

Benzoik Asit'in Drosophila melanogaster'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması

Genotoxicity of Benzoic Acid Studied in the Drosophila melanogaster Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

Rabia SARIKAYA

G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı, Ankara- TÜRKİYE
erabia@gazi.edu.tr

Kemal SOLAK

G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı, Ankara- TÜRKİYE

ÖZET

Bu çalışmada gıdalarda koruyucu olarak kullanılan benzoik asit'in genotoksik etkisi Drosophila melanogaster'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile değerlendirilmiştir. İki işaret geni taşıyan üç günlük trans-heterozigot larvalara farklı konsantrasyonlarda (50 mM, 75 mM ve 100 mM) test maddesi uygulanmıştır ve kimyasalın her konsantrasyonda letalitesi saptanmıştır. Deney sonuçlarına göre mutasyon gözlenen kanat sayısı ile toplam mutasyon arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir. Buna ilâve olarak her kanatta gözlenen mutasyonlar sayı ve tipine göre de sınıflandırılmışlardır. Bu çalışma gıda katkı maddelerinin doğru kullanımının insan sağlığı açısından önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Drosophila melanogaster, Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi, Benzoik asit, Genotoksikoloji

ABSTRACT

In this study, benzoic acid, which is food preservative, has been evaluated for genotoxicity in the wing somatic mutation and recombination test (SMART) of Drosophila melanogaster. Third-instar larvae trans-heterozygous for two genetic markers mwh and flr, were treated by different concentrations (50 mM, 75 mM and 100 mM) of the test compound and lethality of the chemical were determined for each concentration. A positive correlation was observed between total mutation and the number of mutated wings. In addition, the observed mutations were classified according to the size and type of the mutation per wing. The present study shows that the correct administration of some food additives has a significant effect on human health.

Key Words: Drosophila melanogaster, Somatic Mutation and Recombination Test, Benzoic acid, Genotoxicity

1. Giriş

Günümüzde besinlerin üretim ve tüketim ilişkileri, gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımını teknolojik bir zorunluluk olarak ortaya koymaktadır. Endüstrinin gelişmesi ile besin üretiminin ve işlenmesinin artması GKM kullanımını da artırmıştır. Beslenme alışkanlıklarının değişmesi, besin hazırlama için daha az zaman ayrılması gibi nedenler yarı-hazır veya ticarî olarak tamamen hazırlanmış olan besin üretimini teşvik etmiş, bu da GKM kullanımını kaçınılmaz kılmıştır.

GKM Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde şöyle tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi 1997): Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddelerdir.

Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde tam bir patlama olmuştur. Gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en

sıkça görülenleri egzema, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, ishal (özellikle çocuklarda) hiperaktiflik ve aşırı duyarlılık (hypersensitivity) vb.'dir (Güneşli, 2000).

Kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddelerinin sürekli olarak alındığında toksik etkiler gösterdikleri bilinmektedir (Briggs, 1997). Bu katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı zaman halk sağlığı açısından zararlı olabilir. Son zamanlarda kimyasal karsinojenlere maruz kalma, önemli bir sorun hâline gelmiştir. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek dozlarda kullanılsalar dahi, bu maddelerin bir süre sonra vücutta birikerek insan sağlığını tehdit edebilecek miktarlara ulaşabileceği, dokularda hasar meydana getirebileceği, kısaca insan için mutajenik ve karsinojenik olabileceği gibi konular göz ardı edilmemelidir.

Son yıllarda kimyasalların mutajenik ve genotoksik etkilerinin araştırılmasında prokaryotik ve ökaryotik sistemler kullanılmaktadır (Garcia ve Dapena,1974). Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda genel hücre metabolizması birbirinden büyük farklılıklar içerir. Bu nedenle kimyasalların prokaryotik bakteri sistemleri ile test sonuçları ökaryotik canlılarda aynı kimyasalların olası etkileri konusunda güvenilir bilgiler veremez. Ökaryotik canlı olan *Drosophila* hakkında genetik bilgi birikimi ve uygun deney hayvanı olma özellikleri nedeni ile kimyasalların genotoksik etkisini araştırmada sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, gıdalarda koruyucu olarak kullanılan katkı maddelerinden Benzoik asit'in canlılardaki genotoksik etkisi Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Bu çalışma gıda katkı maddelerinin gıda sanayinde kullanılmasının ve tüketici tarafından tüketiminin bilinçli bir şekilde olmasına yardımcı olacaktır.

2. Materyal ve Metod

2.1. *Drosophila* stokları

Deneylerde kullanılan *Drosophila melanogaster*'in sık kanat kıllılığı (multiple wing hair, *mwh/mwh*) ve düzensiz kanat kıllılığı (flare, *flr³/ In (3LR), TM3 Bd*) genlerine sahip iki mutant ırkı Zürih Üniversitesi Toksikoloji Enstitüsünden temin edildi. Homozigot çekinik bir mutasyon olan *mwh* geninin 3. kromozom üzerindeki yeri 0.0'dır. Kanat hücrelerinde normalde tek hücreden tek kıl çıkması gerekirken, birden fazla kıl çıkmasına neden olur. İkinci işaret geni flare (*flr*)'in 3. kromozomdaki yeri 39.0'dır. Fenotipte körelmiş kıl şeklinde görülür ve homozigot olduğunda lethal olup TM3 geni ile dengededir. Bu çalışmada *flr* soyu dominant Blade işaret geni taşımaktadır (Charles ve arkadaşları., 1991).

2.2. Uygulama

Stoklar ve deney sistemleri 25°C ve % 40-60 bağıl neme ayarlanmış etüvlerde tutuldu ve standart *Drosophila* besiyeri (Instant *Drosophila* Medium, Carolina Biological Supply Company, Burlington, N.C.) kullanıldı. Mutant soylardan 5 günlük *mwh* virjin dişilerle, aynı yaştaki *flr³* erkeklerinin çaprazlanmasından 3 gün sonra 4'er saat aralıklarla toplanan yumurtalardan trans-heterozigot üçüncü dönem lârvalar elde edildi. Standart besi ortamından alınarak yıkanan larvalar 100'erli gruplar hâlinde 1,5 g besi ortamı 5 ml belirlenen dozdaki kimyasal ile ıslatılarak ortama gömüldü (Graf ve arkadaşları., 1989). Kimyasal içeren standart besi ortamına alınan lârvalar gelişmelerini tamamlamaya bırakıldı. Pupadan çıkan ergin bireyler hafif eterle bayıltılarak diseksiyon mikroskobu altında cinsiyet ve fenotiplerine göre ayırt edildi. Her doz uygulaması üç kez tekrarlandı ve bu tekrar gruplarından alınan sonuçların farklılığının önemi χ^2 testi yapılarak kontrol edildi. Pupadan çıkan birey sayıları tespit edildikten sonra dominant Blade işaret geni taşımayan (normal kanat şekline sahip) bireylerden sadece dişiler (*Drosophila* erkeklerinde rekombinasyon görülmez) ayrılarak diğerleri atıldı (Graf ve arkadaşları., 1984). Seçilen bu dişi bireyler kanat preparatları hazırlanana kadar bekletilmek üzere %70'lik etanol içeren tüplere alındı.

2.3. Kanat preparatlarının hazırlanması

Normal fenotipli kanatlar mikroskop altında sinekten ayrılarak lâm üzerine yerleştirildi. Bir damla Faurse solüsyonu (30 g Arap zamkı, 20 ml glycerol, 50 g chloral hydrate, 50 ml distile su) kullanılarak kanatlar lâm üzerine tespit edildi. Lâmel ile kapatılan preparatlar üzerlerine küçük ağırlıklar konarak tozdan uzak petri kapları içinde kurumaya bırakıldı. Daha sonra kenarları tırnak cilâsı ile kapatılarak uzun süreli preparatlar elde edildi (Graf ve arkadaşları., 1984).

2.4. Kanatların mikroskopik analizleri

Belirlenen dozlarda uygulanan kimyasalların mutajenik etkisi kanat kıllarının mikroskop altında 400X büyütme ile incelendi. Mutasyonun oluşum şekline göre, mutasyon taşıyan hücre kümesinde 1-2 hücre olduğunda küçük küme (S=1-2, small single spot), 3-4 hücre olduğunda büyük küme (S>2, large spot) ve t (twin) (*mwh* ve *flr*³ fenotipinin her ikisinin de birlikte gözleendiği kümeler) şeklinde sınıflandırıldı. Ayrıca kimyasalları çözmede kullanılan su ile kontrol deneyleri yapıldı (Browder ve arkadaşları., 1991).

2.5. Deneyde Kullanılan Katkı Maddesinin Özellikleri

Deneylerde kullanılan benzoik asit beyaz renkli, katı ve kendine has kokusu olan bir maddedir. E kodu E210'dur. Gıdalarda antimikrobiyal madde olarak kullanılır. Benzoik asidin sinonimleri Benzenecarboxylic acid ve Phenylcarboxylic acid'dir. Kimyasal formülü C₇H₆O₂ olup, molekül ağırlığı 122,12'dir. Benzoik asit meyva suları, şuruplar, gazlı içecekler, ketçap, turşu, margarin, sofralık zeytin, kakaolu mamüller, bisküvi, gofret, kek ve kremler gibi birçok üründe küf, maya ve bakteri faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkan bozulmaları önlemek amacıyla kullanılır. Benzoik asidin gıdalarda kullanıldığı doz aralığı 150-1000 mg/kg'dır.

3. Bulgular

Bu çalışmada, gıdalarda koruyucu olarak kullanılan Benzoik asit'in genotoksik etkisi *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Benzoik asit 50 mM, 75 mM ve 100 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulanmış ve sonuçlar su kontrol grubunun değerleri ile karşılaştırılmıştır. Deney grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı Chi-Square Test ile hesaplanmış ve sonuçlar Tablo-1'de verilmiştir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak genotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir.

Benzoik asidin uygulandığı farklı konsantrasyonlar, kimyasal uygulaması sonucunda hayatta kalan sineklerin yaşama yüzdeleri, mutasyon gözlenen kanat yüzdeleri ve kanatlarda tespit edilen toplam mutasyon yüzdeleri Tablo-1' de gösterilmiştir. Bulunan değerler kontrol grubu (su) ile karşılaştırılmış ve aradaki farkın anlamlılığı Khi-Square Testi ile belirlenmiştir.

Tablo-1: Benzoik asit'in genotoksitesitesi ile ilgili sonuçlar

| DOZ (mM) | BENZOİK ASİT | | |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------|
| | YAŞAMA YÜZDESİ (%) | MUTASYON GÖZLENEN KANAT (%) | TOPLAM MUTASYON (%) |
| 50 mM | 72 * | 20,3 * | 35,74 *** |
| 75 mM | 60 ** | 27,4 *** | 62,50 *** |
| 100 mM | 40 *** | 44,64 *** | 86,46 *** |
| Kontrol | 98 | 7,59 | 14,55 |

* Kontrole göre $P < 0.05$ düzeyinde önemli (X^2 test)

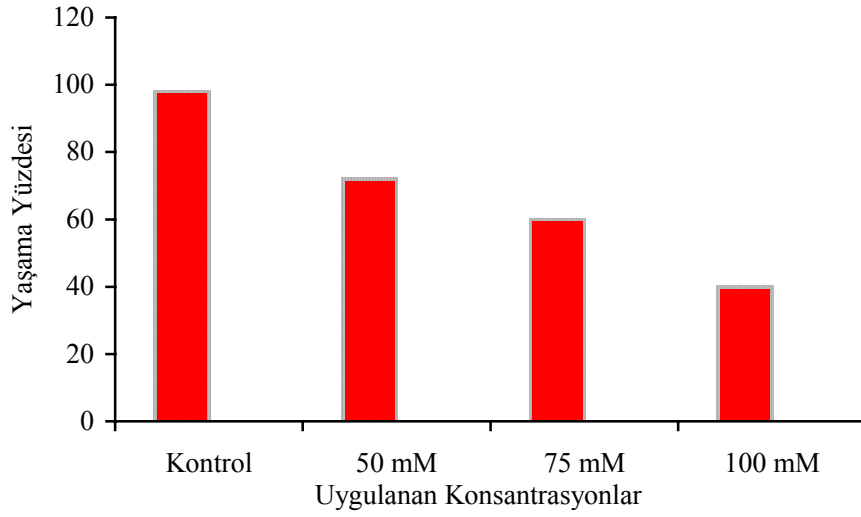
** Kontrole göre $P < 0.01$ düzeyinde önemli (X^2 test)

*** Kontrole göre $P < 0.001$ düzeyinde önemli (X^2 test)

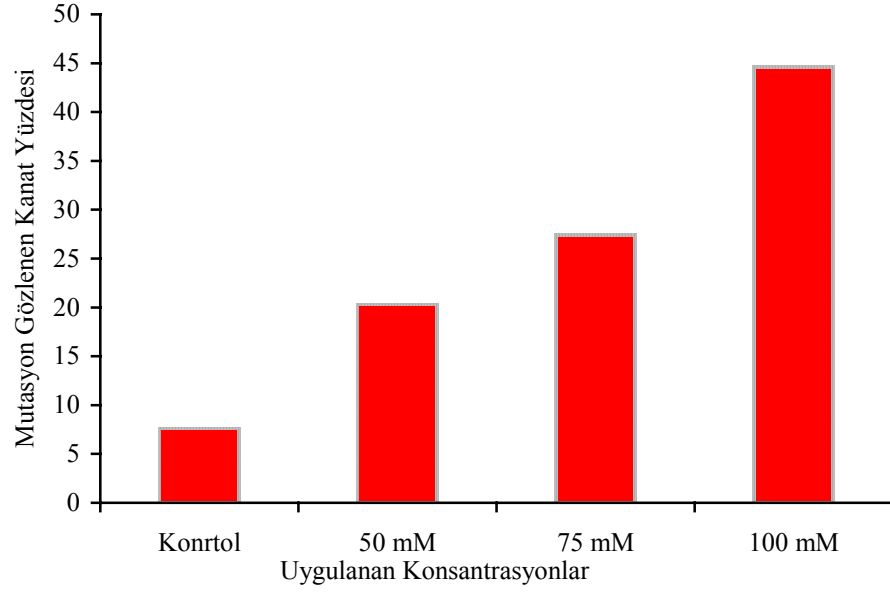
Benzoik asidin uygulandığı 50 mM, 75 mM ve 100 mM'lık konsantrasyonlar ve kontrol gurubunun yaşama yüzdeleri Şekil-1'de verilmiştir. Grafikte konsantrasyon arttıkça

yaşama yüzdesi kontrol grubuna oranla önemli ölçüde azalmıştır. Bu da benzoik asidin toksik etkisinin konsantrasyon arttıkça arttığını göstermektedir.

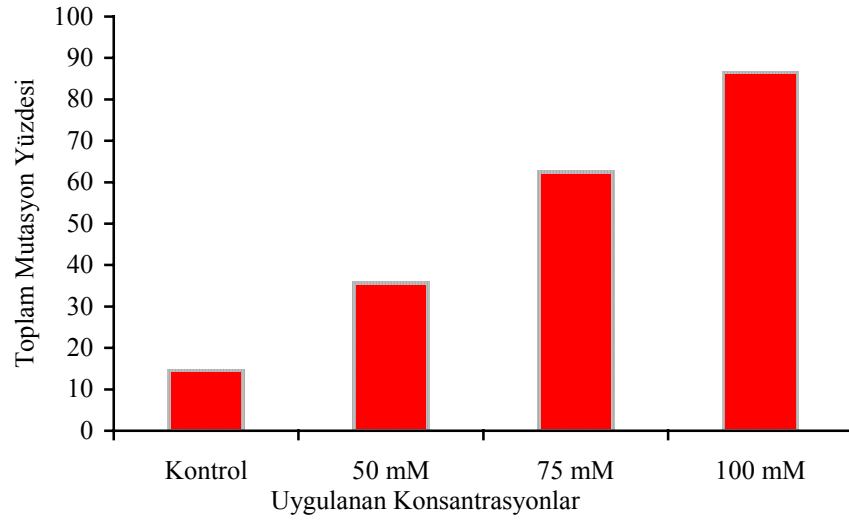
Benzoik asidin uygulandığı farklı üç konsantrasyon ile hayatta kalarak incelenebilen sineklerdeki mutasyon gözlenen kanat yüzdeleri arasındaki ilişki Şekil-2’de gösterilmiştir. Bu grafikte konsantrasyon artışına bağlı olarak mutasyon gözlenen kanat yüzdesi artmaktadır. Bu artış kontrol grubuna oranla anlamlı bulunmuştur. Şekil-3’te Benzoik asidin uygulandığı farklı konsantrasyonlar ile toplam mutasyon yüzdesi arasındaki ilişki görülmektedir. Bu grafikte de konsantrasyon arttıkça toplam mutasyon yüzdesinin artması dikkat çekmektedir.



Şekil-1: Benzoik Asidin Uygulandığı Konsantrasyonlar ile Yaşama Yüzdesi Arasındaki İlişki



Şekil-2: Benzoik Asidin Uygulandığı Konsantrasyonlar ile Mutasyon Gözlenen Kanat Yüzdesi Arasındaki İlişki



Şekil-3: Benzoik Asidin Uygulandığı Konsantrasyonlar ile Toplam Mutasyon Yüzdesi Arasındaki İlişki

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada Benzoik asit 50 mM, 75 mM ve 100 mM olmak üzere üç konsantrasyonda uygulanmış ve sonuçlar kontrol grubunun değerleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubuyla kontrol grubu arasındaki fark Chi-Square Test ile her bir grup için anlamlı bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça yaşama yüzdesinin azalması ve toplam mutasyonun artması Benzoik asidin *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)'ne göre hem toksik hem de mutajenik olduğunu göstermektedir. Bu çalışma gıda katkı maddeleriyle yapılan diğer çalışmalarla genotoksisite bakımından benzerlik göstermektedir.

Graf ve arkadaşları (1989), farklı laboratuvarlarda aralarında nitrosopiperidin ve sodyum nitrit gibi kimyasalların da bulunduğu 30 kimyasal *Drosophila* SMART Test ile genotoksik açıdan değerlendirmişlerdir. Kronik beslenme sonrasında 10 mM'lık nitrosopiperidine iki bağımsız deneyde de açıkça pozitif sonuç vermiştir. Sodyum nitrit ise 72,5 mM'lık konsantrasyonda genotoksik bulunmuştur. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan benzoik asitte bir gıda koruyucusu olup 75 mM'lık dozu genotoksisite bakımından anlamlı sonuç vermiştir.

Schlatter ve arkadaşları (1992), gıda katkı maddelerinden potasyum sorbat, sodyum sorbat ve 4,5-epoxy-2-hexenoic acid'in genotoksik etkisini SMART ile araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda sadece 4,5-epoxy-2-hexenoic acid'in zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu, potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın ise genotoksik etki göstermediğini saptamışlardır.

Gıda boyalarından tartrazin'in genotoksik etkisi *Drosophila*'da SMART ile Niraj ve arkadaşları (1989) tarafından araştırılmış ve tartrazinin hem mutajenik hem de rekombinojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Graf ve arkadaşları (1994), yaptıkları çalışmada İspanya orijinli beş şarap, bir brandy, üç bitki çayı ve siyah çayın SMAR Test ile genotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuçta alkollü içeceklerden kırmızı şarapta, çaylardan ise siyah çay (*Camellia sinensis*) ve iki bitkisel çayda (*Achillea millefolium*, *Urtica dioica*) genotoksik etkisinin olduğu gözlemiştir. Farklı içeceklerde ve bitkisel çaylarda mevcut bulunan Ouercetin ve Rutin

maddelerinin SMART Test ile genotoksik etkisinin olduğu bu araştırma ile açığa çıkartılmıştır.

Graf ve arkadaşları (1986), SMART Test ile instant kahvenin mutajenik değil fakat rekombinantik olduğunu göstermişlerdir. Ramirez ve arkadaşları (2001), sodyum nitridin genotoksik etkisine karşı yeşil biber ekstraktının antimutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır. Kronik uygulamalarda sodyum azid'in genotoksik etkisinin olduğu da bu test ile gösterilmiştir (Gonzales ve arkadaşları, 1997).

Gilman ve Godman (1980), iki farklı kahve konsantrasyonu SMART Test ile genotoksik açıdan karşılaştırmışlardır. Çalışmada iki farklı ırkın işaret gen özellikleri kullanılarak trans-heterozigot larvalar kullanılmıştır. Kullanılan yöntemde ergin erkek sinekler sulu kahve solüsyonunda, metabolizmaları farklı olduğundan beslenirken işaret geni taşıyan dişilerle çaprazlanmış ve F₁, F₂ generasyonlarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ergin kanatlarında oluşan kılların yapı şekil farklılıkları analiz edilmiş ve mitotik rekombinasyon sonucu değişik fenotipte gözlenen mutasyonlar oluşmuştur. Farklı iki şekilde hazırlanan kahvenin içinde bulunan kafein somatik hücreleri konsantrasyona göre etkilemiştir. Sonuçta, yüksek konsantrasyonlu uygulamalarda mutasyonel kayıplar olmuştur, fakat istatistik olarak sonuç önemsiz bulunmuştur. Idamar ve arkadaşları (2002), üç tıbbî bitki çeşidinden ekstrakte ettikleri uçucu yağların genotoksik etkisini SMART Testi ile araştırmışlar ve bu maddelerin genotoksik değil antigenotoksik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Ebringer ve arkadaşları (1982) iki nitroz içeren gıda koruyucusunun mutajenik etkisini incelemişler ve 5-NFAA {3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid} mutajenik bulunmuştur.

Guzman ve arkadaşları (1998), *Drosophila melanogaster*'de SMART Testi ile methyl urea, sodyum nitrit ve bunların kombinasyonlarının genotoksitesini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada methyl urea genotoksik bulunmazken sodyum nitrit'in 36 mM'lik konsantrasyonunda toplam mutasyon yüzdesi zayıf bulunmuştur. Ancak methyl urea ve sodyum nitridin birlikte uygulanması sonucunda genotoksik etkinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir.

Frei ve arkadaşları, (1992) genotoksik potansiyeli olan on altı pyrrolizidine alkaloid *Drosophila*'nın kanat hücrelerindeki somatik mutasyon ve rekombinasyonun

incelenmesi ile test etmişlerdir. Hayvan türleri ve insanın özellikle karaciğerinde patojenik toksik etkileri olan bu maddeler genotoksik etkilerine göre sıralanmıştır.

Nane ve çam bitkisinden ekstrakte edilen bazı uçucu yağların genotoksik etkiye sahip olduğu yine SMART Test ile Lazutka ve arkadaşları (2001) tarafından tespit edilmiştir.

Cunha ve arkadaşları (2002), kanser tedavisinde kullanılan iki ilâcın genotoksik etkisini araştırmışlar ve SMART Testi sonuçlarına göre bu ilaçların yüksek rekombinojenik aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Tiburi ve arkadaşları (2002), Vincristine, vinblastine ve vinorelbine isimli alkaloitlerin genotoksik etkisini wing spot test (SMART) ile araştırmışlar ve üç alkaloitinde genotoksik etkisinin yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Kalender (1997), sodyum benzoat ve tartrazinin fare dermal ve ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon etkilerini araştırmıştır. Sodyum benzoat ve tartrazin, ağız ve enjeksiyon yoluyla farelere (*Mus musculus domesticus*) verilmiş ve mast hücrelerindeki degranülasyon Transmission Electron Microscope (TEM) ile incelenmiştir. Sonuç olarak, hem dermal bağ dokusu mast hücrelerinde, hem de ince bağırsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon tespit etmişlerdir. En fazla degranülasyon Sodyum benzoat ve tartrazinin birlikte uygulandığı grup olup, bunu Sodyum benzoatın tek başına uygulandığı grup izlemektedir. En az degranülasyon ise tartrazinin tek başına uygulandığı grupta rapor edilmiştir.

Adams'a (1992) ve Yurttagül (1993)'e göre benzoik asit astım, deri döküntüleri, hiperaktiviteye neden olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada Ankara piyasasından sağlanan meyva sularında Benzoik asit miktarının izin verilen değeri aştığı saptanmıştır (Yentür ve Bayhan 1990).

Tüm dünyada yeterli ve dengeli beslenme sorununun; organizmanın yapı taşlarını oluşturan, biyolojik değeri yüksek gıda maddelerinin tüketimi ile çözümlenebileceği bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, dengeli beslenmenin insanların fiziksel ve mental çalışmalarını büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin kullanımları ile ilgili olarak uyulması zorunlu olan bazı temel ilkeler vardır. GKM yasalara uygun şekilde kullanıldığında, yani izin verilen katkı maddesi izin verilen besinlerde ve izin verilen miktarlarda kullanıldığında; yararlandığımız ve

sağlık riskleri minimize edilmiş maddelerdir. Uygun GKM kullanımı ile ürün çeşitliliği artacak, besin kayıpları azalacak, fiyatlar düşecek ve beslenme durumu olumlu etkilenecektir. GKM'nin uygun kullanımı üretici, tüketici ve devlet iş birliğini gerektirmektedir. Üreticiler otokontrolle ürettikleri besinin kalitesini, üretim aşamalarında, satışa sunmadan önce, kontrol etmeye önem vermelidir. Bunu kavrayan üreticiler kaliteli ve sağlıklı üretim yaparak hem halk sağlığına hizmet edecekler, hem de rekabette öncelik kazanacaklardır. Tüketiciler GKM'ler konusunda bilinçlendirilmelidir. Besin sanayisi için tüketici istekleri son derece önemlidir. Bilinçli tüketici, doğru GKM kullanımı konusunda, hem üreticiyi hem de devleti etkin kontrol yapma konusunda daha duyarlı hâle getirecektir.

Kaynaklar

- Adams EJ., 1992. Nutritional Care in Food Allergy and Food Intolerance. Mohan LK., Arlin M. (Ed): Food Nutrition and Food Therapy. WB Saunders Company. Philadelphia.
- Briggs DR. 1997. Food Additivis. Wahlgvist ML(Ed). 'Food and Nutrition. Allen & Unwin Pty Ltd. Australia.
- Browder, L. W., C. A. Erickson, W. R. Jerrery (1991). 'Developmental Biology' Saunders College Publishing, pp. 213-216, 589-590.
- Charles, R., Worthing, C. R. and Hance J. (1991). 'The Pesticide Manuel (9th Edition) British Corp Protection Council'.
- Cunha, K.S., Reguly, M.L., Graf, U., and Andrade, H.H. (2001). "Taxanes: The Genetic Toxicity of Paclitaxel and Docetaxel in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*", Mutagenesis, 16(1):79-84.
- Ebringer, L., Subik, J., Lahitova, N.(1982), 'Mutagenic Effect of Two Nitrofuran Food Preservatives, Neoplasma, 29(6): 675-684.
- Frei, H., Lüthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Würigler F. E. and Schlatter, C. (1992). "Structure Activity Relationships of The Genotoxic Potencies of Sixteen Pyerrolizidine Assyed for The Induction of Somatic Mutation and

- Recombination in Wing Cells of *Drosophila melanogaster*", Chemical Biology Interactions, 83: 1-22.
- Garcia-Bellido, A., J. Dapena, (1974) 'Induction, Detection and Characterization of Cell Differentiation Mutants in *Drosophila*', Molec. Gen. Genet. 128:117-130.
- Gilman, A.G. and Godman, L.S. (1980). "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Mac Millan Publishing, New York, 1650 p.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juan, H. and Hall, J.V. (1984). 'Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*', Environmental Mutagenesis, 6:153-188.
- Graf, U., Würgler, F. E. (1986), 'Investigation of Coffee in *Drosophila* Genotoxicity' Food Chem. Toxicol., 24 (8): 835-842.
- Graf, U., H. Frei, A. Kagi, A. J. Katz ve F. E. Würgler, (1989). 'Thirty Compounds Tested in The *Drosophila* Wing Spot Test', Mutation Research. 22: 359-373.
- Graf, U., Moraga, AA.,Castro, R., Diaz Carillo E.,(1994). 'Genotoxicity Tesiting of Different Types of Beveragas in The *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test', Food Chem. Toxicol., 32(5) 423-430.
- Gonzales-Cesar, E. and Ramos-Morales, P. (1997). "Sodium Azide Induces Mitotic Recombination in *Drosophila melanogaster*", Mutation Research, 389(2-3): 157-165.
- Guzman-Rincon, J., Espinosa, J. and Graf, U. (1998). "Analysis of The In Vivo Nitrosation Capacity of The Larvae Used in The Wing Somatic Mutation and Recombination Test of *Drosophila melanogaster*", Mutation Research, 412(1): 69-81.
- Güneşli,A. (2000). "Bazı Gıda Boyalarının Toksikolojik Etkileri" Seminer, A.Ü.Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.
- Idoamar, M., Hamms, R.E. and Alonsa, A.M. (2002). "Genotoxicity and Antigenotoxicity of Some Essential Oils Evaluated by Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster*", Mutation Research,513:61-68.
- Kalender,S., (1997). 'Sodyum Benzoat ve Tartrazin Fare Dermal ve İnce Bağırsak Bağ Dokusu Mast Hücrelerinde Degranülasyon Etkileri', Doktora Tezi, A.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Lazutka, J.R., Mierauskiene, J., Slapsyte, G. and Dedonyte, V. (2001). "Genotoxicity of Dill (*Anethum graveolens* L.), Peppermint (*Mentha piperita* L.) and Pine (*Pinus sylvestris* L.) Essential Oils in Human Lymphocytes and *Drosophila melanogaster*", Food Chemical Toxicology, 39(5):485-92.
- Niraj, K.T., Kalyani, K.P. and Nabi, M.J. (1989). "Genotoxicity of Tartrazine Studied in Two Somatic Assays of *Drosophila melanogaster*", Mutation Research, 224, 479-483.

- Ramirez, P.V., Judith, G.R., Espinosa, A. and Susana, M.R. (2001). "Antimutagenic Effect of One Variety of Gren Pepper and Its Possible Interference With The Nitrosation Process", *Mutation Research*, 496:39-45.
- Schlatter, J., Wurgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Hollinger, E. and Graf, U. (1992). "The Potential Genotoxicity of Sorbates: Effects on Cell In Vitro In V79 Cells and Somatic Mutations in *Drosophila*", *Food Chemicals and Toxicology*, 30, 843-851.
- Tiburi, M., Reguly, M., Schwartzmann, G., Cunha, K., Lehmann, M. and Andrade, H. (2002). "Comparative Genotoxic Effect of Vincristine, Vinblastine, and Vinorelbine in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*", *Mutation Research*, 26;519(1-2):141.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmî Gazete. Sayı: 23172 16 Kasım 1997.
- Yentür G., Bayhan A. (1990). 'Bazı Gıda Maddelerinde Sorbik ve Benzoik Asit Miktarlarının Araştırılması'. *Gıda*. 15(2): 79.
- Yurttagül M., (1993) 'Hızlı Hazır Yemek Fast Food Sisteminde Kullanılan Katkı Maddeleri' Akdağ F., Arslan P(Ed):Hızlı Hazır Yemek Sistemi (Fast Food). Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını:6, Ankara.