

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rima ÇELİK

**4-METİLİMİDAZOL' UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
IN VITRO GENOTOKSİK ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**4-METİLİMİDAZOL' UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
IN VITRO ZGENOTOKSİK ETKİLERİ**

Rima ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 19/08/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI Doç.Dr.Ahmet KAYRALDIZ
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof.Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013YL5**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

4-METİLİMİDAZOL' UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
IN VITRO GENOTOKSİK ETKİLERİ

Rima ÇELİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışma : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Yıl: 2013, Sayfa: 93

Jüri : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

: Doç.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışma, bir gıda renklendiricisi olan 4-Metilimidazol' un (4MEI) insanlar için genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını, insan periferal kan lenfositlerinde in vitro kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile belirlemek amacıyla yürütülmüştür. İnsan periferal lenfositleri 24 ve 48 saat boyunca 300, 450, 600, 750 µg/ml 4-Metilimidazol ile muamele edilmiştir.

4-Metilimidazol, insan periferal kan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik muamelede KKD' yi uyarmıştır. 24 saatlik muamelede en yüksek iki konsantrasyonda (600 ve 750µg/ml) ve 48 saatlik muamelede ise tüm konsantrasyonlarda KKD' yi arttırmış ve bu artış 48 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı olmuştur. Ayrıca 4-Metilimidazol KA' y 24 ve 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda uyarmıştır. KA' daki artış tüm konsantrasyonlarda olmakla beraber 48 saatlik muamelenin en yüksek konsantrasyondaki artış (750 µg/ml) MMC' deki (Pozitif Kontrol) kadar olmuştur. 4-Metilimidazol 24 saatlik muamelede sadece en yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik muamelede ise tüm konsantrasyonlarında MN oluşumunu uyarmıştır. Ayrıca 4-Metilimidazol 24 saatlik muamelede en yüksek iki konsantrasyonda ve 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda PI' nin önemli derecede düşmesine neden olmuştur. Bu düşüş 750µg/ml konsantrasyonda MMC' den daha fazla olmuştur. 24 saatlik muamelede en düşük konsantrasyon hariç ve 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda test maddesi MI' nin düşmesine yol açmıştır. Ayrıca 4-Metilimidazol, Nukleus Bölünmesini (NBI) 24 ve 48 saatlik muamelede kontrole nazaran önemli ölçüde düşürmüştür. Bu düşüş 24 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı durum göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 4-Metilimidazol(4-MEI), İnsan Periferal Kan Lenfositleri, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Anormalliği, Mikronukleus (MN)

ABSTRACT

MSc THESIS

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF 4-METHYLIMIDAZOL ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Rima ÇELİK

**ÇUKUROVA UNIVERSTY
INSTITUTE OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTA Ş

Year: 2013, Pages: 93

Jury : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTA Ş

: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZO ĞULLARI

: Assoc. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

The aim of the present study was to investigate the genotoxic effects of 4-Methylimidazole (4MEI), on human peripheral lymphocytes by using sister chromatid exchange (SCE), chromosomal aberration (CA) and micronucleus (MN) tests. Cells were treated with 300, 450, 600, 750 µg/ml 4-Methylimidazole for 24 and 48 hours periods.

4-Methylimidazole induced SCEs when compared to control for 24-h and 48-h treatment periods in human peripheral blood lymphocytes. 4-Methylimidazole increased SCEs in highest two concentrations (600 and 750µg/ml) of 24-h treatment period and in all concentrations of 48-h treatment period and that increase depended on the concentration of 48-h treatment. Also 4-Methylimidazole induced CA all concentrations for 24 and 48 hours treatment periods. At the same time, the highest concentration (750µg/ml) induced 4-Methylimidazole CA as much as the positive control. 4-Methylimidazole induced MN formation in only highest two concentrations of 24-h treatment and in all concentrations of 48-h treatment. Additionally, 4-Methylimidazole significantly decreased PI in two highest concentrations for 24h and in all concentrations of 48-h treatment. Decreasing in highest concentrations (750µg/ml) occurred as much as positive control. All concentrations of 24-h (except for the lowest concentration) and 48-h decreased MI. Also, 4-MEI decreased NDI in all concentrations 24 and 48 h treatment periods. This decrease dependent on concentrations in 24 h treatment period.

Key words: 4-Methylimidazole (4-MEI), Human Periferal Lymphocytes, Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosome Aberration (CA), Micronucleus (MN)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında her konuda çok büyük yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof.Dr. Hasan Basri İLA' ya, Uzman Biyolog Mehmet BÜYÜKLEYLA' ya, Uzman Biyolog Mehmet ARSLAN' a, Uzman Biyolog Erman Salih İSTİFLİ' ye, Uzman Biyolog Tuba DÖRDÜ' ye, Uzman Biyolog Mostafa NOORZADEH TAZEKAND' a, Uzman Biyolog Nadire SEVİNDİK' e, Biyolog Saeid SADİGHAZADI' ye, Biyolog Esra ÖZDEMİR' e, Biyolog Orkideh HAJPOOR' a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşım Biyolog Taygun TİMOÇİN' e de ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve her koşulda yanımda yer alan sevgili annem Leyla ÇELİK' e, sevgili babam Ahmet ÇELİK' e ve kardşim Dina ÇELİK' e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yöneticilerine de teşekkür ederim (Proje no: FEF2013YL5).

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Doğal Renklendiriciler İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	9
2.1.1. Annatto ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	9
2.1.2. Antosiyaninler ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	10
2.1.3. Beta karoten ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	11
2.1.4. Demir oksit ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite Çalışmaları.....	12
2.1.5. Gümüş ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	13
2.1.6. Karamel ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	14
2.1.7. Klorofil ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları..	17
2.1.8. Kurkumin ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	17
2.1.9. Likopen ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	18
2.1.10. Titanyum ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	19
2.2. Sentetik Renklendiriciler ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	19
2.2.1. Azo boyalar ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları.....	19

3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Gıda Renklendiricilerinin Sınıflandırılması.....	23
3.1.1. Doğal Renklendiriciler.....	23
3.1.2. Sentetik Renklendiriciler.....	25
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.2.1. 4-Metilimidazol (4-MEI)' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	26
3.2.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma).....	27
3.2.3. Cytochalasin B (Sigma).....	27
3.2.4. Entellan (Merck).....	28
3.2.5. Fiksatif.....	28
3.2.6. Giemsa (Merck).....	28
3.2.7. Hipotonik Eriyik.....	29
3.2.8. Kolkisin (Kolşisin) (Sigma).....	29
3.2.9. Kromozom Medyumu.....	30
3.2.10. Mitomycin C (MMC) (Sigma).....	30
3.2.11. Nitrik Asit (HNO ₃).....	31
3.2.12. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	31
3.2.13. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyi ği.....	31
3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	32
3.3.1. Flow Kabin (Steril Kabin).....	32
3.3.2. Hassas Terazi.....	32
3.3.3. İnkübatör.....	32
3.3.4. Mikroskop.....	32
3.3.5. pH Metre.....	32
3.3.6. Santrifüj.....	33
3.3.7. Su Banyosu.....	33
3.4. Lamaların Temizlenmesi.....	33
3.5. Sterilizasyon.....	33
3.5.1. BrdUrd ve Test Maddesi Eriyi ğinin Sterilizasyonu.....	33
3.5.2. Saf suyun Sterilizasyonu.....	34

3.6. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme.....	34
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	34
3.6.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	36
3.6.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	37
3.6.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması.....	37
3.6.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması.....	37
3.6.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi(PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması.....	38
3.6.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	43
3.6.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....	43
3.6.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	44
3.7. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	44
3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	44
3.7.2. Preparatların Boyanması.....	45
3.7.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	46
3.7.3.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	46
3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	49
3.9. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. Bulgular.....	51

4.1.1. 4-Metilimidazol' un İnsan Periferel Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri.....	51
4.1.1.1. 4-Metilimidazol' un Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri.....	51
4.1.1.2. 4-Metilimidazol' un Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	54
4.1.1.3. 4-Metilimidazol' un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	61
4.1.1.4. 4-Metilimidazol' un Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	63
4.2. Tartışma.....	68
4.2.1. 4-Metilimidazol' un İnsan Periferel Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Aberasyon (KA) Üzerindeki Etkisi.....	68
4.2.2. 4-Metilimidazol' un Mikronukleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri.....	71
4.2.3. 4-Metilimidazol' un Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLERİ.....	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

- Çizelge 4.1. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı.....54
- Çizelge 4.2. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre58
- Çizelge 4.3. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Proliferasyon İndeksi (PI) ve Mitotik İndeksi (MI).....65
- Çizelge 4.4. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde MN' lu Nükleüsçeren İki Nükleuslu Hücre %' si, MN %' si ve NBI68

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

- Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit,1990).....40
- Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)' in kimyasal yapıları.....41
- Şekil 3.3. BrdUrd' nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985; Topaktaş ve Speit, 1990' dan.....43
- Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları. (X1000).....44
- Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....44
- Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları .(X1000).....45
- Şekil 3.7. Bir nukleuslu hücre .(X1000).....49
- Şekil 3.8. İki nukleuslu hücre .(X1000)..... 50
- Şekil 3.9. Üç nukleuslu hücre .(X1000)..... 50
- Şekil 3.10. Dört nukleuslu hücre .(X1000).....51
- Şekil 4.1. KKD uyarılmış hücre (14 KKD) (450µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♀).(X1000)..... 55
- Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre' nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,019).....55
- Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre' nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,011).....56
- Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele

edilen insan periferal lenfositlerinde AH%’ sinin konsantrasyona bęli artışıını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı(P=0,007)	59
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KA/Hücre’ nin konsantrasyona bęli artışıını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,011).....	59
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (300µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000)	60
Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (600µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000)	60
Şekil 4.8. Kromatid kırıkları (B'), kromozom kırıkları (B') ve fragmentler (F) bulunan metafaz plağı (750µg/ml 4-Metilimidazol, 48 saatlik muamele, ♂).(X1000).....	61
Şekil 4.9. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (750 µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♀). (X1000).....	61
Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (450 µg/ml 4-Metilimidazol,24 saatlik muamele, ♂). (X1000).....	62
Şekil 4.11. Poliploid hücre kromozomları (450 µg/ml 4-Metilimidazol,24 saatlik muamele, ♂).(X1000).....	62
Şekil 4.12. Kontraksiyonlu kromozoma sahip metafaz plağı (450 µg/ml 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele, ♀).(X1000).....	63
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde PI konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,048).....	66
Şekil 4.14. Tek mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (600 µg/ml, 4-Metilimidazol 48 saatlik muamele, ♂).(X1000).....	69
Şekil 4.15. İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (750 µg/ml, 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele,♀).(X1000).....	69
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI konsantrasyonlarda bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı(P=0,026).....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-MEI	: 4-Metilimidazol
ADI	: Acceptable Daily Intake (Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı)
AH	: Anormal Hücre
B'	: Kromatid Kırığı
B' '	: Kromozom Kırığı
BrdUrd	: 5' -Bromo-2' -Deoxyuridine
CA	: Chromosome Aberration
CE	: Chromatid Exchange
Chl	: Classical Hodgkin Lymphoma
CHO	: Chinese Hamster Ovary
Cyt-B	: Cytochalasin-B
DEN	: N-nitrosodiethylamine
DMH	: 1,2-dimetilhidrazin
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DS	: Disentrik Kromozom
dT	: Deoksitimidin
dU	: Deoxyuridine
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
F	: Fragment
FD&C	: Federal Food, Drug, and Cosmetic (Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik)
FDA	: Fluorescein Diacetate
HNO ₃	: Nitrik asit
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA	: Kromozomal Anormallikleri
KCl	: Potasyum klorür
KD	: Kromatid Değişimi
KKB	: Kardeş Kromatid Bileşimi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi

MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MI	: Mitotik indeks
MMC	: Mitomycin C
MMP	: Metal Proteinaz
MN	: Mikronükleus
MNNG	: N-methyl-N' -nitro-N-nitrosoguanidine
MNPE	: Mikronukleuslu polikromatik eritrosit
mRNA	: Messenger RNA
MTT	: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
NaCl	: Sodyum klorür
NTP	: National Toxicology Program (Ulusal Toksikoloji Programı)
P	: Poliploidi
ppm	: Parts Per Million
PC12	: Pheochromocytoma Cells
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PI	: Proliferasyon İndeksi
PK	: Pozitif Kontrol
r	: Korelasyon katsayısı
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Rotation Per Minute (devir/dakika)
SCD	: Sister Chromatid Differentiation (Kardeş Kromatidlerin Farklılaşması)
SCE	: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SSC	: Standart Saline Citrate
T	: Translokasyon
TiO ₂	: Titanyumdioksit
UV	: Ultraviyole
UV-A	: Ultraviyole-A
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Gelişen gıda sanayisi ve nüfusun artmasıyla beraber gıdaları büyük hacimde üretmek ve uzun süre dayanıklı kalmasını sağlama ihtiyacı, gıda katkı maddelerinin yaşamımızın birçok alanına girmesine yol açmıştır. Beslenme alışkanlıklarının değişmesi, en başında çalışanların sayısının gün geçtikçe artması ve bunun paralelinde de besin hazırlama için zaman kısıtlamasına gidilmesi, insanların katkı maddeleri içeren hazır gıdalarla beslenmesine neden olmaktadır.

Gıda katkı maddelerinin yiyeceklerde kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Gıda biliminin ve teknolojinin olmadığı dönemde dahi gıdaların tat-koku ve görünüşlerini çekici hale getirmek ve uzun süre saklamak için katkı maddelerinden yararlanılmıştır. Tuz, odun tütsüsü ve baharatlar insanoğlunun kullandığı ilk doğal katkı maddeleri ve gıdalarda bozulmayı önleyen ilk yöntemlerdir. Günümüzden 3000 yıl önceki insanlar etleri tuzlayarak bozulmalarını önlemiş ve dayanıklılığını arttırmıştır. Tarihi kaynaklarda Orta Asya’ da yaşayan Türkler’ in kışa hazırlık olarak çeşitli şekilde tuzlanmış, kurutulmuş ve dumanlanmış et ürünleri yaptıkları belirtilmektedir. Günümüzdeki teknik sistemlerin olmadığı zamanlarda tuz ve baharat kullanılarak et, balık, sebze ve tereyağı gibi gıdalar belli bir süre bozulmadan muhafaza edilmiştir. Gıdalarda koruyucu olarak kullanılan tuz, sirke ve tütsü aynı zamanda lezzete de katkı sağlamıştır.

Gıdaların kullanımını artıran bir yöntem de onların görüntüsü ve rengidir. 1956 yılında Dünya Sağlık Örgütü 40 ülkeyi kapsayan, 50 doğal ve 114 yapay renk maddesini içeren listeyi yayınlayarak gıdalarda kullanımına izin vermiştir.

Doğal gıdaların renkleri içerdikleri çeşitli kimyasal formlara sahip olan ve pigment olarak adlandırılan maddelerden kaynaklanmaktadır. Renklendiriciler Tebliği’ ne göre gıdalarda kullanılan renk maddelerinin tanımı şu şekildedir: Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdalarda ana bileşen olarak kullanılmayan gıdaya renk artırıcı veya renk düzenleyici olarak katılan maddelerdir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi’ nin tanımına göre ise renk maddeleri, sebze, hayvan, mineral veya diğer kaynaklardan sentez veya benzer bir yolla elde edilen, ekstrakte olunan,

izolasyonu sağlanan ya da başka türlü çıkarılan, gıdalara ilave edildiğinde söz konusu rengin özelliklerini gösteren herhangi bir boya, pigment ve diğer maddelerdir. Bu tanımdan da anlaşılacağı gibi, renk maddeleri elde edildikleri kaynaklar, kimyasal yapıları ve gıdalara verdikleri renkler açısından büyük oranda farklılıklar göstermektedir. Renk maddeleri gıdaların tatlarını değiştirmeden görüntüsünü cazip hale getirirler. Bir gıdaya bakıldığında insanın dikkatini çeken ilk özelliği rengidir. Dolayısıyla gıdaları çekici hale getiren renk maddeleri, tüketicilerin bir gıdayı alırken karar vermesinde önemli bir faktördür.

Renk maddelerinin kodlanması E 100' den başlayıp E 181' de biter. Gıda endüstrisinde kullanılan renk maddeleri sentetik, bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilirler. Renk maddelerinin en çok kullanıldığı gıdalar alkolsüz içecekler, şekerlemeler, pastalar, süsleme kremalar, dondurmalar, meyvalı yoğurt, margarin, unlu mamüller, yoğurtlu içecekler, sakız ve kahvaltılık çerez gibi ürünlerdir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1956 yılında kullanımına izin verilen 164 renk maddesinden birçoğu kullanımdan kaldırılmıştır. Bu yıldan günümüze kadar geçen zamanda alerjik ve kanserojen oldukları iddiasıyla bazı sentetik renk maddelerinin kullanımı yasaklanarak renk maddelerinin sayısı azaltılmıştır. Sentetik renk maddelerine karşı tüketicilerden gelen tepkiler nedeniyle doğal renk maddelerinin kullanımında bir artış gözlenmektedir.

Renk maddelerinden bazıları vücutta sindirilemezler. Gıda renk maddesi olarak şekerlemelerin dış kaplamalarında ve çikolataların süslemelerinde kullanılan altın (E175) ve gümüş (E174) sindirim sisteminden parçalanmadan barsaklardan atılmaktadır.

Renk maddeleri gıda sanayinde çok yaygın olarak, çoğu kez de bilgisizce kullanılan katkı maddeleridir. Ancak, renk katkılarının kullanılması ile ilgili pek çok sorun, modern üretim ekipmanlarının kullanılması ve su ile ilgili özel işlemler sayesinde belli ölçüde çözümlenmiştir. Alkolsüz içecek endüstrisinde renk maddeleri kullanımı oldukça yaygındır. Gazlı içeceklerde askorbik asit; vitamin aktivitesi ve aromanın korunması açısından kullanılması zorunlu katkı maddesidir. Ancak askorbik asit kullanıldığı zaman renk katkısı olarak, özellikle sertifikasız renk

maddelerinin kullanılması gerekmektedir. Meyva aromalı içeceklerde, kola ve kök birasında renk maddesi olarak karamel kullanılmaktadır (Altuğ, 2006).

Gıdalarda kullanılan boyalar doğal ve sentetik boyalar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Çalışmamızda test maddesi olarak kullandığımız 4-Metilimidazol doğal boyalardan karameller grubuna girmektedir.

Gelişen teknolojiyle birlikte piyasadaki gıda firmaları arasındaki rekabet de gün geçtikçe artmakta ve bu firmalar her gün tüketicinin beğenisine sunmak için albenisi yüksek ürünler çıkartmak zorunda kalmaktadırlar. Besin alışkanlıklarımızın büyük bir kısmını kaplayan bu ürünlerdeki birçok gıda katkı maddesinin arasında yer alan renklendiriciler de hâkimdir.

Gıda boyalarıyla ilgili birçok çalışma yapılmış ve özellikle sentetik gıda boyaları başta olmak üzere birçoğunun kullanılması yasaklanmıştır. Gıda boyalarının bilinen en sık görülen yan etkileri çocuklarda hiperaktivite, kurdeşen, deri döküntüleri, bulantı, kusma, yüksek tansiyondur.

Hayatımızın bu kadar içine girmiş olan gıda boyalarına araştırmacılar kayıtsız kalmamışlar ve bu maddelerle ilgili birçok araştırma yapmışlardır.

Gaunt ve ark. (1977) open-pan ve close-pan amonyak yöntemiyle yapılmış karameli sıçanlara %4 , %8, %16 oranlarında vermişlerdir. Araştırma sonucunda bütün dozlarda lenfositopeni (kandaki lenfosit sayısının azalması) gözlenmiş, yüksek olan iki dozda da timüs ve dalak ağırlıklarında azalma olduğu bildirilmiştir. Karaciğer ve böbrek ağırlığında artma olmuştur.

Maekawa ve ark. (1982) amonyaklı karamelin (4-MEI) F344 sıçanlarında bu maddenin kanserojenik olmadığını bildirmişlerdir.

Hagiwara ve ark. (1983) karamellerin farelerde kanserojenik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Adams ve ark. (1992) karamellerin genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmak için kısa süreli genotoksisite testlerini (MN ve Ames testi) kullanmışlardır. Çalışmalarında, *Salmonella typhimurium* suşları (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) kullanılmış ve karamelin genotoksik etkisinin

olmadığını saptamışlardır. Fare mikronukleus testi ile de herhangi bir genotoksik etki belirlenmemiştir.

Allen ve ark. (1992) *Salmonella typhimurium* suşları (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100) ile yaptıkları Ames testinde karamellerin 4 grubunun genotoksitesini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda karamellerin I. (sade karamel) ve III. (amonyum karamel) grubun genotoksik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada CHO (Chinese Hamster Ovarium) larda ise karamelin kromozom aberasyonunu indükleyici etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Brusick ve ark.(1992) karamellerin genotoksitesini değerlendirmek için kısa zamanlı genotoksisite testlerinden Ames testini kullanmışlar ve *Salmonella* m 5 standart suşunda (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100) herhangi genotoksik etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Stoner ve ark. (1997), Millard reaksiyonu ile şekerlerden elde edilen karamellerle yapılan bir başka çalışmada bu reaksiyon sırasında çıkan ürünlerin *Salmonella* suşlarında genotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Price ve ark. (2006) Amerika' da kullanılması onaylanan azo boya grubu içerisinde yer alan 8 gıda boyasının (blue 1, blue 2, yellow 1, yellow 5, yellow 6, red 3, green 3) farelerde in vivo olarak kanserojenitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Fisher fare embriyolarında bazı boyaların (blue 1, red 3, yellow 5) habis oluşumu uyardığı ve ölümlere yol açtığı görülmüştür. Boya kombinasyonlarında ise tümör oluşumu ve fare ölümleri artmıştır. Çalışmanın sonucuna göre bu gıda boyalarının kanserojen olduğu açıklanmıştır.

EFSA' nın 2011 yılındaki çalışmasında karamellerin bütün sınıfları (I, II, III, IV) incelenmiştir. III. grubun immün sistemde toksik olduğu, öte yandan diğerlerinin böyle bir etkiye sahip olmadığı açıklanmıştır Ancak I. ve IV. (amonyum-sülfid karamel) grubun yüksek dozda genotoksik olduğu da ortaya çıkmıştır (<http://www.foodnavigator.com/Legislation/EFSA-establishes-new-ADIs-for-caramel-colours>).

Kromozom mutasyonları ile ilgili genetik değişimler birçok insan genetik hastalıklarının sebebidir. Somatik hücrelerin onkogen ya da tümör süpressör

genlerinde değişmelere sebep olan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda ve deney hayvanlarında kanserin uyarılmasında rol oynadığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (OECD TG 473, 1997).

Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığını belirlemede kullanılan metotlar; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994) ve mikronükleus (MN) (Heddle ve ark., 1991, Fenech, 2002) testleridir.

Mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biri, periferal kan lenfositlerindeki kromozom anormalliği (KA) frekansının değerlendirilmesidir (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark. 1994). Kromozom anormallikleri DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin, kromozom kırıkları DNA' daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi de, DNA' daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabilir (Savage, 1993). KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve ark., 2000; Bonassi ve ark. 2000; 2004; 2005; 2007). Yüksek KA frekansı (gap hariç), KA artışını başlatan sebebe bakmaksızın yüksek kanser riski olduğunu önceden gösterebilir. Hem kromatid tipi hem de kromozom tipi KA' lar kanser riskinin göstergesidir. Fakat kromozom tipi KA' lerinin kromatid tipi KA' lerine göre daha iyi bir belirleyici olduğuna dair kanıtlar vardır (Norppa, 2004; Norppa ve ark. 2006; Boffetta ve ark. 2006).

Genotoksik riski belirlemede kullanılan diğer yöntemlerden biri, periferal kan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansının belirlenmesidir (Tucker ve ark. 1993). Kardeş kromatid değişimleri, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (Sonoda ve

ark. 1999; Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı bulunmuştur (Perr ve Evans, 1975; Albertini ve ark. 2000). Ayrıca, tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu da saptanmıştır (Carrano ve ark, 1978). Benzer bir ilişkinin KKD' nin artışıyla in vivo tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. KA' nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark. 2006).

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik metodlardan bir diğeri ise mikronukleus (MN) testidir (Heddle ve ark. 1991; Fenech, 2002). Bonassi ve ark. (2007)' na göre periferik kan lenfositlerindeki yüksek MN frekansı insanlarda kanser riskini göstermektedir. Periferik kan lenfositlerinde kromozom hasarının göstergesi olarak MN' un kullanılması ilk kez 1976 yılında Contryman ve Heddle tarafından öne sürülmüştür (Bonassi ve ark. 2001). Daha sonra sitokinez-bloklama mikronukleus metodunun Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilmesiyle, nukleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki MN' lar incelenmeye başlanmıştır. MN asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş nukleusun dışında rastlanan küçük nukleuslardır (Surrallés ve ark. 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılabilmesi (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğiplikçiklerinde, sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark. 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark. 1997; Norppa ve Falck, 2003). Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Cheng ve ark. 1996; Duffaud ve ark.

1997). Ayrıca, Fenech ve ark. (1999)'ün, uluslararası işbirliği ile yaptıkları insan mikronukleus projesindeki bulguları, MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemiştir.

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 4-Metilimidazol ile yapılan çalışmaları şu şekilde özetleyebiliriz.

Tuormaa (1995), 4-metilimidazol'ü kullanarak sıçan, fare ve tavşanlar ile araştırma yapmıştır. Çalışılan bu hayvanlardan sıçan ve farelerde beyaz kan hücrelerinde ve lenfositlerinde olumsuz derece de düşüşler gözlenmiş, ayrıca tavşanlarda da düşük konsantrasyonlar da dahil B6 vitaminin emilimini inhibe edildiği belirlenmiştir.

Chan ve ark. (2006) da dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada erkek sıçanlara 0, 625, 1250, 2500 ppm; dişilere ise 0, 1250, 2500, 5000 ppm 4-metilimidazol vermişlerdir (106 hafta). Bu çalışmada en yüksek doz verilen dişi sıçanlarda heyecanlanma, hiperaktivite ve yürüyüşte bozukluklar gözlenmiştir. Yine bu dişilerde mononükleer lösemili hücre görülme sıklığı kontrol grubuna nazaran artmıştır. Chan ve ark. (2008)'ına göre 4-metilimidazol'ün erkek ve dişi sıçanlarda alveolar/bronşiyal adenom veya karsinom için indükleyici olabileceğini ve dişi sıçanlarda mononükleer lösemi hücrelerin meydana gelmesine neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Görüldüğü gibi gıda renklendiricisi olarak kullanılan ve karamel renklendiriciler grubuna giren 4-Metilimidazol'un genotoksik olup olmadığını belirlemeye yönelik araştırmalar daha önce yapılmamıştır. İşte bu çalışmanın amacı doğal renklendirici olarak kullanılan 4-Metilimidazol (4-MEI) 'un insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmak ve bu testler yardımı ile insanlar için herhangi bir genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan ve bir gıda renklendiricisi olan 4-Metilimidazol doğal renklendiriciler grubuna girmektedir (ALTUĞ, 2006). Gıda renklendiricileri doğal renklendiriciler ve sentetik renklendiriciler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu iki gruba ait renklendiriciler ile yapılan genotoksisite, kanserojenite ve sitotoksisite çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

2.1. Doğal Renklendiriciler İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Swaroop ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada sentetik gıda boyalarının (Eritrozin, Tartrazin, Ponceau 4R, Sunset Yellow FCF, Brilliant Blue FCF, Fast Green FCF, Karmozin, Indigo Karmin) insan lenfositlerinde sitokinez bloklayıcı mikronükleus (CBMN= Cytokinesis Block Micronucleus) tekniği ile genotoksik etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Sentetik boya içeren grupların kontrol grubuna nazaran genotoksik olduğu saptanmış ve gıda boyası kullanımında ADI (Acceptable Daily Intake=Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) değerinin baz alınmasının altı çizilmiştir.

2.1.1. Annatto ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Annatto, Bixa orellana adı verilen Brezilya' da yetişen bir ağaçtan elde edilir. Gıdalarda kırmızı renk vermek için kullanılır. Latin Amerika ve Karayip dolaylarında fazlasıyla kullanılan annatto kahvaltılık tahıllarda, çerez, balık, tereyağı, margarin, krema tozunda da renklendirici olarak kullanılır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Annatto>).

Hagiwara ve ark. (2003), de yapmış oldukları çalışmada F344/DuCrj erkek sıçanlara N-nitrosodiethylamine (DEN)' i (200 mg/kg/gün) intraperitoneal yoldan vermişler ve DEN' in sıçanlarda karaciğer kanseri yaptığını tespit etmişlerdir. Daha

sonra bu kanserli sıçanlara annatto ekstraktı (%0, %0.03, %0.1, %0.3) vermişlerdir. Çalışmada medium-term bioassay sistem tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre DEN' in sıçanlarda neden olduğu kanserojeniteyi annatto ekstraktının en yüksek dozu (%0.3) düşürmüştür.

Agnera ve ark. (2004), annattonun kanserojenik etkiyi azaltıp azalmadığını araştırmışlardır. Wistar sıçan karaciğerlerinde N-nitrosodiethylamine (DEN) (200 mg/kg vücut ağırlığı)' m neden olduğu DNA hasarları comet tekniği ile saptanmış, ayrıca sıçan karaciğer medium-term testinde kanserojenitesi ve antikanserojenitesi araştırılmıştır. Çalışma için 20, 200, 1000 ppm dozlarını kullanmış ve en yüksek dozda annattonun antigenotoksik ve antikanserojenik olduğu ortaya çıkmıştır.

Antunes ve ark. (2005) çalışmalarında içerisinde Annatto maddesi içeren Bixa orellana L. ekstraktının insan lenfositlerinde klastojenik ve cisplatinin klastojenik etkisine karşı antiklastojenik etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonuçlarına göre ekstraktın bütün konsantrasyonlarında (1, 2.5, 5, or 10 µg/mL) cisplatinin neden olduğu aberasyonlu metafazları düşürmüştür.

Santos ve ark. (2012), içerisinde annatto maddesi olan Bixa orella L. ekstraktının sitoksisitesini, mutajenitesini ve genotoksisitesini bir antikanser ilacı olan cisplatine karşı antigenotoksisite olup olmadığını araştırmışlardır. Sitotoksisite için PC12 (sıçanlarda adrenal medulladaki feokromositomalar) hücre hattında MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) tekniği, genotoksisite için ise mikronukleus testi ve comet testi kullanılmıştır. Sonuç olarak annatto ekstraktının, sitotoksik olmadığı ve PC12 hücrelerinde cisplatinin neden olduğu DNA hasarını düşürdüğü ve mikronukleus oluşumunu uyarmadığı saptanmıştır.

2.1.2. Antosiyaninler ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Antosiyaninlerin ticari kaynağı üzüm kabuğu ve suyudur. Kırmızı yaban mersini, ahududu suyundan elde edilen konsantrelerde boya olarak kullanılmaktadır. (<http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF7EE1F1486EE5030EBFA78F5AB8E93754>)

Gasiorowski ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada *Aronia melanocarpa*'dan izole ettikleri antosiyaninlerin benzo(a)pyrene and 2-amino fluorene karşı antimutajenik etkilerini Ames testi ve in vitro olarak insan lenfositlerinde KKD testi ile araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucuna göre antosiyaninlerin antimutajenik olduğu bildirilmiştir.

2.1.3. Beta karoten ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Gıda ve içecek sektörlerinde yoğun olarak kullanılan ve E160a kodu ile tanımlanan beta karoten, karotenlerin en çok bilinen çeşitlerinden biridir. Beta karotenin gıda sektöründe ciddi bir yeri vardır. Uygulama alanlarından bazıları şunlardır: Eritme peynirleri, sirke, tuzlu su (salamura) ve yağda sebzeler, kahvaltılık tahıllar, reçeller, jöleler, marmelatlar, meyve preparatları, sosis, salam, şekerlemeler, içecekler, distile alkollü içkiler, meyve şarapları, aromalandırılmış şaraplar, soslar, salata sosları, turşu çeşitleri, çerezler ve unlu mamuller.

Biacchi-Santmaria ve ark. (1993), yapmış oldukları çalışmada bitki ekstraktlarından elde edilen beta karotenin ve kantaksantin *Salmonella typhimurium* TA102 suşlarının oksidatif mutajenleri olan 8-metoksiporalen ve benzo(a)pirene karşı antimutajenik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda Beta karotenin ve kantaksantin antimutajenik olmadığı saptanmıştır.

Offord ve ark. (2002), beta karotende dahil olmak üzere birçok antioksidanın UV ışığına maruz kalan insanların fibroblastlarında oksijen radikallerinin oluşumuna karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Beta karoten ve likopen kullanıldığı zaman UV-A ile indüklenen MMP (metal proteinaz) mRNA' s yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre beta karotenin koruyucu bir görevinin olmadığı ileri sürülmüştür.

Alija ve ark. (2003) sıçan hepatositlerinde Beta karoten' in (0.1, 1, 10µM) genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada KKD tekniği kullanılarak kromozom aberasyonları değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre Beta karoten maddesinin genotoksik olmadığı bildirilmiştir.

El-Makawy ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada Beta karotenin erkek ve dişi sıçanlarda MNPE (mikronukleuslu polikromatidli eritrosit) oluşumunu artırıp artırmadığını araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda Beta karotenin genotoksik olmadığını saptamışlardır.

Muzandu ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada comet tekniğinden yararlanılarak Çin hamsterlarının karaciğer fibroblastlarında katekol-estrogenin neden olduğu (0.25- 10 μ M) DNA hasarı üzerinde likopen ve Beta karotenin iyileştirici etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre beta karoteinin ve likopenin DNA hasarını inhibe ettiği ve böylece bu maddelerin antioksidan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Muzandu ve ark. (2006), beta karotenin kanser, kronik inflamatuvar gibi çeşitli hastalıklarda rol oynayan reaktif bir tür olan peroksinitrite (0.31- 10 μ M) etkisini Çin hamsterları karaciğer fibroblastlarındaki DNA, plazmid DNA üzerine etkileri comet tekniği ile araştırılmasını amaçlamışlardır. Sonuçlara göre Beta karotenin peroksinitrite ve diğer reaktif türlerinin olumsuz etkilerini hafiflettiği sonucuna varılmıştır.

Yurtçu ve ark (2012), yapmış oldukları çalışmada, beta karotenin insan lenfositlerindeki L-arjinin ile oluşturulan oksidatif reaktiflere karşı koruyucu etkilerinin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. DNA hasarının değerlendirilmesi için alkali tek hücre jel elektroforez tekniğini kullanmışlardır. Bu çalışmada, L-arjinin kültürlerde oksidatif hasarı indüklerken, beta karotenin genotoksik hasarı azalttığı saptanmıştır.

2.1.4. Demir oksit ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite Çalışmaları

Demir Oksitler: Sarı, kırmızı, kahverengi veya siyah renkte toz halinde bulunan bu maddeler suda ve organik çözücülerde çözünmeyip, konsantre mineral asitlerde çözünmektedir. Zengin renk skalasına sahip olan demir oksitler renkli olan hemen hemen bütün gıda maddelerinde bulunmaktadır.

Ying ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmada demir oksit nanopartiküllerinin in vitro olarak insan lenfositlerinde sitotoksik etkisini 24 saatlik

FDA (fluorescein diacetate) tekniği ile belirlenmesini amaçlamışlardır. Çalışmalar ışığında kültüre edilen gruplar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında farklı boyutlarda demir oksit nanopartiküllerinin sitotoksik olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır.

Hong ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada, demir oksitin çeşitli fonksiyonel gruplarının sıçan L-929 fibroblast hattındaki sitotoksik ve genotoksik etkisini comet tekniği ile incelenmesini amaçlamışlardır. Çalışmada demir oksit ile muameli gruplar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında genotoksisite için anlamlı değişiklikler gözlenmiş ve demir oksitin genotoksik olduğu sonucuna varmışlardır.

Könczol ve ark. (2011), demir oksidin insan akciğer epitel hücrelerinde genotoksik olup olmadığını comet testi ile araştırmışlardır. Çalışmada yararlanılan comet tekniği değerlendirmelerinde göre demir oksit reaktif oksijen üretimini daha da arttırdığı için diğer hücrelerle kıyaslandığında demir oksitli hücrelerde DNA hasarı daha fazladır ve demir oksidin genotoksik olduğu açıklanmıştır.

2.1.5. Gümüş ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Bir metal olan gümüş gıda sektöründe gümüş tozu olarak pasta ve şekerlemeleri renklendirmek için kullanılmaktadır.

AshaRani ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, gümüş nanopartiküllerin insan akciğer fibroblast ve glioblastoma hücrelerinde tek hücre elektroforez yöntemiyle genotoksik etkisinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Çalışmada DNA hasarları belirlenmiş ve etken madde apoptosise etki etmemiştir.

Wise Sr. ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada gümüş nanopartiküllerin balık hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerini koloni oluşturma tekniği ile araştırmayı amaçlamışlardır. Değerlendirmeler ışığında gümüş nanopartiküllerin kromozom aberasyonu ve aneuploidi oluşturduğu görülmüş ve test maddesinin balık hücreleri için genotoksik ve sitotoksik olduğu savunulmuştur.

Foldbjerg ve ark.(2011) gümüşün insan karaciğer A549 kanser hücrelerindeki antioksidan olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada yararlanılan

MTT ve annexin V/propidium iyodür testine göre reaktif oksijen türlerine bağlı DNA hasarlarında gümüş kullanılan alveolar hücre hattında düşüş gözlenmiş ve gümüşün antioksidan olduğunun altı çizilmiştir.

2.1.6. Karamel ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Karamel başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç ve kozmetik sektörlerinde de yoğun olarak kullanılır. Gıda sektöründeki başlıca kullanım alanları şunlardır: Unlu mamuller (malt ekmeği), alkollü içecekler (bira, elma şarabı, viski, tahıl alkolü, şarap bazlı aromalandırılmış içkiler, aromalandırılmış şaraplar, likör şarapları), alkolsüz içecekler (kolalı içecekler), sirke, tuzlu su (salamura) ve yağda sebzeler, kahvaltılık tahıllar, reçeller, jöleler, marmelatlar, meyve preparatları, sosis, salam, kahvaltılık sosisler, köfteler, çorbalar, şekerlemeler, süsleme ve kaplama malzemeleri, dondurmalar, soslar ve çeşni maddeleridir (http://hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=105&Itemid=143).

Gaunt ve ark. (1977) open-pan ve close-pan kimyasallarını amonyak yöntemiyle yapılmış karameli sıçanlara % 4 , % 8, % 16 oranlarında vermişlerdir. Araştırma sonucunda bütün dozlarda lenfositopeni (kandaki lenfosit sayısının azalması) gözlenmiş, yüksek olan iki dozda da timüs ve dalak ağırlıklarında azalma olduğu bildirilmiştir. Karaciğer ve böbrek ağırlığında artma olmuştur.

Adams ve ark. (1992) karamellerin genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmak için kısa süreli genotoksisite testlerini (MN ve Ames testi) kullanmışlardır. Çalışmalarında, *Salmonella typhimurium* suşlarını (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) kullanmışlar ve karamelin genotoksik etkisinin olmadığını saptamışlardır. Fare mikronukleus testi ile de herhangi bir genotoksik etki belirlenmemiştir.

Allen ve ark. (1992) *Salmonella typhimurium* suşları (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100) ile yaptıkları Ames testinde karamellerin 4 grubunun genotoksisitesini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda karamellerin I. (sade karamel) ve III.(amonyum karamel) grubun genotoksik potansiyele sahip olduğu

bulunmuştur. Yine aynı çalışmada CHO (Chinese Hamster Ovarium)' larda ise kromozom aberasyonunu indükleyici bulgulara rastlanmamıştır.

Tuormaa (1995), 4-metilimidazol' ü kullanarak sıçan, fare ve tavşanlar ile araştırma yapmıştır. Çalışılan bu hayvanlardan sıçan ve farelerde beyaz kan hücrelerinde ve lenfositlerinde olumsuz derece de düşüşler gözlenmiş, ayrıca tavşanlarda da düşük dozlarda dahil B6 vitaminin emiliminin inhibe edildiği belirlenmiştir.

Stoner ve ark. (1997), Millard reaksiyonu ile şekerlerden elde edilen karamellerle yapılan bir başka çalışmada bu reaksiyon sırasında çıkan ürünlerin *Salmonella* suşlarında genotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

EFSA' nın 2011 yılındaki çalışmasında karamellerin bütün sınıfları (I, II, III, IV) incelenmiştir. III. grubun immün sistemde toksik olduğu, öte yandan diğerlerinin böyle bir etkiye sahip olmadığı açıklanmıştır Ancak I. ve IV. (amonyum-sülfid karamel) grubun yüksek dozda genotoksik olduğu da ortaya çıkmıştır(file:///C:/Users/user/Desktop/tez%20%C3%B6zeti/EFSA%20rules%20caramel%20colours%20are%20not%20carcinogenic%20or%20genotoxic.html).

Test maddemizin de dahil olduğu karamellerin etkileriyle ilgili tersi görüşlerde vardır. Brusick ve ark. (1992) karamellerin genotoksitesini değerlendirmek için kısa zamanlı genotoksikite testlerinden Ames testini kullanmışlar ve *Salmonella* plaklarından elde edilen 5 standart (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100) suşun hiçbir genotoksik etkinin olmadığını göstermişlerdir. Karamel III ve Karamel IV ile yaptıkları çalışmada ise yine hiçbir genotoksik bulguya rastlamamışlar ve insanlar için zararlı olmadığını belirtmişlerdir.

Til ve Spanjers (1973) balıklarda yaptıkları araştırmalarda IV. Grup karamellerin büyümeyi olumsuz etkilemediğini ve teratojenik etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Hagiwara ve ark. (1983) karamellerin farelerde karsinojenik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Kromozom mutasyonları ile ilgili genetik değişimler birçok insan genetik hastalıklarının sebebidir. Somatik hücrelerin onkogen ya da tümör süpressör genlerinde değişmelere sebep olan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların

insanlarda ve deney hayvanlarında kanserin uyarılmasında rol oynadığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (OECD TG 473. 1997).

Maekawa ve ark. (1982) amonyaklı karamelin F344 sıçanlarında karsinojenitesini araştırmışlar ve bu maddenin karsinojenik olmadığını bildirmişlerdir.

Chan ve ark. (2006) da dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada erkek sıçanlara 0, 625, 1250, 2500 ppm; dişilere ise 0, 1250, 2500, 5000 ppm 4-metilimidazol vermişlerdir (106 hafta). En yüksek doz verilen dişi sıçanlarda heyecanlanma hiperaktivite ve engelli yürüyüşler gözlenmiştir. Yine bu dişilerde mononükleer lösemili hücre görülme sıklığı kontrol grubuna nazaran artmıştır. Chan ve ark. (2008) 4-metilimidazol' ün erkek ve dişi sıçanlarda alveolar/bronşiyal adenom veya karsinom için indükleyici olabileceğini ve dişi sıçanlarda mononükleer lösemi hücrelere neden olabileceğini açıklamışlardır.

Price ve ark. (2006) Amerika' da kullanılması onaylanan azo boyalar grubuna giren 8 gıda boyasının (blue 1, blue 2, yellow 1, yellow 5, yellow 6, red 3, green 3) farelerde in vivo olarak kanserojenitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Fisher fare embriyolarında bazı boyaların (blue 1, red 3, yellow 5) habis oluşumunu uyardığı ve ölümlere yol açtığı görülmüştür. Boya kombinasyonlarında ise tümör oluşumu ve fare ölümleri artmıştır. Çalışmanın sonucuna göre bu gıda boyalarının kanserojen olduğu açıklanmıştır.

2.1.7. Klorofil ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Yeşil bitki ekstraktlarından elde edilen klorofil besinlerde gıda boyası kullanılmasının yanı sıra birçok araştırmacının yaptığı çalışmada da kanıtlandığı üzere klorofilin antioksidan özelliği de vardır.

Negishi ve ark. (1994) yaptıkları çalışmada klorofilin *Drosophila*' lardaki genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada DNA hasarları için DNA tamir testi uygulanmış ve sonuçlara göre kompleks olan kanserojenlerin etkilerinin klorofiller sayesinde inhibe edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Simonich ve ark. (2008) gökkuşağı alabalıklarında birçok organda oluşan kanserin üzerinde klorofil bazlı diyetlerin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada chl (Classical Hodgkin lymphoma) değeri baz alınmış ve sonuçlara göre gökkuşağı alabalıklarında klorofil alımı tümör oluşumunu azaltmıştır.

2.1.8. Kurkumin ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Zerdeçal veya turmerik denilen, hint safranına sarı rengini veren pigmente kurkumin denir. Kurkumin Hindistanda çok yaygın olarak kullanılan bir gıda boyasıdır (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kurkumin>). Sarı renk verdiği için dolayı genellikle katı ve sıvı yağlarda ve unlu mamullerde kullanılır.

Shi ve ark. (2006) kurkuminin insan over kanser hücreleri üzerinde antiproliferasyon ve apoptozis etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucuna göre kurkuminin kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellemekte ve apoptozisi uyarmaktadır.

Ragunathan ve Panneerselvam (2007) yaptıkları çalışmalarında kurkuminin Allium cepa' da köklerdeki hücrelerde sodyum azidin neden olduğu kromozom aberasyonlarına karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada tüm kurkumin ile muamele edilen gruplarda mitotik indeks düşmüş ve oluşan kromozom aberasyonları azalmıştır, fakat bu olayın mekanizması bilinmemektedir. Kurkuminin bu çalışmada en iyi antimutajenik etkiyi gösterebildiği dozu 5 µg/ml' dir.

Cao ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Akrilamid kanserojeninin HepG2 (hepatoselüler kanser) hücrelerinde meydana getirebileceği genotoksik hasarlara karşı kurkuminin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan mikronukleus testi sonuçlarına göre akrilamidin neden olduğu genotoksisiteyi önlemek amacıyla kurkumin kullanımının makul bir yol olabileceği savunulmuştur.

Bar – Sela ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada bir antioksidan olarak bilinen kurkuminin antikanser ajanı olabildiğini araştırmışlardır. Hasta gönüllülerde yaptıkları klinik çalışmalar sonucunda pankreas kanseri hastalarının tedavisinde antikanser ilacı olarak kullanılabilenliği öngörülmüştür.

2.1.9. Likopen ile Yapılan Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Gıda boyası olarak kullanılan likopen kırmızı meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur. Renklendirici olmasının yanı sıra güçlü bir antioksidan olarak da bilinir. Meyva suları, salçalar, et ürünlerinde kullanılır.

Velmurugan ve ark. (2004), N-methyl-N' -nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)' nin Wistar sıçanlarının kemik iliği hücrelerinde meydana getirecekleri genotoksik etkilerin önlenip önlenemeyeceğini belirlemek için genotoksik etkilere karşı koruyucu olarak likopeni kullanmışlardır. Genotoksik etkiyi belirlemek için de mikronukleus ve kromozom aberasyonu testlerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmada likopenin kanserojen olan MNNG' nin KA ve mikronukleus oluşturma etkisini engellediği saptanmış ve bundan da likopenin kanserojenlere karşı koruyucu etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Dias ve ark. (2009) Wistar sıçanlarının erkeklerine likopen ile beraber 1,2-dimetilhidrazin (DMH) de vermişlerdir. Sekiz haftanın sonunda DMH' in oluşturduğu hasarlı hücrelerin likopen yardımıyla apoptoza girdiği görülmüştür.

2.1.10. Titanyum ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Titanyumdioksit inorganik bir pigmenttir (TiO_2) E171 gıda katkı maddesi koduyla bilinen bir gıda renklendiricisi ve nem tutucudur. Beyaz un, sofr tuzu, şeker, sakız, diş macunu, sabun, deterjanlar, kimyasal ilaçlar, vitaminler, şekerleme, karbonat, kabartma tozu ve partikül halindeki gıdalar gibi birçok ürün titanyumdioksitle beyazlatılır (<http://www.nanobilgi.com/?p=1>).

Velasca – Ortega ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada ticari olarak satılan titanyumun diş implantasyonunda bakteriyel (*E. coli*) geri mutasyon ve fare lenfoma hücre mutasyon testi ile genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmanın sonunda titanyumun genotoksik ve sitotoksik olmadığı diş implantasyonunda kullanılabilir uygunlukta olduğu bildirilmiştir.

2.2. Sentetik Renklendiriciler ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

2.2.1. Azo Boyalar ile Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Azo boyaları gıda renklendiricilerinin bir alt grubudur. Bu gruba dahil olan bazı boyalar şunlardır; Tartrazin, Sarı 2G, Sunset sarı, Azorubin, Amarant, Ponso 4R, Allura kırmızısı, Brilliant Black, Brown FK, Brown HT, Litolrubin BK. Azo boyalar gıda ve tekstil üretiminde kullanılan bütün boyaların % 60-70' ini oluştururlar. Gıda renklendiricileri arasında en çok yan etkisi olan boyalardır ve birçok ülke tarafından yasaklanmıştır (<http://www.food-info.net/tr/colour/azo.htm>).

Haveland- Smith ve ark. (1979) yaptıkları çalışmada azo boyalar grubuna giren kırmızı 2G boyasının genotoksisitesini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmayı bakterilerde DNA tamir tekniği ile yürütmüşlerdir. Çalışma sonucuna göre kırmızı 2G boyasının bakterilerde DNA tamir mekanizması sistemini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Chung ' un (1983) derlemesine göre azo boyalam (litol kırmızısı, sunset sarı, tartrazin, allura kırmızısı) kullanılan ülkelere göre değiştiğini ve hastalığa sebep olma olasılığını değiştirdiğini belirtmiştir. Örneğin gelişmiş sanayi ülkelerinde bağırsak kanseri arttığı için gıda tüketimindeki boyalar üzerine dikkat çekilmesinin gerektiğini açıklamıştır. Lin ve Solodar (1987), bazı azo boyaların mutajenitesinin boya yapısı ve aktivitesi arasındaki ilişkiye bağlı olduğunu gösteren bir çalışma yapmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada azo boyalar S9 mix ve p-fenilendiamin ile birlikte ortama verildiği zaman mutajenik etki göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre azo boyaların mutajenik etki göstermelerinin sebebi p-fenilendiaminin okside yapısında bulunmasıdır.

Prival ve ark. (1988) 4 farklı azo boyasının *Salmonella typhimurium* ' da (Ames testi) mutajenik olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada Ames testi uygulanmış ve çalışma sonucuna göre azo boyasının mutajenik aktivite göstermediği saptanmıştır.

Roychoudhury ve Giri. (1989) yapmış oldukları çalışmada aralarında tartrazin ve eritrozinde içinde olduğu birçok gıda boyasının *Allium cepa* üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, tartrazin ve eritrozinin poliploidi hücrelerinin oluşumunda ciddi bir artışa neden olmakta, yüksek dozda mikronukleus oluşumlarını uyarmaktadır.

İzbırak ve ark. (1990) gıdaları renklendirmede yaygın olarak kullanılan 4 azo boyası (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow ve Tartrazin) mutajenik etkilerinin olup olmadığını *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. Bu çalışma sonucuna göre Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow ve Tartrazin' in mutajenik etki göstermemiştir.

Chung ve ark (1992) yapmış oldukları çalışmada azo boyaların mutajenitesinin yapısal özellikleri arasındaki bağlantıyı çözmeyi amaçlamışlardır. Oral yoldan alınan azo boyaların bağırsak mikroflorası tarafından aromatik aminlere dönüştürüldüğü bilinmektedir. Bu aromatik aminlerin fonksiyonlarının değişik etken gruplarda farklılık gösterdiği görülmüştür. Örneğin bu aminler benzidin ile muamele edildiğinde mutajenitesinde bir değişme olmamış fakat etil alkol ile muamele edildiğinde mutajenitesi düşmüştür. Sonuç olarak azo boyaların karşılaştığı gruplara göre mutajenitesinin değiştiği açıklanmıştır.

Sweeney ve ark. (1994) azo boyaların oksidatif genotoksitesini incelemeyi hedeflemişlerdir. Çalışmada Ames testinde *Salmonella typhimurium* suşları (TA98, TA100, TA102) kullanılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında; TA102 suşunda genotoksik etki görülürken, TA98 ve TA100 suşlarında genotoksik etki görülmemiştir.

Tripathy ve ark. (1995), amarant gibi azo boyalarının *Drosophila*' lardaki somatik ve üreme hücre hattında genotoksik etkisini araştırmak amacıyla somatik ve üreme hücrelerinde cinsiyete bağlı resesif letal mutasyon tekniğini kullanmışlardır. Çalışma sonucuna göre amarantın hiçbir genotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Rafii ve ark. (1997) azo boyaları mutajenik etkisini Ames testi ile değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Sonuçlara göre her iki *Salmonella* suşunda mutajenik etki görülmemiştir.

Tsuda ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada günlük olarak oral yoldan verilen azo boyaların (amarant, allura kırmızısı ve asit kırmızısı) erkek ve gebe farelerde DNA hasarlarını comet tekniği ile incelemeyi amaçlamışlardır. Gebe farelere oral yoldan 24 hafta boyunca test maddesi sadece tek konsantrasyonda (2000 mg/kg) verilmiştir. Üçüncü haftada kolonda (kalın barsak), altıncı haftada da karaciğer de DNA hasarları meydana gelmiştir. Çalışma sonucuna göre bu üç azo boyanın da çok düşük dozda dahi kolonda DNA hasarlarına sebep olduğu bildirilmiştir.

Sasakia ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışmada, tartrazin ve eritrozinin de arasında bulunduğu 39 gıda katkı maddesinin comet testi tekniğiyle fare organlarındaki genotoksik etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre tartrazin ve eritrozine midede DNA hasarına neden olduğu saptanmıştır.

Mansoura ve ark. (2007), gıda boyaları olarak kullanılan azo boyaların *Pseudomonas putida* mt-2' de genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Azo boyaların S9 mix varlığında genotoksik olduğu vurgulanmıştır.

Poula ve ark. (2009), amarant, sunset sarı, tartrazin gibi azo boyaların fare barsak hücrelerini genotoksik olarak nasıl etkilediğini MN testi ile araştırmışlardır. Boyaları farelere gavaj yöntemiyle 24 saatlik periyotlarla vermişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre boyaların sadece en yüksek dozu mikronukleus oluşumunu uyarmıştır.

Giri ve Srivastava (2011), yaptıkları çalışmada *Trignella foenum- graecum* (çemen otu) kök meristemlerinde sunset sarısının genotoksik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda anafazda ve metafazda sayıca bir hayli fazla olan anormalliklere rastlandığından sunset sarısının genotoksik olduğu bildirilmiştir.

Mpountoukasa ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada amarant ve tartrazinin insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkilerini KKD testi ile araştırmayı amaçlamışlardır. Amarantın en yüksek dozda (8mM) KKD' yi uyardığını, tartrazinin ise KKD' yi uyardığını bildirilmişlerdir. Çalışmada buzağı timüs hücrelerinde DNA' ya nasıl bağlandıklarını incelemek için PCR ve agaroz jel elektrofoz tekniklerinden yararlanılmıştır. Çalışma sonucuna göre bu boyalardan sadece amarantın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkisi olduğu ve iki boyanın da doğrudan DNA' ya bağlandıkları açıklanmıştır.

Sayed ve ark. (2012) sunset sarısının insan somatik ve üreme hücreleri üzerine genotoksik etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Sonuçlara göre somatik hücrelerde SCE testinden yararlanılmış, çok sayıda kromozom fragmentlerine rastlanmış ve sunset sarısı genotoksik olduğu belirtilmiştir.

Gomes ve ark. (2013) sunset sarısı, bordo kırmızısı ve tartrazin sarısının Allium cepa L. kök meristematik hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamelede sitotoksitesini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışma sonucuna göre boyaların mitotik indeksi düşürdüğu gözlenmiş ve bu üç gıda boyasının da sitotoksik olduğu açıklanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma da test maddesi olarak doğal bir gıda renklendiricisi olan 4-Metilimidazol, materyal olarak da sigara içmeyen yaşları birbirine yakın sağlıklı iki erkek (22 ve 24 yaşlarında) ve iki bayandan (25 yaşında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Gıda Renklendiricilerinin Sınıflandırılması

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 4- Metilimidazol bir gıda renklendiricisidir. Gıda renklendiricileri şu şekilde sınıflandırılır: Gıdalarda kullanılan renklendiriciler doğal ve sentetik boyalar olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

3.1.1. Doğal Renklendiriciler

Yapay renk maddelerinin sağlık üzerine bazı olumsuz etkilerinden dolayı kullanımında sınırlamalar vardır. Bu durum doğal renk maddelerinin kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır. Gıdalara renk vermek için katılan fakat E numarası olmayan genellikle meyva, sebze ve baharatlardan elde edilen doğal renk maddeleri de vardır. Mesela sarı renk için safran, yeşil renk için ıspanak, kırmızı pancardan izole edilmiş renk maddeleri sentetik renk maddelerine alternatif olarak kullanabilmektedir. Doğal gıda boyaları sentetik renk maddelerine kıyasla genelde zor çözünürler, asitliğe, ısı ve ışığa karşı oldukça duyarlıdırlar, renkleri kalıcı değildir ve üretim masrafları daha pahalıdır. Bu nedenlerden dolayı doğal gıda boyaları her gıdada kullanılamamaktadır.

Doğal boyalar, doğada bulunan kaynaklardan elde edilen organik boyalardır. Kullanıldığı gıdada boyanın ismi veya varsa E numarası yazılır. Mesela bitkilerden elde edilen safran, üzüm ekstraktı veya minerallerden elde edilen altın ve gümüş doğal boyalara örnektir. Birde doğala özdeş boyalar vardır ki bunlar; kimyasal sentez

yoluyla üretilmektedir ve bu boyaların kimyasal yapısı doğada bulunan doğal boyalarla aynıdır. Gıdalarda renklendirici olarak kullanılan doğal boyalar şunlardır:

Klorofiller: Klorofil bitkilerin yaprak, ham meyve ve otsu bitkilerinin gövdelerindeki yeşil görünümünü sağlayan renk maddesidir. Bu madde sayesinde fotosentez yaparlar. Yapraklar yaşlandıkça klorofil parçalanır ve yeşil renk kaybolur. Birçok meyve ham haldeyken fazla miktarda klorofil içerdiğinden renkleri yeşildir. Ancak olgunlaşma ilerledikçe klorofil yavaş yavaş kaybolur, sarı veya kırmızı karotenoitler veya pembe – mor renk tonlarındaki antosiyaninler hakim olur.

Antosiyaninler: En yaygın doğal pigment maddeleri olup bunlar antosiyanidinlerle şekerin yaptığı glikozitlerdir. Pembeden mora kadar değişen renk tonlarını veren maddelerdir. Antosiyaninler, hücre öz suyunda glikozit formunda bulunmaktadır. Yani, antosiyanidinlerle şekerin yaptığı glikozitlerdir. Tereyağı, krema tozu, margarin, dondurma, yoğurt gibi gıdalarda renk maddesi olarak kullanılmaktadır.

Karotenoitler: Karotenoitler, sarıdan koyu kırmızıya ve menekşeden siyaha kadar değişen farklı renkte maddelerdir. Ancak çoğunluğu sarı – kırmızı renktedirler. Genel olarak sarı renkli meyve ve sebzeler karotenoit, yeşil renkli olanlar ise hem klorofil hem karotenoit içerirler. Nitekim klorofil kaybolunca karotenoitlerin rengi ortaya çıkar. Yani, yeşil renkli sebzelerdeki, karotenoitlerin rengi, klorofilin güçlü rengi tarafından maskelenmektedir.

Biksin: Biksin yağda eridiği halde, norbiksin adı verilen türevi suda çözünürdür. Sulandırılmış ekstraktı, dondurma sanayinde ürünü renklendirme amacı ile çok kullanılmaktadır. Ayrıca tereyağı, margarin, mısırözü yağı ve salata mayonezlerinde de geniş kullanım alanına sahiptir.

Karamel: Karamel, koyu kahve renkli amorf bir maddedir. Kontrollü bir ısıtma işlemi uygulanarak dekstroz, laktoz, malt şurubu, hidrolize nişasta ve özellikle sakkoroz gibi bazı karbonhidratların 190°C' a kadarısıtılmaları (yakılmaları) ile elde edilir. Kahverenginin tonu, sıcaklık derecesine göre değişir. Karamel, kompleks bir bileşime sahip, suda kolloit halde çözünür bir maddedir. Bu kolloitler elektrik yükü taşımadıklarından üretimde uygulanan işlemleri etkileyebilmektedirler. Kullanım alanı daha çok gazlı içecekler olan karamelin üretim sırasında izoelektrik

noktası önem taşımaktadır. Örneğin, kola ve kök biralarda ortama ilave edilen karamelin koagülasyonunun önlenmesi için kuvvetli negatif elektrik yükü taşıması ve izoelektrik noktasının pH 2.0 veya altında olması gerekir.

Ucuz bir maddedir. Bu özellikleri nedeniyle çorbalar, fırın ürünleri, pasta ve şekerleme endüstrisinde çok fazla kullanılan bir renk katkısıdır. Renk verme yanında lezzet maddesidir. Sıvı veya toz halde satılmaktadır. Gıdalarda % 0.1 – 10 arasında ilave edilir.

Karameller 4 grupta incelenir:

Sade karamel: Yüksek sıcaklıklarda ısıtılan karbonhidratların karamelizasyonu sonucunda oluşan, koyu kahverengiden siyaha kadar renk veren bir maddedir. Sıvı veya katı formlarda bulunur. Suda çözünür.

Kostik sülfid karamel: Karbonhidratların sülfid bileşikleri varlığında kontrollü ısı ile işlemiyle elde edilmektedir. Amonyum bileşikleri kullanılmaz. Koyu kahverengiden siyaha doğru sıvı veya katı formları da bulunmaktadır.

Amonyum karamel: Karbonhidratların amonyum bileşikleri varlığında kontrollü ısı ile işlemiyle elde edilmektedir. Sülfid bileşikleri kullanılmaz. Koyu kahverengiden siyaha doğru sıvı veya katı formları da bulunmaktadır.

Sülfid-amonyum karamel: Karbonhidratların sülfid ve amonyum bileşikleri varlığında kontrollü ısı ile işlemleriyle elde edilmektedir. Koyu kahverengi siyaha kadar olan renklerde sıvı veya katı formlarda bulunmaktadır.

Karmin ve Karminik Asit: Bu renk katkısının aktif maddesi karminik asittir. Karmin, karminik asidin alüminyum pigmenti ile meydana getirdiği bir bileşiktir. Pahalı olduğu için gıda sanayinde kullanılması ekonomik değildir. Pembe renkli draje kaplamalarda, ayrıca FD & C boyalarının özellikle proteinli gıdalarda sakıncalı olması nedeniyle çoğu zaman bu gıdalarda karminden yararlanılmaktadır.

3.1.2. Sentetik Renklendiriciler

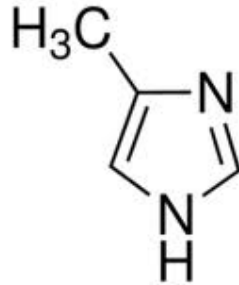
Sentetik boya maddeleri (İng. Coalter dyes) 1870' li yıllarda keşfedilmiştir. 19.yüzyılın sonlarında sentetik boya organik kömür katranından üretilerek tereyağı ve peynirde kullanılmıştır. Bu yüzden bu renklendiricilere kömür katranı

renklendiriciler de denilmektedir. Sentetik (suni veya yapay boyalar) kimyasal yapıları bakımından doğada bulunmayan ve kimyasal sentez yoluyla üretilen boyalardır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.1. 4-Metilimidazol (4-MEI)' ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 4-Metilimidazol karameller renk maddesi grubundan amonyaklı karameller alt grubuna girmektedir. 4-Metilimidazol' un kimyasal yapısı ve bazı özellikleri aşağıda açıklanmıştır.



UIPAC ADI:

4-Methyl-1*H*-imidazole

5-Methyl-1*H*-Oimidazole

Cas No: 822-36-6 (Sigma)

Kimyasal Formülü: C₄H₆N₂

Moleküler Ağırlığı: 82.11 g/mol

Katı Yoğunluğu: 1.02 g/cm³

4 – Metilimidazol su ve alkol içerisinde çözünen açık sarı kristalin bir katı maddedir. Bu madde 44-47° C' de erir ve 263 °C' de kaynar. Parlama noktasise 157°C' <http://en.wikipedia.org/wiki/4-Methylimidazole>).

3.2.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir

Kimyasal adı: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

Kapalı formülü: C₉H₁₁BrN₂O₅

Molekül ağırlığı: 307.10 g/mol

Erime noktası: 191-194°C

CAS No: 59-14-3

Sigma No: B 5002

3.2.3. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nukleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. 5 mg Cytochalasin B' yi, 3 ml %50' lik etil alkolde çözerek 6mg/ml stok çözelti elde edilir.

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol

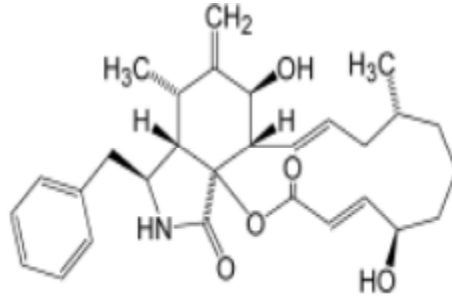
Erime noktası: 218-223°C

Kaynama noktası: 218-223°C

Safılık düzeyi: %98

CAS No: 14930-96

Açık formülü:



Sigma No: C-6762

3.2.4. Entellan (Merck)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan şeffaf yapışkan sıvıdır (Cat. No. 7961).

3.2.5. Fiksatif

KKD ve KA' y incelemek amacıyla yapılan preparasyon için kullanılan fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit' in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. MN inceleme amacıyla yapılan preparasyon için ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif muamelesi için 1 kısım glasiyal asetik asit 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra bu karışım 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle (1/5/6) hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise 1 hacim glasiyal asetik asit 5 hacim metanol (1;5) karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.2.6. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiştir. Sorensen tamponu içinde hazırlanıp, filtre edilmiş % 5' lik boya eriyiği, kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.2.7. Hipotonik Eriyik

% 0.4' lük KCl (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, inkübatör ile 37°C' ye kadansıtılarak kullanılmıştır.

3.2.8 Kolkisin (Kolşisin) (Sigma)

Kolkisin (Colchicine) (Sigma Cat. No. C9754), KKD ve KA' y inceleme amacıyla preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolkisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.7 ml' lik kromozom medyumu içerisindeki hücre kültürüne ilave edilmiştir. Kolkisin' e ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

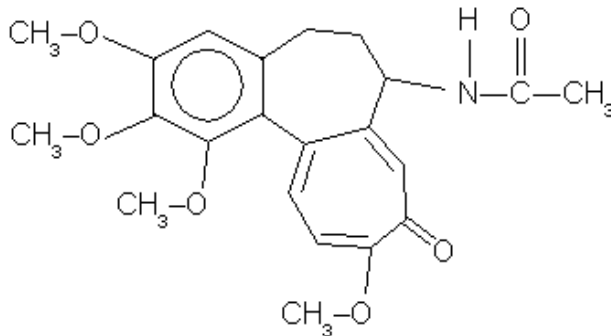
Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

Sigma No: C-9754

Açık formülü:



3.2.9. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB Max. Kromozom medyumu (cat.no. 12552-013) hücre kültürü için kullanılmıştır. PB Max medyumu tam medyumdur. Fakat heparin içermemektedir. Bu medyum her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

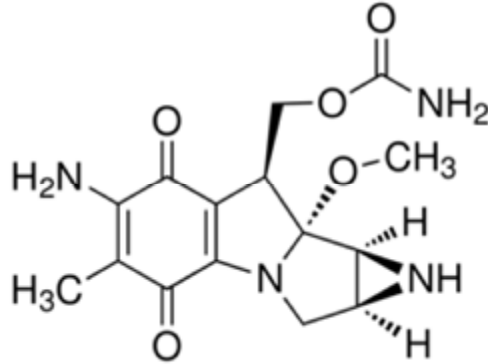
3.2.10. Mitomycin C (MMC) (Sigma)

Mitomycin C, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 2 mg Mitomycin C' yi 30 mL steril saf suda çözerek elde edilir.

Kimyasal adı: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8amethoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

Erime noktası: >360°C

CAS No: 50-07-7

3.2.11. Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.2.12. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD' ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5' lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır. Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A:11.34 gr KH₂PO₄ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B:14.83 gr Na₂HPO₄.12H₂O 250 ml saf su içinde eritilmiştir(pH=9.3).

3.2.13. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kaptaki eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik 5 × SSC' dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD' yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen 1 × SSC eriyiği kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.3.1. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m³/h emiş kapasiteli, UV ve flüoresan ampülü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.3.2. Hassas Terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.3.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37°C' ye kadar ısıtılmasında Incucell marka 0°C -100°C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.3.4. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

3.3.5. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

3.3.6. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dak' ya (rpm) kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.' ık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarında kullanılmıştır.

3.3.7. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C' de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 NÜVE marka 0-60°C ayarlanabilir su banyosu kullanılmıştır.

3.4. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.5. Sterilizasyon

3.5.1. BrdUrd ve Test Maddesi Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır. Ayrıca test maddesinin steril saf suda hazırlanmış eriyiği de aynı şekilde steril edilmiştir.

3.5.2. Saf Suyun Sterilizasyonu

Temiz bir vida kapaklı 100 ml' lik kültürşişesine saf su doldurularak şişenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum folyo ile örtülmüştür. Şişedeki saf su otoklavda 1.2 atm buhar basıncında ve 121°C' de 20 dk. steril edilmiştir.

3.6. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA ve MN testleri yardımıyla saptanabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslararası yönergelerle uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır. Bundan dolayı 4-Metilimidazol' un insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bu çalışma Albertini ve ark. (2000)' lar tarafından yayınlanan IPCS (The International Programme on Chemical Safety) yönergesine göre gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KKD ve KA' ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)' un metotlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (22 ve 24 yaşlarında) ve iki bayandan (25 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre

kültürü inkübatörde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 72 saat için inkübe edilmiştir. 4-MEI' ün etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce 4-MEI' ün daha önce steril bidistile su içerisinde hazırlanmış ve steril edilmiş eriyiğinden son konsantrasyonu 300, 450, 600, 750 $\mu\text{g/ml}$ 4-MEI kültür tüplerine ilave edilmiştir. Test maddesi 4-MEI suda çözündüğü için çözücü kontrol kullanılmamıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere son konsantrasyonu 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 $\mu\text{g/ml}$) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C ' de) kolkisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresinin sonu olan 72. saatin bitiminde preparat yapma işlemine geçilmiştir. Kültür tüpleri 2000 devir/dk' da 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml' lik sıvı iyice karıştırıldıktan ve hücreler resüspanse edildikten sonra tüplere, etüvde 37°C ' de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır ve hücre süspanasyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağız kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37°C ' de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilmiş ve sonra hücre süspanasyonu 1200 devir/dk 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerin dibinde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-

5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.6.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation = SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter' in (1985) geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen Tampon A, 5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml' ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W' lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 × SSC eriyiği içerisinde 60°C (± 2 °C)' de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5' lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

%5' lik Giemsa boyanın hazırlanması: 4 ml tampon A, 4 ml tampon B ve 4 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 80 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1 × SSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf

sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır. Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

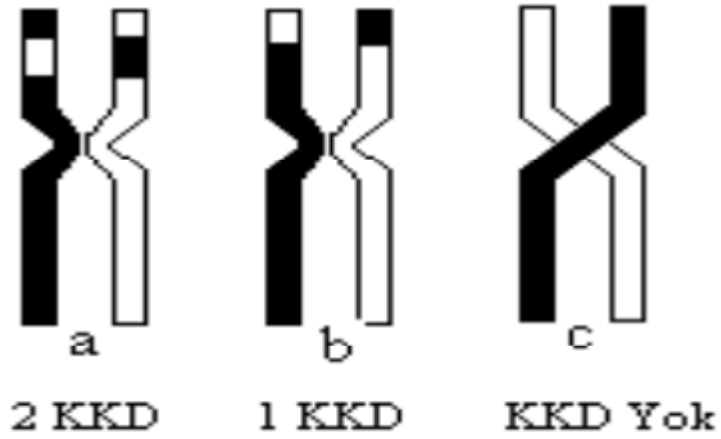
3.6.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPOS CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir ($10 \times 100 = 1000$ büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

3.6.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

3.6.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (dört kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. Her kişinin 25 ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerinde KKD sayısı belirlenmiş bundan her kişi için hücre başına düşen ortalama KKD sayısı (KKD/hücre) hesaplanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.a). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.1.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

3.6.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)' nin Saptanması

4-MEI' ün DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle PI belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

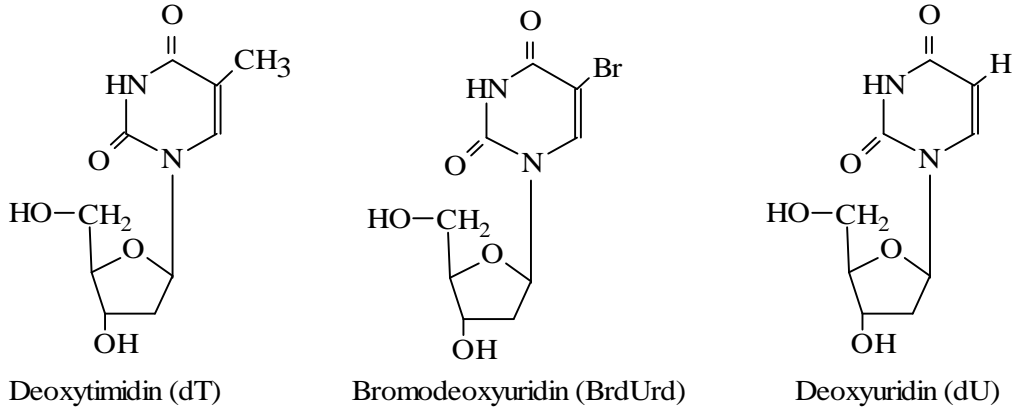
$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

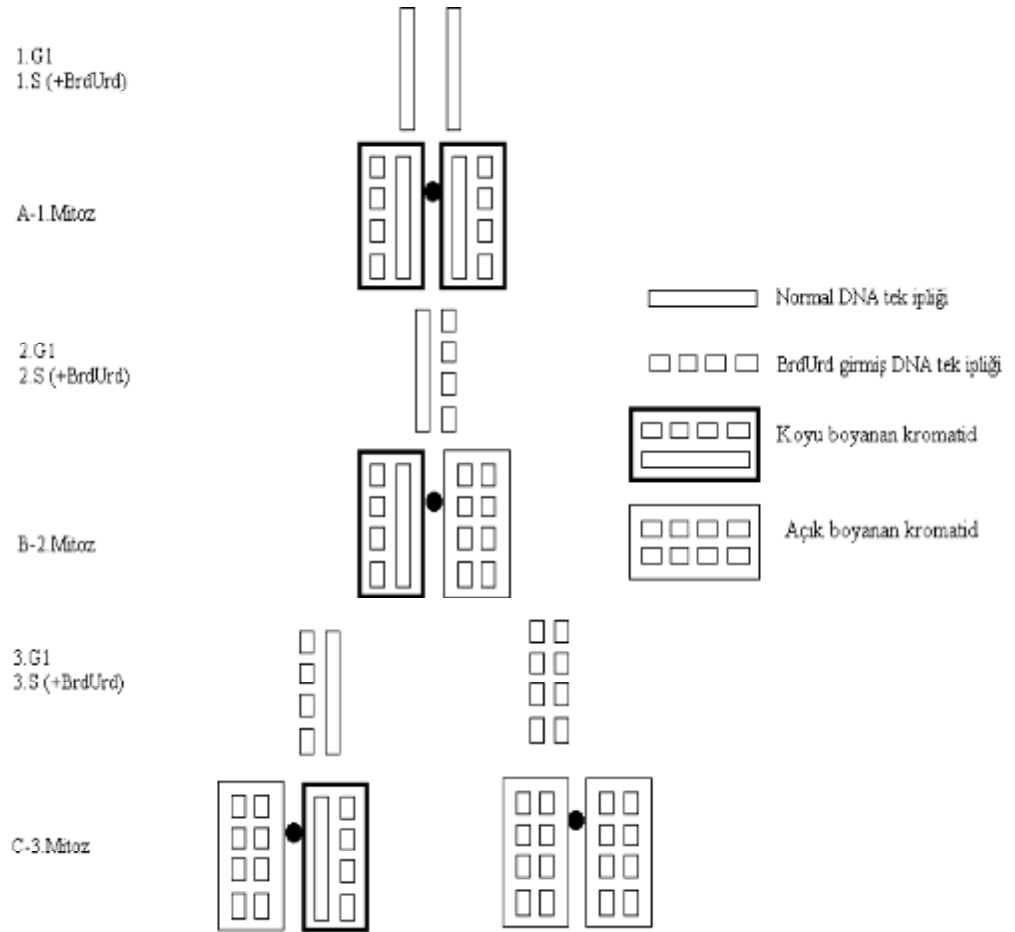
Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT’de CH₃, BrdUrd’de Br ve dU’de H atomudur (Şekil 3.2).



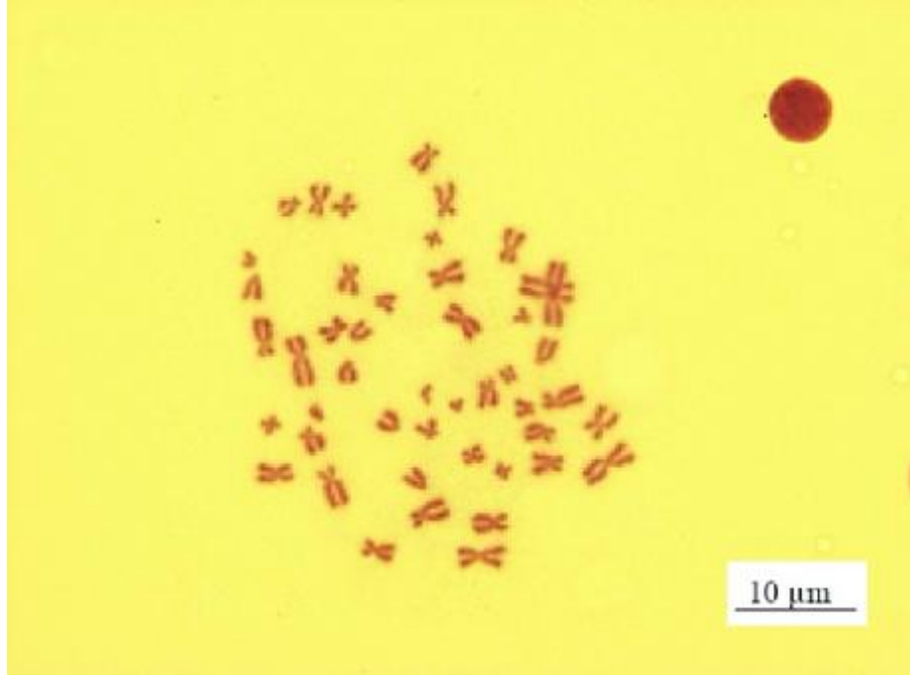
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)’in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA’ın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA’larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT : dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 A ve Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd’li ortamda ikinci S faz) timin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinukleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık

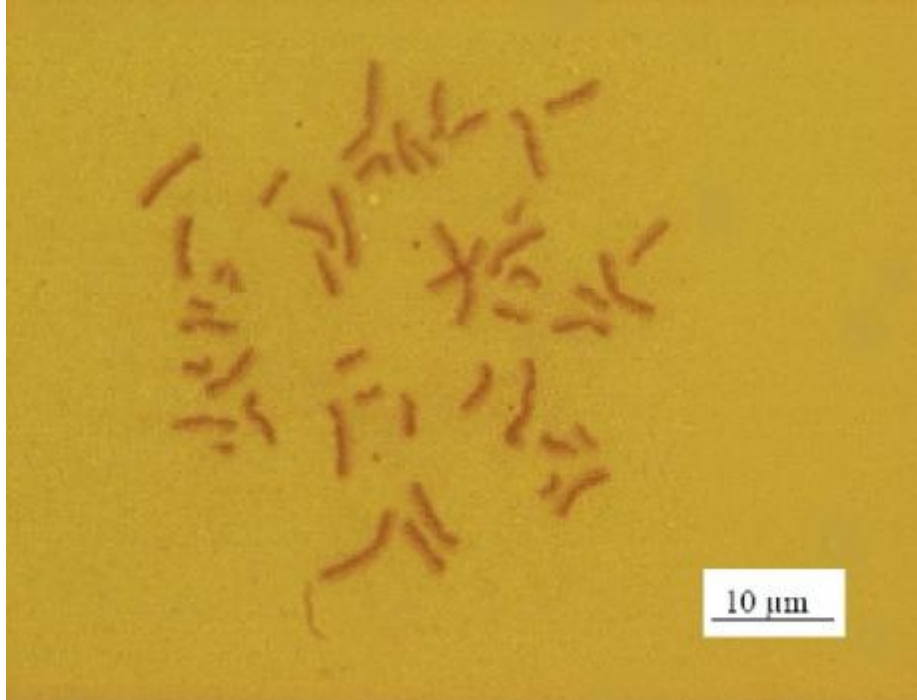
boyanan kromatidini oluşturacaktır (BrdUrd/BrdUrd). İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/dT: BrdUrd/BrdUrd). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 B ve Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd' li ortamda üçüncü S faz) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd/BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd: BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise (dT/BrdUrd), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd' li ve diğer kromatidinin bir ipliği timinli diğer ipliği BrdUrd' li olan bir kromozom (BrdUrd/BrdUrd:dT/BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır. İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 C ve Şekil 3.6). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır



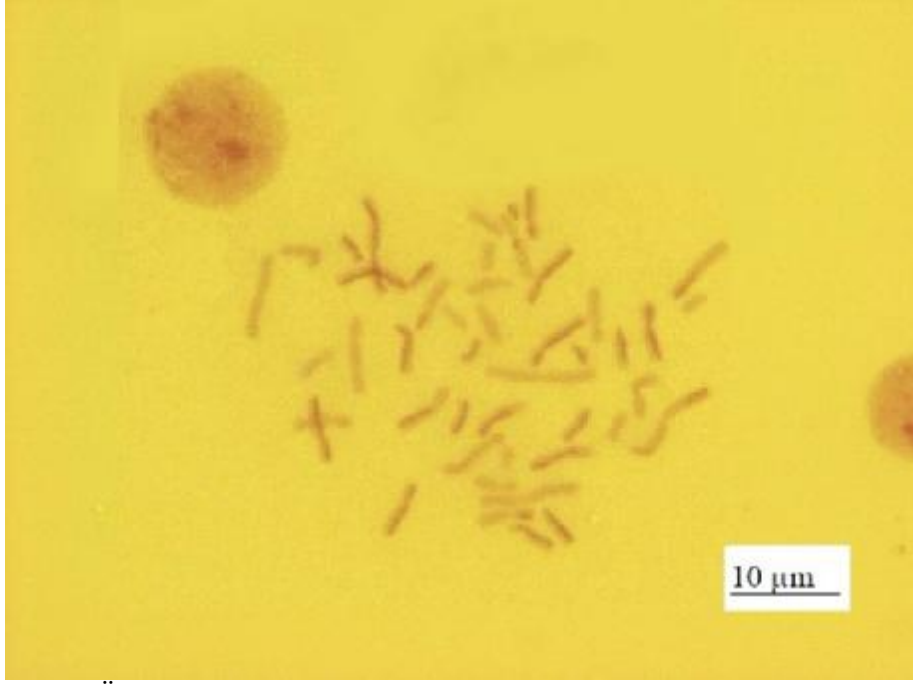
Şekil 3.3. BrdUrd' nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985' e göre Topaktá ve Speit, 1990' dan).



Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).

3.6.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.6.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA' y saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda KA' ıl hücreler ve toplam KA sayısı saptanmıştır. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. KA' ıl hücrelerin yüzdelerinin hesaplanmasında sadece yapısal kromozom aberasyonları göz önünde bulundurulmuştur. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada gap' lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark. 1978). Gap' lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir (Preston, 1987' e göre; Kauderer ve ark. 1991' den): Gap' larda, kromatidin

birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, halka kromozom, fragment ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

3.6.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

4-MEI' ün mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI' i belirlemek için her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.7. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)' ün geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yönteme göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan (KKD ve KA testi için kan alınan kişilerden) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir ve hücreler $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan gıda renklendiricisinin etkisini

belirlemek için son konsantrasyon 300, 450, 600, 750 µg/ml olacak şekilde 4-MEI kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir de pozitif kontrol grubu vardır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 devir/dk' da 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCl, 37°C) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır. Hipotonik eriyik, kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 1200 devir/dk' da 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak soğuk birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCl) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk. muameleden sonra 1200 devir/dk' da 10 dk. daha santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. İkinci ve üçüncü fiksatif muamelesi ise 1 kısım glasiyal asetik asit, 5 kısım metanol karışımının sonucunda hazırlanmış (1/5) fiksatifle yapılmış, ikinci ve üçüncü fiksatif muamelesi 10 dk. oda sıcaklığında yapılmış, her fiksatif muamelesinden sonra tüplerdeki hücre süspansiyonu 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.7.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5' lik Giemsa boyası ile 7-8 dk. boyanmış ve üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.7.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar OLYMPUS marka ışık mikroskobunda $10 \times 40=400$ büyütmede incelenmiştir.

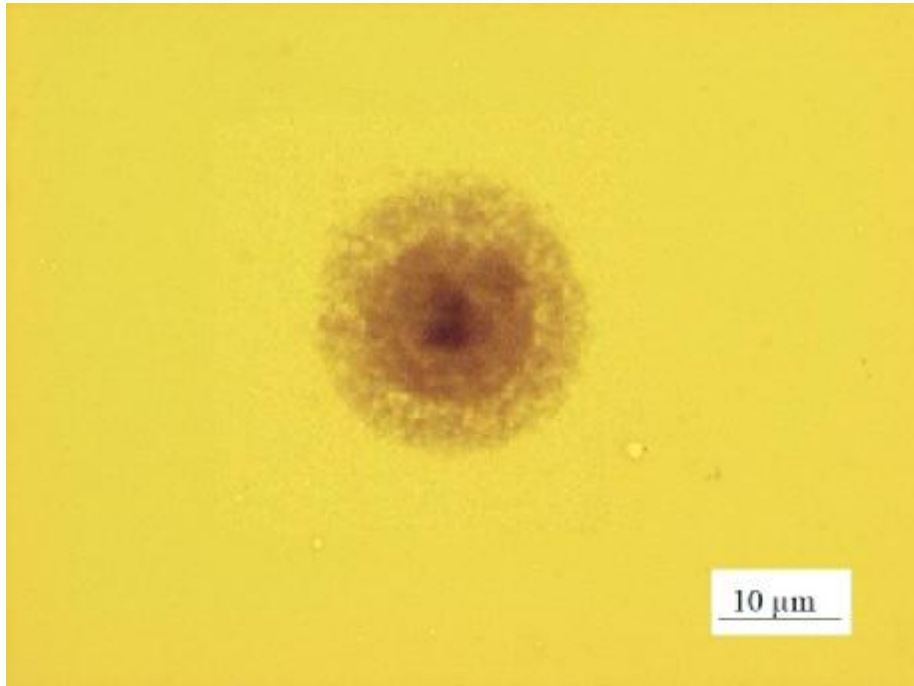
3.7.3.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binukleer) toplam 1000 hücre (Şekil 3.8) incelenmiş (4 kişi 4000 hücre) ve bu binukleer hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan mikronukleuslu iki nukleuslu hücre %' si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronukleus sayısından MN %' si hesaplanmıştır. Binukleer hücre ve mikronukleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)' e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nukleuslar belirgin nukleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nukleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN' lar sadece ana nukleusun $1/3$ ' ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN' lar ana nukleus gibi boyanmalıdır; (6) MN' lar ana nukleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır. Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nukleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkanı vermesidir. Bu durum, sitokalsin-B ilavesinin ardından oluşan bir nukleuslu, iki nukleuslu, multinukleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nukleus bölünme indeksi (NBI) Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

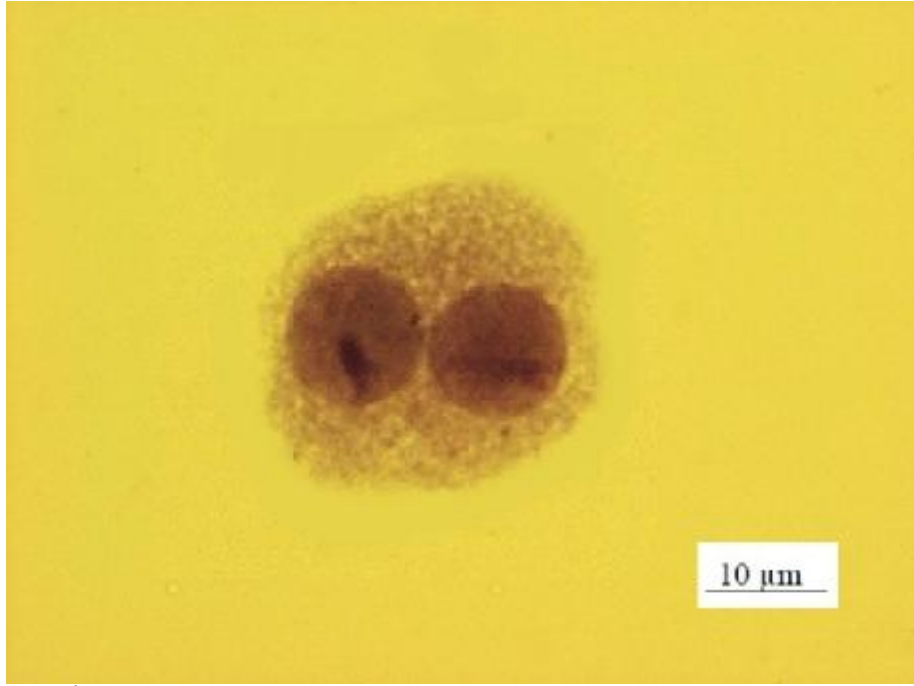
$$NBI = (MI + 2 \times MII + 3 \times MIII + 4 \times MIV) / N$$

Formüle göre, *MI* bir nukleuslu (Şekil 3.7), *MII* iki nukleuslu (Şekil 3.8), *MIII* üç nukleuslu (Şekil 3.9), *MIV* dört nukleuslu (Şekil 3.10) hücrelerin sayısını, *N* ise

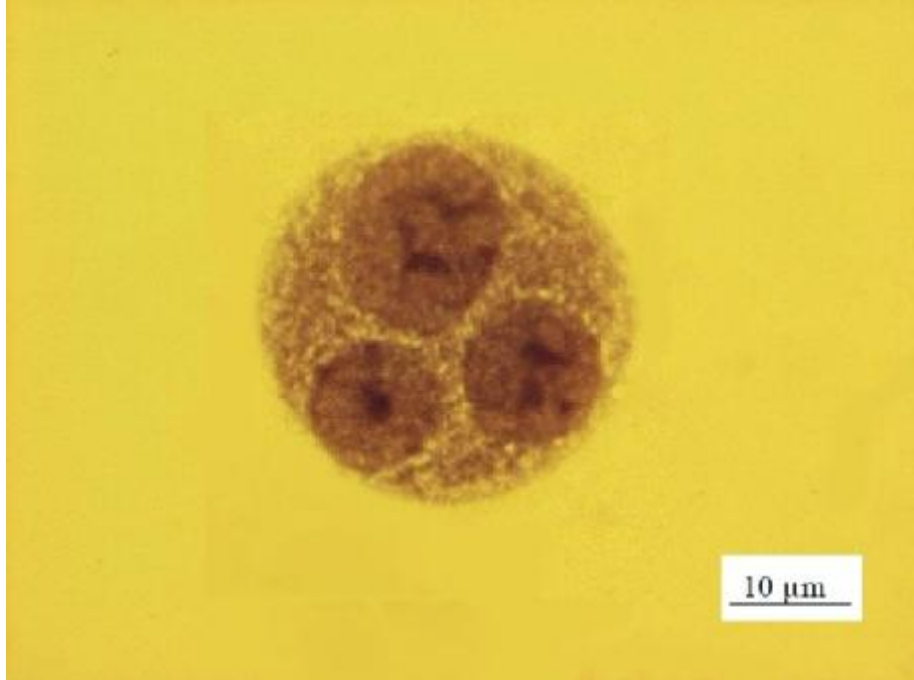
toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI' nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN oluşumunu saptamak için incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişi 4000 hücre) incelenmiştir.



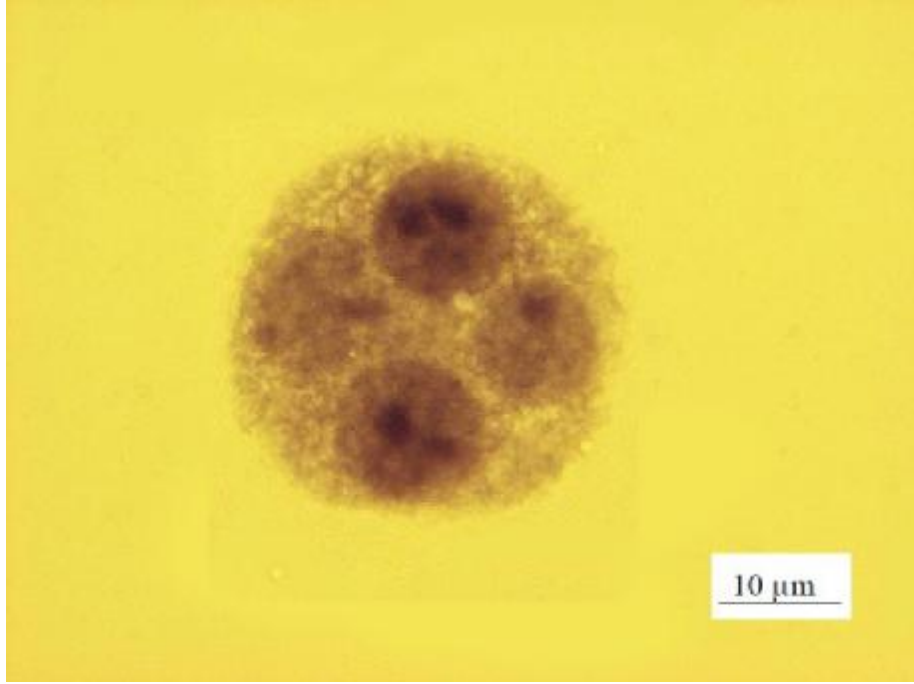
Şekil 3.7. Bir nükleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.8. İki nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.9. Üç nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.10. Dört nukleuslu hücre (X1000).

3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesinde 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, sık rastlanan ve ilginç olan KA' lam, mikronukleuslu binukleer hücreler ile 1, 2, 3, 4 nukleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, MI, PI, MN ve NBI parametrelerine ait veriler için her bir muameleli grubun ortalamaları ile kontrol kültürlerinin ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi metodu ile kontrol edilmiştir. Konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r)

bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir. Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. 4-Metilimidazol' un İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1.1. 4-Metilimidazol' un Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Dört farklı konsantrasyondaki (300, 450, 600, 750 µg/ml) 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid sayıları (KKD/Hücre) çizelge 4.1.' de görülmektedir. 4-Metilimidazol, 24 saatlik muameleli kültürlerde en yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik muamele süresinde ise tüm konsantrasyonlarda KKD' yi önemli derece de uyarmıştır (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1). Ancak KKD' deki bu uyarılma pozitif kontroldeki (MMC) kadar olmamıştır.

4-MEI hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde KKD' yi konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı.

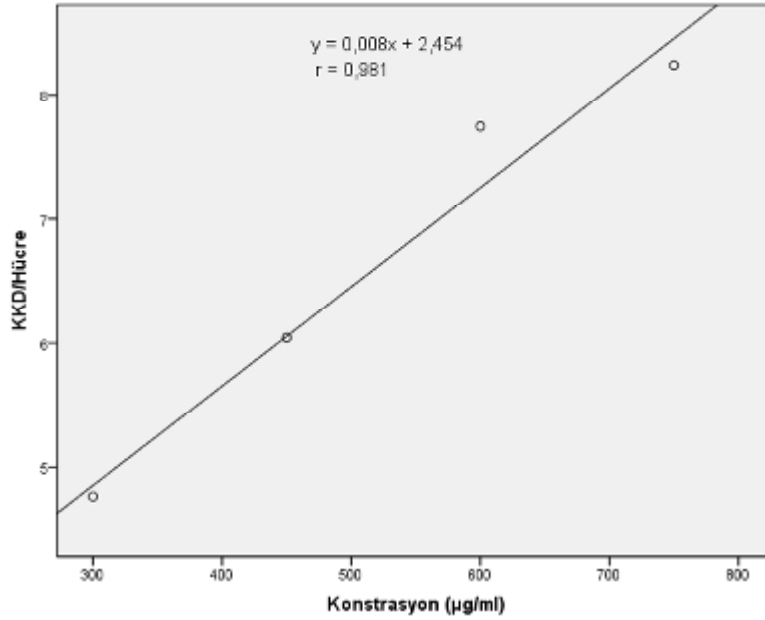
Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Min-Max KKD	KKD/Hücre \pm SH
Kontrol	--	--	0-14	4.55 \pm 0.442
MMC (PK)	24	0.25	8-80	23.18 \pm 1.94
4-Metilimidazol	24	300	0-22	4.76 \pm 0.187 b ₃
		450	0-24	6.04 \pm 0.604 b ₃
		600	0-64	7.74 \pm 0.191 a ₃ b ₃
		750	1-40	8.24 \pm 0.289 a ₃ b ₃
MMC(PK)	48	0.25	5-89	31.31 \pm 1.94
4-Metilimidazol	48	300	2-46	6.39 \pm 0.354a ₁ b ₃
		450	3-31	9.04 \pm 0.561a ₂ b ₃
		600	0-42	11.24 \pm 0.9a ₂ b ₃
		750	2-39	12.54 \pm 0.41 a ₃ b ₃

a: Kontrol ile; b: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

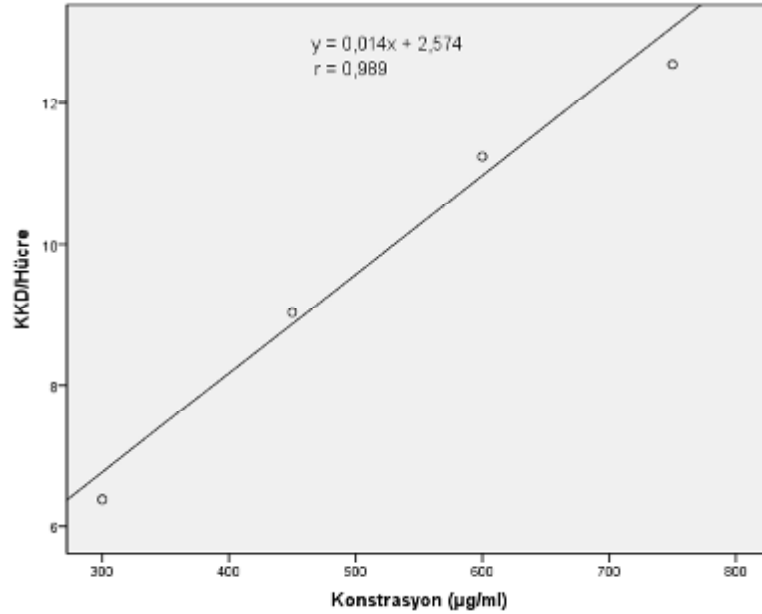
a₁b₁: P \leq 0.05; a₂b₂: P \leq 0.01; a₃b₃: P \leq 0.001



Şekil 4.1. KKD uyarılmış metafaz plağı (14 KKD)(450µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♀).(X1000)



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre' nin konsantrasyona bağlı artışı gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,019).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre' nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,011).

4.1.1.2. 4-Metilimidazol' un Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Dört farklı konsantrasyonda (300, 450, 600, 750 µg/ml) 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde saptanan kromozom anormallik çeşitleri, kromozom anormalliğine sahip anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormallikleri (KA/Hücre) çizelge 4.2.' de görülmektedir.

4-Metilimidazol, 24 ve 48 muamele sürelerinde tüm konsantrasyonlarda anormal hücre (AH) %' sinin kontrole nazaran artmasına neden olmuş 48 saatlik muamelede ise bu artış konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca KA/Hücre sayısı 24 ve 48 saatlik muamelelerde ve tüm konsantrasyonlarda istatistiki bakımdan önemli bir artış göstermiştir (Çizelge 4.2). Yani 4-Metilimidazol kromozom aberasyonu oluşumunu uyarmıştır. Ayrıca KA' daki artış 48 saatlik muameleli kültürün en yüksek konsantrasyonunda, pozitif kontrol olan MMC' deki kadar olmuştur.

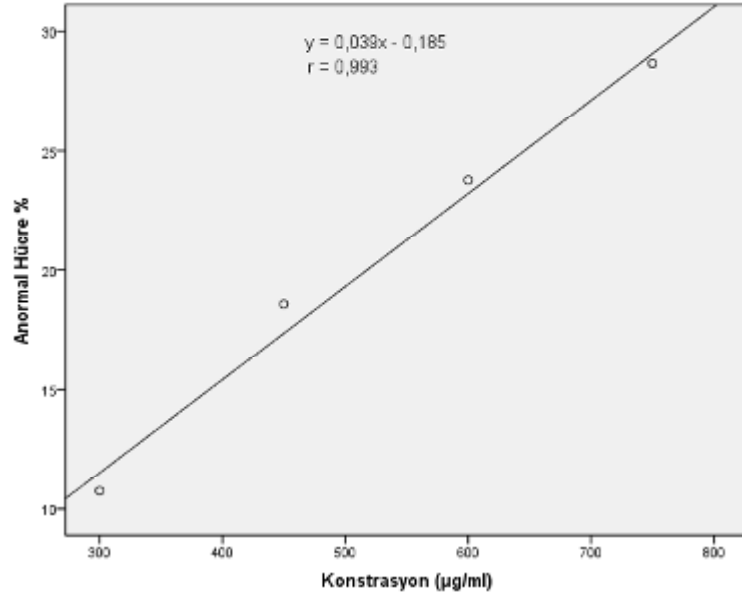
4-MEI, 48 saatlik muameleli kültürlerde hem kromozom aberasyonlu hücre oranının (KA' ıl hücre yüzdesinin) hem de hücre başına düşen KA sayısının (KA/hücre) konsantrasyona bağılı olarak artmasına neden olmuştur (Şekil 4.4) (Şekil 4.5).

4-Metilimidazol ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid tipi anormalliklerden özellikle kromatid kırığı (Şekil 4.6., Şekil 4.7 ve Şekil 4.8.) en fazla görülen anormallik arasında sayılabilir. Kromozom tipi anormalliklerden özellikle kromozom kırığı (Şekil 4.8), fragment (Şekil 4.8 ve 4.9) ve kardeş kromatid bileşimi (KKB) (Şekil 4.10) gibi yapısal anormalliklere ve poliploidi (Şekil 4.11) gibi kromozom sayı anormalliklerine rastlanmıştır. Ayrıca 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 saat muamele edilen kültürlerde en düşük konsantrasyon (300µg/ml) hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda dikkate değer miktarda kromozom kontraksiyonu gözlenmiştir (Şekil 4.12).

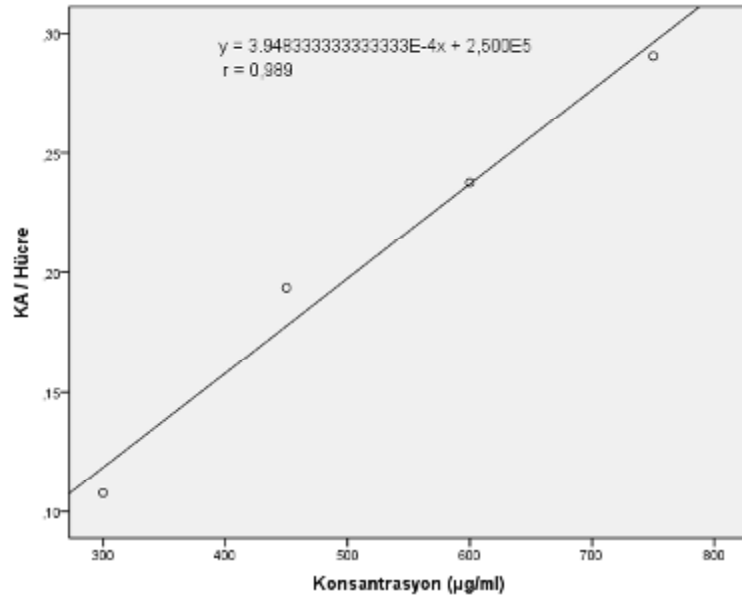
Çizelge 4.2. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol İle 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/Hücre.

Test Maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri										Anormal Hücre (%)' si ± SH	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B'	B''	F	T	DS	KD	KKB	P				
											B'	B''		
Kontrol	--	--	5	2	-	1	-	5	10	1	4.82±0.09	0.0482±0.001		
MMC(PK)	24	0,25	57	54	11	2	-	14	23	1	22.01±1.05	0.2201±0.01		
4-Metilimidazol	24	300	12	6	2	1	-	9	13	-	7.11±0.70a ₃ b ₃	0.0711±0.007a ₁		
		450	38	31	7	1	-	7	16	-	14.35±0.32 a ₃ b ₃	0.1435±0.003 a ₃ b ₃		
		600	46	28	4	1	-	8	22	3	16.69±0.14a ₃ b ₃	0.1670±0.001 a ₃ b ₃		
		750	76	39	19	1	-	8	25	-	17.14±0,83 a ₁ b ₂	0.1715±0.08 a ₃ b ₁		
MMC(PK)	48	0,25	82	70	24	3	-	15	31	2	30.82±4.95	0.3084±0.049		
4-Metilimidazol	48	300	30	10	2	2	-	9	11	-	10.75±0.42 a ₃ b ₃	0.1075±0.004 a ₃ b ₃		
		450	39	25	4	1	-	14	17	-	18.59±1.71 a ₂ b ₂	0.1859±0.012 a ₃ b ₂		
		600	50	26	4	1	-	13	21	1	23.78±3.27 a ₃ b ₁	0.2378±0.016 a ₃ b ₁		
		750	57	32	7	1	-	21	24	1	28.67±1.35 a ₃	0.2905±0.012 a ₃		

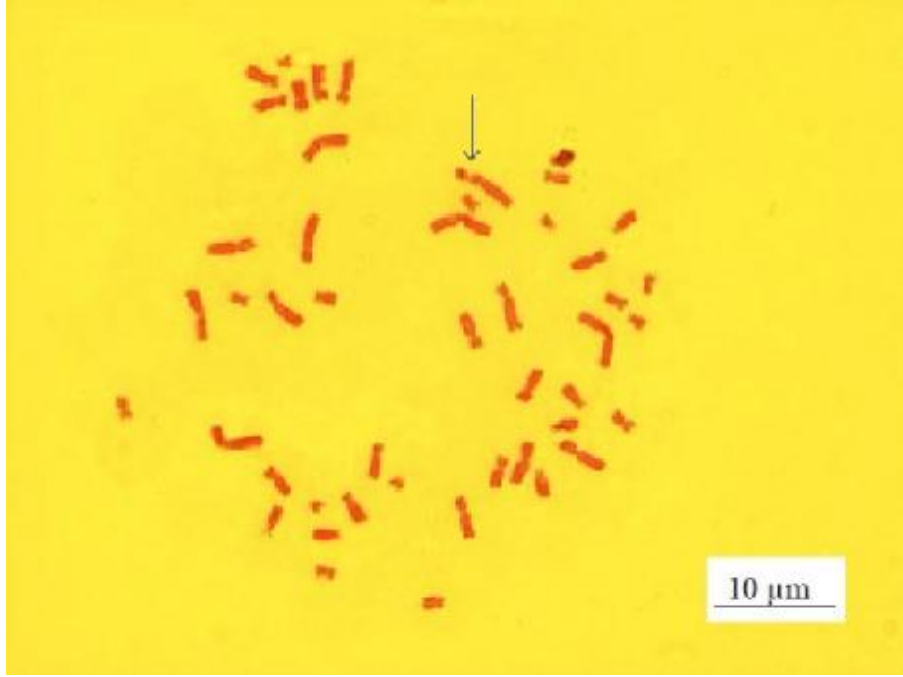
B' : Kromatid iriği, B'' : Kromozom kırığı, F: Fragment, T: Translokasyon, DS: Disentrik kromozom, KD: Kromatid değişimi, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (Sister chromatid union), P: Poliploidi
a: Kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile karşılaştırılmada fark önemlidir. a₁b₁: P < 0.05; a₂b₂: P < 0.01; a₃b₃: P < 0.001



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde AH%’sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,007)



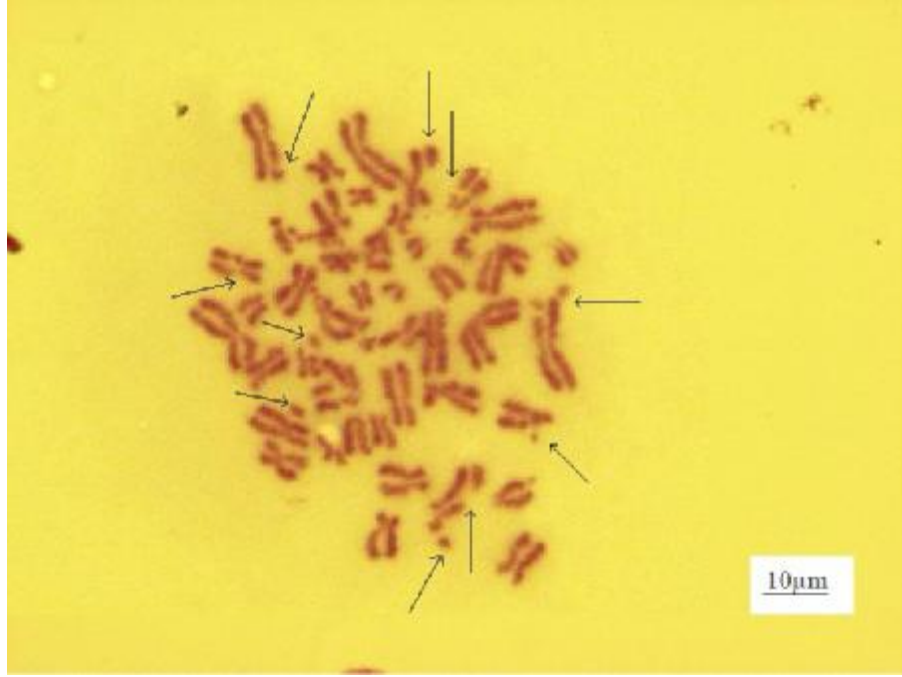
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KA/Hücre’ nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,011)



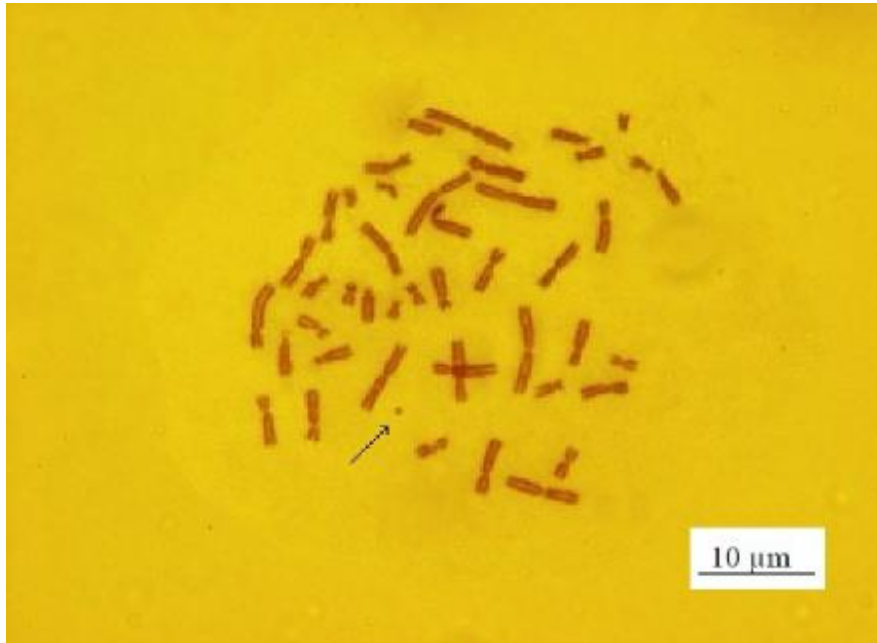
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (300µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000).



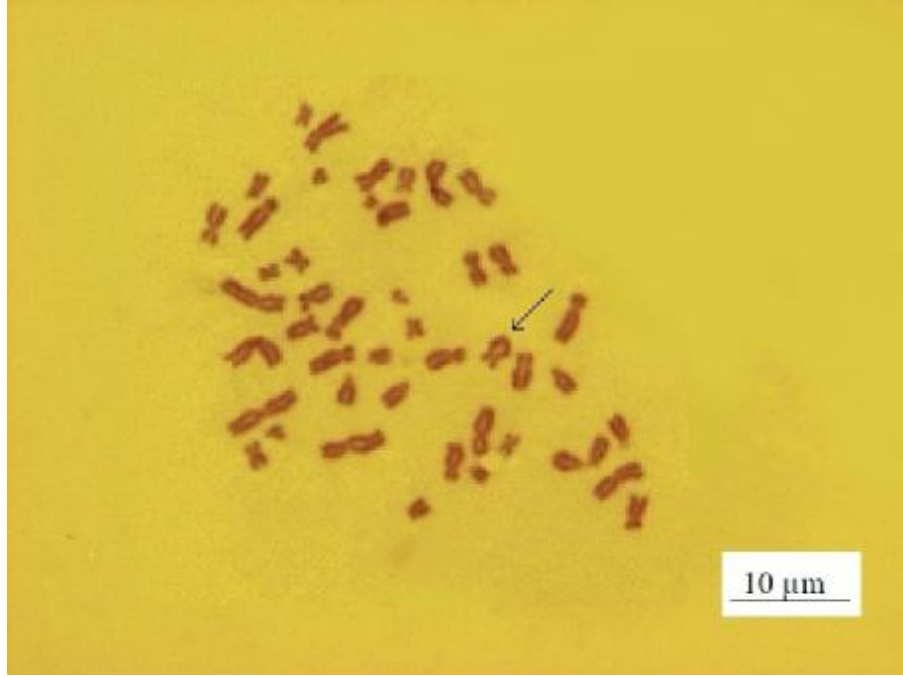
Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (600µg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000).



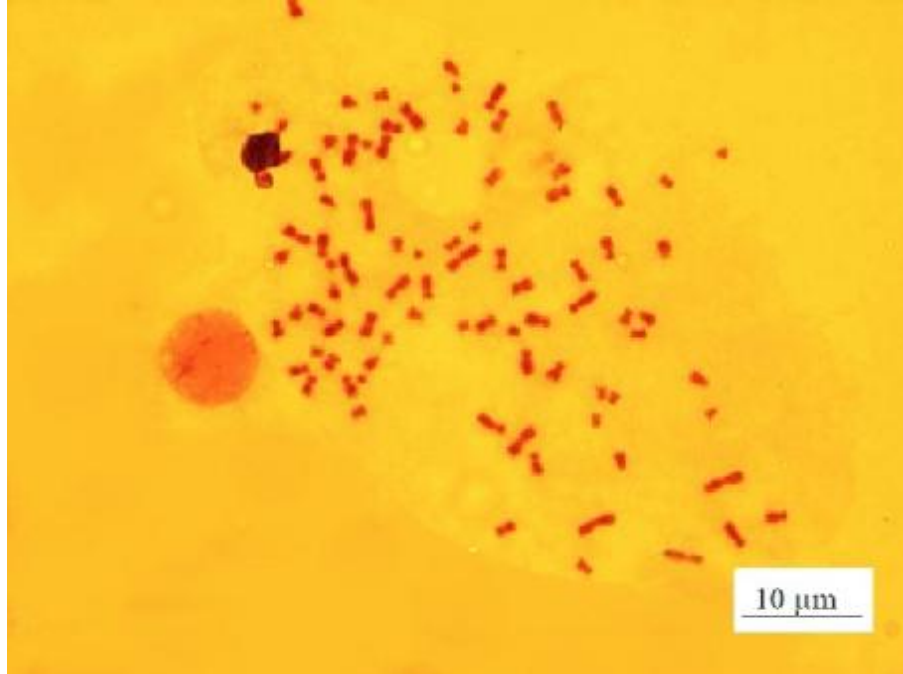
Şekil 4.8. Kromatid kırıkları (B'), kromozom kırıkları (B'') ve fragmentler (F) bulunan metafaz plağı (750 μg/ml 4-Metilimidazol, 48 saatlik muamele,). (X1000).



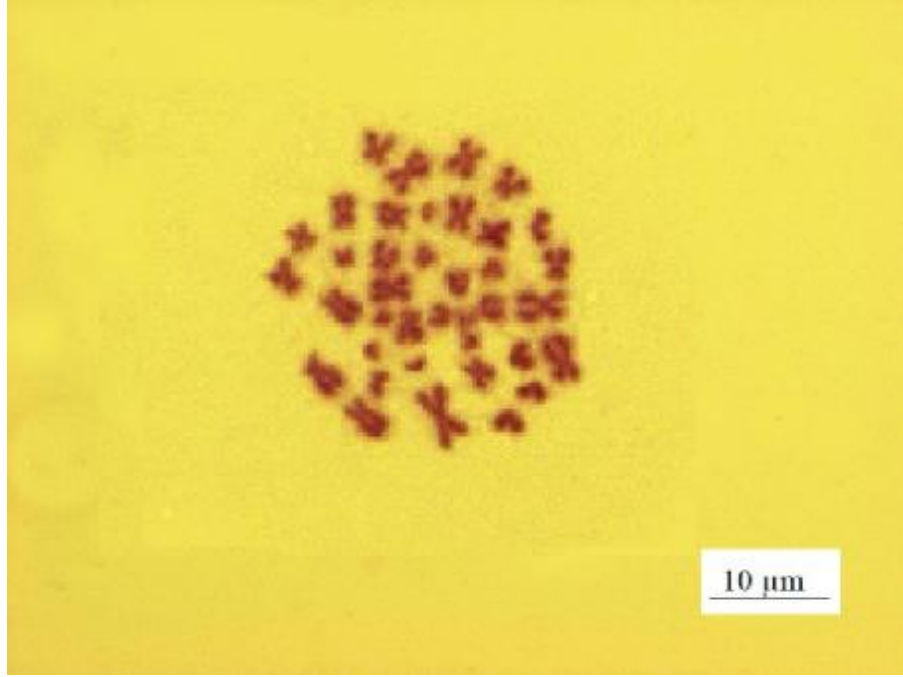
Şekil 4.9. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (750 μg/ml 4-Metilimidazol, 24 saatlik muamele, ♀). (X1000).



Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (450 µg/ml 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele, ♂). (X1000).



Şekil 4.11. Poliploid hücre kromozomları (450 µg/ml 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele, ♂). (X1000).



Şekil 4.12. Kontraksiyonlu kromozoma sahip metafaz plağı (450 µg/ml 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele, ♀). (X1000).

4.1.1.3. 4-Metilimidazol' un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

4-Metilimidazol' un DNA replikasyonu üzerindeki etkisi proliferasyon indeksi (PI) (Replikasyon indeksi (RI))' nin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeks (MI)' in bulunmasıyla saptanmıştır.

4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen kültürlerde PI kontroldekine nazaran genel olarak düşmüş, ancak bu düşüşün en yüksek iki konsantrasyonundaki 4-MEI ile muameleli kültürlerde önemli olduğu saptanmıştır. 750 µg/ml 4-MEI ile muameleli kültürdeki PI' deki düşüş pozitif kontroldekinden de fazla olmuştur (Çizelge 4.3.). 48 saat 4-MEI ile muamele edilen kültürlerde tüm konsantrasyonlarda test maddesi, kontroldekine nazaran PI' de önemli derecede düşmesine neden olmuştur. PI' deki bu düşüş 450 µg/ml ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında pozitif kontroldeki kadar olmuş, 750 µg/ml konsantrasyonundaki düşüş ise pozitif kontroldekinden de daha fazla olmuştur (Çizelge 4.3.). 48 saatlik muameleli

kültürlerdeki PI' deki düşüş konsantrasyona bağlı bir durum göstermiştir (Şekil 4.13). Yani 4-MEI DNA replikasyonunu önemli derecede engellemiştir.

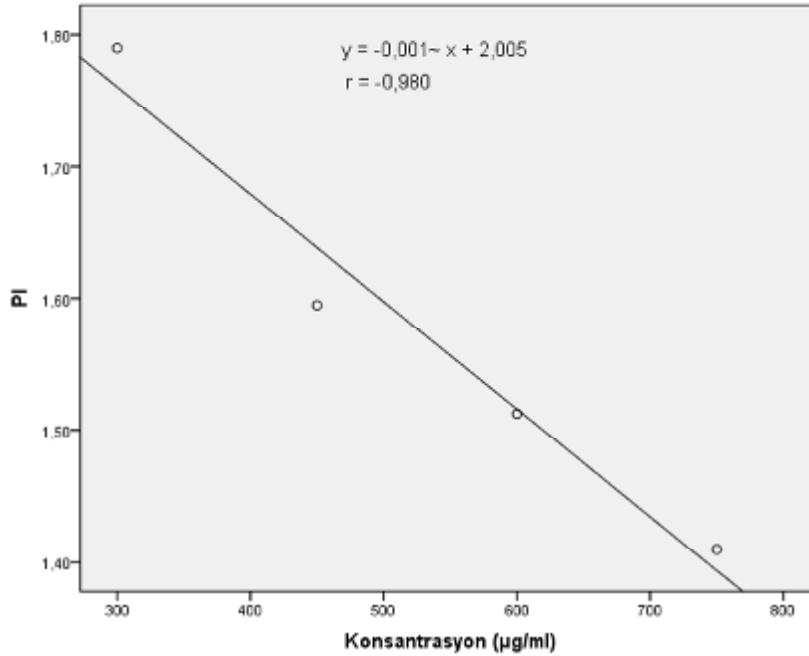
24 saatlik muameleli kültürlerde en düşük konsantrasyon hariç diğer üç konsantrasyonda MI' nin kontrole nazaran düşmesine neden olmuştur (Çizelge 4.3.). Ayrıca en yüksek konsantrasyonda ise MI' deki düşüş pozitif kontroldeki kadar olmuştur (Çizelge 4.3.). 48 saatlik muameleli kültürlerde ise 4-MEI, tüm konsantrasyonlarda MI' nin kontroldekine nazaran önemli derecede düşmesine yol açmıştır (Çizelge 4.3.). Bu düşüş tüm konsantrasyonlarda pozitif kontroldeki kadar olmuştur. PI ve MI' deki bulgular birlikte değerlendirilecek olursa 4-MEI, hem DNA replikasyonunu hem de hücre bölünmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Çizelge 4.3. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI) ve Mitotik İndeks (MI).

Test Maddesi	Muamele		M1	M2	M3	PI±SH	MI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)					
Kontrol	--	--	149	114	137	1.9675±0.02	5.732±0.46
MMC(PK)	24	0.25	246	91	63	1.5800±0.08	2.615±0.41
4-MEI	24	300	197	120	83	1.7150±0.08	5.215±0.85
		450	190	132	78	1.7200±0.09	3.627±0.59 a ₁
		600	256	102	44	1.5425±0.07 a ₂	4.115±0.34 a ₁ b ₁
		750	273	85	42	1.4225±0.03a ₃ b ₁	2.857±0.43 a ₂
MMC(PK)	48	0.25	239	105	56	1.5425±0.04	1.473±0.37
4-MEI	48	300	176	132	92	1.7900±0.05a ₁ b ₁	3.183±0.79 a ₁
		450	215	132	53	1.5950±0.02 a ₃	2.415±0.55 a ₂
		600	247	113	40	1.5125±0.07a ₂	2.508±0.49 a ₂
		750	261	114	25	1.4100±0.01a ₃ b ₂	1.565±0.43 a ₂

a: Kontrol ile; b: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁: P≤0.05; a₂b₂: P≤0.01; a₃b₃: P≤0.001



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde PI' nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,048).

4.1.1.4.4-Metilimidazol' un Mikronukleus (MN) Ölçümü ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

4-Metilimidazol 24 saatlik muameleli kültürlerde en yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik kültürlerde ise hemen hemen tüm konsantrasyonlarda MN oluşumunu önemli derecede artırmıştır (Çizelge 4.4). Bazı binukleer hücrede bir mikronukleus, bazı hücrelerde ise iki mikronukleuslara rastlanmıştır (Şekil 4.14 ve Şekil 3.15).

4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen kültürlerde tüm konsantrasyonlarda NBI kontrolüne nazaran önemli derecede düşmüştür (Çizelge 4.4). Bu düşüş en düşük iki konsantrasyonda (300 ve 450 µg/ml) pozitif kontroldeki kadar, yüksek iki konsantrasyonda (600 ve 750 µg/ml) ise pozitif kontroldekinden daha fazla olmuştur. Bu muamele süresindeki NBI' nin düşüşü konsantrasyona bağlı durum göstermiştir (Şekil 4.16).

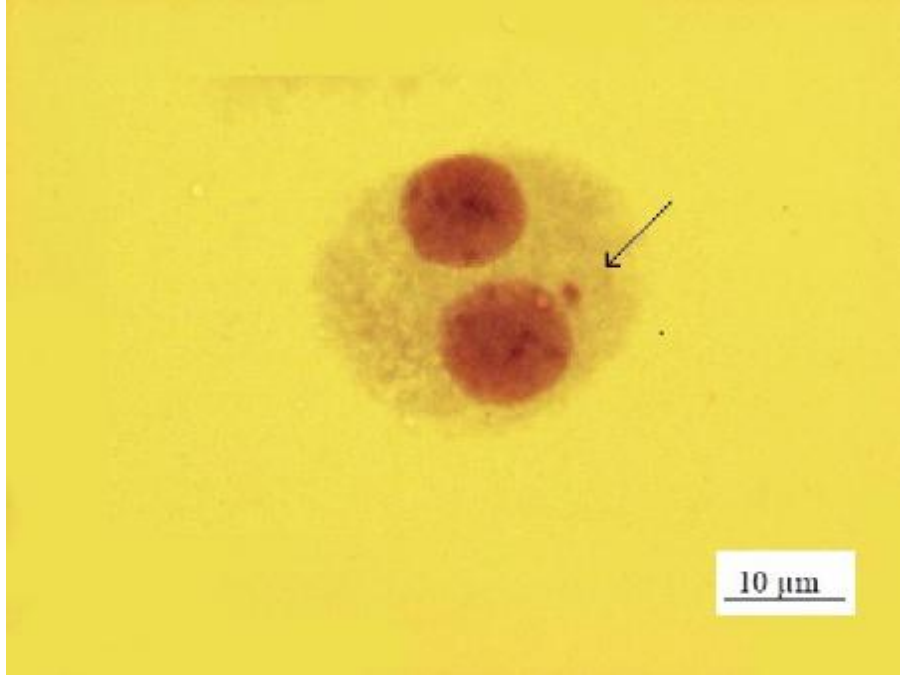
48 saat muamele edilen kültürlerdeki NBI' deki düşüş kontroldekinden önemli derecede fazla olmuştur. Bu muamele süresinde 450 µg/ml ve 600 µg/ml konsantrasyonlarda 4-MEI ile muamele edilen kültürlerde NBI pozitif kontroldekinden önemli derecede düşük, en düşük (300 µg/ml) ve en yüksek (750 µg/ml) konsantrasyonlarda ise pozitif kontroldeki kadar bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Sonuç olarak farklı konsantrasyonlardaki 4-MEI ile muamele edilen kültürlerde test maddesinin nukleus bölünmesi üzerindeki etkisi genel olarak hücre proliferasyonu ve mitoz bölünme üzerindeki etkisine benzemektedir. Çünkü, özellikle 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlardaki PI ve MI parametrelerindeki düşüş kontroldekine nazaran önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

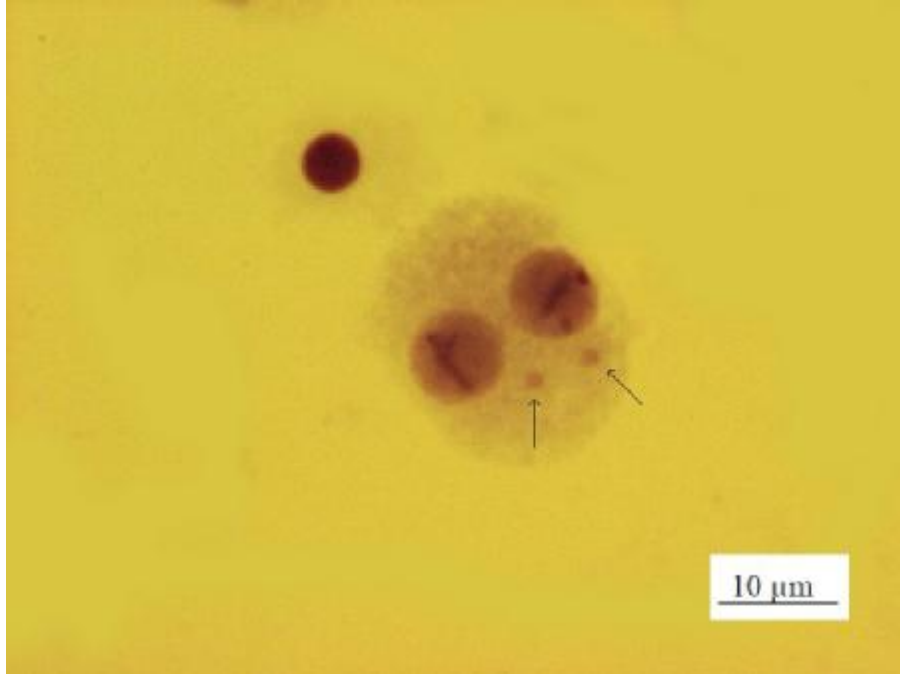
Çizelge 4.4. Değişik Konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %' si, MN %' si ve NE

Test Maddesi	Muamele		MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %' si	MN %' si	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			1	2	3	4	
Kontrol	--	--	0.237±0.05	0.65±0.06	2403	1272	18	13	1.5145 ± 0,06
			0.812±0.04	2.17±0.3	2858	1105	20	17	1.2970±0,02
MMC(PK)	24	0,25	0.5±0.19	0.7±0.08 b ₃	3064	873	33	30	1.2505±0,02 a ₂
			0.325±0.07	0.75±0.02 b ₂	3147	822	16	15	1.2248±0,03 a ₃
			0.725±0.11 a ₁	1.45±0.2 a ₂	3355	631	10	4	1.1658±0.02a ₃ b ₁
			1.462±0.38 a ₂	1.9±0.3 a ₂	3407	584	8	1	1.1507±0.02 a ₃ b ₁
MMC(PK)	48	0,25	2.462±0.13	4.12±0.9	3047	929	17	7	1.2460±0.05
			0.487±0.06 a ₁ b ₂	1.05±0.02 a ₁	3296	680	12	12	1.1858±0.02 a ₃
			0.712±0.09 a ₁ b ₁	1.36±0.1 a ₂ b ₁	3484	506	8	2	1.1418±0.02 a ₃ b ₁
			0.712±0.16	1.3±0.2 a ₁	3625	365	6	4	1.0972±0.007a ₃ b ₃
4-Metilimidazol	750	750	1.845±0.24 a ₁	2.6±0.2 a ₂ b ₁	3762	235	2	1	1.204±0.14

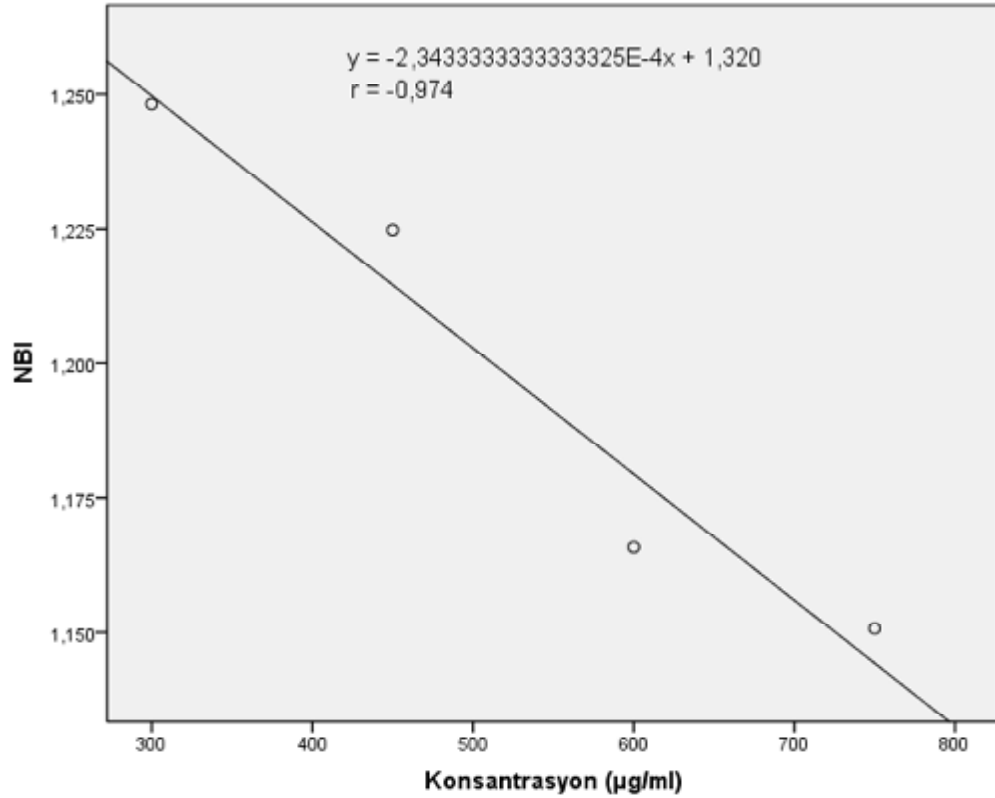
a: Kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile karşılaştırılmada fark önemlidir. a₁; P < 0.05; a₂; P < 0.01; a₃; P < 0.001



Şekil 4.14. Tek mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (600 µg/ml, 48 saatlik muamele, ♂). (X1000).



Şekil 4.15. İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (750 µg/ml, 24 saatlik muamele, ♀). (X1000).



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda 4-Metilimidazol ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI' nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P=0,026).

4.2. Tartışma

4.2.1. 4-Metilimidazol' un İnsan Periferal Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Aberasyonu (KA) Üzerindeki Etkisi

Bu çalışma 4-Metilimidazol' un KKD' yi uyur uyarmadığını araştıran ilk çalışma olup, bu çalışmada test maddesinin insan periferal lenfositlerinde KKD' yi konsantrasyona bağlı olarak uyardığı saptanmıştır. Alija ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada 4-Metilimidazol ile aynı grupta olan beta karotenin sadece en yüksek dozda (10µM) KKD' yi artırdığını saptamışlardır. Sentetik renklendiriciler grubuna dahil olan azo boyalardan sunset sarısı ile yapılan çalışmada Sayed ve ark. (2012) test maddesinin KKD' yi ciddi şekilde attırdığını ve sunset sarısının genotoksik

olduğunu açıklamıştır. Yine bir azo boya olan tartrazin ve amarant ile yapılan çalışmada Mpountoukasa ve ark. (2010) insan periferik lenfositlerinde bu maddelerin genotoksik olup olmadığı araştırmışlar ve araştırmacılar tartrazin ve amarantın kontrol grubuna göre KKD' yi artırdığını bildirmişlerdir. Giri ve ark. (1988) 4-Metilimidazol ile aynı gruba ait olan turuncu G boyasının fare kemik iliği hücrelerinde KKD' yi konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptamışlardır. Yine Giri ve ark. (1990) yaptıkları çalışmada hızlı yeşil FCF' nin farelerin kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmayı hedeflemişler ve araştırmacılar hızlı yeşil FCF' nin KKD' yi ciddi anlamda uyardığını belirtmişlerdir. Giri ve ark. (2006) sentetik gıda boyaları grubuna giren yeşil S' nin fare kemik iliği hücrelerinde 50-200 mg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonlarında yeşil S' nin KKD' yi uyarmadığı, fakat en yüksek dozda (400 mg/kg vücut ağırlığı) KKD' yi uyardığını saptamışlardır. Bizim ve diğer araştırmacıların sonuçlarına göre değişik gıda renklendiricileri KKD' yi uyarmaktadır. Bu durumda, gıda renklendiricilerin genotoksik risk taşıdıkları söz konusu olabilir.

Yukarıdaki sonuçlara karşılık Zuno ve ark. (1994) sentetik boyalar grubundan eritrozinin B6C3F1 farelerinde kemik iliği hücrelerinde eritrozinin kontrole nazaran KKD' yi düşürdüğünü saptamışlardır. Loprieno ve ark.(1992) in vitro olarak Çin hamster yumurtalık hücrelerinde karminik asidin genotoksik olup olmadığını araştırmışlar ve araştırmacılar karminik asidin KKD' yi uyardığını açıklamışlardır. Gasiorowski ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada *Aronia melanocarpa*'dan izole ettikleri antosiyaninlerin benzo(a)pyrene ve 2-amino fluorene' in mutajenik etkilerine karşı antimutajenik etkilerini Ames testi ve in vitro olarak insan lenfositlerinde KKD testi ile araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucuna göre antosiyaninlerin antimutajenik olduğu bildirilmiştir.

Yukarıdaki gıda renklendiricileri ile yapılan çalışmaların sonuçları toplu olarak değerlendirilecek olursa çoğu renklendiriciler KKD' yi uyarır. Bazıları ise KKD' yi uyarır ve uyarıcı mutajenlerin etkisini de azaltmışlardır. Yapılan bu çalışmalardaki sonuçların farklılık göstermesi test edilen gıda boyalarının her birinde yapısal farklılıklarının olduğundan kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada insan periferel lenfositlerinde 4-Metilimidazol' un hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde kromozom aberasyonunu konsantrasyona bağlı olarak uyardığı saptanmıştır. Özellikle 4-Metilimidazol kromatid kırığı ve kromozom kırıklarına neden olmaktadır. Benzer çalışmalar 4-Metilimidazol' un içindeki renklendirici gruplarında da yapılmıştır. Abe ve Sasaki (1976) içlerinde dört farklı azo boyanında bulunduğu 33 farklı kimyasal maddenin Çin hamster yumurtalık hücrelerinde mutajenesinin araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre azo boyaların hepsi konsantrasyona bağlı olarak kromozom aberasyonunu artırmıştır. Patterson ve Butler (1982) tartrazinin memeli hücrelerindeki genotoksik etkisini araştırmayı hedeflemişlerdir. *Muntiacus muntjac* (geyikgillerden; hint munçağı) in vivo lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada kromozom aberasyonu testi uygulanmış ve tartrazin ile muamele edilen grupların kontrol grubuna göre KA' y uyardığı belirlenmiştir. Roychoudhury ve Giri (1989) indigo karmin, turuncu G, tartrazinin *Allium cepa* hücrelerinde genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucun göre bu test maddelerinin yüksek dozunda kromozom kırıklarına rastlanmış ve KA' y uyardıkları saptanmıştır. Ozaki ve ark. (1998), red 3, red 40, red 102, blue 1, blue 2 sentetik boyalarının fare kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmıştır. Çalışma sonucuna göre bu beş sentetik boyandan mavi 2 boyası hariç diğerlerinin KA' y uyarmadığı saptanmıştır. Giri ve ark. (2006), yeşil G sentetik gıda boyasının in vivo fare kemik iliği hücrelerinde KA' y artırdığını saptamışlardır. Çalışma sonucuna göre KA artışı kontrole göre sadece 200 ve 400 mg/kg vücut ağırlığı da saptanmıştır. Agarwala ve ark. (1994), aspir sarısı ve kokum kırmızısı Swiss albino erkek farelerinde klastojenik etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan KA testine göre az da olsa klastojenik olduğu ortaya çıkmıştır.

Görüldüğü gibi birçok araştırmacının gıda renklendiricileriyle yaptığı kromozom aberasyonları çalışmalarından elde ettiği sonuçlar bizim sonuçları destekler yöndedir.

Çalışmamızın sonucuyla farklılık gösteren sonuçlara ulaşılan bazı çalışmalar da vardır.

Brusick ve ark. (1992) karamelin 4. grubunun Çin hamster üreme hücrelerindeki kromozom aberasyonuna uyarıp uyarmadığını araştırmışlar ve araştırmacılar test maddesinin KA' y uyarmadığını saptamışlardır. Allen ve ark (1992) yaptıkları çalışmada yine karamelin alt grubu ile (3.grup) Çin Hamster üreme hücrelerine olan genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre karamelin bu alt grubu KA' y uyarmamıştır. Das ve Mukherjee (2004) sentetik boyaların sıçanlarda in vivo kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre çalışılan sentetik boyaların mutajenik ve genotoksik olmadığı açıklanmıştır. Görüldüğü gibi bazı araştırmacıların sonuçları bizim çalışma sonucumuzdan farklı çıkmıştır. Bunun nedeni de test maddelerinin farklı olmasıdır.

Ayrıca bazı gıda renklendiricilerinin de antiklastojenik etkilerinin olduğu saptanmıştır. Örneğin; Mukherjee ve ark. (1991) beta karotenin in vivo fare kemik iliği eritrositlerinde siklofosfamidin mutajenik etkisine karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada KA ve MN testlerinden yararlanılmış ve çalışma sonucuna göre eritrozinin sıçan eritrositlerinde siklofosfamidin mutajenik etkisini düşürdüğü saptanmıştır. Loprieno ve ark. (1992) karminik asitin Çin Hamster yumurtalık hücrelerinde KA testi ile genotoksik etkisi incelemiştir. Araştırma sonucuna göre KA' y uyarmamıştır. Ragunathan ve Panneerselvam (2007) yaptıkları çalışmalarında kurkuminin, *Allium cepa*'nın kök ucu hücrelerinde sodyum azidin (SA) neden olduğu kromozom aberasyonlarına karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada SA' m muameleli gruplarda oluşturduğu kromozom aberasyonlarını kurkuminin azalttığı saptanmıştır. Kurkuminin bu çalışmada en iyi antimutajenik etkiyi gösterebildiği konsantrasyon 5µg/ml' dir.

Bu çalışmada 4-MEI, KKD ve KA' y uyarmıştır. Bu sonuçlara göre 4-MEI genotoksik risk taşımaktadır. Birçok gıda renklendiricisiyle yapılan çalışmalarda bizim sonuçlarımızı destekleyen sonuçlar alınmıştır. Ancak bazıları ise KKD ve KA' y uyarmamış, bazıları ise bilinen genotoksinlerin genotoksik etkilerini azaltmışlardır. Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulacak olursa gıda renklendiricilerin kullanıma sunulmadan önce mutlaka genotoksik risk taşıyıp taşımadıklarının araştırılması gerekir.

4.2.2.4-Metilimidazol' un Mikronukleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri

Bu çalışma, 4-MEI' nin mikronukleus oluşumu üzerindeki etkisini araştıran ilk araştırmadır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer besin renklendiricilerinin MN oluşumu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarda elde edilen sonuçlarla karşılaştırılacaktır. 4-Metilimidazol 24 saatlik muamele süresinde sadece en yüksek iki konsantrasyonda, 48 saat muamele süresinde ise tüm konsantrasyonlarda kontrole nazaran MN oluşumunu artırmıştır.

Adams ve ark. (1992) karamelin Çin Hamster yumurtalık hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada yararlanılan MN testi sonuçlarına göre karamelin sadece yüksek dozda mikronukleus oluşumunu arttırdığını saptamışlardır.

Roychoudhury ve Giri (1989) indigo karmin, turuncu G, tartrazinin *Allium cepa* hücrelerinde genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada test maddelerini genotoksik etkisi MN testi ile değerlendirilmiş ve çalışma sonucuna göre bu test maddelerinin yüksek dozunda kromozom kırıklarına rastlanmış ve MN oluşumunu uyardıkları saptanmıştır. Aynı çalışmada tartrazin ve eritrozinin *Allium cepa* üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre tartrazin ve eritrozinin poliploidi hücre oluşumunu ciddi bir şekilde uyararak, yüksek dozda mikronukleus oluşumlarını uyardığını saptamışlardır. Macioszek ve Kononowicz (2004) yaptıkları çalışmada quinoline sarı ve brilliant black BN insan periferik lenfositlerinde mikronukleus oluşumunu uyarıp uyardıklarını araştırmışlardır. Araştırma sonucuna göre her iki test maddesinin de mikronukleus oluşumunu arttırmıştır. Beije (1987), bir azo boya olan direkt black 38' in vivo sıçan kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışma sonucuna göre test maddesinin mikronukleus oluşumunu arttırdığı saptanmıştır. Lima ve ark. (2003) doğal renklendirici grubuna giren annatto boyasının fare kemik iliği hücrelerinde en yüksek dozda (10.670 ppm) mikronukleus oluşumunu arttırdığı saptamışlardır. El-Makawy ve El-Ashmaoni (2003), yapmış oldukları çalışmada Beta karotenin erkek ve dişi sıçanlarda MNPCE (mikronukleuslu polikromatidli eritrosit)' de MN oluşumunu uyardığını bu nedenle genotoksik

olduğunu saptamışlardır. Poula ve ark. (2009), amarant, sunset sarı, tartrazin gibi azo boyaların fare barsak hücrelerini genotoksik olarak etkisinin olup olmadığını MN testi ile araştırmışlardır. Boyaları farelere gavaj yöntemiyle 24 saatlik periyotlarla vermişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre boyaların tüm konsantrasyonlarda MN oluşumunu arttırmıştır. Görüldüğü gibi başka araştırmacıların gıda renklendiricileriyle yaptığı çalışmaların birçoğunda da gıda renklendiricilerinin MN oluşumunu uyardığı saptanmıştır. Bu sonuçlar bizim sonuçları destekler yöndedir. Bununla beraber bazı renk maddeleri ise MN oluşumunu uyardığı bilinen maddelerin etkilerini azalttığı belirlenmiştir. Örneğin;

Mukherjee ve ark. (1991) beta karotenin in vivo fare kemik iliği eritrositlerinde siklofosfamidin mutajenik etkisine karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada MN testinden yararlanılmış ve eritrozinin sıçan eritrositlerinde siklofosfamidin mutajenik etkisini düşürdüğü saptanmıştır. Cao ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Akriamid kanserojeninin HepG2 (hepatoselüler kanser) hücrelerinde meydana getirebileceği genotoksik hasarlara karşı kurkuminin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada yararlanılan mikronukleus testi sonuçlarına göre kurkumin tüketimi akrilamidin neden olduğu genotoksiteyi önlemek amacıyla makul bir yol olabileceği savunulmuştur. Serpeloni ve ark. (2011) 4-Metilimidazol ile aynı gruptan olan klorofilin cisplatinin mutajenik etkisine karşı fare kemik iliği hücrelerinde antigenotoksik etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucuna göre klorofilin cisplatinin mutajenik etkisini azalttığı açıklanmıştır. Santos ve ark. (2012), içerisinde annatto maddesi olan Bixa orella L. ekstraktının mikronukleus oluşumunu uyarmadığı saptanmıştır.

4.2.3.4-Metilimidazol' un Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

4-MEI' nin kültüre edilmiş insan lenfositlerindeki sitotoksik etkisi, proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeksi (MI) ve nukleus bölünme indeksi (NBI) bulunarak saptanmıştır.

Bu çalışma 4-MEI' nin insan periferal lenfositlerinde yapılan ilk sitotoksik çalışmadır. 4-MEI, PI' nin 24 saatlik muamelede en yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda PI' nin düşmesine neden olmuştur. Yani 4-MEI DNA replikasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. 4-MEI ile 24 ve 48 saat muamele edilen kültürlerdeki MI' deki düşüş PI' deki düşüşe benzemektedir. 4-MEI, 24 ve 48 saatlik muameleli kültürlerde ise tüm konsantrasyonlarda NBI' nin düşmesine yol açmıştır. Yani 4-MEI üç teste göre de sitotoksiktir. Gomes ve ark. (2013) sunset sarısı, bordo kırmızısı ve tartrazin sarısının *Allium cepa* L. kök meristematik hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamelede sitotoksitesini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışma sonucuna göre boyaların hücrelerde hücre sikluslarını inhibe ederek mitotik indeksi düşürdüğü gözlenmiş ve bu üç gıda boyasının da sitotoksik olduğu açıklanmıştır. Ying ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmada demir oksit nanopartiküllerinin in vitro olarak insan lenfositlerinde sitotoksik etkisini araştırmışlar ve demir oksidin yüzey alanı kaplama özelliğinden dolayı ortamdaki lenfositlerin yüzeyini kaplayarak hücreleri inhibe ettiğini saptamışlardır. Wise Sr. ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada gümüş nanopartiküllerin balık hücrelerinde sitotoksik olduğunu ve bunun nedeninde gümüş nanopartiküllerinin antibakteriyel ve antifungal özelliklerinden dolayı sitotoksik etki oluşturduğunu açıklamışlardır. Shi ve ark. (2006) kurkuminin insan over kanser hücreleri üzerinde antiproliferasyon ve apoptozis etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucuna göre kurkuminin hücre büyümesini engelleyerek ve apoptozisi harekete geçirerek kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellemekte ve apoptozisi uyarmaktadır.

Bizim ve diğer araştırmacıların sonuçlarını toplu olarak değerlendirecek olursak, bazı gıda renklendiricilerin gerek normal hücrelerde gerekse tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterdikleri, hücre bölünmesini baskı altına aldıkları ve apoptozise neden oldukları görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılan 4-metilimidazol' un KKD' yi ve KA' ıyhem kontrole nazaran hem de konsantrasyona bağlı olarak uyardığı saptanmıştır. MN oluşumunu ise genel olarak uyarılmış ancak bu uyarılma yüksek konsantrasyonlarda kontrole nazaran istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde 4-Metilimidazol' un genotoksik risk oluşturabileceğini söyleyebiliriz. Zeiger ve ark (1998) ve NTP (2007) 4-MEI' un Salmonella typhimurium TA97,TA98, TA1535 suşlarında genotoksik olmadığını belirtmişlerdir. Bizim ve bu araştırmaların sonuçları birlikte değerlendirilecek olursa 4-MEI' nin genotoksik olup olmadığı hakkında kesin karar verebilmek için in vivo genotoksisite çalışmalarının sonuçlarına ihtiyaç vardır.

4-MEI 24 saatlik muamele süresinde yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik muamele süresinde ise tüm konsantrasyonlarda kontrole nazaran PI ve MI' nin düşmesine neden olmuştur. Halbuki NBI' deki düşüş hem 24 saat, hem de 48 saat muamele sürelerinde tüm konsantrasyonlarda saptanmış ve 24 saatlik muamelede NBI' deki düşüş konsantrasyonuna bağlı durum göstermiştir. PI, MI ve NBI parametrelerindeki düşüş 4-MEI' nin sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir.

Gıda katkı maddeleri arasında yer alan renklendiriciler hazır gıdaların tüketimi ile vücudumuza girmektedir. Neredeyse günlük alınan bu renklendiricilerin kanser gelişimi üzerindeki etkileri hala tartışılmaktadır. Chan ve ark. (2006) da dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada erkek sıçanlara 0, 625, 1250, 2500 ppm; dişilere ise 0, 1250, 2500, 5000 ppm 4-Metilimidazol vermişlerdir (106 hafta). Bu çalışmada en yüksek dozda dişi sıçanlarda heyecanlanma hiperaktivite ve yürüyüşte bozukluklar gözlenmiştir. Yine bu dişilerde mononükleer lösemili hücre görülme sıklığı kontrol grubuna nazaran artmıştır. Çalışmanın sonucuna göre 4-metilimidazol' ün erkek ve dişi sıçanlarda alveolar/bronşiyal adenom veya karsinom için indükleyici olabileceğini ve dişi sıçanlarda mononükleer lösemi hücrelere neden olabileceğini belirtilmiştir. Bizim ve başka araştırmacıların sonuçlarına göre gerek normal gerekse kanser hücrelerinde, genel olarak sitotoksik etki göstermektedirler.

Tüm bu veriler göz önünde tutulacak olursak gıda renklendiricilerinin genotoksik ve kanser riski oluşturup oluşturmayacağını, sitotoksik etkilerinin olup olmadığının mutlaka saptanması gerekir. Alınacak sonuçlara göre kullanılıp kullanılmayacağına karar verilmelidir.

KAYNAKLAR

- ABE, S., SASAKI, M., 1976. Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamster Cells Exposed to Various Chemicals. *Oxford Journals Medicine*,58(6):1635-1641.
- ADAMS, K., ALLEN, J.A., BROOKER, P.C., JONES, E., PROUDLOCK, R.J., 1992. Assessment of the genotoxic potential of caramel colour I in four short-term tests. *Food and Chemical Toxicology*, 30(5):397– 402.
- AGARWALA, K., MUKHERJEE, A., CHAKRABARTI, J., 1994. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to natural food colourings. *Food and Chemical Toxicology*, 32(9):837– 838
- AGNERA, A.R., BARBISANA, L.F., SCOLASTICIA, C., SALVADORIA, D.M.F., 2004. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10):1687– 1693.
- ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E.G., TICE, R., WATERS, M.D. and AITIO, A., 2000. IPCS Guidelines for The Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutat. Res.*, 463:111-172.
- ALIJA, A.J., BRESGEN, N., SOMMERBURG, O., SIEMS, W., ECKL, P.M., 2003. Cytotoxic and genotoxic effects of of β -carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. *Oxford Journals Life Sciences & Medicine Carcinogenesis* 25(5): 827-831.
- ALLEN, J.A., BROOKER, P.C., JONES, E., RICHOLD, M., 1992. Absence of mutagenic activity in salmonella and of clastogenic activity in cho cells of caramel colours I, II, III and IV. *Food and Chemical Toxicology* 30(5):389– 395.
- ALTUĞ, T., 2006. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım Matbacılık Hizmetleri, İZMİR, 276s.

- ANDERSON, D., 1988. Human Biomonitoring. *Mutat. Res.*, 204:353-541.
- ANTUNES, L.M.G., PASCOALA, L.M., BIANCHI, M.L.P., DIASA, F.L., 2005. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1– 2):113– 119.
- ASHARANI, P.V., MUN, G.L.K., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S., 2009. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano*, 3(2):279– 290.
- BAR-SELA, G., EPELBAUM, R., SCHAFFER, M., 2010. Curcumin as an Anti-Cancer Agent: Review of the Gap Between Basic and Clinical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 17(3):190-197.
- BEIJE, B., 1987. Induction of unscheduled DNA synthesis in liver and micronucleus in bone marrow of rats exposed in vivo to the benzidine-derived azo dye, Direct Black 38. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 187(4):227-234.
- BIANCHI-SANTAMARIA, A., TATEO, F., SANTAMARIA, L., 1993. Antimutagenic action of beta carotene, canthaxanthin and extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Melissa officinalis*. Genotoxicity of basil and tarragon oil. *Food and cancer prevention: chemical and biological aspects*, 75-81.
- BOFFETTA, P., VAN DER HEL, O., NORPPA, H., FABIONOVA, E., FUCIC, A., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., PUSKAILEROVA, D., ZNAOR, A., KELECSENYI, Z., JUOZAS, K., RACHTAN, J., FORNI, A., VERMEULAN, R. and BONASSI, S., 2006. Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Result of a Cohort Study from Central Europe. *American Journal of Epidemiology*, 1-10.
- BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E. and NORPPA, H., 2000. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Res.*, 60:1619- 1625.

- BONASSI, S., FENECH, M., LANDO, C., LIN, Y. P., CEPPI, M., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., JIA, C., Di GIORGIA, M., FREGUSON, L. R., FUCIC, A., LIMA, O. G., HRELIA, P., KRISHNAJA, A. P., LEE, T. K., MIGLIORE, L., MIKHALEVICH, L., MIRKOVA, E., MOSESSO, P., MULLER, W. U., ODAGIRI, Y., SCARFI, M. R., SZABOVA, E., VOROBTSOVA, I., VRAL, A. and ZIJNO, A., 2001. Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 37:31-45.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res.* 104:376-382.
- BONASSI, S., UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STROMBERG, U., VERMEULEN, R. and TUCKER, J. D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Perspectives. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 45:258-270.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M. R., ZIJNO, A., NORPPA, H. and FENECH, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28:625-631.
- BRUSICK, D.J., JAQANNATH, D.R., GALLOWAY, S.M., NESTMANN, E.R., 1992. Genotoxicity hazard assessment of caremel colours III and IV. *Food. and Chem. Toxicol.*, 30(5):403-10.

- CAO, J., LIU, Y., JIA, L., JIANG, L.P., GENG, C.Y., YAO, X.F., KONG, Y., JIANG, B.N., ZHONG, L.F., 2008. Curcumin Attenuates Acrylamide-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in HepG2 Cells by ROS Scavenging, *J. Agric. Food Chem.*, 56(24), 12059– 12063.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, LINDL, P.A. and MINKLER, J.L. 1978. Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis, 271:551-553.
- CARRANO, A.V. and NATARAJAN A. T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutat. Res.*, 204:379-406.
- CHAN, P., MAHLER, J., TRAVLOS, G., 2006. Induction of N thyroid lesions in 14-week toxicity studies of 2 and 4-methylimidazole in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice, *Arch. Toxicol.*, 80:169– 180.
- CHAN, P.C., HILL, G.D., KISSLING, G.E., NYSKA, A., 2008. Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Arch. Toxicol.*, 82(1):45-55.
- CHENG, M., CONNER, M.K. and ALARIA, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom' s Syndrome Lymphocytes. *Cancer Res.*, 71:4508-4512.
- CHENG, T. J., CHRISTIANI, D. C., XU, X., WAIN, J. C., WIENCKE, J. K. And KELSEY, K. T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutat. Res.*, 349:43-50.
- CHUNG, K.T., 1983. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 114(3): 269– 281.
- CHUNG, K.T., STEVENS, S.E., CERNIGLIA, C.E., 1992. The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora. *Crit Rev Microbiol.*, 18(3):175-90.
- DAS, A., MUKHERJEE, A., 2004. Amaranth and Tartrazine, Genotoxicity Testing of the Food Colours. *Int. J. Hum. Genet.*, 4(4): 277-280.
- DELLARCO, V.L., MAVOURNIN, K.H. and TICE, R.R., 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions. *Environ. Mutagen.*, 7:405-424.

- DIAS, M.C., VIEIRALVES, N.F.L., GOMES, M.I.F.V., SALVADORI, D.M.F., RODRÍGUES, M.A.M., BARBISAN, L.F., 2009. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 48:772– 780.
- DUFFAUD, F., ORSIERE, T., VILLANI, P., PELISSIER, A.L., VOLOT, F., FAVRE, R. and BOTTA, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. *Mutagenesis*, 12:227-231.
- EASTMOND, D. A. and TUCKER, J. D., 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13:34-43.
- EL-MAKAWY, A., EL-ASHMAOUI, H.M., 2003. Evaluation of the protective activity of beta-carotene and l-carnitine on doxorubicin -induced genotoxicity in rats. *Arab J. Biotech.*, 6(2) :289-296.
- EVANS, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition, Elsevier Science Publishers, 405-427.
- FENECH, M. and MORLEY, A. A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147:29-36.
- FENECH, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutat. Res.*, 392: 11-18.
- FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W. P., ZEIGER, E. and BONASSI, S., 1999. The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutat. Res.*, 428:271-283.
- FENECH, M., 2000. The in vitro Micronucleus Technique. *Mutat. Res.*, 455:81-95.
- FENECH, M., 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181-182: 411-416.

- FOLDBJERG, R., DANG, D.A., AUTRUP, H., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 85(7):743-750.
- GASIOROWSKI, K., SZYBAA, K., BROKOSA, B., KOZIXLILACZYŃSKA, B., JANKOWIAK-WZIXLILODARCZYKA, M., OSZMIAŃSKI, J., 1997. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Letters*, Volume 119(1) 37– 46.
- GAUNT, I.F., LLOYD, A.G., GRASSO, P., GANGOLLI, S.D., BUTTERWORTH, K.R., 1977. Short-term study in the rat on two caramels produced by variations of the ‘ Ammonia process’ . *Food and Cosmetics Toxicolog*, 15(6):509– 521.
- GIRI, A. K., MUKHERJEE, A., TALUKDER, G., SHARMA, A., 1988. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to Orange G, a food colourant. *Toxicology Letters*, 44(3):253– 261.
- GIRI, A. K., MUKHERJEE, A., 1990. Sister chromatid exchange induced by secondary and tertiary amine containing dyes and in combination with nitrite in vivo in mice. *Cancer Letters*, 52(1):33– 37.
- GIRI, A.K., SIVAM, S.S., KHAN, K.A., SETHI, N., 2006. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations in mice after in vivo exposure of green S-A food colorant. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19(3):223– 226.
- GIRI, K., SRIVASTAVA, N., 2011. Genotoxic effects of two commonly used food additives of boric acid and sunset yellow in root meristems of *Trigonella foenum-graecum*, *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 8(4):361-366.
- GOMES., K.M.S., OLIVEIRA, M.V.G.A., CARVALHO, F.R., MENEZES, C.C., PERON, A.P., 2013. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Sci. Technol.*, 33(1).

- HAGIWARA, A., SHIBATA, M., KURATA, Y., SEKI, K., FUKUSHIMA, S., ITO, N. 1983. Long-term toxicity and carcinogenicity test of ammonia-process caramel colouring given to B6C3F1 mice in the drinking-water. *Food and Chemical Toxicology*, 21(6):701-706.
- HAGIWARA, A., IMAIA, N., DOIA, Y., NABAEA, K., HIROTA, T., YOSHINO, H., KAWABE, M., TSUSHIMA, Y., AOKIC, H., YASUHARAC, K., KODAC, T., NAKAMURAC, M., SHIRAIB, T., 2003. Absence of liver tumor promoting effects of annatto extract (norbixin), a natural carotenoid food color, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay using male F344 rats. *Cancer Letters*, 199(1):9– 17.
- HAGMAR, L., BRØGGER, A., HANSTEEN, I. L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S. and SORSA, M., 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54:2919-2922.
- HAVELAND-SMITH, R.B., COMBES, R.D., BRIDGES, B.A., 1979. Methodology for the testing of food dyes for genotoxic activity: Experiments with red 2G (C.I. 18050). *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 64(4):241– 248.
- HEDDLE, J. A., CIMINO, M. C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., VANPARYS, Ph. and MacGREGOR, J. T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18:277-291.
- HELLEDAY, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutat. Res.*, 532:103-115.
- HONG, S.C., LEE, J.H., LEE, J., KIM, H.Y., PARK, J.Y., CHO, J., LEE, J., HAN, D.W., 2011. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int. J. Nanomedicine*, 6:3219– 3231.

- İZBIRAK, A., SÜMER, S., DİRİL, N., 1990. Gıdalara katılan bazı azo boyalarının mutajenik etkilerinin test edilmesi, *Mikrobiyol. Bült.*,24:48-56.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTEN, F. J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18(1):28-34.
- KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., CUNDARI, E., VAN HUMMELEN, P., 1997. The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. *Mutat. Res.*, 392(1-2):19-30.
- KÖNCZÖL, M., EBELING, S., GOLDENBERG, E., TREUDE, F., GMINSKI, R., GIERÈ, R., GROBÈTY, B., RUTISHAUSER, B.R., MERFORT, I., SUNDERMANN, V.M., 2011. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF-Kb. *Chem. Res. Toxicol.*,24(9):1460– 1475.
- LIMA, R.O.A., AZEVEDO, L., RIBERIORA, L.R., SALVADORIA, D.M.F., 2003. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41(2):189– 192.
- LIN, G.H.Y.,SOLODAR, W.E., 1988. Structure-activity relationship studies on the mutagenicity of some azo dyes in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis*, 3(4):311-5.
- LOPRIENO, G., BONCRISTIANI, G., LOPRIENO, N., 1992. Genotoxicity studies in vitro and in vivo on carminic acid (natural red 4). *Food Chem. Toxicol.*, 30(9):759-64.
- MACE, ML JR., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 52:199-206.
- MACIOSZEK, V.K., KONONOWICZ, A.K., 2004. The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline yellow (E104) and Brilliant Black BN (E151). *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9:107-122,

- MAEKAWA, A., OGIU, T., MATSUOKA, C., ONODERA, H., FURUTA, K., TANIGAWA, H., HAYASHI, Y., ODASHMA, S., 1982. Food and Chemical Toxicology, 21(2):37-244.
- MANSOURA, H.B., CORROLERA, D., BARILLIERA, D., GHEDIRA, K., CHEKIR, L., MOSRATI, R., 2007. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. Food and Chemical Toxicology, 45(9):1670– 1677.
- MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKIA, KOSTARELI, E., CHRISTODOULOU, P., KARELIA, D., STAMATIA, P. S., MOURELATOS, C., LAMBROPOULOVA, V., 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.
- MUKHERJEE, A., AGARWAL, K., AGUILAR, M.A., SHARMA, A., 1991. Anticlastogenic activity β -carotene against cyclophosphamide in mice in vivo. Mutation Research Letters, 263(1):41-46.
- MUZANDU, K., ISHIZUKA, M., SAKAMOTO, K.Q., SHABAN, Z., EL BOHI, K., KAZUSAKA, A., FUJITA, S., 2005. β -carotene DNA damage 4-hydroxyestradiol lycopene reactive oxygen species lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage. Japanese Journal of Veterinary Research, 52(4).
- MUZANDU, K., ISHIZUKA, M., SAKAMOTO, K.Q., SHABAN, Z., EL BOHI, K., KAZUSAKA, A., FUJITA, S., 2006. Effect of lycopene and β -carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. Toxicology and Applied Pharmacology, 215(3):330– 340.
- NEGISHI, T., NAKANO, H., KITAMURA, A., ITOME, C., SHIOTANI, T., HAYATSU, H., 1994. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. Cancer Letters, 83(1-2):157– 164.
- NORPPA, H., FALCK, G.C.M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain. Mutagenesis, 18(3):221-233.

- NORPPA, H., 2004. Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphism. *Toxicology Letters*, 149:309-334.
- NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I-L., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., RÖSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIÁNOVÁ, E., ŠRÁM, R. J., KUNUDSEN, L. E., BARALE, R. and FUCIC, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutat. Res.*, 600(1-2):37-45.
- NTP (National Toxicology Program), 2007. NTP Technical Report 535 on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Methylimidazole (CAS No. 822-36-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. NIH Publication No. 07-4471.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 473 (1997): In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test.
- OFFORD, E.A., GAUTIER, J.C., AVANTI, O., SCALETTA, C., RUNGE, F., KRÄMER, K., APPLGATE, L.A., 2002. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(12):1293– 1303.
- OZAKI, A., KITANO, M., ITOH, N., KURODA, K., FURUSAWA, N., MASUDA, T., YAMAGUCHI, H., 1998. Mutagenicity and DNA-damaging Activity of Decomposed Products of Food Colours under UV irradiation. *Food and Chemical Toxicology*, 36(9):811– 817.
- PATTERSON, R.M., BUTLER, J.S., 1982. Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 20(4):461– 465.
- PERRY, P. and EVANS, H. J., 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258:121-125.
- PERRY, P. and THOMSON, E.J., 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.). *Handbook of Mutagenicity*, 459– 529.

- POULA, M., JARRY, G., ELHKIM, M.O., POULA, J.M., 2009. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2):443– 448.
- PRICE, P.J., SUK, W.A., FREEMAN, A.E., LANE, W.T., PETERS, R.L., VERNON, M.L., HUEBNER, R.J., 2006. In vitro and in vivo indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *International Journal of Cancer*, 21(3):361– 367.
- PRIVAL, M., DAVIS, V.M., PEIPERL, M.D., BELL, S.J., 1988. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 206(2):247– 259.
- RAFII, F., HALL, J.D., CERNGLIA, C.E., 1997. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, 35(9):897– 901.
- RAGUNATHAN, I., PANNEERSELVAM, N., 2007. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(7):470-475.
- RENCÜZOĞULLARI, E. and TOPAKTAŞ, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5:19-24.
- ROTHFUSS, A., SCHUTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., ELBERHARD, E., KREINBERG, R., VOGEL, V. and SPEIT, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60:390-394.
- ROYCHOUDHURY, A., GIRI, A.K., 1989. Effects of certain food dyes on chromosomes of *Allium cepa*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 223(3):313– 319.

- SANTOS, C.D. G., MENDONÇA, L.M., ANTONUCCI, G.A., CARDOZO DOS SANTOS, A., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P., 2012. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2):335– 340.
- SASAKI Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., TSUDA, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519:103– 119.
- SAVAGE, J. R. K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. and Mol. Mutagen.*, 22:198-207.
- SAYED, H.M., FOUAD,D., ATAYA, F.S., HASSAN, N.H., FAHMY, M.A.,2012. The modifying effect of selenium and vitamins A, C, and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice, *Mutat Res.*, 744(2):145-53.
- SERPELONI, J.M., GROTTTO, D., AISSA, A.F., MECADANTE, A.Z., BIACHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G., 2011. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. *Environmental Mutagenesis*, 725(1-2):50-56.
- SHI, M., CAI, Q., YAO, L., MAO, Y., MING, Y., OUYANG, G.,2006. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biology International*, 30(3):221– 226.
- SIMONICH, M.T., MCQUISTAN, T., JUBERTA, C., PEREIRAC, C., HENDRICKS, J.D., SCHIMERLIK, M., ZHUE, B., DASHWOODA, R.H., WILLIAMS, D.E., BAILEYA, G.S., 2008. Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3):1014– 1024.
- SONODA, E., SASAKI, M. S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. and TAKEDA, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7):5166-5169.

- SPEIT, G., 1984. Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. *Hum. Genet.*, 67:264-269.
- SPEIT, G, and HAUPTER, S., 1985. On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum. Genet.*, 70:126-129.
- STONER, G.D., MORSE, M.A., KELLOF, G.J., 1997. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environmental Health Perspect.* 105:945-954.
- SURRALLÉS, J., XAMENA, N., CREUS, A. and MARCOS, R., 1995. The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. *Mutat. Res.*, 342:43-59.
- SWAROOP, V.R, ROY, D.D., VIJAYAKUMAR, T., 2011. Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*, 1:128-134.
- SWEENEY, E.A., CHIPMAN, J.K., FORSYTHE, S.J., 1994. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. *Environ. Health Perspect*, 6:119– 122.
- TITENKO-HOLLAND, N., WINDHAM, G., KOLACHANA, P., REINISCH, F., PARVATHAM, S., OSORIO, A.M. and SMITH, M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay In Vitro and In Vivo: a Study of Malathion-Exposed Workers. *Mutat. Res.*, 388(1):85-95.
- TIL, H.P., SPANJERS, M., 1973. Reproduction study in rats with six different Ammonia Caramels. Unpublished report No. R 4068 from Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek (CIVO/TNO), Zeist, The Netherlands.
- TOPAKTAŞ, M. ve SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.*, 5(1,2, 3):73-84.
- TOPAKTAŞ, M. ve RENCÜZOĞULLARI, E., 2010. *Sitogenetik*. Nobel Yayınevi, Ankara, 176.

- TRIPATHY, N.K., NABI, M.J., SAHU, G.P., KUMAR, A., 1995. Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, 33(11):923– 927.
- TSUDA, S., MURAKAMI, M., MATSUSAKA, N., KANO, K., TANIGUCHI, K., SASAKI, Y. F., 2001. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Tox. Sciences.*, 61:92-99.
- TUCKER, J. D., AULETTA, A., CIMINO, M. C., DEARFIELD, K. L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R. R. and CARRANO, A. V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 297:101-180.
- TUORMAA, T.E., 1995. The adverse effects of food additives on health: A review of the literature with special emphasis on childhood hyperactivity. *Journal of Orthomolecular Medicine*. 10(4).
- VELASCO-ORTEGA, E., JOS, A., CAMEÁN, A.M., PATU-MOURELO, J., SEGURA-EGEA, J.J., 2010. In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 702(1):17– 23.
- VELMURGAN, B., SANTHIYAR, S.T., NAGINI, S., 2004. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in combination against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. *Pol. J. Pharmacol.*, (56):241-245.
- WISE SR, J.P., GOODALEA, B.C., WISE, S.S., CRAIGE, G.A., PONGANE, A.F., WALTERF, R.B., THOMPSON, W.D., NG, A.K., ABOUEISSA, A.M., MITANI, H., SPALDINGI, M.J., MASON, M.D., 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology*, 97(1):34– 41.
- YING, E., HWANG, H.M., 2010. In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes, *Science of The Total Environment*, 408(20): 4475– 4481.

YURTCU, E., KASAPÖĞLU, E., ŐAHİN, F.İ., 2012. Beta-karoten ve silimarinin insan lenfositleri üzerindeki koruyucu etkisi, Turk J Bio., (36):47-52.

ZEIGER, E., ANDERSON, B., HAWORTH, B., LAWLOR, T., MONTELMANS, K., 1988. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 11:1-157.

ZUNO, A., MARCON, F., LEOPARDI, P., SALVATORE, G., CARERE, A., CREBELLI, R., 1994. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. Food and Chemical Toxicology, 32(2):159– 163.

<http://en.wikipedia.org/wiki/4-Methylimidazole>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Annatto>

http://hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=105&Itemid=143

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kurkumin>

<http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF7EE1F1486EE530EBFA78F5AB8E93754>

<http://www.nanobilgi.com/?p=1>

<http://www.food-info.net/tr/colour/azo.htm>

<http://www.foodnavigator.com/Legislation/EFSA-establishes-new-ADIs-for-caramel-colours>

ÖZGEÇMİŞ

12/08/1987 tarihinde Adana’ da doğdu. İlköğretimi Ahmet Karabucak İlköğretim Okulu’ nda tamamladıktan sonra, liseyi Şehit Temel Cingöz Lisesi’ nde bitirdi. 2006 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nde okumaya hak kazandı. 2008 yılında yatay geçişle Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’ nde okumaya hak kazandı. 2010 yılında buradaki eğitimini tamamladıktan bir sene sonra aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans öğretimine başladı.