

PAPER DETAILS

TITLE: Gıda Boyası Tartzaninin A. cepa L. Kök Ucu Hücrelerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerine Karsi Yesil Kahvenin Koruyucu Rolü

AUTHORS: Emine YALÇIN,Tugçe KALEFETOGLU MACAR,Oksal MACAR,Kültigin ÇAVUSOGLU

PAGES: 49-58

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1732670>

Gıda Boyası Tartzaninin *A. cepa* L. Kök Ucu Hücrelerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerine Karşı Yeşil Kahvenin Koruyucu Rolü

Emine Yalçın¹ , Tuğçe Kalefetoğlu Macar²  ✉, Oksal Macar² , Kültiğin Çavuşoğlu¹ 

¹Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28049, Giresun

²Giresun Üniversitesi, Şebinkarahisar Teknik Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknoloji Bölümü, 28400, Giresun

Geliş Tarihi (Received): 04.11.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 12.03.2021

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): tugce.macar@giresun.edu.tr (T. Kalefetoğlu Macar)

☎ 0 454 310 17 10 📠 0 454 310 17 17

ÖZ

Bu çalışma tartzaninin *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı yeşil kahvenin koruyucu rolünü araştırmayı amaçlamıştır. Bu amaçla *A. cepa* bulbları altı gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu deney süresince çeşme suyunda tutulurken; diğer gruplar 365 mg/L yeşil kahve, 730 mg/L yeşil kahve, 200 mg/L tartrazin, 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin ve 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin ile muamele edilmiştir. Tartrazin uygulaması, çimlenme yüzdesi, kök uzaması ve ağırlık artışının azalmasına yol açmıştır. Artan yeşil kahve dozları bu olumsuz etkileri azaltmıştır. Genotoksisitenin araştırılması için kullanılan mitotik indeks tartrazin uygulamasına bağlı olarak azalmıştır. Tartrazin, mikronükleus ve kromozomal anormalliklerin sıklığını artırmıştır. Tartrazin ile birlikte uygulanan yeşil kahve dozları, tartrazinin sebep olduğu genotoksik etkileri azaltmıştır. Tartrazin, membranlarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit miktarında artışa neden olmuştur. Antioksidan savunmanın iki önemli bileşeni olan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktiviteleri tartrazin uygulamasını takiben artmıştır. Tartrazin uygulaması meristematik hücre hasarlarına sebep olmuştur. Artan yeşil kahve dozları, doza bağlı bir şekilde tartrazinin neden olduğu oksidatif stresi ve meristematik hücre hasarlarını azaltmıştır. Çalışma, yeşil kahvenin, tartrazinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde neden olduğu zararlara karşı önemli bir koruyucu rolü olduğunu açıkça göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa*, Genotoksisite, Gıda boyası, Tartrazin, Yeşil kahve

Protective Role of Green Coffee against Cytotoxic and Genotoxic Effects of Food Dye Tartzanine in *A. cepa* L. Root Tip Cells

ABSTRACT

This study aimed to investigate the protective role of green coffee against cytotoxic and genotoxic effects of tartazine on *A. cepa* root tip cells. For this purpose, *A. cepa* bulbs were divided into six groups. While the control group was kept in tap water throughout the experiment, other groups were treated with 365 mg/L green coffee, 730 mg/L green coffee, 200 mg/L tartrazine, 365 mg/L green coffee + 200 mg/L tartrazine and 730 mg/L green coffee + 200 mg/L tartrazine. Tartrazine treatment led to a decrease in germination percentage, root elongation and weight gain. Increasing doses of green coffee reduced these negative effects. Mitotic index used for the investigation of genotoxicity decreased due to tartrazine administration. Tartrazine increased the frequency of micronucleus and chromosomal abnormalities. Green coffee doses applied with tartrazine reduced the genotoxic effects caused by tartrazine. Tartrazine caused an increase in the amount of malondialdehyde, an indicator of lipid peroxidation in membranes. The activities of superoxide dismutase and catalase enzymes, two important components of antioxidant defense, increased following tartrazine administration. Tartrazine application caused meristematic cell damages. Increasing doses of green coffee decreased the oxidative stress and meristematic cell damages induced by tartrazine.

in a dose-dependent manner. The study clearly demonstrated that green coffee has an important protective role against the damage caused by tartrazine in *A. cepa* root tip cells.

Keywords: *Allium cepa*, Genotoxicity, Food dye, Tartrazine, Green coffee

GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri, Avrupa Birliği Yönetmeliği EC 1333/2008 tarafından, tek başına gıda olarak kullanılmayan; ancak gıdalara lezzet ya da renk vermek, gıdaları korumak ya da gıdalardaki asitliği düzenlemek için eklenen maddeler olarak tanımlanmaktadır [1]. Öte yandan, Codex Alimentarius [2]'a göre gıda katkı maddeleri, besleyici değerleri olup olmadığına bakılmaksızın gıdalara imalat, işleme, hazırlama, paketlenme, taşıma ya da saklama sırasında teknolojik bir amaç için eklenen, kendileri ya da yan ürünleri gıdanın bir parçası haline gelen veya gıdaların niteliklerini etkileyen maddeler olarak ifade edilmektedir. Kıvam arttırıcı, stabilizatör, emülgatör veya yapışma önleyici maddeler olarak da işlev gören binlerce farklı gıda katkı maddesi doğal, sentetik veya yarı sentetik olabilmektedir. Son yıllarda gıda katkı maddelerinin kullanımındaki artış sonucunda günümüz beslenmesindeki gıdaların % 75'inin sanayileşmiş gıdalardan oluştuğu tahmin edilmekte [3]; ancak bunların içeriğindeki gıda katkı maddelerinin ksenobiyotik maddeler olma riski endişe uyandırmaktadır [1].

Gıda katkı maddelerinin en büyük sınıfı olan yapay renklendiriciler, özellikle azo (N=N) boyalar, gıda endüstrisinde uzun yıllardır görünümü, rengi ve dokuyu değiştirmek ya da gizlemek için içeceklerde, şekerlemelerde ve fırıncılık ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [4]. Bu yapay boyalar; hem oksijene ve pH'a karşı dayanıklılıkları hem de düşük maliyetleri nedeniyle doğal boyalara karşı özellikle tercih edilmektedir [5]. E102 kodu ile bilinen tartrazin ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$), gıda maddelerinin görünümünü ve rengini iyileştiren besinleri daha iştah açıcı ve çekici hale getiren sentetik bir azo boyadır [6, 7]. Sarı renkli bir gıda katkı maddesi olarak; alkolsüz içecekler, soslar, aromalı cipsler, dondurmalar, jöleler, reçeller ve sakızlar gibi pek çok gıda maddesinde yaygın olarak kullanılmakta ve düşük maliyetinden dolayı da birçok gelişmekte olan ülkede safran yerine tercih edilmektedir [8]. Kömür katranından kimyasal sentezle elde edilir ve gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılır [9].

Sentetik gıda boyalarının kullanımının sıçanlarda böbrek bozukluklarına, hepatotoksisiteye, anemiye, lökopeniye, astım ataklarına, kurdeşenlere ve enzim fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [10]. Tartrazinin de içinde olduğu bu maddelerin alerjenik, klastojenik, mutajenik ve kanserojen etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar mevcut olduğundan; sentetik gıda boyaları, maksimum tüketici güvenliği için hem uzun hem de kısa süreli biyokimyasal, mutajenik ve akut toksisite testleri gibi çok sayıda araştırmaya tabi tutulmalıdır [11].

Dünyada yaygın olarak tüketilen kahvenin üretildiği kahve çekirdekleri; *Rubiaceae* familyasının her dem yeşil çalı türlerinden olan *Coffea arabica* ve *Coffea canephora* var. *robusta*'dan elde edilen kavrulmamış tohumlardır [12]. Kavrulmuş kahvenin demlenmesi ile elde edilen kahvenin popülerliğine rağmen; yeşil kahve, zengin besin değerleri ile son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmiştir. Yeşil kahvede bulunan mineraller, kafein ve klorojenik asitler, in vivo hayvan ve insan çalışmalarında gözlenen anti-inflamatuar, anti-obezite ve diğer etkiler gibi faydalı sağlık etkileri nedeniyle odak noktası haline gelmiştir [12-14]. Sıçanlarda hipotansif etki gösteren ve iş organlarındaki yağları ve vücut ağırlığını azalttığı belirlenen yeşil kahvenin; kafeine ek olarak teofilin, teobromin, tokoferoller, kafestol, kahveol ve trigonellin gibi antioksidan bileşikler bakımından da oldukça zengin olduğu belirlenmiştir [15].

Allium cepa L. az sayıdaki büyük boyutlu kromozomları ($2n = 16$) ve kök meristem hücrelerindeki kısa hücre döngüsü sebepleri ile sitotoksikite ve genotoksikite çalışmaları için oldukça popüler bir bitkisel test materyali haline gelmiştir [16-18]. *A. cepa* kökleri test edilecek materyallerin çözeltileri ile doğrudan temas halinde olduğundan; bu sistem özellikle de genetik materyalin olası hasarını izlemek için oldukça başarılı olarak kabul edilmektedir. Literatürde tartrazinin *A. cepa* kök meristematik hücrelerindeki toksik etkilerini gösteren az sayıda çalışmaya [19, 20] rastlansa da; olası toksisiteye karşı yeşil kahvenin koruyucu etkisi üzerinde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı; *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde tartrazin boyasının sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı yeşil kahvenin koruyucu ve iyileştirici fonksiyonlarını araştırmaktır. Bu amaçla tartrazin ve yeşil kahve çözeltileri ile muamele edilen soğanlarda fizyolojik parametreler olarak çimlenme yüzdesi, kök uzaması ve ağırlık kazanımı; genotoksikite parametreleri olarak ise mitotik indeks (MI), mikronükleus (MN) oluşumu ve kromozomal anormallik (KA) sıklığı incelenmiştir. Hücrelerdeki oksidatif stres seviyesini belirlemek için malondialdehit (MDA) seviyesi ile antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzimlerinin toplam aktivite düzeyleri araştırılmıştır. Tartrazinin ve yeşil kahvenin meristematik dokudaki yapısal bütünlüğe etkisi, kök uçlarından alınan enine kesitlerin incelenmesi ile belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Materyallerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *A. cepa* soğanları Güre / Giresun'da bir yerel marketten satın alınmıştır. Yaklaşık olarak aynı büyüklükte (13.25-13.48 g) olacak şekilde seçilen soğanlar laboratuvarında en dış kısımlarında bulunan kuru yapraklarından ve tabla gövdedeki eski

köklerinden arındırılarak temizlenmiştir. Soğanlar biri kontrol ve beşi deney grupları olmak üzere her birinde 50 birey bulunan altı gruba (n=50) ayrılmıştır (Tablo 1). Soğanlar, deney süresince, uygun çözeltileri içeren steril cam beherlerde, $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 72 saat boyunca karanlık koşullarda köklendirilmiştir. Beherlerdeki çözelti seviyeleri günlük kontroller ile deney süresince sabit tutulmuştur. Grup I çalışma boyunca çeşme suyu ile muamele edilirken; Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI sırasıyla 365 mg/L yeşil kahve, 730 mg/L yeşil kahve, 200 mg/L tartrazin, 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin ve 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin çözeltileri ile muamele edilmiştir. Tartrazin ve

yeşil kahve çözeltileri, ticari olarak satın alınan %85'lik Tartrazin (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) ve saf yeşil kahve çekirdek ekstresi (Sepe Natural Organik Ürünler San. ve Tic. A.Ş., İzmir, Türkiye) kullanılarak hazırlanmıştır. Taşlı ve ark. [20], A. cepa üzerinde 200 mg/L tartrazinin belirgin sitogenetik etki gösterdiğini tespit etmiştir. Buna ek olarak; Türk Gıda Kodeksi'nde E102 kodu verilen tartrazin boyasının sadece ön pişirme yapılmış kabuklularda 250 mg/L'ye, diğer gıdalarda ise 100 mg/L'ye kadar kullanılabileceği belirtilmiştir [21]. Araştırmada kullanılan tartrazin dozunun belirlenmesinde bahsi geçen kaynaklar esas alınmıştır.

Tablo 1. Deneyde kullanılan gruplar ve uygulamalar

Table 1. Groups and applications used in the experiment

Gruplar	Uygulamalar
Grup I (Kontrol)	Çeşme suyu
Grup II	365 mg/L yeşil kahve
Grup III	730 mg/L yeşil kahve
Grup IV	200 mg/L tartrazin
Grup V	365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin
Grup VI	730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin

Fizyolojik Analizler

Çimlenme yüzdesinin (%) belirlenmesi için her gruptan 50 birey kullanılmış ve tabla gövdeden ek kök çıkışı “çimlenme” olarak kabul edilmiştir (Eşitlik 1) [22].

Gruplara ait ortalama toplam ağırlık kazancının belirlenmesi için her gruptan rastgele seçilen 10 soğan

dikkate alınmıştır. Toplam ağırlık kazancı (g) soğanların deney sonundaki ağırlığından, deney başlangıcındaki ağırlığının çıkarılması ile belirlenmiştir.

Gruplara ait ortalama kök uzamasının (cm) belirlenmesi için her gruptan rastgele seçilen 10 soğandan toplamda 100 ek kökün uzunluğu bir cetvel yardımı ile ölçülmüştür.

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = (\text{Çimlenen Tohum Sayısı} / \text{Toplam Tohum Sayısı}) \times 100 \text{ (Eşitlik 1).}$$

Genotoksisite Analizleri

Tartrazin ve yeşil kahvenin A. cepa kök ucu hücrelerindeki genotoksisite potansiyelini belirlemek için mitotik indeks (MI), mikronükleus (MN) ve kromozomal anormallik (KA) analizleri yapılmıştır. Genotoksisite parametrelerinin ölçülmesi için kök uçlarından 1 cm'lik parçalar kesilmiştir. 3:1 oranında glasiyel asetik asit:etanol çözeltisi (Clarke çözeltisi) ile 2 saat boyunca fikse edilen kök uçları daha sonra 15 dakika boyunca %96'lık etanol ile muamele edilmiştir. Bu işlemi takiben distile su ile yıkanan kökler %70'lik etanol içinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan stok kimyasallar Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) firmasına aittir. Buzdolabından alınan kök uçları 60°C 'lik su banyosunda, 1 N HCl (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) çözeltisi içinde 13 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemi tamamlanan kök uçlarından kesilen 1 cm'lik parçalar %1'lik aseto-karmin boyası (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) ile 24 saat boyunca boyanmaya bırakılmıştır. Boyama işleminden sonra mikroskop slaytlarını hazırlamak için 2 mm'lik kök uçları 1 damla %45 asetik asit (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) çözeltisi kullanılarak ezilmiştir. Slaytlar binoküler araştırma mikroskopunda X500 büyütmede incelenmiş ve fotoğraflanmıştır [23].

KA ve MN analizleri her grup için tek bir kök ucu içeren 10'ar adet slayt hazırlanarak yapılmıştır. KA ve MN sıklıkları için her gruba ait 10 slaytta rastgele seçilen alanlardan mitoz aşamasındaki 100'er hücre, toplamda ise 1.000 hücre taranmıştır. MI analizi için ise her grup için hazırlanan 10 slaytta yine rastgele seçilen alanlardan 1.000'er hücre, toplamda ise 10.000 hücre incelenmiştir. Sayılan toplam 10.000 hücre içindeki mitoz bölünme halindeki hücrelerin sayısı, MI sonucunu vermiştir. Hücrelerde görülen yapıların MN olarak kabul edilmesi için “a) MN çapı hücre ana nükleusu çapının en az 1/3'ü olmalıdır, b) MN oval ya da yuvarlak olmalı ve en az hücre ana nükleusu kadar boyanmış olmalıdır, c) MN ve hücre ana nükleusu temas etseler bile bu iki yapı üst üste çakışmamalıdır” kriterlerine uyulmuştur [24]. Çekilen fotoğraflarda MN çapının hücre ana nükleusu çapına oranı Digimizer v 4.5. yazılımı (MedCalc Software, Belgium) ile analiz edilmiştir.

Biyokimyasal Analizler

Tartrazin ve yeşil kahvenin A. cepa kök ucu hücrelerindeki lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlere karşı etkisini izlemek için malondialdehit (MDA) seviyesi ile toplam süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm biyokimyasal analizler her grup için 3 kere tekrar edilmiştir.

Uygulamaların hücre zarlarındaki etkisini belirlemek için membranlardaki lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA miktarı ölçülmüştür. MDA seviyesini belirlemek için 0.5 g kök ucu örneği %5'lik trikloroasetik asit (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) çözeltisinde, oda sıcaklığında, havan aracılığı ile homojenize edilmiştir. 12000 rpm'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlenen homojenatların süpernatant kısımları toplandıktan sonra, eşit hacimdeki süpernatant ile %20'lik trikloroasetik asit ve %0.5'lik tiobarbitirik asit (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) çözeltisi karıştırılmıştır. Taze hazırlanan bu karışımlar 30 dakika boyunca +96°C'lik su banyosunda ısıtıldıktan sonra tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyonlar durdurulmuştur. 10000 rpm'de, oda sıcaklığında, 5 dakikalık santrifüj işleminden sonra süpernatantlar toplanmış ve MDA miktarının belirlenmesi için spektrofotometrede 532 nm'de okunmuştur. MDA miktarları, spesifik ekstinksiyon katsayısı ($155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{M/g}$ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır.

Toplam enzim aktivitelerinin belirlenmesi için SOD [EC 1.15.1.1] ve KAT [EC 1.11.1.6] enzimleri 0.5 g'lık kök materyalinden aynı yöntemle ekstrakte edilmiştir [25]. Uygulamaların bitiminden sonra kesilerek distile su ile yıkanan kökler sıvı azotta havanda iyice ezilmiştir. Daha sonra kök materyalleri 5 mL sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.8)'na alınarak homojenize edilmiştir. Taze hazırlanan bu homojenatların 14000 rpm'de, +4°C'de, 20 dakika boyunca santrifüjlenmesinden sonra enzimleri içeren süpernatant kısımları tüplerden toplanmıştır.

Toplam SOD aktivitesini belirlemek için 0.01 mL enzim ekstraktı; 7.8 pH'a sahip 1.5 mL sodyum fosfat tamponu (0.05 M), 0.3 mL metionin (130 mM), 0.3 mL riboflavin (20 μM), 0.3 mL EDTA- Na_2 (0.1 mM), 0.3 mL nitroblue tetrazolium klorür (750 μM), 0.01 mL polivinilpirolidon (%4) ve 0.28 mL distile su karışımına eklenmiştir. Enzim içeren özütün eklenmesini takiben yeni karışım, katalizin gerçekleşmesi için, 15 dakika, 375 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ floresan ışığa maruz bırakılmıştır. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunmuş ve her grup için ortalama toplam SOD aktivitesi IU/mg protein olarak hesaplanmıştır [26].

Toplam KAT aktivitesini belirlemek için 0.2 mL enzim ekstraktı; 1.5 mL sodyum fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.8), 1.0 mL distile su ve 0.3 mL hidrojen peroksit (0.1 M) içeren reaksiyon karışımına eklenmiş ve böylece enzimatik tepkime başlatılmıştır. KAT aktivitesi 240 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma izlenerek spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamındaki hidrojen peroksidin enzimatik olarak giderilmesi, IU/mg protein olarak hesaplanmıştır [27]. SOD ve KAT enzim aktivitelerinin analizlerinde kullanılan tüm çözeltiler Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) firmasına ait stoklar kullanılarak hazırlanmıştır.

Meristematik Hücre Hasarının Belirlenmesi

Uygulama süresinin sonunda tartrazin ve yeşil kahve çözeltilerinin *A. cepa* köklerinin meristematik hücrelerindeki etkisini belirlemek için distile su ile yıkanan köklerden kök şapkaları uzaklaştırılmıştır.

Bistüri yardımı ile köklerin meristematik bölgesinden enine kesitler alınmış ve hücreleri boyamak için kök kesitlerine %5'lik metilen mavisi (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) damlatılmıştır. Boyanmış kök kesitlerini içeren lamalar binoküler araştırma mikroskopunda X500 büyütmede incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Analizlerden elde edilen veriler SPSS 23.0 yazılımı kullanılarak one-way ANOVA ve Duncan testleri ile ortalamalar arasındaki farklılıkların önem kontrolü ($p < 0.05$) açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Tartrazin ve yeşil kahvenin fizyolojik parametreler üzerine etkilerini incelemek için; çimlenme yüzdesi (%), kök uzunluğu (cm) ve ağırlık kazanımı (g) araştırılmıştır. Kontrol grubu (Grup I) ile farklı dozlarda yeşil kahve uygulaması yapılan Grup II ve Grup III'te fizyolojik parametreler bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark ($p < 0.05$) gözlenmemiştir (Tablo 2). Bu durum; yeşil kahvenin *A. cepa* kök ucu hücrelerinin büyüme fizyolojisinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Buna karşın; tartrazin ile muamele edilen Grup IV üyelerinde çimlenme yüzdesinin %45'e gerilediği görülmüştür. Aynı gruptaki soğanların kök uzaması ve ağırlık kazanımı; hem kontrol grubuna (Grup I) hem de yeşil kahve uygulanan (Grup II ve III) gruplara göre istatistiksel olarak önemli derecede ($p < 0.05$) azalma göstermiştir. Tartrazin ile muamele edilen grubun kök uzaması kontrol grubunun yaklaşık olarak dörtte biri iken; ağırlık artışı kontrol grubunun yaklaşık olarak dokuzda biri olarak belirlenmiştir. Tartrazin ile birlikte 365 mg/L yeşil kahve (Grup V) verilen gruptaki çimlenme yüzdesi %58; tartrazin ile birlikte 730 mg/L yeşil kahve uygulanan (Grup VI) gruptaki çimlenme yüzdesi ise %75 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; artan dozlardaki yeşil kahvenin, tartrazinin sebep olduğu çimlenme inhibisyonunun iyileşmesine önemli katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Tartrazinin sebep kök uzaması inhibisyonu; tartrazinle beraber uygulanan yeşil kahve sayesinde, hem Grup V'te (5.50 ± 1.34 cm) hem de Grup VI'da (7.30 ± 1.52 cm), Grup IV'e göre, istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) iyileşme göstermiştir. Benzer şekilde; ağırlık kazanımı da sadece tartrazin uygulanan Grup IV'e ($+1.00$ g) göre Grup V'te ($+3.78$ g) ve Grup VI'da ($+6.10$ g), artan yeşil kahve dozlarına bağlı olarak, önemli artış ($p < 0.05$) sergilemiştir. Taşlı ve ark. [20]; çalışmamıza benzer şekilde, tartrazinin farklı dozlarının *A. cepa* soğanlarında çimlenme yüzdesini, kök uzamasını ve ağırlık artışını azalttığını ve bu inhibisyonun 200 ppm'lik dozda en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir. Bu olumsuz etki; sentetik boyanın, proteinlerle ve dolayısıyla büyüme ve gelişmede rol oynayan enzimlerle kovalent olarak reaksiyona girerek, proteinlerde konfigürasyon bozulmasına ve işlev kaybına yol açmasından kaynaklanıyor olabilir [10]. Yeşil kahvenin *A. cepa*'da tartrazine karşı koruyucu etkisini gösteren başka bir

çalışmaya rastlanmamıştır. Fizyolojik parametrelerde yeşil kahvenin dozuna bağlı olarak artan iyileşme miktarı; büyük ölçüde yeşil kahvenin içeriğinde bulunan fitokimyasallardan kaynaklanmaktadır. Zengin biyoaktif

bileşik içeriği ve geçiş metallerini azaltıcı yeteneği; yeşil kahveye eşsiz bir antioksidan kapasite kazandırmakta [28] ve antioksidan yeteneğin sağlıklı bir büyüme ve gelişme açısından önemi bilinmektedir.

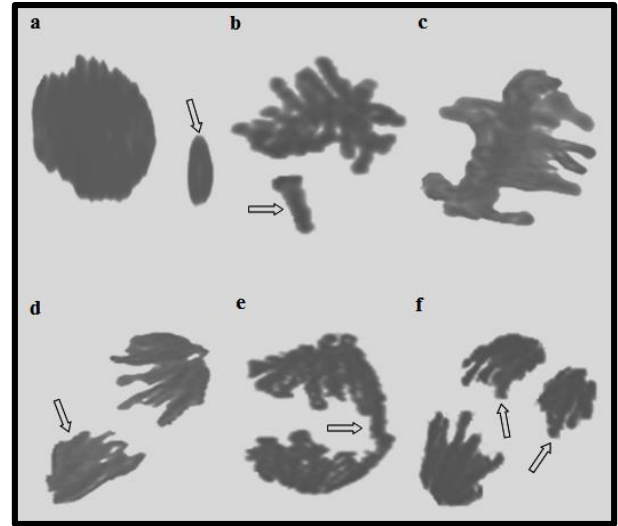
Tablo 2. Tartrazin ve yeşil kahvenin seçilen fizyolojik parametreler üzerine etkisi

Table 2. Effect of tartrazine and green coffee on selected physiological parameters

Gruplar	Çimlenme Yüzdesi (%)	Kök Uzunluğu (cm)	Ağırlık Kazanımı (g)
Grup I	98	11.50±1.93 ^a	+8.50 ^a (13.37±2.45-21.87±2.96)
Grup II	100	11.60±2.10 ^a	+8.80 ^a (13.48±2.36-22.28±2.98)
Grup III	100	11.80±2.24 ^a	+8.96 ^a (13.25±2.38-22.21±2.92)
Grup IV	45	3.00±1.12 ^d	+1.00 ^d (13.45±2.34-14.45±2.36)
Grup V	58	5.50±1.34 ^c	+3.78 ^c (13.30±2.44-17.08±2.44)
Grup VI	75	7.30±1.52 ^b	+6.10 ^b (13.35±2.40-19.45±2.62)

*Grup I: Kontrol, Grup II: 365 mg/L yeşil kahve, Grup III: 730 mg/L yeşil kahve, Grup IV: 200 mg/L tartrazin, Grup V: 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin, Grup VI: 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. Çimlenme yüzdesinin belirlenmesinde 50 adet, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımının tespiti için ise 10 adet soğan kullanılmıştır. Aynı sütun içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar p<0.05'de önemlidir.

Tartrazinin *A. cepa* kök meristematik hücrelerindeki genotoksik etkisi ile yeşil kahvenin bu toksisiteye karşı koruyucu etkisi mitotik indeks, mikronükleus sıklığı ve kromozomal anormallik yoğunluğu parametreleri aracılığıyla incelenmiştir. Kontrol grubu (Grup I) ile artan dozlarda yeşil kahve uygulanan Grup II ve Grup III'te genotoksik parametreleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark (p<0.05) olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3). Bu sonuca göre; uygulanan yeşil kahve dozları *A. cepa* kök ucu hücrelerinde herhangi bir genotoksik etkiye sahip değildir. Mİ mitotik bölünme aşamasındaki hücrelerin; MN varlığı ise genotoksik stresin ve kromozomların ayrılmasındaki hataların önemli göstergeleridir [16, 29]. Tartrazin uygulanan Grup IV'te Mİ (525.70±16.30), kontrole (880.00±24.36) göre, istatistiksel olarak önemli derecede (p<0.05) azalmıştır. Tartrazin; Grup IV'teki MN sıklığının (33.00±4.12), kontrole (0.30±0.48) göre önemli miktarda artmasına (p<0.05) yol açmıştır. Tartrazinin *A. cepa*'da sebep olduğu MN dışındaki kromozomal anormallikler en sık görüldenden en nadir görülene doğru sırasıyla fragment, yapışkan kromozom, kromatinin eşit olmayan dağılımı, köprü ve çok kutuplu anafazdır (Şekil 1). MN oluşumunun, hücre bölünmesinin sonraki aşamalarında kırılabilir ve fragment oluşumu için potansiyel riskler haline gelebilecek köprülerin katkısının bir sonucu olarak arttığı belirtilmiştir [30]. Tartrazin uygulamasını takiben MN oluşumundan sonra en sık görülen kromozomal anormallik tipi olan fragment (35.80±3.85); kromatidlerdeki ve kromozomlardaki kırıklardan kaynaklanmaktadır [31]. Tartrazinin tetiklediği diğer kromozom bozuklukları olan yapışkan kromozom (28.30±2.96) ve köprü (15.00±2.25), bir kimyasal ajanın mutajenitesini gösteren önemli belirteçler olarak kabul edilmektedir [32]. En fazla miktarda tartrazin uygulanan Grup IV'te görülen kromatinin eşit olmayan dağılımı (23.50±2.80); anafaz sırasında kromatidlerin ayrılamamasından kaynaklanmaktadır [33]. Tartrazinden kaynaklanan çok kutuplu anafaz oluşumunun (8.60±1.20) iğ ipliklerinin tamamen parçalanması neticesinde gerçekleşebileceği ve tüm kromozomal bozukluklar neticesinde MN oluşumunun tetiklendiği belirtilmiştir [34].



Şekil 1. Tartrazinin teşvik ettiği kromozomal hasarlar (a: MN, b: fragment, c: yapışkan kromozom, d: kromatinin eşit olmayan dağılımı, e: köprü, f: çok kutuplu anafaz)

Figure 1. Chromosomal damage promoted by tartrazine (a: MN, b: fragment, c: adhesive chromosome, d: unequal distribution of chromatin, e: bridge, f: multipolar anaphase)

Tartrazinin *A. cepa*'daki toksik etkilerini gösteren bir çalışmada; tartrazin, sonuçlarımıza benzer şekilde, ciddi sitotoksik ve klastojenik etkiye sebep olmuş, Mİ önemli azalma göstermiş, MN önemli artış sergilemiş ve lag kromozom, yapışkan kromozom ve C-mitoz gibi kromozomal bozukluklar görülmüştür [19]. Taşlı ve ark. [20], yine sonuçlarımızla benzer şekilde, tartrazinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde fragment, yapışkan kromozom, köprü, kromatinin eşit olmayan dağılımı ve C- mitoz şeklinde kromozomal hasarların oluşumuna yol açtığını göstermiştir. Tartrazin gibi gıda katkı maddelerine maruz kalma, gen mutasyonu ve kromozomal sapma şeklindeki mutajenite ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [35]. Bu çalışmada tartrazin ile birlikte yeşil kahve çözeltilerine maruz bırakılan gruplarda tartrazin kaynaklı genotoksikitenin azaldığı açık şekilde

görülmüştür. Tartrazin çözeltisine katılan 365 mg/L yeşil kahve uygulanan Grup V'teki MI 598.20 ± 18.57 ve MN sıklığı ise 25.00 ± 3.76 olarak belirlenmiş olup; bu değerler sadece tartrazin uygulanan Grup IV'e göre istatistiksel olarak önemli derecede düşüktür ($p < 0.05$). Benzer şekilde, tartrazin çözeltisine katılan 730 mg/L yeşil kahve uygulanan Grup VI'daki MI (650.40 ± 20.24) ve MN sıklığı (19.40 ± 2.88) sadece tartrazin uygulanan Grup IV'e göre önemli derecede düşük olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Kromozomal bozuklukların sayısal değerleri incelendiğinde; yüksek dozdaki yeşil kahvenin (Grup VI) iyileştirici etkisi düşük dozdaki yeşil kahveye (Grup V) göre önemli seviyede daha yüksektir

($p < 0.05$). İnsan kalın bağırsak ve karaciğer hücrelerinin kültürlerinde yapılan bir çalışmada yeşil kahve ekstraktı ve klorojenik asidin hidrojen peroksit tarafından indüklenen DNA hasarlarını önemli miktarda azalttığı gösterilmiştir [36]. Bu iyileştirici etki sebebiyle yeşil kahve ekstraktı, fonksiyonel gıda olarak, ekmek gibi çeşitli gıdalara katılmakta ve böylece yeşil kahvenin antigenotoksik özelliğinden yararlanılmaktadır [37]. Yeşil kahve içeriğinde bulunan klorojenik asitlerin, son on yılda, insan ve hayvan metabolizmasındaki anti-enflamatuvar, antioksidan, anti-diyabetik, anti-obezite ve anti-kanserojen etkileri sebebiyle kullanılabileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur [38, 39].

Tablo 3. Tartrazinin teşvik ettiği genotoksisiteye karşı yeşil kahvenin koruyucu rolü

Table 3. Protective role of green coffee against tartrazine-induced genotoxicity

Hasarlar	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
MN	0.30 ± 0.48^d	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	33.00 ± 4.12^a	25.00 ± 3.76^b	19.40 ± 2.88^c
MI	880.00 ± 24.36^a	870.30 ± 23.95^a	896.40 ± 24.58^a	525.70 ± 16.30^d	598.20 ± 18.57^c	650.40 ± 20.24^b
FRG	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	35.80 ± 3.85^a	27.40 ± 3.21^b	21.60 ± 2.83^c
YK	0.40 ± 0.58^d	0.36 ± 0.48^d	0.16 ± 0.33^d	28.30 ± 2.96^a	21.50 ± 2.75^b	15.90 ± 2.38^c
KED	0.24 ± 0.46^d	0.12 ± 0.28^d	0.00 ± 0.00^d	23.50 ± 2.80^a	14.20 ± 1.84^b	19.40 ± 1.24^c
K	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	15.00 ± 2.25^a	9.30 ± 1.32^b	5.40 ± 0.94^c
ÇKA	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	8.60 ± 1.20^a	5.20 ± 0.86^b	2.10 ± 0.68^c

*Grup I: Kontrol, Grup II: 365 mg/L yeşil kahve, Grup III: 730 mg/L yeşil kahve, Grup IV: 200 mg/L tartrazin, Grup V: 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin, Grup VI: 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir (n=10). MN sıklığı her grupta 1.000 hücre, kromozomal hasar sıklıkları ise her bir gruptaki, her bir kök ucundan 100 hücre, toplamda ise 1.000 hücre analiz edilerek hesaplandı. Aynı satır içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar $p < 0.05$ 'de önemlidir. MN: mikronükleus, MI: mitotik indeks, FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, K: köprü, ÇKA: çok kutuplu anafaz.

Yeşil kahvenin tartrazin tarafından teşvik edilen oksidatif strese karşı koruyucu etkisini ölçmek için MDA miktarı ile SOD ve KAT enzim aktiviteleri analiz edilmiştir. İlk üç grubun MDA miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4). Tartrazin uygulanan gruptaki (Grup IV) MDA seviyesi kontrol grubunun yaklaşık olarak 3.1 katına çıkmış ve tartrazin ile birlikte 365 mg/L yeşil kahve uygulanan Grup V'teki MDA seviyesi 22.60 ± 2.65 μ M/g TA ve tartrazin ile birlikte 730 mg/L yeşil kahve uygulanan Grup VI'daki MDA seviyesi 15.90 ± 1.92 μ M/g TA olarak hesaplanmıştır. Grup V ve VI'nın MDA miktarlarında gözlenen bu azalma hem birbirlerine hem de Grup IV'e göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). MDA, üç veya daha fazla çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan ve biyolojik membranlardaki bütünlüğün hasar gördüğünü gösteren bir bileşik olarak, oksidatif stres varlığına işaret etmektedir [40]. Buna ek olarak; MDA'nın ikincil bir haberci olarak bitki savunma sistemlerinin de önemli bir parçası olduğunu belirtmek gerekir [41]. Deney hayvanlarında gerçekleştirilen çalışmalarda; bu çalışmanın sonuçları ile benzer şekilde, yüksek dozda tartrazin uygulaması MDA artışı ile sonuçlanmıştır [42, 43]. Yine çalışmamızın sonuçları ile paralel şekilde, yeşil kahvenin, içerdiği fenolik bileşikler sayesinde, plazma antioksidan kapasitesini artırarak, insan plazmasındaki MDA oranını düşürdüğü belirlenmiştir [44]. Benzer şekilde, yeşil kahvenin dişi sıçanların karaciğer, beyin ve böbrek dokularında okratoksin A tarafından teşvik edilen oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığı ve MDA ile ölçülen lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir [45].

Biyolojik organizmalar; oksidatif stresi oluşturan serbest radikallerin potansiyel tehlikelerine karşı SOD ve KAT enzimlerinin de dahil olduğu pek çok antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. SOD enzimi, membran lipidlerine saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatan süperoksit radikalının hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizlerken; KAT enziminin olağanüstü hızlı aktivitesi sayesinde; hidrojen peroksit, suya ve oksijene indirgenmektedir [46]. Sadece yeşil kahve dozları ile muamele edilen Grup II ve Grup III'te SOD ve KAT aktiviteleri kontrol grubu (Grup I) ile istatistiksel olarak fark göstermemiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4). Grup II ve III'teki MDA seviyeleri ile SOD ve KAT aktivitelerinin kontrole göre önemli bir fark göstermemesi; bu çalışmada uygulanan en yüksek yeşil kahve dozu olan 730 mg/L yeşil kahvenin (Grup III) dahi prooksidan etkiye sebep olacak kadar yüksek bir doz olmadığını düşündürmektedir. Buna karşın tartrazin uygulanan Grup IV'teki SOD enzim aktivitesi kontrol grubunun yaklaşık 2.5 katına; KAT aktivitesi ise kontrol grubunun yaklaşık 2 katına çıkmıştır. Sonuçlarımızın tersine; tartrazinin deney hayvanlarında SOD ve KAT aktivitelerini azalttığını gösteren çalışmalar olduğu gibi [8, 47]; SOD aktivitesini azaltıp KAT aktivitesini arttırdığı çalışmalara da rastlanılmıştır [48]. Rahal ve ark. [49] serbest radikal oluşturarak ya da antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif strese sebep olan her türlü endobiyotik ya da ksenobiyotik maddeyi prooksidan olarak tanımlamış ve antioksidan rolleri ile bilinen flavonoidlerin bile farklı ortam koşullarında prooksidan olarak davranabildiğine dikkat çekmiştir. Uygulanan tartrazin dozu ile birlikte gerçekleşen SOD ve KAT enzim aktiviteleri artışı; tartrazinin A. cepa hücrelerindeki

prooksidan etkisinin, antioksidan sistemleri inhibe etmekten ziyade serbest radikal oluşumunu tetiklemesinden ileri geldiğini düşündürmektedir. Buna ek olarak; Grup IV'te ortaya çıkan oksidatif stresin etkisini membran hasarını gösteren MDA seviyesindeki artıştan görmek de mümkündür. Grup IV ile kıyaslandığında, tartrazin ile birlikte verilen yeşil kahve dozları SOD aktivitesini Grup V'te 30.38 ± 2.75 IU/mg protein, Grup VI'da ise 25.73 ± 2.63 IU/mg protein seviyelerine düşürmüştür. Bununla beraber; Grup V'teki KAT aktivitesi (14.73 ± 1.82 IU/mg protein) ile Grup VI'daki KAT aktivitesi (11.60 ± 1.24 IU/mg protein) Grup IV'e göre önemli derecede azalmıştır ($p < 0.05$). Ancak; tartrazin ile birlikte verilen yeşil kahve dozlarına rağmen her iki enzimin aktivitesi hiçbir zaman kontrol seviyesine kadar gerilememiştir. Yine de bu iki gruptaki (Grup V ve VI) aktivitelerin Grup IV'e göre önemli ölçüde azalması; yeşil kahve içeriğinde bulunan klorojenik asit gibi fenolik ve flavonoid bileşiklerin antioksidan savunmaya katkısı ve yeşil kahve özütlerinin geçiş metal iyonlarını azaltma kapasitesi ile açıklanabilir [28]. Ayrıca; yeşil kahve

içerisinde önemli miktarda bulunan bakır ve mangan elementlerinin, endojen antioksidanların ve süperoksit dismutaz (SOD1, SOD2 ve SOD3) gibi radikal temizleyicilerin önemli parçaları olduğu bildirilmiştir [15]. Bu gruplarda artan yeşil kahve dozu ile beraber; MDA seviyelerinin ve kromozomal bozuklukların genelinde azalması ile hücre bölünmesinin artması; hücre içi oksidatif stresin baskılandığını düşündürmüştür. Sonuçlarımızın aksine; AL-Megrin ve ark. [50], sıçanlarda, uygulanan stres kaynağına bağlı olarak düşen SOD ve KAT aktivitelerini yeşil kahve uygulamasının artırdığını göstermiştir. Ayrıca, Nogaim ve ark. [45], yine sıçanlarda, okratoksin A uygulamasını takiben KAT aktivitesinin arttığını; SOD aktivitesinin ise azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmada, okratoksin A ile aynı anda uygulanan yeşil kahve; MDA miktarı ve KAT aktivitesini azaltırken SOD aktivitesini ise arttırmıştır. Literatürde mevcut çalışmalar arasındaki farklılıkların; model organizmaya, uygulanan doza, stresin kaynağına, uygulamanın süresine ve şekline bağlı olarak değiştiği söylenebilir.

Tablo 4. Tartrazin ve yeşil kahvenin seçilen biyokimyasal parametreler üzerine etkisi

Table 4. The effect of tartrazine and green coffee on selected biochemical parameters

Grup	MDA ($\mu\text{M/g TA}$)	SOD (IU/mg protein)	KAT (IU/mg protein)
Grup I	9.30 ± 1.93^d	15.18 ± 1.32^d	8.55 ± 0.93^d
Grup II	9.20 ± 1.88^d	15.35 ± 1.34^d	8.25 ± 0.90^d
Grup III	9.10 ± 1.82^d	14.78 ± 1.35^d	8.10 ± 0.88^d
Grup IV	28.50 ± 2.94^a	37.74 ± 2.86^a	17.46 ± 1.98^a
Grup V	22.60 ± 2.65^b	30.38 ± 2.75^b	14.73 ± 1.82^b
Grup VI	15.90 ± 1.92^c	25.73 ± 2.63^c	11.60 ± 1.24^c

*Grup I: Kontrol, Grup II: 365 mg/L yeşil kahve, Grup III: 730 mg/L yeşil kahve, Grup IV: 200 mg/L tartrazin, Grup V: 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin, Grup VI: 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Aynı sütun içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar $p < 0.05$ 'de önemlidir.

Tartrazinin teşvik ettiği meristematik hücre hasarlarına karşı yeşil kahvenin koruyucu rolü Tablo 5'te verilmiştir. Sadece yeşil kahve dozlarına maruz bırakılan gruplarda (Grup II ve III) kontrol grubuna (Grup I) benzer şekilde herhangi bir meristematik hücre hasarına rastlanmamıştır. Buna karşın tartrazin uygulaması Grup IV'te belirgin olmayan iletim doku, epidermis hücre hasarı, yassılaşmış hücre çekirdeği ve korteks hücre çeperinde kalınlaşma şeklinde hasarların görülmesine sebep olmuştur (Tablo 5, Şekil 2). Bu grupta gözlenen epidermis hücre hasarı ve yassılaşmış hücre çekirdeği en şiddetli hasarlar; belirgin olmayan iletim doku ve korteks hücre çeperinde kalınlaşma ise orta şiddetli hasarlar olarak sınıflandırılmıştır.

Epidermis hücreleri çok büyük olasılıkla dışarıda bulunan kimyasal iç dokulara taşımamak için birbirine doğru yaklaşmış ve sıkışmış; bu savunma stratejisine ek bir adaptasyon sistemi olarak korteks hücre çeperleri kalınlaşmıştır [51]. Bu stratejiler; kök civarında bulunan kimyasalın, bitkinin üst dokularına taşınmasını sağlayabilecek olan, iletim demetlerine ulaşmasını önlemek için önemli adımlardır. Tartrazin absorpsiyonunu ve transferini önlemek için gerçekleşen bu olaylara karşın hücrelere giren kimyasalın anormal nükleus görünümüne sebep olduğu ve iletim dokusuna ulaşan dozun ise bu bölgede bütünlük kaybına yol açtığı söylenebilir.

Tablo 5. Tartrazinin teşvik ettiği meristematik hücre hasarlarına karşı yeşil kahvenin koruyucu rolü

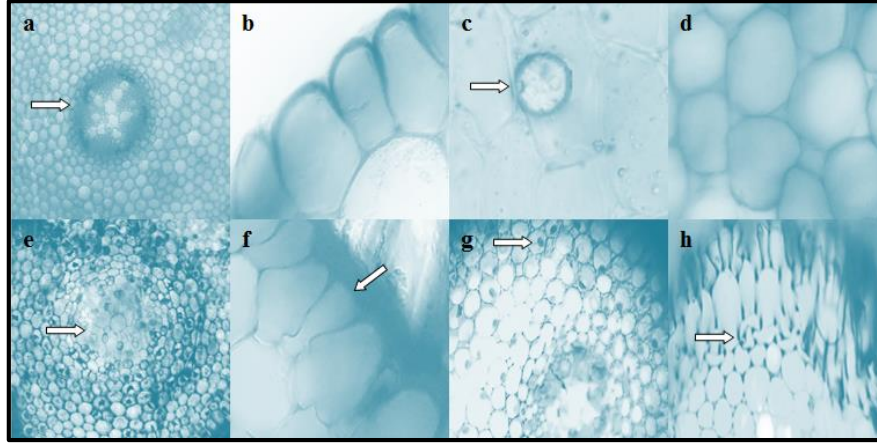
Table 5. Protective role of green coffee against meristematic cell damage induced by tartrazine.

Gruplar	BİD	EHH	YHÇ	KHÇK
Grup I	-	-	-	-
Grup II	-	-	-	-
Grup III	-	-	-	-
Grup IV	++	+++	+++	++
Grup V	+	++	++	+
Grup VI	-	+	+	-

*Grup I: Kontrol, Grup II: 365 mg/L yeşil kahve, Grup III: 730 mg/L yeşil kahve, Grup IV: 200 mg/L tartrazin, Grup V: 365 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin, Grup VI: 730 mg/L yeşil kahve + 200 mg/L tartrazin. BİD: belirgin olmayan iletim doku, EHH: epidermis hücre hasarı, YHÇ: yassılaşmış hücre çekirdeği, KHÇK: korteks hücre çeperinde kalınlaşma. (-): hasar yok, (+): az hasar, (++) : orta hasar, (+++) : şiddetli hasar.

Yeşil kahve tartrazin ile birlikte uygulandığı zaman (Grup V ve VI) tartrazinin sebep olduğu meristematik hasarları azaltmıştır. Yeşil kahvenin tartrazine karşı hücrelerdeki bu koruyucu etkisi doza bağlı olarak gerçekleşmiş ve yeşil kahve dozu arttıkça hasarların daha da azaldığı görülmüştür. Tartrazin ile beraber 730 mg/L yeşil kahve uygulanan Grup VI'da epidermis hücre hasarı ve yassılaşmış hücre çekirdeği az hasar sınıfında değerlendirilmiş; belirgin olmayan iletim doku ve korteks hücre çeperinde kalınlaşma hasarları ise kontrol seviyesine gerilemiştir. Tartrazin uygulamasının *A. cepa* kök ucu meristem dokusunda yassılaşmış hücre

çekirdeği, korteks hücrelerinde bazı maddelerin birikimi, hücre deformasyonu, belirgin olmayan iletim doku, nekroz ve korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma şeklinde anatomik hasarların oluşumuna da sebep olduğu gösterilmiştir [20]. Literatürde yeşil kahvenin hücrelerdeki anatomik değişikliklere karşı koruyuculuğunu gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu etki antioksidan rolü defalarca kere kanıtlanmış olan yeşil kahvenin oksidatif stresi azaltarak membran bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 2. Tartrazinin sebep olduğu meristematik hücre hasarları [a: iletim dokunun normal görünümü, b: epidermis hücrelerinin normal görünümü, c: hücre nükleusunun normal görünümü (oval), d: korteks hücrelerinin normal görünümü, e: iletim dokunun belirgin olmayan görünümü, f: epidermis hücre hasarı, g: yassılaşmış hücre çekirdeği, h: korteks hücre çeperinde kalınlaşma]

Figure 2. Meristematic cell damage caused by tartrazine (a: normal appearance of conduction tissue, b: normal appearance of epidermis cells, c: normal appearance of cell nucleus (oval), d: normal appearance of cortex cells, e: non-obvious appearance of conduction tissue, f: epidermis cell damage, g: flattened cell nucleus, h: thickening of the cortex cell wall)

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma sentetik bir gıda katkı maddesi olan tartrazin boyasından kaynaklanan toksisiteye karşı yeşil kahvenin koruyucu ve iyileştirici etkisini gösteren ilk araştırmadır. Bu amaçla önemli bir model organizma olan *A. cepa*'nın köklerinde tartrazinin toksik etkileri; fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve diğer hücresel hasarlar açısından kapsamlı bir incelemeye tabi tutulmuştur. Tartrazin araştırılan tüm parametrelerde negatif etkilere sebep olmuş; ancak tartrazin ile birlikte uygulanan yeşil kahve tartrazin toksisitesini azaltmıştır. Tek başına uygulanan yeşil kahvenin hiçbir yan etkiye sahip olmaması ve tartrazinle beraber uygulanan yeşil kahvenin iyileştirici etkisinin yeşil kahve dozuna bağlı olması son derece dikkat çekicidir. Neticede, bu çalışma eşsiz bir fonksiyonel gıda olarak önemli potansiyel vaat eden yeşil kahvenin diğer kimyasallardan kaynaklanan toksisiteye karşı etkilerinin araştırılması için önemli bir adımdır.

KAYNAKLAR

[1] Kumar, N., Singh, A., Sharma, D., Kishore, K. (2019). Toxicity of Food Additives. In Food Safety and Human Health, Edited by R.L. Singh, S.

Mondal, Academic Press, London, United Kingdom, 402p.
 [2] Codex Alimentarius, (2017). Food Additives. 11.4.2020 tarihinde Codex Alimentarius: <http://www.codexalimentarius.org/standards/gsfa/>
 [3] Linke, B.G., Casagrande, T.A., Cardoso, L.I.A. (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 306-310.
 [4] Li, J., Liu, M., Jiang, J., Liu, B., Tong, H., Xu, Z., Yang, C., Qian, D. (2019). Morphology-controlled electrochemical sensing properties of CuS crystals for tartrazine and sunset yellow. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, 552-563.
 [5] Soylak, M., Uzcan, F. (2020). A novel ultrasonication-assisted deep eutectic solvent microextraction procedure for tartrazine at trace levels from environmental samples. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17(2), 461-467.
 [6] de Lima Barizão, A.C., Silva, M.F., Andrade, M., Brito, F.C., Gomes, R.G., Bergamasco, R. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles for tartrazine and bordeaux red dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 103618.
 [7] Wu, S., Yin, Z.Z., Chen, X., Wang, X., Wu, D., Kong, Y. (2020). Electropolymerized melamine for

- simultaneous determination of nitrite and tartrazine. *Food Chemistry*, 333, 127532.
- [8] Abd-Elhakim, Y.M., Moustafa, G.G., Hashem, M.M., Ali, H.A., Abo-EL-Sooud, K., El-Metwally, A.E. (2019). Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), 12368-12378.
- [9] Stevenson, D.D. (2014). Food Allergy: Adverse Reaction to Foods and Food Additives. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.
- [10] Elekima, I., Nwachuku, O.E. (2019). Evaluation of acute and chronic toxicity of tartrazine (E102) on steroid reproductive hormones of albino rats. *Asian Journal of Research and Reports in Endocrinology*, 1-15.
- [11] Balta, I., Sevastre, B., Mireşan, V., Taulescu, M., Raducu, C., Longodor, A.L., Marchiş, Z., Mariş, C.S., Coroian, A. (2019). Protective effect of blackthorn fruits (*Prunus spinosa*) against tartrazine toxicity development in albino Wistar rats. *BMC Chemistry*, 13(1), 104.
- [12] Macheiner, L., Schmidt, A., Schreiner, M., Mayer, H.K. (2019). Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, 103307.
- [13] Castro, A.C.C.M., Oda, F.B., Almeida-Cincotto, M.G.J., Davanço, M.G., Chiari-Andréo, B.G., Cicarelli, R.M.B., Peccinini, R.G., Zocolo, G.J., Ribeiro, P.R.B., Correa, M.A., Isaac, V.L.B., Santos, A.G. (2018). Green coffee seed residue: a sustainable source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 246, 48-57.
- [14] Şemen, S., Mercan, S., Yayla, M., Açıkkol, M. (2017). Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. *Food Chemistry*, 215, 92-100.
- [15] Jeszka-Skowron, M., Stanisz, E., De Peña, M.P. (2016). Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. *LWT Food Science and Technology*, 73, 243-250.
- [16] Kalefetoğlu Macar, T. (2020). Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in *Allium cepa* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- [17] Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T., Çavuşoğlu, K., Yalçın, E. (2020). Determination of protective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extract against cobalt (II) nitrate-induced toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- [18] Khan, S., Anas, M., Malik, A. (2019). Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Toxicology Reports*, 6, 193-201.
- [19] Bonciu, E., Rosculete, E., Rosculete, C. (2020). The clastogenic effect of tartrazine, a synthetic yellow dye, in plant meristematic tissues. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 49(1), 32-35.
- [20] Taşlı, B., Çavuşoğlu, K., Yalçın, E. (2018). *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L.'da tartrazin uygulaması sonucu oluşan fizyolojik, sitogenetik ve anatomik değişimlerin araştırılması. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 7(2), 1-6.
- [21] Türk Gıda Kodeksi (2013). Gıda katkı maddeleri yönetmeliği. *T.C. Resmi Gazete*, Sayı: 28693, Ankara.
- [22] Atik, M., Karagüzel, O., Ersoy, S. (2017). Sıcaklığın *Dalbergia sissoo* tohumlarının çimlenme özelliklerine etkisi. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 20(2), 203-210.
- [23] Staykova, T.A., Ivanova, E.N., Velcheva, I.G. (2005). Cytogenetic effect of heavy metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 41-46.
- [24] Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 65-75.
- [25] Zou, J., Yue, J., Jiang, W., Liu, D. (2012). Effects of cadmium stress on root tip cells and some physiological indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 54, 129-141.
- [26] Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- [27] Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). Colorimetric method for estimation of catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-139.
- [28] Masek, A., Latos-Brozio, M., Kałużna-Czaplińska, J., Rosiak, A., Chrzescijanska, E. (2020). Antioxidant properties of green coffee extract. *Forests*, 11(5), 557.
- [29] Lepage, C.C., Thompson, L.L., Larson, B., McManus, K.J. (2020). An automated, single cell quantitative imaging microscopy approach to assess micronucleus formation, genotoxicity and chromosome instability. *Cells*, 9(2), 344.
- [30] Bianchi, J., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A. (2016). Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, 144, 475-483.
- [31] Yi, H., Meng, Z. (2003). Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 109-114.
- [32] Mishra, K. (1993). Cytotoxic effects of distillery waste on *Allium cepa* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(2), 199-204.
- [33] Dutta, J., Ahmad, A., Singh, J. (2018). Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia*, 71(2), 139-145.
- [34] Khallef, M., Benouareth, D.E., Konuk, M., Liman, R., Bouchelaghem, S., Hazzem, S., Kerdouci, K. (2019). The effect of silver nanoparticles on the mutagenic and the genotoxic properties of the

- urban wastewater liquid sludges. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18403-18410.
- [35] Hashem, M.M., Abd-Elhakim, Y.M., Abo-EL-Sooud, K., Eleiwa, M.M. (2019). Embryotoxic and teratogenic effects of tartrazine in rats. *Toxicological Research*, 35(1), 75-81.
- [36] Gleis, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C., Pool-Zobel, B.L. (2006). Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and Cancer*, 56(2), 182-192.
- [37] Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B. (2017). Wheat bread enriched with green coffee - In vitro bioaccessibility and bioavailability of phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 221, 1451-1457.
- [38] Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, 56, 2215-2244.
- [39] Gouthamchandra, K., Sudeep, H.V., Venkatesh, B.J., Prasad, K.S. (2017). Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 147-153.
- [40] Öztürk, G., Çavuşoğlu, K., Yalçın, E. (2020). Dose-response analysis of potassium bromate-induced toxicity in *Allium cepa* L. meristematic cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- [41] Dalo, E., Sadikaj, R., Sahiti, H. (2019). Assessment of accumulation of heavy metals and lipid peroxidation in common reed (*Phragmites australis*) in the Albanian Part of Lake Ohrid. *Ecological Engineering*, 20(4), 114-120.
- [42] Ali, A.F., Abdelgayed, S.A.S., El-Tawil, O.S., Bakeer, A.M. (2016). Toxicological and histopathological studies on the effect of tartrazine in male albino rats. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food & Biotechnological Engineering*, 10(8), 513-518.
- [43] Boussada, M., Dhoub, E.I., Lamine, J.A., Abidi, N. (2017). Assessment of a sub-chronic consumption of tartrazine (E102) on sperm and oxidative stress features in Wistar rat. *International Food Research Journal*, 24(4), 1473-1487.
- [44] Martínez-López, S., Sarria, B., Mateos, R., Bravo-Clemente, L. (2019). Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 58(2), 865-878.
- [45] Nogaim, Q.A., Bugata, L.S.P., Prabhakar, P.V., Reddy, U.A., Kumari, I., Mahboob, M. (2020). Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. *Toxicology Reports*, 7, 142-148.
- [46] Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- [47] Erdemli, Z., Altinoz, E., Erdemli, M.E., Gul, M., Bag, H.G., Gul, S. (2020). Ameliorative effects of crocin on tartrazine dye-induced pancreatic adverse effects: a biochemical and histological study. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- [48] Noori, S., Rehman, N., Qureshi, M., Mahboob, T. (2009). Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by coffee and green tea. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(4), 452-458.
- [49] Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014, 761264.
- [50] AL-Megrin, W.A., El-Khadragy, M.F., Hussein, M.H., Mahgoub, S., Abdel-Mohsen, D.M., Taha, H., Bakkar, A.A.A., Abdel Moneim, A.E., Amin, H.K. (2020). Green *Coffea arabica* extract ameliorates testicular injury in high-fat diet/Streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Diabetes Research*, 6762709.
- [51] Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T., Çavuşoğlu, K., Yalçın, E. (2020). Protective effects of anthocyanin-rich bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against copper (II) chloride toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 1428-1435.