



**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Murat ÖZÜDOĞRU

Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

Tez No: 2022-022

Afyonkarahisar

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BESİN / GIDA HİJYENİ Ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TARTRAZİN İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN
RATLARDA KARVAKROLÜN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
MURAT ÖZÜDOĞRU

Danışman
Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

Tez No: 2022-022

AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “20.SAĞ.BİL.10”

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım

Kurallarına uygun olacak şekilde hazırlamış olduğum bu tez çalışmada;

- Tez içindeki tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar uygun şekilde elde ettiğimi,
- Başkalarının eserlerinden faydalanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun şekilde atıfta bulunduğumu,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

İmza

Murat ÖZÜDOĞRU

ÖZET

TARTRAZİN İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA KARVAKROLÜN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tartrazin (E 102), sarı renkte hammaddesi kömür katranı olan sentetik bir azo boyasıdır. En ucuz sentetik boyalardan biridir ve sıklıkla pastacılık sektöründe kek ve şekerleme yapımında, alkolsüz içecekler, hazır pudıngler, hazır çorbalar, sakız, çerez, reçel, jelatin, jöle, hardal, ketçap ve pek çok başka gıda maddesinde kullanılmaktadır. Kekiğin ana bileşeni olan karvakrol antioksidan, anti-bakteriyel ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bir bileşik olup ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından insan tüketimine uygun olarak tanımlanmış, fenolik bir bileşik olarak Avrupa Gıda Konseyi tarafından da kullanımına izin verilmiştir. Günümüzde antioksidan ajan olarak karvakrolün, potansiyel kullanımları araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiş ve yapılan çalışmalarla karvakrolün antioksidan ve hücre koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Planlanmış olduğumuz bu araştırma ile ratlarda tartrazinin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı karvakrolün antioksidan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmamız doğrultusunda, tartrazin (500 mg/kg) ve karvakrol (12,5; 25; 50 mg/kg) miktarlarda 21 gün boyunca ratlara gastrik gavaj ile verildi. Bu süre sonunda hayvanlardan elde edilen kan, karaciğer, beyin, böbrek, akciğer, testis ve kalp doku örneklerinden süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve katalaz (CAT) enzimlerinin seviyeleri incelendi. Ayrıca serumda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri ölçüldü. Ratlardan alınan karaciğer ve böbrek doku örneklerinde doku hasarı ile ilişkili olan IFN- γ , TNF- α ve NFkB yangısal genlerinin moleküler analizi ve histopatolojik incelemeleri gerçekleştirildi.

Tartrazin, ratların tüm dokularında lipit peroksidasyonu uyarak SOD, CAT ve GSH düzeylerini azalttı, MDA aktivitesini yükseltti, serum ALT, ALP ve AST aktivitelerini de yükseltti. Karvakrol uygulaması ile dokulardaki SOD, CAT ve GSH düzeyleri kontrole yaklaşırken, MDA aktivitesi ise azaldı. Diğer taraftan karvakrol,

serum AST, ALT ve ALP aktivitelerini kontrol grubuna yaklaştırdı. Elde edilen bulgular, tartrazin uygulamasının plazma ve hücrelerde oksidatif strese neden olduğunu ve doğal bir antioksidan madde olan karvakrolün oral tartrazin toksisitesi üzerinde koruma etkisinin olduğunu ve tartrazin'in sebep olduğu oksidatif strese baēlı olumsuz etkileri düzelttiēini göstermektedir.

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel deēerlendirmesi yapılarak, gruplar arası farklılıkların önemi ile parametreler arası ilişkiler saptanmış ve karvakrolün, tartrazin ile oksidatif hasara karşı olası koruyucu etkinliēi belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre karvakrolün oksidatif strese baēlı doku ve organ hasarlarının önlenmesinde olumlu etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tartrazin, Karvakrol, Rat, Oksidatif Stres, Lipid Peroksidasyon

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EFFECT OF CARVACROL AGAINST TARTRAZINE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RATS

Tartrazine (E 102) is a yellow synthetic azo dye whose raw material is coal tar. It is one of the cheapest synthetic dyes and is often used in the pastry industry for making cakes and confectionery, soft drinks, instant puddings, instant soups, chewing gum, snacks, jams, gelatin, jelly, mustard, ketchup and many other foodstuffs. Carvacrol, the main component of thyme, is a compound with antioxidant, anti-bacterial and anti-inflammatory properties. Today, the potential uses of carvacrol as an antioxidant agent have attracted the attention of researchers and studies have reported that carvacrol has antioxidant and cell protective effects. The aim of this study, which we planned, was to examine the antioxidant effect of carvacrol against oxidative damage caused by tartrazine in rats. In line with our study, tartrazine (500 mg/kg) and carvacrol (12.5; 25; 50 mg/kg) were administered to rats by gastric gavage for 21 days. At the end of this period, the levels of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) enzymes were examined from blood, liver, brain, kidney, lung, testes and heart tissue samples obtained from animals. In addition, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) levels were measured. Molecular analysis and histopathological examinations of IFN- γ , TNF- α and NFkB inflammatory genes associated with tissue damage were performed in liver and kidney tissue samples taken from rats.

Tartrazine decreased SOD, CAT and GSH levels by stimulating lipid peroxidation in all tissues of rats, increased MDA activity, and increased serum ALT, ALP and AST activities. With the application of carvacrol, SOD, CAT and GSH levels in the tissues approached the control, while MDA activity decreased. On the other hand, carvacrol brought the serum AST, ALT and ALP activities closer to the control group. The findings show that tartrazine administration causes oxidative

stress in plasma and cells, and carvacrol, a natural antioxidant, has a protective effect on oral tartrazine toxicity and corrects the negative effects of tartrazine-induced oxidative stress.

By statistical evaluation of the data obtained in the study, the importance of the differences between the groups and the relationships between the parameters were determined and the possible protective effectiveness of carvacrol against oxidative damage with tartrazine was determined. According to these results, it has been revealed that carvacrol has positive effects in the prevention of tissue and organ damage due to oxidative stress.

Keywords: Tartrazine, carvacrol, rat, oxidative stress, lipid peroxidation

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	I
SUMMARY	III
ÖNSÖZ SAYFASI	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER	X
ÇİZELGELER	XI
RESİMLER	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri	3
2.1.1. Gıda Boyaları	4
2.1.1.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları	6
2.1.1.3. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyası Kodları	7
2.1.1.4. Gıda Boyalarının Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi ve Zararları	7
2.2. Tartrazin	8
2.2.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler	8
2.2.2. Tartrazinin Kullanım Alanları	9
2.2.3. Tartrazinin Metabolizması	10
2.2.4. Tartrazinin Toksikolojik Etkileri	11
2.3. Oksidatif Stres	12
2.3.1. Serbest Radikaller	14
2.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	16

2.3.3. Serbest Radikallerin Türleri	18
2.3.4. Serbest Radikallerin Makro Moleküller Üzerine Etkileri	18
2.3.5. Serbest Radikallerle Oluşan Lipit Peroksidasyonu	19
2.4. Antioksidan Sistemi	21
2.4.1. (GSH) Redükte Glutasyon	23
2.4.2. (SOD) Süperoksit Dismutaz	24
2.4.3. (CAT) Katalaz	25
2.4.4. (AST ve ALT) Aminotransferazlar	27
2.4.5. (ALP) Alkalen Fosfataz	29
2.4.6. (MDA) Malondialdehit	29
2.5. Karvakrol	31
2.5.1. Karvakrol Hakkında Genel Bilgiler	32
2.5.2. Karvakrol'ün Açık Formülü ve Kimyasal Özellikleri	34
2.5.3. Karvakrol İle Yapılan Deneysel Çalışmalar	36
2.5.4. Karvakrol İle Yapılan Toksikolojik Çalışmalar	41
2.5.5. Karvakrol'ün Antioksidan Etkisi	42
3. MATERYAL ve METOT	43
3.1. Deneysel Hayvan Materyali	43
3.2. Deneysel Süreç	43
3.2.1. Anestezi ve Sakrifikasyon	44
3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme	44
3.2.3. Doku Takibi	44
3.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	45
3.3.1. Doku Homojenizasyonu	45
3.3.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	45
3.3.3. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini	46
3.3.4. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	46
3.4. Moleküler Analizler	47
3.5. Biyokimyasal Parametreler	49
3.6. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50

4.1. Biyokimyasal Bulgular	50
4.1.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	50
4.1.2. Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri	50
4.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Düzeyleri	50
4.1.4. Katalaz (CAT) Aktivite Düzeyleri	50
4.1.5. Plazmadaki Enzim Düzeyleri	50
4.1.6. Karaciğer ve Böbrekte Değişen Biyokimyasal Gen Parametreleri	51
4.2. Histolojik Bulgular	54
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	70
EKLER	92
Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	92
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TGK:	Türk Gıda Kodeksi
TART:	Tartrazin
KAR:	Karvakrol
AST:	Aspartat Aminotransferaz
ALT:	Alanin Aminotransferaz
CAT:	Katalaz
ALP:	Alkalen Fosfataz
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
GLA:	Gama Linoleik Asit
GSH-Px:	Glutasyon Peroksidaz
GSH:	Redükte Glutasyon
GSSG:	Yükseltgenmiş Glutasyon
LPA:	Lipid Peroksidasyonu
MDA:	Malondialdehit
SOD:	Süperoksit Dismutaz
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ROS:	Reaktif Oksijen Türler
RNS:	Reaktif Nitrojen Türleri
OS:	Oksidatif Stres
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
ROO[·]:	Peroksil radikali

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1. Antioksidan dengedeki bozulmanın neden olduğu oksidatif stres	14
Şekil 2. GSH'ın antioksidan işlevi	24
Şekil 3. Antioksidan enzimlerin reaktif oksijen türleri üzerine etkisi	27
Şekil 4. Karvakrolün biyolojik yararları	33
Şekil 5. Karvakrolün açık kimyasal formülü	35
Şekil 6. Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	59
Şekil 7. Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	59
Şekil 8. Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	60
Şekil 9. Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	60
Şekil 10. Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	61
Şekil 11. Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	61

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1. E numarası kodlaması	7
Çizelge 2. Tartrazin	9
Çizelge 3. Antioksidanların sınıflandırılması	22
Çizelge 4. Karvakrol'ün açık formülü ve kimyasal özellikleri	34
Çizelge 5. Origanum Onites L. yağı içerisinde yer alan temel bileşenler	35
Çizelge 6. Karvakrol'ün elde edildiği başlıca aromatik bitkiler	36
Çizelge 7. Çalışmada kullanılan primer dizileri.	49
Çizelge 8. Gruplara ve dokulara göre MDA düzeyleri	52
Çizelge 9. Gruplara ve dokulara göre GSH düzeyleri	52
Çizelge 10. Gruplara ve dokulara göre SOD enzim aktivite düzeyleri	53
Çizelge 11. Gruplara ve dokulara göre CAT enzim aktivite düzeyleri	53
Çizelge 12. Plazma AST, ALP ve ALT enzim aktivite düzeyleri (IU/L)	54

RESİMLER

SAYFA

Resim 1. Beyin Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a A3 (Beyin, Tartrazin grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanlar	54
Resim 2. Beyin Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b A4 (Beyin, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları kler. A5 (Beyin, Tartrazin+C50 grubu); (İnce ok) Damarlarda hiperemi. A6 (Beyin, Tartrazin+C100 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon	55
Resim 3. Akciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a B3 (Akciğer, Tartrazin grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi	55
Resim 4. Akciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b B4 (Akciğer, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi. B5 (Akciğer, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma. B6 (Akciğer, Tartrazin+C100 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma	55
Resim 5. Kalp Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a C3 (Kalp, Tartrazin grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları	56
Resim 6. Kalp Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b C4 (Kalp, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları. C5 (Kalp, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları.	56
Resim 7. Karaciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a D3 (Karaciğer, Tartrazin grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (İnce ok) Vena sentralislerde hiperemi, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları	56
Resim 8. Karaciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b D4 (Karaciğer, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D5 (Karaciğer, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D6 (Karaciğer, Tartrazin+C100 grubu); (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları	57
Resim 9. Böbrek Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a E3 (Böbrek, Tartrazin grubu); (Kalın ok) Damarlarda hiperemi, (İnce ok) Glomerulus	57

kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.

Resim 10. Böbrek Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b E4 (Böbrek, Tartrazin+C25 grubu); (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler. E5 (Böbrek, Tartrazin+C50 grubu); (Kıvrımlı ok) İntersitisel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.

57

Resim 11. Testis Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a F3 (Testis, Tartrazin grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları.

58

Resim 12. Testis Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b F4 (Testis, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları. F5 (Testis, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları. F6 (Tsetis, Tartrazin+C100 grubu); (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları.

58



1. GİRİŞ

Monoazo yapıya sahip sentetik bir azo boyası olan tartrazin, pirazolin halkası içermekte olup, azo boya ları içerisinde en çok tercih edilenidir. Tartrazin; cipsler, konserve ler, aromalı içecekler, soslar, tatlılar, pastane ürünleri, şekerlemeler, süsleme ve kaplama maddeleri ve evcil hayvan yiyecekleri gibi birçok gıdanın içerisinde yer almaktadır. Tartrazinin dokulara yüksek oranda alınması sonucu serbest radikal oluşumu meydana gelir ve dokularda oksidatif strese sebep olduğundan karaciğer ve böbrek dokularının biyokimyasal görüntülerinde değişikliklere sebep olmaktadır.

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, tartrazinin yer aldığı ilaçların 2210 hastadan %13,2'sinde alerjik etkiler meydana getirdiği görülmüştür (Bhatia, 1996; Uysal ve Semerdöken, 2011). Yapılan başka araştırmalarda da, tartrazin'e karşı yüksek duyarlılık reaksiyonları, her 10 bin kişide 1 ve 10 arasındaki insanları etkilediği, bu boyanın kullanılması ile çocuklukta hiperaktivite, astım ve ürtiker, damar ödemleri, egzama ve migren gibi hastalıklarına neden olduğu rapor edilmiştir (Yırtıcı, 2007; Atlı, 2010; Erdem, 2014). WHO, tartrazin için günlük alım miktarını, 5,0 mg/kg vücut ağırlığı olarak onaylamıştır (Edlefsen ve Brewer, 1996; Dinç, 2007). Avusturya ve Norveç'de gıdalarda tartrazin eklenmesi yasaklanmıştır (Çakır, 2013). Niraj ve arkadaşları tarafından 1989 yılında *Drosophila*'da, sentetik gıda renklendiricilerinden olan tartrazin'in genotoksik etkisi araştırılmış ve rekombinasyon ve somatik mutasyon testi ile %0,03 ve %0,06'lık tartrazin uygulaması sonucunda tartrazin'in hem rekombinojenik hem de mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Doğada özellikle Labiatae grubunda çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fenolik monoterpen olan karvakrol güvenilir gıda katkısı, lezzet arttırıcı, antimikrobial (Bagamboula vd., 2004), antifungal (Tampieri vd., 2005), Antioksidan (Aeschbach vd., 1994), insektisidal (Panella vd., 2005) ve antiparazitik (Llana-Ruiz-Cabello vd., 2015) aktiviteye sahiptir. Karvakrol, FDA tarafından insan tüketimi açısından güvenilir olarak tanımlanan fenolik bir bileşik olup Avrupa konseyi

tarafından da aromalı katkı maddesi listesine dâhil olmuştur (Hyldgaard vd., 2012). Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışmada kronik strese maruz kalmış sıçanların beyin, karaciğer ve böbreklerinde karvakrolün oksidatif strese karşı koruyucu etkileri çalışılarak MDA, indirgenmiş GSH, SOD, GSH-Px, GR ve KAT aktivitelerinin seviyesi değerlendirilmiştir. Strese bağlı olarak hayvanların beyin, karaciğer ve böbreklerinde MDA seviyesi önemli ölçüde daha yüksek, GSH ve Antioksidan enzimlerin seviyeleri ise kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, strese maruz kalmış hayvanlarda karvakrolün uygulanması iyileştirici yönde etkiler sunmuştur. Mevcut çalışma karvakrolün oksidatif strese bağlı doku ve organ hasarlarının önlenmesinde faydalı etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Farooqui vd., 2016).

Antioksidanların düzeyi düştüğü zaman oksidatif stres gelişir. Bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivitesi hücre savunmasında önemlidir. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalara göre birçok hastalığın patogenezinde lipid peroksidasyonun ve artan serbest oksijen radikallerinin rol aldığını görülmektedir. (Hasanoğlu, 1994; Engin vd., 2000; Engin, 2003; Yardım&Akaydın, 2004; Engin vd., 2005). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, iyonize radyasyona maruz kalma, metaller, pestisidler, organik toksik kalıcı bileşikler, hava partikülleri gibi çevresel faktörlerin kanser, diabetes, aterosklerozis ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yaşlanma süreci de reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksekliği ya da bunların yetersiz detoksifikasyonu ile ilgilidir (Özenirler vd., 1994; Engin, 2003; Yardım&Akaydın, 2004). Oksidatif stresi (OS) aktive eden etmenler; hava kirliliği, iyonize radyasyon, UV ışınları, ağır metaller, metalloidler, pestisidler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar hedef dokularda reaktif oksijen türleri (ROS) reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumuna neden olmaktadır (Limón-Pacheco vd., 2009).

Biyolojik sistemlerde aşırı serbest radikallerin üretiminin önüne geçilmesinden sorumlu antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve nonenzimatik olarak yapılmaktadır. Hücresel savunma mekanizmalarından birisi olan süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir (Zhang vd., 2012). Antioksidanların düzeyi düştüğü zaman oksidatif stres gelişir. Bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivitesi hücre

savunmasında önemlidir. Yapılan çalışmalarda sıklıkla oksidatif strese karşı antioksidan savunma ajanlarının etkisi araştırılmıştır (Peng vd., 2000; Abdel-Wahhab vd., 2016).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddelerinin, günümüzde gıda ürünleri sanayisinde çok fazla kullanılır bileşikler olmasından dolayı bu durum üretim tekniklerinin de değişmesine yol açmıştır. Bunun dışında gelişen sanayileşme, gıda katkı maddeleri hakkında daha farklı bakış açıları göstermekte ve bunlara yenilerinin de katılmasını sağlamaktadır.

GKM'ler, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre “Tek iken gıda olarak tüketilemeyen yada gıda ham maddesi yada yardımcı ürün olarak kullanılamayan, yalnızken besleyici değeri olan yada olmayan, uygun olan teknolojik uygulama gereği kullanılan işlem yada üretim esnasında kalıntı yada benzeri türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın imal edilmesi, tahliyesi, işlenmesi, hazır hale getirilmesi, paketlenmesi ve depolanması sırasında gıda maddesinin görünüş, koku, tat, yapı ve diğer özelliklerini korumak, düzeltmek ya da istenilmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilmiş maddeler” şeklinde tanımlanmaktadır (Kaya, 2005).

GKM'lerin kullanımlarında bir takım koşullar bulunur:

- Kullanılacak olan gıda katkı maddesinin analiz raporu ve kullanılacak miktar belli olmalıdır.
- Bu maddeler eklendikleri gıdanın besin değerini azaltmamalı veya değiştirmemelidir.
- Gıdada yer alan vitaminlere hasar vermemeli ve besin kalitesini azaltmamalıdır.
- Gıdaya eklenen katkı maddelerinin özellikleri bilinmeli ve bu konuda hücre içi ve hücre dışı testler yapılmış olmalıdır.
- Gıda katkı maddesinin hangi amaçla, ne miktarda ve hangi ürünlere eklenebileceği gıda kodeksinde gösterilmiş olmalıdır.

- Gıdaya kodekste belirtilmiş olan miktarlardan daha fazla eklenmemelidir ve üretimleri esnasında gıda katkı maddesi eklenen gıdalar sürekli denetime tabi tutulmalıdır.
- Katılan gıda katkı maddesinin açık adı ve katılan miktarı gıdanın üstündeki etiketinde belirtilmelidir.
- GKM'ler, bozulmuş olabilecek gıdayı maskeleyememeli ve tüketiciyi kandırıcı olmamalıdır.
- Özellikle bebek mamalarına ve diyet ürünlerine eklenecek katkı maddesinin, katılım şartları ve miktarları bazı özel izinlere tabi tutulmalıdır (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Halk sağlığı üzerinden, gıda katkı maddeleri konusunda Türkiye'deki uygulamalara bakıldığında, her ülkede olduğu gibi GKM'lerin kullanım şartlarını düzenleyen yasa ve yönetmelikler bulunmaktadır. FAO ve WHO örgütlerinin kullanım şartlarına bağlı kalınarak, her ülkenin sağlık birimleri GKM'lerin eklenebileceği ürünleri ve bu maddelerin ürünlere eklenme miktarlarını kendi ülkelerinin şartlarına göre belirlemektedirler (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Günümüzde gıda katkı maddeleri, besleyici ve bol gıda temininde önemli bir rol almaktadır. Sürekli artan nüfusumuzla birlikte birçok yiyeceğin içerisinde gıda boyalarına izin verilmektedir. Yapılan son araştırmalara göre renk, yemek seçerken önemli bir özellik kriteri olmuştur. Bunun sonucunda gıda boyaları oldukça yaygın şekilde besin içeriklerine eklenmiştir (Erden-Çalışır ve Çalışkan, 2003).

2.1.1. Gıda Boyaları

Renklendiricilerin ilk olarak MÖ 1500 yıllarında Mısır'da gıdalara eklendiği düşünülmektedir (https://en.wikipedia.org/wiki/Food_coloring#cite_ref-6). GKM'nin bir üyesi olan gıda boyaları, “gıdanın rengini düzenleyen veya renk vermek amacıyla katılan madde” olarak uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu tarafından tanımlanmaktadır. Renk veren birçok madde kimyasal ve fiziksel yapılarındaki değişiklikler nedeniyle farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ayrıca bu

özellikleri sayesinde hangi ürünlerde, ne şekilde ve hangi amaçla kullanılacakları belirlenmektedir. Gıdaların albenisinde ve tüketiciler tarafından onay görmesinde renk, en önemli duyuşsal kalite niteliğidir. Gıdalar üretilirken ve tasnif esnasında farklı fiziksel ve kimyasal nedenlere bağılı olarak ürün renginde renk kayıpları oluşabilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için renklendirici bazı maddeler yani gıda boyaları kullanılmaktadır (Adams&Langley, 1995; Kırca&Ekinci, 2011; Çukadar 2014).

Gıdaların renklendirilmesinin nedeni bu zamanda uygulanan gıda işleme tekniklerinin, gıdalarda tekstür özellikleri bakımında ortaya çıkardıkları olumsuz etkilerdir (Karaali&Özçelik 1993).

Gıdalarda renk kaybının önlenmesine çalışılmasının başlıca nedenleri:

- Hava şartlarından oluşacak olan nem ve tasnif işlemlerinden kaynaklanabilecek renk kayıplarını önlemek,
- Gıda ürününe belli bir renk standartı oluşturmak,
- Gıda ürününe ilgi çekici özellik kazandırmak,
- Rengi olmayan bir gıdaya renk vermek,
- Kalitesi düşük gıdaları ilgi çekici hale getirmektir.

Gıdalara renk maddesi eklenmesinin nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Kendi doğal rengini azalmasını önlemek ya da gıdanın orijinalliğini korumak.
2. Üründe belli standartta renk oluşturmak.
3. Bir başka renge dönüştürmek veya ürüne değişik renk tonları eklemek.
4. Kalite standartlarını korumak koşuluyla daha güzel ve ilgi çeken ürünler elde etmek (Karaali&Özçelik 1993, Yaman 1996).

Gıdalarda duyuşsal özellikleri dikkate alındığında renk, gıdanın çekiciliğini artırmada önemli rol oynamaktadır. Her zaman gıdadaki ilk izlenim görselliğidir ve gıdanın tercih edilmesine ya da reddedilmesine neden olur. Gıdanın ilgi çeken özelliği rengidir. Tüm gıda maddelerinde alışılmış olan bir renk aranmaktadır.

Teknolojik işlem gören birçok gıda maddesinde belli oranda renk kayıpları görülmektedir. Gıda boyaları, yeni gıdaları üretilirken veya depolama işlemleri sırasında meydana gelebilecek renk hasarlarını düzeltmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Gıda üretim ve ürün işleme esnasında gıdanın kendi rengini koruması, ürünün tek renk olması ve çekiciliğinin artması amacına bağlı kalarak, üretilmiş olan rengi olmayan ya da rengi az olan gıdalara renk kazandırmak amaçlı gıda boyalarını ürünlerinde kullanılmaktadırlar. GKM'nin kullanımı uluslararası yasalar ve ulusal yönetmelikler tarafından belirlenmekte ve denetlenmektedir (Çakmakçı&Çelik, 1994).

Gıda boyaları, doğal gıda boyası, sentetik gıda boyası ve yarı sentetik gıda boyası olmak üzere üç ayrı gruptan oluşurlar. Elde edildikleri kaynak dikkate alınarak bu gruplandırma yapılmıştır. Yapay gıda boyaları eklenerek üretilen gıdalar sağlık açısından önerilmemektedir. Bu yüzden doğal gıda boyaları içeren ürünler çok daha fazla tüketilmektedir (www.diyetuzmani.com/beslenme/beslenme-bilgileri/gida-katkı-maddeleri.php, 2019).

2.1.1.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları

Bu boyalara 'kömür katranı'(coaltar dyes) adı verilmektedir. Nedeni ise çoğunun sentezinde başlama maddesi olarak kömür katranı kullanılmasıdır. Bazılarının yapısında - (N = N) - grubu içerdiğinden azo boyalar olarak da isimlendirilirler. Doğadan elde edilmeyen ancak laboratuvar ortamında sentezlenerek üretilen katkı maddelerine sentetik gıda boyaları adı verilir (Ekşi, 1996). En önemlileri tartrazin, ponceau 4R ve amarant adıyla bilinen gıda boyalarıdır (Erdoğan, 2007).

Tartrazin, dihidroksitartarik asit ile fenilhidrazin parasülfonik asidin, kondensasyonundan üretilmektedir. Renk oluşturabilme aralıkları, renk verme şiddetleri, maliyet açısından daha uygun olmaları ve kolay kullanılabilir olmasından dolayı doğal gıda boyalarına oranla daha üstün denilebilir ve bunun sonucu olarak daha fazla tercih sebebidirler. Sentetik boyaların dengesini pH, ışık, ısı, asit, tuz ve koruyucular gibi bazı faktörler bozabilmektedir ayrıca sentetik gıda boyaları yüksek

oranlarda suda çözünebilirler (Crosby 1981). Sentetik gıda boyalarının tamamı dış ülkelerden, ülkemize girmektedir (Karaali&Özçelik, 1993).

Sentetik gıda boyalarının hepsinin sertifikası olup iki gruba ayrılırlar:

- Gıda İlaç ve Kozmetik İçin Boyalar
- Gıda İlaç ve Kozmetik İçin Lake Boyalar (Ekşi, 1996; Yaman, 1996).

2.1.1.3. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyası Kodları

Gıda boyaları E300, E200, E100 gibi “European” kelimesini ifade eden E harfi ile kodlanırlar. Uluslararası piyasada onaylanmış olan gıda boyalarında E koduyla birlikte bir de numarası yer almaktadır (Yurttagün, 2019).

Çizelge 1. E Numarası Kodlaması

E Numarası	Adlandırma
E400 – E 466	Jelleştirici ve Koyulaştırıcılar
E300 – E385	Antioksidanlar
E200 – E297	Koruyucular
E100 – E180	Boyalar

2.1.1.4. Gıda Boyalarının Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi ve Zararları

Gıda boyalarının en önemli ve en çok bilinen zararlı etkilerinden biri genetik faktörlere verdiği hasardır. Çok fazla miktarda gıda boyası içeren ürünleri tüketen kişinin kalıtsal yapısına zarar vererek DNA hasarları, çift çekirdeklilik, kromozomların anormal olması gibi sorunlara yol açabilmektedir. Bununla birlikte gıda boyaları bir takım davranış bozukluklarına da sebep olabilmektedir. Bir araştırmaya göre küçük yaşlarda gıda boyası içeren ürünleri tüketen çocukların dikkat eksikliği sergilediği tespit edilmiştir (www.diyetuzmani.com/beslenme-bilgileri/gida-katkı-maddeleri.php).

Tüm bunlar dikkate alındığından gıda boyalarının üretime katılmadan önce yerel ve uluslararası bazı kuruluşların onayından geçmesi zorunludur (Yılmaz, 2008). Gıda katkı maddeleri vücuda alınan miktarlara bağlı olarak toksikolojik bir etkiye neden olabilirler (Yurtagül&Ayaz, 2008; Kırca&Ekinci, 2011). Üretime katılacak olan gıda katkımaddelerinin deney hayvanlarına eklenecek doz nedeniyle ortaya

ıkabilecek olası yan etkilerin belirlenmesi, gıda katkı maddelerinin üretime katılma izninin verilmesinde ilk adımı oluşturmaktadır (Yılmaz, 2008). Bu kimyasal maddelerin deney hayvanlarında ortalama yaşam sürelerinin % 70-80 arasını kapsayan süreçte düzenli olarak her gün deney hayvanlarına verilmesi sonucunda test edilerek, kronik toksisite testleri gerçekleştirilir. Ayrıca en fazla eklenebilecek miktarlarının belirlenmesi amacıyla, gıda katkı maddesinin günlük verilebilecek miktarının da belirlenmesi şarttır (Yılmaz, 2008; Yurtagl&Ayaz, 2008; Kırca&Ekinci, 2011). Uluslararası ve ulusal kuruluşlarca oluşturulmuş bilimsel komiteler tarafından bu toksisite sonuçları değerlendirmeye alınır. Gıda katkı maddelerinin hiçbir etkisinin gözlenmediği bir doz belirlenemezse, o maddenin kullanımına izin verilmez (Yılmaz, 2008). Birçok sentetik gıda renklendiricisi deney hayvanları üzerinde de zararlı etkiler oluşturması nedeniyle yasaklanmıştır (Kırca&Ekinci, 2011). Sentetik gıda boyalarının toksisite özellikleri incelendiğinde, kesin güvenilirliği olmadıkları (El-Saaday, 1991; Kırca&Ekinci, 2011) ve gıdalara eklenen maddeler üzerinde yapılan çalışmalarda; bu bileşiklerin yüksek karsinojenik etkiye sahip olabilecekleri tahmin edilmiştir (Kırca&Ekinci, 2011). Son zamanlardaki gelişmeler dikkate alındığında, gıda boyaları hakkında ki eski bulguların korunduğunun kontrol edilmesi ve yeni veriler elde edebilmek için sürekli yeni araştırmaların ve incelemelerin yapılması gereklidir (Yurtagl&Ayaz, 2008; Kırca&Ekinci, 2011).

Son dönemlerde güvenilirlik nedeni ile gıda boyalarının kullanımı azaltılmış olsa da, farklı sentetik gıda boyaları dünyanın her yerinde daha ucuz ve etkili oldukları için doğal boyalar yerine tercih edilmektedir (Seyhan, 2006; Kırca&Ekinci, 2011).

2.2. Tartrazin

2.2.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler

Tartrazin; monoazo yapıda, pirazolin halkası içeren, sertifikası olan sentetik bir gıda boyasıdır. Bu gıda boyası 1884 yılında, Alman Kimyager Ziegler tarafından ilk defa kömür katranından izole edilerek bu ismi almıştır. Bu gruptaki sentetik

boyalar, –N=N- grubu içermesinden dolayı azo boyası olarak da isimlendirilirler. Bu boyalar içerisinde kullanımı en fazla olan tartrazin maddesi; sarı-turuncu rengi sahip, toz halinde bir gıda boyasıdır. Suda çözünebilme özelliğine sahip olup, altın sarısına benzer renkte çözeltileri vardır (Deshpande, 2002; Yırtıcı, 2007; Çukadar 2014).

Bu gıda boyası, fenilhidrazin-p-sülfonik asit ile oksaloasetik esterin kondenzasyon tepkimesi sonucunda sentezlenir. Bu tepkimenin ürünü, sülfanilik asit ile birleştirildikten sonra oluşan ester bağı, sodyum hidroksit ile hidrolize edilir. Tartrazin sentezinin bir başka yolu ise, iki mol fenilhidrazin-p-sülfonik asidin ile bir mol dihidroksitartarik asitin kondenzasyon tepkimesidir (Karaali&Özçelik, 1993; Yırtıcı, 2007). Kondenzasyon olmadan da, petrolün yan ürünü olan 4-amino benzen sülfonik asitin ile sodyum nitritin tepkimesin son ürünü olan Tartrazin saflaştırılarak sodyum tuzu olarak da elde edilebilir (Çukadar, 2014).

Tartrazinin günlük alınabilecek maksimum miktarı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesinin belirlemiş olduğu (5 mg/kg/gün)'dür. Ortalama olarak 30 kilo ağırlığındaki bir çocuk için alabileceği maksimum doz (150 mg/gün)'ne denk gelmektedir (Güneş, 2016).

Tartrazinin en az %85'i suda çözünebilirken suda çözünmeyen miktarı en fazla %0,2'dir. Bu gıda boyası toz ve granüllü bir yapıya sahip olup turuncu-sarı rengindedir. Alkolü %95 içeren bir ortamda çok az çözünebilir. Tartrazin çözeltisine askorbik asit ve sodyum perborat lave edildiğinde renk değiştirmezken, kalay klorür eklendiğinde iki dakika içinde rengi kaybolur (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, 2002). Tartrazin, gıdaya sarı rengini vermesine karşın, başka renklendiricilerle birlikte kullanıldığında yeşil rengin bazı tonlarını da verebilir. (https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin_E102).

Çizelge 2. Tartrazin (Akgün, 2002; Çukadar 2014).

Ticari adı:	E102 veya FD&C Yellow 5
Kimyasal adı:	Trisodyum 5-hidroksi-1-(4- sülfonato-fenil)-4-(4-sulfanatofenilazo)-Hprizol-3-karboksilat

Formül:	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂
Mol kütlesi:	534,3 g/mol
Kaynama noktası:	870 °C (1598 °F)
Erime Sıcaklığı:	300 °C (572°F)

2.2.2. Tartrazinin Kullanım Alanları

1916 yılından bu yana Amerika’da en çok kullanılan ikinci gıda boyar maddesi unvanına sahip olup, dünyanın birçok ülkesinde Tartrazin; konserveler, aromaya sahip içecekler, donmuş meyveler, tatlılar, soslar, pastane ürünleri, süsleme ve kaplama maddeleri, dondurma, cips, ve şekerlemeler hatta evcil hayvan gıdaları gibi birçok gıdanın yanı sıra ilaç sektöründe ve kozmetik ürünlerinde de çok sık kullanılmaktadır (Mpountoukas vd., 2010; Mahfouz&Al-Shammrani, 2013). Ayrıca et ve ürünlerinde, süt ve ürünlerinde, pudingler, jöleler, reçel ve sakız gibi gıdalarda, diş macunları, nemlendirici ve şampuan gibi kozmetik ürünlerinde ve boya kalemleri içerisinde renk vermek amacıyla en çok kullanılan gıda boyasıdır (Akgün, 2002; Atlı, 2010; Peltek, 2012). Deri, kâğıt, ipek, yün ve naylon boyamada, hayvan histolojisinde kontrast boya olarak, sabun ve plastik boyanmasında ve mürekkep hazırlanmasında kullanılmaktadır (Seyhan, 2006; Çukadar, 2014). Gıda ve tekstil sanayisinde kullanılan sentetik boyaların % 60 - % 70’ini tartrazininde içinde bulunduğu azo boyaları oluşturur. Bu kadar çok kullanılmalarının nedeni azo boyalarının birçok doğal gıda boyasından daha kararlı olmaları ve bu boyaların üretimlerinin de daha ucuz olmasındandır. (https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin_E102).

2.2.3. Tartrazin Metabolizması

İnsan, tavşan ve ratlarda, barsak mukozasındaki bakteriyel azo redüksiyonu ile ilk önce gıdalarla birlikte alınan tartrazinin sindirilmesi sağlanır. Kısacası oral yolla alınan tartrazinin barsak mikroflorası tarafından metabolize olduğu tespit edilmiştir. Tartrazinin en önemli metabolitleri, aminopirazolon ve sülfanilik asittir. Ağızdan alınarak vücuda giren azo boyaları, barsak mikroflorası tarafından azoredüktaz enzimleri sayesinde metabolize edildikten sonra aromatik aminlere dönüşür. Bir nitro

azo boyası sadece nitroredüktaz enzimi ile metabolize olabilmektedir (Demirkol ve ark., 2012).

Tavşan ve ratlarla yapılan bir çok çalışmada, tartrazinin safra ve idrar yolu ile değişime uğramadan ki haliyle atıldığı bildirilmiştir (Himri vd., 2012; Soares vd., 2015; Bezerra vd., 2016).

Tartrazin gibi azo boyalarında, bu boyaların metabolizmaları esnasında azo bağının indirgeyici biyo transformasyonu sonucu toksik, karsinogenik ve mutajenik etkilerinin ortaya çıkıyor olması, bu tepkimeyle doğrudan veya dolaylı etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. (Demirkol vd., 2012; Soares vd., 2015). Azo bağlarının ayrılmasını karaciğerde yer alan azo redüktaz enzimi de katalize edebilir (Soares vd., 2015).

Barsak florası, oral yolla alınan Tartrazinin büyük bir kısmını kolonda kolayca metabolize edebilir. Kolondaki anaerobik koşullar ve barsak bakterileri tarafından salınan elektron taşıyıcıları tartrazinin aminopirazolon ve yüksek duyarlı bir aromatik amin olan sülfanilik asit olacak şekilde iki metabolite indirgenmesini sağlar. Tartrazin ve metabolitleri çoğu zaman gaita ile atılmasına rağmen az miktarda da olsa geri emilebilirler (Himri vd., 2012; Soares vd., 2015; Bezerra vd., 2016). Bu metabolitler rejeneratif hiperplazi sürecinde hücreleri değiştirme yeteneğine ve interfaz boyunca hücre döngüsünde kalma potansiyeline sahiptirler. Bundan dolayı hücrede kanserin gelişmesine büyük ölçüde neden olabilirler (Bezerra vd., 2016).

Tartrazin metabolizmasında barsak mikroflorası önemli bir rol almasına karşın, karaciğerde bulunan bazı enzimler de azo bağlarının kırılmasını sağlayabilir ve nitro gruplarının sayısını azaltabilir. Barsak ve karaciğerdeki bu reaksiyonlar sonunda, eğer azo boyaları tümüyle aromatik aminlere indirgenebilirse, bu aminler daha sonrasında P450 enzimleri sayesinde N-hidroksi türevlerine okside edilirler (Demirkol vd., 2012). Bu yüzden azo boyalarının metabolizmasında, azo bağlarının kırılmasını sağlayan karaciğer enzimleri de görev almaktadırlar.

2.2.4. Tartrazinin Toksikolojik Etkileri

Birçok klinik deney sonucunda etkileri incelenen tartrazinin patolojik veya toksik bir etkisinin görülmediği bunun yanında tümör oluşumu için herhangi bir risk oluşturmayacağı ifade edilmesine karşın bazı çalışmalara göre, tartrazinin kullanımıyla astım, çocuklukta hiperaktivite ve deride kaşınma ya da egzama ve damar ödemlerinin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Besinlerle birlikte bedenimize aldığımız Tartrazinin bir bölümü barsak mikrorganizmaları tarafından parçalanır ve geriye kalanı parçalarına ayrılmadan vücuttan uzaklaştırılır (Kırca&Ekinci, 2011).

Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) Tartrazin için 2016 yılında yapılmış olan çalışmada bir günlük alım miktarını 0-10 mg/kg vücut ağırlığı arasında kabul edilebilir olarak belirlemişlerdir. Gıdalarda kullanılan tartrazin miktarının sürekli takip edilmesi toplumda gıda güvenliğini arttırmak için elzemdir. Bu yüzden yiyecek ve içeceklerde tartrazin miktarının belirlenmesi gereklidir (Ameur, F.Z. vd., 2020).

Yapılmış olan bir çalışmada ratlara içme suyu ile birlikte belli miktarlarda tartrazin verilmiş ve vücut ağırlıklarında, timus ağırlıklarında, hemoglobin ve kırmızı kan hücreleri miktarlarında azalmalar saptanmıştır (Yırtıcı, 2007; Çukadar, 2014). Bir klinik çalışmaya göre tartrazin gibi azo grubu gıda boyalarının çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu, aspirine duyarlı ve astımlı bireylerde olumsuz sonuçlar meydana getirdikleri görülmüştür (Çukadar, 2014). Tartrazine karşı tolerasyon mekanizması tam olarak bilinmiyor olmasına rağmen, buna benzer istenmeyen reaksiyonlara tartrazin metabolitlerinin neden olabileceği tahmin edilmektedir. Bunun yanında çocuklarda boşaltım sürecinin daha geç gerçekleşmesi de bu sonuca neden olabilmektedir (Çukadar, 2014).

Tartrazinin; klinik depresyon, nörodavranışsal toksisite, kaşıntı ve uyku bozukluğu gibi birçok istenmeyen immünolojik reaksiyonların başlamasına da neden olabileceği tespit edilmiştir (Park vd., 2009). Amin ve arkadaşları, 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada tartrazinin düşük miktarlarda bile böbrek ve karaciğer gibi hayati organlara zarar vererek bir takım biyokimyasal parametreleri değiştirebileceğini rapor etmişlerdir. Astım krizlerine neden olan alerji, ventolin ve aspirin gibi çok kullanılan ilaçlar ile tartrazinin etkileşimini gösteren çalışmalardan dolayı, bazı ülkeler tartrazin kullanımını yasaklanmıştır (Mahfouz&Al-Shamrani,

2013). Mervat ve Heba, rat kullanarak yaptıkları çalışmada depresyon ve anksiyete benzeri nörolojik davranış bozuklukları ile tartrazin arasında doğrudan bir ilişkinin olduğunu tespit etmişler ve halk sağlığı açısından tartrazinin tehlikeli etkilerinin olabileceğini rapor etmişlerdir (Mervat&Heba, 2011).

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, aktif olmayan oksijen türlerinin üretilmesi ile biyolojik yapının aktif olmayan ara ürünleri detoksifikasyona uğratması ve bozulmanın etkilerini temizlemesi arasındaki denge bozukluğu olarak tanımlanabilir (Freinbichler, 2011). Gomberg tarafından ilk kez 1900 yılında keşfi olmuştur. Organizmada enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin azalması ile oksidan madde düzeylerinin artmış olması olarak ifade edilen oksidatif stres, özellikle son yirmi yılda toksikolojik çalışmaların ilgi odağı olmuştur (Rock CL vd., 1996; Bergendi, L vd., 1999).

Oksidatif stres, hücrelerin lipid tabakasında peroksidasyon ile sonuçlanan serbest radikallerin sentezi ve bedenin antioksidan reaksiyonlar ile kendini koruması arasındaki dengenin aleyhine bozulması olarak tanımlanabilir (Gordon CA&Himmelfarb J., 2004).

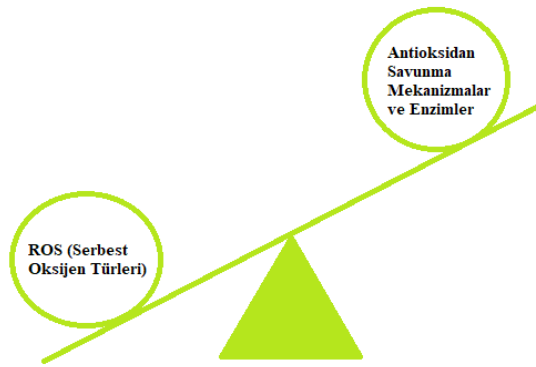
Oksidatif stres doğal bir mekanizma olup oksidatif stresi kontrol altına alan özelleştirilmiş mekanizmalar vardır. Oksidatif hasar ise var olan bu mekanizmaların yetersizliği durumunda oluşur (Floyd RA., 1992). Bu dengedeki bozulma çok çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına, kanser oluşumuna, şeker, reperfüzyon travmalarına, inflamatuvar hastalıklara ve psikiyatrik hastalıklara neden olabilmektedir (Valko M. vd., 2007).

Oksidatif hasar hücresel yapıda ilk olarak ROT ve serbest radikaller tarafından meydana gelir (Huang 1999). Vücudun antioksidan savunma mekanizmaları oksidatif stresin hasarlarını önlemede yetersiz kalacak olursa, hücrelerde oksidatif hasar meydana gelir ve hücresel reaksiyonlar önemli oranda bozulur. Kas, karaciğer, kardiyo-vasküler, böbrek yetmezliği ve yaşlanmanın etyopatogenezi gibi pek çok

hastalığın öncü sebepleri arasında oksidatif stresin olduğu bilinmektedir (Stefanis L. vd., 1997; Esterbauer H&Pubi H., 1991).

Serbest radikal üretimi, birçok zenobiyotiğin toksisitesi ile serbest radikallerin istenilenden fazla sayıda üretimi ve patofizyolojinin bir parçasıdır. Oksidatif stres, travmatik beyin yaralanmaları, nörolojik hastalıklar, iskemi, karaciğer hasarı, kanser, diyabet, down sendromu, AIDS ve ALS gibi birtakım hastalıklarla doğrudan ilişkilidir (Niki, 2010; Freinbichler, 2011). Serbest radikal üretimini oksidatif stres arttırarak, hedef alınan hücrelerde veya dokularda antioksidan düzeyinin düşmesini neden olarak kanser hücrelerinin oluşumunda önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Huang, 1999). Örneğin Parkinson ve alzheimer rahatsızlıklarının başlangıcı doğrudan beyindeki oksidatif stresin yükselmesi ile ilişkilidir.

Dokulardaki oksidatif stresin bir ölçüsü olarak, MDA ölçümü dikkate alınmaktadır. Oksidatif stresle ilgili yapılan deneysel çalışmaların birçoğu DNA, protein hasarı ve lipid düzeyini belirlemeye yöneliktir (Freinbichler, 2011). GSH (Glutasyon) düzeyi ve okside olmuş DNA materyalleri oksidatif stresin belirteçlerindendir (Jomova, 2011). Oksidatif stresin neden olduğu mekanizmayı tespit edebilmek için substrat olarak genellikle kültür hücreleri tercih edilir. Oksidatif stresin artmasıyla Koenzim-Q ve GSH gibi antioksidanların indirgenmiş/yükseltgenmiş yapıların oranında da artış tespit edilmiştir (Niki, 2010).



Şekil 1. Antioksidan dengedeki bozulmanın neden olduğu oksidatif stres

Oksidatif stres, azot radikalleri ve serbest oksijenler arasındaki dengesizlikten ve bunların koruma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamamasından oluşmaktadır (Hussain T. vd., 2016).

2.3.1. Serbest Radikaller

Dış yörüngesinde ortak olmayan bir veya birden fazla elektrona sahip olan moleküllere serbest radikal adı verilir (Clarkson, 2000). Bazı radikaller çok fazla reaktif etkiye sahiptirler ve diğer moleküllerden bir elektron alabilir ya da onlara elektron verebilirler. Bundan dolayı birer yükseltgen veya indirgen etki gösterirler. Yüksek oranda aktif olmaları nedeniyle radikallerin çoğu biyolojik sistemlerde ki yarılanma ömürleri oldukça kısadır (6-10 saniye ya da daha azı). Radikal oluşumları bedende genellikle ekzojen ve endojen nedenler olmak üzere iki ayrı mekanizma tarafından gerçekleşebilir. Vücuttaki tüm hücrelerde normal hücresel fonksiyonun bir parçası olarak serbest radikal üretimi durmaksızın oluşmaktadır. Fakat iç ve dış kaynaklı serbest radikallerin fazla üretilmesi birçok hastalığa neden olabilmektedir (I S Young, 2001). Bir de serbest radikallerin, basit hücresel bileşenlere bağlanma yetenekleri vardır; hücre zarı yağlarının doymamış bağlarıyla reaksiyon verirler ve nükleik asitlere zarar verirler (Huang, 1999).

Serbest radikallerin, romatoid artrit, yaşlanma, ateroskleroz, iskemi, bazı organlarda reperfüzyon yaralanması, parkinson, alzheimer ve sindirim sistemi bozukluğu, tümör metastazı, kanser ve AIDS gibi birçok hastalıkla ilişkisi vardır (Bagchi, 2000).

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) üzerinde ki son çalışmalar, yaşam formlarında sağlıklı yaşam ve hastalıkların tedavileri için ümit veriyor (Aruoma OI, 2003). Yaşam için vazgeçilmesi zor bir element olan oksijen, bazı durumlarda canlılara zarar verebilmektedir (Mohammed AA & Ibrahim AA., 2004). Bu elementin zararlı etkilerinin birçoğu, ROS olarak bilinen bazı kimyasal bileşenlerin oluşumuna ve aktivitelerine bağlıdır. Serbest radikal ve antioksidanlar, hastalık mekanizmalarına göre bugünün tartışmalarında çok kullanılan terimler haline gelmişlerdir (Aruoma OI, 1994). Çoğu serbest radikalın ortak özelliği eşleştirilmemiş bir elektrona sahip olmasıdır. Çoğu radikal istikrarsız ve oldukça reaktiftir (Cheeseman KH.&Slater TF., 1993). Hastalıklarda oksijen içeren serbest radikallerin en önemlileri; süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hipoklorit, nitrik oksit radikali hidrojen peroksit, singlet oksijen, ve peroksinitrit radikalidir (Young IS.&Woodside JV., 2001).

Canlılarda serbest radikaller, olası metabolik süreçlerden ya da ozon, hava kirleticileri, X-ışınları ve endüstriyel kimyasallar gibi dış etkenlerin etkisine bağlı olarak üretilirler (Bagchi K&Puri S., 1998). Canlı hücrelerde enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonların sonucunda serbest radikaller sürekli olarak oluşurlar (Liu T. vd, 1999). Serbest radikaller, oksijenin enzimatik olmayan reaksiyonları ile üretilirler. Hücre içerisinde üretilen serbest radikal kaynakları: Mitokondri, iskemi/reperfüzyon hasarı, peroksizomlar, ksantin oksidaz, iltihap ve egzersiz (Ebadi M., 2001).

Serbest radikaller stabil olmayıp oldukça fazla etkin atom veya moleküllerdir. Reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen radikalleri olarak ikiye ayrılmış olup hücresel metabolizmanın ürünleridir. Hem zarar verip hem de faydalı oldukları için, canlı sisteminde ikili görev aldıklarına inanılmaktadır. Hücrenin aktif tepkimeleri için gerekli olan en önemli moleküller oksijen ve nitrojenlerdir. Bu moleküller iç veya dış etmenler nedeniyle hücreye olumsuz etki gösteren serbest radikallere dönüşebilirler. Hücreye zararlı etki gösterdiklerinde oksidatif strese ve nitrözatif strese neden olmaktadır (Valko, M. vd., 2007). Serbest radikaller oldukça kararsız yapılarda olup, çevresindeki moleküllerle çabuk reaksiyona girme ve dış orbitallerindeki elektronlarını verme eğilimindedirler (Halliwell B. vd., 1992). Dış orbitallerinde ortaklaşmamış elektron bulundurması serbest radikallerin reaktivitesini fazlaca arttırdığından dolayı bu moleküllerin kimyasal aktifliği oldukça yüksektir (Valko M. vd., 2007). Oksijen molekülü yapısından dolayı radikal olmaya elverişli olduğu için serbest radikal denince reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir. Biyolojik sistemlerdeki oksijenden meydana gelen radikaller, en önemli serbest radikallerdir (Seifried H.E. vd., 2007).

Yüksek aktiviteye sahip serbest radikaller başka moleküllerle reaksiyona girdiklerinde o moleküllerin kimyasal yapısını bozarlar. Bu yüzden bu radikallere, oksidan moleküller ya da reaktif oksijen türleri denilmektedir (Gözükara, 2011). Fakat bu radikal ve reaktiflerin canlıda yüksek oranda oluşması oksidatif stres kaynaklı doku hasarına, hücre ölümüne, kanser, kalp damar hastalıkları ve nörolojik bozukluklara sebep olmaktadır (Gürdöl&Adenoğlu, 2010).

2.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller hücre içi veya hücre dışı nedenlere bağlı olarak üretilirler. Reaktif oksijen radikallerinin en önemli hücre içi kaynakları;

- Sitokrom P-450, endoplazmik retikulum, mikrozomlar, peroksisomlar ve enflamatuvar hücre aktivitesi potansiyel kaynaklarıdır. Vücuttaki süperoksit molekülünün başlıca kaynağı mitokondridir. Bir mikrogram proteine dakikada 2–3 nmol oksijen üretebilir, birde hidrojen peroksitte (H_2O_2) üretebilir.
- NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve diğer oksidan enzimler, reaktif oksijen radikallerinin kaynaklarıdır. Ksantin oksidaz, hipoksantini ksantine ve ksantini de ürik aside katalizler. Bu reaksiyonun ilk aşamasında oksijen ve ikinci aşamasında hidrojen peroksit oluşur.
- Makrofajların görevi, nötrofil ve eozinofiller içerisinde serbest radikal üretmektir. Makrofajların aktivasyonu ile nitrik oksit, oksijen ve hidrojen peroksid’inde içinde olduğu çeşitli radikaller meydana gelir. Hidrojen peroksit’in % 80’inde mikrozomlar görev alır.
- Araşidonik asitin metabolize olduğu sırada oksijen radikali oluşur.
- Moleküllerin başlatmış oldukları hepatotoksik olaylar esnasında kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile salıverilen sitokinler radikaller oluşturur (Valko, M. vd., 2006).

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel hücre dışı kaynakları;

- Metal iyonları: Demir, nikel, krom, bakır, civa ve kadmiyum.
- İlaçlar: Bleomisin, doksorubisin, aminotriazol, oksijen, klonazin, asetaminofen, hiperbarik klosapin, nitrofurantoin, trisiklik antidepresanlar, siprofloksasin, siklosporin, troglitazon ve barbitüratlar.
- Radyasyon: Ultraviyole ışık, x-ray
- Kirleticiler: Ozon, karbon monoksit, hipoklorit, yangın, plumbagin.
- Son olarak beslenme şeklide ekzojen bir kaynak olarak bilinmektedir (Abdollahi, M. vd., 2004).

Çok sık olmamakla birlikte, oksijenin kısmen redüksiyonu ile de serbest radikallerin ortaya çıktığı görülmüştür (Thomas M.J., 1995). Bunların yanı sıra hücrelerde kimyasallara maruz kalma, sigara dumanı, iyonize edici radyasyon, yoğun egzersiz, ısı, hipoksi ve intoksikasyon gibi etkilere hücre içerisinde radikallerin sayısını artırabilmektedir (Aslan, 1995; Wickens A.P., 2001). Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin birçoğu oksijeni kaynak almaktadır. Hasta ya da yaşlanmış hücreler çok fazla serbest radikal üretmektedir. Reaktif oksijen türlerinin bir diğer oluşum kaynakları arasında bazı enzimatik reaksiyonlar ve oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik kaynaklar, radyasyon, UV ışınları, sigara, beslenme ve kanserojen maddelerde yer almaktadır (Aksoy, 2002). Antineoplastik ajanlar, çevresel ajanlar, bazı küçük moleküllerdeki otooksidasyon, enzimler ve proteinler, peroksizomlar, plazma membranı ve oksidatif stres neden olan bazı durumlar serbest radikal kaynakları olarak bilinmektedir (Karabulut, 2016).

2.3.3. Serbest Radikallerin Türleri

Serbest radikaller nitrojen veya oksijen kaynaklıdır. Nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) ve oksijen kaynaklı olanlarda reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (Valko, M. vd., 2007). Reaktif oksijen türleri; süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-), lipid peroksil (LOO^-) ve alkoksil (RO^-) serbest radikalleridir. Reaktif nitrojen türlerinde ise nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2) sayılabilir (Valko, M. vd., 2007; Pham-Huy L.A. vd., 2008).

2.3.4. Serbest Radikallerin Makro Moleküller Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin üretimlerinin artması sonucunda aşırı oluşan oksidatif stres başta hücre zarı fosfolipitleri ve hücrel bileşiklerin tamamına (DNA, karbonhidrat, lipid ve protein) zarar vermekte, hücre membranlarının depolarize olması sonucu hücre membranının permeabilitesi ve elektrik yük dengesi düzensizleşmektedir (Kavas 1989; Sinclair A. vd., 1990). Bazı fiziksel şartlarda oluşan reaktif oksijen türleri; fagositozdaki savunma mekanizmaları, nötrofil fonksiyonları gibi bazı olaylara müdahalede bulunur (Johansen JS. vd., 2005).

Serbest radikaller hücre ve dokularda bazı hasarlar oluşmasına neden olabilmektedir.

Bunlardan bazılarına örnek verecek olursak:

- ✓ Nükleotitlerin yapılarında yer alan koenzimlerin yıkılmasına,
- ✓ DNA yapısının bozulmasına,
- ✓ Enzim aktivitesinde ve lipid metabolizmasında ki değişikliklere,
- ✓ Hücre zar yapısı ve fonksiyonlarının değişmesine,
- ✓ Hücre zarı proteinlerinin hasarı ve lipid peroksidasyonu,
- ✓ Protein ve lipidlerle birlikte kovalent bağ kurarak yapının bozulmaları,
- ✓ Steroid ve yağ pigmentlerinin birikiminde ve proteinlerin zarar görmesine,
- ✓ Tiollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına,
- ✓ Kollajen ve elastin gibi proteinlerin redoks olaylarının bozulmasına,
- ✓ Mukopolisakkaritlerin yıkımına, neden olabilmektedir (Uysal, 1998).

2.3.5. Serbest Radikallerle Oluşturulan Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin meydana getirdikleri oksidatif stres ile oluşan bozuklukların başında hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonu gelmektedir. Serbest radikallerin sebep olduğu ve membran yapısında doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelen bu kimyasal olaya lipid peroksidasyonu adı verilmektedir (Kalender S vd., 2004).

Biyolojik canlılar içerisinde reaktif etki gösteren oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en hassas yapılar lipidlerdir. Hücre zarında lipid peroksidasyonu meydana geldiğinde, doymamış yağ asitlerinde hasar meydana gelmesi sonucu hücre membran akışkanlığında azalma görülür. Lipid peroksidasyonu esnasında biyolojik yapıda görülen ve oksidatif hasarın belirleyicisi olan malondialdehit (MDA) oluşur (De Zwart LL., 1999).

Malondialdehid (MDA), en önemli lipid peroksidasyonu ürünüdür. Üç veya daha fazla kovalent bağ bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşur. Meydana gelen Malondialdehid, hücre zarından iyon alış-verişini etki altına alarak zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olur böylece enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara sebep olur. Bu özelliğinden dolayı

MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile tepkime verebilir ve mutajenik hücre kültürlerinde karsinojenik ve genotoksiktir (Valko M. vd., 2007).

Biyolojik sistemler içerisinde bu radikalın hidroksil radikali ve superoksit anyonu olduğu kabul edilir. Bunun yanı sıra, hidroksil radikali (OH[•])'nin lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikal olduğu bilinmektedir. Hidroksil radikali superoksit radikali ya da H₂O₂'den demirin katalitik etkisi nedeniyle oluşabilmektedir. Serbest radikal oluşumunun artmasıyla birlikte, oksidatif stres tetiklenir. Kısacası, biyolojik sistemlerde antioksidanlarla prooksidanlar arasındaki oluşan dengenin, prooksidanlar tarafına bozulmasına oksidatif stres adı verilir (Berk vd., 2008). Hücreler düşük oksidatif stres altındayken kendi başlarına tolerasyon gösterebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktif hale getirirler. Fakat, hücre içinde ki antioksidan savunma sistemlerinin yeterli gelmediği zamanlarda, reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki düzen bozulur bu yüzden de protein, karbohidrat, lipit ve DNA gibi oksidatif hasara karşı duyarlı olan hücresel makromoleküller zarar görebilir (Zadák vd., 2009; Wildburger, 2009).

Serbest radikal üretimindeki artış ve antioksidan savunmasının düşmesi sonucu oluşan oksidatif stresin biyobelirteci olarak, antioksidan miktarlarındaki azalma ya da onların metabolitlerindeki artmaların değerlendirilerek antioksidan tüketiminin araştırılması ile tespit edilebilir (Blumberg, 2004). Moleküllerden elektron alma yeteneklerine sahip olan oksidanlar, hedef moleküllerin yapı ve fonksiyonlarını değişime uğratarak hücre membranına, RNA, DNA gibi genetik materyale zarar vererek hücre hasarlarına yol açmaktadır. Bu oksidanlar biyolojik sistemlerde mitokondriyal, sitoplazmik ve ekstrasellüler formlara sahip olan SOD, GPx ve CAT gibi antioksidan savunma sistemleri ile transferrin, seruloplazmin, GSH ve alfa-tokoferol gibi antioksidanlar aracılığıyla yıkıma uğrarlar (Valko vd., 2007).

Serbest oksijen radikalleri içerisinde; nitrik oksit (NO[•]) ve süperoksit (O²⁻) gibi değişik kimyasal yapıdaki radikallere sahiptirler. Biyolojik sistemlerdeki en mühim serbest oksijen radikali, oksijenden meydana gelen radikallerdir. Oksidatif stresin sonrasında oluşan serbest oksijen radikalleri; protein ve lipit hasarına neden olur. Serbest oksijen radikalleri ile oksitlenen yağ asitleri, lipit hidro peroksitleri ve lipit peroksi radikalleri şeklini alır. Lipit peroksi radikalleri ise malondialdehit (MDA)'e

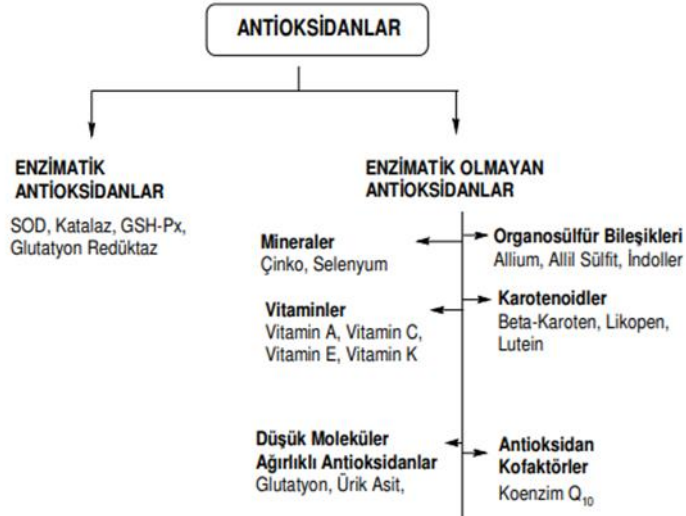
dönüşür. Serbest oksijen radikalleri endojen veya ekzojen olarak iki şekilde oluşabilir. Endojen serbest oksijen radikalleri düzenli hücre metabolizması ve oksidatif fosforilasyondan sonra oluşur. Bazı kimyasallar, hormonlar ve ilaçlar ekzojen serbest oksijen radikallerini meydana getirir. Lipit serbest radikalleri hücre membranından kolay şekilde geçerek, hücredeki dengeyi bozabilir (Knight, 1995).

Makro moleküllere zarar veren serbest radikallerin, oluşum hızının ve etkisizleştirilme hızının dengede tutulması oldukça önemlidir. Yapılan bazı çalışmalara göre antioksidan içeren bitkilerle beslenerek, serbest radikallere karşı, bitkilerdeki kompleks bileşiklerin vücuda alınmasının oksidatif hasarın bıraktığı metabolik zararın azaldığı görülmüştür. Bundan dolayı antioksidan savunma sistemleri etki mekanizmalarının öğrenilmesi ve kullanımı, oksidatif stresin neden olduğu hasarların giderilmesine ve halk sağlığı açısından büyük bir öneme sahiptir (Saraç, 2010).

Hücre zarında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün hidrojenle doyurulmamış bağları ile metabolizmada oluşan serbest radikallerin reaksiyon vermesi ile lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Yağ asidi zincirinin bir lipid radikali özelliğini kazanması ile lipid peroksidasyonu başlar. Sonrasında lipid radikali, oksijenle reaksiyona girer ve sonunda lipid peroksit radikalleri meydana gelir. Daha sonra oluşan bu lipid peroksit radikalleri hücre zarının yapısında bulunan diğer yağ asitleri ile tepkime vererek farklı lipid radikalleri oluşturur ayrıca bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan hidrojen, lipid peroksit radikalleri ile bağlanır ve lipidperoksitleri oluşturur. Bu gibi devam eden zincirleme tepkimeler meydana gelir (Ayala A., 2014). Lipid peroksitlerin yıkımıyla birlikte açığa çıkan malondialdehit, acrolein ve 4-hidroksinonenal gibi ürünler biyolojik açıdan bakıldığında aktiflerdir. Bu ürünler hücre içerisinde metabolize edilmediğinde, oluşan zarar hücrenin diğer bölümlerine de yayılır (Betteridge DJ., 2000). Çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonu sonucu en çok oluşan yıkım ürünü malondialdehit (MDA)'dır. Aynı zamanda MDA yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir göstergesidir ve lipid peroksidasyon derecesiyle korelasyon gösterir. 1960'lardan bu yana yapılan çalışmalarda, oksidatif stres seviyesini değerlendirmek için birçok yöntemle MDA düzeyi tespiti yapılmaktadır (Frankel E.N.&Neff W.E., 1983).

2.4. Antioksidan Sistemi

Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin düzensiz bir şekilde artmasıyla oksidatif stres meydana gelir. Biyolojik sistemlerin bu oksidatif hasardan kendilerini korumaları için bazı savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu da ROS kontrolünü sağlayabilmek için oluşturulan antioksidan savunma sistemidir. Antioksidanlar, oksidasyon hızını azaltmak veya durdurmak için vardır (Kohen&Nyska, 2002). Antioksidanlar kendi elektronlarını ROS'a vererek ROS'un verdiği zararı azaltabilirler. Bir antioksidanın durdurma, önleme ve onarma olmak üzere üç ayrı çalışma prensibi vardır. Durdurma işlevinde katalitik veya katalitik olmayan enzimleri kullanarak reaktif türleri temizler, önleme işlevinde, reaktif türlerin oluşumunu en aşağı düzeyde tutabilir. Onarma işlevinde ise glutatyon gibi bazı maddelerle zarar görmüş moleküllerin onarılmasına yardımcı olur (Kohen&Nyska, 2002).



Çizelge 3. Antioksidanların sınıflandırılması (Özkaya, 2007)

- **Enzimatik Antioksidanlar:** En önemli enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimleridir. Bu enzimler oksidatif zarara karşı başarılı bir koruma sağlamaktadırlar (Christofidou S.M. & Muzykantov V.R., 2006). CAT ve GSH-Px gibi bazı enzimler, reaktif hidroksil türlerinin zararlarına karşı sınırlı bir koruma sağlarlar (Erenel vd., 1992).

- **Nonenzimatik Antioksidanlar:** Nonenzimatik antioksidanlar arasında en önemlileri, glutatyon (GSH), askorbik asit, α -tokoferol ve β karoten olmak üzere iç ve dış kaynaklı antioksidanlardır (Ferreira vd., 2005). Bunların dışında ki diğer antioksidanlar; seruloplazmin, melatonin, laktoferrin, transferin, hemoglobin ve miyoglobindir (Akkuş, 1995). Enzimatik olmayan antioksidanlar kaynaklarına göre kendi içinde iki ayrı gruptan oluşur. Bunlar besin kaynaklı antioksidanlar ve metabolizma kaynaklı antioksidanlardır. Besin kaynaklı antioksidanlar vücutta üretimi yapılamayan gruplar olarak bilinmektedir bundan dolayı ekzojen antioksidanlardır. Besin kaynaklı antioksidanlar, gıdalarla veya ek besin takviyeleri ile vücuda alınmalıdır. Bunlara; C vitamini, E vitamini, omega-6 ve omega-3 yağ asitleri örnek verilebilir. Metabolizma kaynaklı antioksidanlar ise metabolizma tarafından üretildikleri için endojen antioksidanlardır. Bu gruptaki antioksidanlara, melatonin, glutatyon ve bilirubin örnek verilebilir (Willcox&Ash, 2004; Pham-Huy vd., 2008).

Antioksidanlar, oksidanları zararsız hale getirebilmek için dört ayrı mekanizma kullanabilirler;

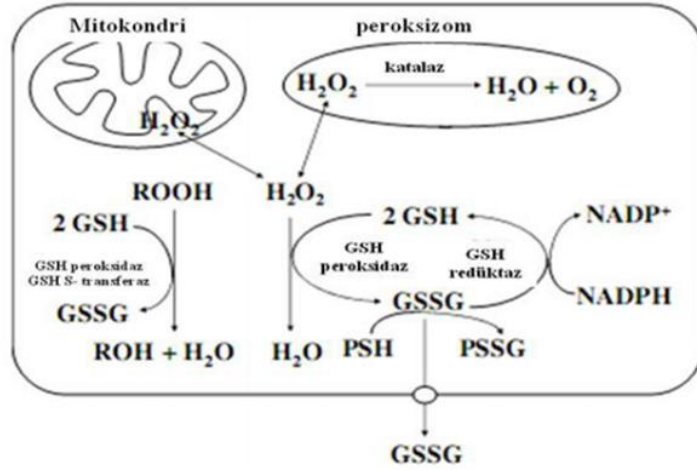
1. Temizleme etki mekanizması: Enzimler tarafından oksidanları güçsüz bir molekül haline getirmek şeklinde ifade edilebilir.
2. Baskılama etki mekanizması: Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlara bir molekül hidrojen aktararak etkisiz duruma getirme şeklinde ifade edilebilir.
3. Onarıcı etki mekanizması: Oksidatif zarara uğrayan biyomoleküller onarılmaktadır.
4. Zincir koparma etki mekanizması: E vitamini, hemoglobin ve seruloplazmin tarafından oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller haline getirme şeklinde ifade edilebilir (Sözmen 2002; Cherubini vd., 2005).

2.4.1. Redükte Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH), yapısında γ -glutamin-sistein-glisin' den oluşan bir tripeptid olup, çoğu hücrede sentezlenebilmektedir. GSH, endojen olarak çok fazla bulunan ve

protein olmayan tiyol şeklinde bir yapıya sahiptir. Hücre büyümesi ve protein fonksiyonlarının düzenlenmesi, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonu ve bağışıklık fonksiyonlarının onarımı gibi birçok işleve sahiptir. Ksenobiyotikler ve ROT'un detoksifikasyonunda yer alan reaksiyonları katalizleyen peroksidaz ve glutatyon transferaz enzimleri için GSH bir substrat görevi yapar. Ayrıca oksijen radikalının patolojisinde, karşı savunma için kilit öneme sahiptir (Parcell, 2002). GSH, serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücrelerin oksidatif zarara uğramasına engel olur. Beyin, göz, böbrekler, eritrositler ve kaslarda yer alır. GSH, özellikle karaciğer ve göz doku hücrelerinde yüksek miktarda bulunur (Çulhaoğlu, 2009). Glutatyonun, indirgenmiş ve yükseltgenmiş olarak 2 ayrı yapı şekli bulunmaktadır. Aerobik şartlara bağlı olarak normal büyüme ve metabolizmasına bağlı olarak oluşan ve selenyum atomu içeren GSH-Px tarafından katilize edilerek toksik peroksitler ayrılırken eritrositlerdeki glutatyon okside formuna (GSSG) dönüşür. Böylece hücreyi serbest radikallerin hasar bırakmasına engel olur. Hücrede farklı sebeplere bağlı olarak oluşan serbest radikaller arttığında GSSG konsantrasyonu artarken, GSH konsantrasyonu azalmaktadır. GSH konsantrasyonunun azalması, GSSG konsantrasyonu artması hücrelerde çeşitli hastalıkların öncüsü olabilmektedir (Çulhaoğlu, 2009).

GSH (γ -glutamil sisteinil glisin)'in, en fazla karaciğerde bulunmasında rağmen tüm hücrelerde yer almaktadır. Glutatyon sentezi, sitozol içerisinde sırasıyla γ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetazın katalizlediği tepkimelerle gerçekleşir. Glutatyon sentezinin hızını sınırlayan basamağı, γ -glutamilsistein sentetazın katalizlediği reaksiyondur (Lu, 2009).



Şekil 2. GSH'ın antioksidan işlevi (Lu, 2009).

2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, yüksek oranda etkin bir in vivo enzimatik antioksidan grubunda yer alır. Süperoksit radikallerinin, toksik etkisi daha az olan hidrojen peroksit'e dönüşmesinde katalizör görevi yapmaktadır. Bu enzim, süperoksit ve ROS radikallerine karşı savunma mekanizmasında yer alan en önemli antioksidandır. Ayrıca, lipid peroksidasyonunun inhibe olmasına sağlamaktadır. Süperoksit dismutaz, oksijen radikaline karşı koruyuculuğu olan en önemli enzimdir. Süperoksit dismutaz enzim grubu, fazla oksijeni detoksifiye etmek için kullanılan kofaktörlerine göre isim alır.

Oksijeni, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren tepkime şu şekilde yazılır:



Bu reaksiyon ortamda SOD varsa kendiliğinden oluşan tepkimeye göre daha yüksek hızda gerçekleşmektedir (Kayış, 2015).

Metal içeriğinden dolayı metalloenzim olarak da adlandırılır. Cu/Zn-SOD dimerik yapıya sahip olup ve sitozol içerisinde yer alır, iki alt bölümüne Zn ve Cu bağlanır. Mn-SOD ise, ilk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından keşfedilmiştir. Çoğunlukla mitokondride yer alır ve tetramerik yapıya sahiptir. Hücre

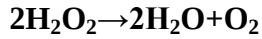
dışı SOD, düz kas hücrelerinde üretilerek, hücre dışına salgılanır (Bergendi vd., 1999; Culotta vd., 2006).

SR reaksiyonları, süperoksit anyonunun üretilmesiyle birlikte tetiklenmekteyken, SOD ise hücresel bölümlerdeki oksijen düzeylerini kontrol altına almaktadır. Bu enzimlerin aktif kompartımanlarında yer alan aminoasitlerin çeşitli olması, kofaktör ve bazı özelliklerine göre farklı izoformların oluşmasına neden olmaktadır (Landis&Tower, 2005).

Bu enzim süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesini sağlar. Metabolizmada, serbest radikali substrat olarak kullanan tek enzim süperoksit dismutaz enzimidir (Yin vd., 2015).

2.4.3. Katalaz (CAT)

Bitki, hayvan ve aerobik bakteriler içerisinde bulunan katalaz enzimi, hücrelerde en fazla peroksizomlarda bulunur (Ighodaro OM.&Akinloye OA., 2018). Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene yıkılmasında katalizör görevi görür. Reaksiyon şu şekilde ifade edilebilir (Cherubini vd., 2005).



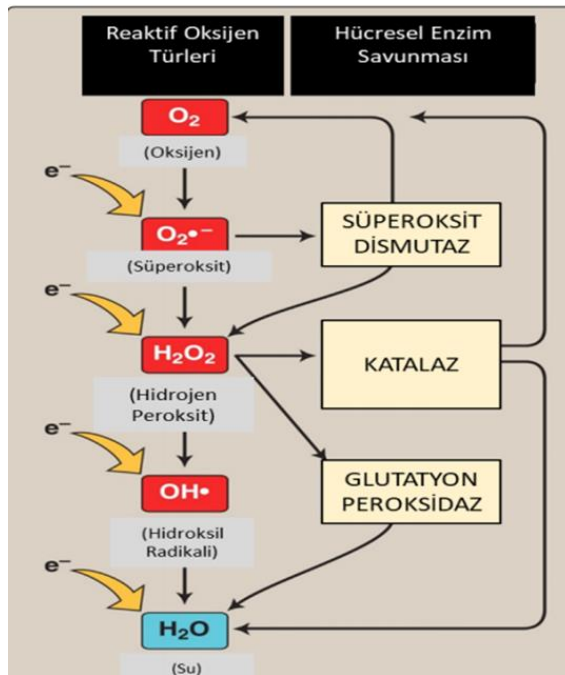
Katalaz, tetramerik bir yapısı olan hemoproteindir. Yapı içerisinde prostetik grup olarak Fe+3 bulunduran bir Protoporfirin yer almaktadır (Gürdöl&Adenoğlu, 2010). Katalaz enzimi en fazla peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitozolde de yer almaktadır (Gözükara, 2011).

Katalaz, bütün enzimler içerisinde ki, en iyi reaksiyon hızına (ürüne dönüşebilen substrat oranı) sahip enzim olarak bilinir. Katalaz, karaciğer ve eritrositlerde yüksek oranda aktiviteye sahiptir (Valko vd., 2007). Bunların dışında böbrek, miyokard ve çizgili kaslarda da katalaz aktivitesi yüksek olup, bağ doku ise enzim aktivitesinin en düşük olduğu kısımdır (Gözükara, 2011).

Doğada bu kadar fazla bulunan katalaz, ilk kez 1901 yılında O. Leew tarafından keşfedilmiştir. Yine ilk kez 1937 yılında Dounce ve Summer tarafından karaciğer dokularından kristal bir formda izole edilebilmiştir. Peroksizomlar

haricinde, mitokondri ve lizozomlarda da bulunmaktadır. Kandaki katalaz aktivitesini büyük oranda eritrositler sağladığından, insan eritrositleri katalaz yönünden oldukça zengindir (Murray vd., 1998). Mitokondri içerisinde oksijenin suya indirgenmesi esnasında, sitotoksik bir yapıda bulunan süperoksit ve hidrojen peroksit meydana gelmektedir. Süperoksit radikallerinin sayısının artması mitokondriye oldukça fazla hasar vermektedir. ROS'ların sebep olduğu hücrel zarara karşı hücre içerisinde yer alan antioksidan savunma sistemleri koruma sağlamaktadır. Mitokondride çoğalan bu süperoksit radikallerine karşı savunmada bulunan ilk enzimler GSH-Px ve SOD enzimleridir. Hücreye hasar veren radikallerin büyük çoğunluğu bu enzimler tarafından bertaraf edilse de bir kısım hidrojen peroksit mitokondriden ayrılıp sitoplazmaya geçebilmektedir. Bu aşamada sitozol içerisine geçen H_2O_2 'in detoksifikasyonu katalaz enzimi tarafından sağlanmaktadır (Aslankoç vd., 2019; Karabulut H.&Gülay M.Ş., 2016).

Katalaz, kan, kemik iliği ve mukoz membranlarda da bulunmaktadır. Katalazın indirgeyici olan bu etkisi metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküller üzerinde de etkilidir. Fenton reaksiyonu ile bir radikal olmamasına rağmen hidrojen peroksit, bakır ve demir iyonlarının katalizörlüğünde hidroksil radikali verebildiğinden oldukça zararlıdır (Kayış, 2015).



Şekil 3. Antioksidan Enzimlerin Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkisi (Robin R., 2015)

2.4.4. Aminotransferazlar (AST ve ALT)

Aminotransferazlar; özellikle karaciğer üzerindeki zararı ve karaciğer hücre grupları içerisinde oluşan nekrozu ölçebilmek için en sık kullanılan enzimlerdir (Lenaerts A.J. vd., 2005; McKenna M.C. vd., 2006). Her iki aminotransferazda piridoksal fosfatı koenzim olarak kullanır. Bu koenzim, enzim proteininde yer alan lizin kalıntılarını bağlar ve amino asitler ile Schiff temelli geçici bir reaksiyon oluşturur böylece amino grubunu alarak bir α -ketoaside taşır (Friedman S. vd., 2003).

Aspartat transaminaz (AST), SGOT (serum-glutamat-oxaloasetat-transaminaz) olarak da bilinmektedir (Champe vd., 2007). Karaciğer, kalp, iskelet kası ve böbreklerde oldukça fazla aminoasit bulunmaktadır. Bu hücreler kısa süreli zarara uğradığında, bu hücrelerden enzimin salınması sonucu serum değerleri yükselmektedir. AST'nin yüzde sekseni hücrenin mitokondrisinde, yüzde yirmisi ise sitozolde yer alır. Serumdaki normal düzey seviyesi 5-12 ünite/100 m'dir (Dilek, 2003). Ancak serum AST düzeylerinin hangi organdan kaynaklandığını bulabilecek bir yöntem bilinmemektedir (Friedman S. vd., 2003).

Kalp ve iskelet kasında da çok fazla yer aldığı için miyokard enfarktüsü ve hepatik konjesyona eşlik eden kalp yetmezliği gibi durumlarda da artışı görülür. Kalp kasına bağlı hastalıklar haricinde de kas distrofisi ve kas travması gibi olgularda da AST artışı oluşur. Hafif şekilde karaciğer hücre hasarlarında, karaciğer hücre sitozolünde yoğun olarak yer alan ALT enziminin kan düzeyi, AST'ye göre daha fazla yükselir. Ağır karaciğer hücresel hasar ve nekroz durumların da ise, karaciğer hücresinin hem sitozolünde hem de mitokondrisin de yer alır (Henry, 2001).

Alanin transaminaz (ALT), SGPT (serum-glutamat-piruvat-transaminaz) olarak da bilinmektedir. Pirüvat ve glutamat oluşurken, alaninin amino grubunu α -ketoglutarata transferinde katalizörlük görevi yapar. Bu reaksiyon aynı zamanda geri dönüşümlüdür. Fakat, amino asit yıkımı esnasında, bu enzim glutamat sentezi tarafına doğru çalışır. Bundan dolayı glutamat, alaninden azot toplayıcısı olarak hareket etmiş olur (Champe ve ark., 2007). Serumda ki ALT, normal düzey seviyesi 4-13 ünite/100 ml'dir (Dilek, 2003).

ALT enzimi yalnızca hepatositlerin sitoplazmasında yer alır ve karaciğer haricinde diğer dokularda çok düşük miktarlarda bulunmasından dolayı karaciğer hasarında tespit için spesifiktir. Karaciğer nekrozunda, serumda ALT enzimi ile birlikte AST enzimi de artış göstermektedir. Fakat serum AST düzeyinde yükselme olmaksızın serum ALT düzeyinin düşük ya da orta derecede yükselmesi kronik hepatitin (özellikle hepatit C) ve karaciğer yağlanması ifade edebilir (Rosalki S.&Mcintyre N. 1999; Friedman S. vd., 2003). Serum ALT düzeyindeki artışlar, Reye Sendromu, viral hepatit, toksik hepatit ve siroz gibi karaciğer parankiması hastalıklarında; kalp yetmezliği ya da myokard enfarktüsünde ve enfeksiyöz mononükleoz durumlarında görülür (Henry, 2001)

AST ve ALT enzimleri, özellikle karaciğer de hasar meydana gelen hücrelerde, hücre zarında oluşan permeabilite artışına bağlı olarak serumdaki seviyeleri yükselir. Serumdaki AST, ALT'den daha hızlı uzaklaştırılabilir ve çoğunlukla ROS hücreleri tarafından parçalanmaktadır. Mitokondri de yer alan AST enziminin artışı, ALT enziminin artışına göre daha şiddetli bir zararın göstergesidir. Bu nedenle mitokondriyal/sitoplazmik AST oranı ya da mitokondriyal/total AST oranının bilinmesi yüksek hücre hasarı ve alkole bağlı karaciğer hastalıklarının tanısında oldukça önemli bir belirteçtir. Fakat AST'nin bu iki izoenzimini ayırabilen az sayıda laboratuvar bulunmaktadır. Aminotransferazlarda; çok az bir artış (örnek: 5 katı kadar) hepatosteatoz, kolestaz ve sirozun, orta seviyede ki bir artış (örnek: 5-10 kata kadar) akut yada viral hepatitler ve kronik hepatitlerin ağırlaşması gibi durumların, çok daha fazla artışlar ise (örnek: 10 kat ve üzeri) toksinler ve iskemik hepatit gibi nedenlerin göstergesi olabilir (Sonsuz A.).

2.4.5. Alkalen Fosfataz (ALP)

Alkalen Fosfataz (ALP) vücutta en çok dağılan izoenzimler grubudur (Kaplan M., 1972). Bu izoenzim grupları kemik, karaciğer ve plasentada çok yüksek oranda yer alır (Sonsuz A.). ALP düzeyleri, karaciğer hastalıklarını tespitite yardımcı bir takip testidir (Ramaiah, 2007).

Alkalen fosfatazlar, aktif merkezlerinde serin içeren çinko, bulunduran bir metalloenzim gruplarıdır. Alkali pH'da katalizör görevi gösterip bazı organik fosfat

esterlerini hidrolize edebilen bir enzim grubudur. Vücuttaki birçok dokuda bulunması nedeniyle, reaksiyonlar da orto-fosfatlardan, inorganik fosfatların salınımını sağlarlar. ALP'nin substratları fosfoserin, pirofosfat ve fosfoditiletanolamin içermektedir. Karaciğer dokusunda da yer alan alkale fosfataz, hepatositlerin sinüsoidal yüzeylerine ve safra kanaliküllerinin mikrovilluslarına yerleşmişlerdir (Rosalki S.&Mcintyre N., 1999).

Serumda tespit edilen alkale fosfataz izoenzimleri genellikle kemik ve karaciğerden kaynaklıdır. Barsak da bulunan alkale fosfataz, iki ayrı mRNA ile iki ayrı izoenzim şeklinde lokalizedir. Bu iki izoenzimden ilki barsak villuslarının üzerinde bulunurken, diğeri ise plazmaya salınmaktadır (Friedman vd., 2003). Serum ALP düzeyleri çocuklarda büyümenin bir belirteci olarak yükselmekle birlikte yaş ile değişebilmektedir (Morgan vd., 2008).

2.4.6. Malondialdehit (MDA)

Hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri aracılığıyla alkoller, aldehitler ve hidroksi yağ asitleri gibi bazı ürünlere yıkılmasıyla gerçekleşen reaksiyona lipit peroksidasyonu adı verilir. Serbest radikaller yapıları gereği proteinler, lipitler ve nükleik asitler ile etkileşime girerek hücrede hasar bırakırlar. Birçok patolojik olay esnasında çeşitli hücre tiplerinde oksijenin redüksiyonundan meydana gelen türlerin üretilmesiyle oksidatif stres oluşur. Bu nedenle hücre yapısındaki lipitlerde hasarlar meydana gelir (Nordberg, 2001).

Biyolojik sistemlerde lipitlerin oksidasyonu sonucu MDA meydana gelmektedir. Serbest radikaller hücre zarına hasar vererek oksidatif strese neden olurlar. Bu radikallerin hücrede içerisinde meydana getirdiği lipit oksidasyonu sonucunda MDA oluşmaktadır (Vattem, 2005). Lipit peroksidasyonu son ürünü olarak meydana gelen ve mutlak bir aldehit olan MDA, serbest radikaller ile çoklu doymamış yağ asitlerinin tepkimeye girmesi sonucun ortaya çıkan proteinler, lipitler ve nükleik asitler ile çapraz bağlanmaya sebep olmaktadır (Ray vd., 2000). İkincil ürün olan MDA, doku zincir reaksiyonlarında hız belirleyici olarak görev alır. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerin DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Lipit hidroperoksitler doğrudan DNA zincir hasarına neden olurken,

lipit peroksil ve alkoksil radikalleri baz oksidasyonuna sebep olurlar. Peroksit ve hidroperoksitlerin in vivo olarak tümör ilerlemesine katkı gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra lipit peroksidasyonunun prokarsinojenleri son karsinojene dönüştürmede dolaylı olarak rol aldığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada meme kanseri olan bir dokunun MDA düzeyleri, çevre normal dokuya göre yüksek olarak tespit edilmiş ve bu yüksekliğinde nekroz varlığında yetersiz kanlanma sonucu meydana geldiği tahmin edilmiştir (Portakal vd., 2000).

Lipid peroksit düzeylerinin ölçülmesinde MDA miktarının saptanması, genel ölçüm aracıdır (Okutan H.-Savaş C. ve Delibaş N., 2004). Ayrıca, peroksidasyon esnasında oluşmuş olan dien konjugatlarının saptanması da hücre içi lipid peroksitlerinin seviyesini göstermektedir (Halliwell&Gutteridge, 1999).

MDA seviyelerindeki yükselme oksidatif strese bağlı oluşan lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olduğundan oluşan hücre hasarının bir göstergesidir (Pascual vd., 1998). Ayrıca MDA, hücre zarlarından iyon alış-verişinde etkileşime girerek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olmakla birlikte, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçları da beraberinde getirir. MDA, mutasyonel hücre kültürleri için karsinojenik ve genotoksik etki gösterir çünkü MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilmektedir (Mercan, 2004). MDA'nın insanlarda ve memeli dokularında mutajenik etkisi (Niedernhofer L.J. ve ark., 2003), fare ve ratlarda ise karsinojenik etkisi olduğu görülmüştür (Spalding J., 1988). Üç ya da daha fazla çift bağ olan yağ asitlerinin peroksidasyonun da son ürün olarak MDA meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak MDA seviyesi artar fakat spesifik bir özellik değildir (Niki vd., 2005). Ayrıca MDA, prostoglandin biyosentezinde de meydana gelebilmektedir (Esterbauer H., 1991).

2.5. Karvakrol

Baharat ve ilaç olarak çok eski çağlardan beri kullanılan kekik kıymetli bir bitkidir. Bu isim ile anılan çok fazla bitki türü vardır. Bu bitkilerin benzer özellikleri arasında, timol ve karvakrol gibi kendine has koku veren uçucu bileşenleri içeriyor olması gelmektedir. Kekik, insanlık tarihinin en eski kullanımına sahip olan bir bitki

olup, en çok kullanılan türü *Origanum onites* L.' dir. Bu türe, 'kekik' adı verilir ve en fazla kullanılan tür olmanın yanında, yurtdışında 'oregano=kekik' adını da almıştır (Aydın S., 1996).

Kekik, aromatik bir kokusu ve lezzet verici özelliği sayesinde tüketime uygun bitki çeşitlerinden birisidir. Tedavide de ilaç yapımın da kullanılan kekiğin ülkemizde ticareti de yapılmaktadır. Halk tarafından kekiğin bir türü olan *Thymus vulgaris* L.'nin yapraklarından elde edilen sulundırılmış ekstresinin ya da bundan saflaştırılmış uçucu yağlarının tedavide kullanıldığı bilinmektedir. Solunum problemleri, farenjit, üst solunum yolu enfeksiyonları, sindirim sistemi düzensizlikleri, boşaltım sistemi bozuklukları, grip ve nezle gibi birçok sayıda hastalığa karşı kullanıldığı bilinmektedir. Kekik bitkisinin özünün veya yağlarının kırıma önleyici, antifungal ve antibakteriyel özellikleri vardır. Kekik uçucu yağının %60 ve fazlasını timol ve karvakrol oluşturmaktadır (Azaz D., 2002).

Karvakrol ise, ilk olarak kekik ve sonrasında diğer aromatik bitkilerin uçucu yağ fraksiyonlarının doğal bir bileşenidir. Karvakrol tüketimde kullanımı bakımından FDA tarafından onay alabilmiş ve Avrupa gıda konseyi tarafından bu bileşen kimyasal tatlandıcılar listesinde B kategorisinde yer almaktadır. Karvakrole; 2-p-cymenol yada isopropyl-o-cresol adları da verilir. Moleküler formülü: $C_{10}H_{14}O$ ' dur (Vincenzi De M. vd., 2004).

Karvakrol, yabani bergamot gibi bitkilerden de elde edilebilen esansiyel yağların bir bileşenidir. Bu bileşenler, antiseptik ve antioksidan etkiyi içerisinde barındırırlar ve tüketime uygun gıdalarda belli bir aromanın oluşumunu sağlar. Karvakrol'ün tüketilmesi güvenli olup, sentetik ve antioksidatif gıda katkı maddelerinin yerine doğal bir katkı maddesi olarak kullanılabilir (Burt, 2004).

Karvakrol antibakteriyel, antioksidan, analjezik, antitümoral, şark çıbanını önleyici, antispazmodik ve insektisidal etkilerinden dolayı monoterpeneoid fenollerden olup son zamanlarda tıp, yiyecek endüstrisi, kozmetik, diş hekimliği ve tarım alanlarında daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Karaman S., 2001; Bouchra C., 2003).

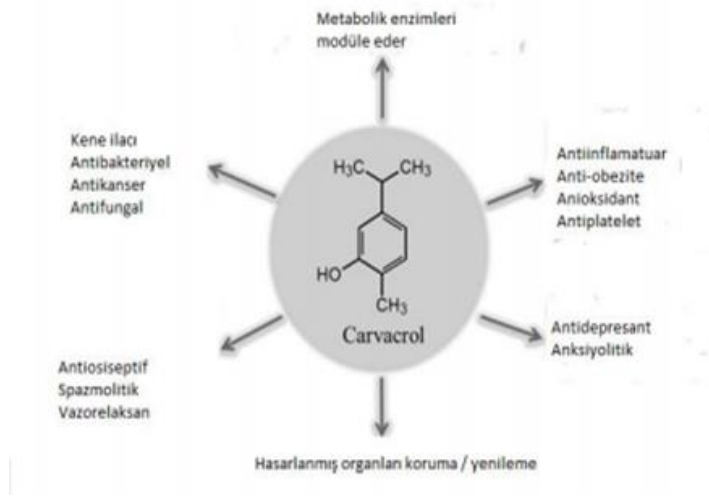
2.5.1. Karvakrol Hakkında Genel Bilgiler

KAR, Ballıbabagiller (Labiata) ailesine ait bitki türlerinin Origanum (Kekik) cinsinden elde edilen, uçucu yağlarında bulunan fenolik ve bir oksijenli monoterpendir (Gündüz, 2010).

Uluslararası Uygulamalı Kimya Birliği, Karvakrolün adlandırılmasında “5-izopropil-2-metilfenol” ismini ön görmüştür (Yadav&Kamble, 2009). Bu yararlı madde doğada, kekik olarak bilinen bazı bitkilerde bulunur. Bu bitkinin özelliği timol ve karvakrol gibi kendine özgü tat ve koku veren bileşenlere sahip olmasıdır. Kekiğin işlenmesi ile oluşan uçucu yağda karvakrol vardır ve bu bitkinin biyolojik aktivitesinde karvakrol’ün etkili olduğu bildirilmiştir. (Fadıloğlu vd., 2001; Baser vd., 2008).

KAR, şimdilerde yüksek oranda gıda ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada karvakrolün antifungal, antibakteriyel (İpek ve ark., 2003; Lee&Jin, 2008) ve antioksidan (İpek vd., 2003; Aydın vd., 2005) etkileri gözlemlenmiştir. Karvakrol, geniş spektrumda gram negatif ya da pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermektedir (Solomakos vd., 2008). Karvakrol aynı zamanda bakteriyel hücre zarına zarar veren biyosidal bileşik olduğu tahmin edilmektedir. Bu bileşik bakteriyel hücre zarlarına girerek hücre içinde ki antimikrobiyal aktiviteyi göstermektedir (Cristani vd., 2007; Cao vd., 2008). Karvakrol ayrıca antikanserojen bir bileşik olarak etki göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı gıda katkı maddesinin yanı sıra kozmetiğe kadar birçok üründe koruyucu olarak uygulama alanına sahiptir (Lee&Jin 2008).

Kekiğin uçucu yağı içerisinde karvakrol dışında timol, terpineol, p-simen, borneol, linalol cymol gibi bileşenler de yer alır (Altundağ&Aslım, 2005; Gündüz, 2010). Karvakrol’ün analjezik, antiinflamatuvar, yaraların iyileşmesinde ve hücre çoğalmasında hızlandırıcı etkisi olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (Önal vd., 2010).



Şekil 4. Karvakrolün biyolojik yararları (Suntres vd., 2015).

Kekiğin içerisinde yer alan karvakrol'ün yararlı etkilerine örnek olarak; antimutajenik, antigenotoksik, antispazmodik, angiyojenik, antiparazitik, insektisidal, antihepatoksik etkileri ayrıca gıda katkı maddesi olarak, bal arılarının üretiminde ve sindirim sisteni ağrılarını tedavi amaçlı kullanımı da verilebilir (Baser vd., 2008; Gündüz, 2010). Kekiğin, kimyasal bileşikleri ve antioksidan özellikleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, antioksidan gücünün antioksidan konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür (Gündüz, 2010).

Kekik içerisinde yer alan karvakrol ile yapılan çalışmalara bakıldığında birçok farklı aktivitesinin olduğu görülmüştür. KAR'ün antioksidan olarak değerlendirilmesinin nedeni kimyasal yapısında yer alan hidroksil (OH^-) grubudur (Kulisic vd., 2004).

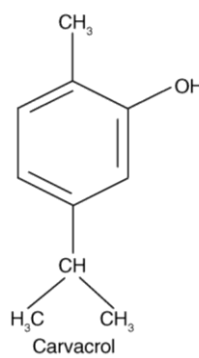
KAR'ün birçok yararlı etkisinin yanı sıra rejenerasyonu başlatıcı özelliğinin de olduğu bilinmektedir (Uyanoglu vd., 2008). Prieto ve arkadaşlarının 2007 yılında in vitro yaptıkları bir çalışma da karvakrol'ün antioksidan özelliğinin SOR'un zararlı etkilerine karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Kulisic vd., 2004). KAR'ün antioksidan özelliğinin ortaya koyan pek çok çalışma bulunmaktadır (Tepe vd., 2005). İpek ve arkadaşları, 2005 yılında KAR'ün genotoksik maddelere karşı bile insan sağlığını korumada yarar sağladığını rapor etmiştir.

2.5.2. Karvakrol'ün Kimyasal Özellikleri ve Açık Formülü

KAR (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), kekik ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında yer alan ve karakteristik kekik kokusuna sahip olan monoterpenoid bir bileşiktir (Suntres vd., 2015). KAR, sıvı bir maddedir ve oda sıcaklığında ki yoğunluğu 0,976 g/cm³'tür. KAR'ün kaynama noktası 236-238 °C ve erime sıcaklığı ise 0°C'dir. Molekül ağırlığı 150.217 g.mol⁻¹ olan karvakrolün kokusu timol ile benzerdir. KAR, su içerisinde çok az ya da hiç çözünmemektedir. KAR, yüksek derecede lipofiliktir. Etanol, aseton, dietil eter ve alkalilerde çözünebilmektedir. Doğrusal formülü (CH₃)₂CHC₆H₃(CH₃)OH'dır (Mohammedi, 2017).

Çizelge 4. Karvakrol'ün Açık Formülü ve Kimyasal Özellikleri (Azırak, 2007)

Bilinen Adları	2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol
CAS Kayıt No	499-75-2
Kapalı Formülü	C ₁₀ H ₁₄ O
Molekül Ağırlığı	150.22 g/mol
Erime Sıcaklığı	0°C
Kaynama Sıcaklığı	236-237 °C
Yoğunluğu	0.976 g/cm ³
Suda Çözünürlüğü	1.25 g/L (25°C)
Fiziksel Durumu	Sıvı
Renk	Açık sarı
Çözücüler	Etanol, dietil eter, karbon tetraklorid, aseton



Şekil 5. Karvakrolün açık kimyasal formülü (Yanishieva vd., 1999).

Labiatae ailesin de bulunan tüm bitkilerin esansiyel yağları içerisinde karvakrol yer almaktadır. Bu sınıfta bulunan bitkilere Coridothymus (acı kekik) yada Thymbra (Zahter) gibi türler örnek verilebilir (Omidi vd., 2013). Yapılan bir çalışmaya göre; *O. Onites L.* uçucu yağının kantitatif ve kalitatif kompozisyonu Çizelge-5' de gösterilmiştir (Erdemgil, 1992).

Çizelge 5. *Origanum Onites L.* yağı içerisinde yer alan temel bileşenler (Erdemgil, 1992)

1. Karvakrol	%65,91
2. Timol	%3,64
3. P-Simen	%3,24
4. Linalool	%14,48
5. Alfa-Terpinen	%0,5

KAR, birçok aromatik bitkinin ve bu aromatik bitkilerin uçucu yağ fraksiyonlarının doğal bir bileşenidir. Çizelge-6'da bu bitkilere yer verilmektedir (Vincenzi vd., 2004). Tablo-6'da gösterilen bitkiler ve bunlar içerisinde çıkarılan esansiyel yağlar, çeşitli işlenmiş yiyecek maddelerine lezzet katması için eklenir. KAR, gıdalarda kullanımı açısından FDA'dan onay alabilmiştir. Avrupa gıda konseyi karvakrolü kimyasal gıda tatlandırıcıları listesinde B kategorisine ilave etmiştir. Buna yönetmeliğe göre karvakrol; içeceklerde 2 ppm, şekerlemelerde ise 25 ppm kadar eklenebilmektedir (Vincenzi vd., 2004).

Çizelge 6. Karvakrol'ün Elde Edildiği Başlıca Aromatik Bitkiler (Vincenzi vd. 2004).

Bitkiler	Karvakrol(%)
T. capitatus	12.7-74.4
T. vulgaris	9-60
T. serpyllum	12-36.9
T. zygis	4.28-25
S. hortensis	1.2-44.0
S. montana	30-40
O. dictamnus	58.8-82.3
O. majorana	48.7

2.5.3. Karvakrol İle Yapılan DeneySEL Çalışmalar

Kekik yağının ana hammaddesi olan karvakrol ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. KAR'ın antiinflatuvar, antikanserojen, antibakteriyel, yara iyileşmesini ve hücre çoğalmasını hızlandıran etkilerini gösteren birçok çalışma vardır (Canbek vd., 2008; Uyanoğlu vd., 2008).

Son zamanlarda yapılan bazı deneysel çalışmalar ışığında karvakrolün hasar görmüş karaciğer hücrelerinin yenilenmesini hızlandırdığı görüldüğü gibi (Canbek vd., 2008; Uyanoğlu vd., 2008) akciğer kanserinde de iyileştirici gücünün olduğu tespit edilmiştir (Koparal AT.&Zeytinoglu M., 2003). Yapılan bir çalışmada karvakrolun, akciğer kanserinde oranı artan adenocarsinom'da yer alan kanserli hücrelerin sayısını azalttığı, hücrelerin morfolojisini değiştirdiği ve total protein oranının da azaltama yaşattığı görülmüştür (Koparal AT.&Zeytinoglu M., 2003).

Doğal ürünler arasında karvakrol gibi uçucu yağların kullanılması, kanıtlanmış terapötik eylem nedeniyle umut verici bir seçenektir (İpek vd., 2005). Hücre içi ve hücre dışı yapılan bazı çalışmalara göre, antioksidan, antibakteriyel, antiseptik, büyüme düzenleyici, antispazmodik, antifungal, anti-inflatuvar, antiviral, antitussif, kimyasal önleyici ve immün modölatör gibi mikrobiyal fermentasyon modifikatörü ayrıca metan emisyonunun azaltılması da olmak üzere karvakrolün farklı biyoaktiviteleri tespit edilmiştir (Luna vd., 2010; Bravo vd., 2014). Karvakrol doğal bir antioksidan olup, hücresel membranların oksidatif yıkımına neden olan lipid peroksidasyonunun azaltılmasında büyük öneme sahiptir (Yanishieva NV., 1999).

Antioksidanlar besinlerdeki lipit türevlerinin oksidasyonunu en aza indirirler. Besinlerin muhafazası için doğal veya sentetik antioksidanların kullanımına her geçen gün ilgi artmaktadır. Bunun yanı sıra bu bileşikler de antioksidan ve prooksidan özelliklerin de araştırılması önemlidir. Peroksil radikallerinin en iyi temizleyicisi thymol, karvakrol ve 6-gingerol gibi bileşiklerdir. Bu bilgiler ışığında, sentetik antioksidan gıda katkı maddelerinin yerini alacak doğal bileşik araştırmalarında dikkate değerdir (Aeschbach vd., 1994).

Baharatlar ve yararlı bitkilerden ayrıştırılan uçucu yağlardaki antimikrobiyal aktiviteden bu fenolik bileşenlerin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Yararlı bitkilerin uçucu yağlarından elde edilen karvakrol, linalool, eugenol ve thymol'e benzer purifiye bileşenler; birçok mikroorganizmayı inhibe ederler. Bagamboula ve

arkadaşlarının majör bileşenleri timol ve karvakrol olan timus uçucu yağı ile yaptıkları çalışmada karvakrol ve timolun, *S. flexneri* ve *Shigella sonnei* gibi bakteriler üzerinde inhibitör etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir (Bagamboula vd., 2004).

T. spyleus subsp. *spyleus* var. *rosulans* yağı içerisinde %94 oranında monoterpenler yer alır ve bunun %58,1'i fenolik karvakroldür. Bu monoterpen fraksiyonlar antioksidan aktivitesini sağlamaktadır (Tepe vd., 2005).

2010 yılında yapılan bir çalışmada kekik uçucu yağı olan karvakrolun metastatik meme kanserinde anti-proliferatif etkilerinin olduğu bulunmuştur (Arunasree, 2010). 2007 yılında Slamaneova D. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise karvakrol eklenen sudan içirilen ratların testis ve karaciğer hücresi DNA'ların da hidrojen peroksit'in (H_2O_2) vermiş olduğu oksidatif etkilerine, kontrol grubuna göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Slamaneova D. vd. 2007). Karvakrol alkol ve eter ile kolay biçimde çözünebilmesine karşın su ile kolay çözünemez (Tepe vd. 2004; Kuli vd., 2007). Yapılan bir diğer araştırmada ise karvakrolün genotoksik maddelere karşı halk sağlığını koruyabileceği ön görülmüştür (İpek vd., 2005). Karvakrolün, üreme sağlığı üzerine ve kronik toksititesi ile teratojenik etkilerine yönelik yeterli veri literatürde bulunmamaktadır (De Vincenzia vd., 2004).

Doğal olarak elde edilen ve antimikrobiyal bir uçucu yağ olan KAR'ün; *Bacillus cereus* tarafından sentezlenen diyerale toksinler üstündeki etkilerine bakılmıştır. Karvakrol sayesinde *B.cereus*' un maksimal spesifik büyüme hızının azaldığı tespit edilmiştir. Karvakrolün total protein miktarına etki etmediği belirlenmiştir. Fakat 0.06 mg/ml karvakrol ortamda bulunduğunda diyerale toksin sentezinde belli bir azalma (%80) görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları arasında: Gıdalara MIC (minimal inhibitör konsantrasyon) değerinin üstünde olmayan dozlarda karvakrol eklenebilir. Böylece *B. cereus* tarafından toksin üretimi riski ortadan kaldırılabilir ve gıda güvenliği daha fazla sağlanabilir (Ultee A.&Smid E.J., 2001).

Karvakrolün güçlü bir antispazmodik ve antifungal bir aktivite gösterdiği birçok

çalışmada tespit edilmiştir. Karaman ve birkaç arkadaşı tarafından yapılan bir araştırmada, Ülkemizde yetişen ve endemik bir bitki türü olan *Thymus revolutus* C' nin çiçeklenen bölgelerinden alınan uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları analiz edilmiş ve 22 farklı bileşik saptanmıştır. Bu yağda en çok görülen bileşik türü karvakroldür. Bu yağlar, 4 fungi ve 11 bakteriye karşı farklı yoğunluklarda test edilmiştir. Buna göre; karvakrolün belirgin bir şekilde antifungal ve antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür (Karaman vd., 2001; Bouchra vd., 2003).

Bitkilerin uçucu yağ asitlerinde varolan diyetel bileşiklere monoterpen adı verilir. Bunların bazıları tümöre karşı güçlü aktiviteye sahiptir. Zeytinoğlu ve arkadaşları, karvakrolü *origanum onites* L. uçucu yağından fraksiyonel distilasyon yöntemi ile elde etmiş, ONA sentezinde yer alan, N-ras transforme myoblast hücreleri C025' in, etkilerini araştırmışlardır. Bu hücreleri çeşitli dozlarda KAR ile birleştirerek; dekzamatazon içeren büyüme ortamında ve ras-aktivite edici ortamda, DNA sentezinin önüne geçtiğini kaydetmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında, KAR'ün myoblast hücrelerinin büyümesin de mutant N-ras onkojenlerinin aktivite göstermesinden sonrada inhibe edebildiğini göstermiştir. Sonuç olarak KAR'ün kanser tedavisinde uygulanabileceği ileri sürülmektedir (Zeytinoğlu vd. 2003).

M.H. Boskabady'nin bir arkadaşı ile yapmış oldukları bir çalışmada; kobay trakeasında KAR'ün çok güçlü bir relaksan etki gösterdiğini tespit etmişleridir (Boskabady H.M.&Jandaghi P., 2003).

Karvakrol bakımından zengin olan uçucu yağlar güçlü antioksidan özelliklere sahiptir (Alma MH. vd., 2003). Karvakrol antioksidan özelliğini yapısında bulunan hidroksil grupları sayesinde kazanmaktadır (Kulisic vd., 2004).

İpek ve arkadaşlarının, 2005 yılında yapmış oldukları bir çalışmada karvakrolün ana bileşenlerinden olan *Origanum onites* in yağının, antigenotoksik ve genotoksik etkilerini Microsome ve Ames Salmonella testi ile araştırmışlardır. Tespit edilen verilere göre karvakrolün yüksek miktarda antimutajenik aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da karvakrolün genotoksik maddelere karşı halk sağlığını koruyabileceği rapor edilmiştir (İpek vd., 2005).

Birçok hastalığı önlemede karvakrolün iyi bir antioksidan madde olduğu yapılan deneysel çalışmalarda tespit edilmiştir (Liang&Lu, 2012). Ayrıca bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde karvakrolün antitümör, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antihepatotoksik ve böcek öldürücü etkisinin olduğu da rapor edilmiştir (Melusova vd., 2014).

Karvakrolün başlıca antioksidan, antimikrobiyal etkisinin olmasının yanı sıra kansere karşı koruma etkisi yer almaktadır. Bu alanda birçok çalışma rapor edilmiştir. Özellikle antioksidan etkisinin ön plana çıkmasıyla, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerine etki etmesi, hayvanları beslemede kullanılması ayrıca hazır paketli gıdaların raf ömrünü uzatması gibi özellikler ortaya konmuştur (Sharifi-Rad vd., 2018).

Karvakrolün vücuttan uzaklaştırılması ile ilgili çalışmalar çok eski zamanlara dayanmaktadır. 1979 yılında Opdyke'nin yaptığı bir çalışmada, tavşanlara oral yolla 1,5 g Karvakrol verilmiş ve barsaklardan karvakrol emiliminin yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Uygulanan karvakrolün, ortalama %30'unun gastrointestinal yolda yer aldığı görülmüştür. Bunun yanında, uygulamanın 22 saat sonrasında verilen Karvakrol miktarının %25'inin idrarla atıma uğradığı tespit edilmiştir (Opdyke, 1979). Ayrıca başka bir çalışmada, ratlara 500 mg ve tavşanlara 1500 ve 5000 mg susam yağında yer alan karvakrolün oral yolla verilmesiyle, hayvanların kan, dışkı, idrar ve dokusunda karvakrole rastlanmıştır. Bu durum, uygulamanın 2-24 saat sonrasında gözlenmiştir (Schroder&Vollmer, 1932).

Karvakrol, yemlerde katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Kanatlı hayvanların beslenmesinde, aflatoksin kontrolünü sağlamak için karvakrol verilmiş ve bunun sonucunda besi kültüründe aflatoksin üremesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Yin vd., 2015).

İnsan beslenmesinde karvakrolün kullanımı, Federal İlaç Dairesi tarafından uygun ve güvenli bulunmuştur. Avrupa Gıda Konseyi tarafından da kullanılabilir kimyasallar listesine girmiştir. Bu gıdalar arasında, alkollü ve alkolsüz içecekler, sakız ve dondurulmuş süt ürünleri gibi gıdalar da yer almaktadır (De Vincenzi vd., 2004).

Ozturk ve arkadaşlarının, ratlar üzerinde 2018 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, her grupta 10 rat olacak şekilde 3 grup kurulmuş ve toplam 30 rat deneyde kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre, ratlarda meydana gelen histopatolojik ve fonksiyonel değişimlerin, karvakrol sayesinde iyi derecede tedavi edildiği rapor edilmiştir. Çalışmaya göre, kreatinin seviyelerinin yükselmesi ve serum BUN değerinin artmasına bağlı olarak bilateral iskemi reperfüzyonu nedeniyle akut böbrek hasarı gözlemlenmiştir. Bu durumun görüldüğü ratların karvakrol ile tedavi edilmesiyle; tubüler dilatasyon, akut tubüler hasar, böbreklerde nekroz ve inflamasyonda azalmalar tespit edilmiştir. Bu çalışmanın ışığında, karvakrol ile iyileştirilen ratlarda iskemi reperfüzyonuna bağlı akut böbrek hasarında azalmalar olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, kreatinin ve serum BUN, böbrek dokusu ve renal oksidatif stres parametrelerinde yapılan histolojik değerlendirmelerde pozitif değişimlerin olduğu rapor edilmiştir (Ozturk vd., 2018).

Hassan Ahmadvand ve arkadaşlarının, 2015 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, zararlı bir madde olan gentamisin verilen ratlarda, histopatolojik değişimler ve böbrek fonksiyonları üzerine Karvakrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Her grupta 8 hayvan olmak üzere toplamda 32 erkek rat bu çalışmada kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda böbrek dokusu histopatolojik olarak incelenmiş, serum kreatinin ve üre değerleri ölçülmüştür. Serum üre sonuçları incelendiğinde, tedavi edilmeyen nefrotoksik ratlarda, kontrol grubunda yer alan hayvanların değerlerinden 4 kat daha yukarıda olduğu tespit edilmiştir. Karvakrol ile tedavi gören nefrotoksik hayvanlar, tedavi görmemiş nefrotoksik grupla kıyaslandığında, serum üre değerlerinin anlamlı derecede azalmadığı bildirilmiştir. Karvakrol ile tedavisi edilen ratların değerlerinde, tedavisi edilmemiş nefrotoksik rat grubuna göre anlamlı bir azalmanın olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, karvakrolün nefrotoksik durumlardaki tedavi etkisinin kısmen olduğu düşüncesi bildirilmiştir (Ahmadvand vd., 2016).

Farelerde yapılan invivo bir çalışmada ise akciğer kanserine karşı antitümöral özellik gösterdiği bulunmuştur. Karvakrol ve karvakrolce zengin kekik yağının gıda bozulmasına neden olan gram negatif ve gram pozitif bakteriler ile mantarlar üzerine ise antimikrobik etkileri vardır. Ayrıca karvakrol; yüksek oranda uçucu yağa sahiptir

ve kekik kendine has kokusu ile bu uçucu yağın ana bileşimini oluşturur (Başer, 2001).

Ballıbabagiller (Labiatae) familyasına ait *Origanum onites*'in yağı ve ana bileşenlerinden olan karvakrol ile yapılan bir çalışmada karvakrolün önemli derecede antimutajenik aktivitesinin olduğu belirlenmiş olup ayrıca genotoksik maddeler karşısında halk sağlığını da korumada yararlı olacağı ifade edilmiştir (İpek vd. 2005). Bir doğal antioksidan olarak karvakrol, hücrel membranın oksidatif hasarına yol açan lipid peroksidasyonunun en aza indirilmesinde rol almaktadır (Yanishlievaa vd., 1999).

Çalışmamızın amacı, ratlara oral yolla Tartrazin verilerek oksidatif stres oluşturulması, bu toksikasyonda Karvakrolün antioksidan etkisinin araştırılmasıdır.

2.5.4. Karvakrol İle Yapılan Toksikolojik Çalışmalar

Akut toksisite, karaciğer içerisinde yer alan biphenil 4-hidrolaz sentezi için ratlarda gavaj yolu ile verilen 1.5mM/kg'lık tek bir doz (%7 timol ve %93 karvakrol karışımı) hafif bir artışa neden olur. Subakut toksisite ve kronik toksisite konusunda hiçbir veri elde edilememiştir. Reprodüktifve teratojenik çalışmalar konusunda da yine hiçbir veri elde edilememiştir. Mutajenite de ise KAR'ün genotoksik potansiyeli çok düşüktür, ancak neden olduğu nükleer fragmentasyon sonucu DNA düzeylerindeki beklenen yan etkileri de göz önünde tutulmalıdır (Vincenzi vd., 2004).

Gaz kromatografik-mass yöntemleri kullanılarak sıçanlarda timol ve karvakrol metabolizması üzerine çalışılmıştır. Bu metabolitlerin üriner ekskresyonu oldukça hızlıdır ve küçük bir kısmı ancak 24 saat sonra ekstre edilebilmiştir. KAR ve özellikle de timol yüksek oranda değişime uğramadan ekstre edilirken (yada sülfat ve glukoronid konjugatları olarak) izopropil ve metil gruplarında geniş bir oksidasyon oluşmuştur. Bununla birlikte, 2-fenil propanol ve benzil alkol ve bunların yanı sıra karboksilik asit derivelerinin oluşmasına neden olmuştur (Austgulen vd., 1987).

Eskişehir Anadolu Üniversitesi bünyesindeki Farmakoloji Anabilimdalı öğrencilerinin yapmış oldukları bir çalışma ile karvakrolün birçok hususdaki önemi

öne çıkarılmış, daha sonra Eskişehir Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezinin yapmış oldukları çalışmalarla karvakrolün, antialerjik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Aydın vd., 1997).

2.5.5. Karvakrol'ün Antioksidan Etkisi

Bitkisel kökene sahip doğal ürünlerin birçoğu, antioksidan ve antitümör aktiviteye sahip olup bu farmakolojik özellikleri nedeniyle uzun yıllardır ilgiyi üzerlerinde toplamaktadır (Takeoka&Dao, 2003). Serbest radikallerin önüne geçme, singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma ve metal iyonlarla bileşik oluşturma gibi özellikler fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinden kaynaklanmaktadır (Rice-Avans vd., 1995). Bu fenolik bileşikler aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesini sağlamaktadır (Skerget vd., 2005). Bazı etmenlere sayesinde farklılık gösteren bu hoş kokulu bitkilerin kimyasal bileşimine göre, antioksidan etkileri de farklılık gösterebilmektedir (Akgül&Ayar, 1993).

Ülkemizde yetişen bu hoş kokulu bitkiler arasında kekiğin güçlü bir antioksidan etkisi olduğu tespit edilmiştir (Akgül&Ayar, 1993). Ülkemizde üstünde en çok araştırmanın yapıldığı aromatik bitkilerin başında kekik gelir. Türkiye’de ticarete kullanılan ve yaygın olarak bulunan cinsler; Thymbra L., Origanum L., Coridothymus Reichb. Fil., Thymus L.ve Satureja L.’dur (Baser, 2001). KAR’ün birçok alanda antioksidan özellikleri tespit edildiği için ve kimyasal yapısı içinde yer alan hidroksil (-OH) grupları nedeniyle antioksidan olarak ifade edilebilir (Sökmen vd., 2004).

Reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan sistem arasında organizmalar içerisinde hemostatik bir denge vardır. Antioksidan savunma sistemi aktivitesinde azalmanın veya oksidan moleküllerinin oluşum hızlarında artmanın yaşanması sonucu, antioksidan/oksidan dengenin bozulması nedeniyle oksidatif stres meydana gelmektedir (Sakaguchi&Furusawa, 2006). Yapılan diğer bir çalışmada KAR’ün, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı Ultraviyole B’nin uyarmış olduğu lipidperoksidasyonuna bile, hücreyi yüksek oranda koruyabildiği gösterilmiştir (Balakrishnan vd., 2010).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Deneysel Hayvan Materyali

Çalışmada 200-300 g ağırlığında erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanılacaktır. Bu hayvanlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilecektir. Çalışmanın deneysel aşaması yine bu merkezde yapılacaktır. Temin edilen ratlar gruplara ayrılacak ve deney sürecine alınmadan önce 7 gün süreyle ortama alışması sağlanacaktır. Ratlar deney hayvanları ünitesinde; 12 saat ışık/karanlık, 24 ± 1 °C derece sıcaklıkta ve düzenli havalandırılan ortamda kafes içerisinde bulundurulacaktır. Ratların beslenmesinde standart rat yemi ve su her gün taze olarak verilecektir. Çalışmada kullanılacak olan Karvakrol (Nafees vd., 2013; El-Sayed vd., 2015) ve Tartrazin (Erdemli vd., 2017) verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak belirlenmiştir. Günlük bakımları ve uygulamalar belirtilen süre içerisinde özenle sürdürülecektir.

3.2. Deneysel Süreç

Hayvanlar her grupta 7'şerli olacak şekilde 6 gruba ayrılacaklardır. Toplamda 42 Wistar albino erkek rat kullanılacaktır. Deneysel aşamada, Karvakrol (Nafees vd., 2013; El-Sayed vd., 2015) ve Tartrazin (Erdemli vd., 2017) için seçilen dozlar daha önceden yapılmış çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde yapılacaktır.

Grup I- (Kontrol grubu)

Grup II- (Mısır Yağı grubu)

Grup III- (500 mg/kg dozunda tartrazin)

Grup IV- (Tartrazin 500 mg/kg + Karvakrol - 12,5 mg/kg mısır yağında çözdürülerek)

Grup V- (Tartrazin 500 mg/kg + Karvakrol - 25 mg/kg mısır yağında çözdürülerek)

Grup VI- (Tartrazin 500 mg/kg + Karvakrol - 50 mg/kg mısır yağında çözdürülerek)

3.2.1. Anestezi ve Sakrifikasyon

Ratlar deney aşaması olan 21 günlük sürenin bitmesinden sonra sakrifiye öncesinde 87 mg/kg i.m. ksilazin uygulamasıyla birlikte preanesteziye alındı ve daha sonra 13 mg/kg dozunda i.m. ketamin uygulanarak total anestezi yapıldı. Total anestezi sonunda göğüs kafesi kesilerek intrakardiyal olarak EDTA'lı enjektörle 3-5 cc kan alındı. Daha sonrasında servikal dislokasyon yapılarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Kan örneklerinin plazmaları 3000 de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldıktan sonra, plazmalar 1.5 lik ependorf tüplere alınarak analizleri yapılincaya kadar -80 °C de saklandı.

Ratların sakrifiye edilmesinden sonra tüm organ ve dokulardan örnekler alındı. Dokuların birer parçası biyokimyasal ve moleküler incelemeler için -80 °C de saklanırken diğer kısımları histopatolojik takibe alındı.

Sakrifikasyon işlemi tamamlanıp, doku örnekleri alındıktan sonra kalan hayvansal atıklar, tıbbi atık ünitesi tarafından temin edilen özel ambalajlara konulmuş olup usulüne uygun yok edilmesi için tıbbi atık ünitesine teslim edildi.

3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

Disseke ratların beyin, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer, kalp dokuları toplandı ve %10 formaldehit solüsyonunda sabitlendi. Daha sonra bu dokular histolojik doku takip prosedürlerine göre analiz edildi ve parafin bloklara gömüldü. 5-6 µm kalınlığında parafin kesitleri kesildikten sonra hematoksilen-eozin boyaması yapıldı ve Nikon, Eclipse Ci, mikroskobunda analiz edildi. Histolojik doku takip metodu aşağıda özetlenmiştir.

3.2.3. Doku Takibi

Histopatolojik değerlendirmelerin yapılması için % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda böbrek, kalp, karaciğer, beyin, testis ve akciğerlerden alınan doku örnekleri incelendi. Sonrasında doku örnekleri 2-3 mm kalınlığında ve doğru ebatlarda küçültülerek doku takip kasetlerine alındı. Devamlı akan musluk suyunda bir gece yıkandıktan sonra 50, 70, 80, 96'lık ve absolüt alkol ve ksilol, ksilollü parafin daha sonrasında 58 °C'de erimiş parafinde 2'şer saat bekletildi ve yine parafinle bloklandı. Mikrotom (Leica, RM 2245) ile parafin blokları 5 mikron

kalınlığında kesilerek alınan örnekler su banyosu (Leica, HI 1210) üzerinden lamellere alındı. On dakika kadar etüvde kurutulduktan sonra histopatolojik yöntemlerde analiz verisi elde etmek için kullanıldı. Tüm kesitler 50, 70, 80 ve 96'lık alkol serileri ile ksilolden geçirilerek hematoksilin-eosin boyama yöntemi (HE) ile uygun şekilde boyandı (Luna, 1968). Boyamaları yapılan örnekler, binoküler başlıklı ışık mikroskopunda (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japan) incelendi ve gerekli olan örneklerden mikroskopik resimler çekildi (Nikon DS Fİ3, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan).

3.3. Lipid Peroksidasyon ve Aantioksiadan Parametreler;

Muhtelif doku ve kan örneklerinden; malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), süperoksid dismutaz (SOD).

3.3.1. Doku Homojenizasyonu

Eritrositlerin hazırlanması için Winterbourn ve ark. (1975) kullanıldı. Kısaca eritrositler, kan numunelerinin santrifüjlenmesi (3500 rpm, 15 dakika, 4 °C) ve ardından 3 kez izotonik tuzlu su tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanarak elde edildi. Daha sonra eritrositler eşit hacimde izotonik salin tampon solüsyonu ile Eppendorf tüplerine aktarıldı ve -20 °C'de flakonlarda saklandı. Analizden önce, eritrosit süspansiyonunun ölçüm için hazır hale getirilmesinde soğuk deiyonize su kullanıldı. Doku örneklerinin hazırlanması İnce ve ark. (2014)'na göre gerçekleştirildi. Kısaca hayvanlar sakrifiye edildi ve böbrek, karaciğer, kalp, beyin, akciğer ve testis dokuları soğuk izotonik tuzlu su tamponu kullanılarak yıkandı. Doku numuneleri, dış dokudan temizlendi ve soğutulmuş Tris-HCl tamponu (0.15 M, pH 7.4) içinde durulandı. Örneklerin homojenatları (%10, w/v) bir Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlandı. Daha sonra homojenize dokular 3500 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve ölçüme kadar -20 °C'de saklandı. MDA, GSH, SOD ve CAT dahil olmak üzere lipid peroksidasyon parametrelerinin ölçümü için eritrositler ve doku homojenatları kullanıldı.

3.3.2 Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

SOD ve CAT, hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynar (Guerin vd., 2001). Doku homojenatı ve eritrosit lizatındaki SOD aktivitesi, daha önce tarif edildiği gibi Sun vd., 1988 tarafından bildirildiği şekilde gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, bir süper oksit akışı oluşturan ve süperoksitin bir göstergesi olarak nitroblue tetrazolyumu (NBT) mavi formazon'a indirgeyen ksantin oksidaz ve ksantin arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Spektrofotometrik ölçüm 560 nm'de yapıldı ve SOD aktivitesi, eritrositte U/gHb ve dokuda g protein başına U olarak ifade edildi. CAT aktivitesinin belirlenmesi, sırasıyla Aebi (1974) ve Luck (1963) tarafından açıklanan yöntemlere göre doku homojenatı ve eritrosit lizatında yapıldı. Bu yöntemler, H₂O₂'nin katalaz yoluyla su ve oksijene ayrışması yoluyla çalışır. H₂O₂, ultraviyole spektrumda 240 nm'de maksimum absorpsiyon sağlar. İndirgeme hızı, oda sıcaklığında 45 saniye boyunca 240 nm'de ölçüldü ve eritrositte k/gHb ve dokuda k/μg protein (k; nmol/dk) olarak ifade edildi. Dokulardaki protein ve eritrositlerdeki hemoglobin içeriği sırasıyla Lowry ve diğerleri (1951) ve Drabkin ve Austin (1935).göre spektrofotometrik olarak belirlendi.

3.3.3. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini

Malondialdehit (MDA) seviyesi, lipid peroksidasyonunun (LPO) güvenilir bir biyolojik belirteci olarak kullanıldı. MDA, tam kan numuneleri ve doku homojenatları için Draper ve Hardley (1990) ve Ohkawa ve arkadaşlarına (1979), göre belirlendi. Bu yöntemler, tiyobarbitürik asit ve MDA reaksiyonunun elde edilen rengini trofotometrik olarak ölçer. MDA konsantrasyonu, tiyobarbitürik asit-MDA kompleksinin (kanda nmol/ml ve dokuda nmol/g) absorbans katsayısı ile belirlendi ve bir çift ışıklı UV-Görünür spektrofotometre (Shimadzu 1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak 532 nm'de belirlendi.

3.3.4. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

GSH, reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan bir savunma sisteminin ana bileşenidir ve tüketimi oksidatif stres tarafından indüklenebilir (Guerin vd.,

2001). Kan ve doku numunelerindeki GSH konsantrasyonu, daha önce Beutler vd., (1963) tarafından tarif edildiği gibi belirlendi. Kısaca, numune (0,2 ml) ve damıtılmış su (1,8 ml) birlikte karıştırılır, ardından numuneye 3 ml çöktürme solüsyonu (1,67 g HPO₃, 30 g NaCl, 0,2 g EDTA, 100 ml distile suda) eklendi. Bu karışım, yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra süzüldü (Whatman No. 42). Daha sonra süzöntü (2 ml) başka bir tüpte 0.3 M Na₂HPO₄ (8 ml) ve 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (1 ml) ile karıştırıldı. Optik yoğunluğun spektrofotometrik olarak belirlenmesi 412 nm'de (Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometre, Tokyo, Japonya) gerçekleştirildi. Sonuçlar nmol/ml kan ve nmol/g ıslak doku olarak ifade edildi.

3.4. Moleküler Analizler

Alınan örneklerde doku hasarı ile ilişkili olan yangısal genlerin (IFN- γ , TNF- α ve NFkB) ekspresyon düzeylerine bakıldı.

RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Elde si; Uygulama sonrasında ratlardan alınan karaciğer ve böbrek doku örnekleri RNAlat er Solusyonuna (Thermo Fisher Scientific, USA) alındı ve daha sonra da -80°C'de u uygulama yapılana kadar saklandı.

RNA izolasyonu için -80°C'den çıkartılan dokular kullanıldı. GeneJet RNA Pur ifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Ratların böbrek ve karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı MultiskanTM FC Mikroplate Fotometre (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek, gruplara ve dokulara göre izole edilen R NA miktarları cDNA eldesinde toplamda 1 μ g RNA olacak şekilde hesaplanarak kull anıldı.

Elde edilen RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak için 1 μ g kalıp RNA, 1 μ l 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 μ l RNaz içermeyen DNaz I (Thermo Fisher Scientific, USA) eklenip ve DEPC (dietil pirokarbonat) ile toplam hacim 10 μ l'ye tamamlanarak 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C'de inkübasyona bırakıldı. DNaz I uygulanan RNA'dan Rever tAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) yardı mıyla cDNA elde edildi.

Primer Tasarımı; Deneyde kullanılan tasarladığımız primerler NCBI web sitesinden *Rattus norvegicus*'a özgü β -aktin, NF κ B, TNF- α , ve IFN- γ genlerine ait mRNA dizileri kullanılarak ve FastPCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar paket programından yararlanıldı ve kontrol edildi. Primer dizileri ve gen bankası numaraları Çizelge 7' de verilmiştir.

Real-time PCR; Deney grupları arasındaki gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla real- time PCR ve gene özgü primerlerden yararlanıldı. Seçilen genlerin ve housekeeping gen (β -Aktin) ekspresyonu, ratların karaciğer dokularından alınan örnekler Bio RAD real-time PCR cihazında incelendi. Daha sonra Real-time PCR sonuçlarının analizi Bio RAD CFX Manager 3.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

PCR karışımı, 1 μ l revers primer (10 pmol), 1 μ l forward primer (10 pmol), 10 μ l SybrGreen karışımı (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu, (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 μ l cDNA ve 7 μ l su eklenerek, toplam hacim 20 μ l'ye olacak şekilde ayarlandı.

Üç aşaması olan amplifikasyon işleminde sırasıyla; primer yapışması, denatürasyon ve zincir uzatma olmak üzere daha sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait olan döngü eşiği (Ct) parametrelerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001).

Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (C_{t_{hedef\ gen}} - C_{t_{\beta actin}})_{denek\ grubu} - (C_{t_{hedef\ gen}} - C_{t_{\beta actin}})_{kontrol\ grubu}$$

formülünden faydalanıldı. Hesaplanan değer her bir gen için ayrı ayrı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne yerleştirilerek mRNA ekspresyon düzeyi üzerine eklenecek şekilde artış ya da azalma şeklinde belirlendi. β -aktin geni endojen kontrol geni olarak kullanıldı ve diğer genlerin ekspresyon düzeyleri her bir örneğe ait β -aktin gen düzeyine göre normalizasyon uygulandı.

Çizelge 7. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Oligonükleotit Dizisi		Gen Bankası No
β-Aktin	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	
NFκB	F	TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC	NM_199267.2
	R	GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC	
TNF-α (Takahashi vd., 2018)	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	NM_012675.3
	R	GGATGAACACGCCAGTCGCC	
IFN-γ	F	AAGACAACCAGGCCATCAGCA	NM_138880.3
	R	TTCACCTCGAACTTGGCGATGC	

3.5. Biyokimyasal Parametreler

Alınan plazma örneklerinden AST, ALT ve ALP miktarları temin edilen ticari kitlerle spektrofotometrik olarak belirlendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, gruplar arasındaki farklılık ve ortalamalar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Duncan testi ile SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1 MDA Düzeyleri

Tartrazin ilavesi ile kan ve dokularda MDA seviyelerinde yükselme ve karvakrol gruplarına göre anlamlı derecede artışa sebep olurken, karvakrol ile farklı dozlarda tedavi edildiğinde MDA seviyelerinin tartrazin grubuna göre anlamlı derecede kontrole yaklaştırdığı tespit edildi.

4.1.2. GSH Düzeyleri

Dokulardan karaciğer, beyin, böbrek, kalp ve testislerde karvakrol grubu GSH değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre olumlu derecede yükseldiği gözlenirken, tartrazin grubunun GSH düzeyleri karvakrol ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede düştüğü gözlemlenmiştir. Tartrazin ve karvakrol gruplarını tartrazin grubu ile karşılaştırdığımız da düşüş gösteren GSH düzeylerinde olumlu derecede artış olduğu ve hatta karvakrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir.

4.1.3. SOD Aktivite Düzeyleri

Tartrazin uygulaması tüm organ dokularında SOD enzim aktivitesinde karvakrol ve kontrol gruplarına göre anlamlı azalmaya sebep olurken, karvakrol eklenmesinden sonra SOD aktivitesinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir.

4.1.4. CAT Aktivite Düzeyleri

Tartrazin uygulaması karaciğer, beyin, böbrek ve kalp dokularında CAT enzim aktivitesinde belirgin düşüslere neden olurken karvakrol eklenmesinden sonra enzim aktivitesinin olumlu yönde artış gösterdiği ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir.

4.1.5. Plazmada Karaciğer Enzim Düzeyleri

Tartrazin uygulamasından sonra plazmadaki ALT enzim değerleri, dokulardaki hasara bağlı olarak karvakrol ve kontrol gruplarına göre ciddi artışlara neden olurken, karvakrol ilavesinden sonra ALT değerlerinde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Plazma AST enzim değerleri tartrazin uygulamasıyla birlikte karvakrol ve kontrol gruplarına göre anlamlı yükselmeler gösterirken, karvakrol ilavesinden sonra plazma AST değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ve karvakrol grubu değerlerine yaklaştığı görülmüştür. Son olarak plazma ALP enzim değerlerine bakıldığında tartrazin uygulamasıyla birlikte karvakrol ve kontrol gruplarına göre anlamlı yükselmelere neden olurken, karvakrol tedavisi istatistiksel olarak plazma ALP değerlerini azaltarak kontrol grubu değerlerine yaklaştırmıştır.

4.1.6. Karaciğer ve Böbrekte Değişen Biyokimyasal Gen Parametreleri

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında tartrazin (500mg/kg), 12,5, 25 ve 50 mg/kg karvakrolün TNF- α gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Ortalama değerler $\pm$ standart sapmalardır (n=6). Her iki dokudaki gen üzerine tartrazine etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki karvakrol anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır (Şekil 8, Şekil 11).

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında tartrazin (500mg/kg), 12,5, 25 ve 50 mg/kg karvakrolün IFN- γ gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Ortalama değerler $\pm$ standart sapmalardır (n=6). Her iki dokudaki gen üzerine tartrazine etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki karvakrol anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır (Şekil 6, Şekil 9).

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında tartrazin (500mg/kg), 12,5, 25 ve 50 mg/kg karvakrolün NF- κ B gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Ortalama değerler $\pm$ standart sapmalardır (n=6). Her iki dokudaki gen üzerine tartrazine etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki karvakrol anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır. (Şekil 7, Şekil 10).

Çizelge 8. Gruplara ve dokulara göre MDA düzeyleri

MDA	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	8,38±1,96 ^c	5,34±0,59 ^c	2,47±0,96 ^c	2,24±0,9 ^d	1,8±0,73 ^c	1,4±0,56 ^c	0,94±0,3 ^c
Yağ	8,65±1,73 ^c	5,88±1,98 ^c	2,58±0,93 ^c	2,27±0,65 ^d	1,89±0,66 ^c	1,48±0,62 ^c	1,03±0,32 ^c
Tartrazin	20,46±6,41 ^a	10,2±1,76 ^a	7,99±1,83 ^a	5,82±2,1 ^a	5,04±0,76 ^a	3,9±1,66 ^a	2,32±0,82 ^a
Tartrazin + Karvakrol 12,5 mg/kg	18,84±6,35 ^{ab}	9,39±3,68 ^{ab}	7,43±2,49 ^a	4,84±1,04 ^{ab}	3,78±1,23 ^b	3,26±1,32 ^{ab}	1,85±0,75 ^{ab}
Tartrazin + Karvakrol 25 mg/kg	16,09±6,91 ^{ab}	8,71±1,83 ^{ab}	6,86±2,71 ^{ab}	3,74±1,08 ^{bc}	2,89±1,23 ^{bc}	2,79±0,95 ^{ab}	1,73±0,51 ^{ab}
Tartrazin + Karvakrol 50 mg/kg	13,25±4,08 ^{bc}	7,63±1,99 ^{bc}	4,83±1,96 ^b	2,92±1,23 ^{cd}	2,73±0,98 ^{bc}	2,13±0,86 ^{bc}	1,43±0,49 ^{bc}

Çizelge 9. Gruplara ve dokulara göre GSH düzeyleri

GSH	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	38,24±6,51 ^a	30,78±10,07 ^a	30,62±6,61 ^a	19,47±7,48 ^a	20,58±4,6 ^a	21,35±7,26 ^a	10,93±2,4 ^a
Yağ	37,94±2,3 ^a	30,7±10,89 ^a	29,37±9,88 ^a	19,67±2,55 ^a	20,08±4,09 ^a	20,87±5,06 ^a	10,34±2,68 ^a
Tartrazin	17,19±5,59 ^d	14,32±5,04 ^c	13,52±3,13 ^c	6,99±2,38 ^d	10,64±1,69 ^c	7,67±2,96 ^c	2,7±0,81 ^d
Tartrazin + Karvakrol 12,5 mg/kg	20,62±6,36 ^{cd}	18,88±3,31 ^{bc}	15,17±4,44 ^{bc}	9,6±1,85 ^{cd}	12,72±5,1 ^{bc}	12,67±4,87 ^{bc}	3,98±1,43 ^{cd}
Tartrazin + Karvakrol 25 mg/kg	27,33±9,18 ^{bc}	24,35±8,19 ^{ab}	20,87±7 ^{bc}	12,62±4,02 ^{bc}	15,2±1,42 ^{bc}	14,73±5,49 ^b	6,07±2,42 ^{bc}
Tartrazin + Karvakrol 50 mg/kg	33,68±5,59 ^{ab}	26,02±9,89 ^{ab}	22,68±9,5 ^{ab}	15,22±4,05 ^{ab}	16,81±5,6 ^{ab}	18,2±3,92 ^{ab}	7,76±2,67 ^b

Çizelge 10. Gruplara ve dokulara göre SOD düzeyleri

SOD	Eritrosit (U/gHb)	Böbrek (U/μg protein)	Karaciğer (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Akciğer (U/μg protein)	Testis (U/μg protein)
Kontrol	30,38±7,55 ^a	10,5±3,46 ^a	7,14±2,46 ^a	4,63±1,78 ^a	6,13±2,12 ^a	3,13±0,42 ^a	1,82±0,68 ^a
Yağ	29,11±9,24 ^a	10,31±2,96 ^a	7,11±1,07 ^a	4,6±1,52 ^a	6,08±2,6 ^a	3,11±1,14 ^a	1,8±0,61 ^a
Tartrazin	13,9±3,63 ^c	1,86±0,65 ^c	2,7±0,8 ^c	1,68±0,67 ^c	1,11±0,38 ^d	1,68±0,43 ^b	0,62±0,26 ^c
Tartrazin + Karvakrol 12,5 mg/kg	15,44±5,1 ^c	3,08±1,16 ^c	3,43±0,92 ^c	2,44±0,86 ^{bc}	1,93±0,76 ^{cd}	2,21±0,74 ^{ab}	0,65±0,16 ^c
Tartrazin + Karvakrol 25 mg/kg	17,1±6,24 ^{bc}	6,22±1,61 ^b	4,19±1,65 ^{bc}	3,52±1,45 ^{ab}	3,07±1,2 ^{bc}	2,25±0,81 ^{ab}	0,91±0,34 ^{bc}
Tartrazin + Karvakrol 50 mg/kg	23,93±9,97 ^{ab}	8,34±3,52 ^{ab}	5,49±1,73 ^{ab}	3,99±1,07 ^a	4,38±1,57 ^{ab}	2,6±0,89 ^a	1,34±0,3 ^{ab}

Çizelge 11. Gruplara ve dokulara göre CAT düzeyleri

Katalaz	Eritrosit (k/gHb)	Böbrek (k/μg protein)	Karaciğer (k/μg protein)	Kalp (k/μg protein)	Beyin (k/μg protein)	Akciğer (k/μg protein)	Testis (k/μg protein)
Kontrol	110,82±31,29 ^a	10,58±2,71 ^a	9,54±2,62 ^a	4,29±1,11 ^a	3,66±1,44 ^a	5,38±1,92 ^a	4,82±1,68 ^a
Yağ	107,89±36,74 ^a	10,54±3,08 ^a	9,14±1,47 ^a	4,24±0,91 ^a	3,49±0,7 ^a	5,28±1,76 ^a	4,78±1,33 ^a
Tartrazin	47,94±17,92 ^c	4,9±0,53 ^c	3,81±0,65 ^c	1,21±0,39 ^c	1,58±0,35 ^c	1,93±0,8 ^c	2,05±0,61 ^c
Tartrazin + Karvakrol 12,5 mg/kg	55,08±16,99 ^{bc}	5,05±0,81 ^c	4,22±0,86 ^c	1,4±0,43 ^{ab}	1,88±0,78 ^{bc}	2,77±0,96 ^{bc}	2,24±0,81 ^{bc}
Tartrazin + Karvakrol 25 mg/kg	67,49±21,87 ^{bc}	6,53±1,38 ^{bc}	5,57±1,52 ^{bc}	2,2±0,72 ^b	1,99±0,73 ^{bc}	3,34±1,08 ^{bc}	3,1±1 ^{bc}
Tartrazin + Karvakrol 50 mg/kg	83,9±26,8 ^{ab}	8,53±1,24 ^{ab}	7,1±2,38 ^b	3,44±0,83 ^a	2,76±0,98 ^{ab}	3,89±1,24 ^{ab}	3,56±1,5 ^{ab}

Çizelge 12. Plazma AST, ALP ve ALT enzim aktivite düzeyleri (IU/L)

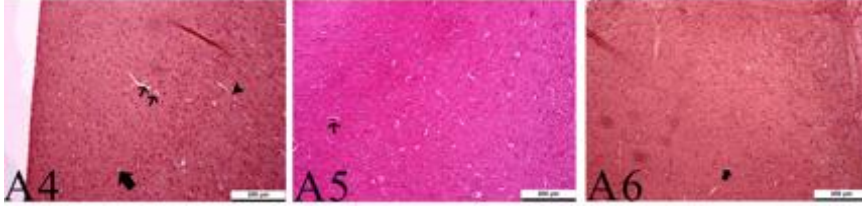
	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)
Kontrol	35,27±14,64 ^c	79,72±21,89 ^b	28,06±8,44 ^d
Yağ	36,82±9,49 ^c	80,07±19,18 ^b	29,92±12,1 ^d
Tartrazin	103,53±27,3 ^a	124,42±22,34 ^a	68,73±16,86 ^a
Tartrazin + Karvakrol 12,5 mg/kg	89,56±17,95 ^{ab}	117,55±26,3 ^a	61,24±16,02 ^{ab}
Tartrazin + Karvakrol 25 mg/kg	74,12±21,85 ^b	97,82±23,06 ^{ab}	50,94±12,7 ^{bc}
Tartrazin + Karvakrol 50 mg/kg	44,66±15,1 ^c	89,4±27,18 ^b	36,73±14,79 ^{cd}

4.2. Histolojik Bulgular

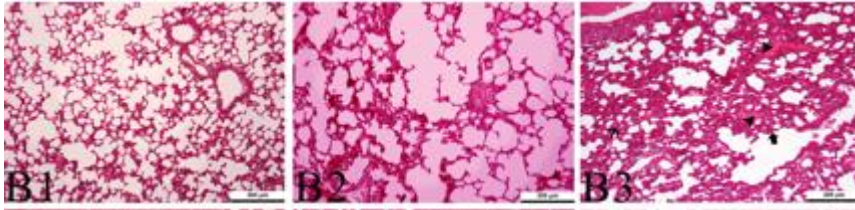
Kontrol ve karvakrol gruplarına ait hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerde beyin parankiminde nöronlarda vakuolizasyon, damarlarda hiperemi ve fokal glia hücre infiltrasyonu alanları izlendi. Akciğer lobüllerinde, intersitisyel alanda kalınlaşma, damarlarda hiperemi ve alveollerde ödem birikimi izlendi. Kalp dokusunda myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları çoklu yapıda değerlendirildi. Karaciğer hepatositlerinde vakuoler dejenerasyon alanları, vena sentralislerde hiperemi ve çift çekirdekli hepatosit oluşumları izlendi. Böbrek glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, damarlarda hiperemi, intersitisyel bölgede hemoraji alanı ve bowman boşluğunda genişlemeler değerlendirildi. Testis hücreleri TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları ve TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları oldukça yoğun düzeyde belirlendi.



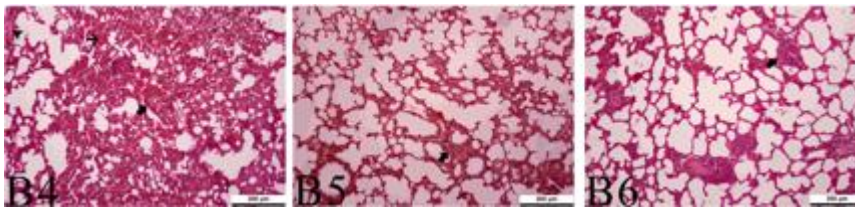
Resim 1. Beyin Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a A3 (Beyin, Tartrazin grubu);
(Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları



Resim 2. Beyin Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b A4 (Beyin, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları kler. A5 (Beyin, Tartrazin+C50 grubu); (İnce ok) Damarlarda hiperemi. A6 (Beyin, Tartrazin+C100 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon



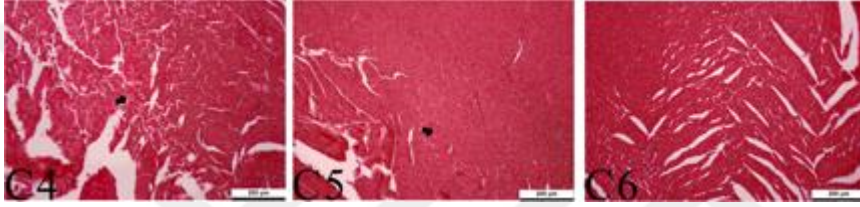
Resim 3. Akciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a B3 (Akciğer, Tartrazin grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi



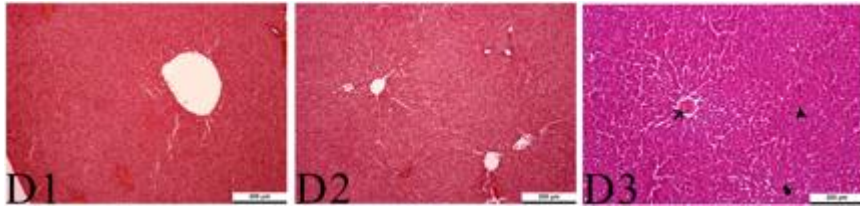
Resim 4. Akciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b B4 (Akciğer, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi. B5 (Akciğer, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma. B6 (Akciğer, Tartrazin+C100 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma



Resim 5. Kalp Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a C3 (Kalp, Tartrazin grubu);
(Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları



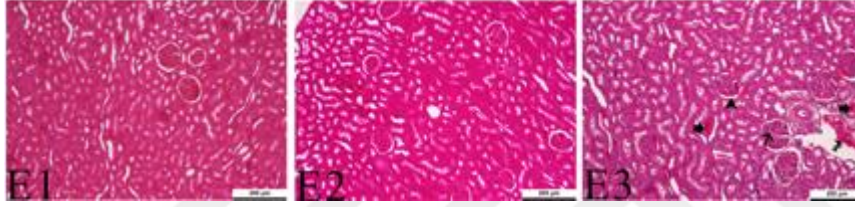
Resim 6. Kalp Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b C4 (Kalp, Tartrazin+C25 grubu);
(Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları. C5 (Kalp,
Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz
alanları.



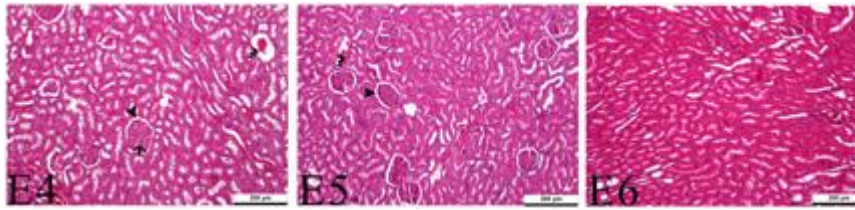
Resim 7. Karaciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a D3 (Karaciğer, Tartrazin
grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (İnce ok) Vena
sentralislerde hiperemi, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları



Resim 8. Karaciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b D4 (Karaciğer, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D5 (Karaciğer, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D6 (Karaciğer, Tartrazin+C100 grubu); (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları



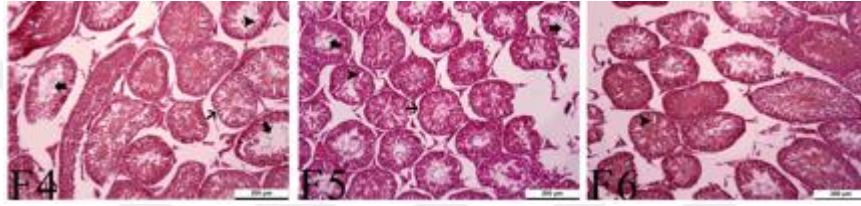
Resim 9. Böbrek Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a E3 (Böbrek, Tartrazin grubu); (Kalın ok) Damarlarda hiperemi, (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.



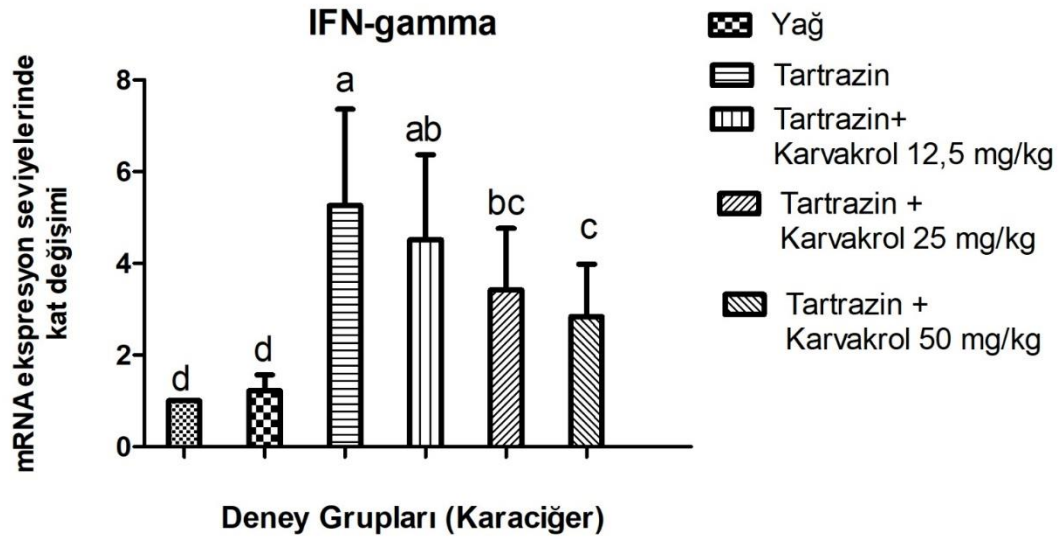
Resim 10. Böbrek Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b E4 (Böbrek, Tartrazin+C25 grubu); (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler. E5 (Böbrek, Tartrazin+C50 grubu); (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.



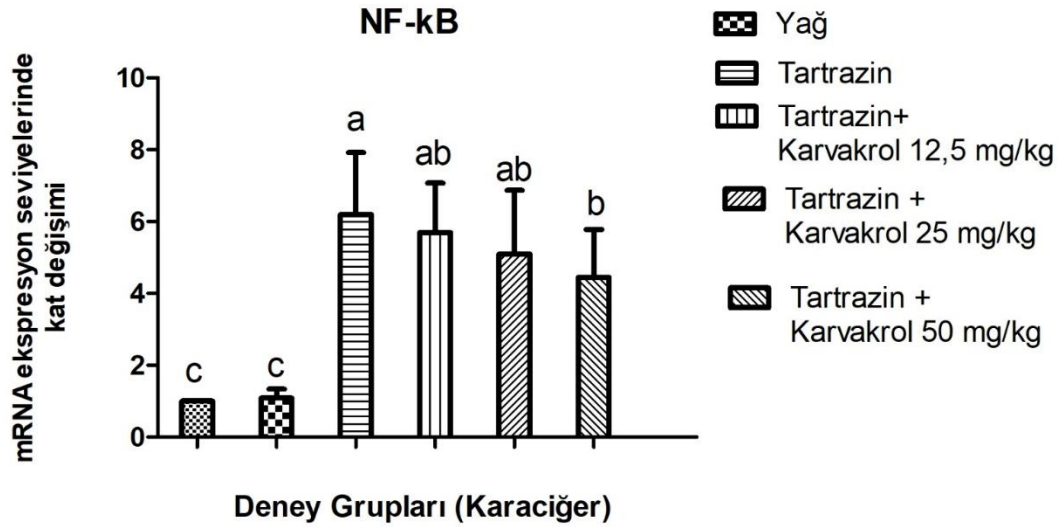
Resim 11. Testis Dokusu Histopatolojik İncelemesi-a F3 (Testis, Tartrazin grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları.



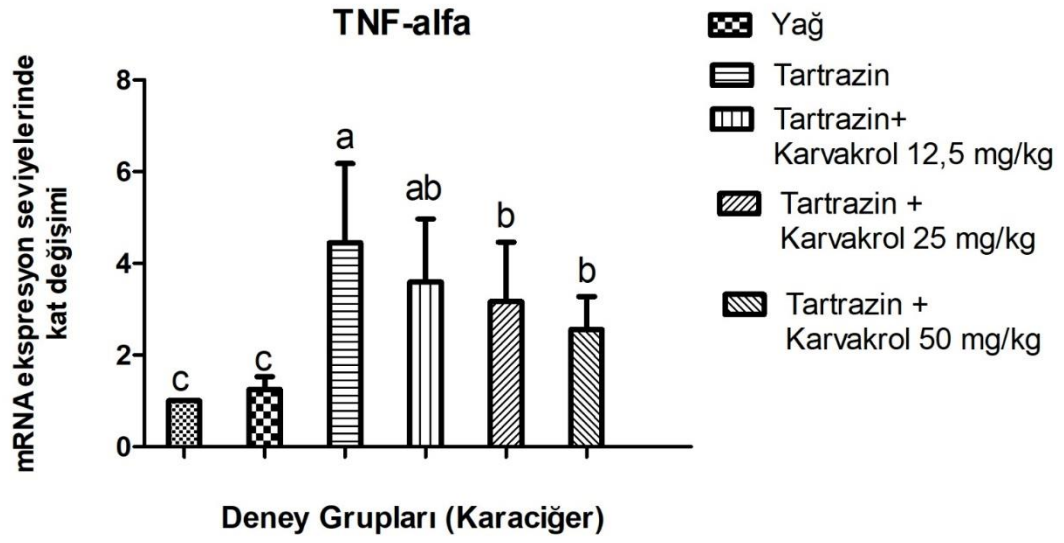
Resim 12. Testis Dokusu Histopatolojik İncelemesi-b F4 (Testis, Tartrazin+C25 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları. F5 (Testis, Tartrazin+C50 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları. F6 (Tsetis, Tartrazin+C100 grubu); (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları.



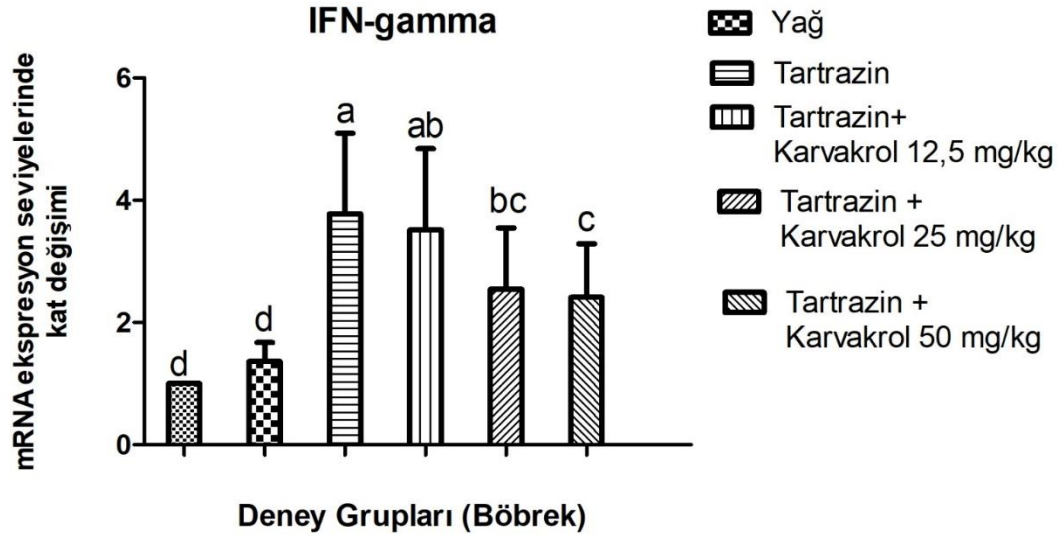
Şekil 6. Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



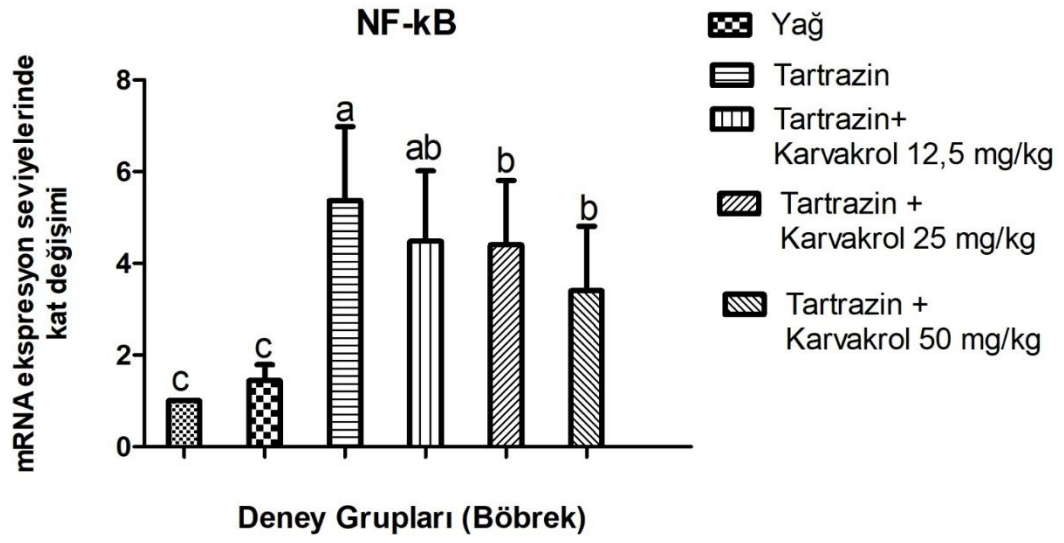
Şekil 7. Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



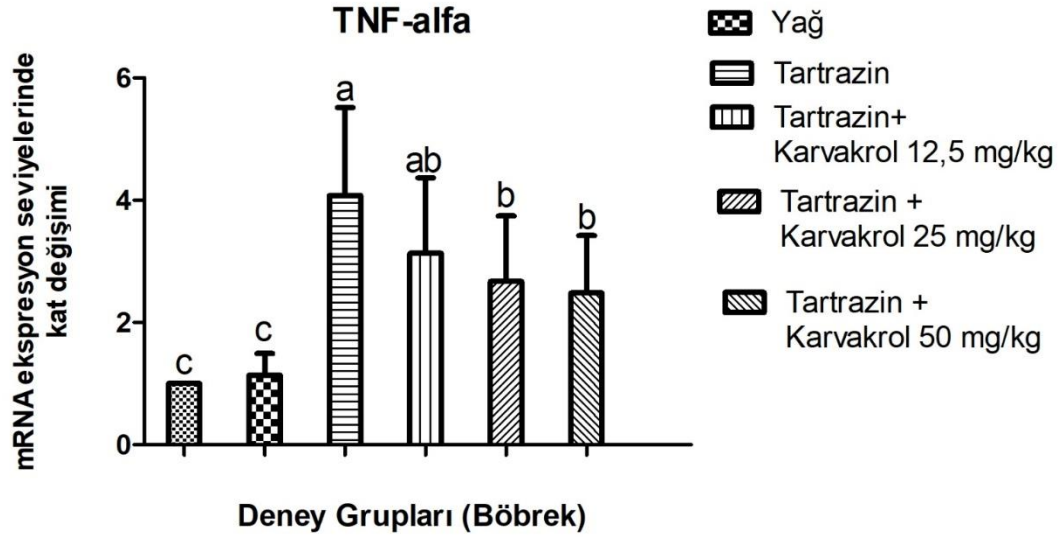
Şekil 8. Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



Şekil 9. Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



Şekil 10. Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



Şekil 11. Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

AboelZahab ve arkadaşları yaptıkları çalışmada günlük beslenmelerine gıda katkı boyası (tartrazin, gün batımı sarı) ilave ettikleri ratlarda karaciğer enzimlerinden AST (Aspartat Aminotransferaz), ALT (Alanin Aminotransferaz) ve alkalın fosfatazda yükselme tespit etmiş ve histopatolojik çalışmaların da kahverengi pigment görmüşlerdir (AboelZahab vd., 1997). Aynı zamanda farklı konsantrasyonlarda tartrazin verilmiş ratların serum total lipidlerine bakıldığında trigliseritler ve kolesterolde önemli bir yükselme gözlemlenmiştir (AboelZahab vd., 1997). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de diyetlerine tartrazin eklenen ratlarda serum AST ALP ve ALT düzeylerinde yükselmeler görülmüş artan dozlarda karvakrol eklendiğinde bu değerlerde anlamlı derecede düşüşler tespit edilmiştir.

Sharma ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara vermiş oldukları çikolatalara gıda boyası olarak tartrazine eklediklerinde karaciğer enzimleri olan AST ve ALT düzeylerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada globulinde ve serum total proteinde de önemli bir yükselme tespit etmişlerdir. Ayrıca doğal olmayan gıda boyalarının oksidatif strese bağlı olarak toksik etki oluşturmada dolayı karaciğer enzimlerinin kana salınımının artması da serum protein konsantrasyonunun da artmaya sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Sharma vd., 2005). Bizim sonuçlarımıza göre de oksidatif strese neden olan tartrazine karşı karvakrol tedavisinin serum biyokimyasal parametreler üzerinde ki sonuçları benzer değerlere sahip olup, tartrazinin bu değerler üzerindeki artışa etkisi oldukça yüksektir.

Helal ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre, doğal olmayan ya da bitkisel kaynaklı renk verici gıda katkı maddelerinin gıdalarla birlikte ağızdan verilmesinin serum AST ve ALT seviyelerinde belirgin bir yükselmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada 1 ay boyunca tartrazin verilen sıçanlarda serum kreatinininde belirgin bir yükselme görmüşlerdir (Helal vd., 2000). Elde ettiğimiz sonuçlar da bu çalışmayla aynı doğrultuda olmuştur.

Farklı dozlarda oral yolla tartrazin verilen sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, yüksek dozda gıda boyası olan tartrazine maruz bırakıldığında karaciğer katalaz aktivitesinde ve glutatyon (GSH) içeriğinde belirgin bir azalma görüldüğü

rapor edilmiştir (Amin K.A.&Abdel H., 2010). Aynı zamanda karaciğer dokusundaki lipid peroksidasyonunda (MDA) anlamlı bir yükselme ve karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Tartrazin, sindirim sisteminin bir bölümü olan barsaklar tarafından sindirime uğradıktan ve metabolize olduktan sonra aromatik amin sülfanilik aside dönüşür. Daha sonra oluşmuş olan bu aromatik aminler, amino gruplarının nitrit-nitrat içeren besinlerle veya mide içerisinde metabolize olduktan sonra, metabolizmalarının bir parçası olarak reaktif oksijen türlerini sentezleyebilirler. Reaktif oksijen türlerinden olan (ROS) süperoksit anyon, H_2O_2 ve hidroksil radikal oksidatif stresin artmasını sağlayabilirler (Amin K.A.&Abdel H., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada ise tartrazinin karaciğer ve böbrek parametrelerinde sapmalara neden olduğu ve serbest radikaller meydana getirerek oksidatif stresi arttırdığı görülmüştür. Bu sentetik azo boyaları canlılarda barsaklarda parçalanabilir ve sonuç olarak yüksek miktarda toksik etkisi olan aromatik aminlerin kana karışmasına neden olabilir. Bu toksik bozulmaya bağlı olarak böbrek, beyin, mide ve karaciğerde zarara neden olabilir (Basu A.&Kumar S., 2016).

Sentetik bir gıda boyası olan tartrazinin, albino sıçanlarda böbrekler ve karaciğerin biyokimyasal belirteçleri olarak değerlendirilen, glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini değiştirdiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra tartrazin diyetle birlikte uzun bir zaman verildiğinde sıçanların mide zarına (artan eozinofiller ve lenfositlerden dolayı) zarar verdiği de rapor edilmiştir. Gıda katkı boyalarının oluşabilecek tüm olumsuz etkilerini aşağıya çekmek için ADI (Kabul Edilebilir Günlük Alım) miktarı hesaplanmıştır (Bhatt D. vd., 2018).

Geçmiş yıllarda yapılmış olan bir başka çalışmada içme suyu içerisine %0,1 ve %2,0 seviyelerinde tartrazin ilave edildiğinde sıçanlarda oluşan kanserojen yapıyı araştırmışlardır. Çalışmada sıçanların içme suyuna 2 yıl süresince %2 düzeylerine kadar tartrazin ilavesinin kanserojen riski taşımadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, başka bir kanserojen etki incelemesi çalışmasında 104 hafta boyunca %0, %0,5, %1,5 ve %5 düzeylerinde diyetlerine tartrazine eklenen farelerde %5'e kadar olan

tartrazin dozlarında kanserojen etki saptanmamıştır (sırasıyla dişi ve erkek farelerde, 9735 ve 8103 mg/kg/gün) (Elhkim M. vd., 2007).

Birçok çalışmada tartrazin, gün batımı sarı, karmoisine gibi katkı maddelerinin çeşitli dozlarında mutajenik, toksik ve kanserojen etkide olabilen aromatik aminler meydana getirebileceği belirtilmiştir. Diyetlerde %5 in üstündeki alımlarda kanserojenik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Leo L. vd., 2018). 2015 yılında, tartrazinin toksikolojik etkisi üzerine yapılan bir çalışmada sıçanların diyetindeki %0,5-5,0 arasında ki tartrazin ilavesinden 2 yıl boyunca etkilenmedikleri belirtilmiştir (Masone D.&Chanforan C., 2015).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada izin alınarak kullanılabilen sentetik gıda boyalarının genotoksitesisi incelenmiştir. Tartrazinin de içinde bulunduğu 8 ayrı sentetik gıda renklendiricisi ve bunların diğer türlerinin izin verilmiş olan dozlarda bile halk sağlığı açısından insan lenfositleri içinde genotoksik etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Bu çalışma sonucunda, gelişmiş ülkelerde uygulanan gıda katkı boyalarının kabul edilen günlük alım miktarlarının ve izin sınırının ne olduğunun yeniden ifade edilmesi zorunluluğunu ortaya koymuştur (Leo L. vd., 2018).

Siraki ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada aromatik aminlerle, hepatositlerin inkübasyonunda, sitotoksiste meydana gelmeden önce mitokondriyal hücre potansiyelinde bir düşmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Karaciğer GSH düzeylerinin tüm arilaminler aracılığıyla test edildiğinde ise deplese olduğu ve aminofluoren ve o-anisidin ile GSH'ların yoğun olarak oksidasyonu görülmüştür (Siraki A.G. vd., 2002).

Ratlardaki böbrek ve karaciğer dokularının biyokimyasal değerlerinde diyetlerine eklenen tartrazin nedeniyle değişiklikler görülebilir bunun yanı sıra yüksek dozlarda eklendiğinde daha yüksek risk taşıyabilmektedir. Tartrazin, serbest radikal oluşumuna neden olduğu için dokularda oksidatif strese neden olur (Himri I. vd., 2011). Antioksidan savunma sistemi, serbest radikaller nedeniyle oluşabilen hücresel hasarlara karşı muhafazasında yer alır (Mourad I.M.&Noor N.A., 2011).

Yapılan bazı çalışmalara bakıldığında, ratlar ve sıçanlardan alınan karaciğer ve böbrek doku örneklerinde doku hasarı ile ilişkisi olduğu düşünülen IFN- γ , TNF- α

ve NFkB yangısal genlerine değinilmiş ancak gerekli ölçüm ve histopatolojik incelemelere literatür taramalarında rastlanılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada yüksek tartrazin (500 mg/kg), maruziyetine bırakılan daha sonrasında ise; 12,5, 25 ve 50 mg/kg karvakrolün, diyetlerine eklendiği ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında IFN- γ , TNF- α ve NFkB gen ekspresyon düzeyleri üzerinde etkilerine baktık. Her iki dokudaki genler üzerine tartrazinin olumsuz etki gösterdiğini ve artan dozlarda karvakrol alımının ise anlamlı derecede kontrol grubuna yakınlaştırdığı tespit ettik.

Günümüzde sentetik gıda renklendiricilerinin uygulanmasıyla ilgili yapılmış olan bazı çalışmalarda gıda renklendiricilerinin ROS sentezini yükselttiği ve bunun sonucunda oksidatif stresi meydana getirdiği ortaya konmuştur (Himri I. vd., 2011; Visweswaran B.&Krishnamoorthy G., 2012). Hücrel bir organizmada ROS sentezindeki yükselme, antioksidan enzim düzeyleri ile korreledir ve bunun sonucunda oksidatif stres meydana gelir (El-Tohamy M., 2012). OS, serbest radikallerin ortamda artması ile antioksidan savunma sistemi tarafından temizlenerek dengenin olumlu yöne kaymasıyla ortadan kaldırılır (Friederich M. vd., 2009; Kaneto H. vd., 2010). Bizim çalışmamızda, karvakrol ile tedavi, CAT ve SOD enzim aktivitesi düzeylerinde tartrazin grubuna göre ciddi oranda iyileşmeler sağlamış ayrıca CAT aktivitesini kontrol düzeylerine yaklaştırmıştır.

Gao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sıçanlara tartrazin uygulamasının antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GR aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (Gao Y. vd., 2011). Sonuçlarımız, karvakrol ile tedavi edilen ratlarda beyinlerinde ki antioksidan enzimlerin azalan etkinliklerini gösteren raporlarla aynı doğrultudadır (Gao Y. Vd., 2011).

Amin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada sıçanların diyetlerinde 30 gün boyunca düşük dozda tartrazin uygulamalarına rağmen böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına, karaciğerde antioksidan/oksidan dengesinin bozularak oksidatif hasara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmacılar sıçanlara 500 mg/kg tartrazin uyguladıklarında ise karaciğer dokularında SOD, GSH ve CAT aktivitelerinin kontrol gruplarına göre önemli derecede azaldığını, MDA düzeylerinin ise anlamlı düzeyde arttığını rapor etmişlerdir (Amin K. vd., 2010). Benzer şekilde

çalışmamızda da tartrazin eklenmesinin MDA seviyelerini anlamlı şekilde arttırdığını tespit ettik. Ayrıca karvakrol ile birlikte tedavi sağlandığında tartrazin grubuna göre indirgenmiş olan GSH seviyelerinde kontrol değerlerine doğru yaklaşırken, MDA seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğunu tespit ettik.

Al-Seenı ve arkadaşlarının, yaptıkları bir çalışmada ise sıçanlara belli süre ve miktarda tartrazin uyguladıklarında karaciğer dokusunda GSH, CAT ve SOD değerlerinde anlamlı düzeyde düşüşler, MDA seviyelerinde ise önemli derecede artışlar tespit etmişlerdir (Al-Seenı M.N. vd., 2017). Çalışmamızda tartrazin uygulaması antioksidan enzimlerden MDA aktivitesinde artışa, CAT ve SOD aktivitesinde ise azalmaya sebep olarak, dokularda ki antioksidan kapasitesini düşürmüştür.

Daha önce sıçanlar üzerinde yapılmış olan bir çalışmada sentetik gıda boyalarından olan tartrazinin çok yüksek dozlarda sıçanlara uygulanması sonucu plazma enzimlerinde (ALT, AST ve ALP) artan aktiviteler, hepatositlerin yükselen hasarı, geçirgenliği ve yaralanmalarını ifade ettiğini ortaya koymuşlardır (Suzuki Y. vd., 2001). Yükselmiş olan ALT ve AST seviyeleri, sıçanlara verilmiş olan tartrazinle oluşacak hepatik, mitokondriyal ve hücrel membranların zarar görmesinin önüne geçmiştir. Önceki çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada da karvakrolün hücrel savunma sistemini düzenleyen mekanizmalar aracılığıyla dokuları hasara karşı koruyabileceği ortaya konmuştur.

Mekkawy ve arkadaşları sentetik gıda azo boyaları arasından tartrazini uyguladıklarında serum AST, ALT ve ALP seviyelerinde önemli derecede artışın olduğunu rapor etmişlerdir (Mekkawy H. vd., 1998). Yine Khayyat ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada da 30 gün süreyle 20 sıçana tartrazin verdiklerinde plazmadaki ALT, ALP ve AST değerlerinde anlamlı düzeylerde artış olduğunu ifade etmişlerdir (Khayyat L. vd., 2017). Yine bir diğer çalışmada ise dört gruba ayrılan 18 albinolu ratlardan bir gruba tartrazin verilmiş ve tartrazin verilen ratlarda ALT, ALP ve AST değerlerinde artışın olduğu gözlemlenmiştir (Al-Seenı M.N. vd., 2017). Çalışmamız önceden yapılmış olan çalışmalarla benzerlik göstermekte olup tartrazin verilmesi karaciğer harabiyetine sebep olarak plazmadaki ALT, AST ve ALP değerlerinde yükselmeye sebep olmuştur.

2007 yılında Slamaneova D. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise karvakrol eklenen sudan içirilen ratların testis ve karaciğer hücresi DNA'ların da hidrojen peroksit'in (H_2O_2) vermiş olduğu oksidatif etkilerine, kontrol grubuna göre daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Slamaneova D. vd., 2007).

Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışmada kronik strese maruz kalmış sıçanların beyin, karaciğer ve böbreklerinde karvakrolün oksidatif strese karşı koruyucu etkileri çalışılarak MDA, indirgenmiş GSH, SOD, GSH-Px, GR ve KAT aktivitelerinin seviyesi değerlendirilmiştir. Strese bağlı olarak hayvanların beyin, karaciğer ve böbrek lerinde MDA seviyesi önemli ölçüde daha yüksek, GSH ve Antioksidan enzimlerin seviyeleri ise kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (Farooqui vd., 2017). Sonuçlarımıza göre; GSH düzeylerinin tartrazin uygulamasıyla birlikte ciddi anlamda azaldığı görüldü. Oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla birlikte GSH depleasyonu hücre dokularında oksidatif hasara sebep olmuştur. Çalışmamızda antioksidan olarak seçilen karvakrolün antioksidan etkisi ile lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA düzeylerinde ciddi azalmalar görüldü. Ayrıca GSH düzeylerinde de karvakrol tedavisinden sonra anlamlı iyileşmeler olduğu tespit edildi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmada gıda boyası olan tartrazinin kan ve beyin, kalp, karaciğer, akciğer, testis ve böbrek dokusu üzerinde oluşturmuş olduğu oksidatif stres kaynaklı doku hasarını ayrıca karvakrolün koruyucu etkilerini histolojik değişiklikler ve biyokimyasal testlerle tespit ettik.

Çalışmamız doğrultusunda, tartrazin (500 mg/kg) ve karvakrol (12,5; 25; 50 mg/kg) miktarlarda 21 gün boyunca ratlara verilmiş olup, antioksidan sistemi baskılamıştır. Tartrazin uygulanmasıyla SOD enzim aktivitesinde, azalma tespit edildi. SOD enzim aktivitesinde bir azalmanın görülmesi, aşırı ROS birikimi ile ilişkili olup, hücre membranlarının fonksiyonunun ve bütünlüğünün bozulmasına neden olmuştur. Çalışmamızda ratlara tartrazin uygulanması CAT aktivitesinde de azalmalara neden olmuştur. Bu azalma nedeniyle artan H_2O_2 'ler yeterince detoksifiye edilemediğinden tüm dokularda oksidatif strese neden olmuştur.

Bu çalışmada tartrazin uygulaması ratların tüm dokularında ki MDA seviyelerinin belirgin şekilde artmasına sebep olmuştur. MDA seviyelerinde ki bu yükselme ise antioksidan savunmanın aşırı oluşan serbest radikalleri önleyememesine ve doku hasarına neden olmaktadır. Çalışmamızda tartrazin uygulaması antioksidan savunma mekanizmasından SOD, GSH ve CAT aktivitesinde düşüşe sebep olarak, lipid peroksidasyonuna neden olan H_2O_2 'nin yükselmesiyle birlikte dokularda ki antioksidan kapasitesini azaltmıştır.

Karvakrol ile tartrazini birlikte uyguladığımızda AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin tartrazin grubuyla karşılaştırıldığında azaldığını ayrıca eklenen karvakrol miktarının artmasıyla birlikte bu değerlerin dikkat çekici düzeyde düşmeye devam ettiğini gözlemlendik. Biyokimyasal sonuçlarımızla paralel olarak histopatolojik ve genetik sonuçlarımızda da tartrazin uygulaması dokularda orta ve şiddetli derecede dejenerasyon, damarlarda hiperemi, intersitisyel alanda kalınlaşma, düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları ve bowman boşluğunda genişlemelere sebep olduğunu tespit ettik. Tartrazin eklenmesi ile meydana gelen hasarın karvakrol ile tedavi edilmesiyle hasarın en aza indiği görüldü.

Ratlardaki böbrek ve karaciğer dokularının biyokimyasal değerlerinde diyetlerine eklenen tartrazin nedeniyle değişiklikler görülebilir bunun yanı sıra yüksek dozlarda eklendiğinde daha yüksek riskde taşıyabilmektedir. Yaptığımız çalışmada yüksek tartrazin maruziyetine bırakılan daha sonrasında ise KAR'ın diyetlerine eklendiği ratlardaki, karaciğer ve böbrek dokularında, IFN- γ , TNF- α ve NFkB gen ekspresyon düzeyleri üzerinde etkilerine bakılmış olup her iki dokudaki genler üzerine tartrazinin olumsuz etki gösterdiği ve artan dozlarda KAR, alımının ise anlamlı derecede kontrol grubuna yakınlaştırdığı görüldü. Çalışmamızın, bu konuda yapılacak olan çalışmalara da kaynak olması düşünülmektedir.

Sonuç olarak deneysel verilerimiz doğrultusunda ratlara, tartrazin indüklemesiyle dokularda ve genetiklerde oluşan hasara oksidatif stresin neden olduğunu ve bu hasarın karvakrol tarafından azaltılabildiğini histolojik ve biyokimyasal sonuçlarımız ışığında ortaya koyduk. Bu yüzden, sentetik gıda boyalarının zararlı etkilerine yönelik tüketiciyi bilinçlendirmek ve gıdalara ilave edilen her türlü katkı maddesinin konsantrasyonunu belirtmek gerekir. Ayrıca bu ürünlere karşı doğal bir antioksidan olan karvakrolün alımı tartrazinin oluşturduğu zararlı etkilere karşı anlamlı derecede iyileştirme sağlayacaktır. Sonuçlarımıza dayanarak, mevcut durumda gıda katkı maddelerinin daha detaylı değerlendirilmesinin elzem olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahhab, M. A., Salman, A. S., Ibrahim, M. I., El-Kady, A. A., Abdel-Aziem, S. H., Hassan, N. S., Waly, A. I. (2016). Curcumin nanoparticles loaded hydrogels protects against aflatoxin B1-induced genotoxicity in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 159-171.
- Abdollahi M., Bahreini-Moghadam A., Emami B., Fooladian F., Zafari K. (2003). Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stres in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.*: 135; 331-336
- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10, (6), 141-7.
- Abiaka C., Al-Awodi F., Alsoyer H. (2002). Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients. *J. Clin. Lab. Anal*; 16: 167-171
- Aboel-Zahab H., El-Khyat Z., Sidhom G., Awadallah R., Abdel-al W., Mahdy K. (1997). Physiological effects of some food coloring addivities on rats. *Boll. Chim. Farm*136(10):615-627.
- Adams J.B., Langley F.M. (1995). Interaction between additives in food systems. *Campden-Chorleywood Food Research Association*, 20: 72-74.
- Aebi H. (1974). "Catalase, Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)", 2: 673-684.
- Aeschbach R., Loliger J., Scoott BC., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma Ol. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerono and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 31-36.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*: 77; 319-321
- Ahmadvand H., Tavafı M., Asadollahı V., Jafaripour L., Hadipour Moradı F., Mohammadrezael-Khoramabadı R., Khosravı P., Salehı H., Cheraghı A. (2016). Protective Effect of Carvacrol on Renal Functional and Histopathological Changes in Gentamicin-Induced-Nephrotoxicity in Rats. *Zahedan J Res Med Sci*, 18: 6446.
- Akgöl A., Ayar A. (1993). "Yerli baharatların antioksidan etkileri". *Doga-TR. J. of Agriculture and Forestry*. 17: 1061-1068
- Akgün M. (2002). Gıda boyalarının türev spektrofotometrik yöntem ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul
- Akkuş I. (1995). "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri", Mimoza Yayınları, Konya, 32.
- Aksoy Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22 (4), 442-448

- Alma MH., Mavi A., Yildirim A. (2003). Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol Pharm Bull*; 26: 1725–1729.
- Al-Seeni M.N., El Rabey H.A., Al-Hamed A.M., Zamazami M.A. (2017). " *Nigella sativa* oil protects against tartrazine toxicity in male rats", *Toxicology Reports*, 41(2): 206-212.
- Altan N., Sepici-Dincel A., Koca C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif Stres. *Turk J Biochem*, 31 (2), 51-56.
- Altundağ Ş., Aslim B. (2005). Kekiğin bazı bitki patojeni bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. Cilt: 03 Sayı: 07 Sayfa: 12-14
- Ameur F. Z., Mehedi N., Rivas C. S., Gonzalez A., Kheroua O., And Saidi D. (2020). Effect of tartrazine on digestive enzymatic activities: in vivo and in vitro studies. *Toxicological Research*, 36(2), 159-166.
- Amin K.A., Abdel-Hameid H., Abdelsttar 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
- Anonim (2002B): Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi, Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği, (No:2002/55), Resmi Gazete.
- Aristatile B, Al-Numair K, Veeramani C, Pugalendi K. (2009). Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamineinduced hepatotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol*; 23(6): 757-65.
- Arunasree Km. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*; 17(8-9): 581-588.
- Aruoma Oi. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol*; 32: 71–83.
- Aruoma Oi. (2003). Bitkisel gıdalarda biyoaktif bileşenlerin potansiyel antioksidan etkilerinin karakterizasyonu için metodolojik değerlendirme. *Mutat Res*; 532: 9–20.
- Aslan R., Şekeroğlu M., Bayiroğlu F. (1995). "Serbest radikal türlerin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma", *Sağlık Bil. Derg*, 2: 137-142.
- Aslankoç R, Demirci D, Inan Ü. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Derg*; 26: 362–369.
- Atli B. (2010). Gıda boyaları. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Austgulen Lt., Solheim E., Scheline Rr. (1987). Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. *Pharmacol Toxicology*, 61: 98-102.
- Ayala A, Munoz Mf, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*; 2014:1–31.

- Aydin A., Sayal A., İşimer A. (2001). "Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi", Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 20.
- Aydin S. (1996). 'Kekik (*Origanum onites* L.) Yağ Altı Suyunun Farmakolojisi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.
- Aydin S., Aral E., Aydın Y., Öztürk Y., Başer Khc. (1997). Kekik (*Origanum Onites* L.) Uçucu Yağının Mast Hücresi Degranülasyonunu İnhibe Edici Etkisi. XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, 2-7 Kasım.
- Aydin S., Başaran A.A., Başaran N. (2005). The Effects of Thyme volatiles on the Induction of DNA Damage by the Heterocyclic Amine IQ and Mitomycin C, *Mutation Research*, 581, 43-53.
- Azaz D, Demirci F, Satil F, Kürkcüoğlu M, Baser Hc. (2002). Antimicrobial activity of some satüreja essential oils. *Z Naturforsch*; 57c: 817-821.
- Azirak S. (2007). Thymol ve Carvacrol'un in vivo genotoksik etkilerinin araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*. *Food Microbiology*, 2: 33-42.
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and pcymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), 33-42.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs SJ., Das DK., Ray SD., Kuszynski CA., Joshi SS., Pruess HG. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2-3), 187-197.
- Bagchi K, Puri S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr*; 4: 350-60.
- Bağci T. (1997). Gıda katkı maddeleri ve sağlığımız üzerine etkileri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 28 (1): 18-23.
- Balakrishnan A., Khalid S., Al-Numair Abdullah H. Al-Assaf, Chinnadurai V., Kodukkur V.P. (2010). Protective Effect of Carvacrol on Oxidative Stress and Cellular DNA Damage Induced by UVB Irradiation in Human Peripheral Lymphocytes, *J. Biochem Molecular Toxicology*.
- Banniste J, Bannister W, Rotilio G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*; 22: 111-80.
- Baser K. H. C. (2001). Her Derde Deva Bir Bitki-Kekik, *Bilim ve Teknik*, Mayıs 2001, 74-77.
- Baser K. H. C. (2008). Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils *Anadolu University, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacognosy, Turkey Current Pharmaceutical Design*, 14, 3106-3120.
- Bast A., Haenen G.R., Doelman C.J. (1991). "Oxidants and antioxidants: state of the art", *The American Journal of Medicine*, 91(3): 2-13.

- Basu A., Kumar S. (2016). Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials* 15(318):468-476.
- Baydar H., Sagdic O., Özkan G., Karadogan T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*; 15, 169–172.
- Baytop T., 1999, Türkiye’de bitkiler ile tedavi, 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Bennet JE., Molinoff PB., Ruddon RW. (1996). *Antimicrobial Agents*. Goodman & Gilman’s *The Pharmacological Basic of therapeutics* (9th). Mc Graw –Hill New York; 1175-1190.
- Bergendi L., Bene L., Ura Ková, Z., Feren Ik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, (18-19), 1865-1874.
- Berk M., Ng F., Dean O., Dodd S., Bush A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Science*, 29(7), 346-351.
- Betteridge DJ. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*; 49: 3–8.
- Beutler, E. (1963). Kan glutatyon tayini için geliştirilmiş yöntem. *J. lab. clin. Med.*, 61, 882-888.
- Bezerra M.D.S., Malaquias G.D.S., Sousa J.M.D.C, Peron A.P. (2016). Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36 (1): 49-55.
- Bhatia M.S. (1996). Alergy to tartrazin in alprazolam. *Indian Journal of Medical Sciences*, 5, 285-286.
- Bhatt D., Vyas K., Singh S., John J., Soni I. (2018). Tartrazine induced neurobiochemical alterations in rat brain sub-regions. *Food and Chemical Toxicology*, 113:322-327.
- Bloomer R.J., Goldfarb A.H. (2004). "Anaerobic exercise and oxidative stress: a review", *Canadian Journal of Applied Physiology* 29(3): 245-263.
- Blumberg J. (2004). Use of biomarkers of oxidative stres in research studies. *J Nutr.*, 134; 3188S-3189S.
- Boskabady H.M., Jandaghi P. (2003). Relaxant effects of carvacrol on guinea pig tracheal chains and its possible mechanisms. *Pharmazie*, 58: 661-663.
- Bouchra C., Achouri M., Hassani Idrisi M.L., Hmamouchi M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 165-169.
- Boyunaga H, Çelik C. (1996). Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Derg*; 347: 98-100.
- Bozkurt Z. (2005). Kekik çörekotu essansiyel yağı ile propolisin yonca kuru otu ve buğday samanının invitro gerçek kuru madde organik maddenin sindirilebilirliğine etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Adana.
- Bravo D, Pirgozliev V, Rose S. (2014). A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J. Anim. Sci*; 92(4): 1531-1536.

- Brigelius-Flohe R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*; 27: 951–65.
- Broucke Van Den CO., Lemli JA. (1982). Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 2: Antagonistic effect of thymol and carvacrol. *Planta Medical*, 45: 188-190.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253
- Canbek M., Uyanoglu M., Bayramoglu G., Senturk H., Erkasap N., Koken T., Uslu S., Demirustu C., Aral E., Husnu Can Baser K. (2008). Effects of carvacrol on defets of ischemia-reperfusion in the liver. *Phytomedicine*; 15(6-7): 447-452.
- Cao L., Si J.Y., Liu Y., Sun H., Jin W., Li Z., Zhao X.H., Pan R.L. (2008). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim, *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.064.
- Champe P., Çev. Editörleri; Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. (1997). "Lippincott's Illustrated reviews serisinden Biyokimya, İkinci Baskı", In: Glikozaminoglikanlar, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Champe R.A., Harvey R. A., Ferrier D.R. (2007). *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri LTD.ŞTİ.*, 248-249.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs", *Physiological Reviews* 59(3): 527-605.
- Chaudière J., Ferrari-Iliou R. (1999). "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms", *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10): 949-962.
- Chavan S., Sava L., Saxena V., Pillai S., Sontakke A., Ingole D. (2005). "Reduced glutathione: importance of specimen collection", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(1): 150.
- Cheeseman KH, Slater TF. (1993). An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*; 49: 481–93.
- Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C., Mecocci C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free radical biology & medicine*, 39, 841-852.
- Clarkson PM., Thompson HS. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 637-646.
- Coşkun O., Armutçu F., Kanter M., Kuzey GM. (2005). Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. *J Appl Toxicol*.25(1):8-12.
- Cristani M., Darrigo M., Mandalari G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (15), 6300-6308.
- Crosby N. T. (1981) . Food Packaging Requirements, In *Food Packaging Materials Aspects of Analysis and Migration of Contaminants*, 9-18.
- Culotta V.C., Yang M., O'halloran T.V. (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, (7), 747-758.

- Çakır S. (2013). Yedikleriniz Helal Olsun. Işık yayınları, 259s, İzmir.
- Çakmakçı S., Çelik İ. (1994). Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, 2, Erzurum.
- Çam H. (2007). Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, S. 41
- Çukadar N. (2014). İçeceklerdeki tartrazin miktarının HPLC-UV yöntemi ile tayini. Bitirme Ödevi, Kayseri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- Çulhaoğlu H. (2009). Alzheimer hastalarında kan MDA ve GSH seviyelerinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kars.
- Davies KJA. (2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. IUBMB Life, 50: 279– 289.
- De Vincenzi M., Stamatı A., De Vincenzi A., Silano M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. Fitoterapia, 75: 801–804.
- De Zwart LL., Meerman JHN., Commandeur JNM., Vermeulen NPE. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and inhumans. Free Radic Biol Med; 26: 202-226.
- Demirkol O., Zhang X., Ercal N. (2012). Oxidative effects of tartrazine (CAS No. 1934-210) and new coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 7: 229-236.
- Deshpande S.S. (2002). Handbook of food toxicology. Marcel Dekker Inc., New York, USA, Inc., 880 pp.
- Diczfalusy U., Falardeau P., Hammarström S. (1977). "Conversion of prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase", Febs Letters, 84(2): 271-274.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M. (1993). Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie, 48: 301-4.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. Pharmaceutica Acta Helveticae, 69: 25-28.
- Dilek O.N. (2003). Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi. Afyon, 23-30 Mart 2003:6
- Dinç M. (2007). "Gıdalara katılan bazı suda çözünen sentetik boyaların belirlenmesi". Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), 79s, Tekirdağ.
- Dorrajı P. S., Jalali, F. (2017). Electrochemical fabrication of a novel ZnO/cysteic acid nanocomposite modified electrode and its application to simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine. Food chemistry, 227, 73-77
- Drabkin, D. L., & Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. Journal of Biological Chemistry, 112(1), 51-65.
- Draper H.H., Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In Methods in enzymology (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.

- Duthie G., Wahle K., James W. (1989). "Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease", *Nutrition Research Reviews*, 2(1): 51-62.
- Ebadi M. (2001). An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. *Antioxidants and free radicals in health and disease*; 13-5.
- Edlefsen M., Brewer M.S. (1996). Illinois Cooperative Extension Service (Document No. EHE-756). University of Illinois at Urbana-Champaign, August.
- Ekşi A. (1996). Ankara Piyasasından Sağlanan Pasta Süsleri ve Bazı Şekerlerde Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Elhkim M., Heraud F., Bemrah N., Gauchard F., Lorino T., Lambre'c., Fremyj M., Poul J. (2007). New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47: 308–316.
- El-Saadany S.S. (1991). Biochemical effect of chocolate colouring and flavouring like substances on thyroid function and protein biosynthesis. *Die Nahrung*, 35: 335- 43.
- El-Tohamy M.M. (2012). "The mechanisms by which oxidative stress and free radical damage produces male infertility", *Life Sci J*, 9(1): 674-688.
- Engin A, Altan N, Işık E. (2005). Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs in R&D*. 6(1): 35-40.
- Engin A, Altan N. (2000). Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia*. 30(2): 91-96.
- Engin A, Bozkurt BS., Altan N., Memiş L., Bukan N. (2003). Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery*. 27(3): 253-5.
- Erdem, N. (2014). Tüketicilerin hazır ve yarı hazır gıdalarda kullanılan gıda katkı maddelerine yönelik görüşlerinin incelenmesi (Konya ili örneği). Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Çocuk Gelişimi Ve Ev Yönetimi Eğitimi Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), 115s, Konya.
- Erdemgil Z. O. (1992). Onites L. Uçucu Yağının Bileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Erden-Çalışır Z., Çalışkan D. (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3): 207-206.
- Erdoğan Ş. (2007). Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erenel G., Erbaş D., Aricioğlu A. (1992). "Serbest radikaller ve antioksidan sistemler", *Gazi Medical Journal*, 3(4): 245-247.
- Ersoy O., Kizilay G. (2018). Effects of fucoidan on diabetic rat testicular tissue. *Biotech Histochem*; 93: 277–285.

- Esterbauer H., Pubi H., Dieber-Rothender M. (1991). Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann Med*; 23: 573–81.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes", *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1): 81-128.
- Evangelic A., Kallpousos G., Karkaponnas S., Liasko R., Nonni A., Stefanou D., Kallistratos G. (1997). Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants, anticarcinogenesis on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Lett*, 115: 105-111.
- Fadiloğlu E., Özyurt H., Erdoğan H., Emre M. H. (2001). L-Name Ğle Hipertansif Yapılan Sıçanlarda Kalpte-İskemi-Reperfüzyon Sonrası Kalp Dokusu Ksantin Oksidaz Aktivitesi ve Malondialdehit Düzeyleri, *Ege Tıp Dergisi*, 40, 75 -81
- Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition," *Nutrition*, 18(10): 872-879.
- Farooqui Z., Afsar M., Rizwan S., Khan AA., Khan, F. (2016). Oral administration of *Nigella sativa* oil ameliorates the effect of cisplatin on membrane enzymes, carbohydrate metabolism and oxidative damage in rat liver. *Toxicology Reports*, 3, 328-335.
- Ferreira M., Moradas-Ferreira P., Reis-Henriques M. (2005). "Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary", *Portugal, Aquatic Toxicology* 71(1): 39-48.
- Fink RC, Scandalios JG. (2002). Molecular evolution and structure function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms, and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399: 19-35.
- Floyd RA. (1992). DNA damage and repair in *Oxidative Damage and Repair*. Davies KJA. Ed. Pergamon Press; 175-180.
- Frankel EN, Neff WE. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta*; 754: 264–270.
- Freinbichler W., Colivicchi MA., Stefanini C., Bianchi L., Ballini C., Misini B., Weinberger P., Linert W., Varešlija D., Tipton KF., Della Corte L. (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2067-2079.
- Friederich M., Hansell P., Palm F. (2009). "Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function", *Current Diabetes Reviews*, 5(2): 120-144.
- Friedman S., Martin P., Munoz J. (2003). "Laboratory evaluation of the patient with liver disease", *Hepatology, a Textbook of Liver Disease*, 1: 661-709.
- Gaetani G., Ferraris A., Rolfo M. (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*; 87: 1595–9.
- Gao Y., Li C., Yin H., An X., Jin H. (2011). "Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved", *Journal of Food Science*, 76(6).

- Gębicka L., Metodiewa D., Gębicki J.L. (1989). "Pulse Radiolysis of Catalase in Solution. I. Reactions of O₂ with Catalase and Its Compound I", International Journal of Radiation Biology, 55(1): 45-50.
- Gıda Katkı Maddeleri, (23 Ocak 2019). [www.diyetuzmani.com/beslenme/beslenme-bilgileri/gida-katki-maddeleri.php]
- Gilbert DL, Colton CA. (2002). Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. Mc Graw –Hill New York; 856-867.
- Gordon CA., Himmelfarb J. (2004). Antioxidant therapy in uremia: Evidence-Based medicine? Seminars in Dialysis: 17(5); 327-332
- Gould MN. (1997). Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. Environ Health Perspect;105:977–979.
- Gözükara E.M. (2011). Serbest radikaller ve Antioksidan enzimler. Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul, s. 881-899.
- Guerin P., El Moutassim S., Menezo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human reproduction update, 7(2), 175-189.
- Gutteridge J. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage", Clinical Chemistry, 41(12): 1819-1828.
- Gutteridge JMC., Halliwell B. (1991). Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press; 1-276.
- Gümrükçüoğlu A., Başoğlu A., Kolaylı S., Dinç S., Kara, M., Ocak M., Ocak, Ü. (2020). Highly sensitive fluorometric method based on nitrogen-doped carbon dot clusters for tartrazine determination in cookies samples. Turkish Journal of Chemistry, 44(1), 99-111.
- Gündüz Ö. (2010). Sıçanlarda renal iskemi-reperfüzyon sırasında oluşan stres hasarına karşı, karvakrolün olası koruyucu etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Osman Gazi Üniversitesi. Eskişehir.
- Güneş B. (2016). Tartrazinin İnsan Periferik Lenfositlerindeki İn Vitro Sitotoksikite ve Genotoksikitesi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi Ordu.
- Gürdöl F., Adenoğlu, E. (2010). Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biokimya Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul
- Halliwell B. (1974). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. New Phytol; 73: 1075-1086.
- Halliwell B., Gutteridge J. (1999). "Free radicals in medicine and biology", Clarendon: Oxford.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. (1985). "Oxygen radicals and the nervous system", Trends in Neurosciences, 8: 22-26
- Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?", The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119(6): 598-620

- Halliwell B., Gutteridge, J.M. (2001). Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- Hasanoğlu E., Altan N., Sindel P., Ongun C., Bali M., Altıntaş E. (1994). The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al, Cu, Zn) of Dialysis Patients. *General Pharmacology*. 25(1), 107-110.
- Hascelik G. (2008). Enfeksiyon etkenlerinin temel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri*, Nobel Matbaacılık İstanbul; 294-303.
- Hashemipour H., Kermanshahi H., Golian A., Veldkamp T. (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci*; 92(8):2059-69.
- Hayes J., Flanagan J., Jowsey I. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45: 51–88.
- Helal E., Zaahkouk M., Mekkawy H. (2000). Effect of some food colorants (synthetic and natural products) of Young Albino rats. *Egypt J Hosp Med* 1:103-113.
- Henry, J.B. (2001). *Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods*, W.B. Saunders Company, 20th
- Himri I., Bellahcen S., Souna F., Belmekki F., Aziz M., Bnouham M., Zoheir J., Berkia Z., Mekhfi H., Saalaoui E. (2011). "A 90-day oral toxicity study of tartrazine, a synthetic food dye, in wistar rats", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3.
- Himri I., Souna F., Aziz M., Hakkou A., Saalaoui E. (2012). DNA Damage induced by tartrazine in rat whole blood using comet assay (single cell gel electrophoresis). *Advances in Environmental Biology*, 6 (11): 2875-2881.
- Hu D., Wan X., Li X., Liu J., Zhou, C. (2017). Synthesis of water-dispersible poly-L-lysine-functionalized magnetic Fe₃O₄-(GO-MWCNTs) nanocomposite hybrid with a large surface area for high-efficiency removal of tartrazine and Pb (II). *International journal of biological macromolecules*, 105, 1611-1621
- Huang YL., Sheu JY., Lin TH. (1999). Association Between Oxidative Stress and Changes of Trace Elements in Patients with Breast Cancer. *Clinical Biochemistry*, 32(2), 131-136.
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C., Rahu N. (2016). "Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us?", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Hyldgaard M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-3.
- Ighodaro OM., Akinloye OA. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*; 54: 287–293.

- Ince S., Kucukkurt I., Demirel H.H., Acaroz D.A., Akbel E., Cigerci I.H. (2014a). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, 108, 197-204.
- Ipek E., Tüylü-Ayaz, B., Zeytinoğlu, H. (2003). Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, *Cytotechnology*, 43, 145-148.
- Ipeka E., Zeytinoglu H., Okaya S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Baser K.H. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by ames salmonella/microsomal test. *Food Chem*; 93(3): 551-556.
- Isinan B. M., Wan J. A., Passreiter M.C. (2001). Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia*, 72:65-68.
- Izumi I., Yoshiko K. (1962). Effect of essential oils and their components on the isolated intestine of mice. *Yakugaku Zasshi* 82: 1326-1328 *Chem. Abst.* 58: 7279.
- Jadhav S., Jaspal D. (2020). Adsorptive eradication of tartrazine from aqueous solutions onto doped polyaniline. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(2), 251-263.
- Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*; 29;4(1):5.
- Johnson F., Giulivi C. (2004). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 340–52. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*; 61: 192–208.
- Jomova K., Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
- Jones R., Ryan A.J. (1964). The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Food and Cosmetics Toxicology* 2: 447-52.
- Joseph P.D., Mannervik B. (2006). *Molecular toxicology*, Oxford University Press on Demand.
- Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics*, 3(1),1-14.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Açikgöz F. (2004). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*: 202; 227-235
- Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T.A. (2010). "Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis", *Mediators of Inflammation*.
- Karaali A., Özçelik B. (1993). Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar, *Gıda*, 18: 389-396.
- Karabulut H., Gülay M. (2016). Antioksidanlar. *Mae Vet. Fak. Derg*; 1: 65.
- Karaman S., Digrak M., Ravid U., Llcim A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 183-186.

- Kavas G.Ö. (1989). "Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri", Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 9(1): 1-8.
- Kaya F.F. (2005). Gıda katkı maddesi olan potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde in vitro genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Kayış T. (2015). Diazinonun subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Khan A.U., Kasha M. (1994). "Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction", Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(26): 12365-12367.
- Khayyat L., Essawy A., Sorour J., Soffar A. (2017). "Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects in vivo", PeerJ 5, 3041.
- Kirca-Ekinci N. (2011). Muhtelif gıda boyalarının *Pisum Sativum* L. üzerine genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.
- Knight J.A. (1995). Disease related to oxygen-derived free radicals. Ann. Clin.Lab.Sci.; 25(2):111-21.
- Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol, 30: 620-630.
- Koltuksuz U., Özen S., Uz E., Aydınç M., Karaman A., Gültek A., Akyol Ö., Gürsoy M.H. Ve Aydın E. (1999). Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats, Journal of Pediatric Surgery, 34(10): 1458-1462
- Koparal At, Zeytinoglu M. (2003). Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line. Cytotechnology; 43(1-3): 149-154.
- Kuli I.A.T., Kri Kob A., Dragovi-Uzelacc V., Milo A.M., Pifat G. (2007). The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. Int J Food Sci Nutr.; 58(2): 87-93.
- Kulic T., Radonic A., Katalinic V. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chem; 85: 633-640.
- Lagman M., Ly J., Saing T. (2015). Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. PLoS One; 10: 1-19.
- Landis G.N., Tower J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Ech ageing dev, 126, 365-379.
- Larson R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 27(4); 969-978
- Larsson K.S. (1975). A teratologic study with the dyes amaranth and porceau-4R in mice. Toxicology, 4: 75-82.
- Lee S.Y., Jin H.H. (2008). Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii* Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology, 47, 315-321.

- Lenaerts A.J., Johnson C.M., Marrieta K.S., Gruppo V., Orme I.M. (2005). "Significant increases in the levels of liver enzymes in mice treated with anti-tuberculosis drugs", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(2): 152-158.
- Leo L., Loong C., Raman M.F.B., Suan M.Y.T. (2018). Occurrence of Azo food dyes and their effects on cellular inflammatory responses. *Nutrition* 46: 36-40.
- Liang W.Z., Lu C.H. (2012). Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, 90: 703-711
- Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 674: 137–147.
- Liu T., Stern A., Roberts L.J. (1999). The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci*; 6: 226–35.
- Llana-Ruiz-Cabello M., Pichardo S., Maisanaba S., Puerto M., Prieto A.I., Gutierrez-Praena D., Camean A.M. (2015). In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 9-27.
- Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193, 265-275.
- Lu S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*: 30, 42-59.
- Luck H.A. (1963). Katalaz tahmini için spektrofotometrik yöntem. *Enzimatik analiz yöntemleri*.
- Luna A., Lábaque M., Zygadlo J., Marin R. (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult Sci*; 89(2): 366- 70.
- Luna L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology*. 3rd Ed, McGraw-Hill Book Company, New York;1-253.
- Maher P., Schubert D. (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci*; 57: 1287-1305.
- Mahfouz H., Al-Shammrani S. (2013). Protective action of vitamin C against mutagenic effects of synthetic food color tartrazine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7 (35): 2474-2483.
- Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959-3970.
- Mårtensson J., Lai J., Meister A. (1990). "High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18): 7185-7189.
- Masone D., Chanforan C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry* 56: 152-8.
- Mates J.M. (2000). Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*: 153; 83-104

- Mates J.M., Perez-Gomez C., Castro I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human disease. Clin. Biochem, 32, 595-603.
- Mc Cord J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med; 108: 652-9.
- Mcintyre M., Bohr D.F., Dominiczak A.F. (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. Hypertension, 34, 539-545.
- Mckenna M.C., Hopkins I.B., Lindauer S.L., Bamford P. (2006). "Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation", Neurochemistry International, 48(6-7): 629-636.
- Meister A. (1994). "Glutathione, ascorbate, and cellular protection", Cancer research, 54(7 Supplement) 1969-1975.
- Meister A., Anderson M. (1983). Glutathione. Annu Rev Biochem; 52: 711-60.
- Meister A., Larsson A. (1995). "Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle", The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 1: 1461-1495.
- Mekkawy H., Ali M., El-Zawahry A. (1998). "Toxic effect of synthetic and natural food dyes on renal and hepatic functions in rats", Toxicology Letters, 95: 155
- Melusova M., Slamenova D., Kozics K., Jantova S., Horvathova E. (2014). Carvacrol and rosemary essential oil manifest cytotoxic, DNA-protective and pro apoptotic effect having no effect on DNA repair. Neoplasma, 61: 690-699.
- Mercan U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi.YYU Vet Fak Derg., 15(1-2); 91-96
- Mervat M.K., Heba S.E. (2011). The potential health hazard of tartrazine and levels of hyperactivity, anxiety-like symptoms, depression and anti-social behaviour in rats. Journal of American Science, 7 (6): 1211-1218.
- Mohammed A., Ibrahim A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. Saudi Pharm J; 12: 1-18.
- Mohammedi Z. (2017). Carvacrol: An Update of Biological Activities and Mechanism of Action. Journal of Chemistry, 1: 53-62.
- Monoret-Vautrin D.A. (1986). Food antigens and additives. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 78: 1039-1046.
- Morgan G., Mikhail M., Murray M. (2008). "Lange Klinik Anesteziyoloji", Günes Tıp Kitabevleri, 970-974.
- Mourad I.M., Noor N.A. (2011). "Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex", Int J Pharm Biomed Sci, 2(1): 4-10.
- Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. Food and Chemical Toxicology. 48: 2934-2944.

- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (1998). Harper's Biochemistry. Ed: Dikmen, N., Özgüven, T., Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, 127-799 s, İstanbul
- Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J. (2003). "Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells", *Journal of Biological Chemistry*, 278(33): 31426-31433.
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors", *Clinical Chemistry*, 43(7): 1209-1214
- Niki E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(4), 503-515.
- Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338: 668–676.
- Nordberg J., Arner E.S. (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system", *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287-1312.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Okutan H., Savas C., Delibas N. (2004). "The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion–reperfusion", *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 3(3): 519-522.
- Omidı A., Torabı Z., Hassanpoorfard M., Zardast M. (2013). Evaluation of protective effect of hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* petals on preventing of gentamicin induced peliosis hepatis and hepatic telangiectasis in rats: Short communication. *J Birjand Univ Med Sci*, 19: 455–62.
- Opdyke D.L. (1979). Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol*, 17: 695–923
- Ozturk H., Cetinkaya A., Duzcu S., Tekce B.K., Hayrettin Ozturk H. (2018). Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98: 656-661
- Önal I.Ö., Erden I.A., Akinci S.B., Erden G., Karabulut I., Zeybek N.D., Fadillioğlu E., Müftüoğlu S., Sarıcaoğlu F., Balkancı Z.D., Başer K.H.C., Aypar Ü. (2010). Sıçanlarda karvakrolün oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarına etkisi. *Klinik Çalışma. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara*.
- Özenirler S., Tuncer C., Ongun C.Ö., Altan N., Kandilci U. (1994). Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. *General Pharmacology*. 25(7): 1349-51.
- Özkaya, A., (2007). Oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Panella N.A., Dolan M.C., Karchesy J.J., Xiong Y., Peralta-Cruz J., Khasawneh M., Maupin G.O. (2005). Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *Journal of Medical Entomology*, 42 (3), 352-358.

- Parcell S. (2002). Sulfur in Human Nutrition and Applications in Medicine. *Alternative Medicine Review*, 7(1), 22-44.
- Park M., Park H.R., Kim S.J., Kim M.S., Kong K.H., Kim H.S., Gong E.J., Kim M.E., Kim H.S., Lee B.M., Lee J. (2009). Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72 (21-22): 1412-1423.
- Pascual C., Karzai W., Meier-Helmann A., Oberhoffer M., Horn A., Bredle D., Reinhart K. (1998). Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med*; 26: 705-9.
- Peltek H. (2012). Yüzey aktif katyonlarla modifiye edilmiş ünye bentonit ve tartrazin boyar maddesi arasındaki etkileşimlerin XRD, TG/DTA FTIR analiz tekniklerinin kullanılmasıyla ve adsorbsiyon verilerinin değerlendirilmesiyle incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Rize
- Peng J., Jones G.L., Watson K. (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Rad Biol Med* 28:1598-1606 (2000).
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 9.
- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. (2008). "Free radicals, antioxidants in disease and health", *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2): 89.
- Portakal O., Ozkaya O., Erden Inal M., Bozan B., Kosan M., Sayek I. (2000). Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem*; 33: 279–284.
- Poul M., Jarry G., Elhkim M.O., 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: 443–448.
- Prieto J.M., Jacopini P., Cioni P., Chericoni S. (2007). In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes, *Food Chem*, 104, 889-95.
- Radi R., Turrens J.F., Chang L.Y. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*; 266:22028–22034
- Raha S., Robinson B.H. (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing", *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10): 502-508.
- Ramaiah S.K. (2007). "A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters", *Food and Chemical Toxicology*, 45(9): 1551-1557.
- Ray G., Batra S, Shukla N.K, Deo S., Raina V., Ashok S., Husain S.A. (2000). Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*; 59: 163–170.
- Rice-Avans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995). the relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*. 22 (4): 375-383.
- Robin R. (2015). Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards Physiology - Preston: 401.

- Rock C.L., Jacob R.A., Bowen P.E. (1996). Update o biological characteristics of the antioxidant micronutrients- Vitamin C, Vitamin E and the carotenoids. J Am Diet Assoc; 96: 693-702.
- Rosalki S., McIntyre N.I. (1999). "Biochemical investigations in the management of liver disease", Oxford Textbook of Clinical Hepatology, 2: 506-507
- Rovina K., Siddiquee S., Shaarani S.M. (2017). A review of extraction and analytical methods for the determination of tartrazine (E 102) in foodstuffs. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 47(4), 309-324.
- Sakaguchi S., Furusawa S. (2006). Oxidative stres and septic shock: metabolic aspects of oxgenderived free radicals generated in liver during endotoxemia. Immunol Med Microbiol; 47:167-77.
- Saraç Ö. (2010). Epigallokateşin Gallat (EGCG) ve Kafeik Asit Fenetil Esterin (CAPE) Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Scandalios J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 995-1014.
- Schroder J., Vollmer H. (1932). The excretion of thymol, carvacrol, eugenol and guaiacol and the distribution of these substances in the organism. Arch. Exp. Path. Pharmacol, 168: 331–353.
- Seifried H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A. (2007). "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species", The Journal of Nutritional Biochemistry, 18(9): 567-579.
- Serarslan G., Altug E., Konaş T., Atik E., Avci G. (2007). Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. Clin Exp Dermatol; 32(6):709-15.
- Seyhan S. (2006). Bazı gıdalarda tartrazin ve indigotinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Sharifi-Rad M., Varonı E.M., Iritı M., Martorell M., Setzer W.N., Contreras M.D.M., Salehi B., Soltanı-Nejad A., Rajabı S., Tajbakhsh M., Sharifi-Rad J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. Phytotherapy Research, 32: 1675-1687
- Sharma S., Goyal R.P., Chakravarty G., Sharma A. (2005). Haemotoxic effects of chocolate brown, a commonly used blend of permitted food colour on Swiss Albino mice. Asian J Ex Sci 19(2):93–103
- Sheppard D., Lampiris H.W. (2001). Antifungal agents. Katzung BG(eds). Lange Basic & Clinica Pharmacology (8 th). Mc Graw –Hill New York; 814-822.
- Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med; 91: 31-38.
- Sinclair A., Barnett A., Lunec J. (1990). "Free radicals and antioxidant systems in health and disease", British Journal of Hospital Medicine, 43(5): 334-344

- Siraki A.G., Chan T.S., Galati G., Teng S., O'Brien P.J. (2002). "N-oxidation of aromatic amines by intracellular oxidases", *Drug Metabolism Reviews*, 34(3): 549-564.
- Siu G., Draper H., Valli V. (1983). "Oral toxicity of malonaldehyde: A 90-day study on mice, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*" Current Issues, 11(1): 105-119
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simoncic M., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191-198
- Slamenová D., Horváthová E., Sramková M., Marsálková L. (2007). DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*; 54(2): 108-112.
- Soares B.M., Araujo T.M., Ramos J.A., Pinto L.C., Khayat B.M., Oliveira M., Montenegro R.C., Burbano R.M., Khayat A.S. (2015). Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research* 35(3):1465-1474
- Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* 125 O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159-166.
- Soltanab Y., Morsybc A., Araujo R., Elzaiaab H., Sallama S., Louvandiniib H., Abdallab A. (2011). Carvacrol and eugenol as modifiers of rumen microbial fermentation, and methane production in vitro. *Foreign Agricultural Relations*; 01– 11
- Sonsuz A., "Karaciğer Fonksiyon Bozukluklarına Klinik Yaklaşım", *Sempozyum Dizisi*, 58.
- Sökmen A., Güllüce M., Akpulat H.A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sökmen M., Sahin F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, *Food Control*; 15, 627-634.
- Sözmen E.Y. (2002). Yaşlanma biyokimyası. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., (Eds) *İnsan Biyokimyası*, Palme yayıncılık, Ankara, 665-674.
- Spalding J. (1988). "Toxicology and carcinogenesis studies of malonaldehyde, sodium salt (3-hydroxy-2-propenal, sodium salt)(CAS NO. 24382-04-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies), NIH Publication", Department of Health and Human Services.
- Stammati A., Bonsi P., Zuccho F., Moezelaar R., Alakomi H.L., Wright Von A. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 813-823.
- Stefanis L., Burke R.E., Greene L.A. (1997). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr OpinNeurol*; 10: 299–305.
- Sun Y., Oberley L.W., Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase., *Clinical Chemistry*, Cilt 34, Sayı 3, 1 Mart, Sayfalar 497–500,
- Suntres Z., Coccimiglio J., Alipour M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*; 55: 304- 318

- Suru S.M. (2008). Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Biometals*; 3.
- Suzuki Y., Ishihara M., Segami T., Ito M. (2001). "Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, α -tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats", *The Japanese Journal of Pharmacology*, 78(4): 435-441.
- Szaleczky E., Prechl J., Fehér J., Somogyi A. (2006). Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus - a rational approach. *Postgrad Med J* 75, 13-17.
- T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Sayı: 23172 Kasım 1997, 16.
- Takahashi R., Takayasu N., Mizoguchi Y., Shimoyama Y., Nakazawa T., Ikuta T. (2018). A Synbiotic with Tumor Necrosis Factor- α Inhibitory Activity Ameliorates Experimental Jejunoileal Mucosal Injury. *Hindawi, BioMed Research International*, Volume 2018, Article ID 9184093, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/9184093>.
- Takeoka G.R., Dao L.T. (2003). Antioxidant constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. *J Agric Food Chem*; 51: 496-501
- Tampieri M.P., Galuppi R., Macchioni F., Carelle M.S., Falcioni L., Cioni P.L., Morelli I. (2005). The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, 159 (3), 339-345.
- Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı (2002). Türk Gıda Kodeksi, Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği, (No:2002/55), Resmi Gazete.
- Tartrazinin Genel Özelliği, (15 Haziran 2021). [<https://www.gidahammaddeleri.com/tartrazine-gida-renklendiricisi-sari-e-102-1kg>].
- Tartrazinin Kullanım Alanları, (15 Haziran 2021). [<http://www.milliyet.com.tr/pembenar/uzm-dr-servet-kulahcioglu/gida-katkimaddeleri2394386>].
- Tartrazinin Toksikolojik Etkileri, (25 Eylül 2021). [<http://earsiv.odu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/11489/756/1/10136141.pdf>].
- Tartrazinin Yapısı ve Genel Bilgiler, (25 Eylül 2021). [[https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin_\(E102\)](https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin_(E102))].
- Tepe B., Daferera D., Sökmen M., Polissiou M., Sökmen A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of thymus eigii. Zohary M, Davis PH. *J Agric Food Chem*; 52(5): 1132-1137.
- Tepe B., Sökmen M., Akpulat H., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *Sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*; 66: 447-454
- Thakur B. R., Arya S. S. (1993). Stability of Sunset Yellow F.C.F and Tartrazine in Liquid Model Food System. *Die Nahrung*, 37, 15-19.
- Thomas M.J. (1995). "The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?", *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(1-2): 21-39.
- Ultee A., Smid E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 373-378.

- Urso M.L, Clarkson P.M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*; 189: 41-54.
- Uyanoglu M., Canbek M., Aral E., Base K.H.C. (2008). Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine*; 15: 226
- Uysal H., Semerdöken S. (2011). Sentetik gıda boyalarının *Drosophila melanogaster*'in Oregon R soyunda larval toksisite ve ergin ömür uzunluğu üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Kafkas Üniv. Fen Bil. Ens. Derg.*,4 (1), 71-87.
- Uysal M. (1998). Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen kosullar. *Klinik gelism*; 11: 336-341
- Uyumlu A.B. (2007). Tüm vücut radyoterapisinin farklı yaş gruplarındaki ratlarda beyin dokusu lipid peroksidasyonu ve Antioksidan sistem parametreleri üzerine etkileri, Master's thesis, İnönü Üniversitesi.
- Vaddia H., Hoa P.C., Chanb Y.W., Chan S.Y. (2002). Terpenes in ethanol haloperidol Permeation and partition through human skin and corneum changes, *J. Controlled Release*, 81:121-133, p.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*; 266: 37-56.
- Valko M., Leibfritz D., Mancol J., Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*: 39; 44-84
- Valko M., Rhodes C.J, Mancol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*: 160; 1-40
- Vattem D.A., Randhir R., Shetty K. (2005). Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle *Process, Biochemistry*, 40(6), 2225-2238.
- Vincenzi De M., Stamrii~Ti A., Vincenzi De A., Silano M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75: 801-804.
- Visweswaran B., Krishnamoorthy G. (2012). "Oxidative stress by tartrazine in the testis of Wistar rats", *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2(3): 44-49.
- Willcox J.K., Ash S.L., Catignani G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 275-295.
- Wickens A.P. (2001). "Ageing and the free radical theory", *Respiration Physiology*, 128(3): 379-391.
- Wildburger R., Mrakovcic L., Stroser M., Andrisic L., Borovic Sunjic S., Zarkovic K., Zarkovic N. (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence: Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 29(1), 189193.
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 85(2), 337-341.

- Wolf P. (1978). "Clinical significance of an increased or decreased serum alkaline phosphatase level", *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 102(10): 497-501.
- Yadav G.D., Kamble S.B. (2009). Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84: 1499–1508.
- Yaman M. (1996). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- Yanishlievaa N., Marinovaa E., Gordonb M., Ranevaa V. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*; 64: 59-66
- Yardım-Akaydın S., Sepici A., Özkan Y., Torun M., Şimşek B., Sepici V. (2004). Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radical Research*. 38(6): 623-628.
- Yeomans M.R. (1996). Palatability and the micro-structure of feeding in humans the appetizer effect *Appetite*, 27,2:119-133.
- Yin H.B., Chen C.H., Kollanoor-Johny A., Darre M.J., Venkitanarayanan K. (2015). Controlling *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production in poultry feed using carvacrol and trans-cinnamaldehyde. *Poultry Science*, 94: 2183–2190.
- Yılmaz S. (2008). Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara
- Yin F., Gong H., Ke Q., Li A. (2015). Stress, antioxidant defence and mucosal immune responses of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* challenged with *Cryptocaryon irritans*. *Fish and shellfish immunology*, 47 (1), 344-351.
- Yirtici Ü. (2007). Tartrazinın *Cyprinus caprio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Young I.S., Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal Of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.
- Young I.S., Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*; 54: 176–86
- Yurttağül M., Ayaz A. (2008). Katkı maddeleri, yanlışlar ve doğrular. T.C. Sağlık Bakanlığı, Beslenme Bilgi Serisi, Klasmat Matbaacılık, Ankara.
- Yurttağün M. (2010). Gıda Katkı Maddeleriyle İlgili Geniş Kapsamlı Bir Araştırma.
- Zadák Z., Hyspler R., Tichá A., Hronek M., Fikrová P., Rathouská J., Hrnčiariková D., Stetina R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 58 (Suppl 1), 13-17.
- Zelko I., Mariani T., Folz R. (2002). A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*; 33: 337–49.

- Zeytinoğlu H., Incesu Z., Başer Kh. (2003). Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10:292-4.
- Zhang C., Ren G., Wang W., Yu X., Yu F., Zhang Q., Zhou M. (2019). A new type of continuous-flow heterogeneous electro-Fenton reactor for Tartrazine degradation. *Separation and Purification Technology*, 208, 76-82
- Zhang H., Yu C.H., Jiang Y.P., Peng C., He K., Tang J.Y. (2012) Protective Effects of Polydatin from *Polygonum cuspidatum* against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury In Mice. *Plos One* 7(9): E46574.
- Zhang L., Sellaoui L., Franco D., Dotto G. L., Bajahzar A., Belmabrouk H., Li Z. (2020). Adsorption of dyes brilliant blue, sunset yellow and tartrazine from aqueous solution on chitosan: Analytical interpretation via multilayer statistical physics model. *Chemical Engineering Journal*, 382, 122952
- Zhu Y.J., Zeng T., Zhu Y.B., Yu S.F., Wang Q.S., Zhang L.P. (2008). Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. *Neurochem Res*; 8;10-14.
- Zimmerman H.J. (1999). "Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver", Lippincott Williams & Wilkins.