

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ MODEL ORGANİZMASI *Vicia faba* ÜZERİNE GIDA BOYASI
AMARANTH'IN MİTOTİK ETKİLERİ

AYŞEGÜL BEYZA YEMİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ MODEL ORGANİZMASI *Vicia faba* ÜZERİNE
GIDA BOYASI AMARANTH'IN MİTOTİK ETKİLERİ

AYŞEGÜL BEYZA YEMİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ SEMA TÜLAY HEKİMBAŞI

GEBZE
2020

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MITOTIC EFFECTS OF FOOD COLORING
AMARANTH ON *Vicia faba* PLANT MODEL
ORGANISM

AYŞEGÜL BEYZA YEMİŞ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASST. PROF. DR. SEMA TÜLAY HEKİMBAŞI

GEBZE
2020

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/07/2020 tarih ve 2020/32 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/07/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ayşegül Beyza YEMİŞ'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üyesi S. Tülay HEKİMBAŞI

ÜYE

: Prof. Dr. Yelda Özden ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Filiz VARDAR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu tez çalışmasında, Amaranth gıda boyasının genotoksik etkisi; bitki model organizması *Vicia faba* (bakla) kullanılarak; kontrol grubu (saf su), 30, 50, 70, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonları kullanılarak araştırıldı. Amaranth sulu çözeltisinde bakla tohumlarını çimlendirip, Amaranth'ın tohum çimlenmesi, kök gelişimi, mitotik indeks ve mitotik anormallikler üzerine etkisi mitoz bölünmenin tüm evrelerinde araştırılıp nitelendirildi. İncelenecek preparatların hazırlanmasında Feulgen ezme preparat tekniği kullanıldı.

Çalışmada; 24, 48 ve 72 saat çimlenme sürelerinin kullanıldığı konsantrasyon gruplarında çimlenme oranlarındaki değişim, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.10$). Kök gelişimi ile ilgili yapılan araştırmalarda kök gelişiminin; 250 mg/L konsantrasyon grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı ($0.01 \leq p < 0.05$), 500 mg/L konsantrasyon grubunda ise; ileri derecede anlamlılık göstererek azaldığı sonucuna varılmıştır ($p < 0.001$).

Tüm konsantrasyon gruplarında hesaplanan mitotik indeks oranı ise; ileri derecede anlamlı olacak şekilde azaldı ($p < 0.001$). Hücrelerde rastlanan anormallikler; metafaz plağında toplanamama, kromozom yapışması, çok kutuplu metafaz, interfazda mikronükleus ve nükleusun odalara ayrılması şeklinde gözlemlendi, bu anormallik oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($0.01 \leq p < 0.05$).

Sonuç olarak; Amaranth'ın çimlenmeye etki etmediği ancak 250 ve 500 mg/L konsantrasyon grubunda kök gelişimini olumsuz etkilediği, mitotik indeks ve mitotik anormalliklere bakıldığında ise; tüm konsantrasyon gruplarında genotoksik etkisi olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Vicia faba*, Amaranth, mitotik indeks, genotoksisite, kök gelişimi, mitotik anormallik.

SUMMARY

In this thesis; the genotoxic effect of food coloring Amaranth were investigated using the plant model organism *Vicia faba* (broad bean). Control group (dH₂O) and Amaranth aqueous solutions were prepared in 30, 50, 70, 100, 250 and 500 mg/L concentrations. The seeds were germinated to observe the effects of Amaranth on seed germination, root development, mitotic index and mitotic abnormalities. All stages of mitosis were also characterized using the Feulgen squash method.

In this study; the changes in germination rates of *Vicia faba* seeds in 24, 48 and 72 hours intervals were not found to be statistically significant compared to the control group ($p > 0.10$). The root development were decreased statistically significant in the 250 mg/L concentration group ($0.01 \leq p < 0.05$). But, in the 500 mg/L concentration group; it was decreased statistically highly significant ($p < 0.001$).

The rate of mitotic index calculated in all concentration groups were found to be decreased statistically highly significant ($p < 0.001$). Abnormalities in cells were observed to be as; the failure of alignment in the metaphase plate, sticky chromosomes, multipolar metaphase, micronucleus in the interphase and the partial nucleus. All these abnormality rates were found to be statistically significant ($0.01 \leq p < 0.05$).

As a result of this study; Amaranth does not found to be affected the seed germination. Eventhough, It affects root development negatively in the 250 and 500 mg/L concentration group. Mitotic index and mitotic abnormalities indicate that Amaranth has genotoxic effect on *Vicia faba* in all concentration groups.

Keywords: *Vicia faba*, Amaranth, mitotic index, genotoxicity, root development, mitotic abnormalities.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince; bilimsel birikimini benimle paylaşıp, her zaman beni motive eden, bana destek olan ve güler yüzüyle yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema Tülay HEKİMBAŞI'na teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca; maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan, benim için her türlü fedakarlığı yapan, ellerinden gelen tüm imkanları sunan ve bana duydukları güvenle beni yüreklendiren sevgili annem Mesude AKALIN'a, sevgili babam Hüseyin AKALIN'a, sevgili abim Ahmet Selman AKALIN'a ve hayatımın her alanında olduğu gibi yoğun çalışmalarım sırasında da bana yardımcı olup beni bir an olsun yalnız bırakmayan, desteğini hep üzerimde hissettiğim sevgili eşim Safa YEMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum ve bu tezi onlara ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaranth Gıda Boyası	3
1.1.1. Kimyasal Yapısı	4
1.1.2. Kullanım Alanları	5
1.1.3. Canlılar Üzerine Etkisi	6
1.1.3.1. İnsanlar Üzerine Etkisi	6
1.1.3.1.1. Toksik Etkisi	6
1.1.3.1.2. Mutajenik Etkisi	7
1.1.3.2. Hayvanlar Üzerine Etkisi	8
1.1.3.2.1. Toksik Etkisi	8
1.1.3.1.2. Mutajenik Etkisi	12
1.1.3.3. Bitkiler Üzerine Etkisi	13
1.2. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	14
2. MATERYAL ve METOD	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Bakla (<i>Vicia faba</i>)	15
2.1.2. Amaranth Gıda Boyası	15
2.2. Metod	16
2.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi	16
2.2.2. Çimlenen Tohumlarda Kök Uzunluklarının Ölçülmesi	16
2.2.3. Mitoz Preparatlarının Hazırlanması	16
2.2.4. Mitotik İndeks	17

2.2.5. Mitotik Anormallik Gözlemleri	17
2.2.6. İstatistiksel Verilerin Hesaplanması	18
3. BULGULAR	19
3.1. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi	19
3.2. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Kök Gelişimi Üzerine Etkisi	20
3.3. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Mitotik İndeks Üzerine Etkisi	23
3.4. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi İle Gözlenen Mitotik Anormallikler	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
A	: Anormal
ADI	: Önerilen Günlük Tüketim Miktarı
ALP	: Alkalın fosfataz
ALT	: Alanin aminotranferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
C	: Karbon
cm	: Santimetre
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E	: Avrupa
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	: Gram
H	: Hidrojen
HCL	: Hidroklorik asit
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi
kg	: Kilogram
L	: Litre
LPO	: Lactopropioaseto-orcein
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MÖ	: Milattan Önce

N	:	Normal
N	:	Azot
Na	:	Sodyum
nm	:	Nanometre
O	:	Oksijen
P	:	Fosfor
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
S	:	Kükürt
SMART	:	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
WHO	:	Dünya Sağlık �rg�t�

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.: Amaranth bitkisinin çiçeklerinin görüntüsü.	4
1.2.: Sırası ile oral yoldan 157.5 mg/kg Kurkumin (C), 315mg/kg Günbatımı Sarısı (B) ve 47 mg/kg Amaranth (A) uygulanan sıçan fetüslerinde görülen büyüme geriliği.	8
1.3.: 47 mg/kg dozda Amaranth uygulanan sıçan fetüsünün kontrol ile karşılaştırıldığında kalp ve akciğer hipoplazisi.	8
1.4.: Kafatası kemiklerinde ve omurlarda meydana gelen anomaliler.	9
3.1.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 24 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.	20
3.2.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 48 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.	21
3.3.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 72 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.	22
3.4.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal profaz safhası (10x40).	24
3.5.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal metafaz safhası (10x40).	24
3.6.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal anafaz safhası (10x40).	25
3.7.: Amaranth'ın 30 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde kromozom yapışması (10x40).	26
3.8.: Amaranth'ın 30 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafaz plağında toplanamama (10x40).	26
3.9.: Amaranth'ın 50 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafazda kromozom yapışması ve çok kutuplu metafaz (10x40).	27
3.10.: Amaranth'ın 50 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde çok kutuplu metafaz (10x40).	28
3.11.: Amaranth'ın 70 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde interfazda mikronükleus (üst ok) ve çok kutuplu metafaz (alt ok) (10x40).	29

3.12.:	Amaranth'ın 70 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde nükleusun odalara ayrılması (10x40).	29
3.13.:	Amaranth'ın 100 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde çok kutuplu metafaz (10x40).	30
3.14.:	Amaranth'ın 100 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde interfazda mikronükleus (10x40).	31
3.15.:	Amaranth'ın 250 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde nükleusun odalara ayrılması (üst ok) ve çok kutuplu metafaz (alt ok) (10x40).	32
3.16.:	Amaranth'ın 250 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafazda kromozom yapışması (üst ok) ve mikronükleus (alt ok) (10x40).	32
3.17.:	Amaranth'ın 500 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde nükleusun odalara ayrılması (üst ok) ve interfazda mikronükleus (alt ok) interfazda mikronükleus (alt ok) (10x40).	33

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>		<u>Sayfa</u>
3.1.:	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltilerinin çimlenme üzerine etkisi.	18
3.2.:	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinin kök gelişimi üzerine etkisi.	19
3.3.:	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinin mitotik indeks üzerine etkisi.	22
3.4.:	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinde çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları.	23

1. GİRİŞ

Azalan tarım alanlarına oranla hızla artan dünya nüfusu, canlıların temel gereksinimi olan beslenme ihtiyacına yönelik çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir. Gıdaların uzun süre bozulmadan saklanabilmesi, üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması gibi hususlar gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Gıda katkı maddeleri; gıda hammaddesi olarak kullanılmayan fakat gıdanın lezzetini arttırmak veya istenen rengi vermek, gıdada meydana gelebilecek istenmeyen değişiklikleri engellemek ya da raf ömrünü uzatmak amacıyla işleme, paketlenme, taşıma ve muhafaza aşamalarında gıdalara katılan doğal ya da yapay maddelerdir.

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarına göre dört gruba ayrılır;

- Aromayı ve rengi geliştiriciler

- Aroma Maddeleri

Aroma arttırıcılar, gıdadaki mevcut tadı ve kokuyu korumak veya tat ve kokuyu daha cazip hale getirmek ya da istenmeyen tat veya kokunun önüne geçmek amacıyla kullanılır.

- Renklendiriciler

Gıdanın rengini düzenlemek, tüketici beğenisini kazanmak ya da renksiz besine renk vermek amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

- Koruyucular

- Antimikrobiyaller

Gıdada bulunan mikroorganizmaları kontrol altında tutarak gıda güvenliğini sağlamak, gıdalarının bozulmasının önüne geçmek amacıyla kullanılan maddelerdir. Nitrit ve nitrat bileşikler, sorbik asit, propiyonik asit, benzoik asit gıdalarda koruyucu olarak kullanılan antimikrobiyal katkı maddelerine örnektir.

– Antioksidanlar

Gıdalarda oksidatif bozulmayı, renk, tat ve kokuda meydana gelen istenmeyen değişiklikleri geciktiren veya önleyen, buna bağlı olarak da gıdaların raf ömrünü uzatan maddelerdir.

- Gıdanın dokusunu, hazırlanma ve pişme özelliğini iyileştirenler
 - pH ayarlayıcılar (asetik asit, propionik asit, kalsiyum karbonat)
 - Topaklanmayı önleyenler (magnezyum oksit, magnezyum karbonat, silikon dioksit)
 - Emülsiyon yapıcılar (lesitin, mono ve digliseritler)
 - Stabilizörler, kıvam arttırıcılar (kalsiyum asetat, kalsiyum karbonat)
- Besin değerini koruyucu ve geliştiriciler
 - Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini eklemek amacıyla gıdaya katılanlar
 - Gıdanın işlenmesi sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koymak amacıyla gıdaya katılanlar

Gıda katkı maddelerinin bir grubu olan rengi geliştiriciler, gıdanın işlenmesi sırasında kaybedilen doğal rengini gıdaya geri kazandırmak ve ayrıca estetik olarak dikkat çekici ürünler oluşturmak için gıdalara eklenen maddelerdir.

İşleme sırasında gıda maddelerinde gıdanın doğal renginde renk kaybı meydana gelmektedir. Tüketiciler, gıdaların alışıktı oldukları belirli renkte olmasını beklemektedirler. Bu nedenle, gıdaların albenisini arttırmak için renklendirici katkı maddeleri kullanımı, gıda endüstrisi açısından vazgeçilmez hale gelmiştir.

Renklendirici gıda katkı maddelerinin kullanımı eski Mısır dönemine (MÖ 1500) dayanmaktadır. O zamandan beri zerdeçal, maydanoz, ıspanak, meyveler, çiçek yaprağı özleri gibi doğal kaynaklı çok sayıda renklendirici, gıdaların görünümünü iyileştirmek için kullanılmıştır. Değişen ve gelişen teknolojiyle beraber gıda renklendiricisi olarak doğal üretilen boyaların yanında kimyasal olarak da renklendirici boyalar üretilmeye başlanmıştır. Yapay katkı boyaları, doğal kaynaklı olanlara göre üretim kolaylığı, düşük maliyet ve daha iyi renklendirme özellikleri,

mikrobiyal kontaminasyona uğrama riskinin az olması, ısı, ışık, sıcaklık, pH ve oksijene karşı yüksek kararlılık gösterme gibi çeşitli avantajlara sahip olduğundan yaygın olarak kullanılır [1]. Ancak insan ve hayvanlar üzerinde karsinojenik, alerjik etki gösterebilmesi, hiperaktiviteye ve öğrenme bozukluklarına yol açabilmesi gibi zararlarından dolayı bu katkı maddelerinin gıdalarda belirli oranlarda kullanımına izin verilmektedir [2].

Yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin kullanım miktarlarının düzenlenmesi tüketici sağlığı açısından önemlidir. Gıda katkı maddelerinin güvenilirliği, WHO (World Health Organisation-Dünya Sağlık Örgütü) ve FAO (Food and Agriculture Organization-Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından ortaklaşa yürütülen uluslararası bir uzman komitesi olan JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi) ve EFSA (European Food Safety Authority-Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından sürekli olarak takip edilir ve değerlendirilir. Bu değerlendirmeler sonucunda FAO/WHO Uzmanlar Komitesi tarafından, renklendirici gıda boya ile ilgili yapılan çalışmaları göz önünde bulundurularak, gıda boya için insanlarda güvenli doz olarak kabul edilen ADI (Acceptable Daily Intakes-Önerilen Günlük Tüketim Miktarı) değeri belirlenmektedir. Bazı gıda boya için ADI değeri; Eritrosin için 0-0.1 mg/kg, Güneş Sarısı için 0-2.5 mg/kg, Amaranth için 0-0.15 mg/kg, Tartrazin için 0-7.5 mg/kg, Azorubin için 0-4 mg/kg olarak belirtilmiştir [3].

Her gıda katkı maddesi için Avrupa Birliği tarafından belirlenen özel tanıma kodu vardır ve bu tanıma kodu E kodudur. E harfi "Europe (Avrupa)"nın kısaltmasıdır.

E kodlama sistemine göre gıda boyalarının uluslararası numaralandırılması E100–E180 aralığında belirlenmiştir. Örneğin E123 Amaranth, E102 Tartrazin gibi renklendirici gıda katkı maddeleri E kodu ve üç basamaklı sayılar kullanılarak belirtilir. Yanındaki sayılar o katkının işlevsel sınıfıyla ilgilidir [3].

1.1. Amaranth Gıda Boyası

Amaranth, dünyanın birçok bölgesinde yaprakları sebze, kendisi süs bitkisi ve tohumları da tahıl sayılan, çabuk üreyen ve bakım gerektirmeyen, dayanıklı, tropikal,

renkleri koyu mordan kırmızıya ve altın rengine kadar değişiklik gösteren bir bitkidir. Aztek, İnka ve Maya toplumlarında mısır ve fasulyeye ek olarak günlük diyetin bir parçası olup önemli bir gıda ürünü olarak tüketilmiştir. Amaranth bol liflidir ve yüksek protein içerir. şekil 1.1. 'de Amaranth bitkisinin çiçeği gösterilmiştir.



şekil 1.1.: Amaranth bitkisinin çiçeklerinin görüntüsü.

Amaranth gıda boyası; Amaranth bitkisinin rengarenk çiçeklerinden üretilen, morumsu kırmızı renkte, toz, suda çözünür boyadır.

1.1.1. Kimyasal Yapısı

- Diğer İsimleri: C.I. Food Red 9 (CI Gıda Kırmızısı 9)

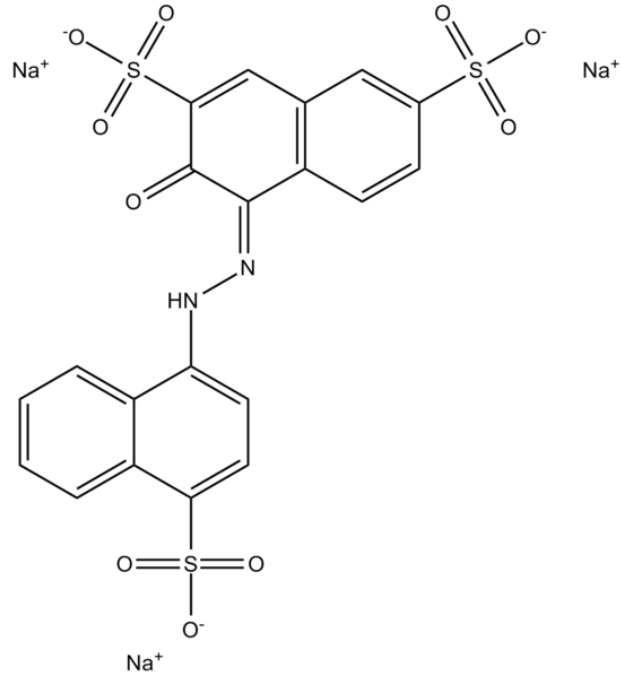
Acid Red 27 (Asit Kırmızısı 27)

- Kimyasal Adı: Trisodyum 2-hidroksi-1-(4-s lfonato-1-naftilazo) naftalin-3,6-dis lfonat
- Fiziksel ve Kimyasal  zellikleri: Amaranth anyonik bir boyadır. Morumsu kırmızı bir görünüme sahiptir. Suda   z n r, etanolde az miktarda çözünür ve bitkisel yağlarda   z nmez. Sulu   zeltisi 520 nm'de maksimum absorbsiyona sahiptir.

- Tehlike: Cilde temasta herhangi bir irritasyona neden olmaz. Göze temasta hafif bir irritasyon meydana gelebilir.
- Kimyasal Formül: $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$
- Molar Kütle: 604,473 g/mol
- Verdiği Renk:



- Yapısal Formülü:



1.1.2. Kullanım Alanları

Renklendirici katkı maddeleri, uzun zamandır insan kültürünün bir parçası olmuştur. Önceleri doğal renklendiriciler kullanılırken gelişen endüstriyle beraber sentetik gıda katkı maddeleri üretilmeye başlanmıştır. Gıda endüstrisi, bir gıda ürününün estetik kalitesini, albenisini ve tüketimini artıracak şekilde sentetik renklendiriciler kullanır. Dünyada yıllık toplam renklendirici üretiminin 800.000 ton olduğu tahmin edilmektedir.

Yapay gıda renklendiricileri, gıda görünümünü cazip kılmak için dünya çapında yaygın olarak kullanılmakta olup farklı alanlarda uygulanmaktadır. Amaranth; alkolsüz içecekler endüstrisinde, meyve aromalı pek çok içekte, şekerlemelerde renk verici olarak sıkça tercih edilen renklendirici gıda boyalarındandır.

Amaranth, pastörizasyon sıcaklıklarına karşı stabilitesinin yüksek olması nedeniyle süt ürünlerinde, yüksek sterilizasyon veya pişirme sıcaklıklarına ve asidik ortam koşullarına karşı dayanıklı olması nedeniyle konserve gıdalarda, yüksek çözünürlüğe sahip olduğu için kuru toz içecekler, tatlılar, krema tozu, çorbalar ve soslarda kullanılmaktadır [3].

Amaranth gıda endüstrisinin yanında kozmetik, tekstil ve kağıt üretimi gibi birçok endüstride de yaygın olarak kullanılmaktadır [4].

1.1.3. Canlılar Üzerine Etkisi

1.1.3.1. İnsanlar Üzerine Etkisi

1.1.3.1.1. Toksik Etkisi

Günümüzde hazır gıdalar, insanlar tarafından oldukça fazla tüketilmektedir. Ulaşımı kolay olan gıda katkı maddeli besinlerin denetimi yapılmalı ve kullanılan miktarlar belirlenen oranların üzerine çıkmamalıdır. Gıda katkı maddeleri uygun şekilde kullanıldığında, yani izin verilen katkı maddesi, izin verilen besinlerde, izin verilen miktarlarda ve yasalara uygun şekilde kullanıldığında sağlık riskleri minimize edilmiş olur. Tüketilen gıdalarda kullanılan gıda katkı maddeleri, miktarlarına dikkat edilmediği takdirde ise insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturmaktadır.

Amaranth'ın toksik etkisi, yapılan çok sayıda çalışma ile çeşitli canlı türlerinde test edilmiştir. Amaranth'ın toksisitesi uygulanan doza, uygulandığı dokuya ve uygulama şekline ve bağlı olarak değişmektedir. Amaranth'ın tüketildikten sonra insan vücudunda aspirin, benzoik asit gibi ilaçlarla etkileşmesi durumunda duyarlı insanlarda alerjik ve astımatik reaksiyonlara sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [5].

İşlenmiş gıdaların tüketiminin artışına paralel olarak, FDA tarafından kullanımına izin verilen renklendiricilerin tüketim miktarları 1950 yılında 12 mg/kişi

başı/gün iken 2012 yılında 68 mg/kişi başı/gün olarak yaklaşık 5 kat artış göstermiştir. Bazı tüketiciler örneğin çocuklar, yetişkinlere göre daha fazla sentetik gıda renklendiricileri ile renklendirilmiş içecek, şekerleme, dondurma ve meyveli ürünler tüketmektedir, renklendiricilere daha fazla miktarda maruz kalmaktadır. Renklendiricilerin insan sağlığına etkileri ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda; renklendirici katkı maddeleri içeren gıdalar tüketildiğinde insanlarda deri döküntüleri, migren, kanser ve kromozom hasarı gibi rahatsızlıklar ve çocuklarda hiperaktivite gözlenmiştir [6].

Sağlıklı beslenmenin çok önemli olduğu çocukluk çağında yeterli ve doğru beslenememek, çocuğun zihinsel, fiziksel ve duygusal durumunu etkilemektedir. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite, çocukluk çağında çok sık görülen psikiyatrik bozukluklardandır. Bu rahatsızlığa genetik faktörler, çevresel değişiklikler, mental sorunlar ve beslenme neden olmaktadır. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber çevresel etmenlerden besinler ve gıda katkı maddeleri, dikkat eksikliği ve hiperaktivite ile ilişkisi bulunan ve araştırılan iki büyük etmendir [6]. Söz konusu durumla ilgili yapılan bir çalışmada, yapay renklendirici içeren gıdalarla beslenen 3 ile 8-9 yaşlarındaki çocuklardan oluşturulan iki grupta da dikkat eksikliği ve hiperaktivite görüldüğü ortaya çıkmıştır [7]. Renklendiriciler ve hiperaktivite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesine yönelik Pelsser ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışmaya göre, 4-8 yaşları arasında dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan 100 çocuğa sağlıklı diyet uygulandığında çocukların %78'i, dikkat eksikliği ve hiperaktivite belirtileri açısından diyetle olumlu cevap vermiştir. Renklendiricilerin sağlık üzerindeki etkileri hakkında yapılan çalışmalar sonucunda gıda renklendiricilerinin dikkat eksikliği ve hiperaktivitenin doğrudan sebebi olmadığı, var olan semptomları ilerlettiği gözlenmiştir [2].

1.1.3.1.2. Mutajenik Etkisi

Gıda katkı maddeleri toksik etkiye sebep olduğu gibi mutasyonlara yol açıp mutajenik etki göstererek insanlar için olası bir tehlike kaynağı da olabilir.

Amaranth'ın sahip olduğu azo fonksiyonel grubundan (-N=N-) ve aromatik halka yapısından dolayı insan sağlığına zararlı olduğu öne sürülmektedir [4]. Amaranth'ın

DNA' ya bağlanabildiği ve kromozom anomalilerine sebep olduğu da Mpountoukas ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışma ile belirtilmiştir. Bu çalışmada, insan periferik kan hücresi kültürleri üzerinde Amaranth gıda boyasının etkisini değerlendiren bir deney gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu deney sonucunda incelenen boyanın 8 mM konsantrasyonda, hücrelerde mitotik indeks azalmasına neden olduğunu, hücre bölünmesinde gecikmeler ortaya çıkardığını ve bu hücrelerde anomaliye sebep olup mikronükleus oluşturduğunu göstermişlerdir [4].

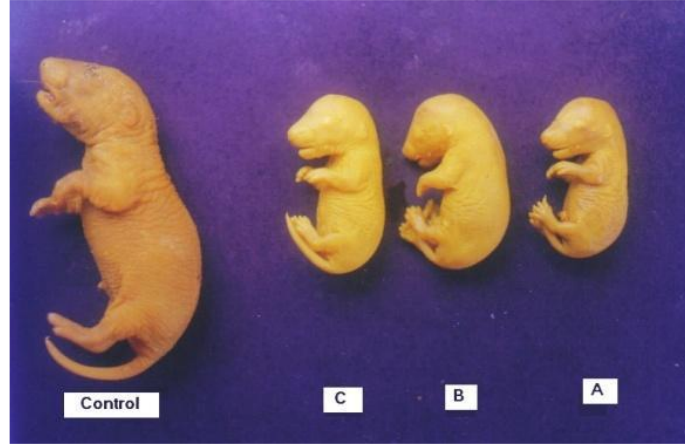
Amaranth'ın insanlar üzerindeki mutajenik etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı olup, daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

1.1.3.2. Hayvanlar Üzerine Etkisi

Gıdalarda kullanılacak olan katkı maddelerinin deney hayvanlarında test edilip doza bağlı olarak ortaya çıkarabileceği olası toksik ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi, gıda katkı maddelerinin kullanım izinlerinin verilmesinde büyük bir öneme sahiptir.

1.1.3.2.1. Toksik Etkisi

Hashem ve arkadaşları (2010), sıçanlarda Günbatımı Sarısı, Kurkumin ve Amaranth'ın toksik etkisini araştırmıştır. Bu araştırma kapsamında, kullanılan dişi sıçanların hamileliğinin 6. gününden 15. gününe kadar ADI değerinin 10 katı olacak şekilde, kilogram başına 47 mg/kg dozda, oral yoldan Amaranth uygulandığında fetüslerin %27.8'inde büyüme geriliği Şekil 1.2. ile, %8.3'ünde akciğer ve kalp hipoplazisi Şekil 1.3. ile ve %25'inde iskelet anomalilerinin ortaya çıktığını Şekil 1.4. ile göstermiştir [8].



Şekil 1.2.: Sırası ile oral yoldan 157.5 mg/kg Kurkumin (C), 315mg/kg Günbatımı Sarısı (B) ve 47 mg/kg Amaranth (A) uygulanan sıçan fetüslerinde görülen büyüme geriliği.



Şekil 1.3.: 47 mg/kg dozda Amaranth uygulanan sıçan fetüsünün kontrol ile karşılaştırıldığında kalp ve akciğer hipoplazisi.



Şekil 1.4.: Kafatası kemiklerinde ve omurlarda meydana gelen anomaliler.

Yapılan 8 haftalık bir çalışma ile sıçanlara oral yoldan uygulanan farklı dozlardaki Amaranth'ın karaciğer ve böbreği olumsuz etkileyebileceği ve biyokimyasal parametrelerde olumsuz değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir [9].

Amaranth gıda boyası, gastrointestinal sistemde emilen ve 1- amino-4-naftalin sülfürikasit ve 1-amino-2-hidroksi-3,6-naftalen disülfürik asit olarak ürünlere yıkılan bir azo boyadır. Amaranth'ın yıkımı sonucu oluşan bu ürünlere, boya ile beslenen sıçanların idrarında da rastlanır [9].

Alanin aminotranferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalın fosfataz (ALP) gibi sitoplazmik enzimler karaciğere ait bozuklukların değerlendirilmesinde kullanılır. Bu enzimler, olası karaciğer hasarında membran geçirgenliğinin değiştirilmesi sonucu dolaşım sistemine girerler. Bu enzimlerin aktivitesindeki artış karaciğer hasarını yansıtır [10]. Yapılan çalışmada, oral yoldan 47 mg/kg dozda Amaranth gıda boyası uygulaması yapılan sıçanlarda ALP, AST ve ALT enzimlerinin kontrol grubuna göre önemli oranda yükselmesiyle sıçanlarda Amaranth'a bağlı karaciğer hasarının meydana gelmiş olduğu gösterilmiştir [9].

Azo boyaların toksik etkisi, bileşiğin kendisinin doğrudan etkisinin veya azo bağının indirgenmesi sırasında üretilen serbest radikallerin ve aril amin türevlerinin oluşumunun bir sonucu olabilir [11].

Bu serbest radikaller, oksidatif strese neden olur ve bunun sonucunda karaciğer hücreleri dejenerasyona uğrar, membran akışkanlığı kaybedilir, membran bütünlüğü ve fonksiyonu bozulur, ciddi patolojik değişiklikler meydana gelir [12].

Proteinler, tüm canlı hücrelerin temel bileşenidir ve bir organizmanın metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmesi için gerekli olan enzimler, hormonlar ve birçok madde protein yapıdadır [13]. Serum proteininin maddelerin taşınması, bağışıklık savunması, kan pıhtılaşması gibi birçok işlevi vardır. Serum protein seviyeleri ve analizleri beslenme durumunu, enfeksiyonu ve çeşitli bozuklukları değerlendirmede kullanılır [14]. Sıçanlara 4.7 mg/kg dozda Amaranth uygulandığında toplam protein düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum, 4.7 mg/kg dozdaki Amaranth'ın protein sentezinin baskılanmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Serum proteininin azalması, Amaranth'ın azo bağlantısı nedeniyle bozulmuş olan protein sentezine bağlanabilir [9]. Karaciğer fonksiyonlarındaki bozukluk da serum proteinini bastırır ve böylece hayvanlarda hipoproteinemiye yani, kanda

protein düzeyinin normalin altına düşmesine neden olur. Ayrıca, bazı toksik bileşiklerin sonucu olarak amino asit deaminasyonundaki artış da hipoproteinemiye neden olur [9]. Çalışmalar, azo boyalarının DNA, RNA ve azot fiksasyonu inhibisyonu gibi birçok biyolojik reaksiyonda da yer aldığını bildirmiştir [15].

Bilirubin doğal bir antioksidan olduğu gösterilmiştir [16]. Yapılan çalışmada 4.7 mg/kg dozda Amaranth boyası uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla toplam bilirubin miktarında önemli bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir. 47 mg/kg dozda Amaranth uygulandığında ise, bilirubin miktarında artış gözlenmiştir. Bu da yüksek dozda Amaranth uygulanmasının karaciğer hasarına neden olup, bilirubin dolaşıma sızmasına neden olduğunu göstermektedir [9].

Yapılan hematolojik değerlendirmede 4.7 mg/kg dozda Amaranth uygulaması yapılan sıçanlarda hemoglobin ve alyuvar sayısında yükselme gözlenmiştir. Bu durum; elektron taşıma zincirinin gıda katkı maddeleri tarafından bozulmasının bir sonucu olarak, dokulara ulaştırılan düşük oksijen miktarına yanıt amaçlı sistemin telafi edici çabasını göstermektedir [9].

Sıçanlar üzerinde Shtenberg ve Gavrilenco (1970, 1972) tarafından iki çalışma yapılmıştır. Çalışmalardan birinde; Amaranth'ın sulu çözeltisi, 12 ay boyunca 1.5 ve 15 mg / kg dozlarında oral yoldan verilmiştir ve sıçanlar 3 kez çiftleştirilmiştir. 1.5 mg/kg Amaranth uygulanan grup için canlı doğumu olmayan başarısız gebeliklerin yüzdesi, 3. çiftleşme sonucunda en yüksek değer olarak raporlanmış ve 1. ve 2. çiftleşme durumunda ölü yavruların yüzdesi sırasıyla % 20.7 ve % 33.8 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek dozda uygulanan Amaranth, doğurganlık ve gebelik sonuçları üzerindeki olumsuz etkinin belirgin bir şekilde artmasına neden olmamıştır. İkinci çalışmada cinsel olarak olgunlaşmış 320 sıçan kullanılmıştır. Bu sıçanlara 12 ay boyunca içme suyu ile beraber 1.5 ve 15 mg/kg dozda Amaranth uygulanmıştır. Bu sıçanların sperm kalitesin bozulma ve östrus sikluslarında uzunluk saptanmıştır. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı olsa da, sistematik olarak anlamsız bulunmuştur ve doz-etki ilişkisine dair tutalı bir kanıt raporlanmamıştır. Testislerin histolojisi ve doğurganlık üzerinde uygulanan farklı dozlardaki Amaranth'ın hiçbir etkisi görülmemiştir, fakat doğumdan 1 ay sonra mortalitede istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ortaya konmuştur [17],[18].

Amaranth'ın neden olduğu toksisitenin belirlenmesine yönelik bir başka çalışmada iki cinsiyette de sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların günlük diyetlerinde 50, 250 ve 1250 mg/kg Amaranth uygulanmıştır. Amaranth uygulamasının doğurganlık, hematolojik parametreler, serum kimyası veya tümör insidansı üzerinde olumsuz etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca uygulama yapılan tüm hayvanların kürkünde renk değişimi meydana gelmiştir ve dışkıda hafif kırmızı renk ortaya çıkmıştır. Yüksek doz Amaranth uygulanan sıçanlar daha fazla yavru üretmiştir ve bu yavruların ortalama ağırlığı kontrol grubunun yavru ağırlıklarından daha düşük olmuştur. Yüksek dozda Amaranth uygulaması yapılan dişi sıçanların idrarlarında daha fazla miktarda proteine rastlanmıştır [19].

1.1.3.1.2. Mutajenik Etkisi

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile Amaranth'ın potansiyel genotoksitesinin değerlendirilmesine yönelik *Drosophila melanogaster* kullanılarak yapılan çalışmada 12.5, 25 ve 50 mg/ml konsantrasyonda uygulanan Amaranth, *Drosophila melanogaster*'da genotoksiste göstermiştir [20].

Sasaki ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmaya göre, fare mide salgı bezi dokusunda ve gastrointestinal sistemde Amaranth'ın 1000 mg/kg dozda DNA hasarına sebep olduğu gösterilmiştir [21]. Yapılan başka bir araştırmayla ise Amaranth'ın fare intestinal sisteminde mikronükleus testinde genotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiş olup Sasaki (2002) tarafından yapılan çalışmada farelerde meydana gelen DNA hasarlarının geçici olduğu, hasarların lezyonlarda sabitlenmediği ve bu durumun boyaların lokal sitotoksitesi ile kısmen açıklanabileceğini düşündürmektedir [22].

Amaranth gibi suda çözünür azo boyalar, yutulan boyanın önemli ölçüde emilmesini engelleyen yüklü sülfü gruplarına sahiptir. Bozulmamış boya kolona ulaştığında bağırsak mikroflorası tarafından kapsamlı metabolik indirgenmeye uğrayabilir ve indirgenmiş aromatik aminler hızla emilir. Aromatik aminler sırasıyla P450 ve asetiltransferaz ile oksitlenir ve asetile edilir. Aktive edilmiş aromatik aminler genotoksiste gösterir. Shimada ve arkadaşları, 2010 yılında yaptıkları çalışmalarla çeşitli konsantrasyonlarda Amaranth gıda boyasının, sıçanların ve farelerin çeşitli

doku hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Beyin, akciğer, karaciğer, böbrek, mide, kolon, idrar kesesi ve kemik iliği, fareler için 1 ve 10 mg/kg dozda uygulamadan 3 saat sonra ve sıçanlar için 10, 100 ve 1.000 mg /kg dozda uygulamadan 3, 6, 12 ve 24 saat sonra örneklenmiştir. Farelerde Amaranth'ın uygulamasından 3 saat sonra 10 mg/kg'lık dozda kolon spesifik DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir. Sıçanlarda test edilen dozlarda, 3 saat sonra incelenen 10 mg/kg dozda Amaranth uygulanan mide örneği hariç, 3 ila 24 saat arasındaki herhangi bir örnekte kolon spesifik DNA hasarı ya da diğer organlarda hasar gözlenmemiştir. Midede oluşan DNA hasarı da, doza bağlı yanıt eksikliği nedeniyle sporadik olarak kabul edilmiştir. [23].

Amaranth'ın farklı organlarda neden olduğu DNA hasarını belirlemeye yönelik yapılan bir diğer çalışmada hamile fareler ve erkek fareler kullanılmıştır. Hamile farelere oral yoldan 2000 mg/kg dozda Amaranth uygulanıp beyin, akciğer, karaciğer, böbrek, mide, kolon, idrar kesesi ve embriyonun uygulamadan 3, 6 ve 24 saat sonraki örnekleri incelenmiştir. Tek hücre jel elektroforezi kullanılarak DNA hasar tespiti yapılmıştır. Kolonda 3 saatlik örnekte ve akciğerde 6 saatlik örnekte Amaranth'ın genotokisite gösterdiği fakat diğer organlarda ve embriyoda DNA hasarına neden olmadığı gösterilmiştir. Erkek fareler için yapılan uygulamada da Amaranth'ın kolon hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir [24].

1.1.3.3. Bitkiler Üzerine Etkisi

DNA molekülü yapısındaki hasarın ve hücre bölünmesindeki değişikliklerin tespiti için, analizi kolaylaştıran düşük sayıda ($2n=2x=16$) ve büyük kromozoma sahip olması nedeni ile *Allium cepa* L. (soğan) kök ucu hücrelerinde, Amaranth'ın sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 0.4 ve 4 ml'lik dozlara 24 ve 48 saatlik maruz kalma süresi sonunda değerlendirmeler yapılmıştır. 5000 hücre analiz edilip mitotik indeks hesaplanmıştır ve ki-kare testi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Elde edilen verilere göre; 24 saatlik ve 48 saatlik maruz kalma süresinde, her iki dozda da uygulanan Amaranth gıda boyası, kontrol grubuna kıyasla bölünen hücre sayısında ve mitotik indekste azalmaya neden olmuştur ve hücrelerde mikronükleus gözlenmiştir. Sonuçlar, değerlendirilen dozlar ve maruz kalma süreleri

altında kullanılan Amaranth'ın, *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri için sitotoksik olduğunu göstermiştir [25].

Model organizma *Vicia faba* (bakla)'da Amaranth gıda boyasının genotoksik etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, *Vicia faba* kök hücrelerine Amaranth'ın 100 mg/L dozda uygulanmasının mikronükleus oranını arttırdığı gözlenmiştir [26].

Günümüze kadar yapılan; Amaranth'ın diğer bitkiler ve çalışmamızda kullanılacak olan *Vicia faba* üzerine mutajenik ve sitotoksik etkisini belirlemeye yönelik çalışmaları yetersiz sayıdadır.

1.2. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Amaranth, gıda ürününün rengini canlandırmak, ürünü daha seçilebilir hale getirmek amacıyla gıda endüstrisinde kullanılan bir gıda boyasıdır. Bu tezin amacı; insan ve hayvanlar üzerinde karsinojenik, alerjik etkiler yapabilen ve çocuklarda hiperaktiviteye sebep olabilen Amaranth'ın gıda boyası olarak kullanımının mutajenik etki açısından güvenilirliğinin, bitki model organizması olan *Vicia faba* kullanılarak test edilmesidir. Ayrıca, Amaranth üzerine daha önce çeşitli canlı türlerinde yapılmış olan genotoksisite çalışmaları çelişkili sonuçlar arz etmekte olup yetersiz sayıdadır. Bu sebeple tez çalışmamızın, konu üzerindeki bilgi açığına *Vicia faba* bitki model organizması özelinde katkıda bulunması hedeflenmektedir.

Amaranth'ın genotoksik etkisi çeşitli türlerde incelenmiştir ve yapılan deneylerde bazı türler üzerinde çelişkili ve yetersiz data mevcuttur. Çalışmamız; konu üzerindeki literatüre bitki test sistemi yaklaşımı ile data katkısında bulunmayı hedeflemektedir.

Bu tez çalışması vasıtasıyla *Vicia faba* bitkisi kullanılarak Amaranth'ın genotoksik etkisinin varlığı ve niteliği kontrol edilmiş olacaktır.

Amaranth'ın bitkilerdeki genotoksik etkisi üzerine yapılan önceki çalışmalar, *Vicia faba*' da sadece mikronükleus testi ile sınırlı kalmıştır. Bu tez çalışmasında ise olası mutajenik etki ve mitotik indeks, mitoz bölünmenin tüm evrelerinde araştırılarak nitelendirilmiştir.

2. MATERİYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Bakla (*Vicia faba*)

Bu çalışmada; Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen bakla (*Vicia faba*) tohumları in vitro koşullarda çimlendirildi ve Amaranth'ın mitotik etkilerini test etmek için kullanıldı.

Bakla; baklagiller familyasına adını veren, B1, B2, B6 ve K vitaminlerini bulundurmakla beraber magnezyum, kalsiyum, demir ve potasyum açısından da oldukça zengin olup insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan bitkidir. Ege, Marmara ve Akdeniz Bölgesi'nde yetişen bakla; mutfağımızda taze, iç veya kuru olarak tüketilir. *Fabaceae* ailesine aittir ve kromozom sayısı $2n=2x=12$ 'dir. Kazık köklüdür, otsu gövdeye ve bileşik yapraklara sahiptir ve yeşil gübre uygulamalarında kullanılır. Ilıman iklim bitkisidir ve yetiştirilme döneminde 18 – 27 °C sıcaklığa ihtiyaç duyar. Çimlenme dönemi için uygun sıcaklık ise 25 °C' tır.

Yetiştiriciliğinin kolay, masraflarının az, sıcaklığa karşı toleranslı ve kromozom sayısının az olması gibi nedenlerle, genotoksisite çalışmalarında bakla (*Vicia faba*) bitkisi sıklıkla tercih edilir.

2.1.2. Amaranth Gıda Boyası

Araştırmada kullanılan Amaranth, aktar olan Tarihi Heybeli Baharat'tan temin edildi. Amaranth'ın; 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyonlarında hazırlanan sulu çözeltileri kullanıldı. Kontrol grubu için saf su kullanıldı.

2.2. Metod

2.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi

30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth sulu çözeltisi ve kontrol olarak saf su kullanılarak çimlendirilmek üzere, kontrol grubu ve her bir konsantrasyon grubu için rastgele seçilen 30 adet bakla tohumu, kurutma kağıtlarının üzerine konarak Petri kaplarına yerleştirildi. Oda sıcaklığında, Petri kaplarının ağızları kapatılarak 24, 48 ve 72 saatlik süreler için çimlenmeye bırakıldı.

2.2.2. Çimlenen Tohumlarda Kök Uzunluklarının Ölçülmesi

Farklı konsantrasyonlardaki Amaranth sulu çözeltisinin, bakla bitkisi kök uzunluğuna etkisini belirlemek amacı ile çimlenen tohumların köklerinin uzunlukları 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda ayrı ayrı ölçülüp aritmetik ortalamaları alındı ve fotoğraf çekimleri yapıldı.

2.2.3. Mitoz Preparatlarının Hazırlanması

Mitotik indeks ve anomalilerin gözlemi amacı ile mitotik preparatların hazırlanması için Feulgen ezme preparat metodu kullanıldı.

- Çimlenmiş tohumların kök uçlarının apeks kısmı 1-1.5 cm uzunluğunda kesildi.
- Ön fiksasyon için kök uçları α -monobromonaftalen'in sudaki doymuş çözeltisinde, +4 °C 'ta 16-17 saat bekletildi.
- Buradan çıkarılan kök uçları Farmer çözeltisi (1: glasiyel asetik asit, 3: etil alkol) içeren tüplere alınıp +4 °C ' ta saklandı.
- Farmer çözeltisinden alınan kök uçları sırasıyla, %70 etil alkol ve saf su ile yıkandı.
- Yıkanan kök uçları N HCl içeren bir tüpe alınarak 60 °C sıcak su banyosunda 12 dakika hidroliz edildi.

- Hidroliz sonrası kök uçları, Feulgen boyası içeren tüplere alınarak 1-2 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda kök uçları kırmızı renk alana kadar boyanmaya bırakıldı.
- Boyanan kök uçlarından 1-2 mm uzunluğunda parça kesilerek lam üzerine alındı.
- Alınan doku üzerine 1 damla LPO (Lactopropioaseto-orcein) boyası damlatılarak pirinç çubuk ile dik vuruşlar yapılarak ezildi.
- Yayılan hücreler üzerine lamel kapatıldı. Preparat iki kurutma kağıdı üzerine alınarak düz bir zeminde, baş parmakla bastırıldı.
- Preparat iki kurutma kağıdı arasından çıkarılmadan, hücrelerin tek düzlem üzerinde dağılmasını sağlamak amacı ile arkası düz bir kurşun kalemle, preparatın üzerine dik vuruşlar yapıldı.
- Leica araştırma mikroskobu ile 40 x büyütme oranında gözlem yapıldı ve hücrelerin fotoğrafları çekildi.

2.2.4. Mitotik İndeks

Mitotik indeks, bir hücre popülasyonunda mitoz bölünme yapan hücrelerin tüm hücrelere oranıdır. Bu çalışmada, mitotik indeks hesaplama amacı ile her bir konsantrasyon grubu ve kontrol grubu için hazırlanan preparatlardan rastgele 3 tanesi seçildi. Seçilen 3 preparattan toplam 1500 hücre sayıldı. Bu sayılan hücrelerden mitoz geçirmekte olanlarının tüm hücrelere oranı % olarak hesaplandı.

2.2.5. Mitotik Anormallik Gözlemleri

Sayılan hücrelerden bölünme aşamasındaki hücrelerde anormallik oranları yüzde olarak hesaplandı. Anormalliklerin tanımı yapılarak fotoğraflandı.

2.2.6. İstatistiksel Verilerin Hesaplanması

Saf su ve farklı konsantrasyonlardaki Amanranth sulu çözeltisiyle çimlendirilen tohumların çimlenme oranları hesaplandı, tohumlardan uzayan kök uçlarının ortalama uzunluklarının istatistiksel analizi *student t* testi kullanılarak yapıldı, kök uçları ile hazırlanan preparatlarda sayılan hücrelerden bölünme aşamasında olan hücrelerin sayısı belirlendi ve mitotik indeks değeri hesaplandı, anlam dereceleri belirlendi. Hücrelerdeki anormallik oranları hesaplandı, *student t* testi ile istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada; Amaranth'ın çimlenme, kök gelişimi, mitotik indeks üzerine etkisi ve mitotik anomaliler kapsamında elde edilen bulgular her bir konsantrasyon grubu için değerlendirildi.

3.1. Amaranth'ın Sulu Çözeltilisinin Farklı Konsantrasyonlarının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Kontrol grubu (saf su) ve Amaranth çözeltisi örneklerinde çimlenen tohumlarda herhangi bir morfolojik değişim gözlenmedi. Çimlendirilen tüm gruplarda çimlenme süresi (24,48 ve 72 saat) arttıkça, çimlenme oranında da doğru orantılı bir artış tespit edildi. Amaranth konsantrasyonunun; 30, 50, 70, 100, 250, 500 mg/L olduğu grupların 24, 48 ve 72 saat sonunda, çimlenme üzerine etkileri kontrolle kıyaslandığında; istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.10$). Farklı Amaranth konsantrasyonlarının, bakla tohumlarının çimlenmesine etkileri Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1.: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltilerinin çimlenme üzerine etkisi.

Uygulanan Amaranth Sulu Çözeltilisinin Konsantrasyonları	Çimlenmeye Bırakılan Tohum Sayısı	Çimlenme Oranı (%)		
		24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol(Saf su)	30	16.6	50	86.6
30 mg/L	30	20	43.3	80
50 mg/L	30	16.6	43.3	83.3
70 mg/L	30	23.3	60	76.6
100 mg/L	30	20	56.6	90
250 mg/L	30	13.3	56.6	90
500 mg/L	30	20	56.6	86.6

Saf suda çimlendirilen bakla tohumlarının çimlenme oranı 24 saat sonunda %16.6 iken Amaranth'ın 30 mg/L, 100 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyonlarında %20, 70 mg/L konsantrasyonda ise %23.3 olarak hesaplandı. Çimlenme oranındaki bu artışlar, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.10$). 250mg/L konsantrasyonda hesaplanan %13.3 oranda çimlenme, yüzde değer olarak kontrole oranla azaldı, ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.10$).

48 saat sonundaki hesaplamalarda; en yüksek çimlenme oranı, 70 mg/L konsantrasyonda %60 hesaplanarak kontrole göre % 10 oranında bir artış görüldü. Ancak bu değerin, istatistiksel açıdan anlamsız olduğu belirlendi ($p>0.10$).

Kontrol grubunda; 72 saat sonundaki çimlenme oranı %86.6 olarak hesaplandı. Çimlenmede 30, 50, 70 mg/L doz gruplarında kontrole göre azalış, 100 ve 250 mg/L doz gruplarında ise; kontrole göre bir artış gözlemlense de, bu farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı görülmedi ($p>0.10$).

3.2. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Kök Gelişimi Üzerine Etkisi

Değişik Amaranth konsantrasyonlarının etkisi altında çimlendirilen bakla tohumları 24, 48 ve 72 saat süre sonunda kök gelişimi olarak incelendiğinde; kontrole oranla tüm konsantrasyon gruplarında kök uzunluğunda azalma olduğu, Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2.: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinin kök gelişimi üzerine etkisi.

Uygulanan Amaranth Sulu Çözeltisinin Konsantrasyonları	24. Saatin Sonunda Ortalama Kök Uzunluğu (mm)	48. Saatin Sonunda Ortalama Kök Uzunluğu (mm)	72. Saatin Sonunda Ortalama Kök Uzunluğu (mm)
Kontrol(Saf su)	7±0,7	8,06±1,66	11,07±4,35
30 mg/L	6,33±1,21	7,23±1,73	9,12±3,43
50 mg/L	6,6±1,67	7,61±2,06	10,08±4,31
70 mg/L	6,14±0,89	6,94±1,92	9,52±3,48
100 mg/L	6±0,63	6,82±1,49	9,44±3,28
250 mg/L	5,75±1,47	6,64±1,72	8,62±3,34
500 mg/L	5,66±1,03	6,29±1,75	7,07±2,72

24 saatin sonunda; 70 mg/L konsantrasyonda ölçülen kök uzunluğundaki azalışta, kontrole göre sınırda anlamlılık görüldü ($0.05 \leq p < 0.10$). 100 ve 500 mg/L konsantrasyonlardaki kök uzunlukları da, istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldı ($0.01 \leq p < 0.05$). 30, 50, 250 mg/L konsantrasyonlarda ölçülen kök uzunluklarındaki azalma, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p > 0.10$). Kontrol grubuna göre; diğer konsantrasyon gruplarında ölçülen kök uzunluğundaki gelişim, Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.



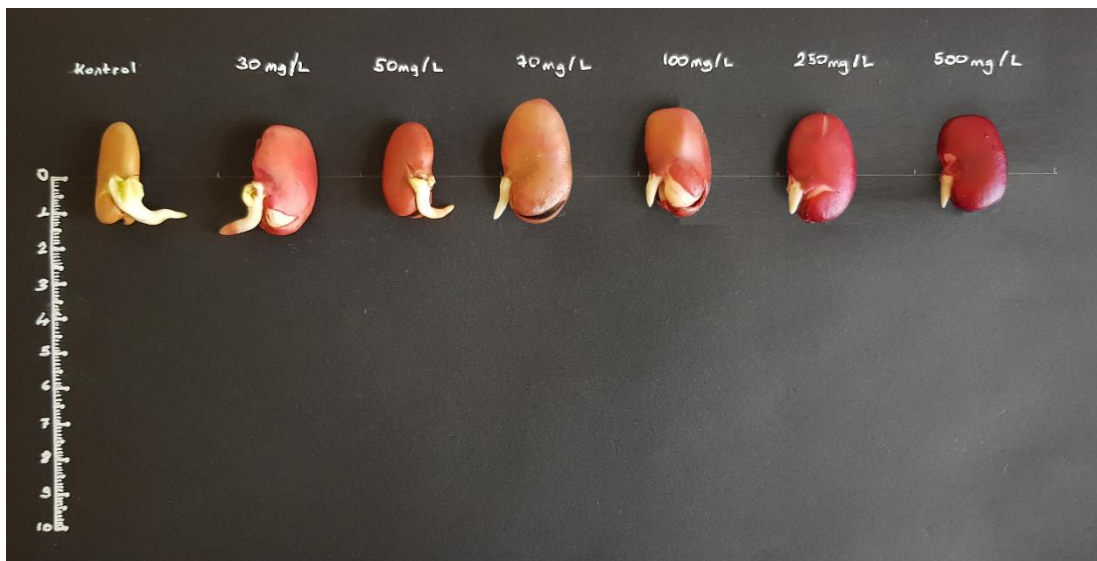
Şekil 3.1.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 24 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.

Kontrol grubuna göre; 48 saat sonunda ölçülen kök uzunluğundaki azalma (Şekil 3.2.), 30 ve 50 mg/L konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmadı ($p>0.10$). 70 mg/L konsantrasyon grubunda, istatistiksel açıdan sınırda anlamlı olarak azaldı ($0.05\leq p<0.10$). 100 ve 250 mg/L konsantrasyon gruplarındaki azalma ise; anlamlı bulundu ($0.01\leq p<0.05$). 500 mg/L konsantrasyonda gözlenen kök uzunluğundaki azalma ise; yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık olarak hesaplandı ($0.001\leq p<0.01$).



Şekil 3.2.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 48 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.

72 saat sonunda kontrol grubuna göre; diğer gruptaki kök uzunluğunda meydana gelen gelişim Şekil 3.3.'de gösterilmiştir. 30 mg/L konsantrasyonda ölçülen kök uzunluğu, istatistiksel hesaplamada sınırda anlamlı olarak azalma gösterdi ($0.05 \leq p < 0.10$). 50, 70 ve 100 mg/L konsantrasyonda ölçülen kök uzunluklarındaki azalma oranı ise; istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p > 0.10$). 250 mg/L konsantrasyondaki grupta meydana gelen kök uzunluğundaki azalış, istatistiksel anlamlılık gösterdi ($0.01 \leq p < 0.05$). 500 mg/L konsantrasyondaki kök uzunluğunun ise; ileri derecede anlamlı olacak şekilde düşüş gösterdiği tespit edildi ($p < 0.001$).



Şekil 3.3.: Kontrol grubu ve farklı Amaranth konsantrasyonlarında çimlendirilen bakla tohumlarında, 72 saat sonunda gözlenen kök gelişimi.

3.3. Amaranth'ın Sulu Çözeltilisinin Farklı Konsantrasyonlarının Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonda Amaranth çözeltilerinde çimlenen bakla tohumların kök uçlarından hazırlanan preparatlarda, mitotik indeks (%) değeri ve bölünen hücre sayısı hesaplandı. Mitotik indeks; kontrol grubunda % 6.93 olarak tespit edildi; diğer 30, 50, 70, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda ise mitotik indeksin yüzde değer olarak düşüş gösterdiği belirlendi (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3.: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinin mitotik indeks üzerine etkisi.

Uygulanan Amaranth Sulu Çözeltisinin Konsantrasyonları	Sayılan Hücre	Bölünen Hücre	Mitotik İndeks (%)
Kontrol(Saf su)	1500	104±3,21	6,93
30 mg/L	1500	13±0,57	0,86
50 mg/L	1500	25±4,16	1,66
70 mg/L	1500	24±2,64	1,60
100 mg/L	1500	41±5,82	2,73
250 mg/L	1500	19±4,16	1,26
500 mg/L	1500	3±1	0,2

Kontrole göre; 30, 50, 70, 100, 250, 500 mg/L konsantrasyon gruplarında hesaplanan mitotik indeks oranındaki azalma; ileri derecede anlamlı olacak şekilde düşüş gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$).

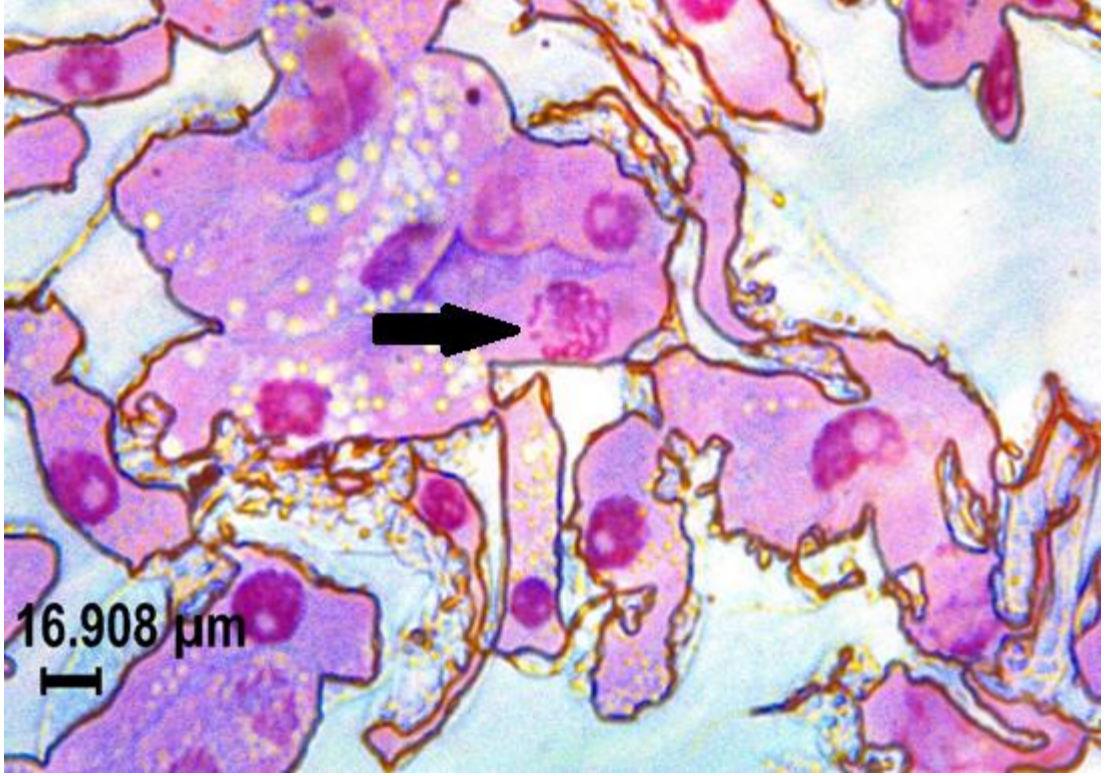
3.4. Amaranth'ın Sulu Çözeltisinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi İle Gözlenen Mitotik Anormallikler

Farklı konsantrasyonlardaki Amaranth sulu çözeltilerinde çimlendirilen bakla tohumlarının kök ucu hücrelerinde meydana gelen mitotik anormallik oranları, Tablo 3.4.'te verilmiştir. Bu anormallik oranları istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmıştır ($0.01\leq p<0.05$).

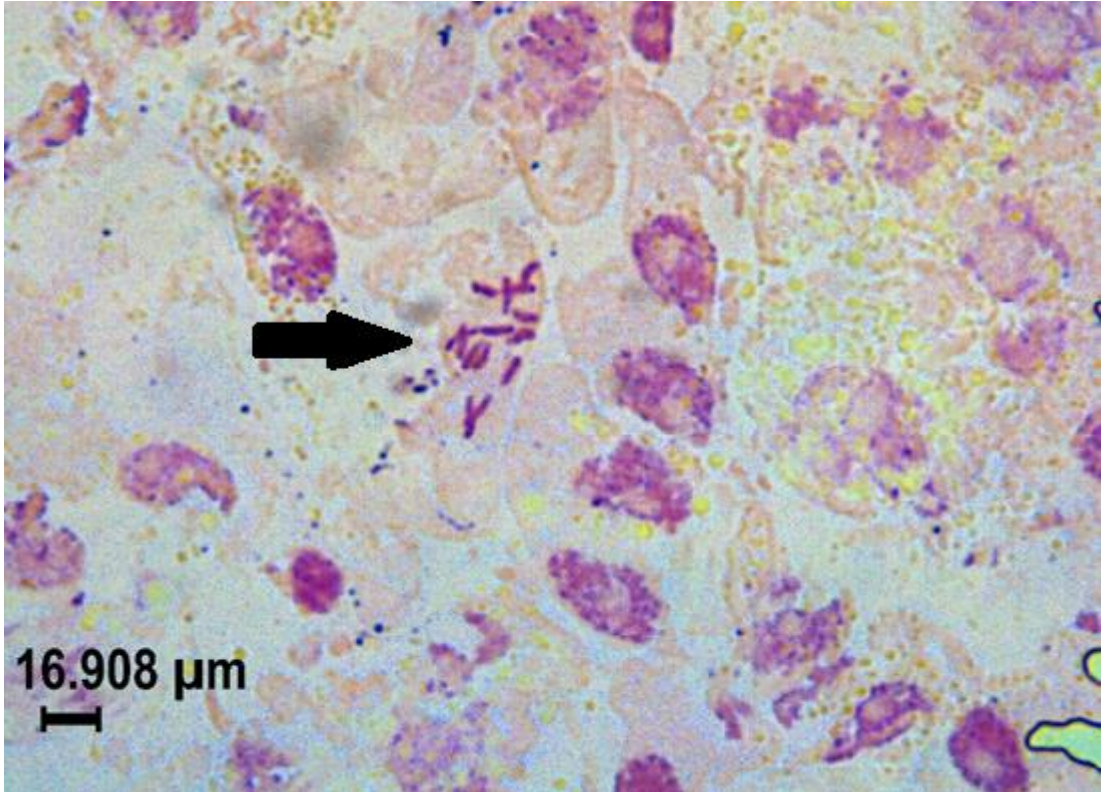
Tablo 3.4.: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Amaranth çözeltisinde çimlendirilen tohumların mitotik anormallik oranları.

	PROFAZ			METAFAZ			ANAFAZ			TELOFAZ		
Uygulanan Amaranth Sulu Çözeltisinin Konsantrasyonları	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)	N	A	AN (%)
Kontrol(Saf su)	17	-	0	86	-	0	1	-	0	-	-	-
30 mg/L	6	-	0	5	2	28,57	-	-	-	-	-	-
50 mg/L	17	-	0	2	5	71,42	1	-	0	-	-	-
70 mg/L	3	-	0	7	13	65	1	-	0	-	-	-
100 mg/L	2	-	0	3	35	92,10	-	-	-	1	-	0
250 mg/L	3	-	0	2	14	87,50	-	-	-	-	-	-
500 mg/L	1	-	0	2	-	0	-	-	-	-	-	-

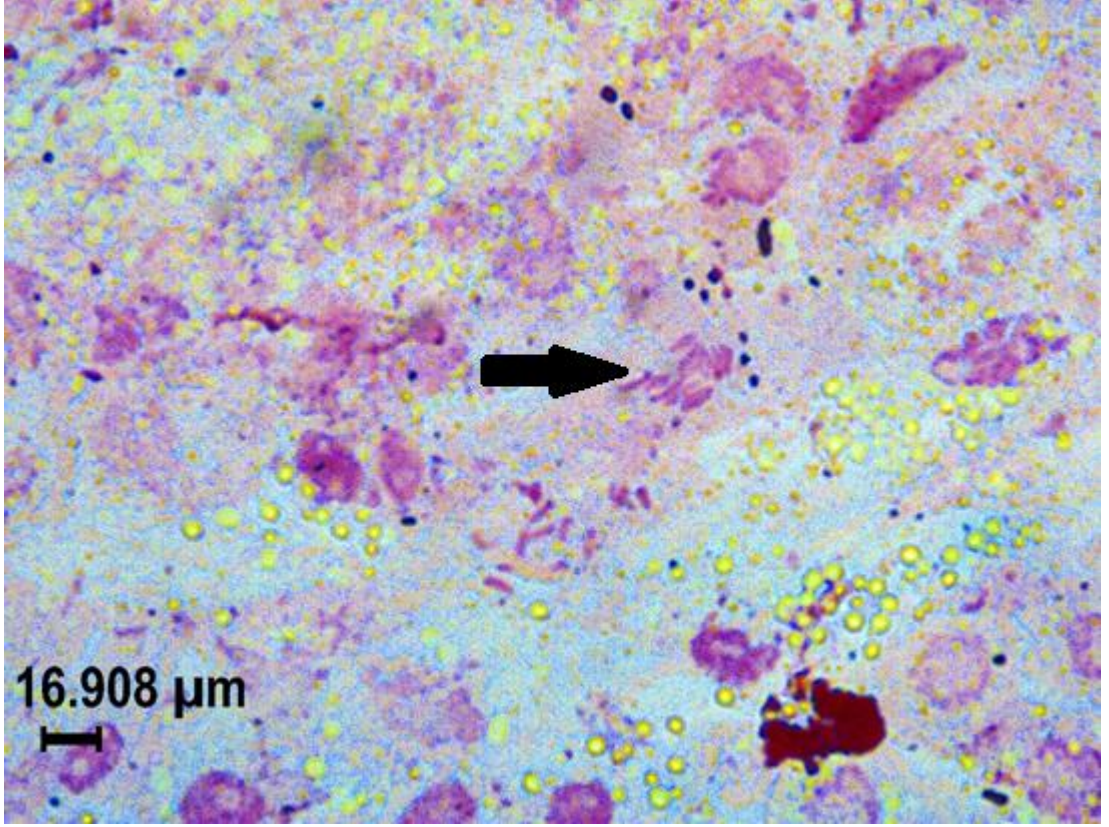
Kontrol grubunda; rastgele 3 preparat seçilerek sayılan 1500 hücreden toplam 104 tanesinde mitoz bölünme gözlemlendi. Bu hücrelerden; 17 tanesinin profaz evresinde, 86 tanesinin metafaz evresinde, 1 tanesinin ise anafaz evresinde olduğu belirlendi. Mitoz bölünmenin tüm profaz (Şekil 3.4.), metafaz (Şekil 3.5.) ve anafaz (Şekil 3.6.) evreleri normal şekilde gerçekleşti, telofaz evresinde hücre gözlenmedi.



Şekil 3.4.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal profaz safhası (10x40).

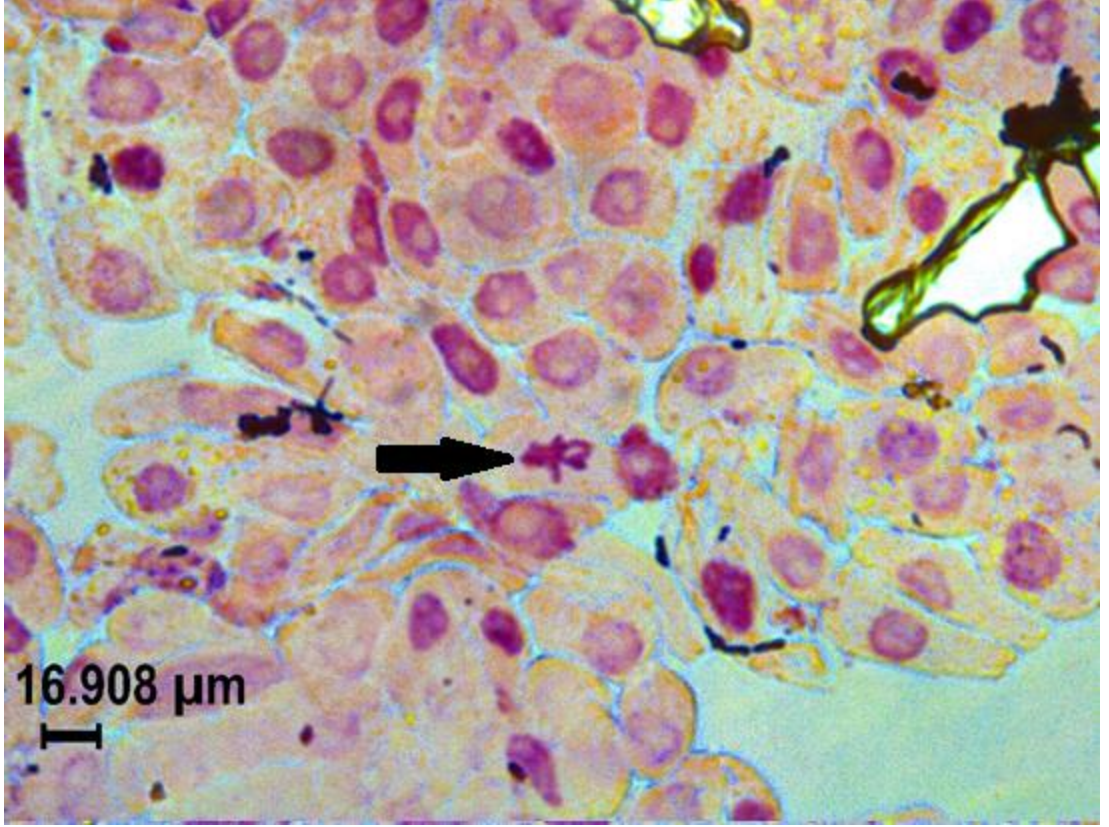


Şekil 3.5.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal metafaz safhası (10x40).

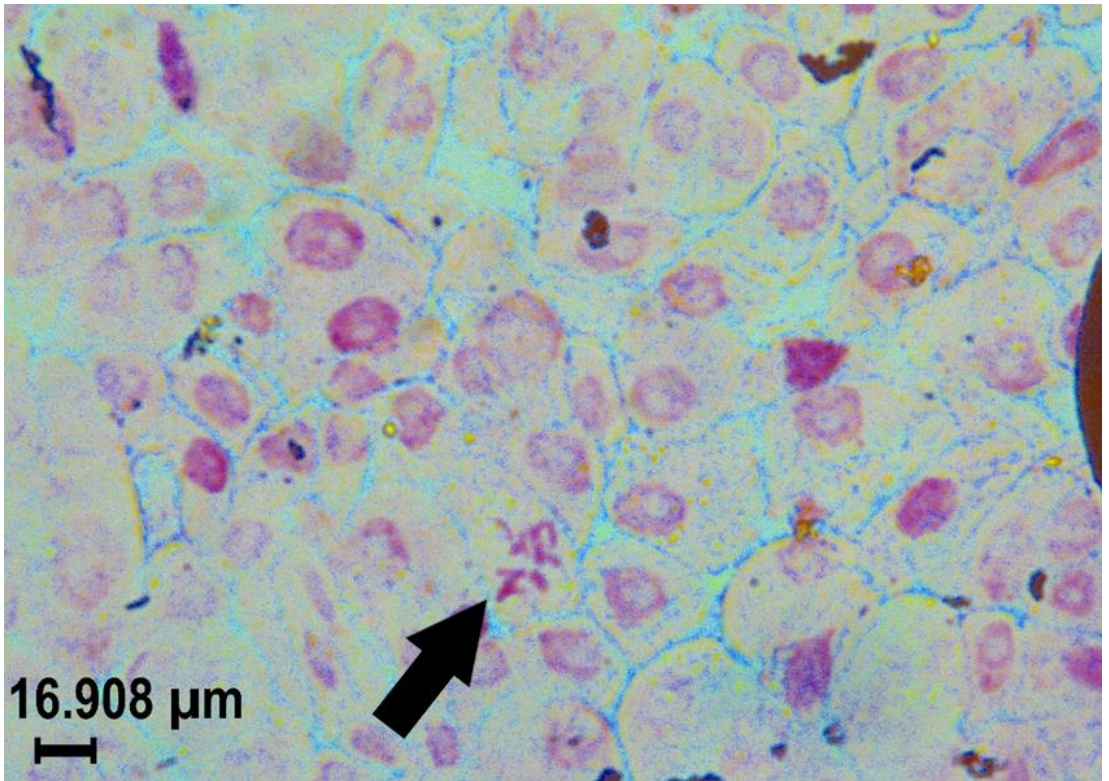


Şekil 3.6.: Kontrol grubunda gözlenen hücrelerde normal anafaz safhası (10x40).

Amaranth'ın sulu çözeltisinin 30 mg/L konsantrasyonunda mitoz geçiren 13 hücreden profaz evresinde 6, metafaz evresinde ise 7 hücre sayıldı ve toplam anormallik oranı %15.38 olarak tespit edildi. Bu anormallikler; kromozomlarda yapışma (Şekil 3.7.), metafaz plağında toplanamama (Şekil 3.8.) olarak belirlendi.

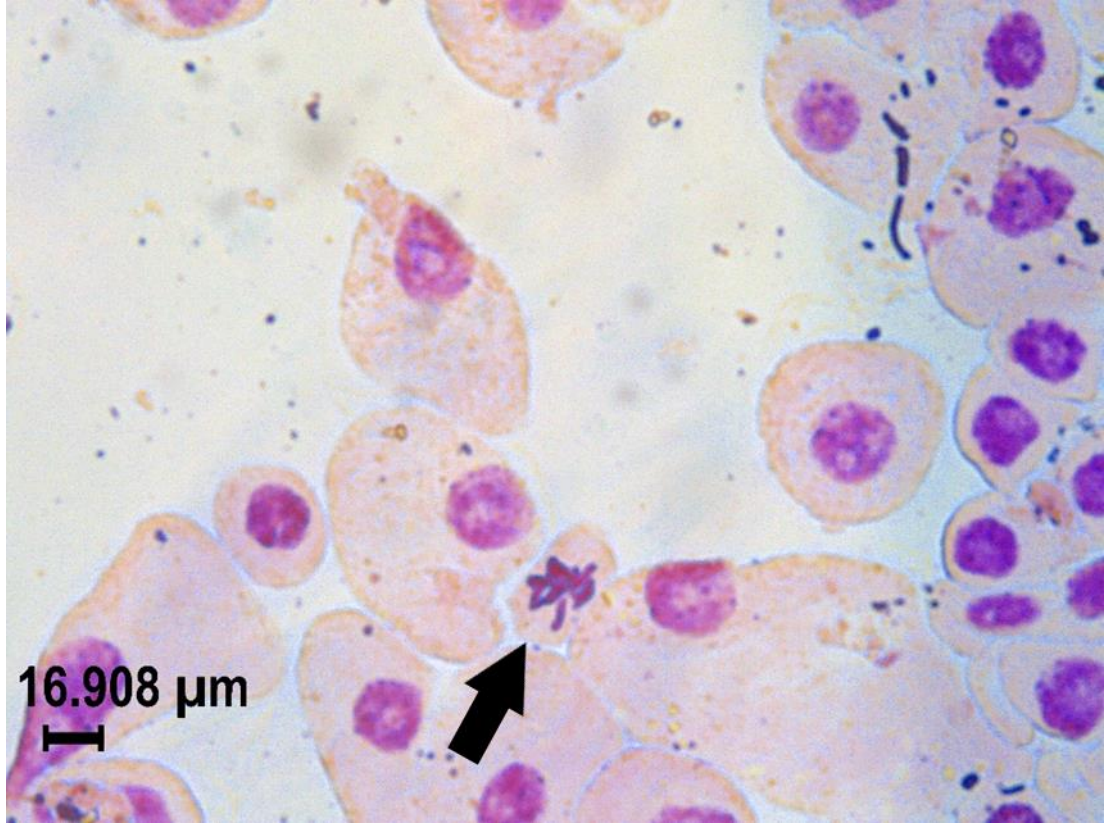


Şekil 3.7.: Amaranth'ın 30 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde kromozom yapışması (10x40).

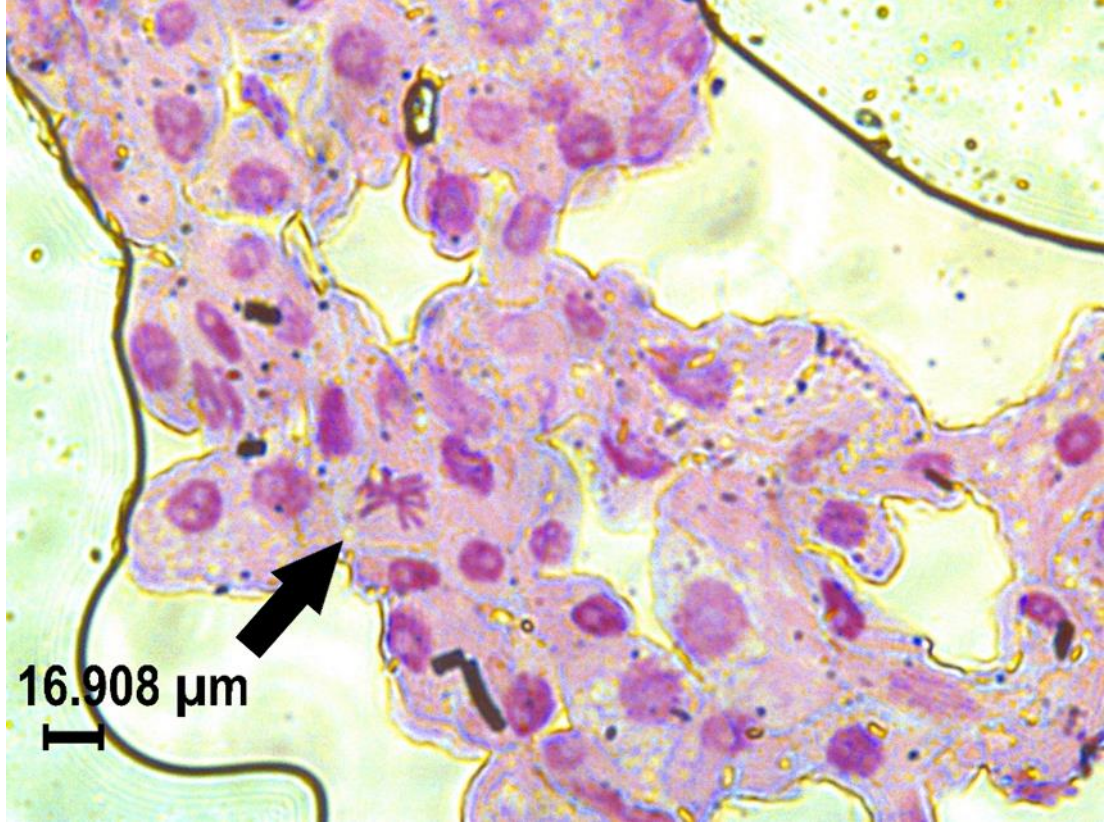


Şekil 3.8.: Amaranth'ın 30 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafaz plağında toplanamama (10x40).

Sayılan hücrelerin %1.66'sının mitoz bölünme geçirdiği 50 mg/L konsantrasyon grubunda; profaz evresinde 17, metafaz evresinde 7, anafaz evresinde 1 hücre sayıldı. Toplam olarak %20 anormal hücre tespit edildi. Hücrelerde; metafazda kromozom yapışması (Şekil 3.9.) ve çok kutuplu metafaz (Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.) görüldü.



Şekil 3.9.: Amaranth'ın 50 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafazda kromozom yapışması ve çok kutuplu metafaz (10x40).

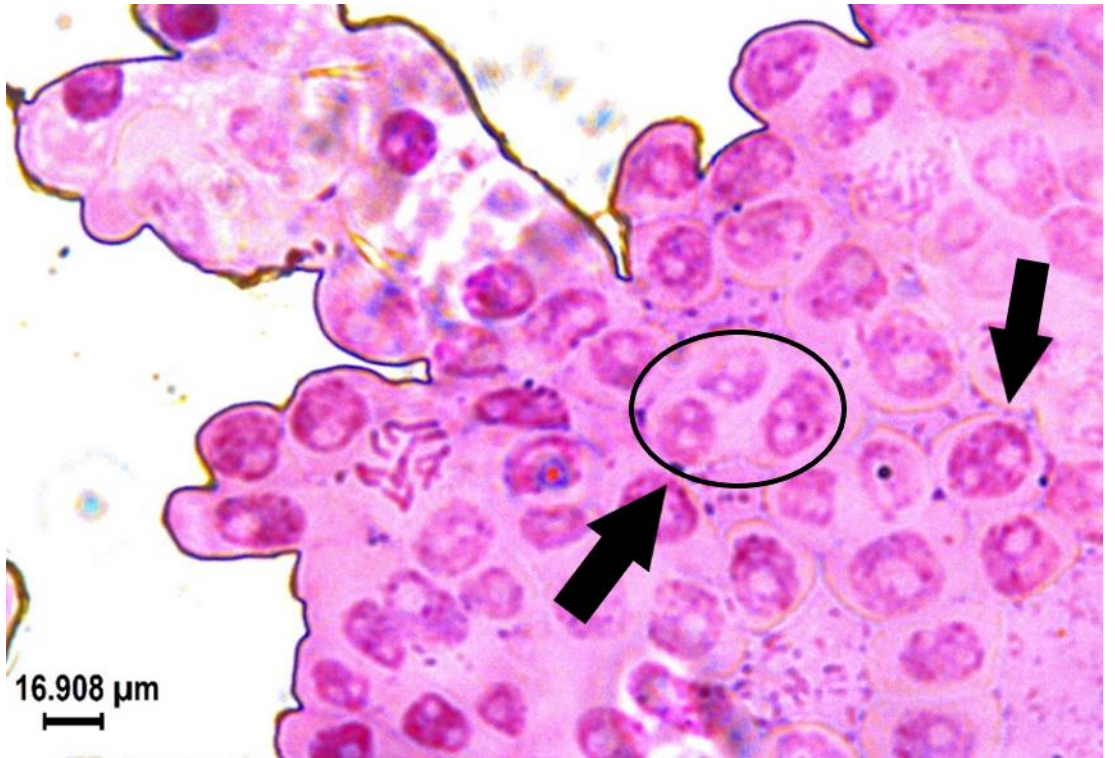


Şekil 3.10.: Amaranth'ın 50 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde çok kutuplu metafaz (10x40).

3 profaz, 20 metafaz ve 1 anafaz evresinde olmak üzere 24 hücrenin mitoz bölünme geçirdiği 70 mg/L konsantrasyon grubunda toplam %54.16 oranda mitotik anormallik tespit edildi. Bu anormallikler; çok kutuplu metafaz ve interfazda mikronükleus (Şekil 3.11.), nükleusun odalara ayrılması (Şekil 3.12.) olarak belirlendi.

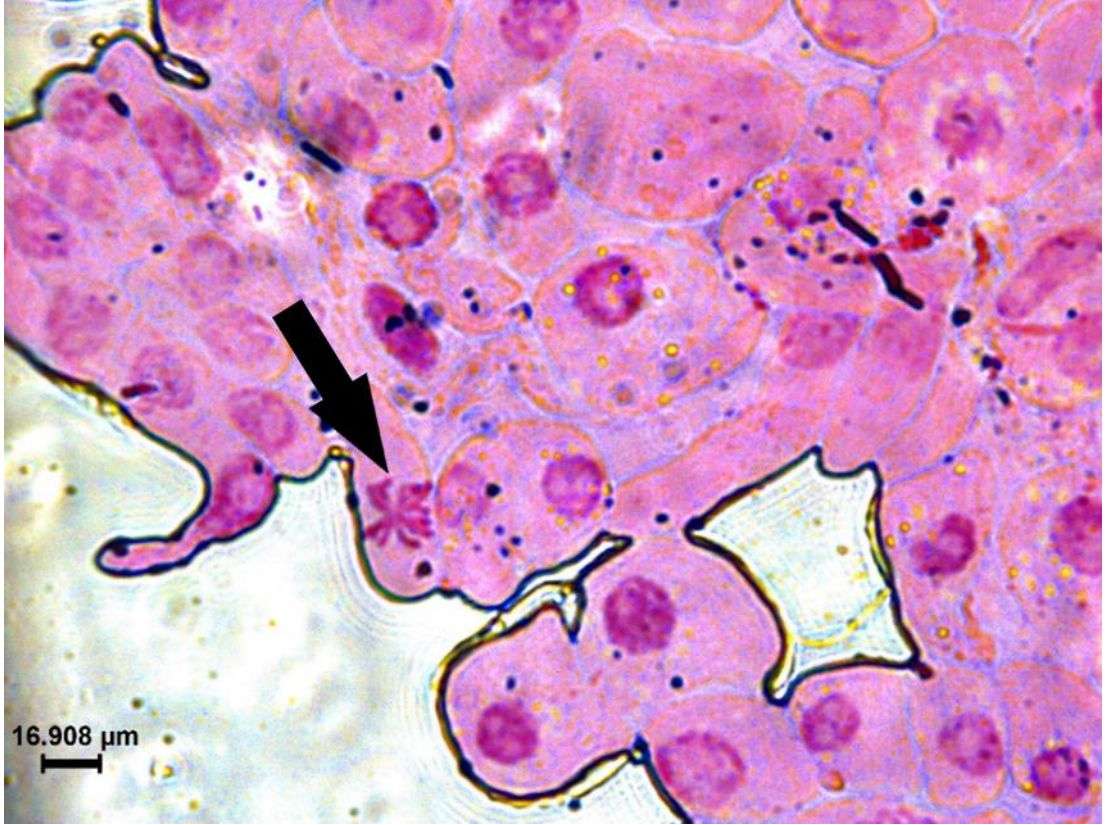


Şekil 3.11.: Amaranth'ın 70 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde interfazda mikronükleus (üst ok) ve çok kutuplu metafaz (alt ok) (10x40).

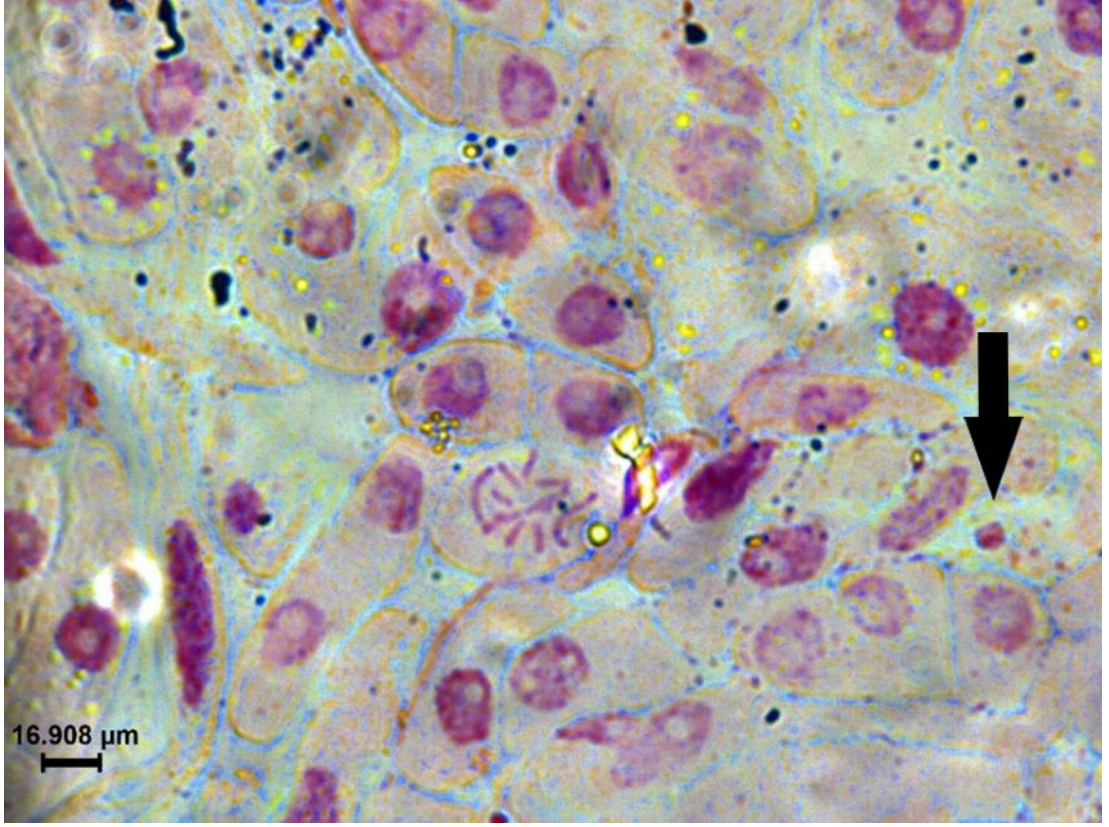


Şekil 3.12.: Amaranth'ın 70 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen nükleusun odalara ayrılması (10x40).

Toplamda % 85.36 oranda mitotik anormalliğin tespit edildiği 100 mg/L konsantrasyon grubunda, mitoz bölünme geçirdiği gözlenen 41 hücreden profaz evresinde 2, metafaz evresinde 38 ve telofaz evresinde 1 hücre sayıldı. Hücrelerde; çok kutuplu metafaz (Şekil 3.13.), interfazda mikronükleus (Şekil 3.14.) anormallikleri gözlemlendi.

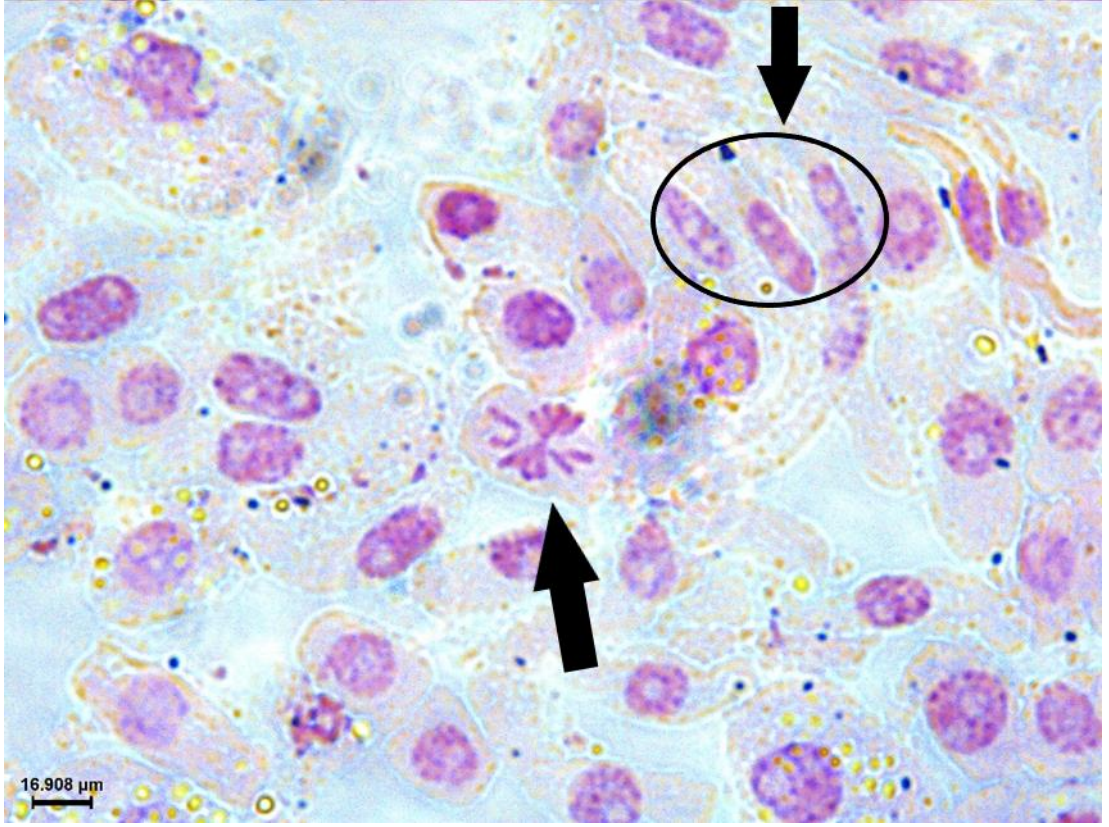


Şekil 3.13.: Amaranth'ın 100 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde çok kutuplu metafaz (10x40).

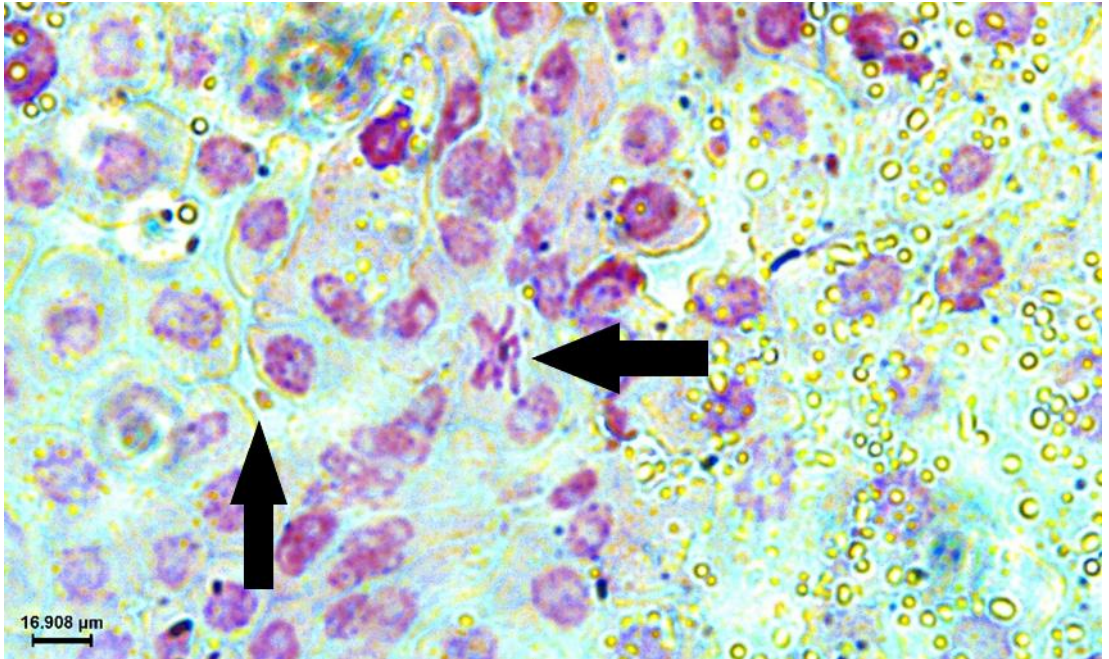


Şekil 3.14.: Amaranth'ın 100 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde interfazda mikronükleus (10x40).

Amaranth'ın 250 mg/L konsantrasyonda olduğu grupta 19 hücre mitoz bölünmeye uğradı. Bu hücrelerden 3 tanesi profaz, 16 tanesi metafaz sayıldı. Mitoz geçiren hücrelerde anormallik oranı % 73.68 olarak belirlendi. Bu anormallikler; çok kutuplu metafaz ve nükleusun odalara ayrılması (Şekil 3.15.) ve metafazda kromozom yapışması ve mikronükleus (Şekil 3.16.) olarak tespit edildi.

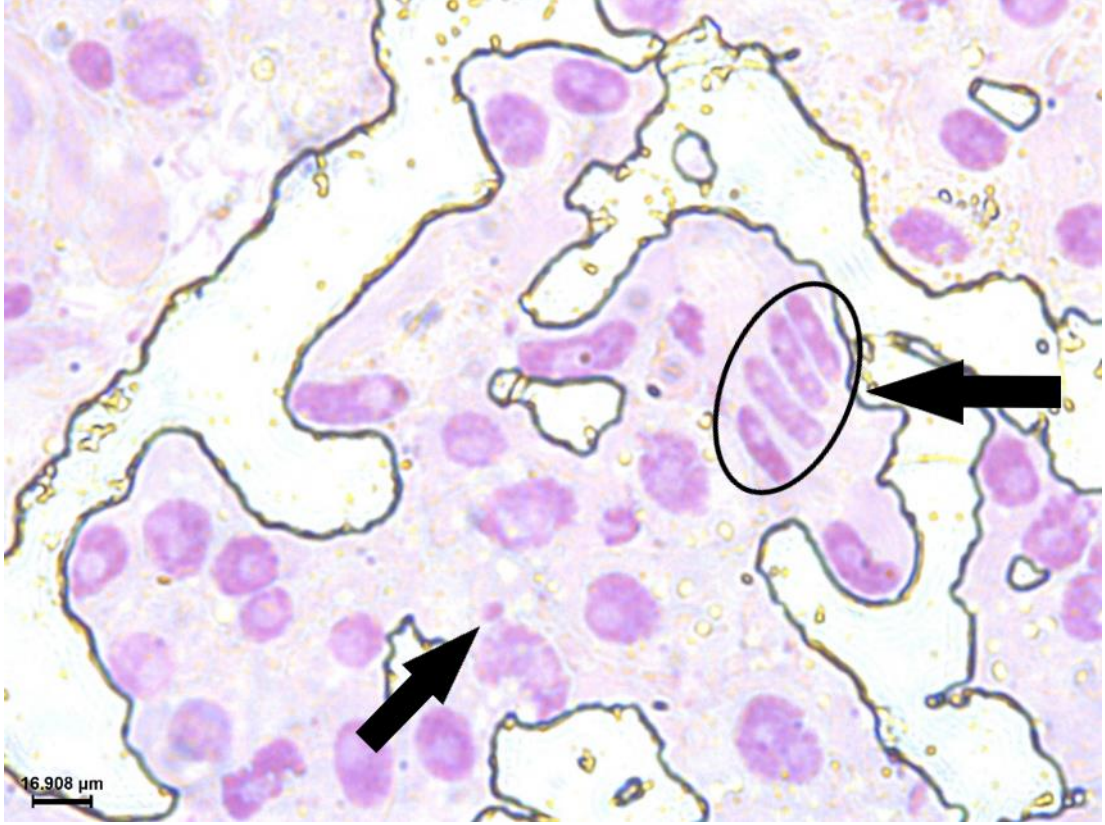


Şekil 3.15.: Amaranth'ın 250 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde nükleusun odalara ayrılması (üst ok) ve çok kutuplu metafaz (alt ok) (10x40).



Şekil 3.16.: Amaranth'ın 250 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde metafazda kromozom yapışması (üst ok) ve mikronükleus (alt ok) (10x40).

En yüksek konsantrasyon grubu olan 500 mg/L'de 3 hücre mitotik bölünme geçirdi. Bu hücrelerden 1 tanesi profaz evresi, 2 tanesi ise metafaz evresinde gözlemlendi. Profaz ve metafaz evresindeki hücrelerde herhangi bir anormallik belirlenmedi ancak nükleusun odalara ayrılması ve interfazda mikronükleus gözlemlendi (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17.: Amaranth'ın 500 mg/L konsantrasyon grubunda gözlenen hücrelerde nükleusun odalara ayrılması (üst ok) ve interfazda mikronükleus (alt ok) (10x40).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (30, 50, 70, 100, 250, 500 mg/L) hazırlanan Amaranth gıda boyasının, bitki model organizması olan baklanın (*Vicia faba*) kök ucu hücrelerine genotoksik etkisi incelenmiştir. Amaranth'ın bitkilerdeki genotoksik etkisini test etmeye yönelik yapılan daha önceki çalışmalar; *Allium cepa* L. (soğan) kök ucu hücrelerinde Gomes ve arkadaşları tarafından 2013 yılında mitotik indeks ve mikronükleus testi ile [25] , 2009 yılında Zheng ve arkadaşları tarafından ise *Vicia faba* (bakla)'da mikronükleus testleri ile sınırlı kalmıştır [26]. Bu tez çalışmasında ise Amaranth'ın mutajenik etkisi ve mitotik indeks, mitoz bölünmenin tüm safhalarında incelenmiş olup, bu bağlamda yapılan ilk çalışmadır.

Bu tez çalışmasında; Amaranth gıda boyasının kullanılmasının nedeni, geçmişten günümüze kadar başta gıda endüstrisi olmak üzere; kozmetik, tekstil gibi birçok alanda kullanılmak amacıyla Amaranth'ın hayatımıza girmiş olmasıdır. Bitki model organizması olarak baklanın kullanılmasının nedeni ise; kromozom sayısının düşük ($2n=2x=12$) ve mikroskobik gözlem için kromozomlarının boyutlarının oldukça elverişli olmasıdır [27].

Çimlenme oranı bulgularına göre; kontrol grubu ve tüm konsantrasyon gruplarındaki tohumlarda çimlenme gözlenmiştir. Çimlenme oranı her grup için kendi içinde; 24, 48 ve 72 saatlik periyot sonunda artış göstermiştir. Ancak 24 saat sonunda; 30, 70, 100 ve 500 mg/L konsantrasyon gruplarında çimlenme oranı kontrole göre artış gösterirken, 50 mg/L grubunda aynı kalmıştır ve 250 mg/L grubunda azalmıştır. 24 saat sonunda gözlemlenen artış ve azalışlar anlamlı bulunmamıştır ($p>0.10$). 48 saat sonunda; 30 ve 50 mg/L gruplarında çimlenme oranı azalmış, diğer gruplarda kontrole göre artmıştır. 48 saat sonunda gözlemlenen artış ve azalışlarda da anlamlılık görülmemiştir ($p>0.10$). 72 saat sonunda ise kontrole göre çimlenme oranında 30, 50, 70 mg/L gruplarında azalma; 100 ve 250 mg/L gruplarında artma, 500 mg/L grubunda ise aynı oranda sabitlik gözlenmiştir. 72 saat sonunda gözlemlenen artış ve azalışlarda herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.10$). Sonuç olarak çimlenme oranlarında gözlenen bu 24, 48 ve 72 saatlik değişimler, örneklerin hiçbirinde kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.10$).

Amaranth'ın bakla bitkisinin kök gelişimine etkisini belirlemek için yapılan deneylerde, milimetre cinsinden ölçülen ortalama kök uzunluğu; kontrole kıyasla bütün gruplarda azalma göstermiştir. Kök uzunluğundaki bu azalış; 250 mg/L konsantrasyon grubunda, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmuştur ($0.01 \leq p < 0.05$). 500 mg/L konsantrasyon grubunda ise; ileri derecede anlamlı olacak şekilde azalış tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Bu çalışma ile Amaranth'ın 250 ve 500 mg/L konsantrasyonda bakla bitkisi için çimlenmeye toksik etki yaptığı sonucuna varılmıştır.

Amaranth'ın mitotik indeks üzerine etkileri ile ilgili bulgularda, kontrol grubuna kıyasla tüm konsantrasyon gruplarında mitotik indeks oranında azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak; tüm gruplarda tespit edilen mitotik indeksteki azalma oranları ileri derecede anlamlılık göstermektedir ($p < 0.001$). Mitotik indeksin azalması ise sitotoksik etki olarak yorumlanmıştır.

Amaranth'ın mitotik indekste neden olduğu değişiklikler, bu tez çalışmasında gözlenen sonuçları destekler nitelikte olarak; *Allium cepa* L. (soğan) kök ucu hücrelerinde ve insan periferik kan hücresi kültürleri üzerinde de tespit edilmiştir. Soğan kök ucu hücrelerinde mitotik indeks; 0.4 ve 4 ml dozlarda uygulanan Amaranth etkisiyle, kontrol grubuna oranla azalma göstermiştir [25]. Mpountoukas ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada ise; 0.02, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM seviyelerinde uygulanan Amaranth'ın insan periferik kan hücrelerinde, artan dozla ters orantılı olarak mitotik indekste azalmaya neden olduğu gözlenmiştir, mitotik indeks oranındaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) [4].

Değişik Amaranth konsantrasyonlarında yetiştirilen bakla bitkisinin kök ucundan hazırlanan preparatlarda, mikroskopla inceleme yapıldığında bir takım anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler; kromozomlarda yapışma, metafaz plağında toplanamama, mikronükleus, çok kutuplu metafaz ve nükleusun odalara ayrılması şeklinde görülmüş ve bu anormallik oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($0.01 \leq p < 0.05$).

Genotoksisite çalışmalarında 1930'lu yıllardan itibaren *Allium cepa* (soğan) ve *Vicia faba* (bakla) kök uçları, sitogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. *Allium/Vicia* mikronükleus testi, geçmişten günümüze hala kullanılmakta olup, bu test sistemleri ile bazı kimyasal ajanların sitotoksisite analizlerinin yapıldığı birçok çalışma

mevcuttur [28, 29]. İlhan (2008), Sunset Yellow (E110) ve Brilliant Black (E151) isimli renklendirici gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* ve *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde sitotoksik etkilerini mikronükleus testi ile araştırmış olup, bu iki kimyasal maddenin doz miktarındaki artışla orantılı olarak mikronükleus miktarının arttığını tespit etmiştir [30]. Mikronükleus testi için kimyasal ajan olarak Amaranth'ın kullanıldığı *Allium cepa* L. (soğan) [25] ve *Vicia faba* (bakla) [26] kök ucu hücrelerinde ise Amaranth, sitotoksik etki göstererek mikronükleus oranını arttırmıştır. Bu sonuçlarla paralel olarak, yapılan bu tez çalışmasında da mikronükleus oluşumuna bütün Amaranth konsantrasyon gruplarında rastlanmıştır. Mikronükleus oluşumundaki artış, Amaranth'ın genetik materyalde oluşturduğu hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir [25].

Gözlenen diğer anormalliklerden olan kromozomlarda yapışma ise; maruz kalınan kimyasalın toksik etkilerini göstermekte olup genellikle geri dönüşümsüzdür ve bitkinin ölümüne neden olabilmektedir [31]. Hücrelerde görülen çok kutupluluk ise; sentriolün maruz kalınan kimyasal sebebiyle bir kereden fazla bölünmesiyle hücrede ikiden fazla kutbun oluşmasıdır.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre; tüm Amaranth konsantrasyonlarında bakla bitkisinde çimlenme gözlemlendiği ve kontrol grubuna kıyasla konsantrasyon gruplarında gözlenen çimlenme oranındaki fark istatistiksel olarak anlamsız olduğu için, Amaranth'ın çimlenmeye genotoksik bir etki göstermediği düşünülmektedir. Kök gelişimi üzerine etkilerine dair bulgularda ise; 30, 50, 70 ve 100 mg/L Amaranth konsantrasyonuna kök gelişimi toleranslı olup 250 ve 500 mg/L konsantrasyonda kök gelişimi olumsuz etkilenmiştir. Fakat Amaranth'ın; mitotik indeks ve mitotik anormallik oranları üzerindeki neden olduğu değişimler; tüm konsantrasyon gruplarında Amaranth'ın mitotik indeks ve mitotik anormallikler açısından genotoksik etkisine işaret etmektedir.

Yapılan bu tez çalışması, gıda katkı maddesi Amaranth'ın bakla bitkisindeki genotoksik etkisi üzerine yapılan önceki çalışmalardan farklı olarak, genotoksik etkinin sadece mikronükleus testi ile sınırlı kalmayıp, olası mutajenite; mitotik indeks ve mitoz bölünmenin tüm evrelerinde araştırılıp nitelendirilmiştir.

Bu çalışma; Amaranth'ın genotoksik etkisi ile ilgili yapılan araştırmalara veri katkısında bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Oplatowska-Stachowiak M., ve Elliott C. T., (2017), "Food colors: Existing and emerging food safety concerns", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 524–548.
- [2] Büyükdere Y. ve Ayaz A., (2017), "Gıdalarda kullanılan renklendiricilerin sağlık yönü: Dikkat eksikliği/ hiperaktivite bozukluğu.", *Beslenme ve Diyet*, 44(2), 169-177.
- [3] Atlı B., (2010), "Gıda Boyaları", Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi.
- [4] Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulo P., Kareli D., Poliliou S., Lambropoulou V., Mourelatos C., 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.
- [5] Nevado J. J. B., Cabanillas C. G., Salcedo A. M. C., (1995), "Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra", *Talanta*, 42(12), 2043–2051.
- [6] Ceyhun Sezgin A. ve Ayyıldız S. (2019), "Çocukların Tükettiği Atıştırmalık Gıdalarda Kullanılan Renklendiricilere İlişkin Bir Araştırma", *OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi*, 11(18), 877-913.
- [7] McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., Sonuga-Barke E., Warner J., Stevenson J. (2007), "Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial.", *Lancet*, 370(9598), 1560–1567.
- [8] Hashem M. M., Atta A. H., Mounelr M. S., Assad G. H., ve Nada S. A., (2011), "Toxicological impact of Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food coloring agents in albino rats", *Journal of Pionering Medical Sciences*, 1(2), 43-51.
- [9] Ikechukwu G. C., Egba S. I., Ibeh R. C., Helal E. G., Ejiofor E. U. ve Okafor P. N., (2017), "Assessment of Sub-chronic Effect of Two Artificial Food Additives on Selected Biochemical Parameters in Wistar Rats.", *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 12(4), 180–190.
- [10] Makni M., Chtourou Y., Fetoui H., Garoui E. M., Boudawara T., ve Zeghal N., (2011), "Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats.", *European Journal of Pharmacology*, 668(1-2), 133–139.

- [11] Chung K. T., Stevens S. E., ve Cerniglia, C. E., (1992), "The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora.", *Critical Reviews in Microbiology*, 18(3), 175–190.
- [12] Halliwell B., (1987), "Oxidants and human disease: some new concepts.", *The FASEB Journal*, 1(5), 358–364.
- [13] Amin K. A., Abdel Hameid H., Abd Elsttar A. H., (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 and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994–2999.
- [14] Alhomaïd A., ve Hassan M. M., (2016), "Histopathological and biochemical studies in male Wistar albino rats injected with diethylnitrosamine and treated with Camel's milk and Curcuma longa.", *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*, 2(2), 548–565.
- [15] Goyal R. N., Verma M. S. ve Singhal N. K. (1998), "Voltammetric Investigations of the Reduction of Direct Orange-31 a Bisazo Dye.", *Croatica Chemica Acta*, 71(3), 715–726.
- [16] Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A., Glazer, A., ve Ames B., (1987), "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." *Science*, 235(4792), 1043–1046.
- [17] Shtenberg AI ve Gavrilenko EV, (1970), "Effect of Amaranth food dye on reproductive function and progeny development in experiments with albino rats", *Vopr Pitan*, 29, 66.
- [18] Shtenberg AI ve Gavrilenko EV, (1972), "The genotoxic and embryotoxic effect of the food dye Amaranth", *Vop. Pitan.*, 31,(5), 28-33.
- [19] Clode S. A., Hooson J., Grant D. ve Butler W. H., (1987), "Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed in utero.", *Food and Chemical Toxicology*, 25(12), 937–946.
- [20] Sarikaya R., Selvi M. ve Erkoç F., (2012), "Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test.", *Chemosphere*, 88(8), 974–979.
- [21] 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." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1–2), 103–119.
- [22] Poul M., Jarry G., Elhkim M. O. ve Poul 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.

- [23] Shimada C., Kano K., Sasaki Y. F., Sato I. ve Tsudua S., (2010), "Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice.", *Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 547–554.
- [24] Tsuda S., Murakami M., Matsusaka N., Kano K., Taniguchi K. ve Sasaki Y. F., (2001), "DNA Damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice.", *Toxicological Sciences*, 61(1),92-99.
- [25] Gomes K. M. S., Oliveira M. V. G. A. de, Carvalho F. R. de S., Menezes C. C. ve 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 Science and Technology*, 33(1), 218–223.
- [26] Zheng L., Zou Z. ,Wu C., (2009), "Effect of amaranth and sunset yellow on micronucleus rate in root tip Cells of *Vicia faba*.", *Occupation and Health* ,12.
- [27] Ellwood S. R., Phan H. T. T., Jordan M., Hane J., Torres A. M., Avila C. M., Izquierdo C. S. ,Oliver R. P., (2008), "Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*.", *BMC Genomics*, 9(380), 1–11.
- [28] L. Wu., H. Yi., ve M. Yi., (2010), "Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays", *J. Hazardous Mat*, 176, 952–956.
- [29] A. Khadra, E. Pinelli, M. Z. Lacroix, A. Bousquet-Melou, H. Hamdi, G. Merlina, M. Guiresse, ve M. Hafidi, (2012), "Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoro-quinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test", *Ecotox. Environ. Safety*, 76, 187–192.
- [30] D. İlhan, (2008), "*Tradescantia pallida* H., *Allium cepa* L., *Vicia faba* L. Bitkilerinde Bazı Genotoksik Bileşiklerin Genetiksel Etkilerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 120.
- [31] Liu D., Jiang W. ve Li M., (1992)," Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*.", *Hereditas*, 117, 23-29.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegöl Beyza Yemiş; 1993 yılında Sakarya’da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Sakarya’da tamamladıktan sonra, 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitime başladı. 2017 yılında mezun oldu ve 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime Dr. Öğr. Üyesi Sema Tölai Hekimbaşı danışmanlığında başladı. 2019 yılı itibariyle halen, İstanbul Kartal Dr. Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi’nde Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Merkezi’nde Biyolog olarak çalışmaktadır.