



**GIDA BOYASI OLARAK KARMOSİNİN ZEBRA
BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOLARINDA GELİŞİM
TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba KIZILTAN

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Yüksek Lisans Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**GIDA BOYASI OLARAK KARMOSİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
EMBRİYOLARINDA GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Development Toxicity of Carmosin as a Food Dye in Zebra Fish (*Danio rerio*) Embryo)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba KIZILTAN

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Erzurum
Ağustos, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Tuba KIZILTAN tarafından hazırlanan “GIDA BOYASI OLARAK KARMOSİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOLARINDA GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışması .. / .. / 20.. tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı, Nanobilim ve Nanomühendislik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan Ceyhun

Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Mine KÖKTÜRK

Iğdır ÜNİVERSİTESİ

Sınava online katılmıştır.

OBS üzerinden

onaylanmıştır.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN* danışmanlığında sunulan “GIDA BOYASI OLARAK KARMOSİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOLARINDA GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	15	30
Kuramsal Temeller	7	30
Materyal ve Yöntem	26	35
Bulgular	20	20
Tartışma	20	20
Tezin Geneli	17	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Tuba Kızıltan	Prof. Dr. Saltuk Buğrahan Ceyhun
9.8.2022	9.8.2022
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, bana her imkanı barındıran bir laboratuvarında çalışma fırsatı veren sayın danışman hocam Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a saygılarımı sunarım.

Tezimi yazmamda yol gösterici olan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Alper BARAN'a, ve laboratuvar hayatını bana sabırla öğreten Dr. Ekrem SULUKAN hocama ve çalışmamda rolü olan Meryem KANKAYNAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans bitirme seviyesine gelmemde en büyük paya sahip olup bana her daim destek veren, hayattaki en büyük şansım olan sevgili babam Ziyettin AKBULUT'a, annem Faika AKBULUT'a kardeşlerim Furkan ve Enes AKBULUT'a çok teşekkür ederim.

Tez yazımına başlamamdan itibaren bana destek olan yol arkadaşım sevgili eşim Yakup KIZILTAN'a çok teşekkür ederim.

Sanki birlikte tez yazmışız gibi benimle birlikte olan kahrımı çeken, mutluluğuma ortak olan canım arkadaşlarım Savcı Derya AKBAŞ'a ve Uzman Diyetisyen Özge MART'a çok teşekkür ederim.

Adını sayamadığım, çalışmamda emeği olan herkese teşekkür ederim.

Tuba KIZILTAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA BOYASI OLARAK KARMOSİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYOLARINDA GELİŞİM TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuba KIZILTAN

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Amaç: 20. yüzyılın ortalarından itibaren boyaların kullanımı her gıda grubunda olduğu gibi ilaç sektöründe, tekstil ve kozmetik endüstrilerinde de yaygınlaşmıştır. Karmosin azo boyalar grubundadır. Azo boyalar, boya sınıflarının geniş renk yelpazesine sahip en önemli grubudur. Bu çalışmada, önerilen ve aşırı dozlara (4 ila 2000 ppm) maruz kalma dahil olmak üzere geniş doz ölçeğinde karmosin maruziyetinin zebra balıklarının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 96 saat boyunca belirlenen dozlarda karmosine maruz bırakılan zebra balıklarında birçok morfolojik ve fizyolojik parametre ve etki mekanizmaları incelenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada karmosinin toksik dozlarının belirlenmesi ve sağlık üzerine etkilerini gözlenmesi için çeşitli dozlarda karmosin kullanılmıştır. Gruplar kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Gruplardaki larvaların vücudundaki reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve apoptotik hücre düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca, kalp atışı ve kan akışı analizlerini incelenmiştir. Karmosinin zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarındaki anksiyete testine etkisi analiz edilmiştir. Değişikliklerin altında yatan metabolizmayı aydınlatmak için ise metabolom analizi yapılmıştır.

Bulgular: Karmosinin zebra balığında (*Danio rerio*) ciddi malformasyonlara yol açtığını gözlemlendi. Ayrıca boy ve göz çapında küçülmelere, kan akışı ve kalp atışında düşmelere, apoptotik hücrelerindeki artışa, serbest oksijen radikallerinin sayısında artışa, lipid birikimine, doza bağlı olarak lokomotor aktivitede azalmaya neden olmuştur. Tüm bu değişikliklerin altında yatan metabolizmayı aydınlatmak için yapılan metabolom analizi sonucunda ise 45 açıklamalı metabolit tespit edildi.

Sonuç: Gıda boyası olarak kullanılan ve potansiyel çevresel kirleticisi olarak da nitelendirilen karmosinin özellikle yüksek dozlarda olumsuz sonuçlar doğurabileceği ortaya konulmuştur. Dolayısıyla kullanımı ve çevredeki konsantrasyonunun kontrol altında tutulması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: nanobilim, nanotoksikoloji, gıda boyaları, azo boyalar, karmosin

Ağustos 2022, 58 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF DEVELOPMENT TOXICITY OF CARMOSIN AS A FOOD DYE IN ZEBRA FISH (*Danio rerio*) EMBRYO

Tuba KIZILTAN

Supervisor: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Aim: Since the middle of the 20th century, the use of dyes has become widespread in the pharmaceutical industry, textile and cosmetics industries, as in every food group. Carmosine is in the group of azo dyes. Azo dyes are the most important group of dye classes with a wide color range. This study examined the effects of broad dose-scale exposure to carmosine, including exposure to recommended and excessive doses (4 to 2000 ppm), on the embryonic development of zebrafish. For this purpose, many morphological and physiological parameters and mechanisms of action were investigated in zebrafish exposed to carmosine at determined doses for 96 hours.

Method: In this study, various doses of carmosine were used to determine the toxic doses of carmosine and to observe its effects on health. The groups were compared with the control group. The formation of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic cell levels in the body of the larvae in the groups were investigated. In addition, heartbeat and blood flow analyzes were studied. The effect of carmosine on anxiety test in zebrafish (*Danio rerio*) larvae was analyzed. Metabolome analysis was performed to elucidate the metabolism underlying the changes.

Results: It was observed that carmosine caused serious malformations in zebrafish (*Danio rerio*). It also caused reductions in height and eye diameter, decreases in blood flow and heart rate, increase in apoptotic cells, increase in the number of free oxygen radicals, lipid accumulation, and dose-dependent decrease in locomotor activity. As a result of the metabolome analysis performed to elucidate the metabolism underlying all these changes, 45 annotated metabolites were detected.

Conclusion: It has been revealed that carmosine, which is used as a food dye and also described as a potential environmental pollutant, can cause negative results, especially at high doses. Therefore, it is recommended that its use and its concentration in the environment be kept under control.

Keywords: nanoscience, nanotoxicology, food dyes, azo dyes, carmosine

August 2022, 58 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ.....	1
Toksosite Çalışmaları ve Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>)	3
KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
MATERYAL VE METOT	8
Balık Materyali.....	8
Karmosin	8
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	13
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Omik teknoloji sistemleri.....	3
Şekil 2. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) nın dört günlük gelişim aşaması	3
Şekil 3. A) Karmosin görünümü B) Karmosin kimyasal formülü	8
Şekil 4. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) davranış analiz cihazı DanioVision	10
Şekil 5. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) embriyolarının 96 saat maruz kalma süresi boyunca ölüm oranları ($p<.05$; ANOVA, Tukey'in testi)	13
Şekil 6. Karmosine maruz kalan Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) embriyolarının 96 saat maruz kalma süresi boyunca kuluçka oranları.	14
Şekil 7. Karmosine ve kontrol gruplarına maruz kalan embriyolarında gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir.....	15
Şekil 8. Karmosine ve kontrol gruplarına maruz kalan embriyoların mikroskopik görüntüleri	16
Şekil 9. Apoptotik hücreler 96. saat larvasında acridine turuncu (AO) lekelenme ve sinyallerin ortalama floresan yoğunluğu. Floresan yoğunluk analizlerinde daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için farklı gruplara ait larvalar görüntüleme yaparken aynı resimde görüntülenmeye çalışılarak elde edildi.....	18
Şekil 10. In vivo CMH ₂ DCFDA 96. saat larvasında üretilen ROS'un boyanması ve sinyallerin floresan yoğunluğu	19
Şekil 11. Nil Adiposit lipid damlacıklarının kırmızı lekelenme ve sinyallerin ortalama floresan yoğunluğu	20
Şekil 12. Karmosine maruz kalan kalp atış hızı (A) ve kan akışı (B) ve zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) larvalarını 5 dpf'de kontrol edin. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir.....	22
Şekil 13. Göz büyüklüğü (a) ve vücut uzunluğu (b) karmosine maruz kalır ve zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) larvalarını 5 dpf'de kontrol edin.....	23
Şekil 14. Karmosine maruz kalan ve 6 dpf'de zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) larvalarını kontrol eden lokomotor aktivite (toplam mesafe)	23
Şekil 15. a) OPLS-DA (Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analiz) yöntemiyle elde edilen kontrol, 50 ppm ve 2000 ppm maruziyet gruplarının m/z değerlerinin skor grafiği (TOF MS yöntemiyle dedekte edilmiştir).	

- b) Analize edilen grupların varyans temelli uzaklık dendogramı (PCA temelli).
- c) Kontrole karşılık 50 ppm maruziyetin volkan ve yolak analiz grafiği, kontrole karşılık 2000 ppm ve 50 ppm karşılık 2000 ppm. Karmosin maruziyetinin kimliklendirilmiş metabolitlerin pik alanına göre log2 bazlı fold değişimi ve log10 temelli p-değeri. 26

Şekil 16. Karmosine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının hematoksilin ve eozin boyamasının (H&E) mikroskopik görüntüsü. Ok ucu nekrozu gösterir 28



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADI	: Kabul edilebilir günlük alım değeri
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AO	: Akridin turuncusu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BPM	: Kalpteki dakika
BPS	: Kalpteki saniye
CBA	: Kavisli gövde eksen
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
GSH	: Glutathione peroxidase
HE	: Hematoksilin-eozin
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
LT	: Litre
MDA	: Malondialdehid
ML	: Mililitre
MM	: Milimetre
NG	: Nanogram
NM	: Nanometre
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PE	: Perikardiyal ödem
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YSE	: Yumurta kese ödemi

GİRİŞ

Son yıllarda teknolojik yeniliklerle birlikte nanoteknoloji alanına ilgi artmaktadır. Nanoteknoloji ürünleri kozmetik, gıda, sağlık ve çevre gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu alanlarda kullanılan ürün çeşitliliği her geçen yıl artış göstermektedir. Nano ölçekli, biyomolekülleri taklit eden nanoteknolojik malzemeler ve biyolojik yapılarla etkileşime girebilmeleri, toksik etkilerinin test edilmesini gerekli kılmaktadır. Nanotoksikolojiye olan ilgi ise bu etkilerin insan vücudu ve çevre üzerindeki potansiyel zararlı etkilerini dikkate alarak gelişmiştir (Donaldson ve ark.2004).

Toksik maddelere karşı antioksidanlar, gıda ve farmasötik ürünlerdeki oksidatif bozulmaya ve oksidatif stres aracılı patolojik süreçlere karşı vücuttaki koruyucu rollerini devreye sokarlar (Gülcin ve ark 2020). Antioksidanlar,reaktif oksijen türlerinin oksidatif süreçlerini ve zararlı etkilerini azaltmak için hem gıda sistemlerinde hem de insan vücudunda önemli yere sahiptirler (Çakmakçı ve ark. 2015; Göçer ve ark. 2013).

Gıda boyaları da insan vücudunda toksik etki uyandıran maddelerdir. Günümüzde yasaklanmış veya yetkililerin ciddi denetimde kullanılan birçok renklendirici çeşidi vardır. Bu durum toksikolojik çalışmaların önemini de artırmıştır. Farklı renklendiricilerin kabul edilebilir günlük alımı (ADI), birçok deneyler sonucunda belirlenmiştir (Gautam 2015).

Gıda boyaları, renk vermek için yiyeceklere, içeceklere hatta farmasötik ve kozmetik ürünlere kasıtlı olarak eklenen maddelerdir. Sıvılar, tozlar, jeller ve macunlar şeklinde mevcut olan boyalar, algılanan lezzeti etkileyip, doğal rengini simüle ederek ürünleri estetik açıdan daha çekici hale getirmiştir.

Geniş tüketim alanına sahip olan gıda boyaları çevre kirlenmesinde de büyük rol oynamıştır. Boyaların çevreye karışması sonucu toksisiteye odaklanılmıştır Ayrıca, bağışıklık sistemine olası müdahaleleri, vücut sistemlerine etkileri ve dokularda birikimi hakkında da çalışmalar yapılmıştır.

Gıda renklendiricileri içerisinde azo boya grubu, endüstrilerce yaygın olarak kullanılmaktadır. Azo kelimesi, Yunanca a (değil) zoe (yaşamak) fiilinden türetilmiştir. Azo boyaların ortaya çıkması kimya endüstrisinin gelişiminde önemli bir olaydır. Azo boyalar, bir amin veya bir fenole bağlı diazotize bir aminden oluşan ve bir veya daha fazla azo bağı içeren bileşiklerdir. Azo boyaları temelde aromatik aminlerdir. Azo bileşikleri canlı renklere sahiptir

ve tüm sentetik boyaların yaklaşık üçte ikisini oluşturur ve ticarete açık ara en yaygın olarak kullanılan ve yapısal olarak çeşitli organik boyalar sınıfıdır (Freeman ve ark. 2007).

Azo boya grubuna dahil olan karmosin, kırmızıdan bordoya renk skalasına sahip anyonik bir gıda boyasıdır (Ai-Mashhedy ve Fijer 2016). Karmosin Ayrıca, Azorubine, Food Red 3, Azorubin S, Brillantcarmoisin O, Acid Red 14 ve CI 14720 olarak birçok adla da bilinir. Gıdalarda kullanımına ilişkin izinler ve düzenlemeler ülkeden ülkeye farklılık gösterir. Mesela ABD ve Japonya'da yasakken Avrupa Birliği'nde ADI (kabul edilebilir günlük alım miktarı) ile kullanımı serbesttir (Peksa ve ark. 2015).

Suda yüksek oranda çözünen karmosin, organik bir azo boyadır. Reçel, badem ezmesi, jöle gibi gıda ürünlerinde meyveli yoğurtlar ve peynirli kek karışımlarının içerisinde kullanılır. Ayrıca, ilaç, tekstil ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Amin ve diğerleri 2010). Yüksek oranda suda çözünürlüğü, ışığa ve oksijene maruz kalarak bozulmama özelliğinin sonucunda suda yaşayanlarda kalıcı bir kirletici olabilir (Micheletti ve ark. 2020). Bu potansiyel nedeniyle kirletici özelliği olan birçok çalışma literatüre eklenmiştir. Su kirliliğine sebep olan karmosini uzaklaştırmak için çeşitli yöntemler denenmiştir (Kiayi ve ark. 2019).

Azo boya karmosin, mikrobiyotik ve azoredüktaz tarafından bağırsak yoluyla karaciğer veya bağırsak duvarında aromatik aminlere indirgenebilir. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan ana metabolit sülfanilik asittir (Chung ve ark. 1992). Gıdalarda bulunabilen nitrit bileşikler, belirli amino asitlerle birleşir ve daha sonra kanserojen N-nitroso bileşiklerine veya nitrozaminlere dönüşür. Bu konuda, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, karmosin gibi azo boyalarını kanserojenler olarak sınıflandırır (Reza ve diğerleri 2019).

Ayrıca, karmoizinin, karaciğer hasarına neden olduğunu ve sıçanlarda bazı metabolik enzimlerin azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Amin ve ark. 2010).

Allium cepa'da azalmış mitotik indeks, genotoksisite ve kromozomal anormalliklere neden olmuştur (Khan ve ark. 2020), farelerde ise bazı önemli savunma genlerinin ekspresyonunu azaltarak kanserojenlik ve biyokimyasal toksisiteye sebep olmuştur (Reza ve ark.2019). Bu etkileri araştırmak için çeşitli yöntemler denenmiştir.

Son zamanlarda analitik teknikler deneylerde sıkça kullanılan güvenilir yöntemler haline gelmiştir. Transkriptomik, proteomik, lipidomik ve metabolomik gibi birçok teknikle araştırmalar analitik tekniklerin başlıca yöntemleri arasındadır.

Metabolomik en yaygın kullanılan omik teknikler arasındadır. Metabolomik aminoasitler, organik asitler, yağ asitleri, şekerler ve şekerler gibi düşük moleküler ağırlıklı molekülleri

belirler. Metabolom, fenotipleri yorumlamada ve ipuçlarını saptamada etkilidir. Metabolomik teknik, fenotip varyasyonunun nedenine yönelik ipuçlarının saptanmasında kullanılabilir. Hem endojen patolojik durumların hem de ekzojen bileşiklerden türetilen toksik etkilerin biyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına da izin verir. Bu nedenle, metabolomik uygulamaları toksikoloji alanına da yayılmıştır (Waters ve Fostel 2004, Robertson 2005, Clarke ve Haselden 2008, Robertson, Watkins ve ark. 2011, Bouhifd, Hartung ve ark. 2013)



Şekil 1. Omik teknoloji sistemleri

Toksisite Çalışmaları ve Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı (*Danio rerio*) , toksikolojik çalışmalarda hem yetişkin hem de embriyo aşamalarında yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, embriyogenezin kolay izlenmesine, yumurta ve embriyonun şeffaflığı nedeniyle herhangi bir gelişimsel kusurun değerlendirilmesine fırsat tanımıştır. Zebra balığı (*Danio rerio*) , insan genomuna % 70 benzerliği ve hızlı gelişim aşamaları ile benzersiz bir model organizmadır (Baran ve arkadaşları, 2018; Sökmen ve arkadaşları, 2020; Capriello ve arkadaşları, 2021). Zebra balığı (*Danio rerio*) nın gelişim aşamalarını mikroskop altında görüntülenebilmektedir (Şekil 2). Bu nedenle, mevcut çalışmalarda karmosinin zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları üzerindeki etkileri morfolojik, moleküler, davranışsal, fizyolojik ve metabolomik açısından değerlendirilmektedir.



Şekil 2. Zebra balığı (*Danio rerio*) nın dört günlük gelişim aşaması

Çalışmamızda, karmosinin zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Morfolojik, moleküler, davranışsal, dolaşım sistemi ve metabolomik etkileri incelendi. Karmosinin zebra balığı (*Danio rerio*) larvası üzerinde oluşturduğu olası toksik etkiyi görmek için larvalarda sağ kalım yumurtadan çıkış oranları, morfolojik analizleri materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Karmosinin ROS oluşumuna, hücre ölümüne ve lipid birikimine olan etkilerine bakıldı. Karmosinin, kalp atışı ve kan akışına etkisiyle ilgili çeşitli görüşler olduğu için farklı dozlarda boya uygulanan larvalarda kalp atışı ve kan akışı analizi incelendi. Ayrıca, dokularda birikimine bakmak için histopatolojik

analizleri gerçekleştirildi. Hücre bazında metabolizma analizi için matabolom analizi gerçekleştirildi.



KAYNAK ÖZETLERİ

Karmosin kullanımı oldukça yaygın olan gıda boyasıdır. Gıdalar yoluyla tüketilmesi yanında sularda kirletici olarak da insan vücuduna nüfus etmektedir. Bu sebeplerden karmosin hakkında birçok çalışma mevcuttur. Öncelikle gerçekten tüketiminin ne ölçüde olduğunu gözlemlemek için Hindistan'da bir araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmada, azo boyalarından Sunset Yellow ve Tartrazinin tüketimi çocuklarda ve gençlerde araştırılmıştır. Sonuçlara göre, gıda boyası tüketiminin önerilen ADI değerinin çok üzerinde olduğu tesbit edilmiştir. Yasal olmayan şekilde gıdalarda boya kullanımının oldukça yüksek olduğunu ve daha sıkı denetim gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmalar, sürekli gıda boyası kullanımının; kansere ve oksidatif hasara neden olma konusunda başlıca şüpheli olduğunu göstermiştir. (Tsuda ve ark. 2001; Das ve Mukherjee 2004).

Teresa Capriello ve arkadaşlarının üzerinde çalıştığı E150d gıda boyası, yiyeceklerle ve içeceklerle lezzet katmak ve renk vermek için kullanılmaktadır. 'Karamel boyası' olarak bilinen gıda boyası, son zamanlarda artan tüketimi, özellikle sularda salınımının artmasıyla araştırmaya gerek duyulmuştur. Bu nedenle çalışmalarında, geleneksel bir suçul model organizma olan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları üzerindeki toksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada, bu gıda katkı maddesinin, doza bağlı olarak yumurtadan çıkış, hayatta kalma, embriyo morfolojisi, fizyolojisi ve kalp atışı üzerinde toksik etkilere neden olduğu sonucuna varılmıştır. Üstelik, yüzme performansının bozulduğu, iskelet kaslarında ve karın boşluğunda hasara neden olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen veriler, E150d'nin suda dağılmasıyla ilişkili riski göstermiştir, bu da insan ve çevre sağlığını korumak için gereksiz kullanımdan kaçınmaya daha fazla dikkat edilmesi gerektiğini belirtmektedir (T. Capriello ve ark 2021).

Zebra balığı (*Danio rerio*) yla ilgili yapılan çalışmalarda karmosinle ilgili direkt çalışma yapılmamış olsa da diğer azo boyalarla ilgili çalışmalar mevcuttur. Eritrosin ve Tartrazinin zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki toksik etkileri ile ilgili çalışma yapılmıştır. Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında oksidatif stresin indüklenmesinde eritrosin ve tartrazinin doza bağlı etkilerini değerlendirilmiştir İki gıda renklendiricisinin reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi üzerindeki etkisini test etmek için süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite analizine bakılmıştır (Gupta, Ranjan ve ark. 2019).

Dört azo boyasıyla yapılan deneyde zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında azo boyalarına maruz kaldığında, gelişimsel toksisiteye sebep olduğunu söylenmiştir. Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında yumurtadan çıkmada gecikmeye, kalp ödemine, azalmış kalp hızı, yolk kesesi ödemi, spinal eğrilik ve kuyruk distorsiyonu dahil spinal defektler gibi gelişimsel anormalliklere neden olabileceği bulunmuştur. (Jiang, Li ve ark. 2020).

Azo boyaları sularda kirletici olarak rol aldığı için tatlı sularda yaşayan *Hydra attenuata*'da çeşitli biyobelirteçler kullanılarak ticari azo boya Disperse Red 1'in (DR1) etkilerini değerlendirmek için deneyler yapılmıştır. Deney sonucunda canlının gıda boyasına maruz kaldığında lipid peroksidasyonunu sınırlamak için savunma mekanizmalarını aktive ettiği kanıtlanmıştır (de Jong ve ark 2016.)

Azo boyası olan karmosinin toksik etkilerini değerlendirmek ve kanserojenite ile ilişkisini araştırmak amacıyla çeşitli deneyler yapılmıştır. Öncelikle fareler üzerinde uzun süre yapılan çalışmalar sonucunda; yüksek dozda karmosine maruz kalmanın böbrek yetmezliğine ve hepatotoksisiteye neden olabileceği ortaya koyulmuştur (Reza, Hasan ve ark. 2019). Çalışmalar karmosinin hayati organlardaki biyokimyasal belirteçleri olumsuz etkilediği ve değiştirdiği sonucuna varmıştır; karaciğer ve böbrek sadece yüksek dozlarda değil, aynı zamanda düşük dozlarda da olumsuz etkilendiği kanıtlanmıştır (Amin, Hameid II ve ark. 2010). Beyin, karaciğer, böbrek dokularında ve kemik iliği hücrelerinde genetik materyalleri ve nükleik asitleri (DNA & RNA içerikleri) belirleyerek ortak gıda boyası kullanımının yan etkilerine bakılmış ve karmosinin genotoksik özellikleri vurgulanmıştır (Ali, Al-Ghor ve ark. 1998).

Karmosinle yapılan çalışmalar sonucunda Lösemi, kalp hastalıkları, metabolik bozukluklar, kanserler, karaciğer ve böbrek hastalıkları gibi hastalıkların çoğunda serbest radikallerin ortalama seviyenin üzerine çıktığı bulunmuştur. Karmosinin kalp dokularına zarar verdiğini ve hücrelerde serbest radikallerin yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir (Pham-Huy ve ark . 2008).

Karmosine maruz kalmanın ROS seviyelerinde bir artışa sebep olduğu başka birçok çalışmada da kanıtlanmıştır. Boyanın serotonin, dopamin seviyelerini hem de toplam antioksidan kapasitesinde azalttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, karmosinin yüksek dozlarda alımının lipid düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir. Dolayısıyla, karmosinin aşırı oral uygulamasının apoptotik olduğu sonucuna varabiliriz (Hussein, Arisha ve ark. 2021).

Gıda boyaları organizmanın enerji dengesinde bozulmalara yol açar bu durum davranış değişikliğinden, üremeye, büyüme gelişmeye kadar birçok yaşamsal döngüyü etkilemektedir

(McKee ve Knowles 1986, De Coen ve Janssen 1997, Smolders, De Boeck ve ark 2003, Smolders, Bervoets ve ark. 2004).

Ayrıca, kirleticiler direkt hedef olmasa da çeşitli nörotoksik etkisinden dolayı fizyolojik ve davranış fonksiyonlarında bozulmalara yol açtığı kanıtlanmıştır (Gravato, Almeida ve ark. 2014, Rodrigues, Gravato ve ark. 2015).



MATERYAL VE METOT

Balık Materyali

Zebra balığı (*Danio rerio*) tropikal bir tatlı su balığıdır ve bilimde önemli bir omurgalı model organizmadır. Bilimsel sınıflandırmada;

- Kingdom : Animalia
- Phylum : Chordata
- Class : Actinopterygii
- Order : Cypriniformes
- Family : Cyprinidae
- Genus : Danio
- Species : *Danio rerio*

Zebra balığı (*Danio rerio*) adını vücudunun yanındaki yatay çizgilerden alır.

Çalışmada kullanılan anaç balıklar AB hattına aittir. Çalışmada kullanılacak larvaları elde etmek için, anaç balıklar bir gün önceden üreme tankına alınır. Bir sonraki gün anaç balıklardan elde edilen yumurtalar E3 solüsyonuyla temizlenir, petrilere alınır ve gerekli dozlar uygulanır. Karışımında 96 saat bekleyen yumurtalar çeşitli deneylere tabi tutulur.

Karmosin

KODU	E122
EN BİLİNEN ISIMLERİ	Karmosin (FDA) Food Red 3 (CI)
GÖRÜNÜMÜ	Şekil 4A
KİMYASAL YAPISI	Şekil 4B
TANIM	Azorubine, disodyum 4-hidroksi-3-(4-sülfonato-1-naftilazo)naftalen-1-sülfonat ve başlıca renksiz elementler olarak, sodyum klorür ve /veya sodyum sülfat ile birlikte yardımcı renklendirici maddelerden oluşur. Azorubine sodyum tuzu olarak tanımlanır (Tekeli 2008).
SINIF	Mono azo Renk endeks No : 14720
KİMYASAL ADI	Disodyum 4-hidroksi-3 (4-sülfonato-1-naftilazo) naftalen-1- sülfonat
FORMÜLÜ	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	502,44 g/mol
TANIMLAMA	Kırmızımsı-kestane rengi toz veya granüler
MAKS. DALGA BOYU	Sulu çözeltide 516 nm dür
SUDA ÇÖZÜNMEYEN MADDE	% 0,2 den fazla olmaması gerekir.

Şekil 3. A) Karmosin görünümü B) Karmosin kimyasal formülü

Karmosin 4 gün boyunca taze stok yapılarak kullanıldı. Boya önce saf suyla seyreltildi ve gerekli konsantrasyonlar hesaplandıktan sonra petrilere hesaplanan dozlarda uygulandı.

Karmosine maruz bırakma, morfolojik ve fizyolojik ölçümler

Çalışmada karmosine maruz kalan AB suşu zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının ataları Oregon Eyalet Üniversitesinden alındı. Normal olarak gelişen ve blastula aşamasına ulaşan embriyolar, E3 embriyo ortamında hazırlanan dereceli karmosine (4, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 ve 2000 ppm) konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Kontrol grubu sadece E3 ortamında bekletildi. Tüm ortamlar her 24 saatte bir yenilendi. Üç bağımsız deney ile yapılan her analiz için deneyde maruz bırakılan her grupta en az 40 embriyo vardı. 96 saatlik maruz kalma sırasında balıklar mikroskop altında incelendi ve her 24 saatte bir ölü balık ve yumurtadan çıkış oranları kaydedildi. Ayrıca, maruz kalma döneminde her 24 saatte bir gözlenen morfolojik anormallikler (perikardiyal ödem, yumurta kese ödemi, kavisli vücut eksen ve kafa malformasyonları dahil) kaydedildi.

Morfolojik gözlem, sağ kalım ve kuluçka oranları, her gruptan en az 200 embriyo larvasının (üç biyolojik çoğalma, toplamda 600 balık ile) incelenmesi sonuçlandı. Göz büyüklüğü ve vücut uzunluğu ölçümleri için her grup havuzundan rastgele 20 larva (üç biyolojik kopya ile toplamda 60 larva) seçildi. Kalp atış hızı ve kan akışı için her grup havuzundan rastgele seçilen 10 larva (üç biyolojik kopya ile toplamda 30 balık) trikain ile uyuşturuldu. 3 dakikalık videolar stereomikroskop altında anestezi edilmiş larvaların peridiyak ve kan damarı bölgelerinden gelen yazılımlar için uygun bir formatta kaydedildi. Video kayıtları DanioScope'a aktarıldı ve yazılım kalpteki saniyede /dak (BPS/BPM) atım sayısını otomatik olarak hesapladı ve belirlenen kan damarlarındaki akış aktivitesinin ölçüsünü kaydetti.

Reaktif oksijen türevlerini CM-H₂DCFDA indikatörü ile boyayarak oksidatif stresin belirlenmesi

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) tespiti CM-H₂DCFDA kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol gruba dahil tüm gruplardan, her gruptan rastgele seçilen 5 larva 96. saatinde (üç tekrar, toplam 15 larva) ROS a maruz bırakıldı. ROS oksidatif stresin genel bir göstergesidir. Standart protokole göre analizler yapıldı; kısacası, larvalar önce ultra saf H₂O ile üç kez yıkandı, daha sonra CM-H₂DCFDA ile karanlıkta 2 saat boyunca 28.5 0 C'de 1 µg / mL konsantrasyonda etüvde bekletildi. İnkübasyondan sonra, ultra saf H₂O ile üç kez yıkandı larve floresan mikroskopisi altında incelendi (Zeiss, Discovery V12, Almanya). Elde edilen görüntülerin

floresan yoğunluk analizi ImageJ yazılımı ile yapılmıştır (Baran ve arkadaşları, 2020; Türkoğlu ve arkadaşları, 2021).

Apoptotik hücrelerin tayin edilmesi

Apoptotik hücrelerin tespiti, karmosine maruz kalan larvalardan her gruptan rastgele seçilen 5 balık 96. saat larvasından (üç çoğalır, toplam 15 larva) DNA ve RNA ile etkileşime giren nükleik asit seçici metakromatik boya olan acridine orange kullanılarak gerçekleştirildi. Standart protokolle analizler yapıldı: Şu şekilde özetlersek, 96. saat larvaları önce PBS ile yıkanması üç kez tekrarlandı, daha sonra 28.5 0 derecede 5 mg / mL konsantrasyonda karanlıkta 30 dakikalık bir süreçte acridine orange ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS ile yıkanma üç kez tekrarlandıktan sonra floresan mikroskopisi altında incelendiler (Zeiss, Discovery V12, Almanya). Elde edilen görüntülerin floresan yoğunluk analizi ImageJ yazılımıyla analiz edilmiştir (Baran ve arkadaşları, 2020; Türkoğlu ve arkadaşları, 2021).

Vücüttaki lipid düzeyinin görüntülenmesi (Nile-Red (C20-H18-N2-O2) boyama)

Larva vücudundaki lipid damlacıklarının tespiti, karmosine maruz kalan larvalardan her gruptan rastgele seçilen 5 balık 96. saat larvasından (üç tekrar, toplam 15 larva) hücre içi lipid damlacıkları ile etkileşime girebilen bir bileşik olan Nil Kırmızısı kullanılarak gerçekleştirildi. Standart protokole göre analizler yapıldı; Kısacası, larvalar önce ultra saf H₂O ile üç kez yıkandı daha sonra nil kırmızısı ile bir gecede karanlıkta 28.5 0 C'de 10 ng / mL konsantrasyonda etüvde bekletildi. İnkübasyondan sonra, ultra saf H₂O ile üç kez yıkandı larve floresan mikroskopisi altında incelendi (Zeiss, Discovery V12, Almanya). Elde edilen görüntülerin floresan yoğunluk analizi ImageJ yazılımı ile yapılmıştır (Baran ve arkadaşları, 2020; Türkoğlu ve arkadaşları, 2021).

Zebra balığı (Danio rerio) larvalarında davranış testi



Şekil 4. Zebra balığı (*Danio rerio*) davranış analiz cihazı DanioVision (Noldus Co.)

Karmosine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının davranış analizi standart protokol ile değerlendirildi. Bu amaçla, her grup havuzundan rastgele seçilen 24 zebra balığı (*Danio rerio*) larvasının (toplamda üç biyolojik 72 larva ile) faaliyetlerini kızılötesi analog kamera (saniyede 25 kare) ile izlemek için, her kuyuda bir larva içeren 24 kuyu plakası DanioVision'a (Noldus Co.) yerleştirildi. Gözlem odasının sıcaklık durumu 28 °C'de ısıtma/soğutma sistemi (Noldus Co.) kullanılarak gerçekleştirildi. Karanlık ve ışık koşullarındaki değişimlere yanıt olarak lokomotor aktivite oluşturmak için karanlık/açık dönemlerine tabii tutuldu. Karanlıkta 10 dakika yerleşimi ardından, toplam 50 dakika boyunca görüntüleri kaydetmek için 10 dk ışık ve 10 dk karanlık koşullar uygulandı (Sulukan ve arkadaşları, 2021). Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının davranışlarının izlenmesi ve değerlendirilmesi EthoVision yazılımı (Noldus Co.) kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler üç bağımsız replikasyonla tekrarı gerçekleştirildi.

Metabolomik analiz

Karmosinin zebra balıklarının embriyonik gelişim dönemi üzerindeki etkilerini metabolit düzeyinde değerlendirmek için, 50 ppm ve 2000 ppm konsantrasyonlarına maruz kalan her zebra balığı (*Danio rerio*) grubundan 25 larva havuzundan metabolit seviyeleri belirlenmiştir. Herbir konsantrasyon için altı havuz oluşturuldu ve larvalar TissueLyser (Qiagen) yardımıyla 1 mL metanolde homojenize edildi. Bundan sonra homojenize numuneler 10 dakika ultrasonik dalgaya maruz kaldı ve daha sonra hücre lizisini başlatmak ve ekstraksiyon etkinliğini yükseltmek için 15 dakika boyunca -20 °C'de inkübe edildi. Karışımlar 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatantlar alındı daha sonra vakum altında buharlaştı (Eppendorf Konsantratörü +). Kalıntılar 80 µL mobil faz karışımı (%0,1 formik asit – su, 50:50, v/v) ile yapılandırıldı. Kalite kontrol numuneleri, her numuneden 5 µL aliquot toplanarak birikti. Oluşabilecek yanlışlıkları ortadan kaldırmak için beş ardışık set kullanılmıştır.

HRMS analizi için toplam çalışma süresi her örnek ve QC için yaklaşık 15 dakikaydı. Akış hızının 400 µl/dk olduğu doğrusal degrade elüasyonu gerçekleştirildi. Aşağıdaki gibi özetlenen koşullar: Mobil faz A'nın %95'i (H₂O (%0,1 v/v Formik asit)) 0,5 dk olacak şekilde düzenlenmiştir, ardından 3,5 dakikada mobil faz B (CH₃CN (%0,1v/v Formik asit)) için %2'den %20'ye, 4 dakikada %20 ila %95 B arasında bir yükselme elde edildi. 2.75 dk boyunca tutulan ilk koşullar. Toplam çalışma süresi her tekrar için yaklaşık 15 dakikaydı.

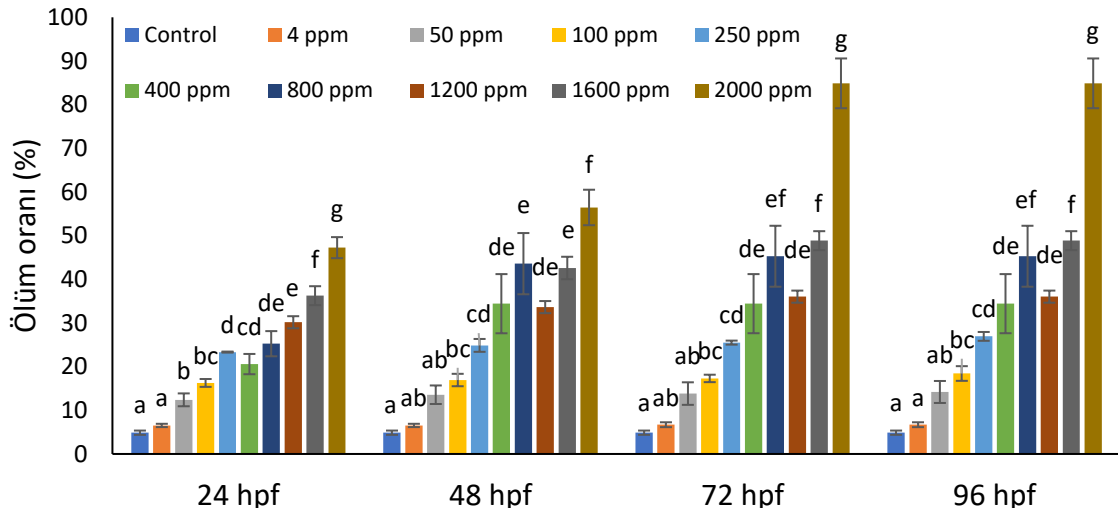
Histopatolojik analiz

Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının karmosine maruz kalması 48 saat boyunca %4 paraformaldehit çözeltisinde bekletildi. Her gruptan beş larva (toplamda üç replikasyonda 15 larva) kullanıldı. Örnekler rutin doku takibinden sonra parafin bloklarına gömülmüş. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesit alındı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Olympus BX 51, Japonya). Bölümler histopatolojik özelliklerine göre çok hafif, hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olarak değerlendirildi.



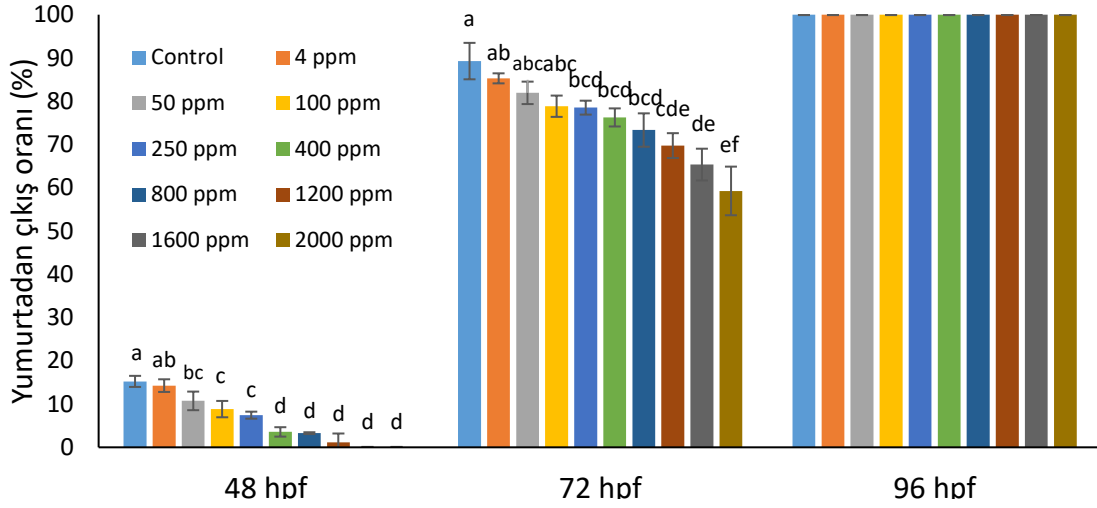
SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karmosinin zebra balığı (*Danio rerio*) embriyosu/larvaları üzerindeki gelişimsel toksisite etkilerini değerlendirmek için sağ kalım ve kuluçka oranları belirlendi. Tablo 1'de gösterildiği gibi karmosinin yüksek dozda verilmesi mortaliteyi önemli ölçüde artırmıştır ($p<0.05$). Bu artış doza bağlı olarak gelişmiştir. Bu durum boyanın toksik olduğunu gösteren faktörlerdendir.



Şekil 5. Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarının 96 saat maruz kalma süresi boyunca ölüm oranları ($p<0.05$; ANOVA, Tukey'in testi)

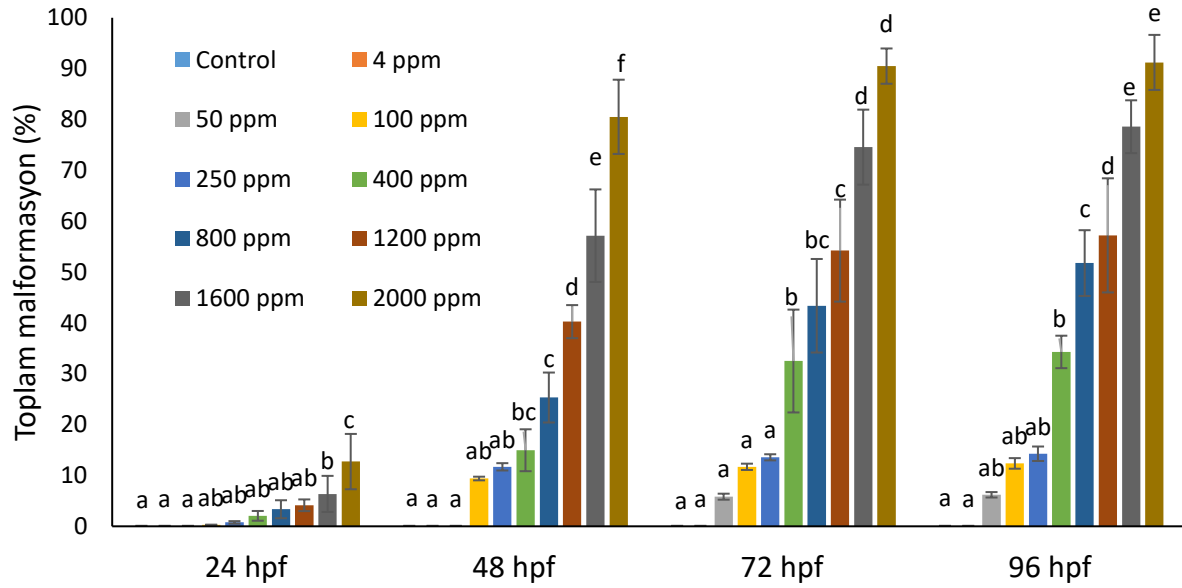
Benzer şekilde, yüksek dozda karmosine maruz kalmanın kuluçka oranlarında bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 6). Konsantrasyona bağlı olarak: Sonuçlarımızdaki kuluçkadan çıkıştaki gecikmeler muhtemel sebebi, bazı yumurtaların embriyolarının koryonu kırılmamasıdır. Diğer taraftan bu duruma, boya uygulanması sonucunda kuluçkadan çıkmak için kullanılan enzimlerin inhibisyonu sebep olabilir. (Baran ve ark., 2018). Yumurtadan çıkma zorluğunun bir başka açıklaması da spontan kas hareketlerinin zayıflamasına neden olan nöromüsküler eksikliklerdir (De la Paz ve ark., 2017). Nitekim azo boyaları da dahil olmak üzere farklı toksikantlara maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında kuluçka oranında bir azalma gözlenmiştir (Suvarchala ve Philip, 2016; Li ve ark., 2017; Joshi ve Katti, 2018; Gupta ve arkadaşları, 2019).



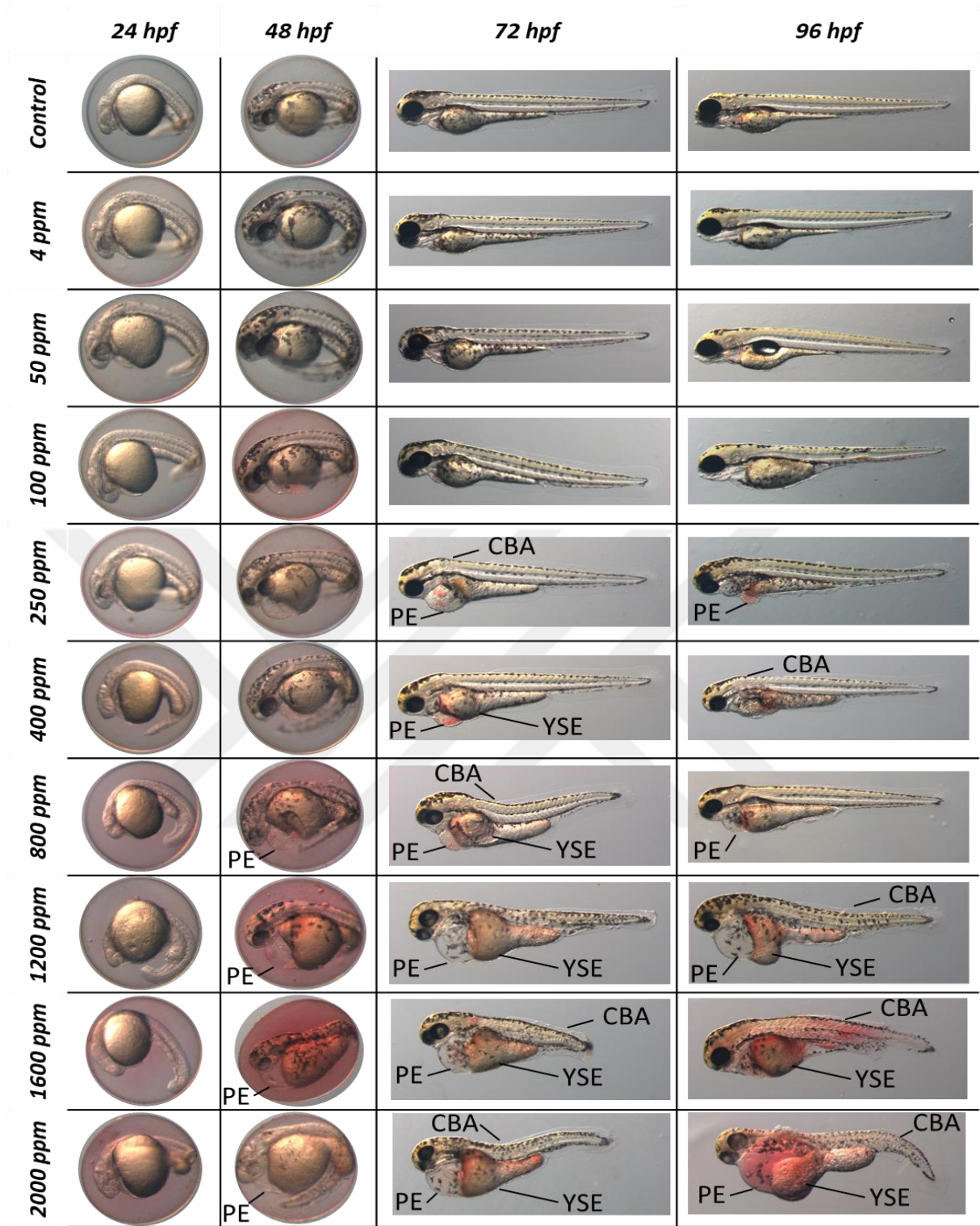
Şekil 6. Karmosine maruz kalan Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarının 96 saat maruz kalma süresi boyunca kuluçka oranları. (* $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi)

Bu çalışmada perikardiyal ödem (PE), yumurta kese ödemi (YSE), vücut malformasyonları (BM) (kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve kafa malformasyonu dahil) ve kavisli vücut eksen (CBA) gibi tipik malformasyonlar morfolojik uç nokta olarak incelendi. Doza bağlı olarak toplam malformasyonda artış görülmüştür. (Şek. 1A-1D). Malformasyonlar içerisinde yüksek oranda olarak perikardiyal ödem, yumurta kese ödemi, kuyruk anomalisi ve spinal eğrilik gözlemlendi. Bununla birlikte, karmosine maruz kalan larvalarda kafa malformasyonu gözlenmedi. Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında deformitelerin veya yumurta keselerinin oluşumunun gecikmiş besin kesesi resorpsiyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, yumurta kese ödemi zebra balığı (*Danio rerio*) gelişimsel toksisite taramalarında sıkça gözlenmektedir. Yumurta oldukça lipofilik olduğu ve su içeriği düşük olduğu bilinmektedir. Embriyo, yumurta kesesinde bir su bariyeriyle bulunduğu su ortamındaki ozmotik dengeyi sağlar (Sant ve Timme-Laragy, 2018). Azo boyalarının, yüksek su çözünürlüğü özellikleri nedeniyle bu ozmotik dengeyi bozabileceği ve embriyoya aşırı su alımına ve bunun sonucunda ödem oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir. (Jiang ve ark., 2020). Bir deneyde (Gupta ve ark., 2019), malformasyonlar veya gecikmiş kemik gelişimi nedeniyle başka bir azo boyası olan eritropine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında büyük bir yumurta kesesi gözlemlenmiştir. Karmosine maruz kalan embriyoların larvalarında gözlenen anormallik, omurga eğriliği ve skolyoz, bu katkı maddesinin asetilkolin, asetilkolinsteraz ve reseptör sistemlerini etkilemiş olabileceği, dolayısıyla zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında nöronal ve kas gelişimini etkilemiş olabileceği temelinde açıklanabilir. (Behra ve arkadaşları, 2002). Bir asetilkolinsteraz inhibitörü olan organofosfat klorpirifosa maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında spinal eğrilik ve notochord bükme bildirilmiştir (Sreedevi ve arkadaşları, 2014). Joshi ve Katti

(Joshi ve Katti, 2018), başka bir azo boyası olan tartrazine maruz kalması sonucunda zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında kuyruk bozulması, yumurta kese ödemi ve kardiyak ödem varlığı kaydedilmiştir.



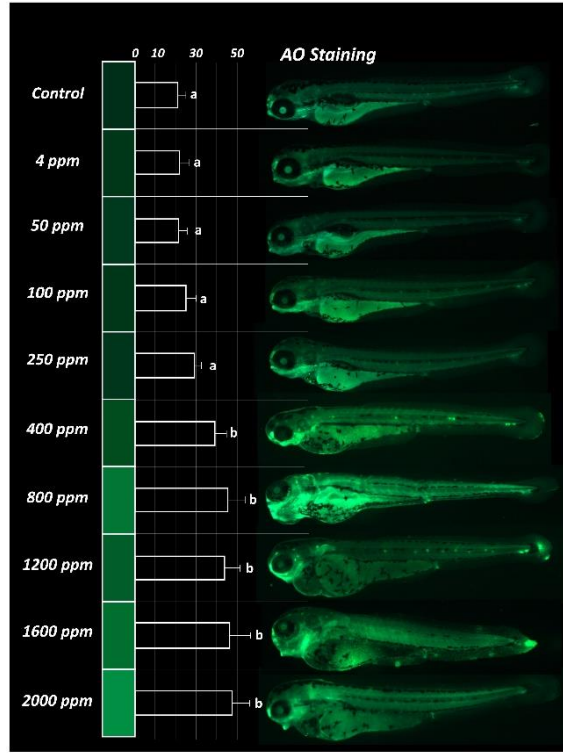
Şekil 7. Karmosine ve kontrol gruplarına maruz kalan embriyolarında gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (* $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi)



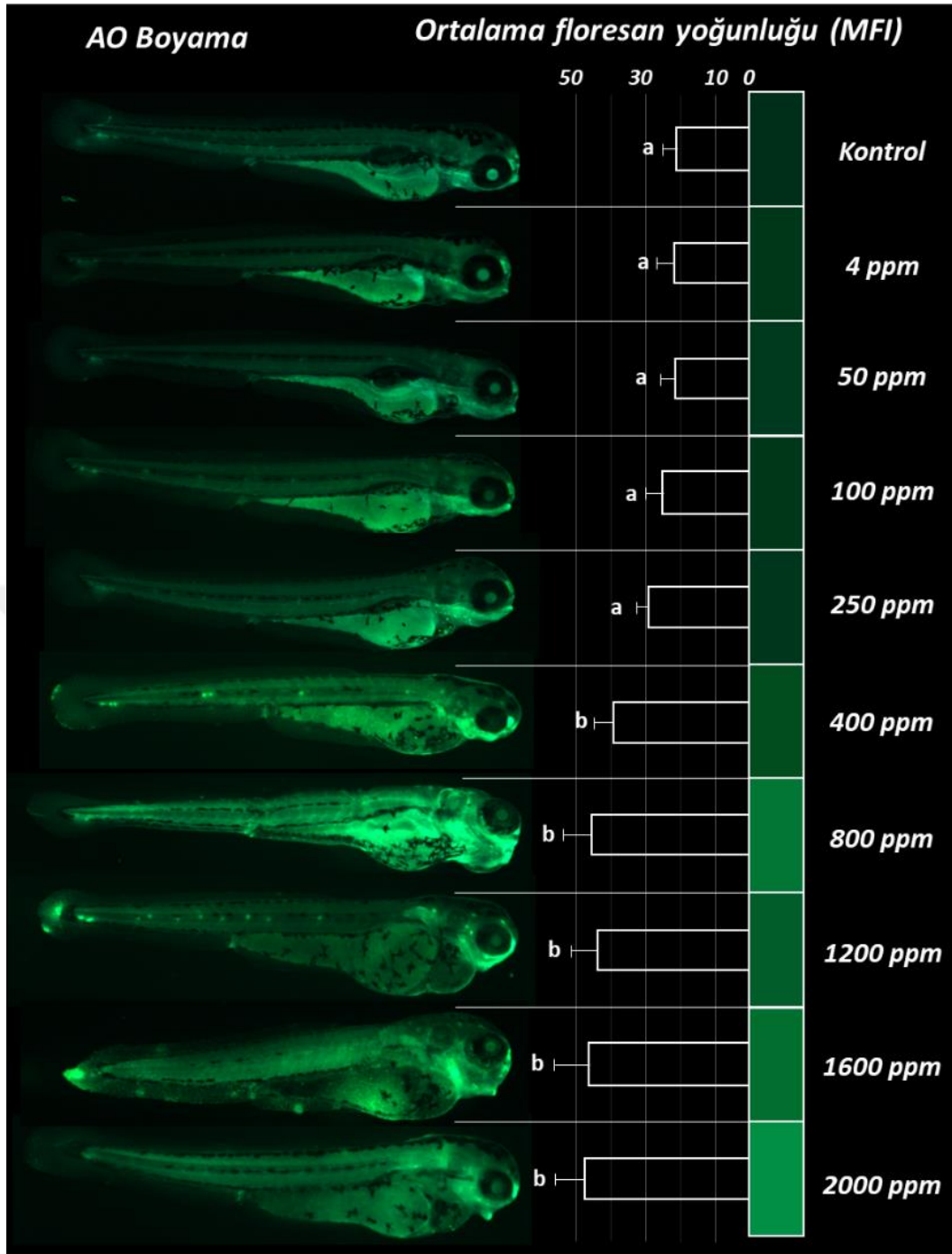
Şekil 8. Karmosine ve kontrol gruplarına maruz kalan embriyoların mikroskobik görüntüleri (PE: Perikardiyal ödem; YSE: Yumurta kese ödemi; CBA: Kavisli gövde eksen)

Apoptoz açısından bir değerlendirme yapıldığında, özellikle 400 ppm'in üzerinde karmosine maruz kalan larvalarda floresan yoğunluğunun doza bağlı olarak yüksek oranda arttığı gözlenmiştir. (Şekil 10). Sonuçlarımıza benzer şekilde, reaktif siyah 5 azo boyanın apoptotik hücre ölümünü artırarak zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında gelişimsel kusurları teşvik ettiği bildirilmiştir (Manimaran ve ark., 2018). Ayrıca, farklı çalışmalar sentetik

tekstil boyalarına maruz kalmanın DNA hasarını güçlü hale geldiğini ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve DNA ligazının inhibisyonu yoluyla DNA onarımını engellediğini ileri sürmektedir (Liu ve ark., 2008).



Şekil 9. Apoptotik hücreler 96. saat larvasında acridine turuncu (AO) lekelenme ve sinyallerin ortalama floresan yoğunluğu. Floresan yoğunluk analizlerinde daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için farklı gruplara ait larvalar görüntüleme yaparken aynı resimde görüntülenmeye çalışılarak elde edildi (devam)

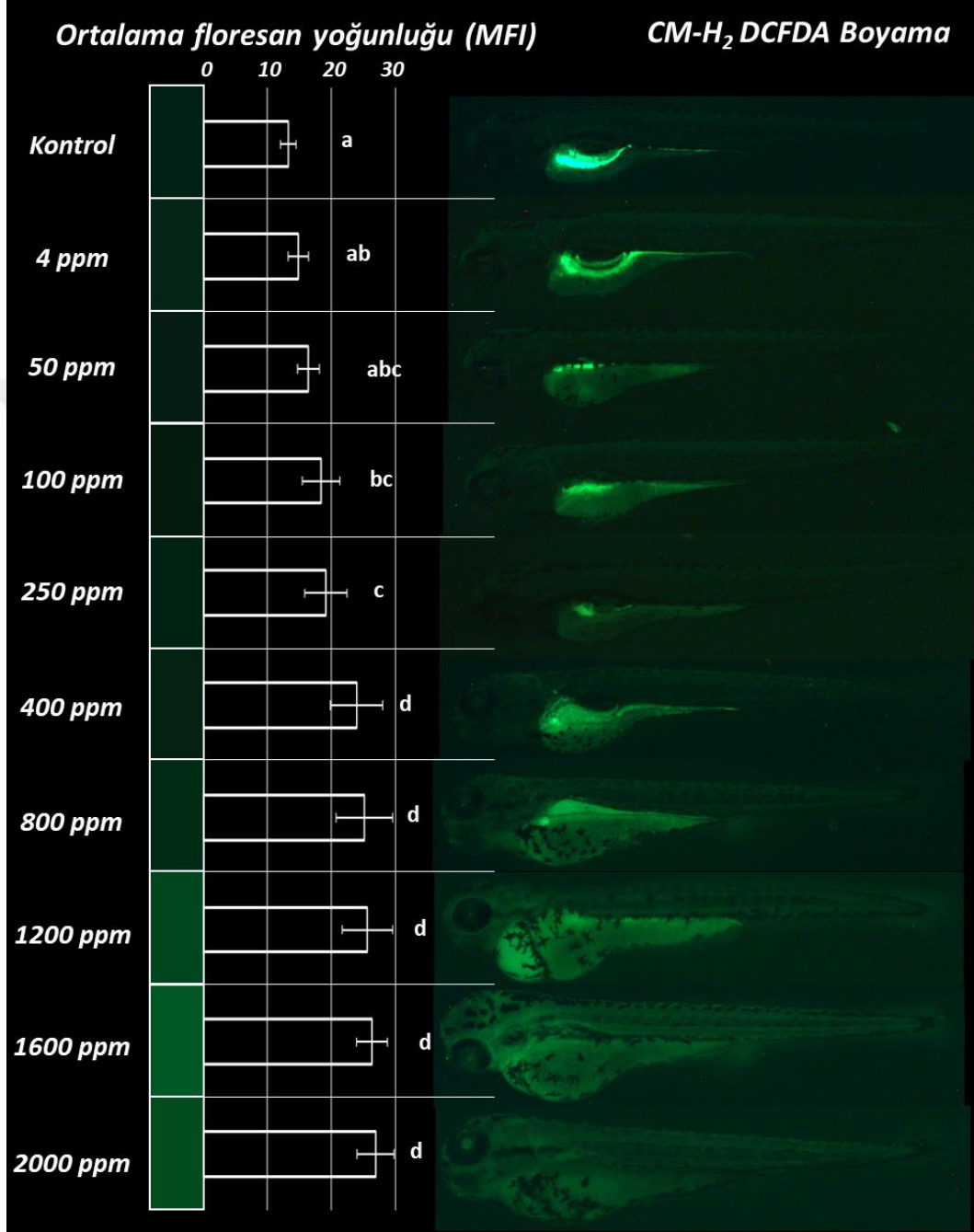


Şekil 9. Apoptotik hücreler 96. saat larvasında acridine turuncu (AO) lekelenme ve sinyallerin ortalama floresan yoğunluğu. Floresan yoğunluk analizlerinde daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için farklı gruplara ait larvalar görüntüleme yaparken aynı resimde görüntülenmeye çalışılarak elde edildi

Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 5 larva, ANOVA, $p < .05$, Tukey'in testini içerir).

ROS, aerobik yaşamın normal bir özelliği olarak ortaya çıkan bir dizi moleküler oksijen türevidir. Metabolizmada farklı antioksidan savunma sistemleri tarafından dengede tutulan ROS, farklı tetikleyici ajanlara yüksek maruziyet ile 'oksidatif stres' olarak adlandırılan moleküler hasara neden olur (Sies ve Jones, 2020). Bu çalışmada karmosin maruz kalan canlı larvalarda ROS düzeyi ortalama floresan ölçülerek değerlendirildi. Sonuçlar,

karmosin maruz kalan larvalarda floresan yoğunluğunun doza bağlı bir şekilde ($p < 0.05$) önemli ölçüde arttığını ortaya koydu (Şekil 11). Başka bir çalışmada bir azo boyası olan Acid Black'in Kaur ve Kaur tarafından tatlı su *Labeo rohita*'da oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Kaur ve Kaur, 2015)

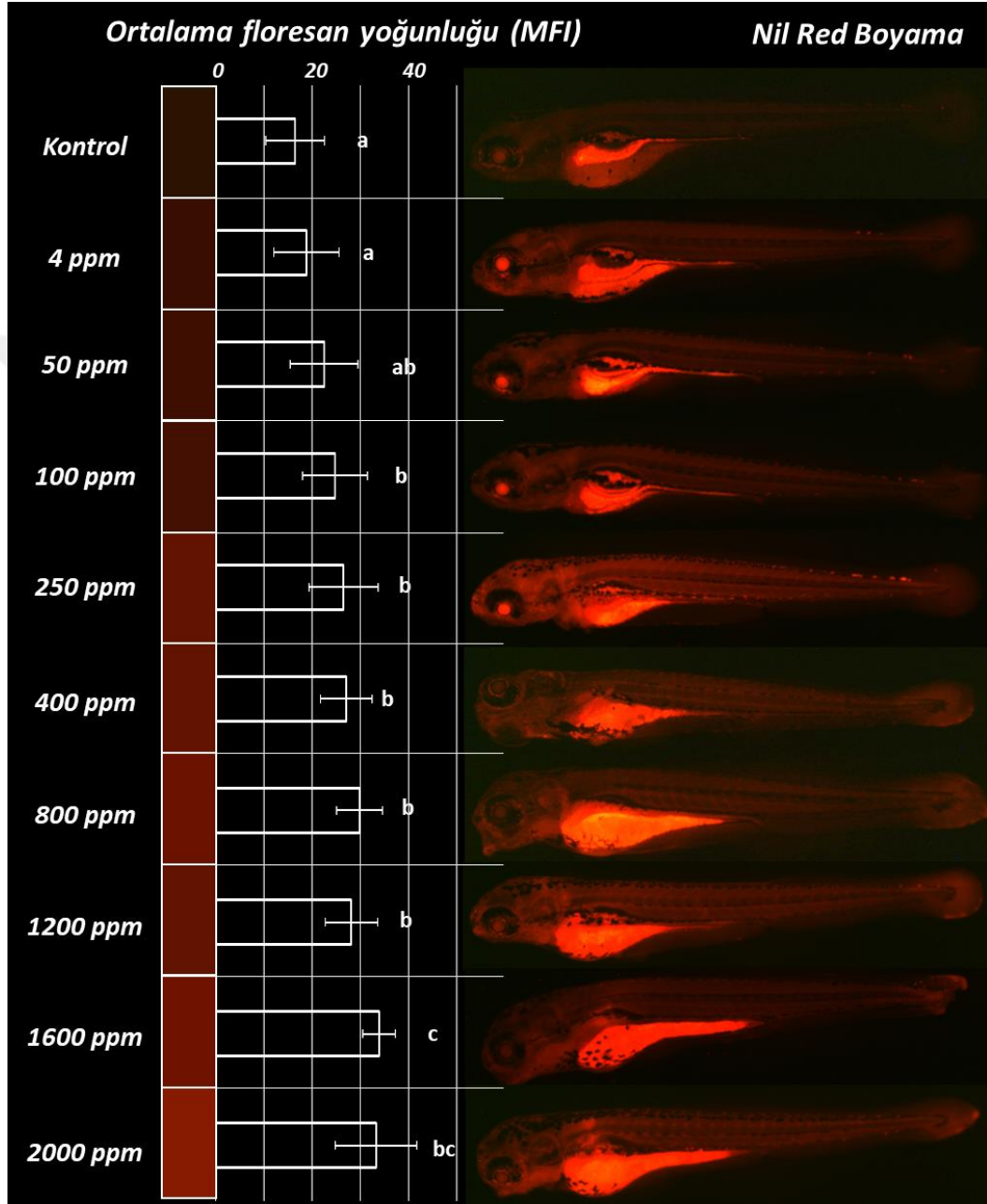


Şekil 10. In vivo CMH₂DCFDA 96. saat larvasında üretilen ROS'un boyanması ve sinyallerin floresan yoğunluğu

Floresan yoğunluk analizlerinde daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için farklı gruplara ait larvalar görüntüleme yaparken aynı resimde görüntülenmeye çalışılarak elde edildi. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 5 larva, ANOVA, $p < .05$, Tukey'in testini içerir).

Benzer şekilde, başka bir azo boyası, Disperse Red 1, tatlı su *Hydra attenuate*'de LPO oluşumunu engellemek amacıyla antioksidan savunmaları aktif hale getirir (de Jong ve ark.,

2016). Ayrıca, tekstil endüstriyel atıklarına maruz kalan yetişkin zebra balıklarında ROS aşırı üretildiği ve GST ile süperoksit dismutaz aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Zhang ve arkadaşları, 2012). Azo boyaları tarafından indüklenen oksidatif stresin, batı kurbağasının erken aşamalarında oksidatif stres geni ile ilgili transkripsiyonel düzenleme de dahil olmak üzere genomik olayları modüle ettiği de belirtilmiştir (*Silurana tropicalis*) (Soriano ve ark., 2014).

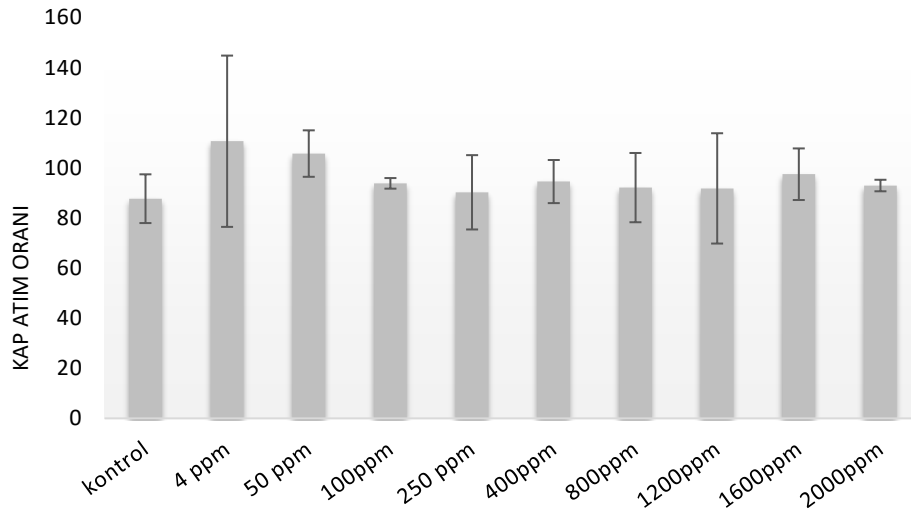


Şekil 11. Nil Adiposit lipid damlacıklarının kırmızı lekelenme ve sinyallerin ortalama floresan yoğunluğu

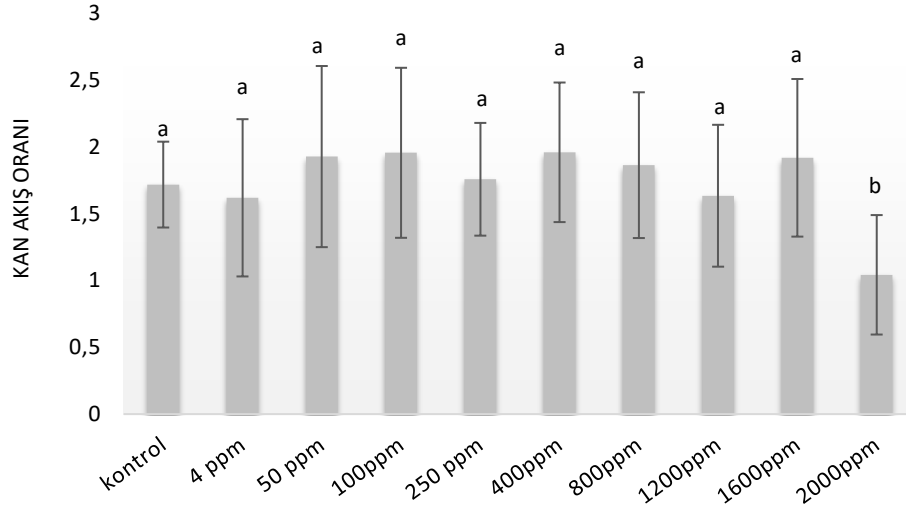
Floresan yoğunluk analizlerinde daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi için farklı gruplara ait larvalar görüntüleme yaparken aynı resimde görüntülenmeye çalışılarak elde edildi. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 5 larva, ANOVA, $p < .05$, Tukey'in testini içerir).

Diyetlerle alınan gıda boyaları gibi ksenobiyotik bileşiklerin endokrin sinyalleri ve lipid homeostazını değiştirerek obeziteye neden olabileceği bildirilmiştir (Tingaud-Sequeira ve ark.,

2011). Lipid metabolizması, lipid birikimini indükleyen çeşitli faktörlere yanıt olarak, hücre bölünmesi yoluyla büyümelerini ve üremelerini sağlamak için bir strateji olarak değiştirilebilir. (D'Alessandro ve Antoniosi Filho, 2016). Nil Kırmızısı, farmasötik veya toksikolojik çalışmalarda adiposit lipid damlacıklarını tespit etmek için floresan prob olarak genellikle kullanılır. Bu çalışmada, karmosine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları, Nil Kırmızısı'nın göreceli floresan yoğunluğunda doza bağlı bir artış göstermiştir (Şekil 12). Ksenobiyotik maruziyet de dahil olmak üzere çoğu çevresel strese maruz kalan organizmaların fizyolojik homeostazı korumak için enerji metabolizması yoluyla düzenleyici süreçleri başlattığı bilinmektedir. Farklı dozlarda karmosine maruz kalan sıçanlarda serum total lipidler, kolesterol ve trigliserit seviyelerinin ağızdan önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Aboel-Zahab ve arkadaşları, 1997). Elekima (2016), ağızdan karmosine maruz kalan sıçanlarda toplam kolesterol, trigliserit ve LDL-Cas seviyelerinde artış gözlenmiştir. Yazarlar, bu artışların azo boyalarının neden olduğu hepatosit hasarı nedeniyle sırasıyla kolesterol ve trigliseritlerin bozulması için gerekli olan lesithin kolesterol transferleri ve hepatik lipaz gibi enzimlerin üretilmemesinden kaynaklanabileceğini iddia ettiler.

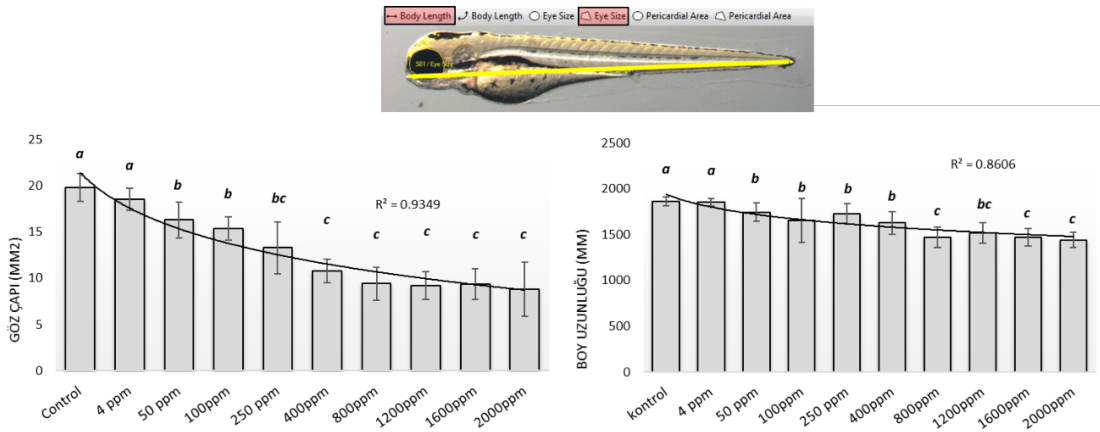


Şekil 12. Karmosine maruz kalan kalp atış hızı (A) ve kan akışı (B) ve zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarını 5 dpf'de kontrol edin. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 10 larva içerir; * $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi) (devam)



Şekil 12. Karmosine maruz kalan kalp atış hızı (A) ve kan akışı (B) ve zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarını 5 dpf'de kontrol edin. Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 10 larva içerir; * $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi)

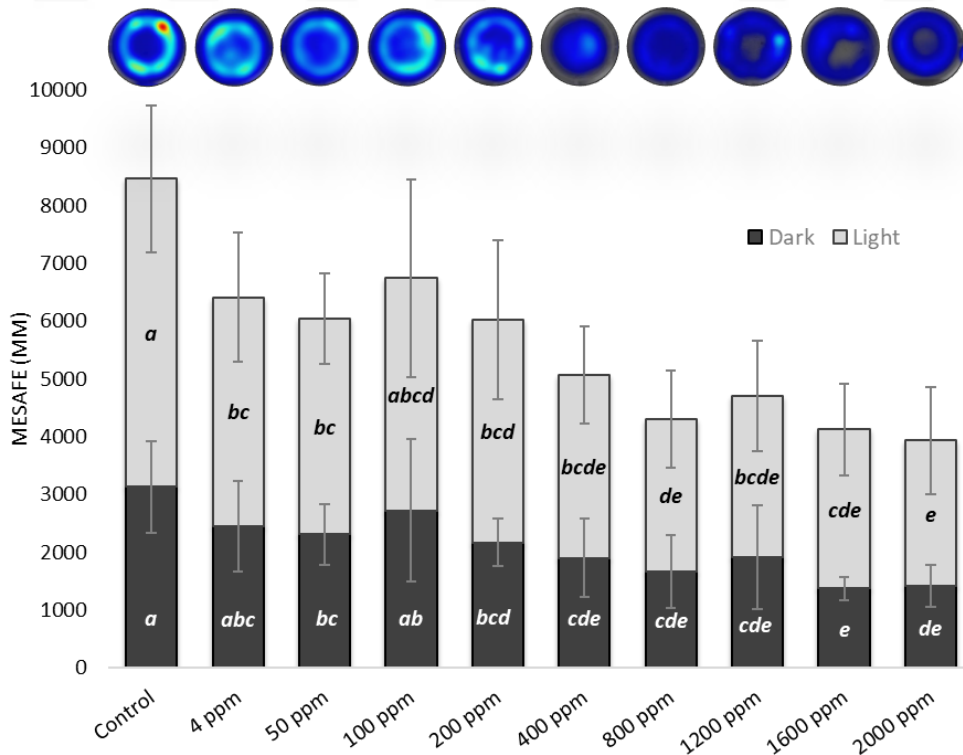
Zebra balıklarında kalp, gelişim aşamasındaki en ilk dikkate alınan organlardan biridir. Kalp fonksiyonu ve fizyolojik homeostaz göstergeleri olarak, kalp atış hızı ve kan akış hızı zebra balıklarında gelişimsel toksisiteyi değerlendirmek sebebiyle tercih edilen önemli parametrelerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, karmosine maruz kalmanın zebra balıklarının embriyonik gelişimi aşamasında kalp atış hızını kayda değer ölçüde etkilemediğini, ancak en yüksek dozda kan akış hızında ciddi bir yavaşlamaya neden olmuştur (Şekil 13). Zebra balıklarının hem sempatik hem de parasempatik otonom sinir sistemlerinin dallarıyla bulunduğu ortamdaki değişikliklere yanıt vererek kalp atış hızını aktif olarak düzenleyebilmiştir (Li ve ark., 2017). Bu sebeple, 120 saate kadar azo boyalarına devamlı maruz kalmanın embriyonik kalp atış hızında yavaşladığına sebep olduğu bildirilmiştir (Stainier, 2001). Çalışmamızda kalp atış hızının etkilenmemesinin bir sebebi karmosine akut maruziyete bağlı olabilirken, diğer bir sebep; en yüksek dozda kaydedilen kan akış hızındaki önemli azalma ve hipoksantin seviyelerindeki artmanın daha düşük kan oksijen seviyeleri ile ilişkili olabilir (Şekil 13). Bu molekül genellikle hipoksi ile ilgilidir (Lee ve ark., 2018).



Şekil 13. Göz büyüklüğü (a) ve vücut uzunluğu (b) karmosine maruz kalır ve zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarını 5 dpf'de kontrol edin.

Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 20 larva içerir; * $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi).

Sonuçlar gösteriyorki, karmosine maruz kalmak zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında vücut uzunluğu ve göz boyutunda doza bağlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 14). Bazı çalışmalarda, küçük göz fenotipine neden olan apoptoz artışı olan retina hücrelerinin sayısında azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir. Çalışmamızla uyumlu olarak, Sunset Yellow'a maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında mikroftalimin (göz çapında azalma) tespit edildiği bildirilmiştir (Joshi ve Pancharatna, 2019). Vücut uzunluğundaki azalmanın bir diğer nedeninin de doza bağlı olarak malformasyonların artması olabileceği göz ardı edilmemelidir.

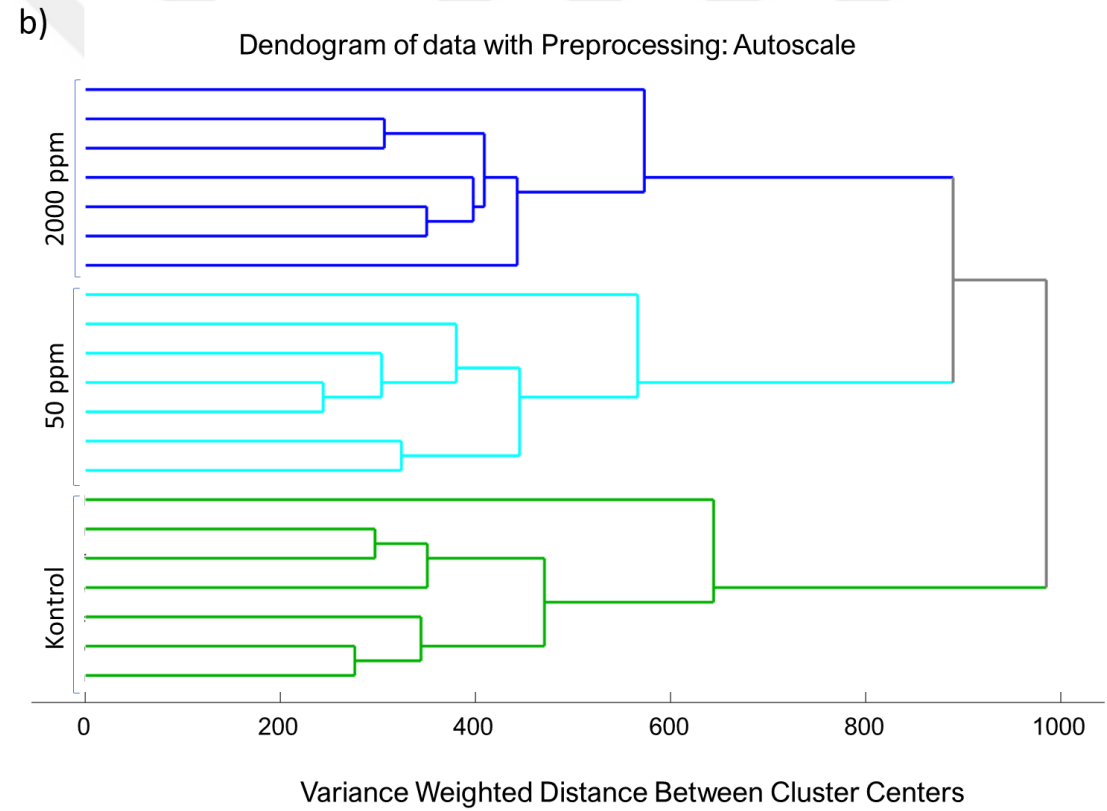
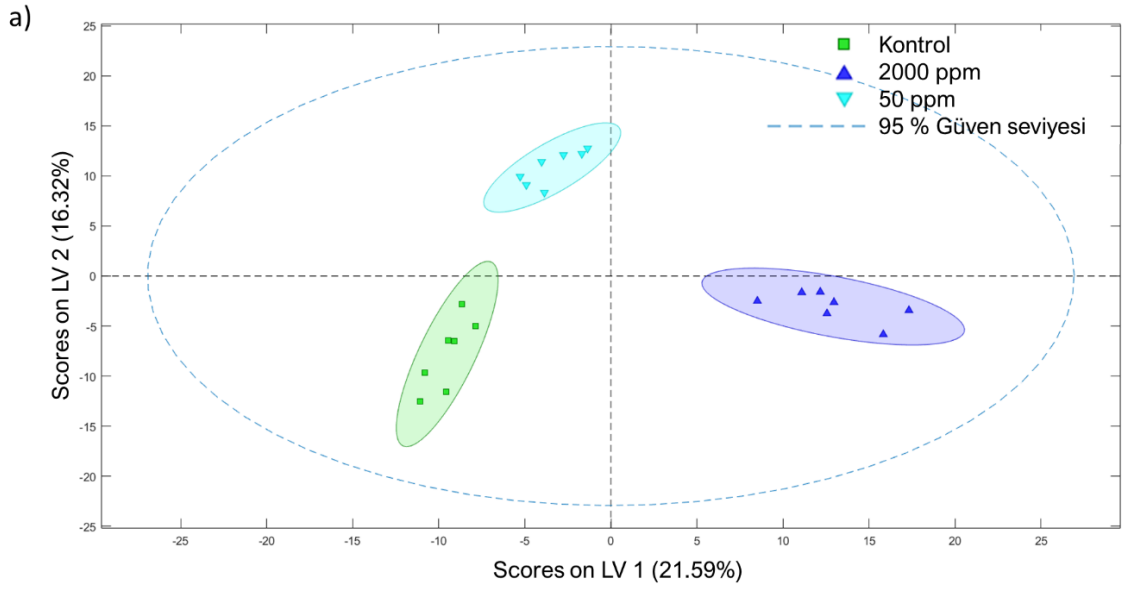


Şekil 14. Karmosine maruz kalan ve 6 dpf'de zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarını kontrol eden lokomotor aktivite (toplam mesafe) (c)

Veriler, üç bağımsız deneyden S.D. $\pm$ anlamına gelir (her çoğaltma 24 larva içerir; * $p < .05$; ANOVA, Tukey'in testi).

Lokomotor aktivitesinde karmosine maruziyetinin neden olduğu bir diğerk önemli bozukluk gözlenmiştir (Şekil 15). Sinir sisteminin farklı seviyelerinde ayarlanan lokomotor aktivitesi birçok farklı endojen/eksojen rahatsızlığa karşı duyarlıdır. Ayrıca, lokomotor aktivitesindeki değişiklikler nöromüsküler kavşak, farklı merkezi desen yapıcılar veya daha fazla rostral düzeydeki değişikliklerin göstergesidir (Dutra Costa ve ark., 2020). Bu yönüyle, zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları, ekolojik açıdan ilgili uç noktalarla erken yaşam evrelerinde farklı nörodavranışsal etki alanlarını değerlendirmek nedeniyle kullanılabilecek önemli bir model organizmadır (Tegelenbosch ve arkadaşları, 2012). Mevcut çalışmada, karmosinin davranışsal etkileri zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları kullanılarak değerlendirildi. Şekil 15 incelendiğinde kontrol grubu larvalarının hem toplamda hem de gece/gündüz evrelerinde net biçimde hareketli olduğu kaydedilmiştir. ($p<0.05$). Locomotor aktivitelerindeki bu azalmanın karmosine doz artışına bağlı bir eğilimde olduğu söylenebilir. Larvalarda gece ve gündüz evreleri arasında kontrol grubu da dahil olmak üzere önemli bir davranışsal fark gözlenmedi. Bu fark gündüz evresinde daha belirginken, gece evresinde nispeten benzer bulgular kaydedilmiştir.

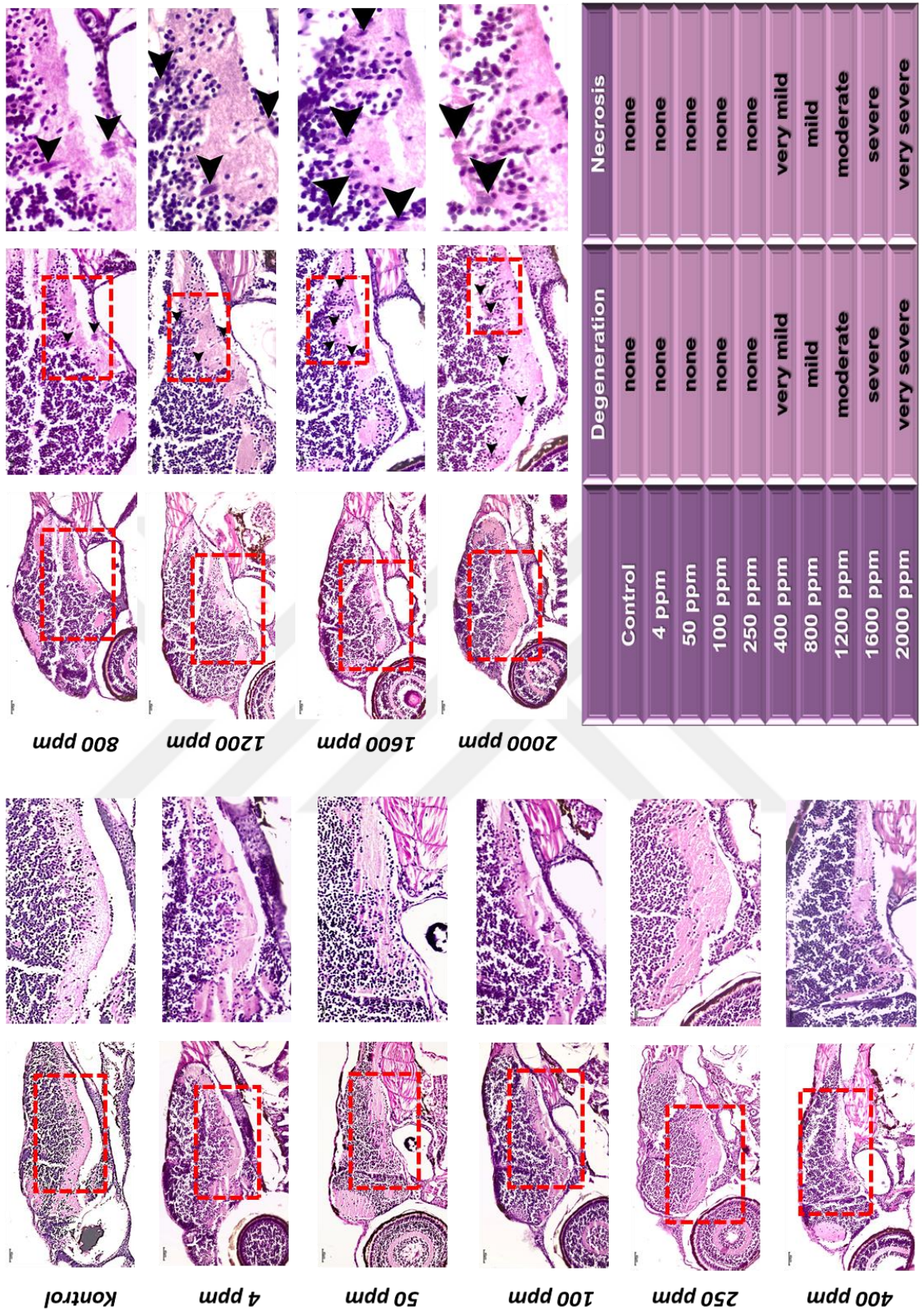
Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında özellikle yüksek dozda gözlenen azalmış lokomotor aktivitesi iki fenomen ile açıklanabilir; birincisi doza bağlı artan malformasyonlar ve ikincisi sinir sistemi metabolom profilidir. Yukarıda karmosine maruz kalmanın dozuna bağlı malformasyonda artış bir gözlenmiştir. Aslında çalışmalar, ksenobiyotiklere maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında gelişimsel toksisiteye bağlı olarak gözlenen malformasyonların lokomotor aktivitesini etkilediğini ortaya koydu (Abe ve arkadaşları, 2017a; Abe ve arkadaşları, 2017b; Sulukan ve arkadaşları, 2021; To ve arkadaşları, 2021).



Şekil 15. a) OPLS-DA (Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analiz) yöntemiyle elde edilen kontrol, 50 ppm ve 2000 ppm maruziyet gruplarının m/z değerlerinin skor grafiği (TOF MS yöntemiyle dedekte edilmiştir). b) Analize edilen grupların varyans temelli uzaklık dendrogramı (PCA temelli). c) Kontrole karşılık 50 ppm maruziyetin volkan ve yolak analiz grafiği, kontrole karşılık 2000 ppm ve 50 ppm karşılık 2000 ppm. Karmosin maruziyetinin kimliklendirilmiş metabolitlerin pik alanına göre log₂ bazlı fold değişimi ve log₁₀ temelli p-değeri. (devam)

Bu anlamda önemli olan doz maruziyetine baēlı sorunların etki mekanizmasını açıklamaktır. Bu bağlamda, mevcut çalışma yüksek ve düşük dozda karmosine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının metabolom profilleri araştırılmıştır. Metabolom sonuçlarına göre, hem düşük (50 ppm) konsantrasyonda hem de yüksek (2000 ppm) karmosine maruz kalma konsantrasyonunda dikkat çekici deēişiklikler saptanmıştır (Şekil 16). Analiz, 45 açıklamalı metabolitin analizi sonucunda tahmin edildiēi gibi, bu metabolit seviyelerindeki farklılık daha yüksek konsantrasyonda daha netti.





Şekil 16. Karmosine maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının hematoksilin ve eozin boyamasının (H&E) mikroskopik görüntüsü. Ok ucu nekrozu gösterir

Guanosine, maruz kalma gruplarında önemli ölçüde yüksek düzenlenmiş açıklamalı metabolitlerdendir. Sonuçlara göre, Guanosine'nin yarı nicel yoğunluğunda doza bağımlı

yükseklik gözlenmiş ve kontrole karşı 50 ppm maruziyet için yaklaşık 5 kat artış ölçülmüştür. Bu kat yüksekliği 2000 mg maruziyette yaklaşık 10'a ulaştı. Guanosin hücre metabolizmasında purin nükleoziddir ve nöral dejeneratif yaralanmalarda önemli bir rol oynar (Lanznaster ve ark., 2016). Boyaya maruziyeti, organizmayı karmosine toksisiteye karşı korumak için konsantrasyonunda artış sağlamaya çalışabilir.

İkinci önemli metabolitler glutamin sentetazının geri dönüşü olmayan inhibitörü olarak bilinen methionine sülfoksimid (MeS) (Ronzio ve ark., 1969). Glutamin sentez eksikliği glial disfonksiyon, nöron kaybı ve canlı organizmalarda anormal hareket olarak patolojik bozuklukları başlatabilir (Zhou ve ark., 2019). Ayrıca, yüksek düzeyde MeS'in, özellikle nöron hücrelerinin nörotransmisyonunda beyin fonksiyonunda çok önemli olan glutamin seviyesini düşürmüştür (Albrecht ve ark., 2010). Histopatoloji analizlerinden elde edilen sonuçlara göre doza bağımlı bir şekilde artan nöronların dejenerasyonu ve nekrozu bu bulgularla örtüşmektedir (Şekil 10). Çoğunlukla hipoksi ile ilişkili olan hipoksantin, kontrol açısından karmosine maruz kalma gruplarında önemli ölçüde yüksek bulunan bir başka açıklamalı metabolittir. Artan hipoksantin miktarı kandaki düşük oksijen seviyesini gösterir (Lee ve ark., 2018). Bu, herhangi bir canlı organizmanın bilişsel davranışını değiştirebilir. Bu artış, özellikle en yüksek dozda görülen kan akış hızının yavaşlaması sebebiyle oksijen eksikliği sonucudur.

Triptofan hipoksi ve nörodejeneratif bozukluklarla ilişkilidir. Artan triptofan seviyesi nörodejeneratif vaka için önemli bir göstergedir (Platten ve ark., 2019). Canlı organizmalarda fenilalanin ve fenilpiruvik asit birikimi de nörolojik bozuklukların sebebi oldu (Asare ve arkadaşları, 2021). Bu nedenle, karmosine maruz kalma sonucu bu metabolitlerin seviyelerindeki artış, davranışlarındaki farklılıkların habercisi olabilir. N-acetyl histidin ve oksitlenmiş glutatyon seviyeleri de oksidatif stresin bir belirtiydi (Dwivedi ve ark., 2020; Holeček, 2020) canlı organizmalar üzerinde nörodejeneratif sonuçlara sebep olabilir (Solleiro-Villavicencio ve Rivas-Arancibia, 2018). Bunun yanında, özellikle balıklarda N-asetil-histidin, gözün ozmotik basıncının bir su pompası olarak görev alır. Bu metabolik değişim, karmosine maruz kalma sonucu gözlenen göz boyutundaki azalmanın altında yatan bir mekanizma olabilir. Bu sonuca göre, göz boyutundaki doza bağlı azalma dehidratasyon sonucu düşünülebilir. Öte yandan karmosine maruz kalma gruplarında sphingosine ve 6-hidroksi sphingosine düzeylerinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum COVID-19 ve sıtma ile çok benzer düşük oksijen vakalarında bulunmuştur (Punsawad ve Viriyavejakul, 2017; Marfia ve arkadaşları, 2021). Bu bulgular hipoksantin ve triptofan düzeylerinin yükselmesiyle uyumludur.

50 ppm kırmızı boya maruz kalan zebra balığı embriyolarında Sfingolipid metabolizmasında değişimler ortaya çıkmıştır bu durum; öncelikle kalp damar hastalıklarıyla ve apoptozla ilgili bir sorun ortaya çıktığını gösterir (Mendelson, Zygmunt ve ark. 2013, Zhu, Ren ve ark. 2018)

Kontrol grubuna göre 50 ppm kırmızı boya göre glisin metabolizmasında değişimler ortaya çıkmıştır. Karmosininin 50 ppmlik dozunda glisin metabolizmasını etkilediğini haliyle nörotoksik ve inflamatuvar etki gösterdiği yorumunu yapabiliriz.

Serin, insanlarda esansiyel olmayan bir amino asittir (vücut tarafından sentezlenir), Serin birçok proteinde bulunur ve fonksiyonel olarak önemlidir. Bir alkol grubu ile yağların, yağ asitlerinin ve hücre zarlarının metabolizması için serin gereklidir; kas gelişimi ve sağlıklı bir bağışıklık sistem için önemlidir.

Kontrolde göre serin metabolizması göre 50 ppm karmosine maruz kalan balıklar arasında farklar oluşmuştur. Bu farklar bize karmosinin amonoasit metabolizmasını etkilediğini gösterir. Fakat serin metabolizması sadece protein değil yağ metabolizmasında da etkilidir. Bu durumda her iki metabolizmanın etkilendiğini görmüş oluruz. Teronin de aynı şekilde hem yağların hem proteinlerin bozulduğunu gösterir. Serin ve teronin metabolizmasındaki bu değişiklikler bağırsaktaki işleyişte de değişim veya bozulma olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Nanoik asit kalp hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir (Liu, Li ve ark. 2020) ve 2000 ppm karmosine uygulanan grupta oldukça yüksek metabolize olmuş bir nanoik asit görüyoruz. Fakat nanoik asit, fitol, ubiquinol bitkisel kaynaklı bir boya kullanıldığından artışı tartışılmaya gerek duyulmamıştır.

Sonuç olarak, karmosine maruz kalma düşük oksijen seviyelerine, artan oksidatif strese ve nörodejeneratif etkilere ve davranış değişikliğine neden olan bazı metabolitlerin yüksek seviyesine neden olabilir. Organizma bu duruma glutatyon, N-asetil histidin ve guanosin gibi nöroprotektif ajanlar, antioksidan moleküllerin konsantrasyonunu artırarak yanıt verir. Özellikle yüksek dozlarda karmosine maruz kalmak zararlı nörodejeneratif etkilere neden olan çok ciddi bir durumdur.

KAYNAKLAR

- Abe, F.R., Mendonça, J.N., Moraes, L.A., de Oliveira, G.A., Gravato, C., Soares, A.M., de Oliveira, D.P., 2017a. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere* 178, 282-290.
- Abe, F.R., Mendonça, J.N., Moraes, L.A.B., Oliveira, G.A.R.d., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Oliveira, D.P.d., 2017b. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere* 178, 282-290.
- Abe, F.R., Soares, A.M.V.M., Oliveira, D.P.d., Gravato, C., 2018. Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. *Environmental Pollution* 235, 255- 262.
- Aboel-Zahab, H., el-Khyat, Z., Sidhom, G., Awadallah, R., Abdel-al, W., Mahdy, K., 1997. Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll Chim Farm* 136, 615-627.
- Ai-Mashhedy, L.A., Fijer, A.N., 2016. Acute toxicity of food additives tartrazine and carmoisine on white male mice. *International Journal of PharmTech Research* 9, 364-367.
- Albrecht, J., Sidoryk-Węgrzynowicz, M., Zielińska, M., Aschner, M., 2010. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biology* 6, 263-276.
- Amin, K., Hameid II, H.A., Abd Elsttar, A., 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, 2994-2999.
- Asare, K.K., Afrifa, J., Opoku, Y.K., 2021. Mechanisms Underlying Induced Pseudo-Scleroderma among Patients with Phenylketonuria Metabolic Disorder. *Global Journal of Dermatology & Venereology* 9,1-8.
- Baran, A., Köktürk, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S.B., 2018. Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable Daily Intake). *Regul Toxicol Pharmacol* 94, 16-21.
- Baran, A., Yildirim, S., Ghosigharehaghaji, A., Bolat, İ., Sulukan, E., Ceyhun, S., 2020. An approach to evaluating the potential teratogenic and neurotoxic mechanism of BHA based on apoptosis induced by oxidative stress in zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Human & Experimental Toxicology*, 0960327120952140.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.-L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature neuroscience* 5, 111-118.
- Cakmakci S, Topdaş EF, Kalın P, Han H, Şekerci P, Polat Kose L, Gulcin I ,2015. Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *Int J Food Sci Technol* 50(2):472–481
- Capriello, T., Visone, I.M., Motta, C.M., Ferrandino, I., 2021. Adverse effects of E150d on zebrafish development. *Food and Chemical Toxicology* 147, 111877.

- Chung, K.T., Stevens, S.E., Jr., Cerniglia, C.E., 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18, 175-190.
- Coultate, T., Blackburn, R.S., 2018. Food colorants: their past, present and future. *Coloration Technology* 134, 165-186.
- D'Alessandro, E.B., Antoniosi Filho, N.R., 2016. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58, 832-841.
- de Jong, L., Pech, N., de Aragão Umbuzeiro, G., Moreau, X., 2016. Multi-scale biomarker evaluation of the toxicity of a commercial azo dye (Disperse Red 1) in an animal model, the freshwater cnidarian *Hydra attenuata*. *Water research* 96, 62-73.
- De la Paz, J.F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M.S., Allende, M.L., 2017. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *International journal of molecular sciences* 18, 710.
- Dixit, S., Purshottam, S., Gupta, S., Khanna, S., Das, M., 2010. Usage pattern and exposure assessment of food colours in different age groups of consumers in the State of Uttar Pradesh, India. *Food Additives and Contaminants* 27, 181-189.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and environmental medicine*, 61(9), 727-728.
- Dutra Costa, B.P., Aquino Moura, L., Gomes Pinto, S.A., Lima-Maximino, M., Maximino, C., 2020. Zebrafish Models in Neural and Behavioral Toxicology across the Life Stages. *Fishes* 5.
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., Mandal, P.K., 2020. Glutathione in brain: overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation and potential therapeutic role in brain disorders. *Neurochemical research* 45, 1461-1480.
- Elbanna, K., Sarhan, O.M., Khider, M., Elmogy, M., Abulreesh, H.H., Shaaban, M.R., 2017. Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *Journal of Food and Drug Analysis* 25, 667-680.
- Elekima, I., 2016. Effect of carmoisine orally administered on lipid parameters of albino rats. *International Journal of Science and Research* 5, 861-864.
- Freeman, H. S., & Mock, G. N. 2007. Dye application, manufacture of dye intermediates and dyes. In Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology (pp. 499-590). Springer, Boston, MA.
- Gautam, N. 2015. Food colorants and their toxicology: An overview. *Sunsari Technical College Journal*, 2(1), 69-75.
- Göçer, H., Akıncioğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., & Gülçin, İ. (2013). Synthesis, Antioxidant, and Antiacetylcholinesterase Activities of Sulfonamide Derivatives of Dopamine-Related Compounds. *Archiv der pharmazie*, 346(11), 783-792.
- Gulcin, İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gupta, R., Ranjan, S., Yadav, A., Verma, B., Malhotra, K., 2019. Toxic effects of food colorants erythrosine and tartrazine on zebrafish embryo development. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 7, 876-885.
- Holeček, M., 2020. Histidine in Health and Disease: Metabolism, Physiological Importance, and Use as a Supplement. *Nutrients* 12, 848.
- Jiang, L.-L., Li, K., Yan, D.-L., Yang, M.-F., Ma, L., Xie, L.-Z., 2020. Toxicity assessment of 4 azo dyes in zebrafish embryos. *International journal of toxicology* 39, 115-123.

- Joint, F., Additives, W.E.C.o.F., Organization, W.H., 1983. Evaluation of certain food additives and contaminants: twenty-seventh report of the Joint FAO. World Health Organization.
- Joshi, V., Katti, P., 2018. Developmental toxicity assay for food additive tartrazine using zebrafish (*Danio rerio*) embryo cultures. *International journal of toxicology* 37, 38-44.
- Joshi, V., Pancharatna, K., 2019. Food colorant Sunset Yellow (E110) intervenes developmental profile of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Applied Toxicology* 39, 571-581.
- Kaur, S., Kaur, A., 2015. Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 167, 108-116.
- Khan, I.S., Ali, M.N., Hamid, R., Ganie, S.A., 2020. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. *Toxicology Reports* 7, 370-375.
- Lanznaster, D., Dal-Cim, T., Piermartiri, T.C.B., Tasca, C.I., 2016. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. *Aging Dis* 7, 657-679.
- Leathwood, P.D., Richardson, D.P., Sträter, P., Todd, P.M., van Trijp, H.C., 2007. Consumer understanding of nutrition and health claims: sources of evidence. *British Journal of Nutrition* 98, 474-484.
- Lee, J.S., Wang, R.X., Alexeev, E.E., Lanis, J.M., Battista, K.D., Glover, L.E., Colgan, S.P., 2018. Hypoxanthine is a checkpoint stress metabolite in colonic epithelial energy modulation and barrier function. *Journal of Biological Chemistry* 293, 6039-6051.
- Li, K., Wu, J.-Q., Jiang, L.-L., Shen, L.-Z., Li, J.-Y., He, Z.-H., Wei, P., Lv, Z., He, M.-F., 2017. Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere* 171, 40-48.
- Liu, F., Gentles, A., Theodorakis, C.W., 2008. Arsenate and perchlorate toxicity, growth effects, and thyroid histopathology in hypothyroid zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* 71, 1369-1376.
- Manimaran, D., Sulthana, A., Elangovan, N., 2018. Reactive black 5 induced developmental defects via potentiating apoptotic cell death in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Pharm Pharmacol Int J* 6, 449-452.
- Marfia, G., Navone, S., Guarnaccia, L., Campanella, R., Mondoni, M., Locatelli, M., Barassi, A., Fontana, L., Palumbo, F., Garzia, E., 2021. Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO molecular medicine* 13, e13424.
- Motta, C.M., Simoniello, P., Arena, C., Capriello, T., Panzuto, R., Vitale, E., Agnisola, C., Tizzano, M., Avallone, B., Ferrandino, I., 2019. Effects of four food dyes on development of three model species, *Cucumis sativus*, *Artemia salina* and *Danio rerio*: Assessment of potential risk for the environment. *Environmental Pollution* 253, 1126-1135.
- Peksa, V., Jahn, M., Štolcová, L., Schulz, V., Proška, J., Procházka, M., Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J., 2015. Quantitative SERS Analysis of Azorubine (E 122) in Sweet Drinks. *Analytical Chemistry* 87, 2840-2844.
- Platten, M., Nollen, E.A.A., Röhrig, U.F., Fallarino, F., Opitz, C.A., 2019. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* 18, 379-401.

- Punsawad, C., Viriyavejakul, P., 2017. Reduction in serum sphingosine 1-phosphate concentration in malaria. *PLoS One* 12, e0180631.
- Reza, M.S.A., Hasan, M.M., Kamruzzaman, M., Hossain, M.I., Zubair, M.A., Bari, L., Abedin, M.Z., Reza, M.A., Khalid-Bin-Ferdaus, K.M., Haque, K.M.F., Islam, K., Ahmed, M.U., Hossain, M.K., 2019. Study of a common azo food dye in mice model: Toxicity reports and its relation to carcinogenicity. *Food Science & Nutrition* 7, 667-677.
- Ronzio, R.A., Rowe, W.B., Meister, A., 1969. Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* 8, 1066-1075.
- Sant, K.E., Timme-Laragy, A.R., 2018. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Current environmental health reports* 5, 125-133.
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 363-383.
- Solheiro-Villavicencio, H., Rivas-Arancibia, S., 2018. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4⁺ T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 12, 114.
- Soriano, J.J., Mathieu-Denoncourt, J., Norman, G., de Solla, S.R., Langlois, V.S., 2014. Toxicity of the azo dyes Acid Red 97 and Bismarck Brown Y to Western clawed frog (*Silurana tropicalis*). *Environmental science and pollution research* 21, 3582-3591.
- Sökmen, T.Ö., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Baran, A., Özkaraca, M., Ceyhun, S.B., 2020. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *NeuroToxicology* 77, 51-59.
- Sreedevi, B., Suvarchala, G., Philip, G.H., 2014. Morphological and physiological abnormalities during development in zebrafish due to chlorpyrifos. *Indian Journal of Scientific Research* 5, 1-8.
- Stainier, D.Y., 2001. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nature Reviews Genetics* 2, 39-48.
- Sulkan, E., Ghosigharehagaji, A., Baran, A., Yildirim, S., Bolat, İ., Ceyhun, S.B., 2021. A versatile toxicity evaluation of ethyl carbamate (urethane) on zebrafish embryos: Morphological, physiological, histopathological, immunohistochemical, transcriptional and behavioral approaches. *Toxicology letters* 353, 71-78.
- Suvarchala, G., Philip, G.H., 2016. Toxicity of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 15515- 15523.
- Tegelenbosch, R.A.J., Noldus, L.P.J.J., Richardson, M.K., Ahmad, F., 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149, 1241-1281.
- Tingaud-Sequeira, A., Ouadah, N., Babin, P.J., 2011. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of lipid research* 52, 1765-1772.
- To, K.T., St. Mary, L., Wooley, A.H., Wilbanks, M.S., Bednar, A.J., Perkins, E.J., Truong, L., Tanguay, R.L., Garcia-Reyero, N., 2021. Morphological and Behavioral Effects in Zebrafish Embryos after Exposure to Smoke Dyes. *Toxics* 9, 9.
- Türkoğlu, M., Baran, A., Sulukan, E., Ghosigharehagaji, A., Yildirim, S., Ceyhun, H.A., Bolat, İ., Arslan, M., Ceyhun, S.B., 2021. The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet- induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*.

- Zhang, W., Liu, W., Zhang, J., Zhao, H., Zhang, Y., Quan, X., Jin, Y., 2012. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *Journal of environmental sciences* 24, 2019-2027.
- Zhou, Y., Dhaher, R., Parent, M., Hu, Q.-X., Hassel, B., Yee, S.-P., Hyder, F., Gruenbaum, S.E., Eid, T., Danbolt, N.C., 2019. Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochemistry international* 123, 22-33.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Tuba KIZILTAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Anadolu lisesi
Lisans:	Hacettepe Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Fakültesi/Beslenme ve Diyetetik
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü/Nanobilim ve Nanomühendislik
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S., & Ceyhun, S. B. (2022). Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations. Archives of Toxicology, 96(4), 1089-1099.	



Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations

Tuba Kiziltan^{1,2} · Alper Baran³ · Meryem Kankaynar^{1,2} · Onur Şenol⁴ · Ekrem Sulukan^{1,5} · Serkan Yıldırım⁶ · Saltuk Buğrahan Ceyhan^{1,5}

Received: 28 December 2021 / Accepted: 27 January 2022 / Published online: 10 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Since the middle of the twentieth century, the use of dyes has become more common in every food group as well as in the pharmaceutical, textile and cosmetic industries. Azo dyes, including carmoisine, are the most important of the dye classes with the widest color range. In this study, the effects of carmoisine exposure on the embryonic development of zebrafish at a wide dose scale, including recommended and overexposure doses (from 4 to 2000 ppm), were investigated in detail. For this purpose, many morphological and physiological parameters were examined in zebrafish exposed to carmoisine at determined doses for 96 h, and the mechanisms of action of the changes in these parameters were tried to be clarified with the metabolite levels determined. The no observed effect concentration (NOEC) and median lethal concentration (LC₅₀) were recorded at 5 ppm and 1230.53 ppm dose at 96 hpf, respectively. As a result, it was determined that the applied carmoisine caused serious malformations, reduction in height and eye diameter, increase in the number of free oxygen radicals, in apoptotic cells and in lipid accumulation, decrease in locomotor activity depending on the dose and at the highest dose, decrease in blood flow rate. In the metabolome analysis performed to elucidate the metabolism underlying all these changes, 45 annotated metabolites were detected.

Keywords Carmoisine · E122 · Food additive · Metabolome · Dyes

Introduction

Dyes are included in the class of important pollutants due to their main components called chromophores and auxochromes (Micheletti et al. 2020; Sohrabi et al. 2017). Its annual global production is estimated to be around 1 million

tonnes and more than 2,000 structurally different dyes are currently used (Elbanna et al. 2017). Azo dyes containing at least one –N=N– group have a wide range of colors and are the most important synthetic materials of the dye classes (Kiayi et al. 2019). Carmoisine (disodium-4-hydroxy-3-[(4-sulfo-1-naphthalenyl)azo]-1-naphthalenesulfonate) in this group is an anionic food dye with a color scale from red to burgundy (Ai-Mashhedy and Fijer 2016). Carmoisine is also known by different names such as Azorubine, Food Red 3, Azorubin S, Brilliantcarmoisin O, Acid Red 14, and CI 14720. The permits and regulations for its use in food differ from country to country. For example, it is banned in the USA and Japan, it is free to use with ADI (acceptable daily intake) in European Union (Peksa et al. 2015). Highly water-soluble carmoisine is an organic azo dye that is widely used in food products such as jams, marzipan, jellies, yogurts, breadcrumbs, and cheesecake mixes, as well as in the pharmaceutical, textile and cosmetic industries (Amin et al. 2010). Due to this highly water-soluble feature, it does not degrade by exposure to light and oxygen, and as a result, it can be a permanent pollutant, especially in the aquatic

✉ Saltuk Buğrahan Ceyhan
saltuceyhan@hotmail.com

¹ Aquatic Biotechnology Laboratory, Faculty of Fisheries, Atatürk University, Erzurum, Turkey

² Department of Nanoscience, Graduate School of Natural and Applied Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey

³ Department of Food Quality Control and Analysis, Technical Vocational School, Atatürk University, Erzurum, Turkey

⁴ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Atatürk University, Erzurum, Turkey

⁵ Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Atatürk University, 25240 Erzurum, Turkey

⁶ Pathology, Faculty of Veterinary, Atatürk University, Erzurum, Turkey

environment (Micheletti et al. 2020). Due to this potential pollutant feature, many studies have been reported in which various methods have been tried to remove carmoisine from aquatic environments (Kiayi et al. 2019).

The azo dye carmoisine can be reduced to aromatic amines via the intestine by the microbiota and azoreductase in the liver or intestinal wall. Sulfanilic acid is the main metabolite formed as a result of these reactions (Chung et al. 1992). Nitrite compounds, which can be found in foods, combine with certain amino acids and then turn into carcinogenic N-nitroso compounds or nitrosamines. In this respect, International Agency for Research on Cancer has classified azo dyes such as carmoisine as category 3 carcinogens (Reza et al. 2019). In addition, EFSA and finally FDA shared their concerns about the use of food dyes, especially for children, who are common consumer groups. In addition, it has been reported that carmoisine cause liver damage and reduced some metabolic enzymes in rats (Amin et al. 2010), genotoxicity by causing chromosomal aberrations and decreased mitotic index in *Allium cepa* (Khan et al. 2020), carcinogenicity and biochemical toxicity by reducing the expression of some important defense genes in mice (Reza et al. 2019). On the other hand, according to the best knowledge we have, the effects of carmoisine on metabolism have not been investigated in a metabolomics perspective, which is one of the most modern approaches to observe important changes that may be caused by endogenous metabolites. Therefore, in this study, the toxic effects of carmoisine on a wide dose scale were investigated by metabolic methods on a modern model organism, zebrafish. Zebrafish is a unique model organism with its rapid developmental stages, which are widely used in both adult and embryo stages in toxicological studies, allowing easy monitoring of embryogenesis and evaluation of any developmental defects due to the transparency of the egg and embryo, and its 70% similarity to the human genome (Baran et al. 2018; Capriello et al. 2021; Sökmen et al. 2020). Thus, in our current study, the effects of carmoisine on zebrafish embryos were evaluated in terms of morphological, molecular, behavioral, circulatory system, and metabolomics.

Materials and methods

Embryo treatment and morphologic and physiologic measurements

The ancestors of AB strain zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to carmoisine in the study were obtained from Oregon State University. Embryos from rootstocks that had developed normally and reached the blastula stage were exposed graded concentrations of carmoisine (4, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, and 2000 ppm) which was

prepared in E3 embryo medium. The control group was kept in E3 medium alone. All mediums were renewed every 24 h. The experiment for each analysis was conducted with three independent experiments ($n=3$) and each compound-treated group contained minimum 40 embryos. During the 96-h exposure, the fish were examined under the microscope, and dead fish and hatching rates were recorded every 24 h. In addition, morphological abnormalities (included pericardial edema, yolk sac edema, curved body axis, and head malformations) observed every 24 h during the exposure period were recorded. Morphological observation, survival and hatching rates were determined as a result of examining at least 200 embryos larvae (with 3 biological replicates, 600 fish in total) from each group. The median lethal concentration (LC_{50}) and no observed effect concentration (NOEC) were calculated according to Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline for testing chemical toxicity (OECD 2013). For eye size and body length measurements, 20 larvae (with 3 biological replicates, 60 larvae in total) were randomly selected from each group pool. For heart rate and blood flow, 10 larvae (with 3 biological replicates, 30 fish in total) randomly selected from each group pool were anaesthetized with tricaine. Videos of 3 min were recorded in a suitable format for software from the pericardiac and blood vessel regions of anesthetized larvae under the stereomicroscope. Video records were transferred to DanioScope and the software automatically calculated the number of beats per second/min (BPS/BPM) in the heart and measured the flow activity in blood vessels determined.

Whole mouth larval staining

Detection of apoptotic cells was performed using **acridine orange**, a nucleic acid selective metachromatic dye that interacts with DNA and RNA from 5 randomly selected 96 hpf (hours post-fertilization) larvae (3 replicates, in total 15 larvae) from each group from larvae exposed to carmoisine. Analysis was performed according to the standard protocol; in brief, the 96 hpf larvae were first washed three times with PBS, then incubated with acridine orange at a concentration of 5 mg/mL at 28.5 °C for 30 min. in the dark. After incubation, they were washed three times with PBS and examined under fluorescence microscopy (Zeiss, Discovery V12, Germany). Detection of reactive oxygen species (ROS) was performed using **CM-H₂DCFDA**, a molecule that reacts with many different ROS and it is a general indicator of oxidative stress, from 5 randomly selected 96 hpf larvae (3 replicates, in total 15 larvae) from each group from larvae exposed to carmoisine. Analysis was performed according to the standard protocol; in brief, the larvae were first washed three times with ultra-pure H₂O, then incubated with CM-H₂DCFDA at a concentration of 1 µg/mL at 28.5 °C for 2 h in the dark. After incubation, they were washed

three times with ultra-pure H₂O and examined under fluorescence microscopy (Zeiss, Discovery V12, Germany). Finally, detection of lipid droplets in larvae body was performed using **Nile Red**, a compound that can interact with intracellular lipid droplets, from 5 randomly selected 96 hpf larvae (3 replicates, in total 15 larvae) from each group from larvae exposed to carmoisine. Analysis was performed according to the standard protocol; in brief, the larvae were first washed three times with ultra-pure H₂O, then incubated overnight with Nile Red at a concentration of 10 ng/mL at 28.5 °C in the dark. After incubation, they were washed three times with ultra-pure H₂O and examined under fluorescence microscopy (Zeiss, Discovery V12, Germany). Fluorescence intensity analysis of the obtained images was done with the ImageJ software (Baran et al. 2020; Türkoğlu et al. 2021).

Larvae locomotor activity analysis

The locomotor activity of zebrafish larvae exposed to carmoisine was evaluated by standard protocol. For this purpose, to monitor the activities of 24 zebrafish larvae (with 3 biological 72 larvae in total) randomly selected from each group pool with an infrared analog camera (25 frames per second), the 24-well plate containing one larva (6 dpf) in each well was placed in the DanioVision Observation Chamber (Noldus Co.). The temperature condition of observation chamber was carried out at 28 °C using a heating/cooling system (Noldus Co.). Dark/light periods were applied to create locomotor activity in response to changing dark and light conditions. Following 10-min habitation in dark, 10-min light and 10-min dark conditions were applied for images to be recorded for a total of 50 min (Sulukan et al. 2021). Monitoring and evaluation of the behavior of zebrafish larvae was carried out using the EthoVision software (Noldus Co.). The analyses were repeated by three independent replications.

Metabolomic analysis

To evaluate the effects of Carmoisine on the embryonic development period of zebrafish at the metabolite level, metabolite levels were determined from 25 larval pools from each group of zebrafish exposed to 50 ppm and 2000 ppm concentrations. Six pools were created for each concentration and the larvae were homogenized in 1 mL of methanol with the aid of TissueLyser (Qiagen). After that, homogenized samples were exposed to ultrasonic wave for 10 min and then incubated at – 20 °C for 15 min to initiate cell lysis and elevate the extraction efficacy. The mixtures have centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatants were picked up and then evaporated under the vacuum (Eppendorf Concentrator+). The residues were reconstituted by 80 µL of mobile phase mixture (0.1% formic acid–water, 50:50, v/v). Quality control samples (QCs) were pooled by collecting

5 µL of aliquots from each sample. QCs were applied after every five consecutive sets to normalize batch drift and remove false peaks.

The total run time for Q-TOF MS/MS analysis was about 15 min for each sample and QC. Linear gradient elution was carried out in which the flow rate is 400 µL/min. Conditions summarized as follows: 95% of mobile phase A (H₂O (0.1% v/v Formic acid)) were arranged to be 0.5 min, followed by an elevation from 2 to 20% for mobile phase B (CH₃CN (0.1% v/v Formic acid)) in 3.5 min and then 20% to 95% B in 4 min. Conditions of 95% solvent B were held for 1 min and a 0.25 min gradient was used to return to the initial conditions, which were held for 2.75 min. The total run time was about 15 min for each run.

Histopathological analysis

The zebrafish larvae exposure to carmoisine were detected in 4% paraformaldehyde solution for 48 h. Five larvae from each group (15 larvae in 3 replications in total) were used. The samples were embedded in paraffin blocks after routine tissue tracking. 4 µm thickness sections were taken from each block. Preparations prepared for histopathological examination were stained with hematoxylin–eosin (HE) and examined with a light microscope (Olympus BX 51, Japan). Sections were evaluated according to their histopathological features as none, very mild, mild, moderate, severe, and very severe.

Results and discussion

To assess the developmental toxicity effects of carmoisine on zebrafish embryo/larvae, survival and hatching rates were determined. The NOEC was calculated at 5 ppm on the carmoisine-induced mortality curve of zebrafish embryos (Fig. 1B). The LC₅₀ estimated at 96 hpf was 1230.53 ppm (Supplementary file). As shown in Fig. 1, high concentration exposure of carmoisine significantly increased the mortality ($p < 0.05$) (Fig. 1B). Similarly, it was observed that exposure to carmoisine caused a decrease in early hatching rates dose-dependent manner (Fig. 1C). A possible explanation for the delayed hatching in our experiment may be that the embryos observed in some eggs could not break out the chorion. Another reason may be the inhibition of enzymes involved in hatching triggered by the dye (Baran et al. 2018). Another explanation for difficulty hatching is neuromuscular deficiencies that cause weakening of spontaneous muscle movements (De la Paz et al. 2017). As a matter of fact, a decrease in hatching rate was observed in zebrafish embryos exposed to different toxicants including azo dyes (Gupta et al. 2019; Joshi and Katti 2018; Li et al. 2017; Suvarchala and Philip 2016).

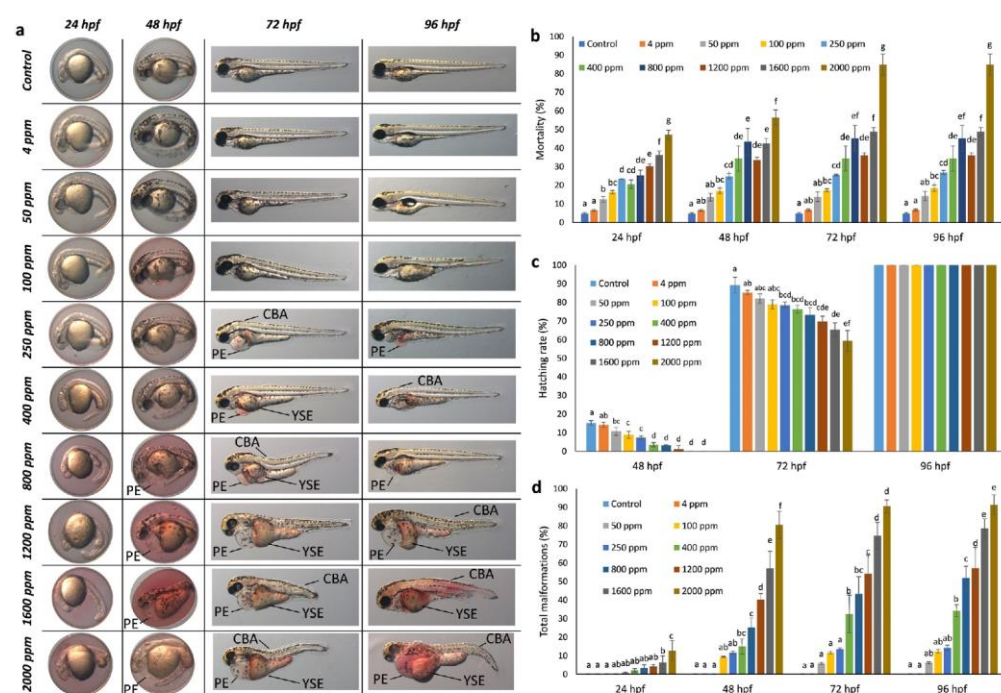


Fig. 1 Microscopic images of embryos exposed to carmoisine and control groups (a). The survival rate (b) and hatching rate (c) of zebrafish embryos during the exposure time of 96 h. Distribution of observed body malformations (d). Data are expressed as

means $\pm$ S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$; ANOVA, Tukey's test) (PE pericardial edema, YSE yolk sac edema, CBA curved body axis)

In this study, typical malformations including pericardial edema (PE), yolk sac edema (YSE), body malformations (BM) (including tail malformation, short tail and head malformation), and curved body axis (CBA) were examined as morphological endpoints. An increase in total malformation was observed in a dose-dependent manner (Fig. 1A, D). Mainly pericardial edema, yolk sac edema, tail anomaly and spinal curvature were observed. However, head malformation was not observed in larvae exposed to carmoisine. It has been reported that deformities or formation of large yolk sacs in zebrafish embryos may be related to delayed nutrient sac (yolk) resorption (Zoupa and Machera 2017). In addition, yolk sac edema is a common pathology observed in zebrafish developmental toxicity screenings. It is known that yolk is highly lipophilic and has low water content. The embryo maintains the osmotic balance in the water environment it is in, thanks to a water barrier in the yolk sac (Sant and Timme-Laragy 2018). It has been reported that azo dyes, due to their high water solubility properties, may disrupt this osmotic balance and cause excessive water intake into

the embryo and, as a result, edema formation (Jiang et al. 2020). Indeed, a study (Gupta et al. 2019) reported that a large yolk sac was observed in zebrafish embryos exposed to erythrosine which is another azo dye due to deformities or delayed bone development. The abnormality, spinal curvature and scoliosis observed in the larvae of the embryos exposed to carmoisine can be explained on the basis that this additive may have affected acetylcholine, acetylcholinesterase and receptor systems, thus neuronal and muscle development in zebrafish larvae (Behra et al. 2002). Spinal curvature and notochord bending have been reported in zebrafish larvae exposed to organophosphate chlorpyrifos, an acetylcholinesterase inhibitor (Sreedevi et al. 2014). Joshi and Katti (2018) observed tail distortion, yolk sac edema, and cardiac edema in zebrafish larvae exposed to another azo dye, tartrazine.

When evaluated in terms of apoptosis, it was found that the fluorescence intensity increased significantly in a dose-dependent manner, especially in larvae exposed to over 400 ppm of carmoisine (Fig. 2). Similar to our results,

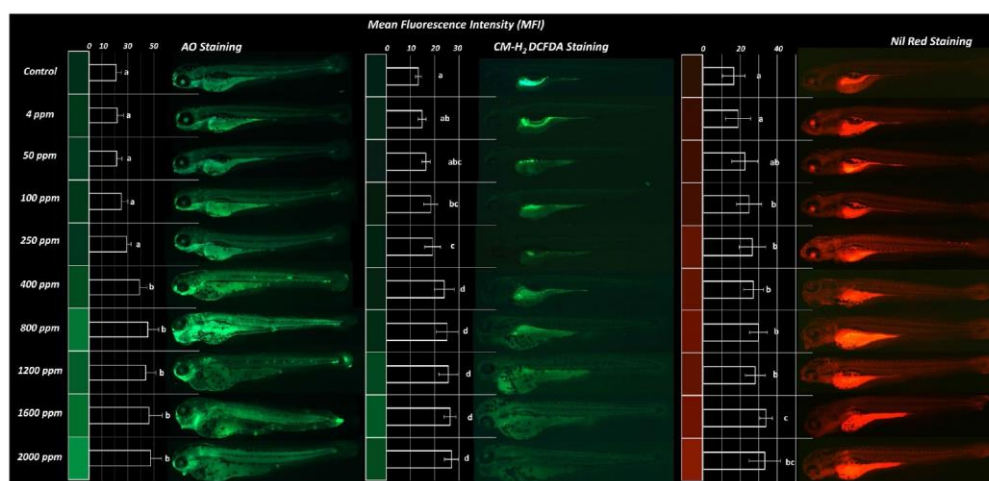


Fig. 2 Apoptotic cells were determined using acridine orange (AO) staining in 96 hpf larvae and mean fluorescence intensity of the signals (Left). In vivo CM-H₂DCFDA staining of produced ROS in 96 hpf larvae and mean fluorescence intensity of the signals (Middle). Nile Red staining of adipocyte lipid droplets and mean fluorescence intensity of the signals (Right). To obtain more accurate results in

fluorescence intensity analyses, larvae belonging to different groups were tried to be imaged in the same picture when imaging. Data are expressed as means $\pm$ S.D. from three independent experiments (each replicate includes 5 larvae, ANOVA, $p < 0.05$, Tukey's test) (color figure online)

reactive black 5 azo dye has been reported to induce developmental defects in zebrafish embryos by enhancing apoptotic cell death (Manimaran et al. 2018). Moreover, different studies have suggested that exposure to synthetic textile dyes potentiates DNA damage and inhibits DNA repair through reactive oxygen species (ROS) generation and inhibition of DNA ligase (Liu et al. 2008). ROS is a term for a series of molecular oxygen derivatives that occur as a normal feature of aerobic life. ROS, which are kept in balance by different antioxidant defence systems in metabolism, cause molecular damage, referred to as 'oxidative stress', with high exposure to different triggering agents (Sies and Jones 2020). In this study, the level of ROS in live larvae exposed to carmoisine was evaluated by measuring mean fluorescence. The results revealed that the level of fluorescence intensity increased in a dose-dependent manner ($p < 0.05$) significantly in larvae exposed to carmoisine (Fig. 2). Indeed, it has been demonstrated that Acid Black, an azo dye, induced oxidative stress in freshwater *Labeo rohita* by Kaur and Kaur (Kaur and Kaur 2015).

Similarly, another azo dye, Disperse Red 1, activates antioxidant defenses to prevent LPO in freshwater *Hydra attenuate* (de Jong et al. 2016). In addition, it was determined that ROS overproduction and GST and superoxide dismutase activities were decreased in adult zebrafish exposed to textile industrial wastes (Zhang et al. 2012).

Oxidative stress induced by azo dyes has also been noted to modulate genomic events, including oxidative stress gene-related transcriptional regulation, at early stages in the western frog (*Silurana tropicalis*) (Soriano et al. 2014).

It has been reported that xenobiotic compounds like food dyes taken with diets can induce obesity by altering endocrine signals and lipid hemostasis (Tingaud-Sequeira et al. 2011). Lipid metabolism can be altered in response to various factors inducing lipid accumulation, as a strategy to enable their growth and reproduction through cell division (D'Alessandro and Antoniosi Filho 2016). Nile Red is often preferred as a fluorescent probe to detect adipocyte lipid droplets in pharmaceutical or toxicological studies. In this study, zebrafish larvae exposed to carmoisine showed a dose-dependent increase in relative fluorescence intensity of Nile Red (Fig. 2). It is known that organisms exposed to most environmental stresses, including xenobiotic exposure, initiate regulatory processes through energy metabolism to maintain physiological homeostasis. It has been reported that serum total lipids, cholesterol, and triglycerides levels increased significantly in rats exposed to different doses of carmoisine orally (Aboel-Zahab et al. 1997). Elekima (2016) reported that total cholesterol, triglyceride, and LDL-Cas levels increased in rats exposed orally to carmoisine. The authors claimed that these increases may be due to the

inability to produce enzymes such as lecithin cholesterol transferases and hepatic lipase, which are required for the degradation of cholesterol and triglycerides, respectively, due to hepatocyte damage caused by azo dyes.

In zebrafish, the heart is one of the first organs observed during the development stage. As indicators of heart function and physiological hemostasis, heart rate and blood flow rate are valuable parameters used to determine developmental toxicity in zebrafish. Results from this study revealed that exposure to carmoisine did not significantly affect heart rate during embryonic development of zebrafish, but caused a significant reduction in blood flow rate at the highest dose (Fig. 3). It has been reported that zebrafish can actively

regulate heart rate in response to changes in the environment through branches of both the sympathetic and parasympathetic autonomic nervous systems (Li et al. 2017). In this regard, sustained exposure to azo dyes up to 120 hpf has been reported to result in decreased embryonic heart rate (Stainier 2001). On the other hand, the significant reduction in blood flow rate observed at the highest dose may be associated with lower blood oxygen levels, indicative of increased hypoxanthine levels (Fig. 4). This molecule is mostly related to hypoxia (Lee et al. 2018).

According to the results, exposure to carmoisine caused a dose-dependent decrease in body length and eye size in zebrafish larvae (Fig. 3). It has been suggested in some

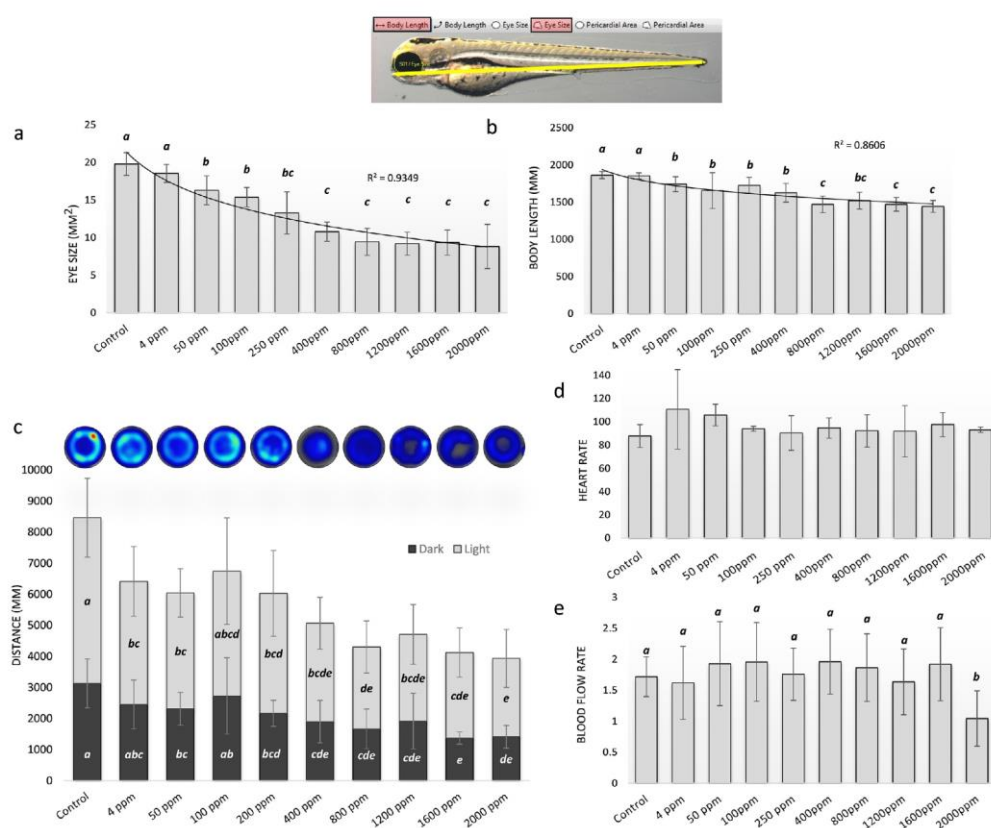


Fig. 3 Eye size (a) and body length (b) of carmoisine exposed and control zebrafish larvae at 5 dpf. Data are expressed as means $\pm$ S.D. from three independent experiments (each replicate includes 20 larvae; $*p < 0.05$; ANOVA, Tukey's test). Locomotor activity (total distance) (c) of carmoisine exposed and control zebrafish larvae at 6 dpf. Data are expressed as means $\pm$ S.D. from three independent experi-

ments (each replicate includes 24 larvae; $*p < .05$; ANOVA, Tukey's test). Heart rate (d) and blood flow (e) of carmoisine exposed and control zebrafish larvae at 5 dpf. Data are expressed as means $\pm$ S.D. from three independent experiments (each replicate includes 10 larvae; $*p < 0.05$; ANOVA, Tukey's test)

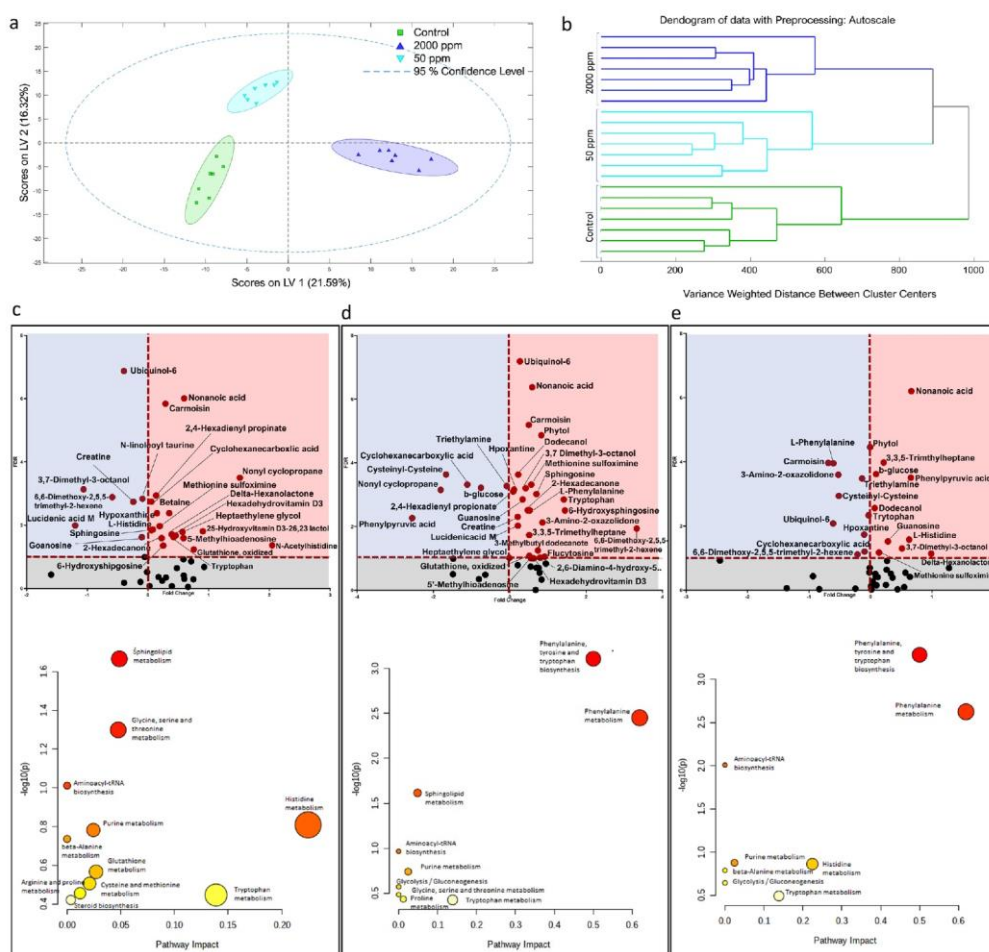


Fig. 4 The OPLS-DA scores plot for features (detected by TOF MS results) of control, 50 ppm and 2000 ppm exposure groups (a). Dendrogram of variance weighed distance between analyzed groups (b). Volcano graphs and pathway analysis plots of control vs 50 ppm (c), control vs 2000 ppm (d) and 50 ppm vs 2000 ppm (e) carmoisine exposure including log₂ (fold change) of the peak area of annotated metabolites and their log₁₀ (*p* value). Upregulated (red) and down-

regulated (blue) metabolites were monitored regarding to the carmoisine exposure in the volcano graph. The pathway analysis plots were created by Metaboanalyst 5.0. The results of pathway topological analysis were represented in x-axis as 'pathway impact' and logarithm of the *p* value for pathway enrichment analysis were expressed in y-axis in accordance with annotated metabolites (color figure online)

studies that it causes a decrease in the number of retinal cells with increased apoptosis, which causes the small eye phenotype. Consistent with our study, microphthalmia (reduction in eye diameter) was reported to be detected in zebrafish larvae exposed to Sunset Yellow (Joshi and Pancharatna 2019). It should not be overlooked that another reason for the decrease in body length may be increased

malformations depending on the dose. Another significant impairment caused by carmoisine treatment was observed in locomotor activity (Fig. 3). Locomotor activity controlled at different levels of the nervous system is susceptible to many different endogenous/exogenous disturbances. Moreover, changes in locomotor activity can be regarded as indicative of changes in the neuromuscular junction, different central

pattern makers, or more rostral levels (Dutra Costa et al. 2020). In this context, zebrafish larvae are recognized as an important model organism that can be used to evaluate different neurobehavioral domains in early life stages with ecologically relevant endpoints (Tegelenbosch et al. 2012). In current study, the behavioral effects of carmoisine were evaluated using zebrafish larvae. When Fig. 3C is examined, it has been seen that the control group larvae are clearly mobile both in total and in the night/day phases ($p < 0.05$). It can be said that this decrease in locomotor activity is in a trend dependent on carmoisine dose increase. No significant behavioral differences were detected in the larvae, including the control group, between the night and day phases. While this difference was more evident in the daytime phase, relatively similar findings were observed in the night phase.

The decreased locomotor activity observed in zebrafish larvae especially in high doses (between 800 and 2000 ppm) can be explained by two phenomena; first is dose-dependent increased malformations and second is the nervous system metabolome profile. It was stated above that an increasing malformation was observed depending on the dose of carmoisine exposure. In fact, studies have revealed that the malformations observed due to developmental toxicity in zebrafish larvae exposed to xenobiotics affect locomotor activity (Abe et al. 2017a, 2017b; Sulukan et al. 2021; To et al. 2021). The important thing at this point is to clarify the mechanism of action of the problems observed depending on the dose exposure. In this context, the current study has been investigated the metabolome profiles of zebrafish larvae exposed to high (2000 ppm) and low (50 ppm) doses of carmoisine. According to the metabolome results, remarkable alterations were detected in both low (50 ppm) concentration and high (2000 ppm) concentration of carmoisine exposure (Fig. 4). The analysis revealed 45 annotated metabolites and, as expected, the change in these metabolite levels was more dramatic at the higher concentration.

Guanosine is one of the annotated metabolites that found significantly high regulated in exposure groups. According to results, dose-dependent elevation has been observed in semi-quantitative intensity of Guanosine and approximately fivefold increase for 50 ppm exposure group were measured against control group. This fold elevation reached about 10 in 2000 mg exposure group. Guanosine is a purine nucleoside in cell metabolism and play an important role in neural degenerative injuries (Lanznaster et al. 2016). Due to its feature, dye exposure may induce its concentration to protect organism against the carmoisine toxicity. Second important metabolites are methionine sulfoximine (MeS) which is known as the irreversible inhibitor of glutamine synthetase (Ronzio et al. 1969). Deficiency of glutamine synthetase may initiate pathological disorders as glial dysfunction, loss of neurons and

abnormal movement in the living organisms (Zhou et al. 2019). It has been also reported that a high level of MeS may cause a low level of glutamine which is really important in brain function, especially in the neurotransmission of neuron cells (Albrecht et al. 2010). According to the results obtained from the histopathology analyzes, the degeneration and necrosis of the neurons, which increased in a dose-dependent manner, overlap with these findings (Fig. 5). Hypoxanthine which is mostly related to hypoxia is another annotated metabolite that was found significantly high in the carmoisine exposure groups with respect to control. Increasing amount of hypoxanthine indicate low level of oxygen in blood (Lee et al. 2018). This may change the cognitive behavior of any living organism. This increase can be explained as a result of oxygen deficiency due to the decrease in blood flow rate observed especially at the highest dose. Tryptophan is another molecule associated with hypoxia and neurodegenerative disorders. An increasing level of tryptophan may be an important sign for the neurodegenerative case (Platten et al. 2019). Phenylalanine and phenylpyruvic acid accumulation in the living organisms also cause neurological disorders (Asare et al. 2021). Therefore, the increase in the levels of these metabolites as a result of exposure to carmoisine may be a precursor to the differences in their behavior. N-Acetyl-histidine and oxidized glutathione levels was also a sign of oxidative stress (Dwivedi et al. 2020; Holeček 2020) that may bring about neurodegenerative consequences on living organisms (Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia 2018). In addition to this, N-acetyl-histidine, especially in fish, has a role in regulating the osmotic pressure of the eye as a water pump. This metabolic change may be the mechanism underlying the reduction in eye size observed as a result of exposure to carmoisine. According to this result, the dose-dependent reduction in eye size can be considered as a result of dehydration. On the other hand, sphingosine and 6-hydroxy sphingosine levels were found to be lower in carmoisine exposure groups. This situation was found in low-oxygen cases very similar with COVID-19 and malaria (Marfia et al. 2021; Punsawad and Viriyavejakul 2017). These findings were compatible with the elevated levels of hypoxanthine and tryptophane.

In conclusion, high-dose exposure of carmoisine may cause low-oxygen levels, increasing oxidative stress and elevated level of some metabolites that cause neurodegenerative effects and behavioral alteration. Organism responds to this situation by increasing the concentration of antioxidant molecules as glutathione, N-acetyl-histidine and neuroprotective agents like guanosine. It should also be taken into account that exposure to high doses of carmoisine may cause serious problems, and therefore, chronic exposures may cause the situation to be more dramatic.

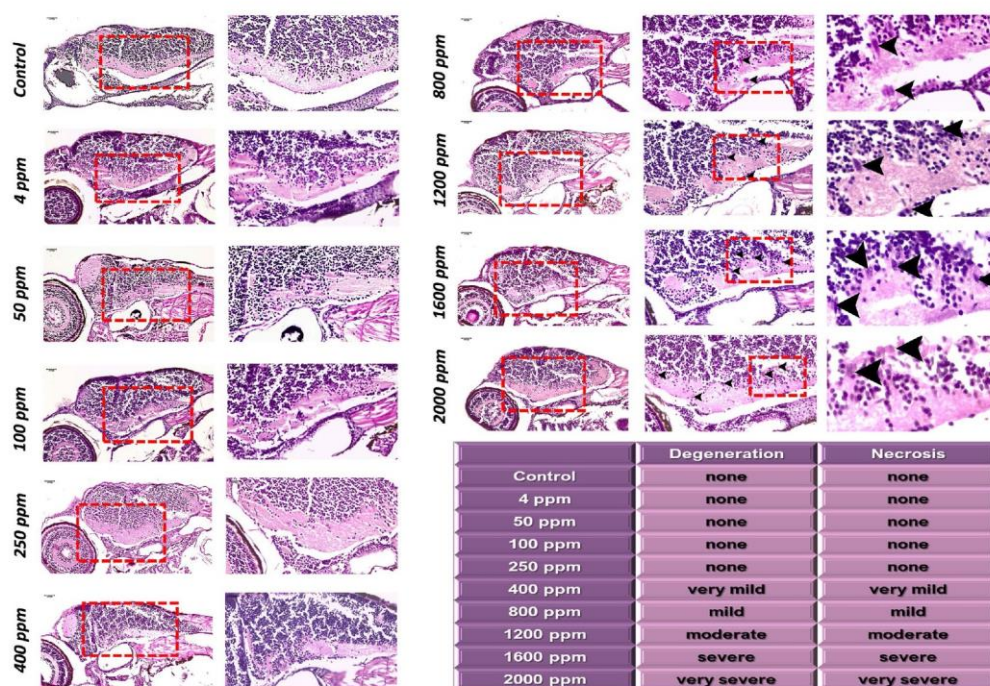


Fig. 5 Microscopic image of hematoxylin and eosin staining (H and E) of zebrafish larvae exposed to carmoisine. Arrowhead indicates necrosis

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03240-2>.

Acknowledgements We would like to thank YÖK (Council of Higher Education, Turkey) for the scholarship support given to Ekrem SULUKAN within the scope of the 100/2000 PhD program. We also would like to thank DAYTAM (Eastern Anatolian High Technology Application Center) for instrument (Q-TOF MS/MS) support.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abe FR, Mendonça JN, Moraes LA et al (2017a) Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere* 178:282–290
- Aboel-Zahab H, El-Khyat Z, Sidhom G, Awadallah R, Abdel-al W, Mahdy K (1997) Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll Chim Farm* 136(10):615–627
- Ai-Mashhedy LA, Fijer AN (2016) Acute toxicity of food additives tartrazine and carmoisine on white male mice. *Int J PharmTech Res* 9(4):364–367
- Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M (2010) Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol* 6(4):263–276. <https://doi.org/10.1017/S1740925X11000093>
- Amin K, Hameid HA, Abdelsttar A (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 Chem Toxicol* 48(10):2994–2999
- Asare KK, Afrifa J, Opoku YK (2021) Mechanisms underlying induced pseudo-scleroderma among patients with phenylketonuria metabolic disorder. *Global J Dermatol Vencrol* 9:1–8
- Baran A, Köktürk M, Atamanalp M, Ceyhan SB (2018) Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (acceptable daily intake). *Regul Toxicol Pharmacol* 94:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.027>
- Baran A, Yildirim S, Ghosigharehaghaji A, Bolat İ, Sulukan E, Ceyhan S (2020) An approach to evaluating the potential teratogenic and neurotoxic mechanism of BHA based on apoptosis induced by oxidative stress in zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Hum Exp Toxicol*. <https://doi.org/10.1177/0960327120952140>
- Behra M, Cousin X, Bertrand C et al (2002) Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci* 5(2):111–118

- Capriello T, Visone IM, Motta CM, Ferrandino I (2021) Adverse effects of E150d on zebrafish development. *Food Chem Toxicol* 147:111877. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111877>
- Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CE (1992) The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18(3):175–190. <https://doi.org/10.3109/10408419209114557>
- D'Alessandro EB, Antoniosi Filho NR (2016) Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 58:832–841
- de Jong L, Pech N, de Aragão UG, Moreau X (2016) Multi-scale biomarker evaluation of the toxicity of a commercial azo dye (disperse red 1) in an animal model, the freshwater cnidarian *Hydra attenuata*. *Water Res* 96:62–73
- De la Paz JF, Beiza N, Paredes-Zúñiga S, Hoare MS, Allende ML (2017) Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *Int J Mol Sci* 18(4):710
- Dutra Costa BP, Aquino Moura L, Gomes Pinto SA, Lima-Maximino M, Maximino C (2020) Zebrafish models in neural and behavioral toxicology across the life stages. *Fishes*. <https://doi.org/10.3390/fishes5030023>
- Dwivedi D, Megha K, Mishra R, Mandal PK (2020) Glutathione in brain: overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation and potential therapeutic role in brain disorders. *Neurochem Res* 45(7):1461–1480
- Elbanna K, Sarhan OM, Khider M, Elmoghy M, Abulreesh HH, Shaaban MR (2017) Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *J Food Drug Anal* 25(3):667–680. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.01.005>
- Elekima I (2016) Effect of carmoisine orally administered on lipid parameters of albino rats. *Int J Sci Res* 5(9):861–864
- Gupta R, Ranjan S, Yadav A, Verma B, Malhotra K (2019) Toxic effects of food colorants erythrosine and tartrazine on zebrafish embryo development. *Curr Res Nutr Food Sci J* 7(3):876–885
- Holeček M (2020) Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients* 12(3):848
- Jiang L-L, Li K, Yan D-L, Yang M-F, Ma L, Xie L-Z (2020) Toxicity assessment of 4 azo dyes in zebrafish embryos. *Int J Toxicol* 39(2):115–123
- Joshi V, Katti P (2018) Developmental toxicity assay for food additive tartrazine using zebrafish (*Danio rerio*) embryo cultures. *Int J Toxicol* 37(1):38–44
- Joshi V, Pancharatna K (2019) Food colorant sunset yellow (E110) intervenes developmental profile of zebrafish (*Danio rerio*). *J Appl Toxicol* 39(4):571–581
- Kaur S, Kaur A (2015) Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). *Comp Biochem Physiol c: Toxicol Pharmacol* 167:108–116
- Khan IS, Ali MN, Hamid R, Ganie SA (2020) Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. *Toxicol Rep* 7:370–375. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.009>
- Kiayi Z, Lotfabad TB, Heidarinasab A, Shahcheraghi F (2019) Microbial degradation of azo dye carmoisine in aqueous medium using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *J Hazard Mater* 373:608–619. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.111>
- Lanznaster D, Dal-Cim T, Piermartiri TCB, Tasca CI (2016) Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. *Aging Dis* 7(5):657–679. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0208>
- Lee JS, Wang RX, Alexeev EE et al (2018) Hypoxanthine is a checkpoint stress metabolite in colonic epithelial energy modulation and barrier function. *J Biol Chem* 293(16):6039–6051
- Li K, Wu J-Q, Jiang L-L et al (2017) Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere* 171:40–48
- Liu F, Gentles A, Theodorakis CW (2008) Arsenate and perchlorate toxicity, growth effects, and thyroid histopathology in hypothyroid zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* 71(7):1369–1376
- Manimaran D, Sulthana A, Elangovan N (2018) Reactive black 5 induced developmental defects via potentiating apoptotic cell death in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Pharm Pharmacol Int J* 6(6):449–452
- Marfia G, Navone S, Guarnaccia L et al (2021) Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO Mol Med* 13(1):e13424
- Micheletti L, Coldibeli B, Salamanca-Neto CAR, Almeida LC, Sartori ER (2020) Assessment of the use of boron-doped diamond electrode for highly sensitive voltammetric determination of the azo-dye carmoisine E-122 in food and environmental matrices. *Talanta* 220:121417. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121417>
- OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Peksa V, Jahn M, Štolcová L et al (2015) Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks. *Anal Chem* 87(5):2840–2844. <https://doi.org/10.1021/ac504254k>
- Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA (2019) Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18(5):379–401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>
- Punsawad C, Viriyavejakul P (2017) Reduction in serum sphingosine 1-phosphate concentration in malaria. *PLoS ONE* 12(6):e0180631
- Reza MSA, Hasan MM, Kamruzzaman M et al (2019) Study of a common azo food dye in mice model: toxicity reports and its relation to carcinogenicity. *Food Sci Nutr* 7(2):667–677. <https://doi.org/10.1002/fsn3.906>
- Ronzio RA, Rowe WB, Meister A (1969) Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* 8(3):1066–1075
- Sant KE, Timme-Laragy AR (2018) Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Curr Environ Health Rep* 5(1):125–133
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(7):363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sohrabi MR, Khavaran A, Shariati S, Shariati S (2017) Removal of Carmoisine edible dye by Fenton and photo Fenton processes using Taguchi orthogonal array design. *Arab J Chem* 10:S3523–S3531. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.02.019>
- Sökmen TÖ, Sulukan E, Türkoğlu M, Baran A, Özkaraca M, Ceyhan SB (2020) Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 77:51–59
- Solheiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S (2018) Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+ T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 12:114
- Soriano JJ, Mathieu-Denoncourt J, Norman G, de Solla SR, Langlois VS (2014) Toxicity of the azo dyes acid red 97 and Bismarck brown Y to western clawed frog (*Silurana tropicalis*). *Environ Sci Pollut Res* 21(5):3582–3591
- Sreedevi B, Suvarchala G, Philip GH (2014) Morphological and physiological abnormalities during development in zebrafish due to chlorpyrifos. *Indian J Sci Res* 5(2):1–8
- Stainier DY (2001) Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet* 2(1):39–48
- Sulukan E, Ghosigharchagaji A, Baran A, Yildirim S, Bolat İ, Ceyhan SB (2021) A versatile toxicity evaluation of ethyl carbamate (urethane) on zebrafish embryos: morphological, physiological, histopathological, immunohistochemical, transcriptional and

- behavioral approaches. *Toxicol Lett* 353:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.09.012>
- Suvarchala G, Philip GH (2016) Toxicity of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environ Sci Pollut Res* 23(15):15515–15523
- Tegelenbosch RAJ, Noldus LPJJ, Richardson MK, Ahmad F (2012) Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149(10–12):1241–1281. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003020>
- Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ (2011) Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J Lipid Res* 52(9):1765–1772
- ToSt. MaryWooley KTLAH et al (2021) Morphological and behavioral effects in zebrafish embryos after exposure to smoke dyes. *Toxics* 9(1):9
- Türkoğlu M, Baran A, Sulukan E et al (2021) The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. *Eat Weight Disord-Stud Anorex, Bulim Obes*. <https://doi.org/10.1007/s40519-021-01140-5>
- Zhang W, Liu W, Zhang J et al (2012) Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *J Environ Sci* 24(11):2019–2027
- Zhou Y, Dhafer R, Parent M et al (2019) Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem Int* 123:22–33
- Zoupa M, Machera K (2017) Zebrafish as an alternative vertebrate model for investigating developmental toxicity—the triadimefon example. *Int J Mol Sci* 18(4):817

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.