitotoksisite bulunmuştur. PCR amplifikasyonları da incelendiğinde bu gıda boyalarının insan lenfositlerinde toksik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (Mpountoukas ve diğerleri, 2010).

Azo boyaları, tekstil boyalarının açık ara en önemli sınıfını temsil etmektedir. Yapılan bir çalışmada çeşitli deri bakterileri tarafından biyotransformasyonları, büyük ölçüde dermal olarak emilebilen aromatik aminlerin (AA'ların) açığa çıktığı belirtilmiştir. AA'ların genotoksik ve/veya kanserojen özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ames testi yapılmış *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarına S9 varlığında ve yokluğunda genotoksisite incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucu, tekstil azo boyalarındaki mutajenik AA'ların, beklenenden çok daha fazla endişe verici olduğunu, bunun da muhtemelen gelecekte azo boyalarının düzenlenmesi üzerinde etkileri olacağı açıklanmıştır (Brüschweiler ve Merlot, 2017).

Gıda boyaları, pek çok kromozomal anormalliğe ve DNA hasarlarına neden olmaktadır. Fakat oluşan bu anormalliklerin mekanizmalarıyla ilgili hala çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek miktarlarda Carmoisine tüketildiğinde, reaktif oksijen türlerine (ROT) neden olur. Bu durum oksidatif strese yol açarak bağışıklık sistemi hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. ROT miktarında artış olduğunda, DNA, protein ve lipitlerin oksidasyonu nedeniyle hücre hasarı artmakta, nekroz ve apoptozis meydana gelmektedir. ROT'ların hücrede önemli rolleri bulunmaktadır. Hücrede sinyal iletiminde, çoğalma ve farklılaşmada ve çeşitli fizyolojik olaylarda rol almaktadırlar. Yüksek oranda üretilen ya da normal düzeyde üretildiği halde nötralize edilemeyen serbest radikaller, lipidlerde peroksidasyona, proteinlerde yıkım nedeniyle oluşan enzim aktivitesi kaybına ve DNA yıkımı nedeniyle mutasyon ve karsinojenik etkiye yol açmaktadır. (Kızıltan ve diğerleri, 2022; Subramaniyan ve diğerleri, 2023).

Carmoisine ile muamele edilen karaciğer dokularında DNA onarım geni PARP'ın ekspresyonundaki değişim fark edilmiş, bu da apoptozun engellenmesini ve karaciğer dokusunda mutasyon veya tümör indüksiyonunu doğrulamıştır. Ayrıca, tümör baskılayıcı gen olan p53, muamele edilen farelerin karaciğer dokularında daha az ifade edilirken, kontrol karaciğer dokularında tam ekspresyona uğramıştır. Bu da muamele edilen karaciğer dokularında mutasyon ve/veya tümör hücresinin oluşacağını doğrulamıştır (Reza ve diğerleri, 2019). Araştırmacılar Carmoisine'in gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanımı onaylanmış olmasına rağmen, sağlık riskleri oluşturabileceğini, hayati organları (örn. karaciğer ve böbrekler) olumsuz etkileyebileceğini ve fonksiyonlarını değiştirebileceğini belirtmişlerdir. Yüksek dozda hepatoselüler hasar riskini artırmakla kalmadığını, aynı zamanda kansere de neden olacağını, karaciğerin Carmoisine toksisitesinin ana hedef organı olduğunu bildirmişlerdir. Sentetik gıda azo boyalarının sağlık üzerindeki olumsuz etkileri konusunda kamuoyunda farkındalık yaratılması ve ADI aralığında tüketimin teşvik edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Reza ve diğerleri, 2019). Yapılan bir diğer çalışmada Carmoisine'in DNA ile bağlanabildiği ve bu bağlanmanın, DNA'nın B-form yapısında orta derecede konformasyonel bozulmalara neden olduğu açıklanmıştır. Bu değişimin mutajenite veya karsinojeniteye katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Basu ve Kumar, 2014).

Carmoisine ile muamele sonrasında toplam antioksidan kapasitede belirgin bir düşüş bildirilmiştir. Makrofajlarda aşırı ROT birikimi, hücre metabolik fonksiyon bozukluğuna ve apoptoza yol açabilen RNA, DNA, lipidler ve proteinde bir dizi hücresel değişikliği tetikleyebilir. Apoptoz, hücre popülasyonlarını kontrol etmenin çok önemli bir yoludur ve bu nedenle kontrol altında olması zorunludur. Normal hücre ölümündeki homeostaz, oksidatif stresin kısıtlanmasıyla sıkı bir şekilde sınırlandırılmıştır. Sonuç olarak, bu yolaklar boyunca hatalı sinyalleşme, apoptozun başlatılmasının yanı sıra kanser gelişimini de mümkün kılmaktadır. Carmoisine, hücre bölünmesi inhibisyonunun yanı sıra membran ve DNA hasarı yoluyla apoptotik indüksiyona neden olmaktadır. Carmoisine, beyin dokularında proapoptotik bir gen olan Fas, Fas-L, BAX ve Caspase-3 gen ekspresyonu ile doğrulanan apoptotik ortamın ilerlemesine neden olmuştur. Dolayısıyla oksidatif stresin oluşması ve ROT birikimine neden olması nedeniyle nörogelişimsel sağlık sorunları ortaya çıkması endişesi bulunmaktadır (Hussein, Arisha, Tayell ve Abdo, 2021).

Carmoisine ve Ponceau 4R metabolizması sülfonatlı aromatik aminler üretmektedir. Jung ve arkadaşları bir dizi sülfonatlı aromatik aminlerin genotoksisitesini incelemişlerdir. Fenilaminlerin ve naftilaminlerin genotoksik potansiyelleri üzerinde sülfonasyonun etkisine ilişkin fikir edinmek için, sülfonatlı aromatik aminlerin genotoksisitesi, sülfonatsız analogları ile karşılaştırılmıştır. Ames testlerinde genel olarak sülfonatlanmış fenilaminlerin ve naftilaminlerin Salmonella'ya karşı mutajenik olmadığı bulunmuştur. Bazı sülfonatlı aromatik aminler için *in vitro* ve *in vivo* diğer test sistemleri de hiçbir genotoksisite göstermemiştir. Mevcut verilere dayanarak, sülfonatlanmış aromatik aminlerin, sülfonatlanmamış analoglarının aksine, hiç veya çok düşük genotoksik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle çalışma, metabolik parçalanmayla türetilen veya renklendirmede kirletici maddeler olarak bulunan sülfonatlı aromatik aminlere maruz kalmanın herhangi bir önemli genotoksik risk oluşturmadığını göstermiştir (EFSA, 2009). Ancak bunun aksini açıklayan çalışmalarda endüstride yaygın olarak kullanılan azo boyaların toksik aktivitesi metabolizmalarının bir sonucu olduğu bildirilmektedir. Enzim aracılı azo indirgenmesi, DNA'ya saldıran aktif aromatik aminlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu maddelerin tavsiye edilen günlük alım miktarından (ADI) daha yüksek miktarlarda alınmasının memeli modellerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (Mishra, 2020).

Tez çalışmasında her iki azo boyanın genotoksik potansiyelinin benzer olduğu ve özellikle yüksek konsantrasyonların genotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda her hangi bir genotoksik etki belirlenmemiştir. Gıda boyalarının genotoksik etkileri ve kanser ilişkisinin mekanizmalarının anlaşılması için ilave çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda boyaları, yaygın olarak tüketilen birçok yiyeceklerde bulunan ve son zamanlarda sıklıkla karşımıza çıkan katkı maddelerindendir. Bu boyaların sağlık üzerine etkisi araştırılmalara konu olmaktadır. Renklendiricilerin fazla ve dikkatsiz kullanımı nedeniyle alerjik reaksiyonlar, mide bulantısı, kalp-damar hastalıkları gibi pek çok hastalığa neden olabileceği görülmektedir. Hatta bazı gıda boyalarının kanserojen, klastojenik ve genotoksik özellikler de gösterdiği bildirilmiştir. Bundan dolayı, gıda boyalarının dikkatli kullanılması gerekmektedir (Momtaz, Bubli and Khan, 2023).

Sentetik gıda boyaları arasında en önemlisi suda çözünen azo boyalardır. Bunlar genellikle ilaç ve gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca azo boyalar, özellikle şuruplar, şekerlemeler ve enerji içecekleri gibi dikkat çekici çok farklı yiyecek ve içeceklerde renk kaybını telafi eden parlak tonları nedeniyle ve tatları zenginleştirmek amacıyla en sık kullanılanlardır (Nandanwadkar ve Mastiholimath, 2020). Birçok boya, laboratuvar hayvanları üzerindeki olumsuz etkileri veya yetersiz testler nedeniyle yasaklanmıştır. Bu testlerin kanserojenite, genotoksisite ve aşırı duyarlılık kanıtları oluşturması, boyaların gıdaların güvenliğini veya beslenme kalitesini artırmadığı gerçeği ile birleştiğinde, çok dikkatli kullanılmaları gerektiğini ve daha güvenli renklendiriciler kullanılmasının zaruri olduğunu ortaya koymaktadır. Düzenleyici makamların daha iyi ve bağımsız toksisite testleri yapmaları, kullanım onayı verilmesinde dikkatli davranmaları ve sadece iyi test edilmiş, güvenli boyaları onaylamaları önemlidir (Kobylewski ve Jacobson, 2012).

Carmoisine (E122) kırmızı renkli bir sentetik-azo boyadır. Tüketim miktarına dikkat edilmeden fazla Carmoisine maruz kalınmasının, hiperaktiviteye neden olduğu, alerjik reaksiyonlar ortaya çıkardığı ve karaciğere zarar verdiği bildirilmektedir. Ponceau 4R (E124) ise sıklıkla kullanılan diğer bir azo boyadır (Kamali ve diğerleri, 2023). Carmoisine ve Ponceau 4R'nin kullanım miktarları sıkı bir şekilde kontrol edilmekle birlikte izin verilen seviyeleri aşabildiği de bildirilmektedir. Bu nedenle, özellikle içecekler gibi yüksek tüketimli ürünlerde renklendirici düzeylerinin izlenmesi büyük önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmaların sayısı, bu sorunun oldukça önemli olduğunu ve sentetik renklendiricilerin zararlarının tespiti için hızlı, doğru ve seçici testlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir (Mirabi ve Norouzi, 2023).

Araştırmalar göstermiştir ki günlük hayatta rahatça ulaşılabilen ve özellikle çocukların dikkatini çeken pek çok yiyecekde bu gıda boyaları bulunmaktadır. Bu nedenle renklendirici maddelerin genotoksik etkilerinin incelenmesi, araştırılması önemli ve hassas bir konudur. Farklı test sistemleri ile desteklenerek literatüre katkı sağlanmalıdır. Aynı zamanda bu araştırmalar, gıda boyalarının fazla kullanımlarından dolayı ortaya çıkan endişelerin giderilmesini de sağlayabilir. Ancak hala azo boyaların mutajenik ve genotoksik aktivite mekanizmasını gösteren çalışmalar sınırlıdır. Ayrıca bu maddelerin, her birinin DNA hasarında rol oynayan mekanizmaları hakkında çok az çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla yeni bilgi ve çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında, Carmoisine ve Ponceau 4R'nin insan lenfositleri üzerinde genotoksisitesi birbirini tamamlayan dört farklı genotoksisite testiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki gıda boyasının da genellikle en yüksek konsantrasyonlarında genotoksik etki görüldüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle gıda, ilaç gibi insanların sıklıkla kullandığı ürünlerde düşük dozlarda kullanılması önemlidir. Bu renklendiricilerin ürünlerde tek başına kullanılmadığı, birçok gıda katkısıyla birlikte bulundukları da unutulmamalı ve kokteyl etkisi oluşabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bunların yanısıra düşük konsantrasyonlarda genotoksik potansiyele sahip olmamaları insan sağlığı açısından son derece önemli bir avantajdır. Kullanım dozu sıkı şekilde denetlenirse sağlık üzerinde olumsuz etkileri minimuma inebilecektir.

Bu çalışma Carmoisine ve Ponceau 4R'nin insan lenfositlerinde genotoksik etkilerinin KA, KKD, MN-sitom ve comet testleriyle incelendiği ilk çalışmadır. Bu nedenle literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Tez çalışması *in vitro* koşullarda lenfosit hücre kültürü ve izole lenfositlerde gerçekleştirildiğinden *in vivo* etkilerin incelendiği çalışmalarla da sonuçlar desteklenebilir.

KAYNAKLAR

Afanasieva, K., Zazhytska, M. and Sivolob, A. (2010). Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*, *31*(3), 512-519.

Agarwal, K., Mukherjee, A. and Sharma, A. (1993). *In vivo* cytogenetic studies on male mice exposed to Ponceau 4R and beta-carotene. *Cytobios*, 74, 23-28

Alabi, O. A. (2023). Comparative chemical analysis, mutagenicity, and genotoxicity of Petroleum refinery wastewater and its contaminated river using prokaryotic and eukaryotic assays. *Protoplasma*, 260(1), 89-101.

Alham, A., Ibraimov, A., Alimzhanova, M. and Mamedova, M. (2021). Natural material shungite as solid-phase extraction sorbent for the extraction of red synthetic dye ponceau 4R from tap water, wine, and juice. *Food Analytical Methods,* 15, 707–716.

Ashby, J. and Tennant, R. W. (1988). Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Research*. 204, 17-115.

Askarniya, Z., Baradaran, S., Sonawane, S. H. and Boczkaj, G. (2022). A comparative study on the decolorization of Tartrazine, Ponceau 4R, and Coomassie Brilliant Blue using persulfate and hydrogen peroxide based advanced oxidation processes combined with hydrodynamic cavitation. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 181, 109160.

Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Çelebi-Keskin, A. and Ünal, F. (2016). Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 8-18.

Avuloğlu-Yılmaz, E., ve Yüzbaşıoğlu D. (2022). Mikronukleus Testi. Ünal, F ve Yüzbaşıoğlu, D.(Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 218-249.

Avuloglu Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D. and Unal, F. (2023). Investigation of genotoxic effect of octyl gallate used as an antioxidant food additive in *in vitro* test systems. *Mutagenesis*, 20, 1-9.

Avuloğlu-Yılmaz, E. (2018). *Gıda katkı maddeleri olarak kullanılan monopotasyum glutamat, magnezyum diglutamat ve xylitol'ün genotoksik etkilerinin araştırılması.* Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 178.

Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D. and Ünal, F. (2022). Investigating *in vitro* genotoxic effects of sweetener Xylitol. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(6), 1315-1325.

Avuloğlu-Yilmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D. and Ünal, F. (2017). *Investigating genotoxic effect of sweetener xylitol using sister chromatid exchange test.* 2nd International Gazi Symposium Series. Ankara.

Bastaki, M., Farrell, T., Bhusari, S., Pant, K., & Kulkarni, R. (2017). Lack of genotoxicity *in vivo* for food color additive Tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 278-284.

Basu, A. and Kumar, G. S. (2014). Study on the interaction of the toxic food additive carmoisine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 200-206.

Bencherit, D., Laoues, K., Karboua, I. and Lounis, M. (2023). Survey of harmful dyes in food color additives in Algeria. *Electronic Journal of Medical and Dental Studie*, 13(3), 0106.

Bender, C., Strassmann, S. and Golz, C. (2023). Oral bioavailability and metabolism of hydroxytyrosol from food supplements. *Nutrients*, 15(2), 325.

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

Benkhaya, S., M'rabet, S. and El Harfi, A. (2020). Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*, 6(1), e03271.

Bhattacharjee, M. (2022). Cytotoxic and Mito depressive potential of Sunset Yellow FCF on Chara vulgaris (n= 28). *Ecology, Environment and Conservation Journal*, 28, 64-70.

Bişgin, A. T. (2023). Ion-pair solvent-based liquid–liquid microextraction and spectrophotometric determination of E102, E110, E124, E129 and E133 in confectioneries and beverages. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 20, 1-12.

Blaznik, U., Krušič, S., Hribar, M., Kušar, A., Žmitek, K. and Pravst, I. (2021). Use of food additive titanium dioxide (E171) before the introduction of regulatory restrictions due to concern for genotoxicity. *Foods*, 10(8), 1910.

Bonassi, S., Ceppi, M., Møller, P., Azqueta, A., Milić, M., Neri, M., Brunborg, G., Godschalk, R., Koppen, G. and Collins, A. (2021). DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Scientific Reports*, *11*(1), 16793.

Boncıu, E. (2019). Some observations on the genotoxicity of the yellow food dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Banat's Journal of Biotechnology*, 10(20), 46-50.

Boreiko, C. J. and Rossman, T. G. (2020). Antimony and its compounds: Health impacts related to pulmonary toxicity, cancer, and genotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 403, 115156.

Boriollo, M. F. G., Alves, V. E., Silva, T. A., Silva, J. J., Barros, G. B. S., Dias, C. T. D. S., Höfling, J. F. and Oliveira, N. M. S. (2021). Decrease of the DXR-induced genotoxicity and nongenotoxic effects of Theobroma cacao revealed by micronucleus assay. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 268-277.

Boutillier, S., Fourmentin, S. and Laperche, B. (2022). History of titanium dioxide regulation as a food additive: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, 1017–1033.

Boyko, O. and Brygadyrenko, V. (2021). Nematicidal Activity Of Synthetic Food Colourings. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(6 B), 7743-7749.

Brüschweiler, B. J. and Merlot, C. (2017). Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 214-226.

Cameron, T. P., Hughes, T. J., Kirby, P. E., Fung, V. A. and Dunkel. V. C. (1987). Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK+/- assays. *Mutation Research,* 189, 223-261.

Conway, G. E., Shah, U. K., Llewellyn, S., Cervena, T., Evans, S. J., Al Ali, A. S., Jenkins, G. J., Clift, M. J. D. and Doak, S. H. (2020). Adaptation of the *in vitro* micronucleus assay for genotoxicity testing using 3D liver models supporting longer-term exposure durations. *Mutagenesis*, 35(4), 319-330.

Cordelli, E., Bignami, M. and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68-78.

Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M. and Whelan, K. (2021). Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition reviews*, 79(6), 726-741.

Çelik, H. ve Uysal, H. (2020). Abietik asit ve guaiazulen terpenlerinin "sekonder metabolit" genotoksik potansiyellerinin *in vitro* mikronükleus testi ile belirlenmesi. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 13(2), 1-10.

Çelik, M. (2022). Kardeş Kromatit Değişimi Testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 185-217.

da Cruz Brambilla, C. M. C., Garcia, A. L. H., da Silva, F. R., Taffarel, S. R., Grivicich, I., Picada, J. N. and da Silva, J. (2019). Amido Black 10B a widely used azo dye causes DNA damage in pro-and eukaryotic indicator cells. *Chemosphere*, 217, 430-436.

de Souza, C. S. H., Chapman, J. M., da Silva, T. A., Silva Filho, T. H. N., dos Santos Dias, C. T., Oliveira, N. D. M. S. and Boriollo, M. F. G. (2022). Genotoxic and cytotoxic potential of food azodyes: preclinical safety assessment using the *in vivo* micronucleus assay: Potencial genotóxico e citotóxico de azocorantes alimentícios: avaliação de segurança pré-clínica usando o ensaio do micronúcleo *in vivo*. *Brazilian Journal of Development*, 8(8), 57227-57247.

Dey, S. and Nagababu, B. H. (2022). Applications of food colour and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. *Food Chemistry Advances*, 1, 100019.

Dos Santos, J. R., de Sousa Soares, L., Soares, B. M., de Gomes Farias, M., de Oliveira, V. A., de Sousa, N. A. B., Negreiros, H. A., da Silva, F. C. C., Peron, A. P., Pacheco, A. C. L., Marques, M. M. M., Gonçalves, J. C. R., Montenegro, R. C., Islam, M. T., Sharif-Rad, J., Mubarak, M. S., de Melo Cavalcante, A. A. C. and de Castro e Sousa, J. M. (2022). Cytotoxic and mutagenic effects of the food additive tartrazine on eukaryotic cells. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 23(1), 95.

Durazzo, A., Carocho, M., Heleno, S., Barros, L., Souto, E. B., Santini, A. and Lucarini, M. (2022). Food dyes and health: Literature quantitative research analysis. *Measurement: Food*, 7, 100050.

Durnev, A. D., Oreshchenko, A. V., Kulakova, A. V. and Beresten, N. F. (1995). Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 41, 50-53.

Duydu, Y. (2022). Derivation of a biological limit value (BLV) for inorganic lead based on lead-induced genotoxicity in workers using the benchmark dose approach (BMD). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 69, 126894.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1332.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2013). Statement on Allura Red AC and other sulphonated mono azo dyes authorised as food and feed additives. *EFSA Journal*, 11(6), 3234.

Elder, R. (2022). *Azoreduction: Reductive Metabolism of Azo Food Dyes by Species of the Human Gut Microbiome*. Doctoral dissertation, University of Guelph, Ontario, 88.

El-Desoky, G. E., Wabaidur, S. M., AlOthman, Z. A. and Habila, M. A. (2020). Regulatory role of nano-curcumin against tartrazine-ınduced oxidative stress, apoptosis-related genes expression, and genotoxicity in rats. *Molecules*, 25, 5801.

Evans, H. J., In Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2, 405–424.

Farheen, J., Mansoor, S., & Abid, M. (2021). Geno-toxic appraisal of widely used food color additives on model plant *Allium cepa* root tip cells. *Journal of Innovative Sciences*, 7(1), 174-181.

Feng, J., Cerniglia, C. E. and Chen, H. (2012). Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 4, 568.

Garner, R. C. and Nutman, C. A. (1977). Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutation Research,* 44, 9-19.

George, A., Cherian, A. R., Benny, L., Varghese, A. and Hegde, G. (2023). Surface-engineering of carbon fibre paper electrode through molecular imprinting technique towards electrochemical sensing of food additive in shrimps. *Microchemical Journal*, 184, 108155.

Ghalkhani, M., Zare, N., Karimi, F., Karaman, C., Alizadeh, M. and Vasseghian, Y. (2022). Recent advances in Ponceau dyes monitoring as food colorant substances by electrochemical sensors and developed procedures for their removal from real samples. *Food and Chemical Toxicology*, 112830.

Glavinić, U., Rajković, M., Ristanić, M., Stevanović, J., Vejnović, B., Djelić, N. and Stanimirović, Z. (2023). Genotoxic potential of thymol on honey bee DNA in the comet assay. *Insects*, 14(5), 451.

Göney, G. (2016). Çevre kirliliğinin biyoizlenmesinde balıklarda genotoksisite testleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1, 43-49.

Guerrero-Rubio, M. A., Hernández-García, S., García-Carmona, F. and Gandía-Herrero, F. (2023). Consumption of commonly used artificial food dyes increases activity and oxidative stress in the animal model *Caenorhabditis elegans*. *Food Research International*, 169, 112925.

Gulati, D. K., Witt, K., Anderson, B., Zeiger, E. and Shelby, M. D. (1989). Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. III. Results with 27 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* 13, 133-193.

Halıcı, A., Seyrek, A., Aykan, K., Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (2021). Nanopartiküllerin genotoksik etkileri. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 2(2), 19-38.

Halilčević, D., Dautović, E., Lelić, M., Husejnović, M. Š., Smajlović, A., Srabović, N. and Softić, A. (2022). Cytotoxicity and genotoxicity of sunset yellow and potassium sorbate in jurkat cell line. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 31(2), 1-9.

Han, M., Zhang, Z., Liu, S., Sheng, Y., Waigi, M. G., Hu, X., Qin, C. and Ling, W. (2023). Genotoxicity of organic contaminants in the soil: A review based on bibliometric analysis and methodological progress. *Chemosphere*, 313, 137318.

Haveland-Smith, R. B. and Combes, R. D. (1980). Screening of food dyes for genotoxic activity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(3), 215-221.

Haverić, A., Inajetović, D., Vareškić, A., Hadžić, M. and Haverić, S. (2018). *In vitro* analysis of tartrazine genotoxicity and cytotoxicity. *Genetics & Applications*, 1(1), 37-43.

Hayashi, M., Kishi, M., Sofuni, T. and Ishidate M. (1988). Micronucleus test in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food and Chemical Toxiclogy,* 26 (6), 487-500.

Higelin, J., Demestre, M., Putz, S., Delling, J. P., Jacob, C., Lutz, A. K., Bausinger, J., Huber, A. K., Klingenstein, M., Barbi, G., Speit, G., Huebers, A., Weishaupt, J. H., Hermann, A., Liebau, S., Ludolph, A. C. and Boeckers, T. M. (2016). FUS mislocalization and vulnerability to DNA damage in ALS patients derived hiPSCs and aging motoneurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 290.

Holmannova, D., Borsky, P., Andrys, C., Hamakova, K., Cermakova, E., Poctova, G., Fiala, Z., Smejkalova, J., Blaha, V. and Borska, L. (2022). Chromosomal aberrations and oxidative stress in psoriatic patients with and without metabolic syndrome. *Metabolites*, 12(8), 688.

Hua, L., Cheng, T., Liang, Z. and Wei, T. (2022). Investigation of the mechanism of phytate-modified biochar-catalyzed persulfate degradation of Ponceau 2R. *Biochar*, 4(1), 6.

Hussein, M., Arisha, A., Mahmoud, E. and Abdo, S. (2021). Mir-140 and Mir-34a as molecular markers for apoptotic brain in sunset yellow and carmoisine intoxicated mice. *Zagazig Veterinary Journal*, 49(2), 158-170.

Istifli, E. S., Husunet, M. T., Misirli, R. C. and Ila, H. B. (2020). Genotoxic effects of the artificial food dye green s in human lymphocytes *in vitro* and 3d molecular docking analysis of its interaction with DNA and alpha-beta tubulin subunits. *Fresenius Environ Bull*, 29, 5238-5249.

İla, H. B., Hüsunet, M. T. (2022). Kromozom Anormallikleri Testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 153-184.

Ishidate, M. J., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 623-636.

Jiang, N., Naz, S., Ma, Y., Ullah, Q., Khan, M. Z., Wang, J., Lu, X., Luosang, D. Z., Tabassum, S., Chatand Basang, W. D. (2023). An overview of comet assay application for detecting dna damage in aquatic animals. *Agriculture*, 13(3), 623.

John, A., Luqman, M., Muhammad, S., Hanif, U., Sardar, A. A., Ali, S., Hasnain, A., Tufail, M., Khan, Z. I., Hussain, M. I., Binyameen, Anjum, M. N., Ejaz, A., Chaudhry, M. S., Yang, H. H. and Awan, M. U. F. (2023). Genotoxicity of synthetic food colors on nitrogen-fixing bacteria in agricultural lands irrigated with wastewater of corresponding industries. *Sustainability*, 15(4), 2897.

Kamali, M., Fazlpour, F., Karimi, F., Rezaee, A., Sadri, F. and Hosseini, S. F. (2023). A review of cytotoxic effects of azo dyes on brain-subregion. *Middle East Journal of Rehabilitation and Health Studies*, 10(2), 1-14.

Kargupta, A., Dutta, K., Roychoudhury, D., Rana, S. and Talapatra, S. N. (2022). *In silico* study of pharmacokinetics of synthetic dyes used in foods and drugs. *Journal Of Electronics Information Technology Science And Management,* 12, 8.

Kassa, B. A. (2021). Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of municipal wastewater discharged into the head of Blue Nile River using the *Allium cepa* test. *Scientific African*, 13, e00911.

Khan, I. S., Ali, M. N., Hamid, R. and Ganie, S. A. (2020). Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. *Toxicology Reports*, 7, 370-375.

Kılıçle, P. A. ve Doğan, A. (2020). Akrilamidin *in vivo* genotoksisitesi üzerine fenolik bileşiklerden pelargonidin ve gallik asidin etkileri. *Caucasian Journal Of Science*, 7(1), 9-27.

Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S. and Ceyhun, S. B. (2022). Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations. *Archives of Toxicology*, 96(4), 1089-1099.

Kobylewski, S. and Jacobson, M. F. (2012). Toxicology of food dyes. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, *18*(3), 220-246.

Kornbrust, D. and Barfknecht, T. (1985). Testing of 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the *in vitro* and the *in vivo/in vitro* rat hepatocyte primary culture DNA repair assays. *Environmental Mutagenesis*, *7*(1), 101-120.

Kramer, N. I., Hoffmans, Y., Wu, S., Thiel, A., Thatcher, N., Allen, T. E., Levorato, S., Trayssnig, H., Schulte, S., Boobis, A., Rietjens, I. M. C. M. and Vinken, M. (2019). Characterizing the coverage of critical effects relevant in the safety evaluation of food additives by AOPs. *Archives of Toxicology*, *93*, 2115-2125.

Kucharska, M. and Grabka, J. (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80(3), 1045-1051.

Kumar, G., Pandey, S., Tiwari, N. K. and Pandey, P. (2022). Analysis of genotoxicity ınduced by food dyes in root meristem of *Salvia hispanica* L. *Open Journal of Genetics*, 12(1), 1-10.

Labiod, K., Hazourli, S., Bendaia, M., Tlili, M., AitBara, A., Graine, R and Meradi, H. (2022). Removal of azo dye carmoisine by adsorption process on diatomite. *Adsorption Science & Technology*, 1-17.

Longstaff, E., McGregor, D. B., Harris, W. J., Robertson, J. A. and Poole, A. (1984). A comparison of the predictive values of the Salmonella/microsome mutation and BHK21 cell transformation assays in relation to dyestuffs and similar materials. *Dyes and Pigments*, *5*(1), 65-82.

Lück, H. and Rickerl, E. (1960). Lebensmittelzusatzstoffe und Mutagene Wirkung. VI Mitteilung. Prüfung der in Westdeutschland zugelassenen und ursprünglich vorgeschlagenen Lebensmittelfarbstoffe auf mutagene Wirkung an E. coli. *Z Lebensm Unters Forsch.* 112, 157-174.

Mamur, S., Yuzbasioglu, D., Altok, K., Unal, F. and Deger, S. M. (2019). Determination of genotoxic effects in hemodialysis patients with chronic kidney disease and the role of diabetes mellitus and other biochemical parameters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *844*, 46-53.

Mankan, S. (2020). *Kırmızı ahududu (Rubus idaeus L.)'nun insan kromozomlarında kardeş kromatit değişimi üzerine etkilerinin araştırılması.* Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, 58.

Mantere, T., Neveling, K., Pebrel-Richard, C., Benoist, M., van der Zande, G., Kater-Baats, E., Baatout, I., van Beek, R., Yammine, T., Oorsprong, M., Hsoumi, F., Olde-Weghuis, D., Majdali, W., Wermeulen, S., Pauper, M., Lebbar, A., Stevens-Kroef, M., Sanlaville, D., Dupont, J. M., Smeets, D. and El Khattabi, L. (2021). Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection. *The American Journal of Human Genetics*, 108(8), 1409-1422.

Mirabi, A. and Norouzi, B. (2023). Preparation of Mesoporous Silica Sba-15 Modified by Ctab for Extraction, Preconcentration and Determination of Trace Amounts of Carmoisine in Food Samples. *Preconcentration and Determination of Trace Amounts of Carmoisine in Food Samples*, 1-17.

Mishra, D. (2020). Food colors and associated oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*, 69, 1-14.

Mohammadi, M. A., Ahangari, H., Mousazadeh, S., Hosseini, S. M. and Dufossé L. (2022). Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(1), 1-12.

Momtaz, M., Bubli, S. Y., and Khan, M. S. (2023). Mechanisms and health aspects of food adulteration: A comprehensive review. *Foods*, 12(1), 199.

Montaser, M., Abiya, R. A., Afifi, M., Saddick, S., Allogmani, A. S. and Almaghrabi, O. A. (2018). Effect of natural and synthetic food colorants on spermatogenesis and the expression of its controlling genes. *Veterinary Medicine in-between Health & Econom,* 55, 1-13.

Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S. And Lialiaris, T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.

Munakata, S., Watanabe, T., Takahashi, T., Kimuro, S., Ishimori, K. and Hashizume, T. (2023). Development of a micronucleus test using the EpiAirway™ organotypic human airway model. *Genes and Environment*, 45(1), 14.

Musto, G., Schiano, E., Iannuzzo, F., Tenore, G. C., Novellino, E., and Stornaiuolo, M. (2023). Genotoxicity assessment of nutraceuticals extracted from thinned nectarine (*Prunus persica* L.) and grape seed (*Vitis vinifera* L.) waste biomass. *Foods*, 12(6), 1171.

Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F. and Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as food colorants in food products. *Food Bioscience*, 52, 102403.

Nagaraju, R., Kalahasthi, R., Balachandar, R. and Bagepally, B. S. (2022). Association between lead exposure and DNA damage (genotoxicity): systematic review and meta-analysis. *Archives of Toxicology*, 96(11), 2899-2911.

Nandanwadkar, S. M. and Mastiholimath, V. (2020). A novel USP-HPTLC protocol compliant method for the simultaneous quantification of E-102, E-124, and E-133 azo dyes in consumer goods. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, 33(4), 405-412.

Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V. and Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-22.

Ngo, A. C. R. and Tischler, D. (2022). Microbial degradation of azo dyes: Approaches and prospects for a hazard-free conversion by microorganisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4740.

Ozel, C. A., Unal, F., Avuloglu-Yilmaz, E., Erikel, E., Mirici, S. and Yuzbasioglu, D. (2022). Determination of genotoxic damages of picloram and dicamba with comet assay in *Allium cepa* rooted in tissue culture and distilled water. *Molecular Biology Reports*, 49(12), 11273-11280.

Özgün, D. ve Seylam-Küşümler, A. (2020). Gıda katkı maddelerinin sağlık üzerine etkileri. *Sağlık ve Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(1), 22-26.

Perry, P. and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251 (5471), 156-158.

Qin, Z., Zhang, J., Liu, Y., Wu, J., Li, G., Liu, J. and He, Q. (2020). A simple but efficient voltammetric sensor for simultaneous detection of tartrazine and ponceau 4R based on TiO2/electro-reduced graphene oxide nanocomposite. *Chemosensors*, 8(3), 70.

Rajendran, H., Manoharan, H. and Subbiah, N. K. (2023). Evaluation of DNA damage ın type I diabetic patients by sister chromatid exchange-a case control study. *International Journal of Academic Medicine and Pharmacy*, 5(1), 558-560.

Ramos-Souza, C., Bandoni, D. H., Bragotto, A. P. A. and De Rosso, V. V. (2023). Risk assessment of azo dyes as food additives: Revision and discussion of data gaps toward their improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 380-407.

Raoul, P., Cintoni, M ., Palombaro, M., Basso, M., Rinninella, E., Gasbarrini, A. and Mele, M. C. (2022). Food additives, a key environmental factor in the development of ıbd through gut dysbiosis. *Microorganisms*, 10, 167.

Rashad, S. E., Abdel-Tawab, F. M., Fahmy, E. M., Attalla, A. G., Ahmed, E. S. and Haggran, A. A. (2021). Application of the yeast comet assay in testing some food additives for genotoxicity by comet assay in yeast. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(12), 7649-7667.

Raya, S. A., Aboul-Enein, A. M., El-Nikeety, M. M., Mohamed, R. S., and Abdelwahid, W. M. (2020). *In vivo* comet assay of food additives' combinations and their effects on biochemical parameters in albino rats. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 24, 9170-9183.

Reza, M. S. A., Hasan, M. M., Kamruzzaman, M., Hossain, M. I., Zubair, M. A., Bari, L., ... and Hossain, M. K. (2019). Study of a common azo food dye in mice model: Toxicity reports and its relation to carcinogenicity. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 667-677.

Rodriguez-Garraus, A., Alonso-Jauregui, M., Gil, A. G., Navarro-Blasco, I., López de Cerain, A. and Azqueta, A. (2023). Genotoxicity and toxicity assessment of a formulation containing silver nanoparticles and kaolin: an *in vivo* ıntegrative approach. *Nanomaterials*, 13(1), 3.

Russo, C., Ferk, F., Mišík, M., Ropek, N., Nersesyan, A., Mejri, D., Holzmann, K., Lavorgna, M., Isidori, M. and Knasmüller, S. (2019). Low doses of widely consumed cannabinoids (cannabidiol and cannabidivarin) cause DNA damage and chromosomal aberrations in human-derived cells. *Archives of Toxicology*, 93, 179-188.

Sabeen, M., Mahmood, Q., Bhatti, Z. A., Irshad, M., Bilal, M., Hayat, M. T., ... & Shahid, N. (2020). *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1368-1374.

Salam, M. R., Al-Senosy, N. K., Ebeed, N. M. and Fahmy K. I. (2021). Genotoxic effects and liver toxicity in swiss albino mice males after acute and chronic exposure of diacetyl and butter flavors. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 29(2), 701-713.

Salama, M. S., Ismail, M. A., Shahin, M. A., & Yassin, H. M. (2016). The use of GST-μ gene and ısoenzymes as biomarkers to evaluate the mutagenicity and hepatic carcinogenicity in the mouse by carmoisine 'E122'. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(6), 294-316.

Saloğlu, D. ve Sahin, O. I. (2021). Removal of azo dyes-tartrazine, carmoisine, and Allura Red-from wastewater using Spirulina biomass-immobilized alginate beads: equilibrium, kinetics, thermodynamics, desorption, and reusability. *Desalination and Water Treatment,* 220, 431–445.

Sankaranarayanan, N. and Murthy, M. S. S. (1979). Testing of some permitted food colors for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Research*, 67, 309-314.

Santana, G. M., do Anjos Sousa, J. J. and Peron, A. P. (2015). Action of Ponceau 4R (E-124) food dye on root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(1), 101-106.

Sanz-Serrano, J., Garayoa, R., Vitas, A. I., López de Cerain, A. and Azqueta, A. (2023). *In vitro* genotoxicity assessment of French fries from mass catering companies: a preliminary study. *Mutagenesis*, 38(1), 51-57.

Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., ... and Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119.

Saygılı, Y., Yüzbaşıoğlu, D. ve Ünal, F. (2021). Metal oksit nanopartiküllerin genotoksik etkileri. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33(3), 429-443.

Sen, T., Barrow, C. J. and Deshmukh, S. K. (2019). Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. *Frontiers in Nutrition*, 6, 7.

Sevastre, A. S. and Hodorog, A. D. (2021). Recent investigations on anticancer properties of azo-dyes. *Medico Oncology*, 2(2), 11-25.

Shimada A and Egami N, 1984. Dominant lethal mutations induced by MMS and mitomycin C in the fish *Oryzias latipes*. *Mutation Research,* 125, 221-227.

Siivola, K. K., Burgum, M. J., Suárez-Merino, B., Clift, M. J., Doak, S. H. and Catalán, J. (2022). A systematic quality evaluation and review of nanomaterial genotoxicity studies: a regulatory perspective. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 1-24.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

Soares, B. M., Araújo, T. M. T., Ramos, J. A. B., Pinto, L. C., Khayat, B. M., Bahia, M. D. O., ... & Khayat, A. S. (2015). Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research*, 35(3), 1465-1474.

Sohrabi, Y., Mohammadzadeh-Aghdash, H., Baghbani, E., Dehghan, P. and Dolatabadi, J. E. N. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of ascorbyl palmitate (AP) food additive. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(2), 341.

Soldi, K. C., Londero, J. E. L., Schavinski, C. R. and Schuch, A. P. (2023). Genotoxicity of surface waters in Brazil. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 888, 503638.

Speit, G. and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.

Subramaniyan, N. K., Elumalai, K., Rajangam, J., N Palei, N., Talari, D., Balaji, A. and Surendran, V. (2023). Protective role of *Vernonia cinerea* against the Carmoisine induced brain injury and anxiogenic effect in mice. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 12-24.

Swaroop, V. R., Roy, D. D. and Vijayakumar, T. (2011). Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(2), 128.

Şen, S. (2018). *Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi.* Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.

Topaktaş, M., İstifli, E. S (2022). Kısa Süreli Genotoksisite Testleri ve Genotoksisitede Bilgisayar Destekli *In Silico* Moleküler Kenetlenme ve Moleküler Dinamik Yaklaşımlar. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 1-29.

Toropov, A. A., Toropova, A. P., Raitano, G. and Benfenati, E. (2019). CORAL: Building up QSAR models for the chromosome aberration test. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1101-1106.

Treudler, R. and Simon, J. C. (2022). Anaphylaxis to food additives. *Allergo Journal International*, 31, 141-144.

Turak, F., Dinç, M., Dülger, Ö. and Özgür, M. U. (2014). Four derivative spectrophotometric methods for the simultaneous determination of carmoisine and ponceau 4R in drinks and comparison with high performance liquid chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, 11, 650465.

Turan, E. (2021). *Korilaginin genotoksik ve mitomisin-C'ye karşı antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 68.

Tsuda S, Murakami M, Matsusaka N, Kano K, Taniguchi K and Sasaki YF, (2001). DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicology Science*, 61, 92-99.

Türk Gıda Kodeksi, (2013). Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği; *Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı*. T.C. Resmi Gazete, Sayı: 28693.

Türkoğlu, Ş. (2021). Genotoxic effect of two commonly used textile dyes Reactive Blue 19 and Reactive Black 5 using *Allium cepa* L. as an indicator. *Cumhuriyet Science Journal*, *42*(3), 515-525.

Uzen, R., Bayram, F., Dursun, H., Kardas, F., Altın-Celik, P., Cakir, M., Eken, A., Cucer, N. and Donmez-Altuntas, H. (2023). Oxidative and chromosomal DNA damage in patients with type I Gaucher disease and carriers. *Clinical Biochemistry*, 111, 26-31.

Ünal, F., Saygılı, Y., Akbaş, E. (2022). Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 313-340.

Vaiano, V. and De Marco, I. (2023). Removal of azo dyes from wastewater through heterogeneous photocatalysis and supercriti. *Separations*, 10, 230.

van Gulik, A. L., Sluydts, E., Vervoort, L., Kockx, M., Kortman, P., Ylstra, B., Finn, S. P., Bubendorf, L., Bahce, I., Sie, D., Radonic, T., Lissenberg-Witte, B. and Thunnissen, E. (2023). False positivity in break apart fluorescence *in-situ* hybridization due to polyploidy. *Translational Lung Cancer Research*, 12(4), 676.

Vasileva, P., Stoyanov, I., Chayleva, E., Staykova, T. and Ivanova, E. (2021). *Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of commonly used food additives on the root meristem cells of Allium cepa*. In 5th Balkan Scientific Conference on Biology, 97-109.

Viola, M. and Nosotti, A. (1978). Applicazione del test di Ames su alcuni coloranti. *Bollettino Chimico Farmaceutico,* 117, 402-415.

Vorobey, N., Kukol, K. K., Pukhtaievych, P. and Kots, S. (2021). Influence of carmoisine on the viability of Bradyrhizobium japonicum *in vitro* and physiological indices of soybean under symbiosis conditions. *Journal of Central European Agriculture*, *22*(4), 735-747.

Wu, J., Zhang, Y., Lv, Z., Yu, P. and Shi, W. (2021). Safety evaluation of *Aloe vera* soft capsule in acute, subacute toxicity and genotoxicity study. *PloS one*, *16*(3), 024935.

Xue, Y., Zhao, G., Qiao, L., Lu, J., Yu, B. and Wang, T. (2020). Sequencing shorter cfDNA fragments decreases the false negative rate of non-invasive prenatal testing. *Frontiers in Genetics*, 11, 280.

Yarima, B. L., Lawal, A., Gwaram, N. S. and Abdulkarem, S. (2021). Spectrophotometric estimation of carmoisine as a food colorant in some selected confectionery items consumed in the metropolis of katsina. *Indian Journals of Interdisciplinary Research,* 1(2), 1-10.

Yılmaz-Çetinkaya, A. and Yurtsever, S. (2021). Somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster* used for investigating the genotoxicity of some food additives. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, *5*(1), 65-73.

Yuzbasioglu, D., Dilek, U. K., Erikel, E. and Unal, F. (2023). Antigenotoxic effect of hyperoside against Mitomycin C and hydrogen peroxide-induced genotoxic damage on human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, *90*, 105604.

Yuzbasioglu, D., Enguzel-Alperen, C. and Unal, F. (2018). Investigation of *in vitro* genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, *112*, 235-241.

Yuzbasioglu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1), 53-59.

Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.

Zaifuddin, M., Othman, R. and Hassan, N. M. (2021). E100-E199 Food Additives: The impact of the colorants from Islamic perspectives. *Halal Services and Contemporary Issues*, 1, 1-19.

Zarrin, R. and Sabzi, R. E. (2022). Ultrasensitive voltammetric measurement of Ponceau 4R using gold nanoparticles loaded on reduced graphene oxide on screen-printed electrode. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 19(7), 2973-2982.

Zhanataev, A. K., Anisina, E. A., Kulakova, A. V., Shilovskiy, I. P., Lisitsyn, A. A., Koloskova, O. O., Khaitov, M. R. and Durnev, A. D. (2020). Genotoxicity of cationic lipopeptide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 328, 1-6.

Zhang, Y., Liang, G., Tang, L., Li, D., Zhan, J., Song, D., Kelly, T., Xu, H. and Chen, Z. (2023). Tunable optical nonlinearity and self-collimation of light in food dye solutions. *Optics Communications*, *528*, 129010.

Zhou, X., Qiao K., Wu H. and Zhang Y. (2023). The impact of food additives on the abundance and composition of gut microbiota. *Molecules*, 28, 631.

Zor, M. and Aslan, E. L. (2020). Assessment of *in vitro* antigenotoxic effect of *Nigella sativa* oil. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1): 115-18.



Gazili olmak ayrıcalıktır