

## Sentetik Gıda Boyalarının *Drosophila melanogaster*'in Oregon R Soyunda Larval Toksikite ve Ergin Ömür Uzunluğu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Handan UYSAL, Sıdıka SEMERDÖKEN

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum

Yayın Kodu (Article Code): 11-10A

### Özet

Bu çalışmada, beş farklı sentetik gıda boyasının (black pn, brilliant blue, pea green, ponceau 4r, quinolin yellow) *Drosophila melanogaster* Oregon R yabamıl soyunun 72±4 saatlik larvaları üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan ön çalışmalar ile dört farklı uygulama dozu (25, 37.5, 50, 62.5 mg mL<sup>-1</sup>) seçilmiştir. Çalışmamız sonucunda, tüm sentetik gıda boyalarının konsantrasyon artışına bağlı olarak larval toksisiteyi artırdığı ve ergine dönüşebilen birey sayısını azalttığı görülmüştür. Kontrol grubunda larvalar için hayatta kalış oranı 98% iken gıda boyaları için bu değer 5-25% arasında değiştiği gözlenmiştir (P<0.05). Ayrıca 3. evre larvalardan elde edilen ergin bireylerin ortalama ömür uzunlukları izlenmiş ve kontrol grubunda 58±0.18 gün olan ortalama ömür uzunluğunun deney gruplarında konsantrasyon artışına ve kronik beslenmeye bağlı olarak 1±0.04-7±0.11 gün olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre, hem larvadan ergine gelişim evreleri hem de gelişebilen erginlerin ömür uzunlukları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman sentetik gıda boyalarının toksik etkiye yol açtıkları ve toksisite sıralamasının pea green>brilliant blue ≥ ponceau 4r> black pn> quinolin yellow şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Drosophila melanogaster*, sentetik gıda boyaları, larval toksisite, teratojenite, ömür uzunluğu

### The Assesment of Longevity Effects and Larval Toxicity of Synthetic Food Dyes on Oregon R wild type of *Drosophila melanogaster*

#### Abstract

In this study, the toxic effect of five different synthetic food dyes (black pn, brilliant blue, pea green, ponceau 4r, quinolin yellow) on 72±4h larvae of Oregon (R) wild type of *Drosophila melanogaster* were investigated. For this purpose, four different application doses (25, 37.5, 50, 62.5 mg mL<sup>-1</sup>) were chosen by means of preliminary studies. As a result of our study, it was observed that all synthetic food dyes increased larvae toxicity and reduced adults depending on concentration increase of all synthetic food dyes. While the survival ratio in control group for larvae is 98%, this ratio is 5-25% for food dyes (P<0.05). In addition average life span of adult individuals obtained from 3<sup>rd</sup> instar larvae were observed and it was determined that while average life span 58±0.18 days in the control group. It is 1±0.04-7±0.11 days in the experiment groups, depending on the concentration increase and chronic feeding.

According to the obtained results, when both the developmental period from larvae into adults and the life span of the developing adults were compared with the control groups, the food dyes were found to be toxic and the toxicity order of pea green> brilliant blue  $\geq$  ponceau 4r> black pn> quinolin yellow was identified.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, synthetic food dyes, larvae toxicity, teratogenicity, longevity

**e-mail:** hauysal@ata.uni.edu.tr

## Giriş

Gıdalarda kimyasal madde kullanımı ile ilgili tarihsel gelişim incelendiği zaman, ilk kez M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini saklamada tuzdan, M.Ö. 900 yıllarında ise odun tütsüsünden faydalandığı bilgisine rastlanılmaktadır (Furia, 1980). Yine M.Ö. 50 yıllarında baharatlardan lezzet verici olarak faydalanılmıştır. Gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl önce Mısırlılar tarafından gıdaların renklendirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Altuğ, 2001). 19. yüzyılda başlayan endüstrileşme ile birlikte gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımında da artış görülmektedir. Bu artışın nedeni olarak GKM'lerin dünya pazar payının 1900'lü yıllarda 10 milyar dolar iken günümüzde bu pazarın daha da büyümüş olması gösterilmektedir (Altuğ, 2001).

Tarihsel süreç dikkate alındığında GKM'lere olan ilginin iki temel sebebe dayalı olduğu anlaşılmaktadır. Bunlardan birincisi gelişen teknoloji paralelinde gıda saklama yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan gereksinimdir. Bu sebeple günümüzde gelişen uluslararası ticarete bağlı olarak GKM'lerin teknolojinin vazgeçilmez bir parçası olduğu söylenebilir. İkincisi ise tüketici gözünde gıdanın mevcut kalitesinin daha iyi algılanmasını sağlamaktır. Yani GKM'ler gıdaların teknolojik kalitesini artırmaktadır.

Hem pratik olmaları hem de daha dikkat çekici görünmeleri nedeniyle çok fazla düşünmeden tükettiğimiz hazır yiyecekler, doğal besinlerden hızla uzaklaşmamıza neden olmuştur (Çalışır ve Çalışkan, 2003). Beslenme alışkanlıklarının değişmesi, besin hazırlamak için daha az zaman ayrılması gibi nedenler yarı- hazır veya ticari olarak tamamen hazırlanmış olan besin üretimini teşvik etmiş, bu da GKM'lerin kullanımını kaçınılmaz kılmıştır (Sarıkaya ve Solak, 2003). Yapılan araştırmalar sonucunda, GKM'ler ile hazırlanan besinlerin vücuda gerekli olan vitamin ve mineral gibi çeşitli besin öğelerini yetersiz miktarda içerdikleri ve beslenme ile ilgili olan başta kardiyovasküler hastalıklar, alerjik astım ve ürtiker gibi çeşitli hastalıkların gelişmesine eğilim yarattıkları tespit edilmiştir (Batu ve Molla, 2008). Bu katkı maddelerinin değişik dozlarda tüketilmesi ile psikolojik rahatsızlıklardan kansere kadar varan geniş bir hastalık spektrumunun oluştuğu da belirtilmektedir (Vincent ve Behbehani, 2001).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre, gıda katkı maddeleri; "tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamül maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi,

işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddeler" olarak tanımlanmaktadır (Anonymous, 2002).

Gıda üretiminin güvenlik yönünden standartlaştırılması ve güvenli gıda tüketimi tüm dünyayı kapsayan önemli konulardır. Bundan dolayı insan sağlığının korunması yönünden en dikkatle izlenmesi gereken madde grubu gıda katkı maddeleridir. Bu ihtiyaçtan yola çıkılarak gıda katkı maddeleri kullanımını denetim altına alan Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission, CAC) ve Gıda Katkı Maddeleri Kodeks Komisyonu (The Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) oluşturulmuştur. Bu komiteler bilimsel veriler doğrultusunda hazırlamış oldukları gıda mevzuatlarında, hangi katkı maddesinin hangi gıdaya, hangi amaçla ve ne kadar katılacağını belirlemişlerdir. Ayrıca bu mevzuatta her bir katkı maddesi için günlük alınması gereken miktarlarda (Acceptable Daily Intake, ADI) verilmektedir.

Tüketiciye cazip hale getirmek amacıyla gıdaların üretimi ve depolanması sırasında gıdaların kaybolan doğal rengini yeniden kazandırmak, zayıf olan doğal rengini kuvvetlendirmek ya da gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek için kullanılan gıda boyaları, gıda katkı maddeleri içerisinde önemli bir gruba oluşturmaktadır (Amin et al. 2010). Gıda boyaları, doğal kaynaklardan ve sentetik olarak elde edilenler şeklinde iki gruba ayrılmaktadır (Sowbhagya et al. 2005). Sentetik boyalar potansiyel olarak toksik olduğundan kullanımları resmi kurumlarca sınırlandırılmış olmasına rağmen dünyanın

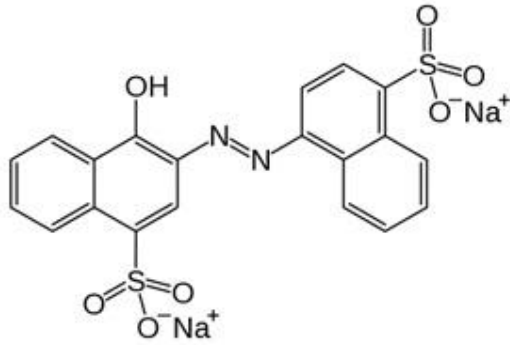
birçok yerinde ucuz, etkili ve stabil olmaları sebebiyle doğal boyaların yerine kullanılmaktadır (Ekşi, 1996).

Yapılan çalışmalarda gıda boyalarının tüketiminin artmasıyla birlikte bu maddelerin çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi de önem kazanmıştır (Sarıkaya et al. 2010). Fare, sıçan ve bakteri gibi deney hayvanları üzerinde yapılan toksisite çalışmaları ve epidemiyolojik kanıtlar, belli şartlar altında boyaların karsinojenik olabileceğini göstermektedir (Poula et al. 2009; Erkmen, 2010). Ayrıca gıda renklendiricilerinin aşırı duyarlılık, astım, deri döküntüleri, migren, erken doğum, aspirin duyarlılığı ve kanserleşmeye yol açtığı da belirtilmektedir (Mamur, 2009; Maier et al. 2010).

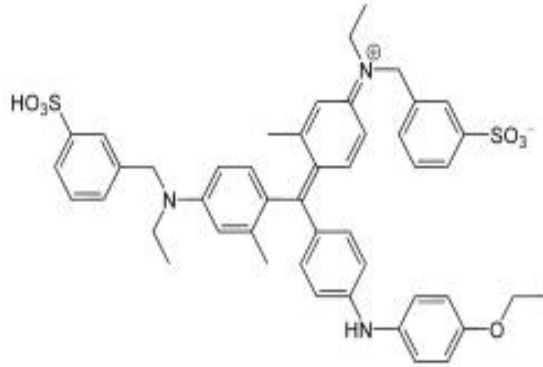
Gıda boya maddelerinden birisi olan tartrazin, aynı zamanda ilaç sanayinde de renklendirici olarak kullanılmaktadır. Hindistan'da yapılan bir araştırmaya göre tartrazin içeren ilaçların 2210 hastanın 13.2%'inde alerjik reaksiyona neden olduğu gözlenmiştir (Bhatia, 2000). Tartrazin ve anilin boyaları insanlarda ürtikere (Lockey, 1959) ve astım atağına sebep olmaktadır (Asero, 2001). Carmin ve annatto gibi boyaların da bu tip etkilerinin olduğu daha önceki araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Quirce et al. 1994). Yine sunset yellow, ponceau 4r, carmoisin ve colchicin gibi boyaların alerjik reaksiyonlara sebep olduğu özellikle ponceau 4r ile renklendirilmiş meyveli yoğurtla beslenen bir kız çocuğunun ağız ve dudaklarında granüloamatöz lezyonlarının olduğu görülmüştür (Veien ve Kroghdahl, 1991).

Sunulan bu çalışmada, beş farklı sentetik gıda boyasının (ponceau 4r, brilliant blue, pea green, black pn ve quinolin yellow) *Drosophila melanogaster* Oregon R yabanıl soyunun 72±4 saatlik

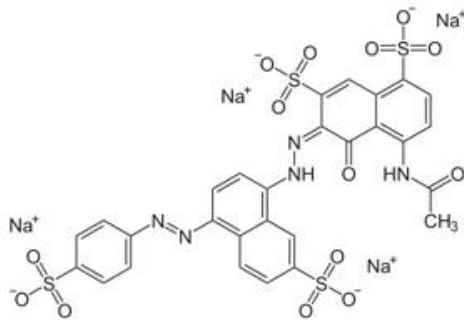
larvaları üzerine toksik etkileri ve larvadan ergine dönüşebilen bireylerin ortalama ömür uzunlukları araştırılmıştır. Kullanılan boyaların özellikleri ve yan etkileri Tablo'1 de, kimyasal formülleri ise Şekil 1-4 de verilmiştir. Ancak çalışmamızda kullandığımız gıda boyalarından birisi olan pea green, brilliant blue ve tartrazin gıda boyalarının karışımından meydana geldiği için kimyasal formülü bulunmamaktadır. Bu nedenle pea green gıda boyasına ait kimyasal formül verilememiştir.



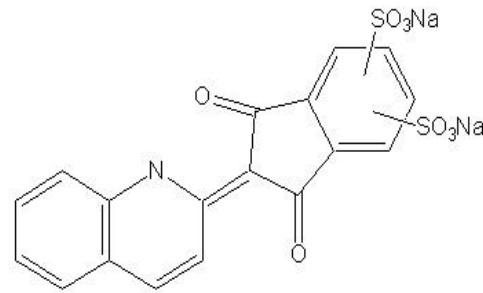
Şekil 1. Ponceau 4r'nin kimyasal formülü



Şekil 2. Brilliant blue'nin kimyasal formülü



Şekil 3. Black pn'nin kimyasal formülü



Şekil 4. Quinolin yellow'un kimyasal formülü

## Materyal ve Metot

### 1. Kullanılan Organizma ve Yetiştirme Şartları

Deneilerimizde kullanılan *D. melanogaster*'in Oregon R soyu (Diptera:

*Drosophilidae*) yabani tip (wild type=w.t.) bir soydur. Bu soy Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan bu yana kendileştirilmektedir. Hayat devrelerinin 9-10 gün gibi çok kısa olması, çok sayıda yavru verebilmeleri, besi yeri hazırlamak için kullanılan malzemelerin çok ucuz olması ve olası varyasyonların fenotipik olarak kolaylıkla gözlenebilmesi gibi sebepler *Drosophila*'yı ideal bir model organizma haline getirmektedir (Uysal et al. 2006). Laboratuar şartlarında yabani stoklar mısır unu, agar, sakkaroz, kuru maya ve propiyonik asitten oluşan

standart *Drosophila* besi yeri (SDB) ile beslenmiş ve  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlı 40-60% bağıl nem içeren sıcaklık kabinlerinde, stokların yenilenmesi dışında, sürekli karanlık ortamda tutulmuştur.

## 2. *D. melanogaster*'e ait 3.Evre Larvaların Elde Edilmesi ve Gıda Boyalarının Uygulanması

Hem deney hem de kontrol gruplarında kullanılacak olan 3. evre larvalar (72±4 saat) yalnızca SDB içeren kültür ortamında 10♀×10♂ çaprazı yapılarak elde edilmiştir. Ebeveynlerin çiftleştirilmesini takiben 4. günde 3. evre larvaları oluşmuştur. Deney grupları oluşturulurken her gıda boyası için 25, 37.5, 50, 62.5 mg mL<sup>-1</sup> boya maddesi+SDB içeren besiyerlerine 100'er larva konulmuştur. Çaprazlamaların başlatıldığı günden itibaren larvaların gelişim evreleri günlük olarak izlenmiştir. Larvadan pupaya, pupadan ergine dönüşebilen bireyler günlük olarak sayılmıştır. Ergin bireyler ise binoküler mikroskop altında incelenmiş ve normal fenotipik özellik gösterenler ile malformlu bireyler kaydedilmiştir. Malformlu bireyler için ayrı bir deney seti hazırlanarak onlar da kendi aralarında çaprazlanmaya çalışılmıştır. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

## 3. Ergin Bireylerin Ömür Uzunluklarının Belirlenmesi

*D. melanogaster*'e ait ergin bireylerin ortalama ömür uzunluklarını belirlemek için, yine 3. evre larvalar farklı konsantrasyonlarda gıda boyası içeren besiyerlerinde kronik olarak beslenmiştir. Seçilen larvalarda erkek-dişi ayrımı yapılmamıştır. Gelişim evrelerini tamamlayabilen 3. evre larvalar ergine dönüşükten sonra, ölen ergin bireylerin ortamdaki uzaklaştırılması ve yaşayabilen bireylerin sayılabilmesi için besiyerleri haftada iki kez tazelenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının tümünde sayımlara en son birey ölünceye kadar devam edilmiştir. Tüm kültür şişeleri 25±1°C'ye ayarlı sıcaklık kabinlerinde tutulmuştur.

## 4. İstatistiksel Analizler

Kontrol ve uygulama grupları için, larvadan ergine gelişebilen bireyler ile ilgili elde edilen sonuçlar Duncan'ın çoklu karşılaştırma testine göre P<0.05 düzeyinde değerlendirilmiştir. Ömür uzunluğu deneylerinden elde edilen veriler ile ilgili istatistiksel analizler ise SPSS 13.0 programı ile yapılmıştır.

## Bulgular

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda 5 sentetik gıda boyasının (black pn, brilliant blue, pea green, ponceau 4r, quinolin yellow) kronik beslenmeye bağlı olarak *D. melanogaster*'in 3. evre larvalarının yaşama yüzdesi ve erginleşebilen bireylerin ortalama ömür uzunluğu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmada kullanılan gıda boyalarının hepsinin, tüm uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak larval toksisiteyi arttırdığı gözlenmiştir (Tablo 2). Kontrol grubunda yalnızca SDB içeren besi yeri ile beslenen larvalarda hayatta kalış oranı 98% iken deney gruplarında bu değerler en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarda (25-62.5 mg mL<sup>-1</sup>) sırasıyla şöyle bulunmuştur; quinolin yellow için 48-25%, black pn için 43-19%, ponceau 4r için 39-10%, brilliant blue için 35-10% ve pea green için 25-5% (Tablo 2, Şekil 5). Tablo 2 dikkatle incelendiği zaman, elde edilen sonuçlar gıda boyaları için doz artışı ve toksik etki arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmeye göre de kontrol ve deney grupları arasındaki bu fark P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. Larvaların hayatta kalış oranları dikkate alındığı zaman, kullandığımız gıda boyalarının toksisite sıralaması pea green> brilliant blue≥ ponceau 4r> black pn> quinolin yellow şeklindedir.

**Tablo 1.** Bu çalışmada kullanılan gıda boya ları ve özellikleri

| Gıda Boyası     | E Kodu  | Kaynağı  | Çözünürlük       | ADI Değeri  | Yan Etkileri  |
|-----------------|---------|----------|------------------|-------------|---|
| Black PN        | 151     | Sentetik | Suda iyi çözünür | 1-5 mg/kg.  | Astım<br>Hiperaktivite  |
| Brilliant Blue  | 133     | Sentetik | Suda iyi çözünür | 12.5 mg/kg. | Alerjik reaksiyonlar  |
| Pea Green       | 102+133 | Sentetik | Suda iyi çözünür | ?           | Alerjik reaksiyonlar  |
| Ponceau 4R      | 124     | Sentetik | Suda iyi çözünür | 4 mg/kg.    | Salisilat intolerans<br>Alerjik reaksiyonlar<br>Hiperaktivite |
| Quinolin Yellow | 104     | Sentetik | Suda iyi çözünür | 10 mg/kg.   | Alerjik reaksiyonlar  |

Deney gruplarında larvadan ergine dönüşebilme oranları karşılaştırıldığı zaman en yüksek değer quinolin yellow'da 48%, black pn'de 43%, ponceau'da 39%, brilliant blue'da 35% ve pea green'de yalnızca 25%'dir. Bu değerlerden de anlaşılacağı gibi larvadan ergine dönüşebilme oranları kontrol grubundan son derece düşüktür. Üstelik erginleşebilen F<sub>1</sub> nesline ait bireylerde de hem çeşitli malformasyonlar gözlenmiş (Tablo 2) hem de ergin bireylerin maksimum ömür uzunluğu kontrol grubuna göre çok çok kısalmıştır (Tablo 3). Malformasyonlu bireyler yalnızca deney gruplarında değil aynı zamanda kontrol grubunda da görülmüştür. Ancak kontrol grubu için erginleşebilen 98 bireyden yalnızca 6'sında gelişimsel anormalliklere rastlanılmıştır (P>0.005). Uygulama gruplarında ise malformlu birey sayısına bakıldığı zaman, erginleşebilen bireylerin yaklaşık yarısında görülen bu tip malformas-

yonların oluşumu P<0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 2, Şekil 6).

Deneylerimiz sırasında ortaya çıkan malformlu bireyler kendi aralarında çaprazlanmaya çalışılmış ve bu amaçla yeni bir deney seti hazırlanmıştır. Ancak pupadan çıkan ergin bireyler sadece 1 gün yaşayabildikleri için çaprazlamalar sürdürülememiştir.

Deneylerimizden elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç ise gıda boya larının yine konsantrasyon artışına bağlı olarak ergin bireylerde maksimum ömür uzunluğunu kontrol grubuna göre çok çok kısaltmasıdır. Kontrol grubu için maksimum ömür uzunluğu 62 gün olarak belirlenmiştir. Bu sürenin toksisite sıralamasına göre uygulama grupları içinde en az toksik olan quinolin yellow'da 7-16 gün, en toksik olan pea green'de ise 1-6 gün arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 3).

**Tablo 2.** Farklı konsantrasyonlarda sentetik gıda boyası içeren besi yerlerinde kronik olarak beslenen 3. evre larvalara ait bazı gelişim özellikleri

|                          |                            | Konsantrasyonlar<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Larva<br>Sayısı | Erginleşebilen<br>Birey Sayısı | Σ Malf. Birey<br>Sayısı |
|--------------------------|----------------------------|--|-----------------|--------------------------------|-------------------------|
|                          | <b>Kontrol</b>             | -  | 100             | 98 <sup>a</sup>                | 6 <sup>a</sup>          |
| <b>Uygulama Grupları</b> | <b>Pea green</b>           | 25   | 100             | 25 <sup>b</sup>                | 12 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 37.5                                       | 100             | 16 <sup>c</sup>                | 7 <sup>a</sup>          |
|                          |                            | 50   | 100             | 7 <sup>d</sup>                 | 3 <sup>a</sup>          |
|                          |                            | 62.5                                       | 100             | 5 <sup>e</sup>                 | 4 <sup>a</sup>          |
|                          | <b>Brilliant<br/>blue</b>  | 25   | 100             | 35 <sup>b</sup>                | 16 <sup>c</sup>         |
|                          |                            | 37.5                                       | 100             | 28 <sup>c</sup>                | 11 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 50   | 100             | 12 <sup>d</sup>                | 5 <sup>a</sup>          |
|                          |                            | 62.5                                       | 100             | 10 <sup>d</sup>                | 6 <sup>a</sup>          |
|                          | <b>Ponceau 4r</b>          | 25   | 100             | 39 <sup>b</sup>                | 18 <sup>c</sup>         |
|                          |                            | 37.5                                       | 100             | 31 <sup>c</sup>                | 13 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 50   | 100             | 17 <sup>d</sup>                | 6 <sup>a</sup>          |
|                          |                            | 62.5                                       | 100             | 10 <sup>e</sup>                | 5 <sup>a</sup>          |
|                          | <b>Black pn</b>            | 25   | 100             | 43 <sup>b</sup>                | 18 <sup>bc</sup>        |
|                          |                            | 37.5                                       | 100             | 37 <sup>c</sup>                | 14 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 50   | 100             | 31 <sup>d</sup>                | 11 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 62.5                                       | 100             | 19 <sup>e</sup>                | 7 <sup>a</sup>          |
|                          | <b>Quinolin<br/>yellow</b> | 25   | 100             | 48 <sup>b</sup>                | 8 <sup>a</sup>          |
|                          |                            | 37.5                                       | 100             | 40 <sup>c</sup>                | 10 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 50   | 100             | 34 <sup>d</sup>                | 10 <sup>b</sup>         |
|                          |                            | 62.5                                       | 100             | 25 <sup>e</sup>                | 10 <sup>b</sup>         |

Σ Malf.: Toplam malformasyonlu birey sayısı, İstatistiksel değerlendirmeler, kontrol ve uygulama grupları arasında, erginleşebilen birey sayısı ve malformlu birey sayısı için ayrı ayrı yapılmıştır. Farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir.

Gıda boyları için en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar (25- 62.5 mg mL<sup>-1</sup>) göz önüne alındığı zaman ortalama ömür uzunluğunun quinolin yellow için 15±0.57-7±0.11 gün (Şekil 7), black pn

için 13±0.22-5±0.10 gün (Şekil 8), ponceau 4r için 8±0.19-3±0.08 gün (Şekil 9), brilliant blue için 8±0.17-3±0.10 gün (Şekil 10), ve pea green için de 5±0.11-1±0.04 gün (Şekil 11) olduğu

**Tablo 3.** Farklı konsantrasyonlarda gıda boyası içeren besiyerlerinde kronik olarak beslenen *D. melanogaster*'in 3. evre larvalarından elde edilen F<sub>1</sub> nesline ait erginlerin ortalama ömür uzunlukları

|                   |                        | Konsantrasyon<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ergin Birey<br>Sayısı | Max.Ömür (Gün) | Ort. Ömür±S.H. |
|-------------------|------------------------|---|-----------------------|----------------|----------------|
| Uygulama Grupları | <b>Kontrol</b>         | -                                       | 98                    | 62             | 58±0.18        |
|                   | <b>Pea green</b>       | 25                                      | 25                    | 6              | 5±0.11         |
|                   |                        | 37.5                                    | 16                    | 3              | 3±0.10         |
|                   |                        | 50                                      | 7                     | 2              | 2±0.11         |
|                   |                        | 62.5                                    | 5                     | 1              | 1±0.04         |
|                   | <b>Brilliant blue</b>  | 25                                      | 35                    | 10             | 8±0.17         |
|                   |                        | 37.5                                    | 28                    | 8              | 7±0.16         |
|                   |                        | 50                                      | 12                    | 5              | 4±0.12         |
|                   |                        | 62.5                                    | 10                    | 3              | 3±0.10         |
|                   | <b>Ponceau 4r</b>      | 25                                      | 39                    | 8              | 8±0.19         |
|                   |                        | 37.5                                    | 31                    | 8              | 8±0.18         |
|                   |                        | 50                                      | 17                    | 7              | 7±0.11         |
|                   |                        | 62.5                                    | 10                    | 3              | 3±0.08         |
|                   | <b>Black pn</b>        | 25                                      | 43                    | 15             | 13±0.22        |
|                   |                        | 37.5                                    | 37                    | 10             | 9±0.18         |
|                   |                        | 50                                      | 31                    | 8              | 7±0.12         |
|                   |                        | 62.5                                    | 19                    | 6              | 5±0.10         |
|                   | <b>Quinolin yellow</b> | 25                                      | 48                    | 16             | 15±0.57        |
|                   |                        | 37.5                                    | 40                    | 12             | 11±0.31        |
|                   |                        | 50                                      | 34                    | 10             | 9±0.18         |
|                   |                        | 62.5                                    | 25                    | 7              | 7±0.11         |

Max.: Maksimum, Ort.: Ortalama, S.H.: Standart Hata

bulunmuştur. Bu sonuçlar, Şekil 7-11'de verilen ömür uzunluğu eğrilerinde de açıkça görülmektedir.

Ayrıca bu sonuçlara bağlı olarak konsantrasyon artışı ve ömür uzunluğu arasında gözlenen negatif korelasyon

değerleri quinolin yellow için R= -0.565; Black pn için R= -0.601; ponceau 4r için R= -0.611; brilliant blue için R= -0.680 ve pea green için R= -0.581 olarak hesaplanmıştır.



## Tartışma

Günümüzde GKM'lerin teknolojik değerlendirilmeleri uluslararası boyutta ele alınmakta ve söz konusu değerlendirmeler akut, kronik, teratojenik, mutajenik ve karsinojenik olarak yapılmaktadır (Renwiek, 1995). Bizim deneylerimizde de GKM'lerin bir grubunu oluşturan gıda boyalarının etkileri kronik ve teratojenik yönden ele alınmıştır.

Günlük hayatımızda kullandığımız sayısız gıda maddesi içerisinde bulunan tartrazin, sunset yellow, ponceau 4r gibi sentetik gıda boyalarının kullanım miktarları tüketici sağlığı açısından büyük önem taşımakla beraber bu boyaların bilinçsizce kullanımı insanlarda başta astım olmak üzere çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır (Sasaki ve Kawaguchi, 2002). Gıda renklendiricilerinin alerjik, mutajenik hatta kanserojenik etkilerinin olabileceği birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Sasaki ve Kawaguchi, 2002; Maier et al. 2010).

Japonya'da gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan benzil violet 4b isimli gıda boyası, 12 ay boyunca ratların günlük diyetine %5 oranında katılmıştır. Kronik beslenmeyi takiben bu bireylerde büyümenin önemli ölçüde gerilediği görülmüştür. Ayrıca bu boya ile beslenen dişi ratlarda meme kanseri gözlenirken kontrol gruplarında kanser vakasına rastlanmamıştır (Sudhic ve Khanna, 1991). Yine sunset yellow ve tartrazin gibi boyaların gıdalarda kullanımıyla birlikte kolon kanseri riskini artırdığı (Chung, 1983), yüksek dozda eritrosin gıda boyasının da karaciğerde (Hallström, 1987) ve tiroit bezinde tümör oluşumuna sebep olduğu bildirilmektedir (Hiasa et al. 1988). Yine Mittal et al. (2007)'e göre, yüksek dozlarda Amaranth ve Sunset Yellow gibi boyalar karaciğer ve iskelet

anomalilerine sebep olduğu için hamilelik sırasında bu boyaları içeren gıdalardan kaçınılması gerekmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir diğer teratojenik çalışmada, gebe farelere gebeliğin ilk gününden itibaren 7 gün boyunca ponceau 4r gıda boyası içeren besi yeri verilmiş ve gebeliğinin 8. gününden sonra %12.7 fetal ölüm tespit edilmiştir (Larson, 1975). Ratlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 10 ay boyunca içme sularına ilave edilen tartrazinin lenfosit ve eozinofil sayısını artırdığı tespit edilmiştir (Moutinho et al. 2007). Gıda boyalarının toksik etkileri üzerine yapılan araştırmalarda yüksek dozlarda kullanılan ponceau 4r, sunset yellow, tartrazin, fast green, brilliant blue ve black pn gibi sentetik boyaların ratlarda karaciğer, böbrek hasarına sebep olduğu ve kronik uygulamalarda karaciğerde tümör oluşturduğu görülmüştür (Mekawwy et al. 1998). Farelerde yapılan bir başka çalışmada da amarant, allura red, new colchicin, ve tartrazin sentetik boyalarının 10ppm düzeyinde özellikle gastrointestinal organlarda etkili olduğu tespit edilmiştir (Sasaki ve Kawaguchi, 2002).

Yine Sasaki et al. (2002) tarafından yapılan bir başka araştırmada Comet test yöntemi kullanılarak amarant, tartrazin ve eritrosin gibi gıda boyalarının bu kez genotoksitesisi araştırılmış ve uygulanan en düşük dozda bile kolon, idrar kesesi, mide ve gastrointestinal organlarda DNA hasarının meydana geldiği gözlenmiştir. Benzeri sonuçlar Shimada et al. (2010) tarafından yapılan çalışmada da görülmüştür.  $10\text{mg}^{-1}\text{kg}$  azo gıda boyasının uygulanmasından üç saat sonra fare kolonunda DNA hasarı oluşmuştur. Oral yolla amarant, allura red ve new colchicine gibi kırmızı gıda boyaları ile beslenen gebe dişi ve erkek farelerde de DNA hasarının indüklendiği gösterilmiştir (Tsuda et al. 2001).

Rhodamin ve amarantın *D. melanogaster* üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, rhodaminin hem somatik hem de üreme hücrelerinde genotoksik olduğu ancak amarantın böyle bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Tripathy et al. 1995). Yine gıda boyalarından tartrazinin genotoksik etkileri *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılmış ve 0.03- 0.06%'lık uygulamaların mutajenite ve rekombinojeniteyi uyardığı gözlenmiştir (Niraj et al. 1989). Farelerde ponceau 4r boyasının kemik iliği hücrelerinde kromozomal anormallikler meydana getirdiği (Agarwal et al. 1993), black pn ve quinolin yellow'un hem insan lenfosit hücrelerinde hem de *Vicia faba* kök meristem hücrelerinde mutajenik ve klastojenik olduğu gösterilmiştir (Agarwal et al. 1993). Yine Masannat et al. (2009) metilen blue, patent blue ve indigo carmin gibi gıda boyalarının insan meme epitel hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Mpountoukas et al. (2010) amarant, eritrosin ve tartrazinin *in vitro* ortamda insan periferik kan hücrelerindeki genotoksik, sitotoksik ve sitostatik potansiyelini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre gıda boyalarının insan lenfosit hücrelerinde toksik etkiye sahip olduğu, kardeş kromatit değişimini (sister chromatit exchange: SCE) kontrol grubuna göre 1.7 kez arttırdığı ve direkt DNA'ya bağlanma etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Daha önce yapılan bu çalışmalar ile bizim deneylerimizden elde ettiğimiz toksikolojik ve teratojenik sonuçlar birbiriyle paralellik göstermektedir.

İngiltere'nin Southampton kentinde çeşitli cips, şekerleme ve gazozlarda sıklıkla kullanılan ponceau 4r boyasının 3 yaşındaki çocukların davranışları üzerindeki etkilerini belirlemek için bir araştırma düzenlenmiştir. Bu gıdaları

tüketen 277 çocuğun 75'inde hiperaktivite, 79'unda alerji ve 36'sında hem hiperaktivite hem de alerji görülmüştür. Yapılan araştırmanın devamında bu gıdaların kesilmesiyle birlikte çocuklarda görülen davranış bozukluklarının düzeldiği, yeniden alınmaları durumunda ise tekrarlandığı tespit edilmiştir (Yaman, 1996). Benzeri sonuçlar tartrazin ile yapılan çalışmalarda da gözlenmiş ve hiperaktivite gibi davranışsal bozukluklarda katalizör olarak hareket ettiği belirtilmiştir (Rowe and Rowe 1994, Ward (1997). Stevenson et al. (2010) tarafından gıda boyalarına bağlı olarak çocuklarda görülen hiperaktivitenin nedenlerini belirlemek için yapılan bir başka araştırmada, gıda boyalarının histamin-N-metil transferaz (HNMT) enzimini inhibe ettiği buna bağlı olarak beyine geçen histaminin ve onun miktarındaki artışın hiperaktiviteyi artırdığı bildirilmektedir. Moutinho et al. (2007)'a göre tartrazin gastrointestinal mikroflorada metabolize edildikten sonra aromatik amin gruplarına dönüştürülmektedir. Nitrit ve nitrat içeren gıda boyaları, amin gruplarıyla etkileşerek lipid peroksidaz ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmakta bu da hafıza ve öğrenme eksikliklerine, nörotoksisiteye ve beyin hücrelerinde histopatolojik hasara sebep olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin artması da oksidatif strese yol açmakta ve nörodejeneratif hasarlar gözlenmektedir. (Bansal ve Goyal, 2005). Gao et al. (2011) farelerde tartrazinin katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) miktarlarını azalttığını buna karşılık beyin dokusunda metabolik bir ürün olan malondialdehit (MDA) seviyesinin artırdığını, bu artışın da beyin hücrelerinde membran yapısının bozulmasına yol açtığını tespit etmişlerdir.

Yaptığımız literatür çalışmalarında, gıda boyalarının *D. melanogaster*'in ergin bireylerinde ömür uzunluğu üzerindeki etkileriyle ilgili sonuçlara rastlanılmamıştır. Bu nedenle ömür uzunluğu deneylerimizin sonuçlarını literatür bilgisi doğrultusunda kıyaslayamamaktayız. Ancak çeşitli gıda boyalarının farklı canlılar üzerindeki mutajenik ve klastojenik etkileri (Ito, 2000; Tsuda et al. 2001) ve bunların yansıması olarak fenotipte gözlenen teratojenik etkilerin ömür uzunluğunu normalden daha da kısaltması kuvvetle muhtemeldir. Ayrıca oksidatif stresin ömür uzunluğunu kısıtlayıcı bir faktör olması da gözden uzak tutulmamalıdır. Oksidatif stres de genetik ve metabolik bozukluklara, nörodejeneratif bozukluklara, kardiyovasküler hastalıklara, otoimmün hastalıklara, enfeksiyöz hastalıklara, alerjik patolojilere ve kansere yol açarak yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır (Droge 2002). Şekil 7-11'de görüldüğü gibi kullandığımız tüm gıda boya ları kronik beslenmeye bağlı olarak *D. melanogaster*'de ömür uzunluğunu kontrol grubuna göre oldukça kısaltmıştır ( $P < 0.05$ ). Bu nedenle her türlü GKM'lerin yasalara uygun olarak kullanılması ve gıda yönetmeliğine göre belirlenmiş dozların üzerinde ve amaç dışı olarak kullanılmaması gerekmektedir.

### Kaynaklar

- Agarwal K, Mukherje A, Sharma A 1993.** Configurational changes in rat liver nuclear chromatin caused by azo dyes. *Food Chem Toxicol.* 22: 337-344.
- Altuğ T 2001.** Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım., İzmir.
- Amin KA, Hameid HA, Abd Elsttar AH 2010.** Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol.* 48: 2994-2999.
- Anonymous 2002.** Gıdalarda kullanılan renklendiriciler tebliği, yetki kanunu *Türk gıda kodeksi yönetmeliği*, Tebliğ No: 2002/55, Resmi Gazete.
- Asero R 2001.** Perennial rhinitis induced by benzoate intolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 107:197.
- Bansal RC, Goyal M 2005.** Activated Carbon Adsorption, Taylor and Francis Group, Boca Raton. DOI: 10.1002/chin.200507277
- Batu A, Molla E 2008.** Lokum üretiminde kullanılan katkı maddeleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi.* 1:33-36.
- Bhatia MS 2000.** Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. *J Clin Psychiatry.* 61: 4736.
- Chung TK 1983.** The significance of azo reduction in the mutagenesis of azo dyes. *Mutat Res.* 114: 269-281.
- Çalışır Z, Çalışkan D 2003.** Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 32: 207-206.
- Droge W 2002.** Free radicals in physiological control of cell functions. *Physiol Rev.* 82: 47-95.
- Ekşi A 1996.** Ankara piyasasından sağlanan pasta süsleri ve şekerlemelerde sentetik boya miktarlarının araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erkmen O 2010.** Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53: 220-235.
- Furia ET 1980.** Synthetic Food Colors. *Handbook of Food Additives* (2nd Ed.) C.R.C. Pres Inc. London, 339-382.
- Gao Y, Li C, Shen J, Yin H, An X, Jin H 2011.** Effect of Food Azo Dye Tartrazine on Learning and Memory Functions in

Mice and Rats, and the Possible Mechanisms Involved. *J Food Sci*, 76: 125-129.

**Hallström H 1987.** Colours in food stuffs. *Toxicological Aspects Vår Föda*, 39: 415-419.

**Hiasa Y, Ohshima M, Kitahori Y, Konishi N, Shimoyama T, Sakaguchi Y, Hashimoto H, Minami S, Kato Y 1988.** The promoting effects of food dyes Erythrosine (Red 3) and Rose Bengal B (Red 105) on thyroid tumors. *Japanese J Cancer Res*, 79: 314-319.

**Ito Y 2000.** Recent state and the investigation of daily intake of food additives in Japan—21 years (1976–1996). *Food Sanitat Res*, 50:89-125.

**Larson KS 1975.** A teratologic study with the dyes Amaranth and Ponceau 4R in mice. *Toxicol*, 4: 75-82.

**Lockey SD 1959.** Allergic reactions to FD and C Yellow No 5 Tartrazine, an Aniline dye used as a coloring in various steroids. *Annals of Allergy*, 17: 719-21.

**Maier E, Kurz K, Jenny M, Schennach H 2010.** Food preservatives Sodium Benzoate and Propionic Acid and colorant Curcumin suppress Th1-type immune response *in vitro*. *Food Chem Toxicol*, 48: 1950-1956.

**Mamur S 2009.** Gıda katkı maddesi olarak kullanılan Sodyum Sorbat ve Potasyum Sorbat'ın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

**Masannat YA, Hanby A, Horgan K, Hardie LJ 2009.** DNA damaging effects of the dyes used in sentinel node biopsy: possible implications for clinical practice. *J Surg Res*, 154: 234-238.

**Mekkawy HA, Ali MO, El-Zawahry AM 1998.** Toxic effect of synthetic and natural food dyes on renal and hepatic functions in rats. *Toxicol Lett*, 95: 155-155.

**Mittal A, Kurup L, Mittal J 2007.** Freundlich and Langmuir adsorption isotherms and kinetics for the removal of tartrazine from aqueous solutions using hen feathers. *J Hazard Mater*, 146:243-248.

**Moutinho IID, Bertges LC, Assis RVC 2007.** Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C Yellow No: 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz J Biol*, 67: 141-145.

**Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, Christodoulou P, Poliliou S, Mourelatos C, Lambropoulou V, Lialiaris T 2010.** Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem Toxicol*, 48: 2934-2944.

**Niraj KT, Kalyani KP, Nabi MJ 1989.** Genotoxicity of Tartrazine studied in two somatic assays of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 224: 479-483.

**Poula M, Jarrya G, Elhkim MO, Poula JM 2009.** Lack of genotoxic effect of food dyes Amaranth, Sunset Yellow and Tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food Chem Toxicol*, 47: 443-448.

**Quirce S, Cuevas M, Olaguibel JM, Tabar AI 1994.** Occupational asthma and immunologic responses induced by inhaled Carmine among employees at a factory making natural dyes. *J Allergy Clin Immunol*, 93: 44-52.

**Renwiek AG 1995.** The use of an additional safety or uncertainty factor for nature of toxicity in the estimation Values. *Regul Toxicol Pharmacol*, 22: 250.

**Rowe KS, Rowe KJ 1994.** Synthetic food coloring and behavior: a dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. *J Pediatr*, 125: 691-8.

**Sarıkaya R, Solak K 2003.** Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksisitesinin araştırılması. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23: 19-32.

**Sarıkaya R, Selvi M, Akkaya N, Acar M, Erkoç F 2010.** Farklı konsantrasyonlardaki gıda boyalarının *Drosophila melanogaster* (mwh x flr)'de yaşama yüzdesi üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Dergisi*, 5: 38-46.

**Sasaki YF, Kawaguchi S 2002.** The comet assay with 8 mouse organs result with 39 currently used food additives. *Mutat Res*, 519: 103-119.

**Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S 2002.** The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*, 519: 103-119.

**Shimada C, Kano K, Sasaki YF, Sato I, Tsudua S 2010.** Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *J Toxicol Sci*, 35: 547-554.

**Sowbhagya HB, Smitha S, Sampathu SR, Krishnamurthy N, Bhattachary S 2005.** Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *J Food Eng*, 67: 367-371.

**Stevenson J, Sonuga-Barke E, McCann D, Grimshaw K, Parker KM, Rose-Zerilli MJ, Holloway JW, Warner JO 2010.** The role of histamine degradation gene polymorphisms in moderating the

effects of food additives on children's ADHD symptoms. *Am J Psychiatry*, 167: 1108-1115.

**Sudhic S, Khanna SK 1991.** Toxicological evaluation of permitted food colours. *India Dairy*, 43: 501-504.

**Tripathy NK, Nabi MJ, Sahu GP, Kumar AA 1995.** Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. *Food Chem Toxicol*, 33: 923-927.

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

**Uysal H, Şişman T, Aşkın H 2006.** *Drosophila* Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri (Genişletilmiş 2. Baskı), Atatürk Üniversitesi Yayın No.941, *Fen-Edebiyat Fakültesi Yayın No:103*, Ders Kitapları Serisi No:30, ISBN:975-442-111-0, Fen-Edebiyat Fakültesi Ofset Tesisleri, Erzurum.

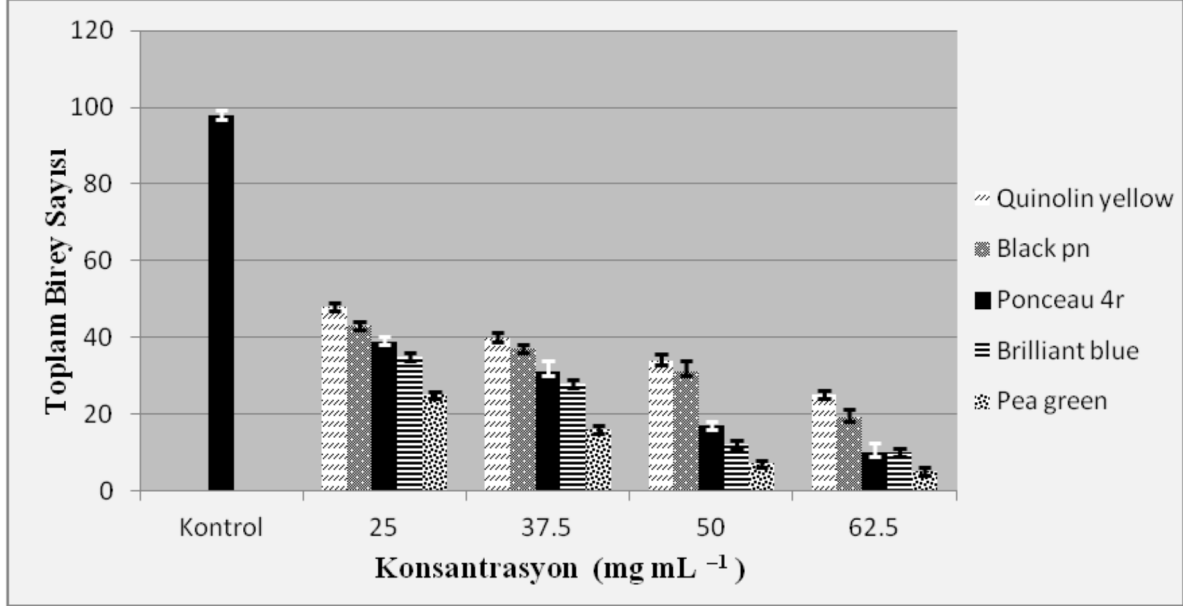
**Veien NK, Krogdahl A 1991.** Cutaneous vasculitis induced by food additives. *Acta Derm Venereol*, 71: 734.

**Vincent T, Behbehani MM 2001.** Toward a rational understanding of migraine trigger factors. *Med Clin North Am*, 85: 911-941.

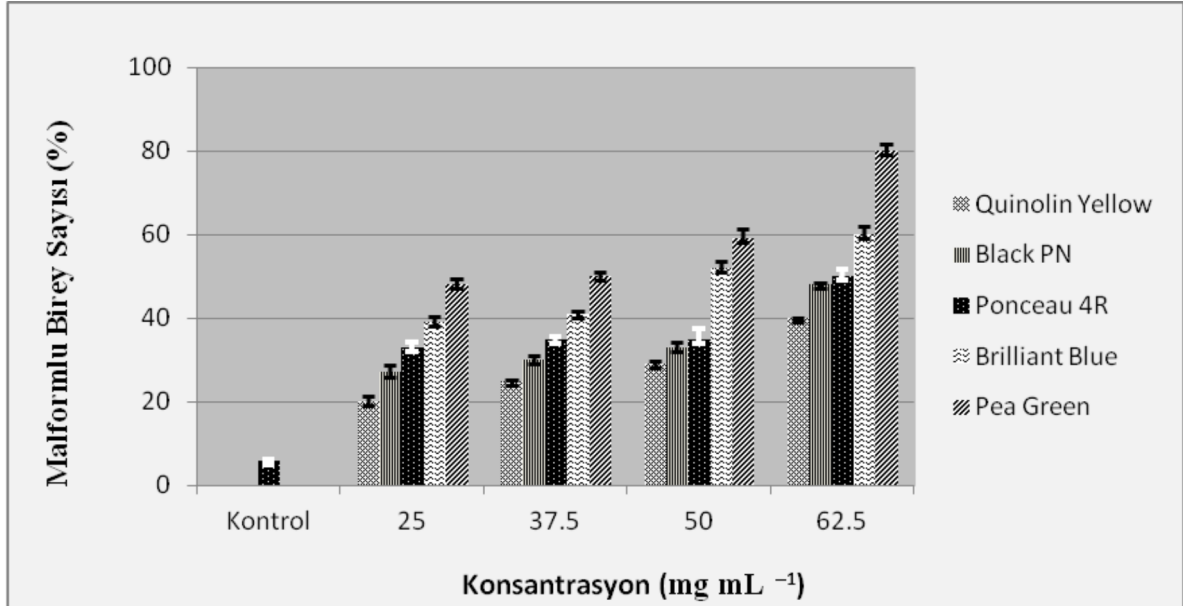
**Ward NI 1997.** Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. *J Nutr Environ Med*, 7: 333-42.

**Yaman M 1996.** Bazı gıda maddelerine katılan sentetik boyaların miktarlarının araştırılması, *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 13-56.

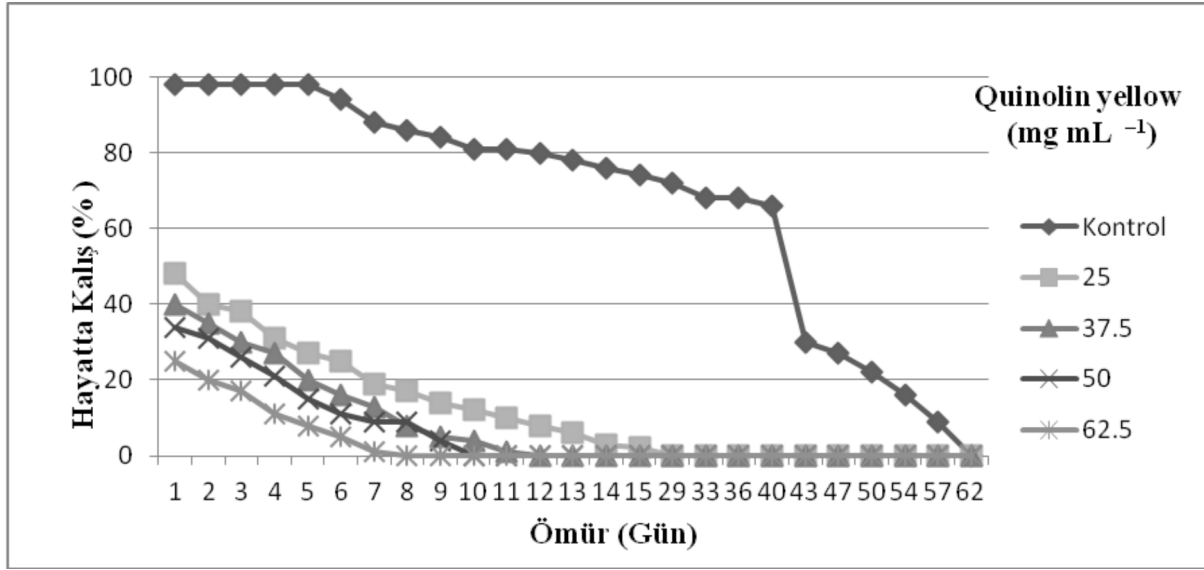
## ŞEKİLLER



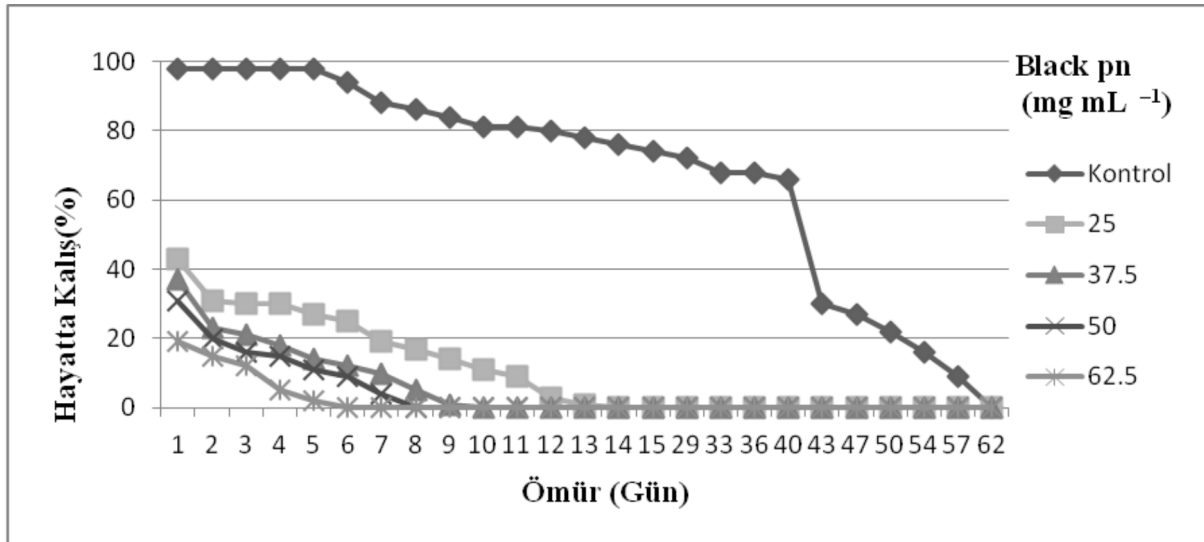
Şekil 5. F<sub>1</sub> nesline ait 3. evre larvalardan-ergine dönüşebilen birey sayılarının karşılaştırılması



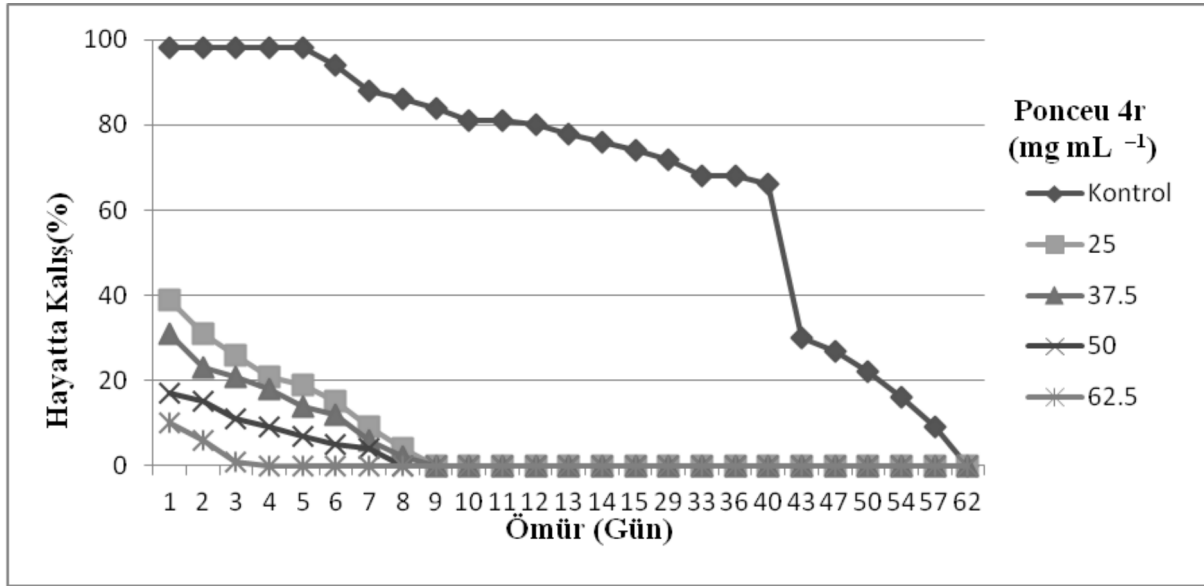
Şekil 6. F<sub>1</sub> neslinde erginleşebilen malformlu bireylerin karşılaştırılması



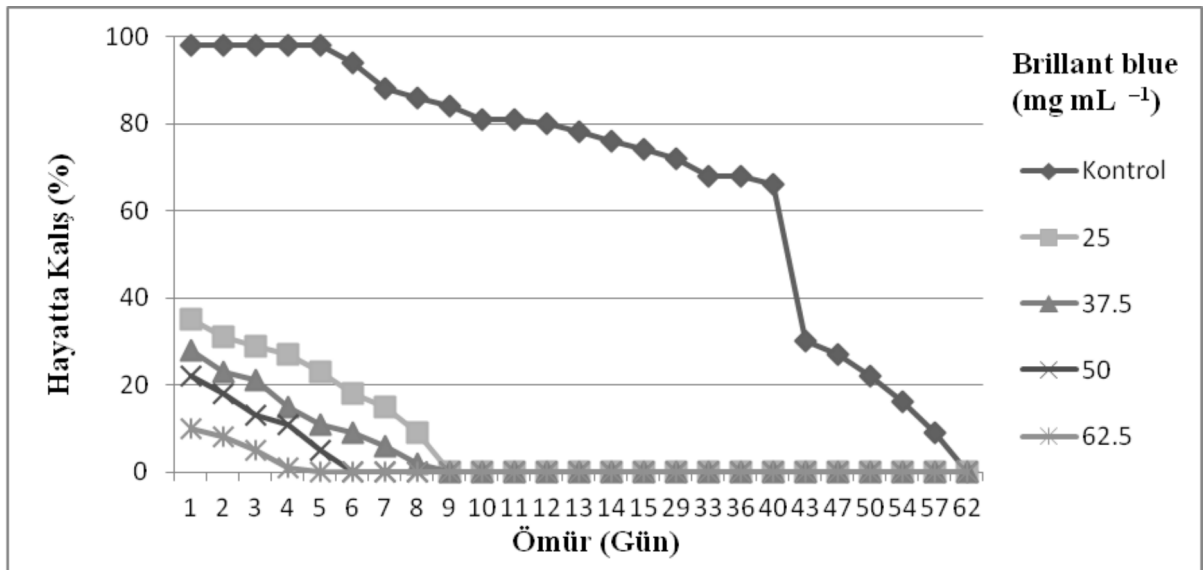
Şekil 7. Quinolin yellow içeren besi yerinde erginleşen F<sub>1</sub> bireylerinin hayatta kalış eğrileri



Şekil 8. Black pn içeren besi yerinde erginleşen F<sub>1</sub> bireylerinin hayatta kalış eğrileri

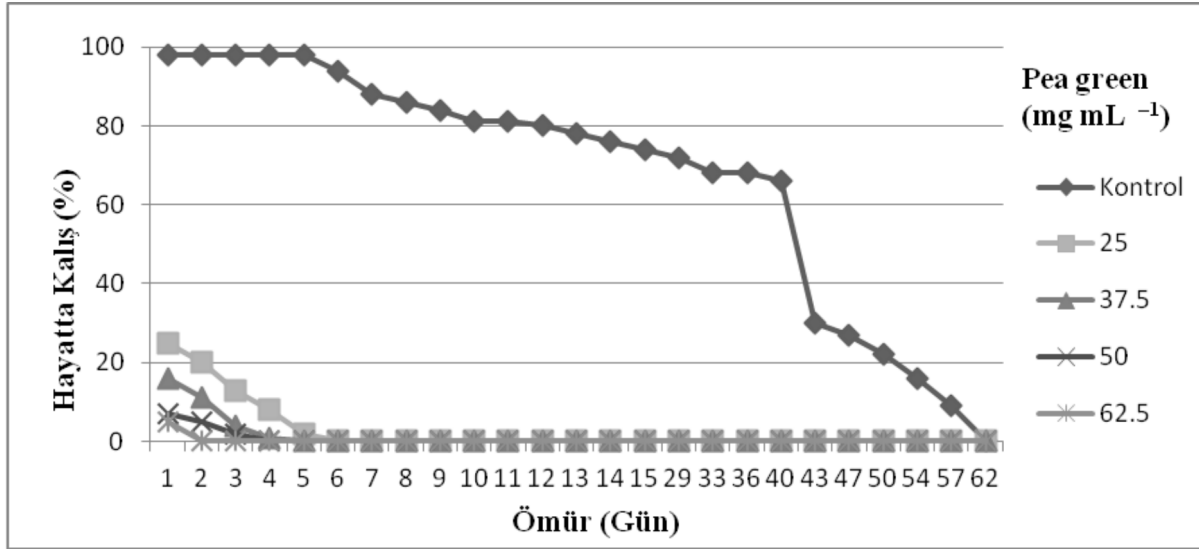


Şekil 9. Ponceau 4r içeren besi yerinde erginleşen F<sub>1</sub> bireylerinin hayatta kalış eğrileri



Şekil 10. Brilliant blue içeren besi yerinde erginleşen F<sub>1</sub> bireylerinin hayatta kalış eğrileri





Şekil 11. Pea green içeren besi yerinde erginleşen F<sub>1</sub> bireylerinin hayatta kalış eğrileri