

ÇEŞİTLİ GIDA BOYALARININ HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN MTS TESTİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Aysel İÇÖZ¹, Omca DEMİRKOL^{2*}, Arzu-ÇAĞRI MEHMETOĞLU²

¹Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ Meslek Yüksek Okulu, Tekirdağ

²Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya

Geliş tarihi: 18.01.2008

ÖZET : Renk, gıdanın kolayca tanınması ve nihai kararın verilmesi için günümüz modern toplumunda vazgeçilmez bir özelliktir. Gıda boyalarının toksikolojisi, özellikle boyar maddelerin kansere sebep olabileceği konusu gündeme geldiğinden beri birçok araştırma yapılmış ve gıda boyalarının önemli kısmı ulusal ve uluslararası onaylanmış listelerden mutajenik ve kanserojenik aktivitelerinden dolayı çıkarılmıştır. Bu çalışmada, esaslı hücre canlılığını belirlemeye dayalı olan MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay) testi kullanılarak Tartrazin, Eritrosin, New Coccine, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red ve Amaranth sentetik gıda boyalarının toksiditelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Adı geçen her bir boyanın 1mM konsantrasyonları ile CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri inkübe edilmiştir. MTS testinin sonucuna göre Eritrosin, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red ve Amaranth boyalarının kontrole göre hücre canlılığı üzerine istatistik olarak önemli derecede ($p<0.05$) toksik olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gıda boyaları, MTS testi, hücre canlılığı

ABSTRACT : Color, an inevitable feature used to easily recognize and also to reach final decision about the food in our modern world. Since issue about toxicology of food color agents especially their carcinogen properties has received interest, several research studies have been done and according to their results important parts of food colors were taken out from the food additives lists approved by national and international agents. In the present study, MTS assay (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay) determining of vitality of cells was used to measure toxicity of several artificial food colors (Tartrazine, Erythrosine, New Coccine, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red and Amaranth). One mM concentration of each color was incubated with CHO (Chinese hamster ovary cell). According to MTS assay, toxicity of Erythrosine, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red and Amaranth against cell vitality was evaluated significantly higher comparing the control ($p<0.05$).

Keywords: Food colors, MTS assay, cell liveliness

GİRİŞ

Depolama ve üretim metotlarının gelişimiyle birlikte işlenmiş gıda ürünlerinin oranı her geçen yıl artmaktadır. Bu da gıda boyaları gibi katkıların kullanımının azaltılması ihtiyacını beraberinde getirmektedir (1). Ancak bu katkı maddelerinin güvenliğinin yeniden değerlendirilmesiyle kullanımına izin verilmiş olanların bir kısmının izinleri iptal edilebilmektedir. Örneğin butter yellowun kullanım izni aynı yıl kanserojen olduğu kanıtlandıktan sonra kaldırılmıştır (2). Kullanımına izin verilen gıda boyalarının miktarı tüketici sağlığını koruma adına son yıllarda azaltılmasına rağmen birçok sentetik gıda boyası düşük fiyatları, yüksek etkileri ve stabilite özelliklerinin çok iyi olmasından dolayı hala tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (3).

Gıdanın ilk fark edilen özelliği rengidir. Gıda boyaları, gıdaya daha çekici ve lezzetli bir görünüş kazandırmak, üretim aşamalarında kayba uğrayan rengi telafi etmek, çocuklar gibi belli tüketici gruplarının dikkatini çekmek amacıyla kullanılır (4, 5).

Bu çalışmada Tartrazin, Eritrosin, New Coccine, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red ve Amaranth sentetik boyaların toksiditeleri MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay) testi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

* E-posta : omcad@sakarya.edu.tr

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada materyal olarak CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri ve Tartrazine, Erythrosine, New Cocci- ne, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red , Amaranth (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) gıda boyaları ve MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA) materyal olarak kullanılmıştır.

Yöntem

Hücrelerin canlılığını (yaşayabilirliğini) tayin etmek için kullanılan MTS (administered 3-(4, 5-dimethyl thiazol- 2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) (6) testi 37 °C'de yaşayan hü- crelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu tetrazolium tuzunun (suda çözünebilir formazon ürünü) renkli bir yapı- ya dönüştürülmesi temeline dayanır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazon miktarı kültürdeki canlı hü- cre sayısı ile direkt orantılıdır ve 490 nm'de ölçülebilir (7). CHO hücreleri, %10 dana cenini serumu içeren Ham's 12 besiyerinde ve %5 CO₂ ve % 95 hava içeriğine sahip bir inkübatörde inkübe edildi. Çoğaltılan hücreler he- mecycytometer ile sayıldıktan sonra 1x10⁵ /mL olacak şekilde kompleks media ile seyreltildi. Seyreltilen hücreler (96-well plates) küvetlere 100 µL olacak şekilde bölündü.

Üzerlerine 150 µL besiyeri konuldu. Hücrelerin küvetlere tutunması için 4-6 saat inkübasyona bırakıldı. Tutun- ma tamamlandıktan sonra küvetlerdeki besiyeri ayrıldı. Hazırlanan standart boya çözeltilerinden 250 µL her bir küvete eklendi. Hücreler 24 saat gıda boyaları ile (%5 CO₂-%95 hava) inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda MTS eklendi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra 490 nm absorbansta bir mikroplate okuyucu (Spec- tra Count, Perkin-Elmer) kullanılarak okuma yapıldı.

İstatistik çalışmada ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi kullanıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

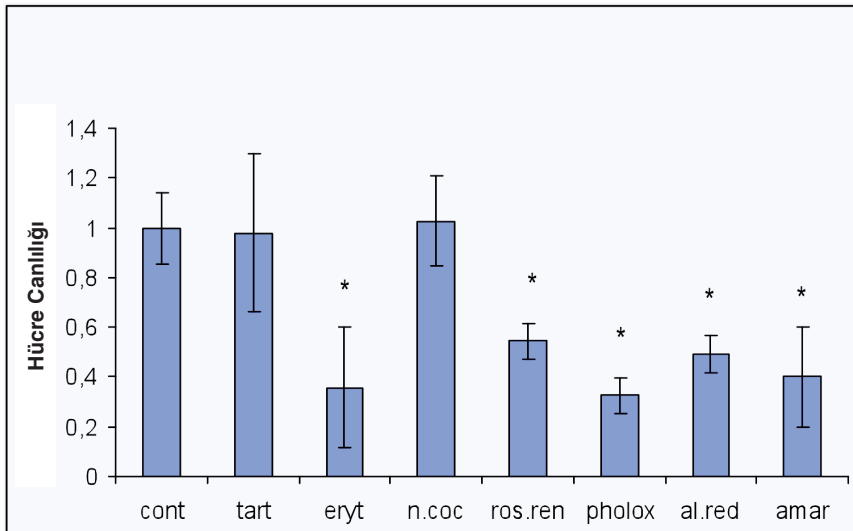
Gıda boyalarına içecekler, süt ürünleri, tahıl ürünleri, fırın ürünleri, çerezler ve dondurma gibi çeşitli gıda ürün- lerinde sık rastlanmaktadır. Bu boyaların kullanımı birçok ülkede yasalarca oldukça sıkı kontrol altındadır. Gı- da boyalarının güvenliğinden emin olmak için düzenlemeler yapılmasına rağmen tüm boyaların olmasa da bir kısmının zararlı ve yan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Örneğin İndigokarminin anafilaksi (aşırı duyarlılık), yüksek tansiyon, düşük tansiyon ve teratogenositiye sebep olduğu araştırmalarca tespit edilmiştir.

Sentetik boyalar gıda katkılarının çok önemli bir bölümünü oluşturur. Bazı sentetik gıda boyaları yasal olarak 1880'lerden beri gıdalara eklenmektedir. Ancak bu boya maddelerinin bazıları, özellikle fazla tüketiliyorsa, in- san sağlığı için potansiyel risk taşır. Bu nedenle kabul edilebilir günlük en yüksek tüketim (ADI) gibi güvenilir veriler, hayvan deneyleri ve insan klinik çalışmalarının temelini oluşturur. Gıda katkılarının insan üzerindeki tok- sik etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar bazı sebeplerden dolayı oldukça zordur. Toksikolojik çalışma- lar hayvanlardaki deneysel sonuçlara bağlıdır (1, 5). Bir gıda katkı maddesinin insan tüketimi için kullanılması- na onun akut, kronik, sub-akut toksiditesi üzerinde yapılan çalışmalardan sonra onay verilir. Bununla beraber o gıda maddesi marketlerde yerini aldıktan sonra da uzun zaman gözlenmeli ve toksikolojik etkilerinin incelen- mesine devam edilmelidir. Çünkü bu bileşenler tüketildikten sonra farklı bileşiklerle interaksiyona girerek yeni toksik riskler yaratabilirler (8). Bu veriler FAO ve WHO tarafından belli aralıklarla tekrar araştırılır ve değerlendirilir (9).

Bu çalışmada kullanılan boyalardan biri olan Tartrazinin MTS testinde canlı hücre sayısını azaltmadığının tes- pit edilmesine rağmen (Grafik 1) birçok araştırmacı mutajenik prosesi stimüle ettiğini (10, 11), hücre canlılığı- nı azalttığını (12), sindirim sisteminde DNA hasarını ADI değerine yakın dozlarda indüklediğini (13) rapor et- miştir. Ayrıca oksidatif strese sebep olan oksijen cisimciklerinin de aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalara rastlanmaktadır (14).

MTS testini uyguladığımız diğer bir boya Eritrosindir. Eritrosinin 1 mM lük konsantrasyonu ile inkübe edilen CHO hücrelerinin canlılığı herhangi bir boya ile inkübasyona tabi tutulmamış aynı hücrelerin canlı kalabilme özellikleriyle karşılaştırıldığında (Şekil 1) istatistik olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Eritrosin ile yapılan bazı toksikolojik ve kanserojenik çalışmalar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Şöyle ki; Eritrosin dalak büyümesine, gözlerde alerjik reaksiyonlara, deri ve mukoz membranlarda tahrişe, solunum hızının artmasına, baş ağrısı, bulantı, dermatit, atopik hastalıklara yol açmakta ve düşük dozlarının bile DNA hasarını indüklediği, belirtilmektedir (15, 16). Bunun dışında eritrosinin de bulunduğu bir gıda boyası karışımıyla beslenen sıçanlardan izole edilen karaciğer hücrelerinde canlı hücre sayısında azalma gözlenmiştir (13).

Çalışmamızda New Coccine ile ilgili elde ettiğimiz sonuç istatistik olarak kontrolden farklı bulunmamıştır (Şekil 1). Ancak bu boyanın kemirgenlerdeki kolon DNA hasarını indüklediği ve bu hasarı ADI değerine yakın dozlarda gerçekleştirdiği, canlı hücre sayısını azalttığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (10-13). New Coccine'in gıda boyası olarak kullanımına ABD'de izin verilmemiştir (17). Amerika'da sadece ilaç ve kozmetikte, Japonya'da ise gıda, ilaç ve kozmetikte kullanımına izin verilen Phloxine'in *Staphylococcus aureus*'un aktivitesini önlediğini gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle bu boyanın antimikrobiyel uygulamalarda kullanılabilirliğini bazı araştırmacılar önermektedir (18). Phloxine'in mutajenik, teratojenik ve kanserojenik olmadığı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration) tarafından belirtilmesine rağmen (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/col-cert.html>), yapılan bir çalışmada farelerde teratojenik etkiye sahip olduğu ve fare fetuslarında iç ve dış organlarda ve iskelette anormalliklere yol açtığı rapor edilmiştir. Ayrıca Phloxine güneş ışığı veya yapay ışıkla karşılaştırıldığında deri hücrelerinin membranlarında hasara sebep olmaktadır (19, 20). Bir başka çalışmada *Schizosaccharomyces pombe* Phloxine ile muamele edildikten sonra proteinin oksidasyon ürünlerinde artış, glutatyon (GSH) oranında ise %50'ye varan azalma gözlenmiştir (21). Bu da Phloxine'nin oksidatif stresin oluşumunu tetiklediğinin bir göstergesidir. Ayrıca bu boya ile yapılan MTS testinde hücre canlılığında %90 azalma gözlenmiştir (22). Bu sonuç bizim Phloxine için bulduğumuz sonuçlarla paralellik göstermektedir. Buna göre Phloxine'in sebep olduğu hücre ölümü, kontrole göre istatistik olarak önemli oranda farklıdır (Şekil 1) ($p < 0.05$).



Şekil 1. Çeşitli gıda boyaalarının hücre canlılığı üzerine etkisinin MTS testi sonucu. Değerler ortalama ± S.S olarak verilmiştir.

*Kontrolle karşılaştırıldığında önemli derecede fark vardır ($p < 0.05$). (n=3/grup).

1948'den beri yalnız Japonya'da kullanılan Rose Bengal'in IgE üretimini etkilediği bilinen bir gerçektir. Ayrıca bu boyanın bazı enzimleri ve sıçan hepatocyteslerindeki RNA sentezini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır (10, 11). Shrestha ve ark. Rose Bengal'in, protein tirozin kinaz ile birlikte proteinlerin hücresel fosforilasyon seviyelerini düzenleyen protein tirozin fosfatazın inhibisyonuna sebep olduğunu bildirmiştir (11). Bu tür yan etkilere sahip olduğu belirlenmiş olan Rose Bengal'in çalışmamızda kullanılan MTS toksikoloji testine verdiği cevap kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistikî olarak önemli derecede toksik bulunmuştur (Şekil 1) ($p<0,05$).

Bu çalışmada kullandığımız boyalardan biri olan Allura Red'in ise MTS testi sonucunda canlı hücre sayısını istatistik olarak önemli oranda azaltmakta olduğu gözlenmiştir (Şekil 1) ($p<0,05$). Bu boya ile ilgili yapılan çalışmaların birinde kemirgenlerdeki DNA hasarını indüklediği tespit edilmiştir (10, 11). Ayrıca karaciğerden izole edilen mitokondrileri %38 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir (23). Allura Red gibi azo boyaları ince bağırsakta absorbe edilmezler. Hepsi intestinal bakteriler tarafından kolonda metabolize olurlar. Bu metabolitler dışkıya geçebilecekleri gibi genel sirkülasyona absorbe olabilir ve idrara geçebilirler (24). Tüm bu olumsuz etkilerine rağmen 1971'den beri Allura Red'in kullanımına genotoksik olmadığı gerekçesiyle ABD'de izin verilmektedir (25, 17). Çalışmamızda canlı hücre sayısını önemli oranda azaltan ($p<0,05$) bir başka gıda boyası Amaranth'dır (Şekil 1). Amaranth'ın sıçan fetusları için toksik ve kanserojenik etkiye sahip olmasının muhtemel olduğu belirtilmektedir. Metabolitlerinden biri olan sodyum naphthionate fetusta sternebral anormalliklere neden olabileceği, diğer bir metaboliti olan R-amino tuzunun da iskelet anormalliklerine yol açabileceği rapor edilmiştir (24). Reyes ve ark. (23) Amaranth'ın karaciğerden izole ettikleri mitokondrileri inhibe etme oranını %20 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca kolonlarda DNA hasarını indüklediğini gösteren bazı çalışmalar da vardır (10, 11).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışma Eritrosin, Rose Bengal, Phloxine, Allura Red ve Amaranth'ın hücre canlılığını önemli derecede azalttığını göstermiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan boyalar gıda endüstrisinde söz konusu olanların sadece bir kısmıdır. Günümüzde kullanılan bütün gıda boyalarının toksik özellikleri kesin olarak belirlenmelidir. Özellikle çocuklar, yaşlılar ve hastaların tükettiği yiyecek ve içeceklerdeki miktar ve çeşidine dikkat edilmelidir. Gıda boyalarının kullanımının gerekli olduğu günümüz koşullarında daha güvenli olanlarının seçilmesi ve bu konuda yapılan araştırmalara verilen önemin artırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Uesugi N, Furumiya K, Mizutani T. 2006. Inhibition Mechanism of UDP- Glucuronosyltransferase 1A6 by Xanthene Food Dyes Journal Of Health Science Vol. 52, No. 5 549-557.
2. Kuno N, Mizutani T. 2005. Influence of Synthetic and Natural Food Dyes on Activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 68 : 16, 1431 – 1444.
3. Ma M, Luo X, Chen B, Su S, Yao S. 2006. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A, Jan. 20 ; 1103 (1) : 170-6.
4. Chen QC, Mou SF, Hou XP, Riviello JM, Ni ZM.1998. Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography. J. Chromatogr. A, Dec. 4 ; 827 (1) : 73-81.
5. Kirschbau J, Krause C, Pfalzgraf S, Brückner H. 2003. Development and evaluation of an HPLC-DAD method for determination of synthetic food colorants. Chromatographia, Vol. 57, Sup. 1 / January, S115-119.
6. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 3, 207–212.
7. Malich G, Markovic B, Winder C. 1997. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. Toxicology, Dec. 31 ; 124 (3) : 179-92.
8. Moutinho ILD, Bertges LC, Assis RVC. 2007. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. Braz. J. Biol. 67 (1) : 141-145.