

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MONOSODYUM GLUTAMAT (MSG) KAYNAKLI  
OKSİDATİF STRESDE ERİTROSİT ASETİLKOLİN  
ESTERAZ VE NİTRİK OKSİT DEĞİŞİKLİKLERİNİN  
ÖNEMİ; MELATONİNİN ROLÜ**

**Hazırlayan  
Muhammed AKTOPRAK**

**Danışman  
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kasım 2015  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MONOSODYUM GLUTAMAT (MSG) KAYNAKLI  
OKSİDATİF STRESDE ERİTROSİT ASETİLKOLİN  
ESTERAZ VE NİTRİK OKSİT DEĞİŞİKLİKLERİNİN  
ÖNEMİ; MELATONİNİN ROLÜ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan  
Muhammed AKTOPRAK**

**Danışman  
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından TYL-2013-4825 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2015  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Muhammed AKTOPRAK**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**"Monosodyum Glutamat (MSG) Kaynaklı Oksidatif Stresde Eritrosit Asetilkolin Esteraz ve Nitrik Oksit Değişikliklerinin Önemi; Melatoninin Rolü"** adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Muhammed AKTOPRAK

Danışmanlar

Prof. Dr. Sami AYDOĞAN

AnabilimDalı Başkanı

Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ

**Prof. Dr. Sami AYDOĞAN** danışmanlığında **Muhammed AKTOPRAK** tarafından hazırlanan "**Monosodyum Glutamat (MSG) Kaynaklı Oksidatif Stresde Eritrosit Asetilkolin Esteraz ve Nitrik Oksit Değişikliklerinin Önemi; Melatoninin Rolü**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../2015

## JÜRİ

## İmza

Danışman : Prof. Dr. Sami AYDOĞAN .....  
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fak. Fizyoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Eser KILIÇ .....  
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Faruk Metin ÇOMU .....  
(Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fak. Fizyoloji ABD)

## ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....  
**Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında bana sabırla yol gösteren, azimli olmamı sağlayan, bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve destekleyen tez yöneticim kıymetli hocam Prof. Dr. Sami AYDOĞAN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bana aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Cem SÜER, Prof. Dr. Meral ASÇIOĞLU, Prof. Dr. Nurcan DURSUN, Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ, Prof. Dr. Bekir ÇOKSEVİM ve Prof. Dr. Nazan DOLU'ya,

Tezimin her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan eşim Öğr. Gör. Sibel AKTOPRAK ve çocuklarım M.Furkan AKTOPRAK ile Berat AKTOPRAK'a, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

**Muhammed AKTOPRAK,**

**Kasım 2015, KAYSERİ**

**MONOSODYUM GLUTAMAT (MSG) KAYNAKLI OKSİDATİF STRESDE  
ERİTROSİT ASETİLKOLİN ESTERAZ VE NİTRİK OKSİT  
DEĞİŞİKLİKLERİNİN ÖNEMİ; MELATONİNİN ROLÜ**

**Muhammed AKTOPRAK**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2015  
Danışman: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN**

**ÖZET**

Monosodyum glutamat toksisitesinde, kanda oksijen taşıyan ve sürekli oksidan strese maruz kalan eritrositlerin önemli ölçüde etkilenebilmektedir. Özellikle eritrosit membranında bulunan asetilkolin esteraz ve eritrositlerdeki nitrik oksit düzeyinin de etkilenmesi muhtemeldir. Ayrıca eritrosit membranları, dolayısıyla onların reolojik özellikleri değişmektedir. Diğer taraftan melatonin güçlü antioksidan özelliği ile çeşitli hastalık ve şartlarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Amacımız monosodyum glutamatın eritrosit asetilkolin esteraz ve nitrik oksit düzeylerine olan etkisini incelemek ve güçlü antioksidan özelliği olan melatoninin koruyuculuk özelliklerini araştırmaktır. Çalışmada ağırlıkları 220±40 gr olan 4-5 aylık erkek Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Kontrol grubuna %0,9'luk 1 ml/kg serum fizyolojik (SF) gavaj yoluyla, msg4 grubuna monosodyum glutamat 4 mg/kg gavaj yoluyla, msg8 grubuna monosodyum glutamat 8 mg/kg gavaj yoluyla, mlt grubuna 10 mg/kg i.p. melatonin, msg4+mlt grubuna 4 mg/kg monosodyum glutamat gavaj yoluyla+10 mg/kg melatonin i.p., msg8+mlt grubuna 8 mg/kg monosodyum glutamat gavaj yoluyla+10 mg/kg melatonin i.p. 14 gün boyunca uygulanmıştır. Alınan kan örneklerinde hematolojik parametreler ( eritrosit sayısı, hematokrit değeri, hemoglobın miktarı, ortalama eritrosit volüm değeri, ortalama eritrosit hemoglobın değeri, ortalama eritrosit hemoglobın konsantrasyonu) ile plazma asetilkolin esteraz düzeyleri, malondialdehit, nitrik oksit miktarları ve % hemoliz değerleri ölçülmüştür. Alınan karaciğer doku örneklerinde asetilkolin esteraz düzeyleri, malondialdehit ve nitrik oksit miktarları ölçülmüştür. MSG toksisitesi oluşturulan msg4 ve msg8 gruplarında eritrosit miktarları azalmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Hemoglobın, hemoliz ve MCHC sayıları anlamlı derecede azalmış, MCV değerleri anlamlı artış göstermiştir. Eritrosit AchE ve Karaciğer AchE düzeyleri azalmış, plazma MDA, Karaciğer MDA, Plazma NO ve Karaciğer NO değerleri yükselmiştir. MSG+melatonin verilen gruplarda ise bu parametrelerin S.F. verilen kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görülmüştür. Melatonin uygulanan grupta elde edilen veriler S.F. uygulanan kontrol grubu verileri ile aynı düzeydedir. Sonuç olarak; monosodyum glutamat verilen sıçanlarda eritrosit asetilkolin esteraz miktarının azaldığı, nitrik oksit ve MDA değerlerinin artışı ile eritrositlerde oksidatif stres oluştuğu ve antioksidan olarak uygulana melatoninin oluşan bu değişiklikleri düzelttiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Monosodyum glutamat, Asetilkolin esteraz, Nitrik oksit, Eritrosit, Melatonin

**THE IMPORTANCE OF ERYTHROCYTES ACETYLCHOLINESTERASE  
AND NITRIC OXIDE CHANGING IN MONOSODIUM GLUTAMATE (MSG)  
INDUCED OXIDATIVE STRESS; POLE OF MELATONIN**

**Muhammed AKTOPRAK**

**Erciyes University, Institute of Health Sciences**

**Department of Physiology**

**Master Thesis, November 2015**

**Advisor: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN**

**ABSTRACT**

It is well known that RBCs which carries oxygen and exposed to stres, affected significantly when Monosodium glutamate toxicity occur in the blood. Especially in erythrocytes, or in erythrocyte membranes, acetylcholinesterase and nitric oxide are affected. Also erythrocyte membranes, therefore changing their rheological properties, as a result. On the other hand, melatonin is a hormone that can be used as the preservative in a variety of diseases and conditions with strong antioxidant properties. Our aim is to investigate the effect of the monosodium glutamate on blood levels of nitric oxide and erythrocyte acetylcholine esterase, and examine the protective and powerful antioxidant properties of Melatonin.

In our study, 4-5 months aged and 220 g weight male Wistar albino rats were used. The control group received 0.9% saline (SF) by gavage, group of msg4 received monosodium glutamate 4 mg / kg by gavage, group of msg8 received 8 mg / kg monosodium glutamate by gavage, group of mlt received 10 mg / kg melatonin by i.p. injection, group of msg4+mlt received 4 mg / kg monosodium glutamat by gavage+10 mg/kg melatonin by i.p. injection, group of msg8+mlt received 8 mg / kg monosodium glutamat by gavage+10 mg/kg melatonin by i.p. injection, for 14 days. Haematological parameters in blood samples (red blood cell count, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume value, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration) and plasma acetylcholinesterase levels, malondialdehyde, nitric oxide amounts and% hemolysis levels were measured. Acetylcholinesterase levels, malondialdehyde and nitric oxide contents in Liver tissue samples, were measured.

Despite the toxicity of MSG, msg4 and msg8 group created to reduce the amount of erythrocyte, but it was not statistically significant. Hemoglobin, and hemolysis and the number of MCHC were significantly reduced, MCV was increased significantly. AChE levels of erythrocytes and liver were decreased, plasma MDA, liver MDA, plasma NO and NO levels of the liver were increased. In the MSG + melatonin group, It has been shown that these parameters was getting closer to control group which was taking only SF. Obtained in the melatonin group data, was the same level as the SF injected control group data. As a result; monosodium glutamate decreases the amount of erythrocyte acetylcholinesterase in rats, Increased Nitric oxide and MDA levels in erythrocytes, was occured with oxidative stress ,and melatonin administered as an antioxidant was concluded that corrected these changes.

**Keywords:** Monosodium glutamate, acetylcholine esterase, nitric oxide, erythrocytes, Melatonin.



## İÇİNDEKİLER

<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK</b> .....	<b>ii</b>
<b>YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI</b> .....	<b>iii</b>
<b>KABUL ONAY</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. MONOSODYUM GLUTAMAT (MSG).....	3
2.1.1. Yapısı ve Genel Özellikleri .....	3
2.1.2. Monosodyum Glutamat ve Obezite .....	5
2.1.3. Monosodyum Glutamatın Kan Üzerine Etkisi .....	7
2.1.4. Monosodyum Glutamatın Diğer Dokulardaki Etkileri.....	8
2.2. OKSİDATİF STRES .....	9
2.2.1. Başlıca Serbest Radikaller .....	11
2.2.2. Lipid peroksidasyon.....	13
2.2.3. Başlıca antioksidanlar .....	15
2.2.3.1.Enzimatik Antioksidanlar .....	16
2.2.3.2.Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	17
2.3. ASETİLKOLİN ESTERAZ .....	20
2.4. NİTRİK OKSİT .....	22
2.5. MELATONİN .....	26
2.6. ERİTROSİTLER .....	33

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
3.1. DENEY GRUPLARI VE PROTOKOL.....	37
3.2. KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	38
3.3. HEMATOLOJİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜLMESİ .....	38
3.4. ASETİLKOLİNESTERAZ ÖLÇÜMÜ .....	38
3.5. NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ .....	39
3.6. MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜ .....	40
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	41
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>54</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>60</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>74</b>

## TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b>	Ana antioksidanların sınıflandırılması .....	16
<b>Tablo 2.2.</b>	Melatoninin bazı biyolojik oluşumlar üzerine etkilerini açıklayan mekanizmalar .....	29
<b>Tablo 4.1.</b>	Deney Hayvanlarının ağırlık değişimleri .....	42
<b>Tablo 4.2.</b>	Hematolojik parametrelerdeki değişiklikler(ort±ss) .....	43
<b>Tablo 4.3.</b>	AchE, NO ve MDA parametrelerindeki değişiklikler(ort±ss) .....	48
<b>Şekil 2.1.</b>	Oksidatif strese bağlı hücre sel hasar .....	9
<b>Şekil 2.2.</b>	Lipid peroksidasyon süreci.....	14
<b>Şekil 2.3.</b>	Asetilkolinesterazın çalışma mekanizması.....	22
<b>Şekil 2.4.</b>	Nitro bileşiklerinin NO'e dönüşümü.....	22
<b>Şekil 2.5.</b>	Argininden NO ve sitrullin oluşumu.....	23
<b>Şekil 2.7.</b>	Melatonin'in kimyasal formülü.....	26
<b>Şekil 2.8.</b>	Pineal bezde melatonin sentezi ve kontrolü .....	28
<b>Şekil 2.9.</b>	Melatoninin Serbest Radikallerle Etkileşimi.....	31
<b>Şekil 2.10.</b>	Melatoninin antioksidan özellikleri.....	32
<b>Şekil 2.11.</b>	Eritrosit membranının yapısı .....	34
<b>Şekil 3.1.</b>	Asetilkolin esteraz standart eğrisi .....	39
<b>Şekil 3.2.</b>	Nitrik Oksit standart eğrisi .....	40
<b>Şekil 3.3.</b>	Malondialdehit standart eğrisi .....	41
<b>Şekil 4.1.</b>	Eritrosit sayıları .....	44
<b>Şekil 4.2.</b>	Hematokrit değerleri .....	45
<b>Şekil 4.3.</b>	Ortalama eritrosit volümü (MCV) değerleri .....	45
<b>Şekil 4.4.</b>	Ortalama eritrosit hemoglobin (MCH) değerleri .....	46
<b>Şekil 4.5.</b>	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerleri.....	46
<b>Şekil 4.6.</b>	Hemoglobin miktarları .....	47

<b>Şekil 4.7.</b>	Eritrosit Asetilkolinesteraz değerleri.....	49
<b>Şekil 4.8.</b>	Karaciğer doku Asetilkolinesteraz değerleri .....	50
<b>Şekil 4.9.</b>	Nitrik Oksit plazma değerleri .....	50

## KISALTMALAR

<b>AchE</b>	: Asetilkolin estera
<b>AFA</b>	: Arilamin formamidaz
<b>AFMK</b>	: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin
<b>AMK</b>	: N1-asetil-5-metoksikinüramin
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>BH4</b>	: Tetrahidrobiopterinin
<b>CaM</b>	: Kalmodulin
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin mono fosfat
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cGMP</b>	: Guanilat siklaz
<b>cGMP</b>	: Siklik guanozin monofosfat
<b>CoQ10</b>	: Koenzim Q10
<b>DHA</b>	: Semidehidroaskorbat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleikasit
<b>EC-SOD</b>	: Ekstraselüler SOD
<b>ETZ</b>	: Elektron Trasport Zinciri
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotit
<b>FMN</b>	: Flavin mononükleotit
<b>G6PD</b>	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>Glu</b>	: L-Glutamik asit
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSSG</b>	: Glutasyonun okside formu
<b>GST</b>	: Glutasyon Transferaz

<b>HGB</b>	: Hemoglobin
<b>IDO</b>	: İndolamin 2,3-dioksijenaz
<b>LDL</b>	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>MCH</b>	: Ortalama eritrosit hemoglobin değeri
<b>MCHC</b>	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyon değeri
<b>MCV</b>	: Ortalama eritrosit volüm değeri
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MEL</b>	: Melatonin
<b>MSG</b>	: Monosodyum glutamat
<b>NAC</b>	: N-asetilsistein
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinüklotid Fosfat
<b>NAT</b>	: N-asetiltransferaz
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Azot dioksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentetaz
<b>PUFA</b>	: Çoklu doymamış uzun zincirli yağ asitleri
<b>RNS</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROO</b>	: Peroksil radikali
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Monosodyum glutamat, glutamat amino asidinin sodyum tuzu olup hazır gıdalarda sıkça kullanılan bir lezzet arttırıcıdır. Lezzetlendirici olarak kullanıldığında göğüs ağrısı, baş ağrısı, yüzde kızarıklık, nefes darlığı, ödem ve terlemeye neden olduğu bilinmektedir (1). Neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (2).

Monosodyum glutamatın, değişik organ ve sistemlerde artan oksidatif stres ve sitotoksisite şeklinde görülen, Çin Restoranı Sendromu olarak da bilinen toksik etkileri olduğu ileri sürülmektedir (4). Artan oksidatif stres sonucu görülen olaylardan biri de lipid peroksidasyonunun artmasıdır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, eritrositlerin fonksiyonlarına ait çeşitli parametreler ve membran bütünlüğünün, lipid peroksidasyonundaki artıştan olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. Oksidatif stresteeki artış nedeniyle meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkileyerek eritrositlerin deformabilite yeteneğinde ve yaşam sürelerinde azalmaya yol açabilmektedir (1,5).

Diğer taraftan sinir sisteminde bulunmasının dışında, asetilkolinesteraz enzimi kanda oksijen taşımakla görevli olan eritrositlerin membranlarında da bulunmaktadır. Ayrıca hem eritrositlerin içerisinde oluşan hem de damar endotel hücrelerinden salgılanana nitrik oksitin gerek eritrositlerin gerekse kan akımının kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir. Her ne kadar bu enzimin eritrosit membranlarındaki fizyolojik işlevleri çok fazla bilinmiyorsa da, bazı hematolojik hastalıklarda AchE aktivitesinde değişiklikler olması hücre membranı ile ilgili çalışmalarda önemli bir komponent olarak

görülmektedir. Bu, bazı hastalıkların anlaşılmasında, ya da eritrosit membranını etkileyen çeşitli ilaçlar veya fizyopatolojik süreçler gibi olaylarda enzimin önemini ortaya koymaktadır. Literatürde AchE aktivitesindeki ya da yapısındaki değişikliklerin de eritrositlerden nitrik oksit salgılanmasını, veya giriş-çıkışını değiştirebildiği ile ilgili az sayıda çalışma vardır (3).

Bu çalışmada monosodyum glutamat kaynaklı oksidatif stresde eritrosit asetilkolin esteraz ve nitrik oksit değişikliklerini antioksidan etkisi bilinen melatonin ile muhtemel olumsuzluğa karşı koruyucu olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MONOSODYUM GLUTAMAT (MSG)

#### 2.1.1. Yapısı ve Genel Özellikleri

Lezzet arttırma amacı ile kullanılan katkı maddelerinin başında Monosodyum Glutamat (E621) gelmektedir. Mono Sodyum Glutamatın gıdalarda kullanımı, deniz yosunları kullanımı ile antik Çin mutfağına kadar uzanmaktadır (8). İlk kez 1866 yılında Ritthausen adındaki Alman kimyacı glutamik asidi laboratuvarında elde etmiş, daha sonra başka bir kimyacı bu asidi sodyum tuzuna dönüştürerek monosodyum glutamatı elde etmiştir (9,10). MSG, esansiyel olmayan asidik bir amino asit olan glutamatın  $\gamma$  karbon atomuna, bir hidrojen atomu yerine bir sodyum atomunun bağlanmasıyla oluşur. Vücuttaki diğer amino asitlerde olduğu gibi MSG de sadece L-formunda aktiftir; D-formunun ise aktivitesi olmadığı saptanmıştır. Ayrıca ısı işlemlere karşı duyarlı olduğu ve ısı etkisiyle bir mol su kaybederek laktan formunu oluşturduğu, böylece lezzet arttırıcı özelliğini kaybettiği bilinmektedir. Aktif olarak çalıştığı pH aralığı ise 5,5-8 olarak belirtilmektedir (11). Dünyada en çok bilinen ve kullanılan lezzet arttırıcı; Mono Sodyum Glutamat proteinlerin yapı taşı olan L-glutamik asidin sodyum tuzudur). MSG ( $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$ ), birçok gıdada ve insan vücudunda proteinlerin yapıtaşı olan amino asit formunda yada serbest halde bulunmaktadır . MSG ile ilgili araştırmalarda söz konusu aminoasidin sadece L formunun lezzet arttırıcı aktiviteye sahip olduğu, D-formunun ise aktivitesinin olmadığı saptanmıştır. Anne sütü, inek sütü, peynir ve et gibi proteince zengin gıdalarda ve mantar, domates gibi sebzelerde doğal olarak bulunan MSG hasat, işleme gibi işlemlerle kayba uğramaktadır. İşleme, pişirme ve dondurma gibi işlemlerin ise bu lezzet kayıplarını durdurmada etkili olmadıkları bildirilmektedir. Gıdanın orijinal lezzetinin bir kısmı MSG gibi bir lezzet arttırıcı kullanılarak geri kazanılabilmektedir. Ancak daha da önemlisi MSG kullanıldığında, çiğnenebilirlik arttığından sindirim de kolaylaşmaktadır. Ayrıca, MSG kendinden özel bir lezzet

katmaksızın, gıdanın doğal lezzetini kuvvetlendirerek gizli lezzet karakteristiklerini ortaya çıkarmakta, zayıf lezzet karakteristiklerini arttırmakta, ağızda doluluk ve süreklilik gibi gıdaya özgü kalite karakteristiklerini geliştirmektedir. MSG' nin en önemli özelliği, tükürük salgısını arttırarak lezzet profilindeki özellikleri ortaya çıkarmasıdır. Avrupa, Japonya ve ABD'de yapılan çalışmalar sonucunda MSG' in lezzet aktivitesinin dört temel tattan farklı olduğu saptanmış ve bu yeni tada "umami" adı verilmiştir. Ancak, MSG' in tadının saf olmadığı, tatlı, tuzlu ve acı ile birlikte hoş giden ve rahatlatan hisleri de içerdiği belirtilmektedir. Umami tadın yanı sıra tuzlu olarak da tanımlanan MSG' in NaCl ile interaksiyonunun olduğu düşünülmekte ve gıdada MSG kullanıldığında NaCl miktarının düşürülmesi ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (12).

L-Glutamik asit (Glu) serbest ve proteine bağlı yapılarda gıda maddelerinde geniş ölçüde bulunan aminoasitlerdir. Serbest Glu'nun yüksek miktarlarını içeren gıdalar (domates, mantar ve peynir) geleneksel olarak lezzetli yemekler elde etmek için kullanılmaktadır. Sadece L-konfigurasyonundaki serbest formdaki Glu lezzet arttırıcı özelliği verir ve bu yüzden özellikle monosodyum tuzu yapısında gıda endüstrisinde lezzet arttırıcı olarak geniş ölçüde kullanılır. Monosodyum glutamat (MSG) beşinci temel tat olarak bilinen, et aromasına çok benzer olan tipik umami aromasını verir. MSG saf olarak veya maya ekstraktlarının gizli içeriği olarak veya hidrolize protein olarak ve yüksek oranlarda Glu içerecek şekilde eklenebilir. Serbest L-Glu, beyinde en çok serbest halde bulunan aminoasittir ve memeli santral sinir sisteminde (CNS) temel uyarıcı nörotransmitterlerden biridir (13).

### **2.1.1. Monosodyum Glutamatın Sinir Sistemindeki Etkileri**

Neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, alzheimer, parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (2). Beyin glutamat konsantrasyonları fizyolojik seviyenin üzerine çıktığı zaman glutamat reseptörleri içeren nöronlara toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Uyarıcı aminoasitlerin (glutamik ve aspartik asit) Parkinson hastalığının fizyopatolojisinde ana rol oynayabileceği belirtilmiştir. Dahası, farklı araştırmacılar MSG'nin Alzheimer, amyotrofik lateral sklerosis ve Huntington hastalığı gibi diğer

nörodejenaratif hastalıklar için kofaktör veya ağırlaştırıcı faktör olabileceğini belirtmişlerdir (13). Monosodyum glutamat'ın apoptoz ve öğrenme bozukluklarıyla ilişkisi ve buna karşı antioksidanların rolünü değerlendiren çalışmalarda MSG'nin uzamsal hafıza ve yer öğrenme gibi mekanizmalarda da olumsuz etkilere yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan bir deneyde, neonatal dönemde günde vücut ağırlığı başına 4 mg/kg MSG enjekte edilen 8 sıçan kullanılmıştır. Buna karşı olarak da normal gelişimlerini sürdürmüş 8 sıçan kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sıçanlara doğumdan sonraki dördüncü ayda dokuz günlük bir yer öğrenme testi uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre deney grubunun uzamsal hafızasının zarar gördüğü saptanmıştır. Bunun yanında yer öğrenme ve hatırlama fonksiyonlarının da monosodyum glutamata bağlı olarak zarar gördüğü ileri sürülmüştür (14). Farelerde yapılan deneyde ise MSG seçici nörodejenerasyona neden olmuştur (11). Hipotalamusta yer alan arcuate çekirdekte ileri seviyede nekroza sebep olmuştur(15). 1970 yılında John Olney'in yeni doğan farelerde ağız yoluyla uygulanan MSG'nin beyinde arkuat nukleusta nöron ölümlerine neden olduğunu göstermesi bu konuyla ilgili deneysel çalışmaları tetiklemiştir (16). Sıçanlarda epileptik atakları tetiklemek için MSG'nin ufak dozları kullanılmıştır. Ölüm oranı ve atakların ciddiyeti, sıçanların yaşı ile doğru orantılı olarak artmıştır(17).

### **2.1.2. Monosodyum Glutamat ve Obezite**

Monosodyum glutamatın farklı yollarla obeziteye neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak en çarpıcı nokta araştırmacıların, obez denek elde etmek için MSG kullanmalarıdır. Yeni doğan farelere doğumdan sonraki 1, 2, 3, 6, 7 ve 8. günlerde çeşitli yollarla bir gram vücut ağırlığı başına 3 mg MSG verilmiştir. Deneklerin %16'sı sütten kesilmeden ölmüş, hayatta kalanların %90'ı ise fark edilir derecede obez olmuştur. Ayrıca yeni doğanlara düzenli olarak yapılan enjeksiyonların, vücut yağlanmasını arttırmada %100 güvenilir bir yöntem olduğu saptanmıştır (18). Obezite ve MSG ilişkisi, üzerine insanların denek olarak kullanıldığı deneyler de bulunmaktadır. Bu deneylerin birinde obez ve normal kilolu kadınlar arasındaki şekerli ve umami tat algı farkınının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan deneyde 23 obez, 34 normal deneğe  $1.10^{-5}$  -  $5,6.10^{-5}$  mol/l konstantrasyon arasında değişen sükroz ve MSG çözeltileri verilmiştir. Obez kadınların tadı algılaması için MSG'yi daha yüksek konsantrasyonda almaları gerektiği gözlenmiştir. Obez kadınların MSG algıları eşik

konsantrasyonun üstünde olmasına rağmen tuz ve MSG'yi ayırt edebilme yeteneği ve sükröz tercihleri normal kilodakilerle benzerdir. Vücut ağırlığı kategorilerini dikkate almadan kadınların %28'i 29 mmol/L MSG'yi 29 mmol/L NaCl'yi ayırt edememektedir. Vücut ağırlığının, umami tadın bazı bileşenleriyle ilişkili olduğu ve eşik ve eşik üstü MSG konsantrasyonlarının algılanmasında farklı mekanizmaların söz konusu olduğu bulunmuştur. Yani obez kadınların MSG eşiği yüksek, sükröz eşiği düşük, normal kadınlarıki ise tam tersidir (19,20). MSG obeziteyi iştahı artırarak, insülin salınımını artırarak, ketogenezi azaltarak ve adolesan dönemde büyüme hormonunun salınımını baskılayarak tetikler (6). MSG iştahı artırması üzerine yapılan bir deneyde koyunlarda değişik miktarlarda MSG içeren sahte otlar verilmiştir. MSG miktarı ve ot yeme arasındaki ilişki incelenmiştir. 5-40 g/kg oranıyla verilen MSG'li kalitesiz otlar iştahı önceki halinin %146'sı yapmıştır. Bu çalışmada anlatılan kalitesiz yiyeceklerin kullanımı MSG eklenmesiyle artırılabilir (21). İnsanlar ile yapılan deneylerde ise iki bulgu göze çarpmıştır. Bu bulgulardan birincisi MSG içeren yiyecek ile beslenen deneğin kısa sürede yeniden acıktığı gözlenmiştir. MSG içeren bir öğle yemeğinden sonra yeniden yeme isteği normale göre daha hızlı oluşmuştur (11). İkinci önemli bulgu ise, MSG içeren besinin tüketiminin MSG içermeyen besinlere karşın oldukça fazla olmasıdır. MSG' nin lezzet üzerine etkisini araştırmak amacıyla 36 genç erkek ve kadına 2 farklı yiyecek sunulmuştur. MSG dozu yüksek olan grup giderek daha hızlı ve daha çok yemeye başlamışlardır (22). Bu konuyla ilgili deneysel çalışmalarda; sıçanlara verilen MSG'nin pankreası aşırı uyatarak hiperinsülinemiye yol açtığı belirtilmiştir. Bunun sonucu ise glikozun adipoz dokuya dönüşümünün hızlanmasıdır. Doğum sonrası dönemde olan sıçanlara verilen MSG, yetişkinlik döneminde insülin direncine işaret eden obezite, hiperinsülinemi ve hiperglikemiye sebep olmuştur. Ayrıca plazma insülini de artış göstermiştir (23). MSG ağız yoluyla bile verildiğinde 3 dakika içerisinde insülin artışı gözlenebilmiştir (24). 7 insan deneğe 150 mg/kg monosodyum glutamat ve plasebo verilmiştir. Bu insanların bir kısmı dinlendirilmiş, bir kısmına beden eğitimi yaptırılmıştır. Sonucunda insülin seviyelerinde artış gözlenmiştir(25). 10 gram MSG ağız yoluyla 19-28 yaş arası insanlara verilmiş ve insülin değerlerinde artış görülmüştür (26). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda büyüme hormonu salgılayan hücreleri yok etmek üzere yalnızca 4 mg/g MSG'nin yeterli olduğu öne sürülmüştür. Sıklıkla büyüme çağında kullanılan bir takım hazır yiyeceklerin ergenlik döneminde ne denli tehlikeli olduğu da tekrar vurgulanmıştır (27). Günümüzün

önemli sorunlarından biri de diyabettir ve her geçen gün diyabet hastalarının sayısı artmaktadır. Bu hastalığı yenmede hayvan deneylerinin önemi büyüktür. MSG'nin obez fare elde etmek için kullanıldığını bilinmekteydi. Ancak aynı maddenin glycosuria'ya neden olduğu keşfedilmiştir. Bu dişi ve erkek farelerin kanlarındaki glikoz, insülin, kolesterol ve gliseritlerin yoğunluğu kontrol gruplarında bulunandan daha fazladır. Bu sonuçlar yetişkin farelerde daha ağırdır. Bu belirtilere çoğu zaman obezite de eşlik etmiştir. Çoğu denekte diabetes mellitus'un ileri hali gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, kullanılan denekler polifaji görülmeyen tip 2 obez hayvanlar olarak kabul edilmiştir (28). Her kemirgen MSG'ye maruz kalınca obez olmamıştır. Bazıları sadece diyabet olmuşlardır. Yeni doğmuş Çin hamsterları MSG aşısı yapılıncaya büyüdüklerinde bile obezite belirtisi göstermemişler, ancak diyabet hastası olmuşlardır (25).

### **2.1.3. Monosodyum Glutamatın Kan Üzerine Etkisi**

Eritrositlerin üzerinde etkili olan asetilkolinesteraz ve nitrik oksit, monosodyum glutamatın oluşturacağı oksidatif stres nedeni ile olumsuz etkilenebilecekleri düşünülmektedir. Ayrıca, eritrositlerin içerisinde de oluşan nitrik oksit bileşiğinin eritrositlerde ATP salınımı ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (3). Artan oksidatif stres sonucu görülen olaylardan biri de lipid peroksidasyonunun artmasıdır. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, eritrositlerin fonksiyonlarına ait çeşitli parametreler ve membran bütünlüğünün, lipid peroksidasyonundaki artıştan olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. Oksidatif stresteki artış nedeniyle meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkileyerek eritrositlerin deformabilite yeteneğinde ve yaşam sürelerinde azalmaya yol açabilmektedir (1,5). Monosodyum glutamatın birçok dokuda oluşturduğu oksidatif stres bir çalışmada eritrositlerde de oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir (2). Eritrositlerin reolojik özelliklerindeki değişiklikler, eritrositlerin kan akımına uyum kapasitelerini azaltarak agregasyona neden olabilirler. Agregasyon eritrosit membranıyla fibrinojen ve globulinler gibi plazma proteinlerin etkileşimi sonucu oluşabilir. Eritrositler kan dolaşımında sürekli oksidan strese maruz kalmaktadırlar. Çeşitli faktörler, fizyopatolojik şartlar ve çeşitli ilaçlar eritrosit membranlarında oksidatif hasara yol açabilmekte ve eritrosit reolojisinde değişikliklere neden olabilmektedir (6,7).

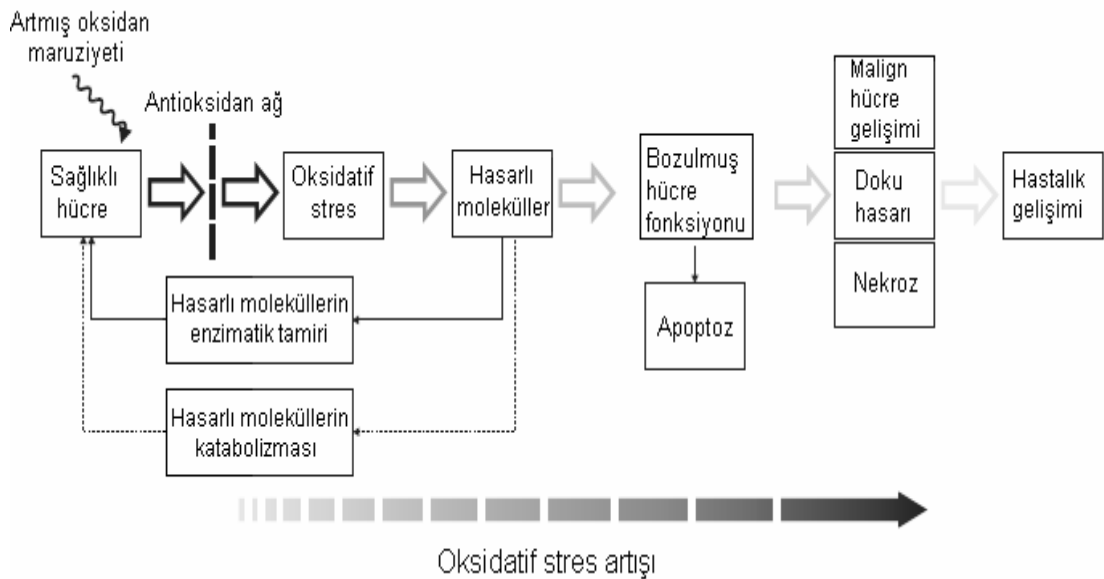
#### 2.1.4. Monosodyum Glutamatın Diğer Dokulardaki Etkileri

Monosodyum glutamat, glutamat amino asidinin sodyum tuzu olup hazır gıdalarda sıkça kullanılan bir lezzet arttırıcıdır. Lezzetlendirici olarak kullanıldığında göğüs ağrısı, baş ağrısı, yüzde kızarıklık, nefes darlığı, ödem ve terlemeye neden olduğu bilinmektedir (1). Monosodyum Glutamat'ın, değişik organ ve sistemlerde artan oksidatif stres ve sitotoksisite şeklinde görülen, Çin Restoranı Sendromu olarak da bilinen toksik etkileri olduğu ileri sürülmektedir (4). Monosodyum glutamatın bir diğer önemli etkisi plesentayı geçmesidir. Hamile sıçana deri altından verilen MSG hem annede hem fetüste nekroza neden olmuştur. MSG'nin anneye etkisinin aynısı fetüste de görülmüştür. Ancak embriyonal hücrelerin tepkisi daha hassas olmuştur. Bu gözlemler insan annelerin MSG içeren beslenmelerinin fetüse etki edeceğinin bir kanıtı olarak alınmıştır (29). MSG'nin üreme sistemi üzerinde olası etkilerini değerlendirmek üzere yapılan çalışmalarda doğrudan etkisi olduğu tam olarak kanıtlanamamıştır. Ancak MSG toksitesinde  $Ca^{2+}$  iyon geçirgenliğindeki değişikliklerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmanın amacı MSG'den önce verilen Diltiazem'in (Ca kanalını bloke edici) , MSG'nin yumurtalıklara ve menstrüel döngüye olan etkilerini değiştirip değiştirmediğini araştırmaktır. Deney 4 gruba ayrılan yenidoğan dişi sıçanlar üzerinde yapılmıştır. C grubuna %0,9'luk NaCl, M grubuna 4 mg/g MSG, D grubuna 5 mg/g Diltiazem, DM grubuna ise 5mg/g diltiazem 1 saat sonra da 4 mg/g MSG enjekte edilmiştir. Bu işlemler 2. 4. 6. 8. ve 10. günlerde tekrarlanmıştır. Sıçanlar 28 gün sonra kafeslere yerleştirilmiştir ve 25 gün boyunca vajinal sürüntü alınıp incelenmiştir. Aynı zamanda sıçanlara genel anestezi verilerek yumurtalıkları çıkarılıp incelenmiştir. Menstrüel döngülerin uzunluğu ve süresi belirlenmiştir. Döngüler M grubunda 5,2 gün, C grubunda 4,1 gün, D grubunda 4,3 gün ve DM grubunda ise 4,6 gün sürmüştür. M grubunda döngü süresi daha uzun ve döngülerin daha sık olduğu görülmüştür. Ayrıca M grubunda kistik dejenerasyon, fibrotik değişiklikler, stromadaki arteriorlarda kistik dejenerasyon görülmüştür. Overlerinde ise çok sayıda atrezik folikül olduğu ve korpus luteum içermediği belirlenmiştir. C, D ve DM gruplarında morfolojinin normal olduğu görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda yenidoğan sıçanlarda ilk 10 gün MSG verildiğinde kısırlık ve tek doz MSG (4 mg/g) verildiğinde geç dönemde menstrüel döngülerin bozulduğu, ancak histolojik bulguların normal olduğu gözlenmiştir. MSG'nin kadın üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri hipotalamus üzerinden doğrudan etkili olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalarda MSG'nin toksik etkilerinde

glutamat reseptörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Glutamat reseptörlerinde artan aktivasyon nörotoksik potansiyel oluşturmakta kronik düşük doz MSG glutamat reseptörlerini aktive ederek overlere zarar vermektedir (30). MSG göz hücrelerindeki birçok yapıda hasara neden olmuştur. Bu hasar kemirgenlerde iki aşamada meydana gelmiştir. İlk aşama ileri derecede hücre içi şişkinliği, ikinci aşama ise nekroz ve hücre kaybı olmuştur. İn vitro çalışma sırasında, 12 günlük tavuk embriyo retinasına eklenen MSG, morfolojik hasara yol açmıştır (31)

## 2.2. OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu radikallerin oluşum hızındaki artış ya da ortadan kaldırılma hızındaki azalma bu dengeyi bozar. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır. Yapısal doku hasarının yanında nekroz, apoptoz yoluyla hücre ölümü ve makromoleküllerin oksidatif modifikasyonunu içerir (Şekil 2.1.). Hücreler normal koşullarda orta dereceli oksidatif stresi, antioksidan savunma mekanizmalarının sentezini gen ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla düzenleyerek ortadan kaldırabilir. Fakat oksidatif stres yüksek düzeylere ulaştığı zaman oksidasyon ürünlerine karşı adaptasyon sağlanamaz ise hücrede hasar oluşabilir. DNA, protein ve lipidleri içeren tüm biyomoleküllerin oksidatif hasarı birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir.



Şekil 2.1. Oksidatif strese bağlı hücre hasarı (32)

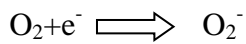
Çeşitli kanser tipleri, kardiyovasküler hastalıklar, alkolik karaciğer hastalığı, diyabet, ağır metal toksisitesi, radyasyon hasarı, vitamin eksikliği, bilinen tedavilerin toksisitesi, inflamasyon, sigaranın toksik etkileri, katarakt, amfizem ve Parkinson ile Alzheimer hastalığını da içeren nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ile oksidatif stres arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (32). Bitkiler güneş enerjisini redükte moleküllere dönüştürmekte; memeliler ise bu redükte molekülleri birçok biyokimyasal basamak sonucunda CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya indirgeyerek, enerjiyi kullanılabilir ve depo edilebilir yüksek enerjili ATP (Adenozin trifosfat) gibi fosfat bileşiklerine çevirmektedir. Bu indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları redoks reaksiyonları olup; okside edilebilir moleküllerden oksijene elektronların transferini içermektedir. Bir maddede elektronların kaybedilmesine oksidasyon; diğer bir maddenin ise elektronları almasına redüksiyon adı verilmektedir. Redoks reaksiyonları sadece elektronların transferi ile değil; aynı zamanda kovalent bağlarda elektron yörüngelerinin değişmesi ile de meydana gelmektedir. Okside olmuş ajanlar ise oldukça elektrofilik oldukları için, diğer moleküllerden elektron alabilmekte ve böylece serbest radikalleri meydana getirmektedirler (33). Serbest radikaller dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Oluşan radikaller çok reaktif ve anstabil dirler. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (34). Organizmada oluşan serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklıdır. Memelilerde, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ), fagositik ve endotelyal hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, araşidonik asit metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantin oksidaz ile NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle meydana gelirler. Ekzojen kaynaklar ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonize radyasyon, ultraviyole (UV) ışık, sigara dumanı ve ksenobiyotiklerdir (34). Bitkilerde ise serbest radikaller endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşur (35-36). Kuraklık, düşük ve yüksek ısı değerleri, ağır metaller, UV ışık, beslenme noksanlıkları, yüksek derecede tuzlu ortam, yüksek ışık stresi ve hipoksi ise ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır (37,39). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres; normal fonksiyon gösteren hücre ve



organizmalardaki moleküllerde enzimatik olmayan oksidatif hasarın birikimi ile karakterize olmuş durumu ifade etmektedir (39). Bitkilerde ve memelilerdeki en yoğun olarak oluşan serbest radikaller ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak sınıflandırılmaktadır.

### 2.2.1. Başlıca Serbest Radikaller

Reaktif Oksijen Türleri (ROS): ROS, serbest radikallerin dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu bulunması ile karakterizedir. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etkimesi ile meydana gelirler. En önemlileri şunlardır (33,39):  $O_2^-$ . (Süperoksit) radikali: Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan  $O_2^-$  radikali oluşur. *In vivo*; adrenalin, flavin nükleotidleri, tiyol içeren bileşikler, glukoz ile demir ve bakır gibi geçiş metallerinin oksijene etkisiyle meydana gelmektedir. Mitokondrilerdeki ETZ, karaciğerde sitokrom P450, adrenal medullada hormon sentezi, damar endotelinde nitrik oksitlerin elimine edilmesinde, fagozitozda, hücre büyümesi ve farklılaşmasında meydana gelmektedir (40):



$H_2O_2$  (Hidrojen peroksit):  $O_2^-$  'ye bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da  $O_2^-$  'ye iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir (41).

OH. (Hidroksil) radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları: Moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelir. Serbest radikallerin çoğu zararlı etkileri hidroksil radikali ile oluşur.  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan, ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da diğer etkilerle hidroksil radikalini oluştururlar (42).

Fenton reaksiyonu:  $H_2O_2$ ,  $Fe^{+2}$  ve diğer geçiş metalleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH radikali oluşturur.

Haber-Weiss reaksiyonu:  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  ile reaksiyona girerek ( $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  katalizi ile) Fehidroksil radikalini oluşturur. Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalmasıyla da OH oluşur.  $H_2O_2$  'nin UV ışığına maruz kalması ile de OH oluşabilir.

HOCl (Hipokloröz asit): Bağışıklık sistemine ait fagositik özellikli nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla  $O_2^-$ 'nin dismutasyonu ile oluşan  $H_2O_2$ 'i, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'ye dönüştürürler (43).

Singlet  $O_2$  ( $1 O_2$ ): Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi; süperoksit radikalinin nitrik oksit ile reaksiyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (44).

R. (Alkil radikali, organik radikaller): Hidroksil radikali; yağ asitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur (45).

$HO_2$  (Hidroperoksil radikali): Süperoksit radikalinin düşük pH'da (pKa 4.8) protonlanmasıyla oluşur ve daha kuvvetli bir oksidandır (46).

LO. (Alkoksil radikali):  $Fe^{+2}$  gibi geçiş metallerinin lipit hidroperoksidi indirgemesi ile oluşur, okside low-density lipoprotein (LDL) oluşturarak hücre ölümüne yol açar (41,47).

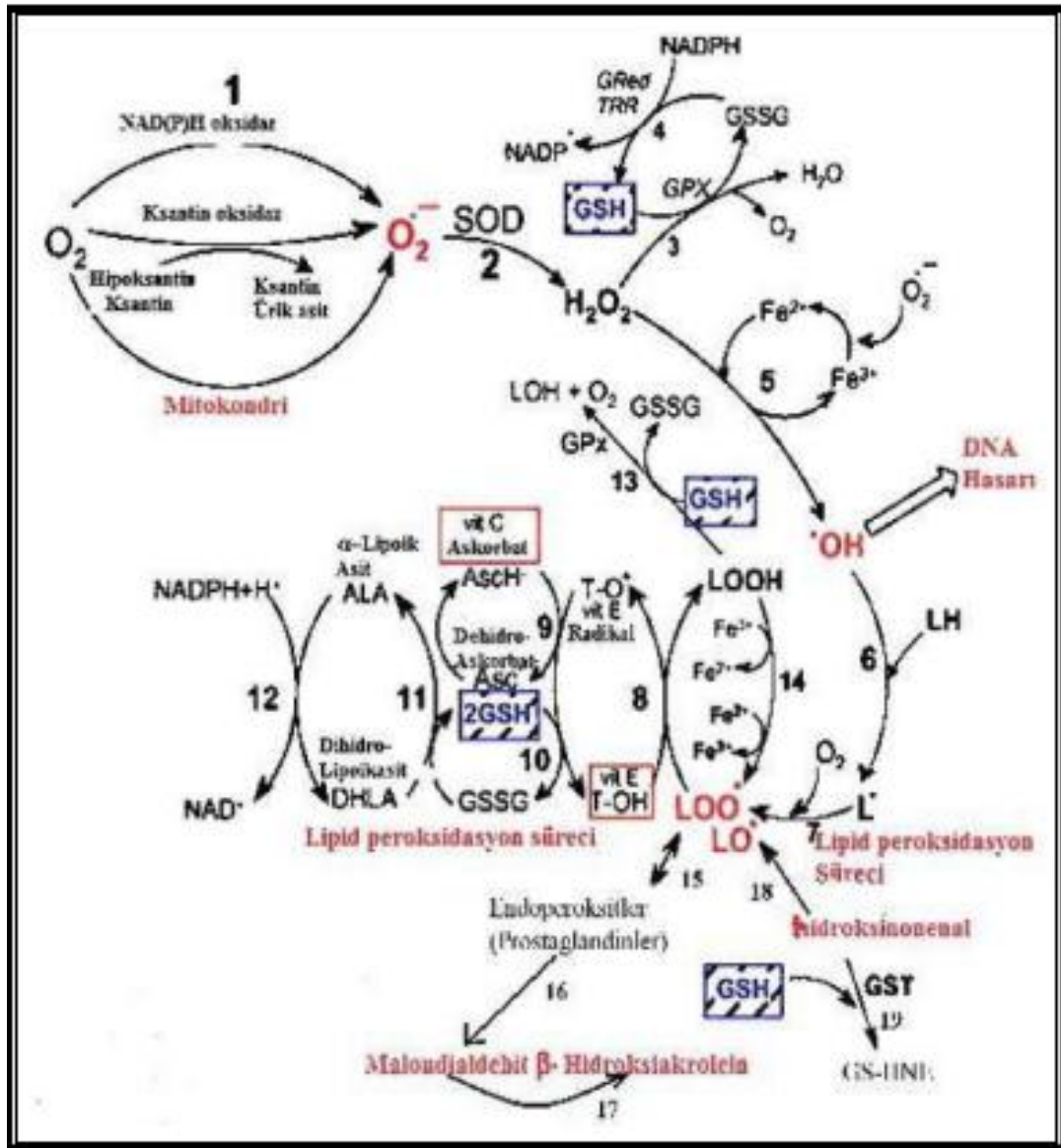
Reaktif Nitrojen Türleri (RNS): Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi nitrik oksittir: Nitrik Oksit (NO) Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-argininden sentezlenir. NO'nun yarı ömrü 10-20 saniyedir. Bu nedenle üretimi hakkında fikir sahibi olabilmek için  $NO_2$  ölçümleri yapılmaktadır. Düz kaslarda siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar. NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azot dioksit ( $NO_2$ ) oluşturur: NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH radikali meydana getirdiği ifade edilmektedir OH ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro-türevleri (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıklarında rol oynayabilmektedir (48).

### 2.2.2. Lipid peroksidasyon

Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (49,50). Normalde, düşük düzeyde tüm hücre ve dokularda meydana gelir (51). Lipid peroksidasyonuna en duyarlı bileşikler, membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış uzun zincirli yağ asitleri (PUFA), özellikle araşidonik asit ve dekosheksaenoik asittir. Bu yüzden lipid peroksidasyonunun yol açtığı en önemli hasar hücre membranında gözlenir (52,53). Lipid peroksidasyonu otokatalitik zincir reaksiyonu ile hasar yapar. Kuvvetli bir oksidanın etkisiyle PUFA zincirindeki ametilen grubundan bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla başlar ve lipid hidroperoksitlerin doymamış yağ asidi aldehitleri, alkanlar, epoksi yağ asitleri, hidroksi yağ asitleri gibi ürünlere yıkılması ile etan, pentan gibi uçucu gazların oluşumu ile sonlanır. Bunlar da direkt olarak membran yapısına, indirekt olarak da hücre komponentlerine zarar verirler (49,54,55). Aldehitler lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en toksik ürünlerdir. Malondialdehit (MDA) non-enzimatik oksidatif lipid peroksit dekompozisyonu sonucu oluşur ve peroksidasyonun son ürünüdür(). Non-enzimatik oksidatif lipidperoksitlerin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerinden biri Malondialdehitdir (MDA). İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin Otoksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen döngüsel endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağıdır (56).

Plazma malondialdehit (MDA) konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksid parçalanması sonucu oluşur. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (57).

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Bu aldehitlerden en önemlisi malondialdehit (MDA) olarak adlandırılan moleküldür. Malondialdehit düzeyi, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, suda çözünen bir lipid peroksidasyon ürünüdür (58, 59).



**Şekil 2.2.** Lipid peroksidasyon süreci: Reaksiyon 1: Süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşumu, Reaksiyon 2: Süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumu, Reaksiyon 3:  $H_2O_2$ 'ın, glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ile temizlenmesi, Reaksiyon 4: Okside glutatyonun (GSSG), GSH'a dönüşmesi, Reaksiyon 5: Demir veya bakır varlığında  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  dan hidroksil ( $\cdot OH$ ) oluşumu, Reaksiyon 6:  $\cdot OH$  ile poliansature yağ asitinden (LH) lipid radikali (L) oluşumu, Reaksiyon 7: Lipid radikalinin lipid peroksil radikaline (LOO) dönüşümü. LOO antioksidanlarla redükte edilemez ise lipid peroksidasyon süreci başlar (15-19. reaksiyonlar). Reaksiyon 8-12: LOO'nun E, C vitaminleri ve GSH yardımı ile indirgenmesi ve GSSG, E ve C vitaminlerinin rejenerasyonu, Reaksiyon 13: Lipid hidroperoksitlerinin GSH ve GPx yardımı ile indirgenmesi, Reaksiyon 15-17: Prostaglandin sentezi ve malondialdehit oluşumu, Reaksiyon 18,19:Hidroksinonenal oluşumu ve bunun GSH ve glutatyon transferaz (GST) yardımı ile detoksifiye edilmesi, NAC'in esas fonksiyonunu GSH sentezi ile yaptığı düşünülmektedir (60).

Eritrositlerde oksidatif stres oluşumu membranın yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona uğraması, membran bütünlüğünün bozularak eritrositlerin parçalanma riskinin artmasına neden olur (3,4). Eritrositlerde membran lipidlerinin peroksidasyona uğraması sonucunda ikincil ürün olarak oluşan önemli oksidasyon ürünlerinden birisi de MDA'dır (61).

### **2.2.3. Başlıca antioksidanlar**

Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir. Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini dört farklı şekilde gösterirler. Örneğin  $\alpha$ - tokoferol, lipit faz zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipit peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırar. Glutatyon gibi antioksidan moleküller ise direk olarak ROS konsantrasyonunu azaltırlar. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler ise geçiş metalleri ile şelat oluşturarak etkilerini gösterirler. Bu yolla laktoferritin, transferrin ile ferritin demirle; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler (39).

Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek için endojen antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan diye iki kısma ayrılabilir (Tablo 2.1). Bu derlemede en önemli hayvansal ve bitkisel antioksidanlardan bahsedilecektir.

**Tablo 2.1.** Ana antioksidanların sınıflandırılması (73).

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Superoksit dizmutaz (SOD)	$O_2^{\cdot-}$ 'i $H_2O_2$ 'ye dönüştürür.	Manganez içerir (Mn-SOD) Bakır ve çinko içerir (CuZn-SOD) Mn ve Fe içerir (Fe-SOD) Ni içerir (Ni-SOD) Bakır içerir (Cu-SOD)
Katalaz (CAT)	$H_2O_2$ 'yi $H_2O$ 'ya çevirir.	Peroksizomlerde yer alan tetramerik bir proteindir.
Glutasyon peroksidaz (GPx)	$H_2O_2$ ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.	Selenoprotein ( $Se^{2+}$ içerir), daha çok sitozolde, az olarak mitokondride bulunur ve GSH kullanır.
Antioksidan Vitaminler	Rolü	Özellikleri
Alfa tokoferol	Lipit peoksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ 'yi temizler.	Yağda çözünür.
Beta karoten	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ 'yi temizler. Vitamin A'nın oksidasyonunu önler. Geçiş metallerini bağlar.	Yağda çözünür.
Askorbik asit	Direk olarak $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ ve $H_2O_2$ 'yu temizler. Nötrofiller tarafından uyarılan antioksidanları nötralize eder. Vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlar.	Suda çözünür.

### 2.2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

a) **Süperoksit Dismutaz (SOD)** Endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzimdir. Hücresel SOD çeşitli prostetik gruplar taşıyan metalloenzimlerin bir grubudur. SOD beş farklı formdadır: Vücutta en bol olarak bulunan bakır çinko CuZn-SOD sitoplazmada bulunur. MnSOD, mitokondrilerde yer alır. Fe-SOD, E. Coli, Bacteroides fragilis ve Propionibacterium shermanii bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığı özel bir sistem şeklinde bulunmaktadır. Ni-SOD, Streptomyces griseus bakterinde tanımlanan homotetramerik yapıya sahip nikel içeren bir izoenzimdir (62).

b) **Ekstraselüler SOD (EC-SOD)** Marklund tarafından 1982'de tanımlanmıştır ve CuZnSOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur (63). EC-SOD, sadece fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentez edilir ve heparan sülfatlara

bağlı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir. Damar endotelinden salınan endotelial heparin gevşetici faktör plazmada süperoksit tarafından nötrelize edildiği için EC-SOD damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynar (66):  $2O_2^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$  SOD, ROS'lerden süperokside bir elektron vererek  $H_2O_2$ 'ye indirgerken; katalaz ve selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx) ise  $H_2O_2$ 'yi suya indirger. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile  $Fe^{3+}$  'ün,  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesisonucunda hidroksil radikalının oluşmasının engellenmesi şeklindedir (62).

**c) Glutatyon Peroksidaz (GPx):** Glutatyon redoks döngüsü, hücreiçi hidroperoksitlerin indirgenmesinde merkezi rol oynamaktadır. GPx, dört atom selenyum bağladığından dolayı seleno-sistein bileşiği sınıfına girer ve katalitik aktivitesini bu özelliği sağlar. Ko-substrat olarak glutatyon gereksinim duyar. GPx, glutatyonu okside ederek  $H_2O_2$ 'yu  $H_2O$ 'ya indirgemektedir (Eşitlik A). Glutatyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH'ya indirgenmesi ise glutatyon redüktaz (GR) tarafından sağlanır (Eşitlik B). SOD maksimum etkinlik için bakır, çinko ve manganez; GPx selenyum ve katalaz demir gibi geçiş metallerinin kofaktörlüğüne ihtiyaç duyar (32).  $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$  (Eşitlik A)  $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$  (Eşitlik B)

**d) Katalaz (CAT):** Hayvansal organizmaların aerobik hücrelerinde; özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğun olarak bulunur. Beyin, kalp, iskelet kasları ise düşük miktarlarda CAT içermektedir. CAT ve GPx, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler. Bu enzimlerin aktiviteleri artmadan SOD'un aktivitesinin artması hidrojen peroksidin birikmesine ve böylece hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur (64):  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

### 2.2.3.2.Enzimatik olmayan antioksidanlar

**a) Alfa tokoferol (Vitamin E):** Hücrelerde bulunan yağda çözünen ana antioksidandır. Doğada yan zincirlerinin doyurulması ve metilasyon bakımından birbirinden farklı  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ -tokoferol ile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ -tokotrienol isminde 8 tip vitamin E bulunmaktadır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Vitamin E, insan vücudu için esansiyel olan bir antioksidan bileşiktir ve bu nedenle dışarıdan alınması gerekmektedir. Tokoferoller, yağlarda, fındıkta, çimlenen tohum ve tahıllarda bulunur. Barsaktan emilimi yağ emilimi ile birliktedir ve yaklaşık

olarak % 40'ı emilmektedir. Emildikten sonra şilomikronlar ile lenfte taşınarak kan dolaşımına ulaştırılır. Yağ dokuda depolanır. Özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarındaki fosfolipitler alfa tokoferole afinite gösterdiği için buralarda yoğunlaşmaktadır. Vitamin E, bir vitaminden daha çok bir antioksidan olarak tarif edilmiştir. Çünkü diğer vitaminler enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak rol alırken vitamin E'nin böyle bir özelliği yoktur (62). Ana fonksiyonu membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesinin önlenmesidir. Lipofilik özelliği nedeniyle hücre membranlarının bilayer yapısı içine girebilmektedir (65,66). Tokoferol-OH, bir H atomu ile serbest radikale bir elektron transfer ederek, hücre membranı proteinleri ile reaksiyon girmesini ya da lipit peroksidasyonunu başlatmasını engeller. Tokoferol-OH serbest radikal ile etkileştiğinde tokoferol-O· radikali meydana gelir. Eğer askorbik asit ortamda yeterli miktarda var ise tokoferol-O· ile askorbat reaksiyona girerek tokoferol-OH ve zayıf bir radikal olan semidehidroaskorbat meydana gelir (39,67). Böylece kuvvetli bir radikal etkisiz hale getirilirken, zayıf bir radikal (dehidroaskorbat) oluşur ve tokoferol-OH tekrar kazanılır. Alfa tokoferol + LOO· → Alfa tokoferol· + LOOH Alfa tokoferol· + LOO· → LOO-alfa tokoferol Alfa-tokoferolün ferrik iyonunu ferröz iyonuna (güçlü bir pro-oksidan) indirgeyebildiği de gösterilmiştir. Ortamda daha fazla alfa-tokoferol olması ile bu oluşan ferröz demir etkisizleştirilebilir (39,68).

**b) Beta-karoten (Vitamin A):** Karotenoidler, sebze ve meyveler renk veren maddelerdir ve vitamin A öncülleri olarak antioksidan etkileri vardır. En önemlileri α-karoten, β-karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantindir. Bunlardan β-karoten, iki molekül vitamin A'nın (retinol) birleşmesinden oluşmuştur. Diyetteki β-karoten ince barsak mukozası tarafından emilirken retinole çevrilmektedir. β-karotenin antioksidan etkisi singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumasıdır. Singlet oksijenden enerji karotenoide aktarılmakta ve geçici bir ara molekül oluşmaktadır. Fotosensitif bir rahatsızlık olan eritropoietik porfiride β- karotenin singlet oksijeni temizlemesi özelliğinden yararlanılmaktadır. β-karoten yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan olarak davranmakta ve proteazları aktive etmektedir. Ayrıca β-karoten diğer ROS'ları da etkisiz hale getirmektedir. Düşük oksijen basıncında β- karoten peroksil radikali ile direk reaksiyona girmekte ve bu durum yüksek oksijen basıncında vitamin E'nin aynı



etkisi ile sinerji oluşturmaktadır (39).  $\beta$ -karoten (CAR) +  $\text{LOO}^\cdot \rightarrow \text{LOO-CAR}^\cdot$   $\text{LOO-CAR}^\cdot + \text{LOO}^\cdot \rightarrow \text{LOO-CAR-OOL}$

**c) Vitamin C (Askorbik asit):** Suda çözünebilir ve turuncgiller, patates, domates ile yeşil yapraklı sebzelerde yer alan antioksidandır. İnsanlar L-glukanolaktan oksidaz enziminin eksikliği nedeniyle d-glikozdan askorbik asidi sentezleyemezler ve bu nedenle gıdaları ile almak zorundadırlar (39). Suda çözünebilir zincir kıran bir antioksidan olması nedeniyle özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında meydana gelen serbest radikalleri ve ROS'ları etkisiz hale getirir (67). Redükte edici (elektron verici) bir ajan olması nedeniyle moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c'yi indirgeyebilir. Bir elektronun verilmesi sonucu askorbat, semidehidroaskorbat (DHA) radikaline çevrilir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek DHA oluşturur. DHA, vitamin C kaynağı olarak kullanılır (40). Askorbik asit +  $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{DHA}$  Hücre dışı sistemlerde askorbatın  $\alpha$ -tokoferole göre daha güçlü bir şekilde LDL oksidasyonu önlediği gösterilmiştir. LDL ile askorbatın birlikte oksidatif koşullarda inkübasyonu, LDL oksidasyonunu engelleyerek LDL partikülündeki endojen antioksidanların korunmasını sağlamıştır (67). Ayrıca vitamin C membrana bağlı Vitamin E'nin rejenerasyonunu da sağlar.  $\alpha$ -tokoferoksil radikali ile reaksiyona girerek, tokoferol meydana getirirken kendisi de dehidroaskorbik aside dönüşür. Hayvanlara vitamin C verilmesi plazma ve doku vitamin E seviyelerini arttırmaktadır. Ayrıca, askorbik asit tek başına pro-oksidan etkilidir ve bakır ile demir tuzları için indirgeyici olarak davranmaktadır. Askorbik asit tarafından  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ 'e dönüştürülmektedir.  $\text{Fe}^{2+}$  böylece hidrojen peroksidin hidroksil radikaline çevrilmesine neden olmaktadır (68).

**d) Glutatyon (GSH):** Vücutta direk olarak sistein, glisin ve glutamattan sentezlenmektedir. GSH redoks döngüsünün bir substratı olarak, hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde yararlıdır. Direk olarak serbest radikalleri temizlemesinin yanısıra; GPx ile birlikte enzimatik olarak da etki gösterir. GSH hücrelerde enzim ve diğer hücre sel bileşenlerin redükte halde tutulmalarını için hayati rol oynar. GSH en çok karaciğerde sentezlenir ve yaklaşık % 40'ı safra ile atılır. Safradaki bu GSH'nın diyetdeki ksanobiyotiklere karşı vücudu koruduğu, barsak lümenindeki lipid peroksidasyonun önlediği ve barsak epitelyumunu oksijen radikallerine karşı savunduğu düşünülmektedir (69).

e) **Koenzim Q10 (CoQ10):** Ubiquinon olarak da bilinir. Tüm yaşayan hücrelerde bulunur ve mitokondriler tarafından enerji üretilmesi için gereklidir. Ayrıca serbest radikallere karşı vücudu korur ve immün direnci artırır (70).

f) **Ürik asit ve Albumin:** Endojen olarak serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan olarak davranır. Vücut sıvılarında yaklaşık olarak 0,5 mmol/L kadar bulunur ve pürin metabolizmasının son ürünü olarak sentezlenir. Ürik asit güçlü şekilde singlet oksijen, peroksil radikali (ROO) ve OH temizleyicisidir. Albuminde meydana gelen hasar, plazmada albuminin çok bol olarak bulunması ve serbest radikallerin diğer antioksidanlar ile de etkisiz hale getirilmesi nedeniyle önemli değildir. (71,72).

### 2.3. ASETİLKOLİN ESTERAZ

Asetilkolin esteraz dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan lipotropik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen nonspesifik bir enzimdir. İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedo marmoneta) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır. Kolinesteraz Asetilkolin'i hidrolize etme yeteneğine sahip nonspesifik bir esterazdır. Özellikle karaciğerde oluşur. Kolinesteraz aktivitesi erkeklerde 0.52 ile 1.39 U/L kadınlarda ise 0.38 ile 1.25 U/L arasında değişir. Normalde erkeklerde kolinesteraz aktivitesi kadınlara oranla daha yüksektir. Serum kolinesterazının artmasına hiperkolinesterazami azalışına ise hipokolinesterazami denir. Bununla beraber tek bir defa kolinesteraz tayini normal değerlerin geniş değişim göstermesinden dolayı yorumlanma sırasında güçlükler neden olur. Doğru bir yorumlama ancak seri halinde tayinlerle mümkündür. Çünkü kolinesteraz spesifik bir enzim değildir. Gerçek kolinesteraz (asetilkolin esteraz) sistematik adıyla EC 3.1.1.7 dir ve eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında, beynin gri cevherinde bulunmuştur. Asetilkolin biyolojik önemi büyük bir esterdir. Sinir hücrelerinin arasında nörotransmitter olarak görev yapması yanı sıra kas hücrelerinin kasılmasının başlamasında ve kas lifleri boyunca elektriksel akımın oluşmasında da görevlidir. Görevini tamamlayan asetilkolin asetilkolin esteraz tarafından kolin ve asetata parçalanır. Kolin presinaptik hücreler tarafından alınarak asetilkolin sentezinde kullanılır (74).

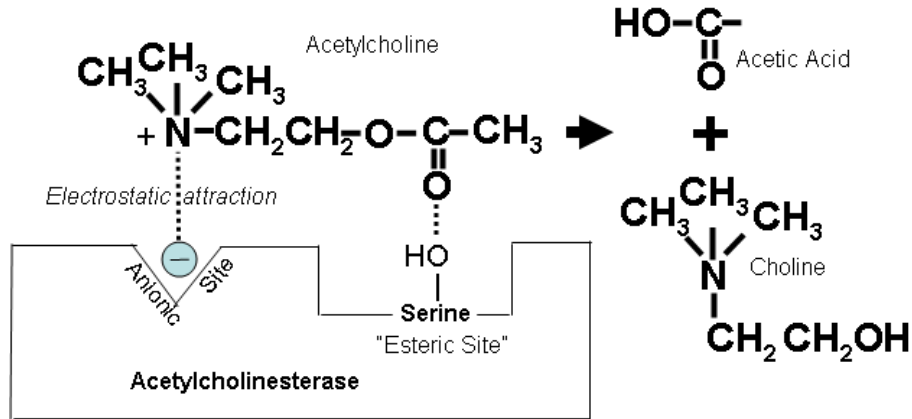
Asetilkolinesteraz molekülü her biri 80 kDa moleküler ağırlıkta ve etkin noktaları ayrı dört alt birimden meydana gelen bir proteindir. AchE eritrosit membranlarında, sinir

dokusu ve iskelet kaslarında bulunur. Eritrosit AchE aktivitesi sinir sistemi AchE fonksiyonu ile paralel seviyededir. Asetilkolinin hidrolizi sonucu sinir veya kasların paralizisi ve lokal reseptörlerin devamlı uyarılması engellenir. AchE ile asetilkolin bağlandığında esteratik alt merkez denenen aktif merkezin ikinci bölgesinde hidrolitik reaksiyonlar meydana gelir. Burada asetilkolinin ester bağları kırılır, asetat ve kolin açığa çıkar. Kolin daha sonra presinaptik membrandaki yüksek affiniteli kolin toplama sistemi tarafından hızla tutulur. Asetat esteratik alt merkezdeki serin rezidüleri ile kovalent bağlanarak AchE'nin geçici asetillenmiş formunu oluşturur. Bu geçici bileşik bir molekül su ile reaksiyona girer ve asetat grubu serbest kalır. Asetilkolinesteraz esterik ve anyonik denenen iki etkin kısma sahiptir. Anyonik kısım negatif yüklüdür ve iki karboksilli bir aminoasitin iyonize karboksil grubundan ibarettir. Asetilkolinin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esterik kısım pozitif yüklü olup iki kısımdan meydana gelir. Bunlardan ilki serinin hidroksil grubudur. İkincisi ise histidin bazik imidazol halkasıdır. Bu kısım serinin hidroksil grubuna hidrojen bağları ile bağlanarak onun etkinliğini artırır. Sık kullanılan organofosfatlı insektisitlerin çoğu fosfor atomuna bağlı olarak ya iki metil ya da iki etil ester grupları taşırlar. Böylece dimetilfosforlanmış ya da dietilfosforlanmış AchE meydana gelecektir. Dimetilfosforlanmış AchE'nin kendiliğinden reaktivasyonu oldukça hızlıdır. Dietilfosforlanmış AchE'de ise bu durum söz konusu değildir (75). Asetilkolinin aşırı birikimi; merkezi sinir sistemi kolinerjik iletimi, somatik sinirler, otonomik gangliyonlar, parasempatik sinir uçları ve yer yer sempatik sinirleri uyarır. Eritrosit membranında bulunan asetilkolin esteraz enziminin eritrositin korunmasında önemli olduğu ve nitrik oksit salınımıyla ilgili olduğu ileri sürülmektedir (76). Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt oluşumunda da rol oynarlar (86). Ayrıca başka bir çalışmada ise eritrosit AchE düzeyindeki ciddi azalma, koma, solunum yetmezliği, hemodinamik dengesizlikler ve ölüm ile ilişkili bulunmuştur (79).

### **Asetilkolinesteraz inhibisyonu**

Organik fosforlu, klorlu, karbomatlı ve diğer bazı kimyasal ya da biyolojik maddeler. Buna örnek olarak sıçan yavrularında emzirme sırasında malation maruziyet beyin, plazma ve eritrosit AchE faaliyetlerinde yüksek bir inhibitör etki uyardığını göstermiştir (78). Organofosforlu bir pestisit olan dimethoate'ın subkronik kullanımında bazı

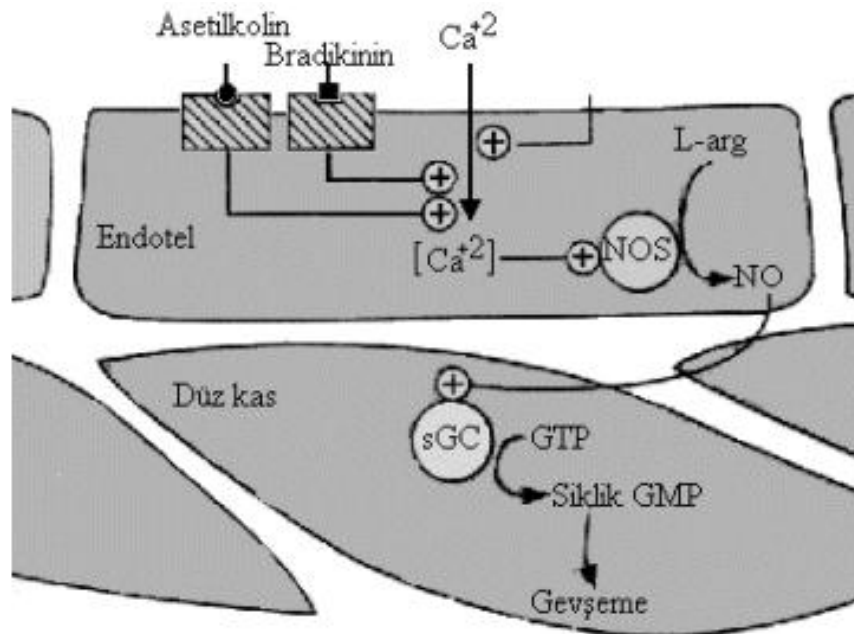
dozlarda, sıçan beyin ve karaciğerinde oksidatif stresi artırıcı etkisi görülmüştür. Bu çalışmada eritrositlerde AchE inhibisyonu görülmüştür. (80).



Şekil 2.3. Asetilkolinesterazın çalışma mekanizması (145)

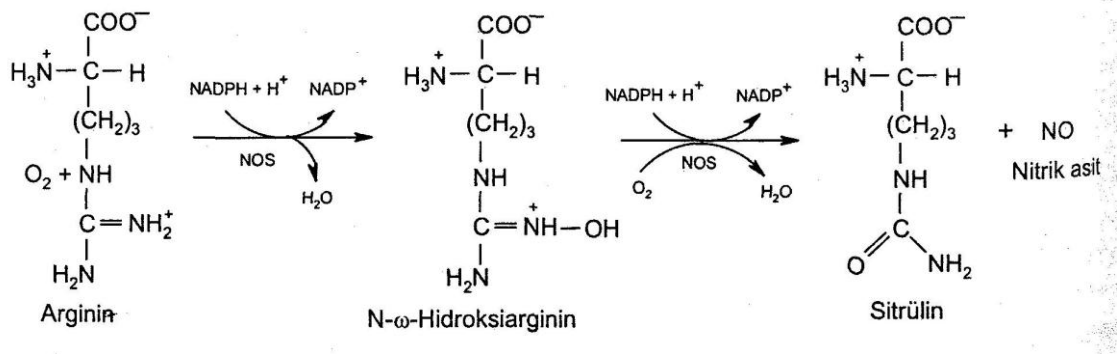
## 2.4. NİTRİK OKSİT

Serbest radikal bir gaz olan nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile L-arginin aminoasitinden sentezlenen nöronal bir mesajcıdır. NO eritrositleri de içine alan pek çok hücrede bulunan, aynı zamanda da oksijen radikali olarak kabul edilen bir moleküldür. NO pek çok reaksiyona katılarak hücre bileşenlerini etkileyebilir (80).



Şekil 2.4. Nitro bileşiklerinin NO'ye dönüşümü (80).

Vazodilatör etkili nitrik oksit (NO), yarılanma ömrü çok kısa olan ve tüm memelilerde var olan biyolojik bir amin, önemli bir haberci moleküldür. Arginin, bir monooksijenaz olan NOS ile sitrüllin ve NO'ya katabolize olur (Şekil 2.4.). NOS kompleks bir enzimdir. Aktivitesi için NADPH, FAD, FMN, hem ve tetrahidrobiopteridine gereksinim duyar (81,82,83). NOS enzimi bağışıklık yanıtı ile sinir ve kalp-damar sistemleri başta olmak üzere damar endotel ve böbrek epitel hücreleri, miyositler, hepatositler, makrofajlar ve nöronlar gibi birçok hücre tipinde bulunmaktadır (82,83).



Şekil 2.5. Argininden NO ve sitrullin oluşumu (84)

NO, Molekül ağırlığı 30 g/mol olup, -151 °C kaynama noktasına sahip, hem yağda hem suda çözünebilme yeteneği sayesinde biyolojik membranlardan çok rahat geçen ve bu sayede çok önemli biyolojik roller üstlenen, çözünür guanilat siklaza bağlanarak onun aktivitesini 400 kat arttırabilen, 3-5 sn kadar kısa yarılanma ömrüne sahip gaz tabiatında bir maddedir. Basit kimyasal yapısına rağmen oldukça farklı ve zıt yönde etkileri mevcuttur (84). Üç tip nitrik oksit sentaz isoformu mevcuttur:

- 1) nNOS: Sinir ve bazı dokularda (akciğer, pankreas, mide ve uterus) bulunan nöronal tip ki bu kalsiyuma bağımlıdır.
- 2) eNOS: Endotel hücrelerde bulunan ve yine kalsiyuma bağımlı olan endotelial tip.
- 3) iNOS: İmmünolojik uyarılarla indüklenen ve kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar,

mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan, kalsiyumdan bağımsız indüklenebilir tip nNOS ve eNOS fizyolojik olayların meydana gelmesinde, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede rol oynamaktadır. Dejenerasyon ve inflamasyon sırasında her iki izoformda upregüle olabilmektedir. iNOS ise immünolojik

savaşta ve nöronal hasar sonrasında etkili olmaktadır. Özellikle travma ve viral enfeksiyon sonrasında ekspresyonu artmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda NO konsantrasyonları 100-500 nM düzeylerinde iken endotoksin,  $\gamma$ -interferon, IL-1, TNF- $\alpha$  gibi ajanlarla iNOS'un tetiklenmesi sonucunda düzeyleri yaklaşık 10 kat artmaktadır (85,86,87).

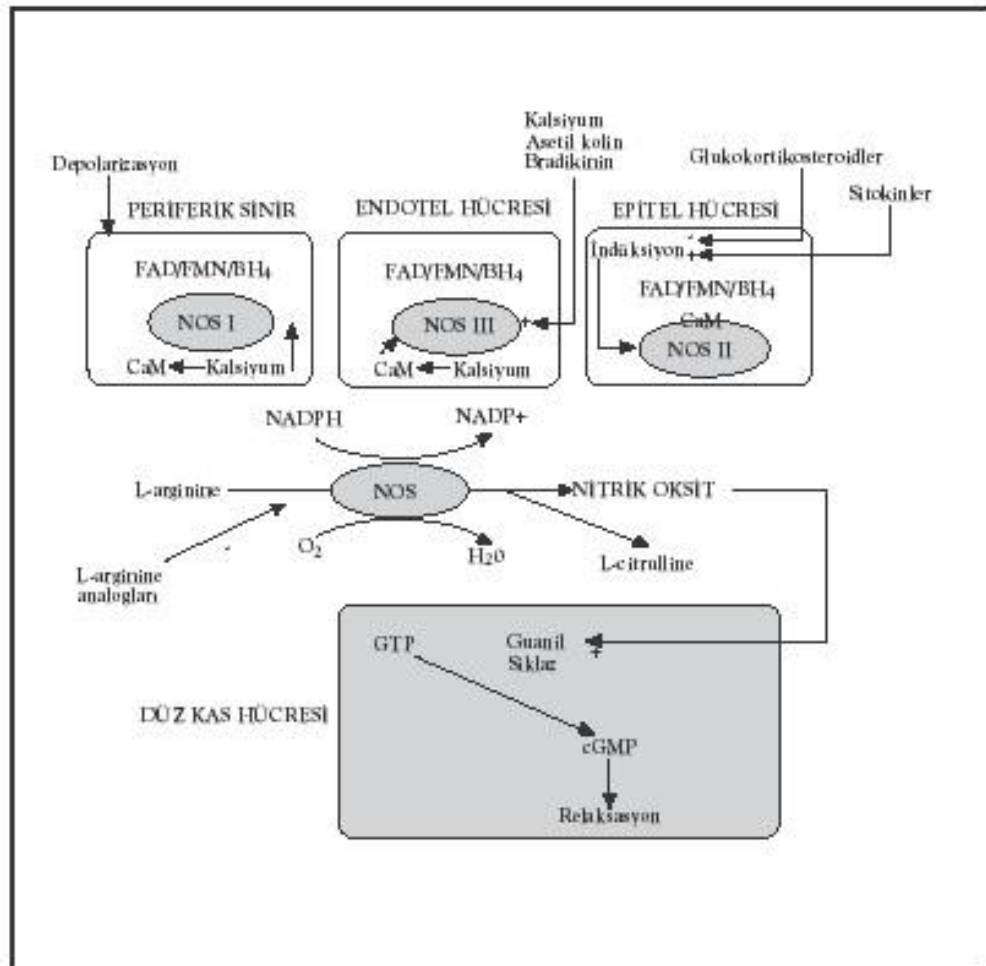
Günümüzde nitrik oksitin vasküler endotelden sürekli olarak salındığı, böylece vasküler tonusun regülasyonunda önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, hem de aşırı üretim durumunda radikal etki gösterdiği vurgulanmaktadır (88).

NO'nin serbest radikal olarak aktivitesi çok yüksektir. Bu nedenle makrofajlarda oksijen ve süperoksit radikali ( $O_2$ ) ile etkileşerek mikroorganizmalar için zehirli olan nitrik oksit hidroksil radikali (OH) oluşturur. NO, hemoglobin ve hem içeren diğer proteinler tarafından inhibe edilir. Ayrıca, NOS'ın kimyasal inhibitörleri NO oluşumunu önemli derece azaltır ve bu yolla vazokonstriksiyona bağlı olarak kan basıncı artar. Ayrıca kardiovasküler sistem üzerine de NO'nin vasodilator edici etkisi vardır. Guanilat siklaz enzimini aktive ederek cGMP oluşumuna yol açtığı, trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve damar genişlemesini sağladığı öne sürülmüştür (82,83).

NO birçok fizyolojik süreçte vasküler sistemin regülasyonunda, nörotransmisyonunda ve çeşitli homeostatik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Diyabet, şok, infarksiyon, nörodejenerasyon, artrit, kronik inflamasyon gibi birçok patolojik durumda NO sentezinin üretimi uyarılmaktadır (90). Birçok fizyolojik süreçte etkin olan NO ve nitrit, nitrat, S-nitrosothiol, nitrosamin, peroksinitrit gibi NO metabolitleri, mitokondrial respirasyon inhibisyonu, gen mutasyonu ile sonuçlanan protein ve DNA hasarı, protein fonksiyon bozuklukları, nekrosis ve apoptosis gibi NO'nin birçok sitotoksik ve genotoksik etkisine aracılık etmekte önemli role sahiptirler. Ayrıca, NO ve NO metabolitlerinin tümör dokusunun metastazında ve hücre gelişiminde inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (90).

NO, ayrıca sinir sisteminde nörotransmitter fonksiyonu görmekte, immün sistemin bir parçası olarak da yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etkisi ile organizmayı korumaktadır (91). Normal eritrosit fizyolojisi üzerine etkili olan endotel hücrelerinde

sentezlenen NO, sadece yakında bulunan düz kas hücrelerini etkilemekle kalmaz aynı zamanda vasküler lümene de diffüze olarak kan hücreleriyle de etkileşir. Ayrıca, insan kırmızı kan hücreleri, nitrik oksit sentazın indüklenebilir (NOS2 ya da iNOS) ve sabit (NOS3 ya da NOS) formlarına sahip oldukları için kendi NO'larını sentezleyebilirler. Eritrositlerin mekanik özellikleri açısından düzenleyici bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Yüksek dozlarda monosodyum glutamatalındığında vazokonstriktör etki ile glutamat reseptörlerinin ya da nörotransmitterlerin agonistik etkisi sonucu endotel hücrelerden nitrik oksit salınımı ile damarlarda vazodilatasyona sebep olduğu bilinmektedir (92).

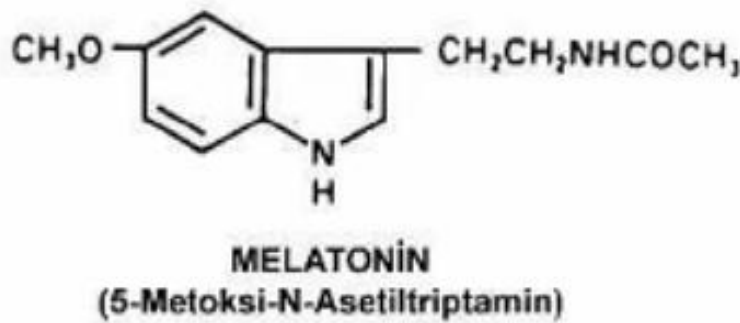


**Şekil 2.6.** Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu: Nitrik oksit sentezleyen enzim (NOS) NADPH, oksijen, flavoproteinler (FAD, FMN), kalmodulin (CaM) ve tetrahydrobiopterinin (BH4) varlığında L-arginini, sitrullin ve NO'ya dönüştürür. NOS I ve III nöronal ve endotel hücrelerde yer alır ve enzim aktivasyonu için intraselüler kalsiyum artışına gereksinim duyar. NOS II kalsiyuma bağımlı değildir. Bütün NOS enzimleri arginin analoglarınca inhibe edilir. Nitrik oksit, guanil siklazı aktive eder ve hücre içinde cGMP düzeyini artırır ve bu, düz kaslarda gevşemeyle sonuçlanır (57).

## 2.5. MELATONİN

### Yapısı ve Özellikleri

Melatonin pineal bez tarafından salgılanan ve ritmi düzenlemekle görevli olan bir hormon olup, 1950'li yılların sonuna doğru varlığı tanımlanmıştır. Pineal bez memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürmektedir. Antioksidan özelliği 1991 yılında ilk kez gösterilen melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda etki gösterebilmektedir (93). Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Pineal bez, yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Descartes tarafından “ruhun tahtı” olarak tanımlanmış, ancak MEL'in varlığı 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından belirlenmiştir. Sığır pineal bez ekstrelerinin, kurbağa deri rengini açtığını gözleyen Lerner, melanin granüllerinin agregasyona uğradığını belirlemiş ve ekstrelerden izole ettiği bu maddeye melatonin adını vermiştir (94,95). İnsanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alan pineal bez (epifiz bezi), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürebilen pineal bez, retinadan alınan görsel uyarılara cevap olarak, başta MEL olmak üzere, birçok hormon salgılayabilir (Şekil 2.8) (94,96).



Şekil 2.7. Melatonin'in kimyasal formülü (119)

### Melatonin Metabolizması

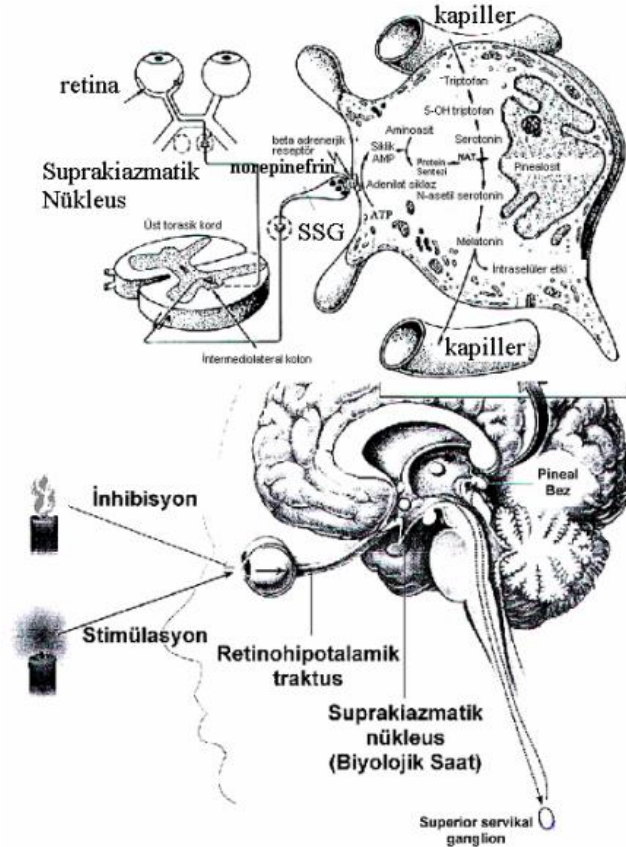
MEL sentezi sirkadiyen ritim gösterir. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkla beraber depolarize olarak, bezde MEL sentezini başlatırlar. Gün batımıyla



fotoreseptör hücrelerden salgılanan norepinefrin, hem triptofanın dolaşımdan beze girişini artırmakta ve hem de b1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, intraselüler cAMP seviyelerini yükseltmektedir (97). Dolaşımdaki triptofanın aktif transportla pinealosit içine alınmasıyla başlayan MEL sentezi, dört ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda tamamlanır: İlk aşamada hidroksilasyon reaksiyonuyla oluşan 5-OH triptofan, dekarboksilasyonla serotonine dönüşmekte ve daha sonra sırasıyla N-asetilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarıyla, serotoninden MEL (5-metoksi-N-asetiltriptamin) oluşmaktadır (99,100). MEL sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) aktivitesi, cAMP etkisiyle yükselmekte ve böylece sentezlenen ve salgılanan MEL miktarı artmaktadır. (Şekil 2.8) (94,96).

Doğumdan itibaren 3 aya kadar çok az olan MEL salınımı, giderek artmakta ve sirkadien doğasını kazanmaktadır. Normal genç erişkinlerde gündüze göre, gece 3-10 kat daha yüksek olan serum MEL konsantrasyonu, 02:00-04:00 saatleri arasında doruk düzeye ulaşmakta ve daha sonra giderek azalmaktadır (96). Yaşlanma ile birlikte MEL sentezinin azaldığı gösterilmiştir (100). Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Otoradyografik çalışmalarla, beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsak, ovaryumlar, kan damarları (94) ve karaciğerde (101), MEL reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. MEL reseptörlerinin sensitivitesi ve ekspresyonu, günlük ışık ritmi ile ilişkilidir (102). Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen MEL için (96), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleride tanımlanmıştır (105). MEL'in inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan MEL, daha sonra sülfat veya glukuronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. MEL'in idrardaki başlıca metaboliti olan 6-sülfatoksi melatonin düzeyleri, MEL'in plazma düzeyleri kadar, sentez ve yıkımı için de iyi bir göstergedir (103). Melatoninin Biyolojik Etkileri MEL'in uyku, sirkadien ritm, duygu durumu, termoregülasyon, immünite, cinsel olgunlaşma ve üreme gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, in vivo ve in vitro çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen MEL'in, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmektedir (94). Melatoninin Antioksidan Etkisi MEL'in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark (87) tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro (96, 105,106) ve in

vivo çalışmalarla desteklenmiştir (107,108). Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, MEL'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir.



Şekil 2.8. Pineal bezde melatonin sentezi ve kontrolü (94, 96)

### Melatoninin antioksidan etkisi:

MEL'in HO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, HOCl, NO, ONOO- gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir (106,109). MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol MEL'e benzer şekilde yıkılsa da, O<sub>2</sub>' varlığında, MEL'in pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır (75). MEL'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir (106). AFMK oluşumuna yol açan diğer bir mekanizma ise, yüksek bir affinite ile OH<sup>•</sup> radikalini bağlayabilen MEL'in, indolil katyon radikalini oluşturması (Şekil 2.9, D) ve bu radikalın de, O<sub>2</sub>'i yakalayarak AFMK'e dönüşmesidir (Şekil 2.9, E). AFMK, daha sonra arilamin

formamidaz (AFA)'ın katalizlediği reaksiyonla N1-asetil-5-metoksikinüramin (AMK)'e çevrilmiştir (47) (Şekil 2.9, F). Diğer taraftan indolil radikal, HO varlığında siklik 3-hidroksimelatonin oluşturmakta ve bu metabolitin idrar düzeyleri, radikal üretiminin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.9, G).

**Tablo 2.2.** Melatoninin bazı biyolojik oluşumlar üzerine etkilerini açıklayan mekanizmalar (94, 96)

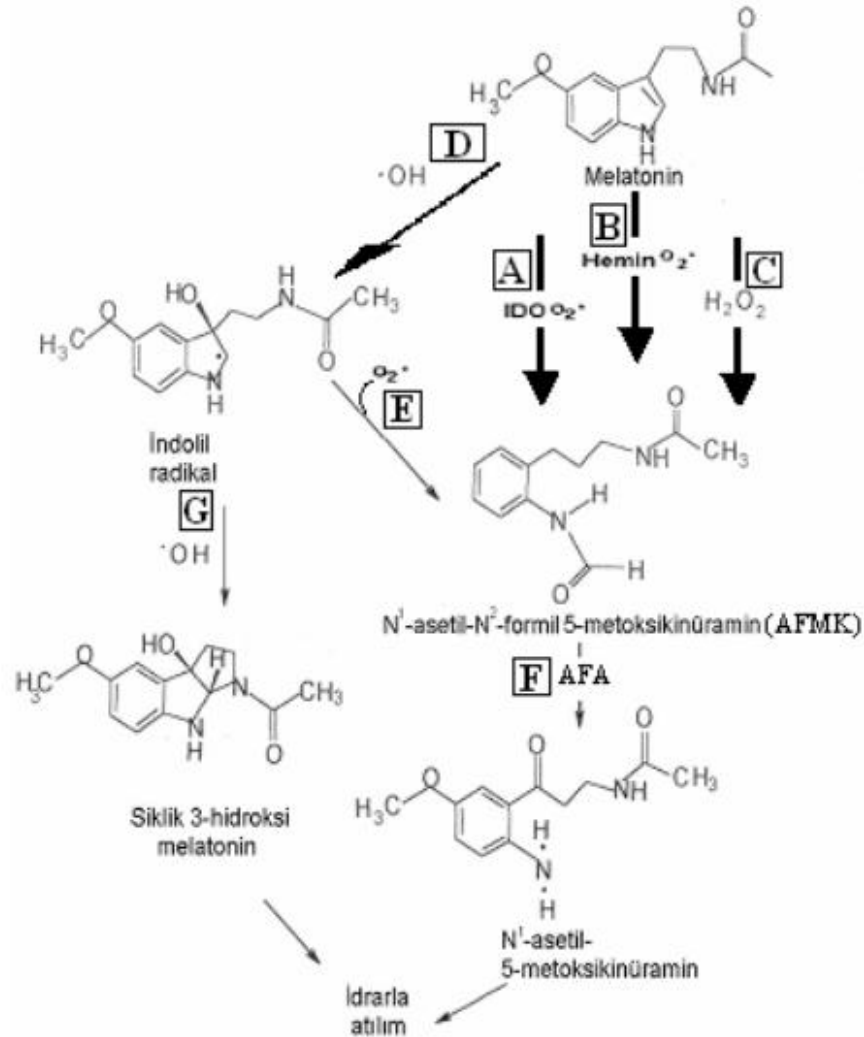
Biyolojik Oluşum	Mel'in Etkisi	Etki Mekanizması	Kaynak
Uyku	Hipnotik etki ve uykuya eğilimin artması (Uykuya dalış hızı ile uyku süre ve kalitesinin artması)	- Hipotermik etki (farmakolojik dozlar-da) - Limbik sistem üzerinde reseptör aracılı etki	Plasebo kontrollü klinik araştırmalar
Sirkadien ritim	- Sirkadien ritimlerin kontrolü - Aydınlık-karanlık siklusunun düzenlenmesi	- Gözlerden ve suprakiazmatik nükleustan gelen nöral uyarılara cevap olarak MEL salınımı - Nöral ve periferik dokularda reseptör aracılı etkiler - Termoregülasyon	Işığın ve aydınlık-karanlık siklusunun MEL salınımına etkisini araştıran çalışmalar
Duygudurum	- Mevsimsel affektif bozukluk ve depresyon gibi siklik duygudurum hastalıkları üzerine düzenleyici etki	-Bilinmiyor (Fakat,tedavide kullanılan tüm antidepresanlar MEL üretimini arttırmaktadır)	MEL salınımı ile ilgili karşılaştırmalı klinik araştırmalar ve duygudurum bozukluklarında fototerapi çalışmaları
İmmünite	- Artmış immün yanıt	- T-helper lenfositler tarafından interleokin yapımının artması - Granülosit ve makrofajlarda,artmış koloni uyarıcı faktörün üretimi ile kemik iliği hücrelerinin apoptozisten korunması	İnsanlarda birkaç kontrolsüz araştırma
Kanser	- Antiproliferatif etkiler	- Direkt antiproliferatif etki (antimitotik aktivite) - İmmünomodülatör etki (immün yanıtın artmasıyla tümör büyümesinin baskılanması) - Antioksidan etki	Hayvanlar ve insanlarda neoplastik hücrelerle ve hücre soylarıyla <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> çalışmalar; birkaç kontrolsüz araştırma
Seksüel olgunlaşma ve üreme	- Antigonadal, anovulatuvar etkiler	- Hipotalamik-hipofizer gonadal eksenin baskılanması (serumda düşük LH ve yüksek prolaktin seviyeleri) - Seks steroidlerinin üretimi üzerine düzenleyici etki	MEL salınımı ile ilgili karşılaştırmalı klinik çalışmalar
Yaşlanma	- Hücre hasarının önlenmesi ve diğer koruyucu etkiler	- Antioksidan etki	Hayvanlarda <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> araştırmalar

Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, MEL'in en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir. Askorbat, alfa-tokoferol ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlarda farklı olarak, MEL yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır (103). MEL'in bu antioksidanlardan daha güçlü olduğu (106), GSH'dan 5 kat ve mannitolden 14 kat daha güçlü bir şekilde OH<sup>•</sup> radikalini yakaladığı (109) in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kıyaslandığında, MEL'in, NO<sup>•</sup> oluşumunu azaltan en güçlü indol olduğu saptanmıştır. İn vitro şartlarda MEL'in doza bağımlı bir şekilde, ONOO<sup>-</sup>'in yol açtığı oksidasyonu önlediği ve ayrıca kendisi nitrasyona uğrayarak ONOO<sup>-</sup>'i detoksifiye ettiği; in vivo enflamasyon modelinde de nitrotirozin oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (106,109).

#### **Antioksidan Enzim Aracılı Etki:**

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (109, 110). Ratlara, akut/kronik uygulanan MEL'in beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu yolla oksidatif hasara karşı beyin dokusunu koruduğu (111); ayrıca anne rata verilen MEL'in plasentadan geçebildiği ve fetus beyinde SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (112). Gündüze göre, gece öldürülen ratlarda beyin GSH-Px aktivitesinin daha yüksek bulunması, MEL'in fizyolojik antioksidan etkisine bağlanmaktadır. Hayvan modeli çalışmalarında, farmakolojik dozda uygulanan MEL ile akciğer, barsak, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, pineal bez ve eritrosit GSH-Px aktiviteleri, %22 ila %138 oranında artmaktadır. Ratlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu GSH-Px aktivitesinin, MEL uygulandıktan 3 saat sonra arttığı gözlenmiştir (93). Nöral GSH-Px aktivitesinin, MEL'e benzer şekilde, gündüz düşük; gece yüksek olduğu bulunmuştur (113). Pinealektomi yapılan ratların karaciğer, akciğer ve beyin GSH-Px aktivitelerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (96). GSH havuzunu koruyan GSSG-Rd aktivesinin sürekli karanlığa maruz bırakılan kuşların beyinde daha yüksek olduğu ve ekzojen MEL ile de deney hayvanlarında aktivitenin yükseldiği bildirilmiştir (114). MEL uygulanan ratların, karaciğer GSSG-Rd aktivitesinin yaklaşık 2 kat arttığı belirlenmiştir

(115) MEL tarafından g-glutamilsistein sentetazın uyarılmasıyla, insan endotel hücrelerinde total GSH içeriğinin yükseldiği öne sürülmektedir (116).

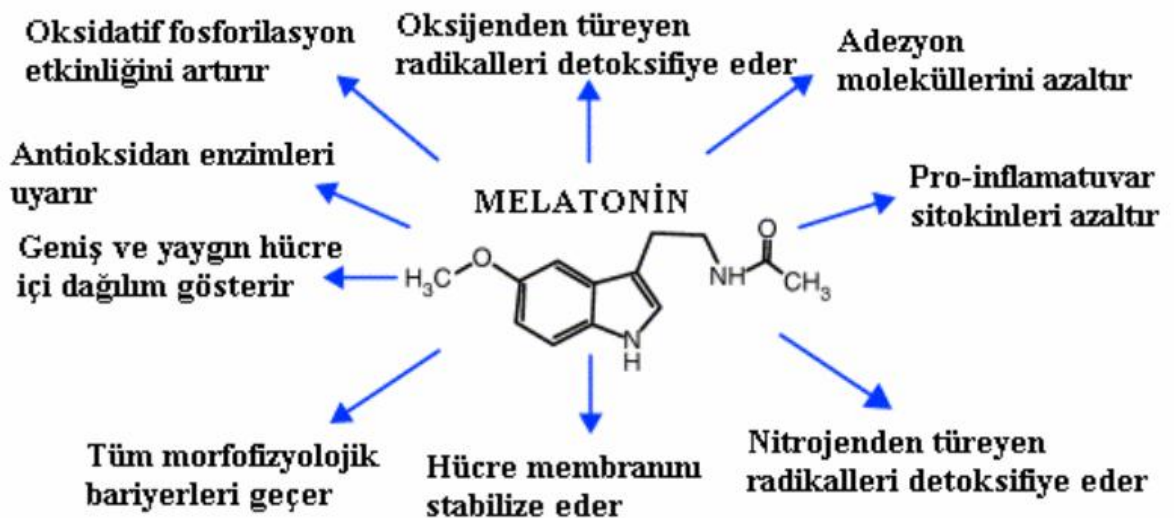


Şekil 2.9. Melatoninin Serbest Radikallerle Etkileşimi (119).

### Prooksidan Enzim Aracılı Etki:

MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (109, 110). In vitro ve in vivo şartlarda, NO ve daha ileri aşamada ONOO- oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (117). Beyin iskemi/reperfüzyon modelinde de, NOS inhibisyonuna yol açan MEL'in düzeltici etkilerinin olabileceği öne sürülmektedir (118). MEL'in bu

antioksidan etkilerini destekleyecek şekilde; oksidatif doku hasarına yol açan kainik asit (107), L-sistein (101), sisplatin (119), adriyamisin (120), alloksan (121), streptozotisin (122), sentetik seks steroidleri (115,123,124) ve siklosporin A (125,126) gibi toksinlerle indüklenen oksidatif stresin MEL ile önlenildiği, in vivo çalışmalarla da gösterilmiştir. Bunların dışında MEL hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen MEL için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, MEL'in tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan MEL, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan  $O_2$ ,  $H_2O_2$  ve HO gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL'e bir üstünlük sağlamaktadır (96). Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, MEL'in toksik bir etki göstermemesidir (95). MEL'in antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (Şekil 2.9.) (127).



Şekil 2.10. Melatoninin antioksidan özellikleri (127).

## 2.6. ERİTROSİTLER

Eritrositler kanın şekilli elemanlarının büyük bölümünü oluşturur. Birleşimlerindeki hemoglobinle kanın kırmızı rengini verirler. Taze frotilerde tek tek görüldüklerinde yesile benzer sarı renk alırlar. Giemsa gibi eosin ve orange boyalarla boyanırlarsa pembe kırmızı renk alırlar. Etkin hareketleri yoktur, kan dolaşımıyla pasif hareket ederler. Yumuşak ve esnek olduklarından sıkıştırılabilirler ve çaplarından çok daha dar yerlerden rahatlıkla geçebilirler (128, 129). Eritrositlerin görevleri öncelikle dokularda oluşan CO<sub>2</sub>'yi akciğerlere taşımak ve akciğerlerden O<sub>2</sub>'yi dokulara taşımaktır. Ayrıca kanın alkalik reaksiyonun değişmezliğini sağlamaktır. Bu görevlerini bünyelerinde bulunan hemoglobin ve fosfatlar yardımıyla gerçekleştirirler. Eritrositler yüzeylerinde bulunan antijenlerle kan gruplarının belirlenmesini de sağlarlar (130). Alyuvarlar çekirdeksiz ve yuvarlak görünümündedirler ortalarından bastırılmış yapılar vardır. Bu bikonkav yapıları ve esnek zarlarının yardımıyla gaz taşınmasına çok elverişlidirler (128). Eritrositler daha çok kırmızı kemik iliğinde yapılırlar. Ancak fetal hayatta ilk olarak karaciğerde, dalakta ve diğer lenfoit organlarda kan yapımı baslar; doğum yaklaştıkça bu görevi kırmızı kemik iliği alır. Tüm kan hücrelerinin asıl kökeni retiküler bağ dokudaki başkalaşıma uğramamış ilkel retikulum hücreleridir. Memeli alyuvarlarının ömrü 100-135 gündür. Alyuvarlar 50 dereceye kadar ısıtıldıklarında ölürler (131). Dolaşımdaki eritrosit sayısı dalgalanma göstermez. Ancak kanama, anemi ya da dokulara giden oksijen azaldığında eritropoetik faktör çok miktarda kana salınarak karaciğerde eritropoetin yapılmasını sağlar ve alyuvar oluşumunu hızlandırır (130). Ömürleri dolan eritrositler dalak ve karaciğerde yıkıma uğrarlar. İnsanlarda ortalama eritrosit sayısı bir milimetreküp kanda 4-6 milyondur. Sıçanlarda ise ortalama 5,5-10 milyondur (132). Eritrositlerde anaerobik glikoliz sırasında 2 önemli bileşik oluşur ATP ve 2,3-DPG. ATP, membranın iki yanında K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> geçisini düzenliyerek eritrositin biçimini korumada rol oynar. ATP azalınca eritrosit içine Na<sup>+</sup> ve suyun girmesiyle hücre küresel biçim alır. Eritrosit membranının özelliği esnek oluşu ve deforme olabilmesidir. Bu durum ATP ile kontrol edilir. ATP azalırsa esneklik kaybolur. Hücre zarı yırtılır hale gelir (133).

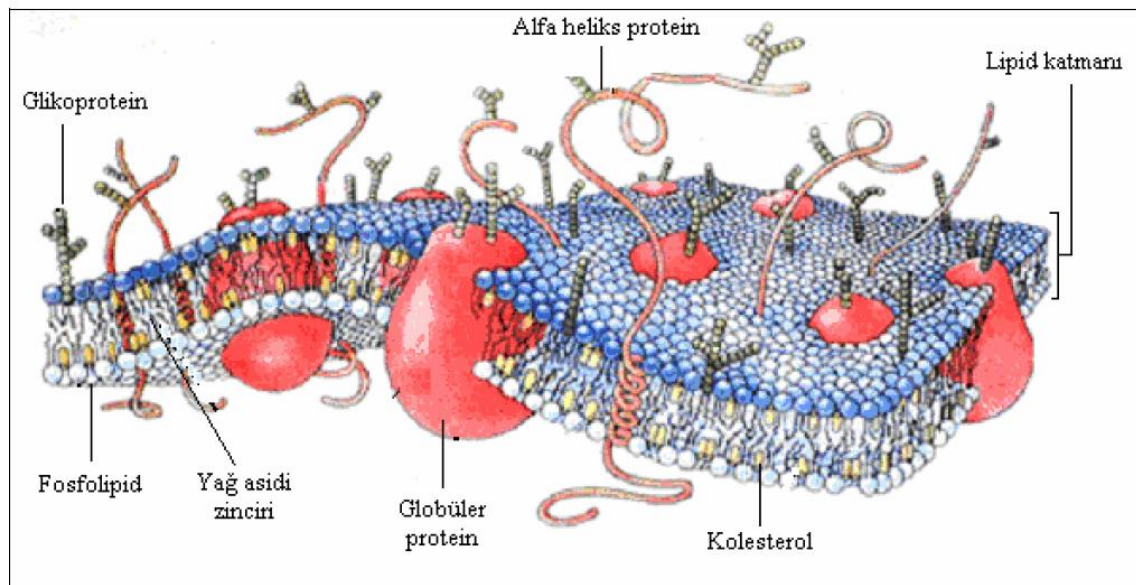
### **Eritrosit Membranı ve Yapısı**

Eritrosit membranı protein, lipid ve karbonhidratlardan oluşur. Özellikle fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan lipidler membranın yarısını oluşturur (134). Fosfolipidler

lipid katmanı içerisine asimetrik bir şekilde dağılmışlardır. Lipid katmanının dış kısmı sfingomyelin, glikolipid ve fosfatidilkolin içerirken, sitoplazmaya bakan iç kısmı ise fosfatidilinositol, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin gibi lipidlerden oluşmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı sıvılarla temas edecek şekilde çift tabakalı olarak dizilmiş olan bu lipid yapısı sayesinde hücre içeriği dış ortamdan korunabilmektedir.

Kolesterol ise membranın esnekliğinin ve kararlılığının devam ettirilmesinde görev yapmaktadır (135).

Bu lipid yapısı dışında eritrosit membranında 12 major ve yüzlerce minor protein bulunmaktadır. Proteinler membranın dış yüzeyine gevşek olarak yapışmış halde (periferik proteinler) ve lipid tabakanın içinde boylu boyunca gömülü (integral proteinler) haldedirler. İntegral proteinler, özellikle eriyik haldeki maddelerin hücre içi ile dışı arasındaki iletimini sağlar. Bunlar içinde en önemlileri spektrin, aktin, ankirin, band-3, glikoforin-A ve glikoforin-B proteinleridir. Hücre membranı ayrıca içerden hücre iskeleti olarak adlandırılan ve proteinlerden oluşan ağ şeklinde bir yapı ile güçlendirilmiştir (136). Hücre iskelet proteinleri membran proteinlerinin % 50-60' lık kısmını oluşturmaktadır (134). Eritrosit membranının yapısı Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.11.** Eritrosit membranının yapısı (137)

Spektrin, kırmızı hücre zarı sito-iskelet bileşeni olup alfa ve beta izoform yapılarında bulunabilmektedir. Birbirlerine gevşekçe sarılı olan bu iki heliks biçimindeki yapılar her



iki uçta birleşerek bir tetramer oluştururlar. Oluşan bu spektrin tetramerleri ise membrana ankirin proteinleri ile bağlıdır (138).

Ankirin de band 3 adı verilen bir membran proteinine bağlıdır. Band 4.2 adı verilen proteinin ise ankirin ile band 3 proteini arasındaki bağlantıyı sağlamlaştırdığı dūřunılmaktadır (135).

### **Eritrosit Membranının Fonksiyonları**

Eritrosit membranının kolay elde edilebilirliği, onun, üzerinde en çok çalışma yapılan biyolojik membran olmasına neden olmuştur. Eritrosit membranının birçok gōrevi vardır: Klorūr/bikarbonat değişimi esnasında pH'ın sabit dūzeyde tutulması, organik fosfatlar ve indirgenler gibi hayati önem taşıyan bileşiklerin korunması ve çeşitli metabolik artıkların organizma dışına atılması gibi birçok hayati önem taşıyan fonksiyonları yerine getirir (138). Ayrıca glikolitik enzimleri inaktive ederek eritrosit metabolizmasının dūzenlenmesi sağlar. Eritrosit membranının dış yūzünün kaygan olması kırmızı kan hūcrelerinin endotel hūcrelerine yapışmasına engel olmaktadır (138).

Eritrosit membranı, hūcreye esneklik ve dayanıklılık özellięi kazandırarak dōngūsel stres esnasında hūcrenin bütūnlūęünün korunmasına imkan verir. Ayrıca hemoglobinin sentezi için hūcre içine demir alınmasını saęlar (138).

### **Eritrositlerden NO ve NO Biyoaktivitesine Sahip Molekūllerin Salınımı**

Eritrosit ve NO iliřkisini arařtıran ilk çalıřmalar eritrositlerde bulunan hemoglobinin 'NO tūketici' etkisi üzerinde durmuřtur (139). Bu nedenle eritrositlerin damar dūz kas tonūsünün belirlemesindeki tek temel fonksiyonlarının plazma içindeki NO seviyelerinin azaltılması yōnūnde olduęu dūřunūlmūřtur. Eritrositlerin NO tūketici etkileri kan akımıyla ve hemoglobinin lokalizasyonuyla yakından iliřkilidir. Kan akımında meydana gelen artıř NO tūketici etkiyi azaltırken (140). hemoglobinin plazmada serbest halde olması bu etkiyi 600 kat arttırmaktadır (139). Ayrıca parsiyel oksijen basıncı da hemoglobinin NO'ya afinitesini etkilemektedir. Yūksek oksijen parsiyel basınçlarında hemoglobinin NO'ya afinitesi artarken, parsiyel oksijen basıncının dūřmesiyle bu afinite azalmaktadır (141).

Bütün bunların yanında son yıllarda yapılan çalışmalar eritrositlerin NO biyoaktivitesindeki rollerinin sadece NO tüketimi değil; bunun yanında plazmaya NO salınımını gerçekleştirmek de olduğunu göstermiştir. Bugün eritrositler tarafından plazmaya NO salınmasına ilişkin 3 farklı mekanizmadan bahsetmek mümkündür:

**A.** Eritrositler endotel hücreleri tarafından üretilen NO'yu hemoglobine bağlı olarak S-nitrosohemoglobin halinde taşıyıp hipoksik koşullarda plazmaya salarlar (142)

**B.** Eritrositler plazmada bulunan nitriti hipoksik koşullarda NO'ya çevirirler (143)

**C.** Eritrositler eNOS enziminin aktivasyonu ile NO üretirler (144)

### **Membran Lipit Peroksidasyon**

Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin en önemli etkilerindendir. Lipid peroksidasyonu kuvvetli yükseltgeyici bir radikalın etkisiyle başlayan ve membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımıyla sonuçlanan 23 kimyasal bir olaydır. Lipid peroksidasyonu lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan malonildialdehit ve hidroksinonenal, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluştururlar (146,147).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemler olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz ve sitokrom oksidazdır (148,149).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya deneysel klinik araştırma merkezinde yetiştirilen ağırlıkları ortalama  $220\pm 40$  gr olan 5-6 aylık erkek Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Her bir grupta 10 sıçan olmak üzere 6 deney grubu oluşturulmuştur. Çalışma boyunca sıçanlara uygulanan enjeksiyonlar intraperitoneal (ip) ve gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Hematolojik parametreler, biyokimyasal parametreler Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi merkez laboratuvarında ölçülmüştür. Eritrosit reolojisi ile ilgili parametreler olan eritrosit agregasyonu, eritrosit hemoliz oranları ölçümleri Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11.09.2013.tarih ve 13/116. numaralı karar ile etik açıdan uygun bulunarak onaylanmıştır.

#### 3.1.DENEY GRUPLARI VE PROTOKOL

**Kontrol Grubu:** 14 gün boyunca ratlara 1 ml/kg Serum Fizyolojik oral gavaj yolu ile uygulanan grup.

**MSG4 Grubu:** 14 gün boyunca Monosodyum Glutamat 4 mg/kg oral gavaj yolu ile uygulanan grup.

**MSG8 Grubu:** 14 gün boyunca Monosodyum Glutamat 8 mg/kg oral gavaj yolu ile uygulanan grup.

**MLT Grubu:** 14 gün boyunca 10 mg/kg intraperitoneal yol ile uygulanan grup.

**MSG4+MLT:** 14 gün boyunca 4 mg/kg MSG+10 mg/kg Melatonin, Monosodyum Glutamat oral gavaj yolu ile Melatonin İntraperitoneal yol ile uygulanan grup.

**MSG8+MLT:** 14 gün boyunca 8 mg/kg MSG+10 mg/kg Melatonin, Monosodyum Glutamat oral gavaj yolu ile Melatonin İntraperitoneal yol ile uygulanan grup.

### **3.2.KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI**

Sıçanlar, enjeksiyonların ve oral uygulamanın bitiminden 1 gün sonra anestezi altında uyutularak her bir sıçanın kalbinden 8-9 ml kan enjektörlere alınmıştır. Enjektöre alınan kan, hematolojik parametreler ve eritrosit fragilitesi için kullanılmıştır. Eritrosit agregasyonu ve gibi reolojik parametrelerin ölçümünde ve hematolojik parametreler ölçümünde tam kan kullanılmıştır. Biyokimyasal parametreler (ACHE, NO ve MDA) için ayrılan kan 3000 devirde 5 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Elde edilen plazma örneği -20°C’de saklanmıştır. Kan alma işlemlerinden sonra karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Doku örnekleri hassas terazide tartılıp 0.15 M KCl çözeltisi (%10, w/v) ile teflon cam homojenizatörü içerisinde iyice ezilip homojenize edildi. Hazırlanan doku homojenatı -20°C’de derin dondurucuda analiz yapılincaya kadar saklandı. Anestezi altındaki hayvanlarkalplerine potasyum klorür (KCl) enjekte edilerek öldürülmüşlerdir.

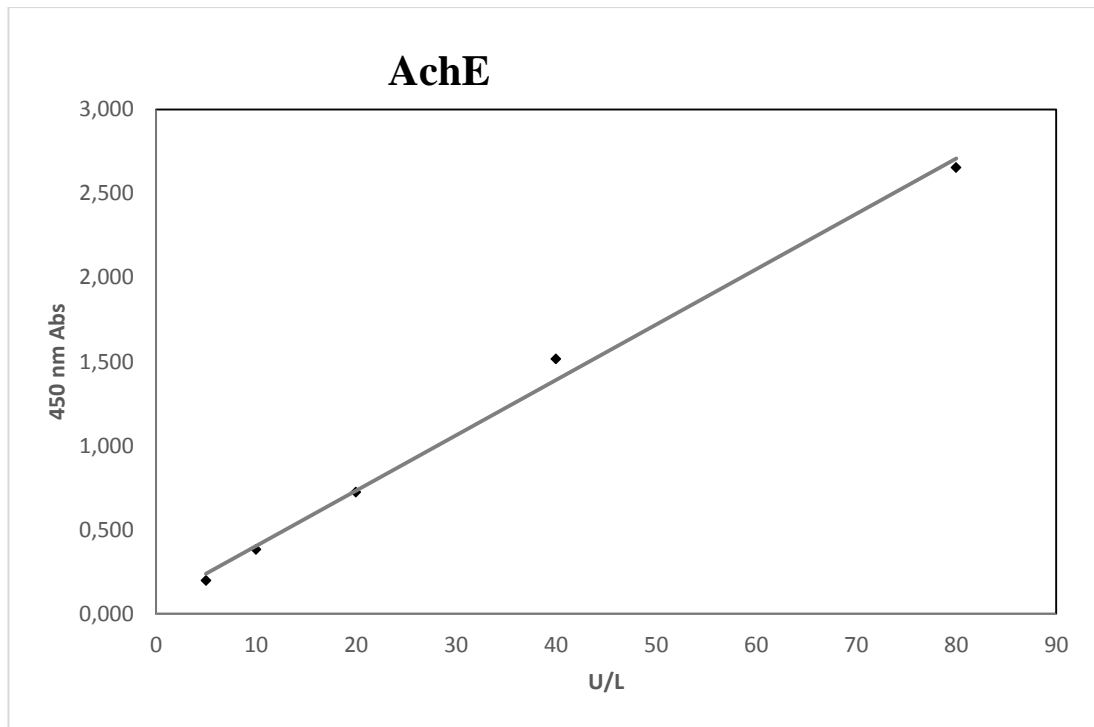
### **3.3.HEMATOLOJİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜLMESİ**

Hematolojik parametreler olarak eritrosit sayısı, hemoglobin, hemotokrit, ortalama eritrosit volüm değeri (MCV), (MCHC), Ortalama eritrosit hemoglobin değeri (MCH), otomatik olarak elektronik hematoloji analizöründe (Seimens Advia 2120İ) ölçülerek değerlendirilmiştir.

### **3.4. ASETİLKOLİNESTERAZ ÖLÇÜMÜ**

Asetilkolinesteraz ölçümü için Rat AchE Elisa kiti (Eastbiopharm CK-E10986) kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi. 8 adet standart; kitin içersinden çıkan 160 U/L lik stok standartın seri dilüsyonu ile elde edildi. Antikor ile kaplı mikropalak kuyucuklarına hazırlanan standartlardan 50 ‘şer µl eklendi. Ardından standartların üzerlerine 50 µl Streptavidin-HRP konuldu. Standartlar mikropalağa pipetlendikten sonra sırasıyla Eritrosit ve karaciğer doku örnekleri, her bir kuyucuğa 40 µl olacak şekilde pipetlendi. Eritrosit ve doku örneklerinin üzerlerine sırasıyla 40 µl MIF-Antibody ve 10 µl Streptavidin-HRP konuldu. Mikropalağın üzeri

kapatılarak 37 C° de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Kit içerisinde bulunan 30X lik yıkama solusyonu hazırlandıktan sonra, plak manuel olarak 350 µl de 5 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara sırasıyla 50 ‘ser µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B pipetlendi.10 dakika 37 C° de ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikroplak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbansda (PERKIN ELMER 1420 VICTOR 3) okundu.

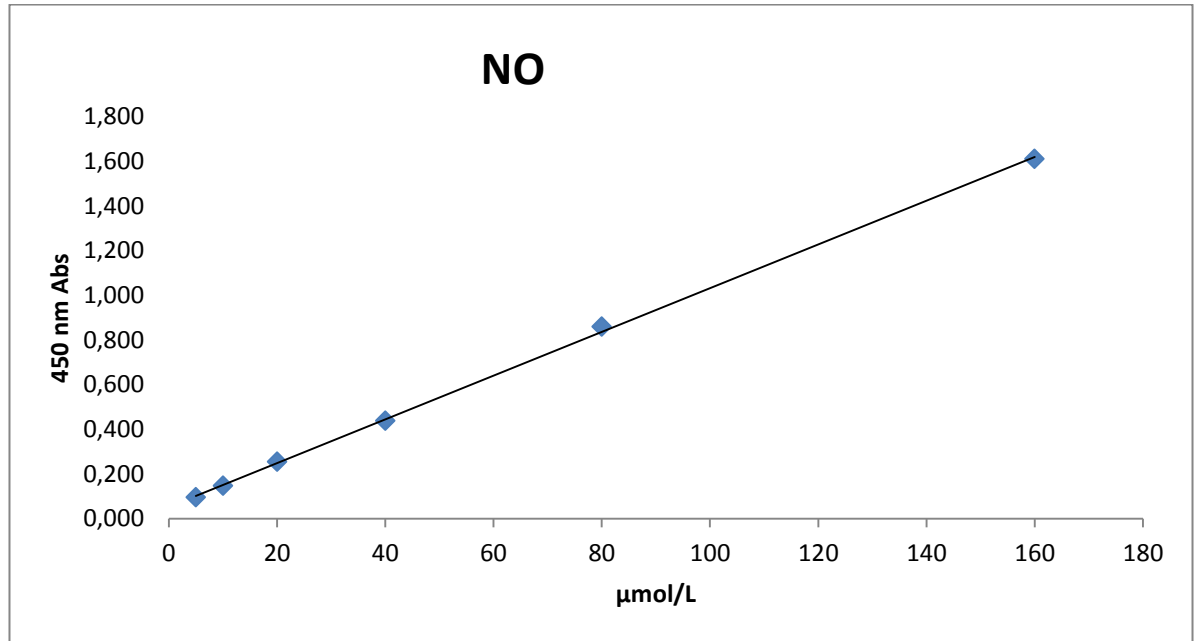


Şekil 3.1. Asetilkolin esteraz standart eğrisi

### 3.5. NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ

Nitrik oksit ölçümü için Rat NO Elisa kiti (Eastbiopharm CK-E10868) kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi. 8 adet standart; kitin içersinden çıkan 640 umol/L lik stok standartın seri dilüsyonu ile elde edildi. Antikor ile kaplı mikroplak kuyucuklarına hazırlanan standartlardan 50 ‘ser µl eklendi. Ardından standartların üzerlerine 50 µl Streptavidin-HRP konuldu. Standartlar mikroplağa pipetlendikten sonra sırasıyla plazma ve karaciğer doku örnekleri, her bir kuyucuğa 40 µl olacak şekilde pipetlendi. Plazma ve doku örneklerinin üzerlerine sırasıyla 40 µl MIF-Antibody ve 10 µl Streptavidin-HRP konuldu. Mikroplağın üzeri kapatılarak 37 C° de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Kit içerisinde bulunan 30X lik yıkama solusyonu hazırlandıktan sonra, plak manuel olarak 350 µl de 5 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara

sırasıyla 50' şer µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B pipetlendi. 10 dakika 37 C° de ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikroplak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbandsda (PERKIN ELMER 1420 VICTOR 3) okundu.

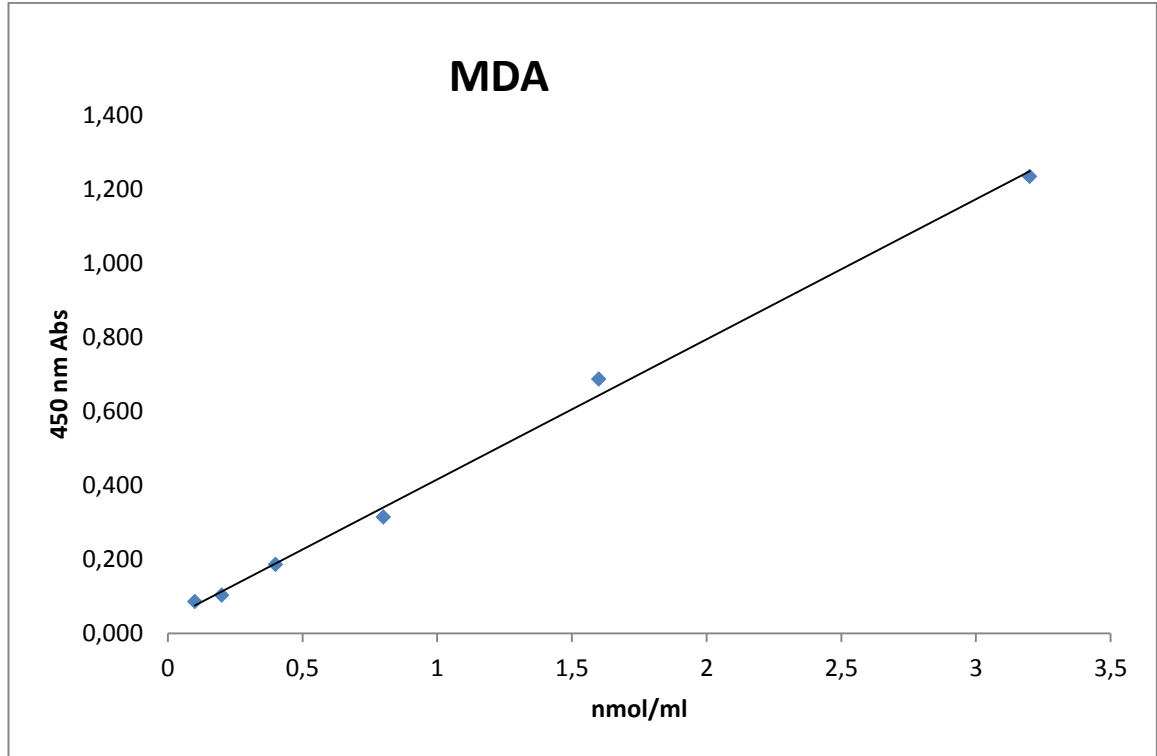


Şekil 3.2. Nitrik Oksit standart eğrisi

### 3.6. MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜ

Malondialdehit ölçümü için Rat MDA Elisa kiti (Eastbiopharm CK-E30266) kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi. 8 adet standart; kitin içersinden çıkan 12,8 nmol/ml lik stok standartın seri dilüsyonu ile elde edildi. Antikor ile kaplı mikroplak kuyucuklarına hazırlanan standartlardan 50 'ser µl eklendi. Ardından standartların üzerlerine 50 µl Streptavidin-HRP konuldu. Standartlar mikroplağa pipetlendikten sonra sırasıyla plazma ve karaciğer doku örnekleri, her bir kuyucuğa 40 µl olacak şekilde pipetlendi. Plazma ve doku örneklerinin üzerlerine sırasıyla 40 µl MIF-Antibody ve 10 µl Streptavidin-HRP konuldu. Mikroplağın üzeri kapatılarak 37 C° de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Kit içerisinde bulunan 30X lik yıkama solusyonu hazırlandıktan sonra, plak manuel olarak 350 µl de 5 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara sırasıyla 50 'ser µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B pipetlendi. 10 dakika 37 C° de ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Tüm

kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikroplak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbandsda (PERKIN ELMER 1420 VICTOR 3) okundu.



**Şekil 3.3.** Malondialdehit standart eğrisi

### 3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 16.0 programı kullanılmıştır. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılıma uygun olduğu saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Tukey HDS testi kullanılmıştır. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

**Tablo 4.1.** Deney Hayvanlarının ağırlık değişimleri

	<b>Deney Öncesi</b> (1. gün)	<b>Deney Sonrası</b> (14. gün)	<b>P</b>
<b>KONTROL</b>	221.200±19.899	221.100±19.627	0.989
<b>MSG4</b>	225.400±18.026	21.,900±13,186	0.231
<b>MSG8</b>	224.600±15,204	216.500±20.194	0.158
<b>MLT</b>	210.200±16.772	222.700±13.475	0.077
<b>MSG4+MLT</b>	231.200±14.030	175.400±94.288	0.115
<b>MSG8+MLT</b>	224.100±15.118	204.400±57.468	0.113

*T testi* \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$

Deney gruplarına 14 gün; 4 mg/kg ve 8 mg/kg monosodyum glutamat, 10 ml/kg melatonin ve 4-8 mg/kg monosodyum glutamat+10 ml/kg melatonin uygulanmıştır. Yapılan ilk ve son tartımlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.1).



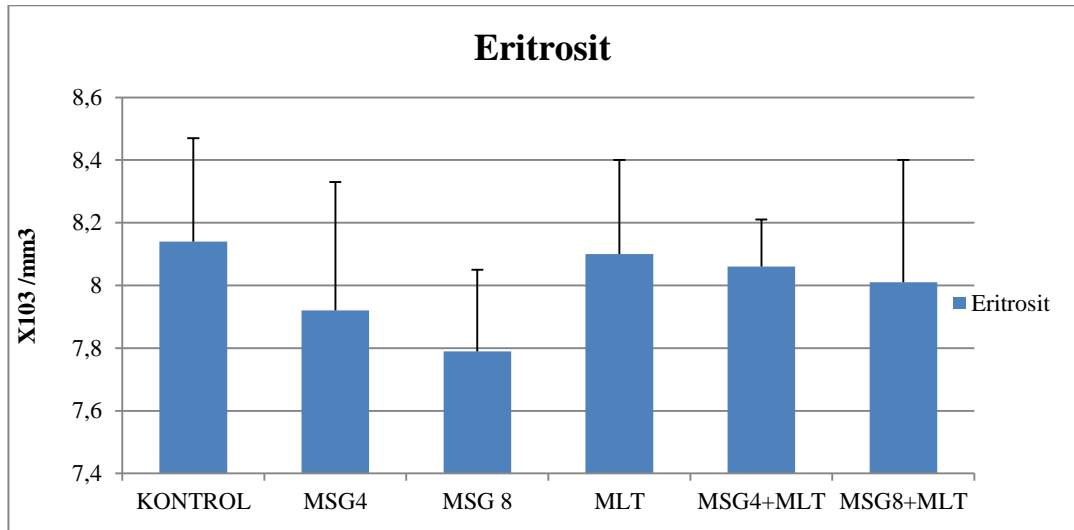
**Tablo 4.2.** Hematolojik parametrelerdeki değişiklikler(ort±ss)

	<b>Kontrol n = 10</b>	<b>MSG 4 n = 10</b>	<b>MSG 8 n = 10</b>	<b>MLT n = 10</b>	<b>MSG4+MLT n = 10</b>	<b>MSG8+MLT n = 10</b>	<b>P</b>
<b>Eritrosit (X106/mm3)</b>	8.14±0.33 <sup>a</sup>	7.92±0.41 <sup>a</sup>	7.79±0.26 <sup>a</sup>	8.10±0.30 <sup>a</sup>	8.06±0.15 <sup>a</sup>	8.01±0.39 <sup>a</sup>	0.097
<b>Hematokrit (%)</b>	44.94±1.49 <sup>ab</sup>	45.68±1.82 <sup>ab</sup>	45.73±0.73 <sup>ab</sup>	43.05±1.23 <sup>bc</sup>	46.44±0.70 <sup>a</sup>	43.98±2.71 <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
<b>MCV (fl)</b>	55.23±0.96 <sup>b</sup>	57.72±1.25 <sup>a</sup>	57.47±1.88 <sup>a</sup>	56.60±2.28 <sup>ab</sup>	56.48±0.57 <sup>ab</sup>	55.22±0.80 <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
<b>MCH (pg)</b>	18.37±0.47 <sup>a</sup>	18.26±0.32 <sup>a</sup>	18.01±0.34 <sup>a</sup>	18.16±0.42 <sup>a</sup>	18.28±0.45 <sup>a</sup>	18.17±0.63 <sup>a</sup>	0.435
<b>MCHC (gr/dl)</b>	33.17±0.69 <sup>a</sup>	31.62±0.42 <sup>c</sup>	31.60±0.64 <sup>c</sup>	32.16±0.94 <sup>bc</sup>	32.18±0.37 <sup>b</sup>	32.14±0.25 <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
<b>HGB (%/gr)</b>	14.84±0.28 <sup>ab</sup>	14.43±0.71 <sup>b</sup>	14.06±0.34 <sup>a</sup>	14.63±0.31 <sup>c</sup>	14.72±0.14 <sup>bc</sup>	14.75±0.40 <sup>bc</sup>	<b>0.001*</b>

Oneway ANOVA Test \*P < 0.01, Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Aynı harfler gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığını göstermektedir.

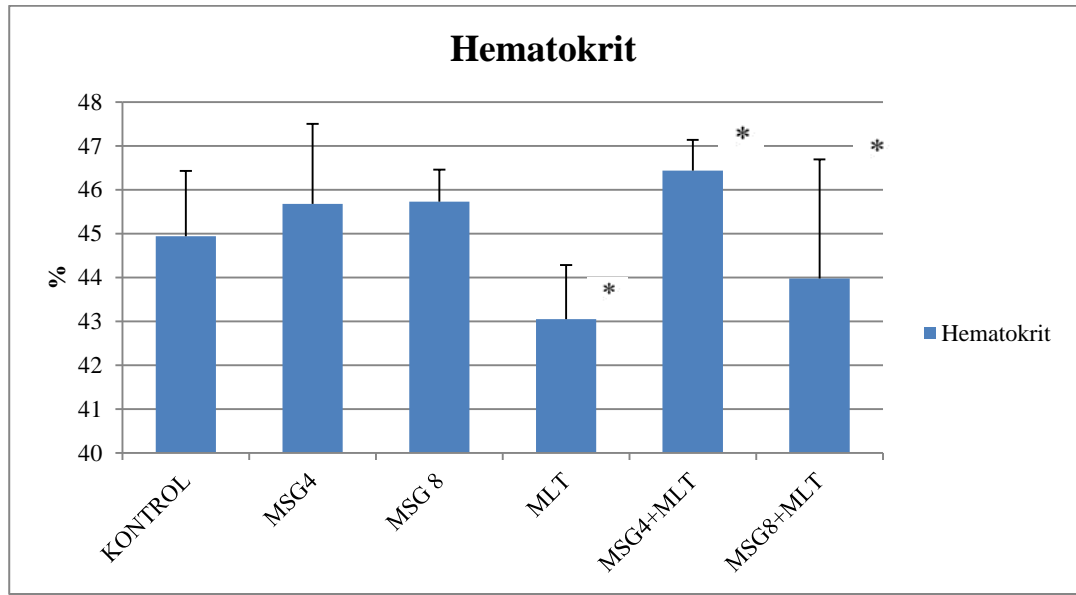
Tüm gruplardan alınan kan örneklerindeki hematolojik parametreler (eritrosit, hematokrit değerleri, hemoglobin miktarları, MCV, MCH, MCHC değerleri.) Tablo 4.1 de verilmiştir. Eritrosit sayıları azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Hematokrit değerleri monosodyum glutamat verilen gruplarda yükselmiş, melatonin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. MCV değerleri monosodyum glutamat uygulanan gruplarda anlamlı derecede artmıştır. Melatonin uygulanan gruplarda kontrol grubu değerlerine gerilediği gözlemlenmiştir. MCH değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamaktadır. MCHC değerleri monosodyum glutamat verilen gruplarda anlamlı derecede azalırken, melatonin uygulanan gruplarda kontrol grubu değerlerine yükseldiği tespit edilmiştir. Hemaglobin değerleri monosodyum glutamat gruplarında anlamlı derecede düşmüştür. Melatonin uygulanan gruplarda ise anlamlı derecede yüksek değerler ölçülmüştür (Tablo 4.2.).

Tüm gruplardan alınan kan ve doku örneklerindeki eritrosit ve karaciğer AchE, NO ve MDA parametreleri Tablo 4.3 de verilmiştir. Eritrosit AchE, Karaciğer AchE, Plazma NO, Karaciğer NO, Plazma MDA ve Karaciğer MDA değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur.



**Şekil 4.1.** Eritrosit sayıları

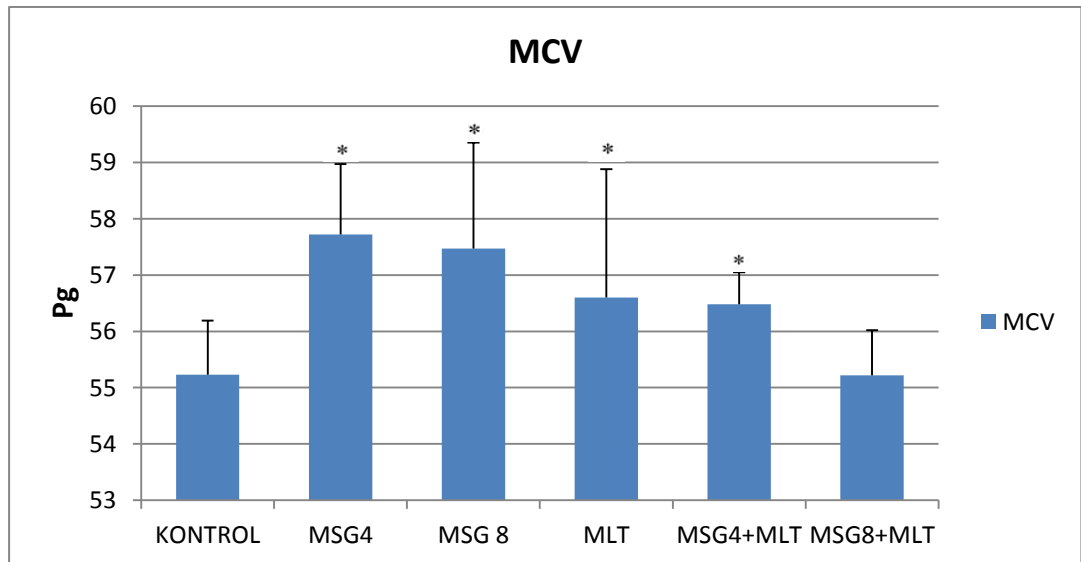
Grupların ortalama eritrosit sayıları MSG4 ve MSG8 gruplarında kontrol grubuna göre düşüş görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.2) (Şekil 4.1).



**Şekil 4.2.** Hematokrit değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0,001$

Grupların Hematokrit ortalama değerleri MSG4, MSG8 ve MSG4+MLT gruplarında artış görülmektedir. MLT grubunda MSG8+MLT grubunda ise düşüş gözlenmiştir. Grupların Hematokrit ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p > 0,01$ ) (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).

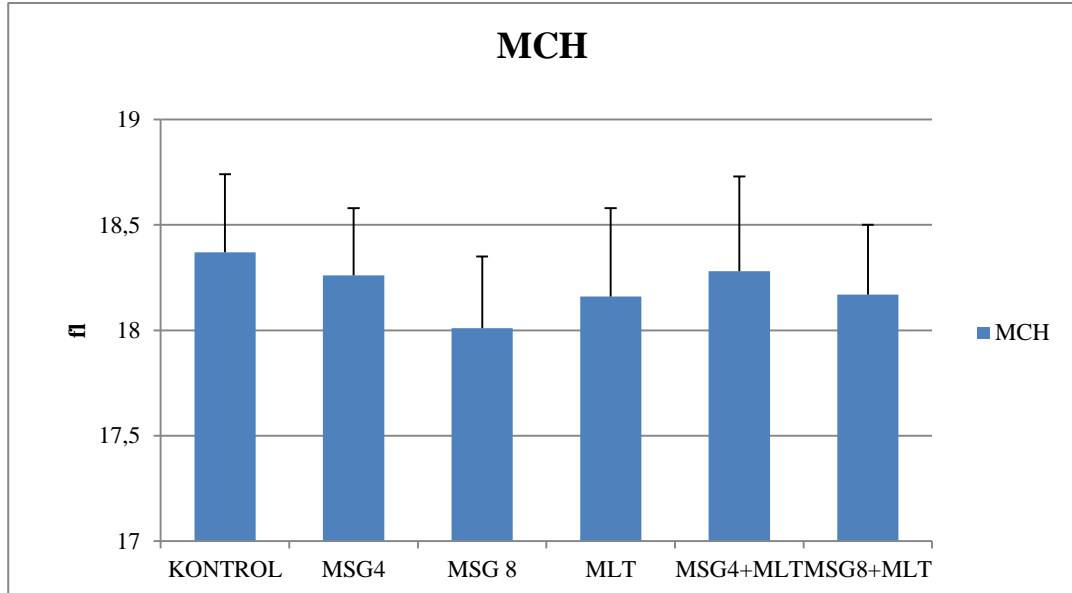


**Şekil 4.3.** Ortalama eritrosit volümü (MCV) değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0,001$

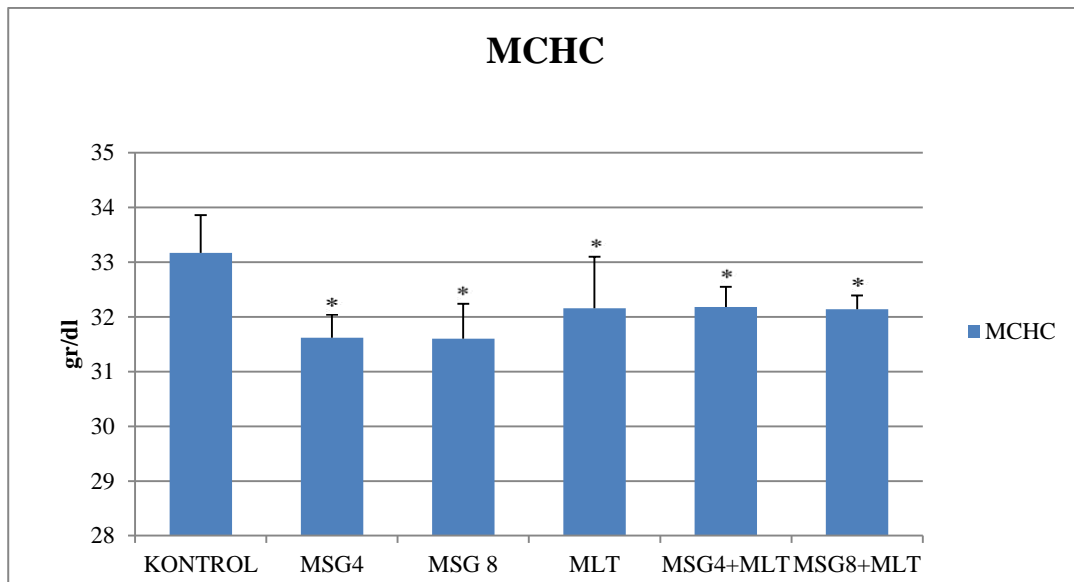
Grupların MCV ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p > 0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 ve MSG8 grupları kontrol grubuna göre MCV ortalama değerleri anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır. MSG8+MLT

grubu MCV ortalama değerleri kontrol grubu değerlerine göre daha düşük llmştr (Şekil 4.3).



**Şekil 4.4.** Ortalama eritrosit hemoglobin (MCH) değerleri

Grupların MCH ortalama değeri MSG4 ve MSG8 gruplarında kontrol grubuna göre düşük ancak gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p < 0,01$ ) (Tablo 4.2) (Şekil 4.4).

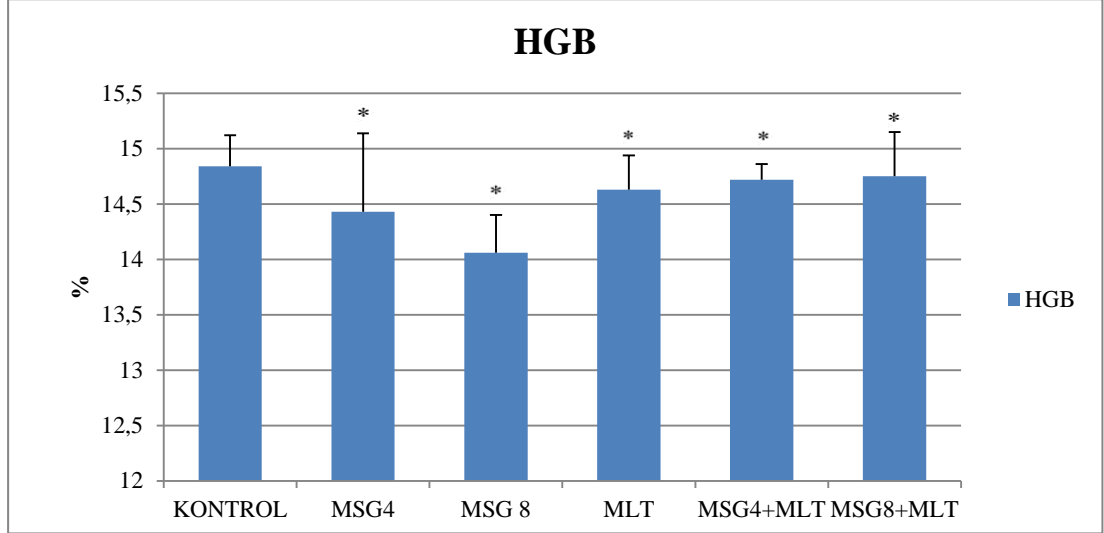


**Şekil 4.5.** Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0,001$

Grupların MCHC değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 ve MSG8 gruplarında MCHC ortalamaları

kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. MSG4+MLT ve MSG8+MLT grupları ve MLT grubu MCHC değerleri kontrol grubuna göre düşüktür (Şekil 4.5).



**Şekil 4.6.** Hemoglobin miktarları

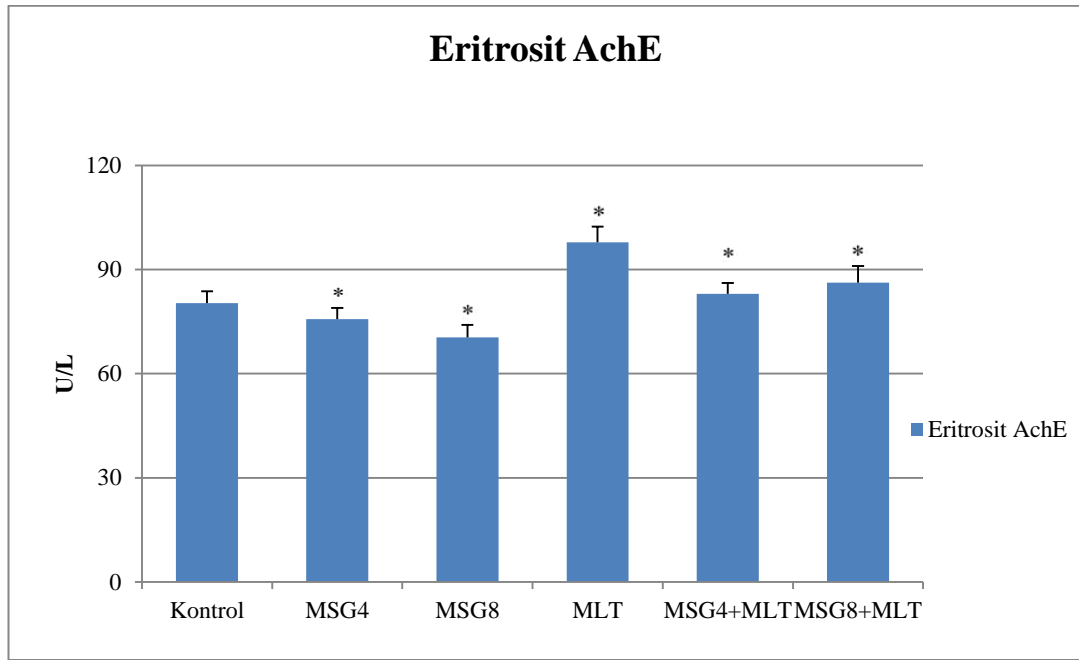
\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0,001$

Grupların HGB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu HGB değeri kontrol grubu HGB değerine göre düşük bulunmuştur. MSG8 grubunun HGB değerleri MSG4 grubu ve kontrol grubu HGB değerlerine göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.6).

**Tablo 4.3.** AchE, NO ve MDA parametrelerindeki değişiklikler(ort±ss)

	<b>Kontrol n = 10</b>	<b>MSG 4 n = 10</b>	<b>MSG 8 n = 10</b>	<b>MLT n = 10</b>	<b>MSG4+MLT n = 10</b>	<b>MSG8+MLT n = 10</b>	<b>P</b>
<b>ERİTROSİT AchE (U/L)</b>	80.334±2.26 <sup>d</sup>	75.633±1.71 <sup>e</sup>	70.428±1.01 <sup>f</sup>	97.829±0.66 <sup>a</sup>	86.246±0.96 <sup>b</sup>	83.006±3.11 <sup>c</sup>	<b>0.001**</b>
<b>KARACİĞER AchE (U/L)</b>	1.844±0.37 <sup>ab</sup>	1.654±0.13 <sup>bc</sup>	1.452±0.03 <sup>c</sup>	2.028±0.35 <sup>a</sup>	1.894±0.00 <sup>b</sup>	1.794±0.00 <sup>ab</sup>	<b>0.001**</b>
<b>PLAZMA NO (µmol/L)</b>	1.012±0.01 <sup>cd</sup>	1.216±0.12 <sup>b</sup>	1.385±0.18 <sup>a</sup>	1.032±0.01 <sup>cd</sup>	1.102±0.10 <sup>c</sup>	1.223±0.14 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>
<b>KARACİĞER NO (µmol/L)</b>	83.280±8.35 <sup>c</sup>	94.720±10.52 <sup>b</sup>	106.55±4.59 <sup>a</sup>	55.440±0.68 <sup>e</sup>	66.550±0.55 <sup>d</sup>	85.530±13.69 <sup>c</sup>	<b>0.001**</b>
<b>PLAZMA MDA (nmol/ml)</b>	1.163±0.11 <sup>ab</sup>	1.216±0.12 <sup>ab</sup>	1.385±0.18 <sup>a</sup>	1.023±0.40 <sup>ab</sup>	1.299±0.32 <sup>ab</sup>	1.305±0.11 <sup>c</sup>	<b>0.005*</b>
<b>KARACİĞER MDA (nmol/ml)</b>	1.644±0.56 <sup>b</sup>	2.185±0.40 <sup>a</sup>	2.290±0.49 <sup>a</sup>	1.244±0.63 <sup>bc</sup>	1.937±0.20 <sup>ab</sup>	2.147±0.46 <sup>a</sup>	<b>0.001**</b>

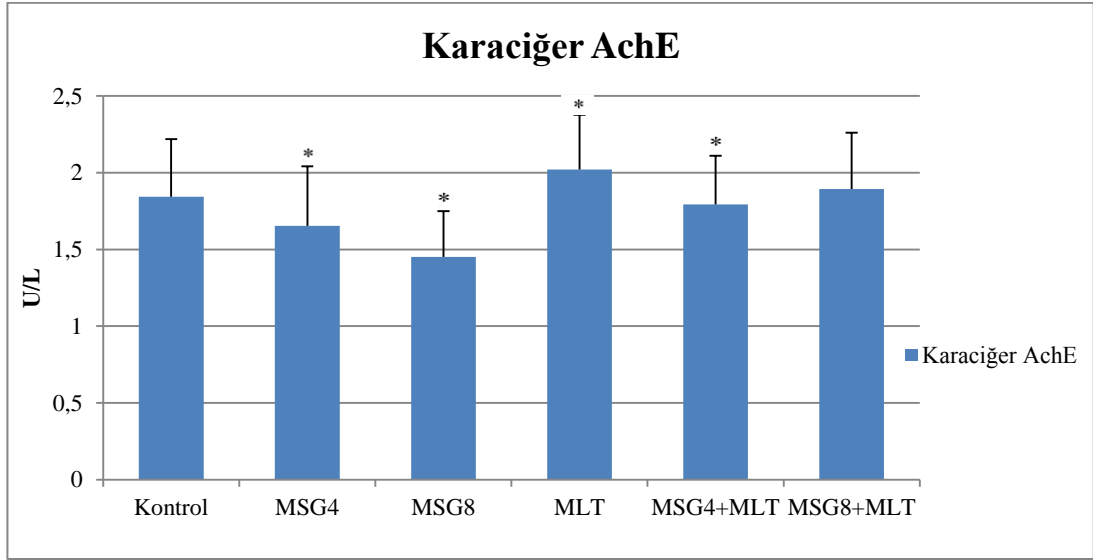
Tukey HSD test \* P<0.005 \*\* P<0.001, Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Aynı harfler gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Eritrosit Asetilkolinesteraz değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0.001$

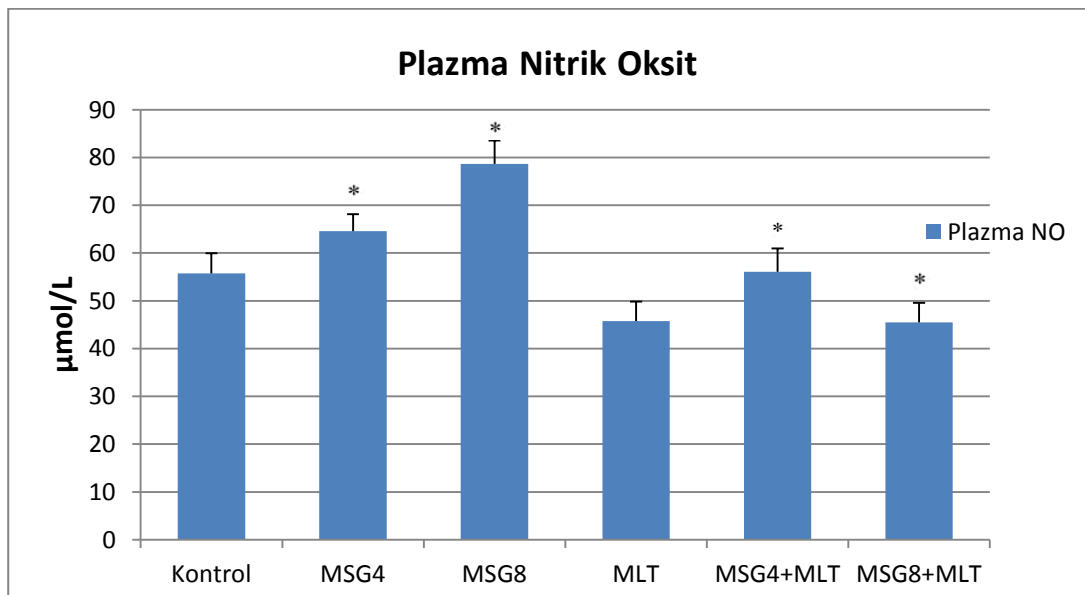
Grupların AchE değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu AchE değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. MSG8 grubunun AchE değerleri MSG4 ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. MLT grubunun AchE değerleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. MSG4+MLT grubu AchE değerleri MLT grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunurken MSG4, MSG8 ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. MSG8+MLT grubu AchE değerleri kontrol, MSG4 ve MSG8 gruplarına göre yüksek bulunurken MLT grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Şekil 4.7).



**Şekil 4.8.** Karaciğer doku Asetilkolinesteraz değerleri

\*: Kontrol grubuna göre P<0.001

Grupların AchE değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu AchE değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. MSG8 grubu AchE değerleri MSG4 grubuna göre anlamlı derecede düşük, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. MLT grubu AchE değerleri MSG4, MSG8 ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. MSG4+MLT grubu AchE değerleri MLT grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunurken MSG4 ve MSG8 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.8).

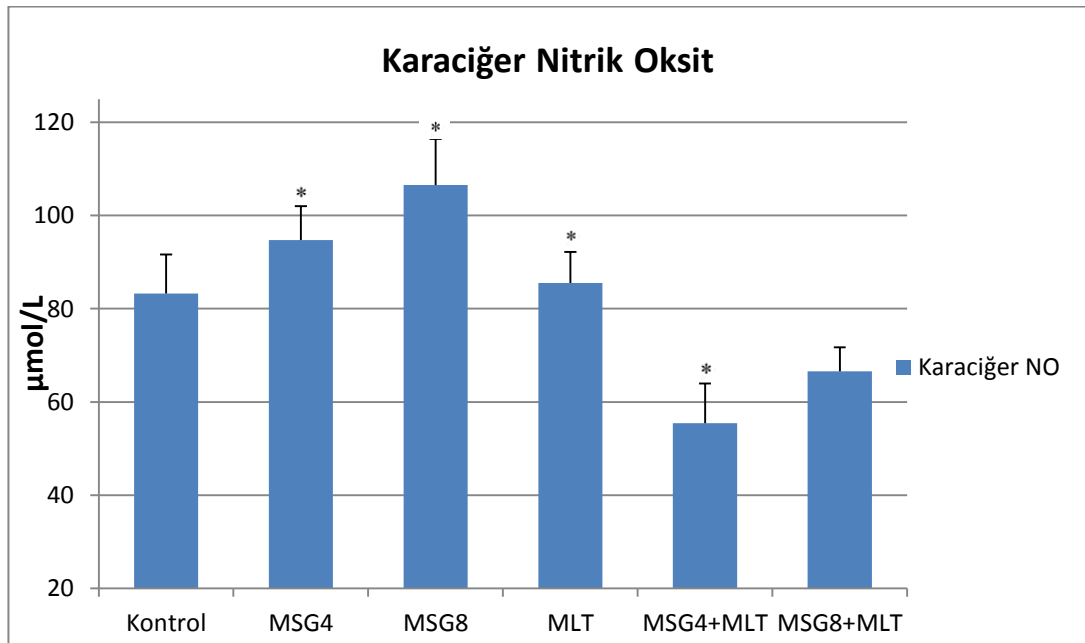


**Şekil 4.9.** Nitrik Oksit plazma değerleri

\*: Kontrol grubuna göre P<0.001



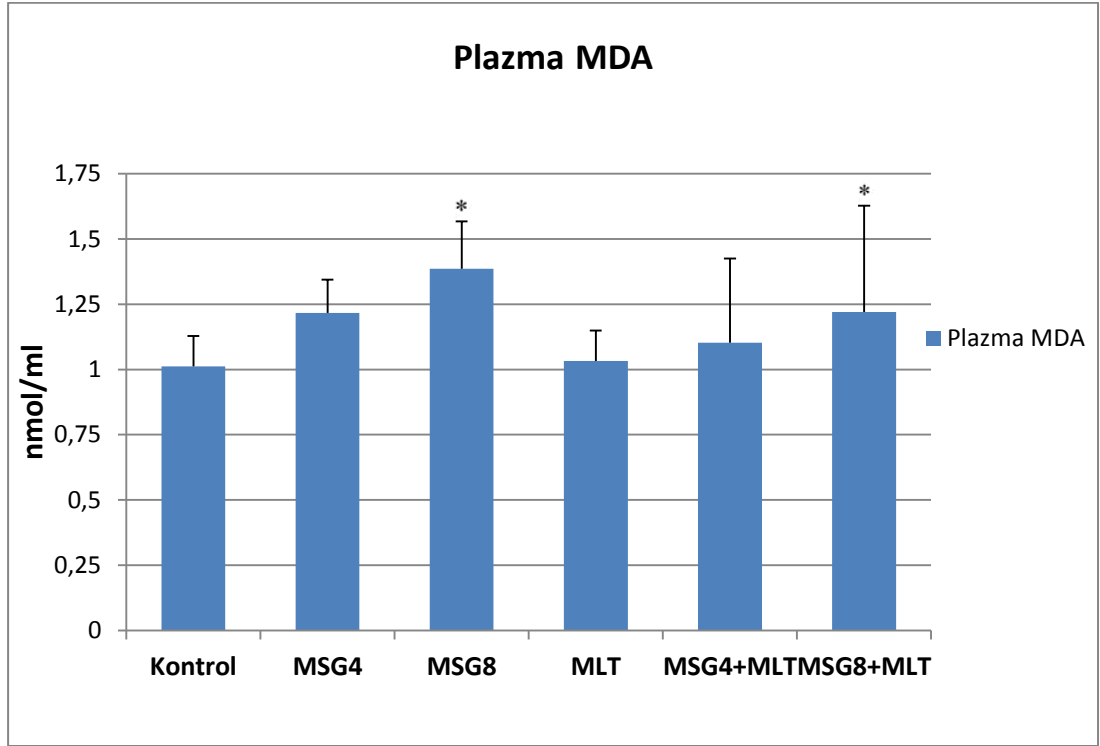
Grupların NO değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu NO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MSG8 grubu NO değerleri ortalaması MSG4 grubuna göre anlamlı derecede yüksek, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. MSG4+MLT grubu NO değerleri MSG4 ve MSG8 gruplarına göre düşük bulunurken kontrol grubuna göre yüksektir. MLT grubu NO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Nitrik Oksit karaciğer değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P<0.001$

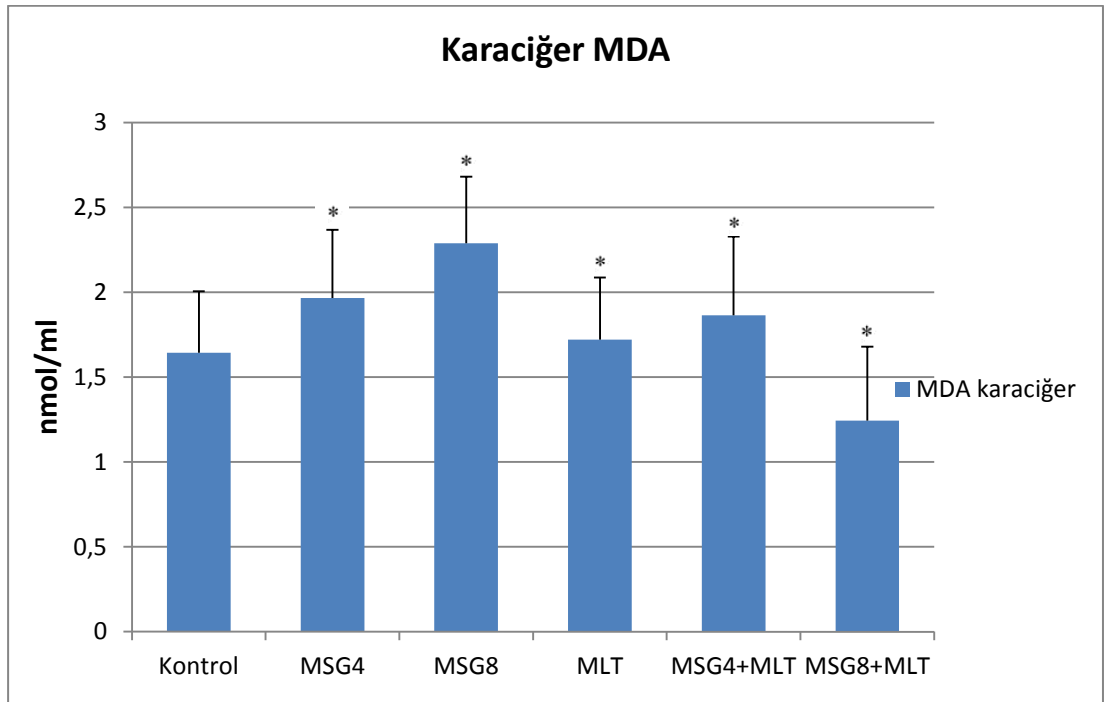
Grupların NO değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p>0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu NO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MSG8 grubu NO değerleri MSG4 grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. MLT grubu NO değerleri ile kontrol grubu NO değerleri arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. MSG4+MLT grubu kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (Şekil 4.10).



**Şekil 4.11.** Plazma Malondialdehit değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0.005$

Grupların MDA değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre yüksektir ancak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. MSG8 grubunun MDA değerleri ortalaması MSG4 grubu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MSG4+MLT grubu ve MSG8+MLT grubu MDA değerleri kontrol grubu MDA değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. MLT grubunun MDA değer ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.11).



**Şekil 4.12.** Karaciğer Malondialdehit değerleri

\*: Kontrol grubuna göre  $P < 0.001$

Grupların MDA değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,01$ ) (Tablo 4.2). MSG4 grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre yüksek ve ileri derecede anlamlı bulunmuştur. MSG8 grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre yüksek ve anlamlı bulunmuştur. MSG4+MLT grubu MDA değerleri MSG4 grubuna göre düşük kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. MSG8+MLT grubu mda değerleri MSG8 ve kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. MLT grubu MDA değerleri MSG4 ve MSG8 gruplarına göre düşük kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Şekil 4.12).

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada monosodyum glutamatın hematolojik parametreler yanında, karaciğer ve eritrositler üzerindeki oluşturabileceği oksidatif hasar ile asetilkolin esteraz ve nitrik oksit düzeyleri üzerinde meydana getirebileceği değişiklikleri ve muhtemel olumsuzlukların melatonin ile önlenip önlenemeyeceği araştırılmıştır.

Monosodyum glutamat, kısaltılmış adıyla MSG ya da koduyla E621, glutamat amino asidinin sodyum tuzu olup hazır gıdalarda sıkça kullanılan bir lezzet arttırıcıdır. MSG, tükürük salgısını arttırarak gıdanın lezzet özelliklerini güçlendirmekte, daha sık ve hızlı yeme isteği uyandırmaktadır. MSG ilk defa 1865 yılında keşfedilmiştir, ticari olarak üretimi ise 1909 yılında başlamıştır. Başta Çin ve Japon mutfakları olmak üzere, Türkiye de dahil birçok ülkede hazır gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. MSG; tüm cips çeşitlerinde, bazı katı yağlarda, et sularında, hazır çorbalarda, soslarda, işlenmiş kırmızı et, balık ve tavuklarda, mayonezlerde, baharat karışımlarında, renkli yoğurtlarda, bebek mamalarında ve daha birçok tüketim ürünüde farklı adlar (glutamik asit, glutamin) altında karşımıza çıkmaktadır. Hazır gıda maddelerinin yanı sıra organik tarım ürünleri için kullanılan gübreler de MSG içermektedir. Hazır gıdalarda özellikle lezzet arttırıcı özelliğinden yararlanan MSG'nin güvenilirliği konusunda yapılan çalışmalarda karşıt görüşler bulunmaktadır. Lezzetlendirici olarak kullanıldığında göğüs ağrısı, baş ağrısı, yüzde kızarıklık, nefes darlığı, ödem ve terlemeye neden olduğu bilinmektedir. Buna Çin Restoranı Sendromu denir. Neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu öne sürülmektedir. Günümüzde MSG'nin insan sağlığı üzerine olası etkilerini değerlendiren çalışmalar halen sürmektedir. Bu konuda birbirinden farklı görüşler olsada MSG kullanımının yasaklanmasını

gerektirecek derecede bilimsel kanıt bulunmamaktadır. Ancak pek çok insan için, MSG'nin zararlı etkilerinin olabileceğinin tartışılıyor olması ve zararsız olduğunun da tam olarak kanıtlanamaması kullanımında çekincelere neden olmaktadır (16).

Mcneil ve ark. (66) yaptıkları çalışmada eritrosit membranında bulunan asetilkolin esteraz enziminin eritrositin korunmasında önemli olduğu ve nitrik oksit salınımıyla ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca başka bir çalışmada ise eritrosit AChE düzeyindeki ciddi azalma, koma, solunum yetmezliği, hemodinamik dengesizlikler ve ölüm ile ilişkili bulunmuştur Carr ve ark. (67). Başka bir çalışmada albino sıçanlarla yaptıkları çalışmada 14 ve 28 gün; monosodyum glutamat 2,75 mg/kg/gün ve 5,5 mg/kg/gün oral yoldan uygulanmıştır. 5,5 mg/kg/gün 14 gün uygulanan grupta eritrosit sayısı yaklaşık % 22 oranında azalmıştır. 2,75 mg/kg/gün 28 uygulanan grupta eritrosit sayısı yaklaşık %30 azalmıştır. Aynı çalışmada hemoglobin miktarında düşük doz ve yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmüştür ashaolu ve ark.(1). Bir başka çalışmada 10 gün boyunca 4 mg/kg/gün monosodyum glutamat uygulanmıştır. Monosodyum glutamat uygulaması hematolojik parametreler üzerinde önemli ölçüde değişikliklere neden olmuştur. Kontrol grubunda 5,15 milyon olan eritrosit sayısı 4 mg/kg/gün MSG uygulanan grupta 3,75 milyona kadar gerilemiştir. Eritrosit sayısının düşüşüne bağlı olarak hemoglobin düzeyleri % 32 oranında dikkate değer azalma görülmüştür. Hematokrit değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmüştür (146). Akanya ve ark. (147) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise albino sıçanlara 4 hafta boyunca normal diyetlerine 0,5 gr/kg/gün %, 1,0 gr/kg/gün % ve 5,0 gr/kg/gün % MSG eklenerek uygulanmış ve eritrosit sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bizim çalışmamız ise Akanya ve ark. (147) yaptıkları çalışmayla paralellik gösterdi. Monosodyum glutamat verilen MSG4 ve MSG8 gruplarında kontrol grubuna göre bir miktar azalma görülsede istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.1.) (Tablo 4.2). Antioksidan olarak Melatonin uygulanan MLT, MSG4+MLT ve MSG8+MLT grupların, kontrol grubuna yakın sayıda eritrosit sayısı belirlenmiştir. Ayrıca MSG8 grubunda hemoglobin sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Antioksidan olarak melatonin uygulanan gruplarda ise hemoglobin sayıları kontrol grubuna yaklaştığı görüldü. MCV değerleri açısından yine MSG4 ve MSG8 grupları kontrol grubuna göre düşük ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Koruyucu olarak

melatonin uygulanan gruplardan MLT ve MSG4+MLT grubunda MCV değerleri kontrol grubuna göre yüksek ve istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0,01$ )(Tablo 4.2.) MSG8+MLT grubu MCV değeri kontrol grubu ile aynı seviyeye yaklaştığı görüldü.

Yapılan bir çalışmada yüksek oksidatif stresin hücresel hasar oluşturacağı bulunmuştur. DNA, protein ve lipidleri içeren tüm biyomoleküllerin oksidatif hasarı birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Çeşitli kanser tipleri, kardiyovasküler hastalıklar, alkolik karaciğer hastalığı, diyabet, ağır metal toksisitesi, radyasyon hasarı, vitamin eksikliği, bilinen tedavilerin toksisitesi, inflamasyon, sigaranın toksik etkileri, katarakt, amfizem ve Parkinson ile Alzheimer hastalığını da içeren nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ile oksidatif stres arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (32). Sauganth Paul ve ark. (148) albino sıçanlarla yaptıkları çalışmada 180 gün; 4g/kg/gün monosodyum glutamat oral olarak uygulamıştır. Bu çalışmada oksidatif stres göstergesi olarak MDA değerleri incelenmiş ve MSG uygulanan grupta MDA değerleri yaklaşık olarak %35 oranında artmıştır. Bir başka çalışmada Ahluwalia ve ark. (149) yetişkin farelere 6 gün; 4mg/g/gün ve 8mg/g/gün monosodyum glutamat subkutan olarak uygulanmış ve lipid peroksidasyon açısından incelenmiştir. 4mg/g/gün ve 8mg/g/gün monosodyum glutamat uygulanan gruplarda lipid peroksidasyonu yaklaşık olarak sırasıyla %31 ve %75 oranında artmıştır. Bizim çalışmamız Sauganth ve ark. (148) yaptıkları çalışmalarıyla paralellik gösterdi. Plazma MDA ölçümlerinde hem MSG4 hemde MSG8 grubunda MDA değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ancak sadece MSG8 grubundaki MDA değerlerindeki artış istatikselsel olarak anlamlıdır. MSG ile birlikte koruyucu olarak melatonin verilen MSG4+MLT, MSG8+MLT gruplarında kontrol grubuna göre MDA değerleri yüksek bulunmuştur. Ancak sadece MSG8+MLT grubundaki MDA değerlerindeki artış istatikselsel olarak anlamlıdır. MLT grubunda MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir fark yoktur. Toksikite sonucu artan MDA değerlerinde antioksidan olarak uygulanan melatoninin kontrol grubu MDA düzeylerine geriletmediği görülmüştür. Karaciğer MDA ölçümlerinde hem MSG4 hemde MSG8 gruplarında kontrol grubuna göre MDA değerleri istatikselsel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir ( $P<0,01$ )(Tablo 4.3). Antioksidan olarak melatonin verilen MSG4+MLT ve MSG8+MLT gruplarında MDA değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Ancak bu değerler istatikselsel olarak anlamlı değildir.

Yapılan bir çalışmada NO birçok fizyolojik süreçte vasküler sistemin regülasyonunda, nörotransmisyonunda ve çeşitli homeostatik olaylarda önemli rol oynadığı ve diyabet, şok, infarksiyon, nörodejenerasyon, artrit, kronik inflamasyon gibi birçok patolojik durumda NO sentezinin üretiminin uyarıldığı tespit edilmiştir. NO ve nitrit, nitrat, S- nitrosothiol, nitrosamin, peroksinitrit gibi NO metabolitleri, mitokondrial respirasyon inhibisyonu, gen mutasyonu ile sonuçlanan protein ve DNA hasarı, protein fonksiyon bozuklukları, nekrosis ve apoptosis gibi NO'nun birçok sitotoksik ve genotoksik etkisine aracılık etmekte önemli role sahip olduğu belirtilmiştir ayrıca, NO ve NO metabolitlerinin tümör dokusunun metastazında ve hücre gelişiminde inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (77). Bir başka çalışmada normal eritrosit fizyolojisi üzerine etkili olan endotel hücrelerinde sentezlenen NO, sadece yakında bulunan düz kas hücrelerini etkilemekle kalmadığı aynı zamanda vasküler lümene de diffüze olarak kan hücreleriyle de etkileştiği ayrıca, insan kırmızı kan hücreleri, nitrik oksit sentazın indüklenebilir (NOS2 ya da iNOS) ve sabit (NOS3 ya da NOS) formlarına sahip oldukları için kendi NO'larını sentezleyebilecekleri ve eritrositlerin mekanik özellikleri açısından düzenleyici bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Yüksek dozlarda monosodyum glutamat alındığında vazokonstriktör etki ile glutamat reseptörlerinin ya da nörotransmitterlerin agonistik etkisi sonucu endotel hücrelerden nitrik oksit salınımı ile damarlarda vazodilatasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (79). Bizim çalışmamızda plazma NO düzeyleri MSG4 ve MSG8 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P < 0,01$ ) (Tablo 4.3). Antioksidan olarak melatonin verilen MSG4+MLT ve MSG8+MLT gruplarında plazma NO düzeyleri kontrol grubuna yakın bulunmuştur. Ancak sadece MSG8+MLT grubu değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır. Karaciğer dokusu NO düzeyleri MSG4 ve MSG8 gruplarında kontrol grubuna göre % 25 kadar fazla ve istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Antioksidan olarak melatonin uygulanan MSG4+MLT ve MSG8+MLT gruplarında NO düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürmüştür.

Yapılan bir çalışmada eritrosit membranında bulunan asetilkolin esteraz enziminin eritrositin korunmasında önemli olduğu ve nitrik oksit salınımıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (63). Başka bir çalışmada kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt oluşumunda da rol oynadığı bildirilmiştir (73). Farklı bir çalışmada ise eritrosit AChE düzeyindeki ciddi azalma,

koma, solunum yetmezliği, hemodinamik dengesizlikler ve ölüm ile ilişkili bulunmuştur (66). Slimen ve ark. (65) albino yavru sıçanlarla yaptıkları çalışmada 21 gün; 200 mg/kg/gün malathion emzirme esnasında oral olarak uygulanmıştır. Malathionun oluşturduğu oksidatif stres neticesinde beyin, eritrosit ve plazma asetilkolinesteraz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Bir başka çalışmada Petrov ve ark. (150) Glutamat uygulanan albino sıçanlarda AchE seviyelerinde azalma olduğu görüldü. Bir başka çalışmada Toth ve ark. (151) gebe ratlarla yaptığı çalışmada monosodyum glutamatı subkutan olarak uygulanmıştır. Postnema bölgesi asetilkolinesteraz-pozitif nöronlarında akut nekroz görülmüştür. Luchese ve ark. (152) albino farelerde yaptıkları çalışmada 28 gün; 10µmol/kg haftada 5 kez kadmiyum klorür(CdCl<sub>2</sub>) uygulanmıştır. Beyin asetilkolinesteraz aktivitesinde inhibisyon görülmüştür. Bizim çalışmamızda Petkov ve ark. (150), Luchese ve ark.(152) çalışmalarıyla paralellik gösterdi. MSG4 ve MSG8 gruplarında Eritrosit AchE miktarı kontrol grubuna göre doz artışına bağlı olarak %13 e kadar azalmış (Tablo 4.3), ve istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Antioksidan olarak melatonin uygulanan hem MSG4+MLT hemde MSG8+MLT gruplarında AchE miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (P<0,01)(Tablo 4.3). MLT grubunda da kontrol grubuna göre AchE miktarı yaklaşık olarak %21 artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulunmuştur. Karaciğer dokusu asetilkolinesteraz miktarı bakımından MSG4 ve MSG8 grupları AchE seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.8) (Tablo 4.3). Antioksidan olarak melatonin verilen MSG4+MLT ve MSG8+MLT gruplarında kontrol grubu değerlerine yükseldiği bulunmuştur. Ancak sadece MSG4+MLT grubu değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Melatonin uygulanan MLT grubu AchE miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 4.3).

Sistemik hastalıklara ve neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu ileri sürülen MSG, karaciğer dokusu ve eritrositlerde oksidatif hasarada yol açmaktadır. Oksidatif strese neden olan monosodyum glutamat çalışmamızda eritrosit



ve hemoglobin, asetilkolinesteraz deęerlerini dūřürmūř hemotokrit, malondialdehit, nitrik oksit deęerlerinde artıřa neden olmuřtur. Melatonin monosodyum glutamatın neden olduęu bu deęiřiklikleri kısmen önlemiřtir.

Elde edilen veriler işığında biręok hazır gıdada ve restoranlarda sıkęa kullanılan monosodyum glutamatın hem plazmada hemde başta beyin olmak üzere değişik dokularda bulunan ve önemli bir enzim olan asetilkolin esterazı inhibe ettiği ayrıca plazma ve doku nitrik oksit miktarında artışa neden olduğu bu artışların değişik doku ve organ hasarlarına neden olabileceğini dūřündürmektedir. Koruyucu olarak uygulanan melatoninin güçlü antioksidan etkinliği ile monosodyum glutamatın plazma ve dokularda oluşturduğu hasarları olumlu yönde etkilemektedir.

Sonuç olarak, MSG gerek karaciğerde gerekse eritrositlerde oksidatif hasara neden olmaktadır. Asetilkolin esteraz enzim düzeylerinde azalmaya, nitrik oksit düzeylerinde artışa yol açmaktadır. Bu değişiklikler eritrositlerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu da dokuların oksijen ihtiyacının tam karşılaşılanamamasına neden olacaktır. Melatonin monosodyum glutamatın yarattığı olumsuzlukları kısmen önleyebilmektedir.

Bu nedenle, farklı antioksidanların monosodyum glutamat intoksikasyonundaki koruyucu etkinliği ve özellikleri klinik ęalıřmalarla desteklenmelidir. Bu ęalıřma farkında olmadan sıklıkla tüketilen MSG katkılı gıda maddelerinin etkilerinden tüketicilerin ve özellikle çocukların sağlığının korunması açısından önemli katkılar sağlıyacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Ashaolu JO, Ukwenya VO, Okonoboh AB, Ghazal OK, Jimoh AG. Effect of monosodium glutamate on hematological parameters in Wistar rats. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2011; 3: 219-222.
2. Pavlovic V, Pavlovic D, Kocic G, Sokolovic D, Sarac M, Jovic Z. Ascorbic acid modulates monosodium glutamate induced cytotoxicity in rat thymus. *Bratisl Lek Listy* 2009; 110: 205-209.
3. Bakhtiari et al. Red blood cell ATP/ADP & nitric oxide: The best vasodilators in diabetic patients. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2012; 11: 2-7.
4. Singh K, and Ahluwalia P. Effect of monosodium glutamate on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in cardiac tissue of alcoholic adult male mice. *J Cardiovasc Dis Res* 2012;3: 12–18.
5. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and: genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25: 251-259.
6. Bertoluzzo SM, Bollini A, Rasia M, Raynal A. Kinetic model for erythrocyte aggregation. *Blood Cell Mol Dis* 1999; 30: 339-349.
7. Chien Shu. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann Rev Physiol* 1987; 49: 192-199.
8. Helvacioğlu F, Kerestecioğlu C, Erdoğan N, Uğur KS, Aktaş G. Monosodyum glutamat yararlı mı yoksa zararlı mı. XIII. Öğrenci Sempozyumu. Başkent Üniversitesi. Ankara. 2011; ss: 10-11.
9. Yurttagül M, Ayaz A. Katkı maddeleri: yanlışlar ve doğrular. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727. Klasmat Matbaacılık, Ankara 2008; 9-19.
10. Niijima A, Togyama T, Adachi A. Cephalic-phase insulin release induced by taste stimulus of monosodium glutamate (umami taste). *Experientia* 1980; 15;36: 232-234.
11. Rogers PJ, Blundell JE. Umami and appetite: effects of monosodium glutamate on hunger and food intake in human subjects. *Physiol Behav* 1990; 48:801-804.

12. Altuğ T (Ed).Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım, İzmir. 2001; ss: 161-174.
13. Uslu, D, Tosun H.Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2013; 8: 18-28.
14. Narayanan SN, Kumar RS, Paval J, Nayak S.Effects of Ascorbic Acid on the Monosodium Glutamate-Induced Neurobehavioral Changes in Periadolescent Rats. Bratisl Lek Listy 2010; 111: 247-52.
15. Hu L, Fernstrom JD, Goldsmith PC.Exogenous glutamate enhances glutamate receptors subunit expression during selective neuronal in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. Neuroendocrinology 1998; 68: 77-88.
16. Olney JW. Missouri Nature 1970; 227-228.
17. Arauz-Contreras JF.Monosodium L-glutamate induced convulsions-1. Differences in seizure pattern and duration of effect as a function of age in rats. Gen Pharmacol 1984; 15: 391-395.
18. Bunyan J, Murrell EA, Shah PP.The induction of obesity in rodents by means of MSG. Br J Nutr 1976; 35: 25-28.
19. Kanarek RB, Meyers J, Meade RG, Mayer J.Juvenile-onset obesity and deficits in caloric regulation in MSG-treated rats. Pharmacol Biochem Behav 1979; 10: 717-721.
20. Pepino MY, Finkbeiner S, Beauchamp GK, Mennella JA.Obese women have lower MSG taste sensitivity and prefer higher concentrations than do normal-weight women. Obesity (Silver Spring) 2010; 18: 959-965.
21. Colucci PE, Grovum WL.Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. The effect of monosodium glutamate on the palatability of straw diets by sham-fed and normal animals. Br J Nutr 1993; 69: 37-47.
22. Bellisle F, Monneuse MO, Chabert M, Larue-Achagiotis C, Lanteaume MT, Louis-Sylvestre J.Monosodium glutamate as a palatability enhancer in the European diet. Physiol Behav 1991; 49: 869-873.
23. Macho L, Fickova M, Jezova, Zorad S.Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. Physiol Res 2000; 49: 79-85.

24. Nijjima A, Togyama T, Adachi A. Cephalic-phase insulin release induced by taste stimulus of monosodium glutamate (umami taste). *Experientia* 1980; 36: 232-234.
25. Komeda K, Yokote M, Oki Y. Diabetic syndrome in the Chinese hamster induced with monosodium glutamate. *Experientia* 1980; 36: 232-234.
26. Chevassus H, Renard E, Bertrand G, Mourand I, Puech R, Molinier N, Bockaert J, Petit P, Bringer J. Effects of oral monosodium (L)-glutamate on insulin secretion and glucose tolerance in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53: 641-643.
27. Corder R, Saudan P, Mazlan M, McLean C, Gaillard RC. Depletion of hypothalamic growth hormone-releasing hormone by neonatal monosodium glutamate treatment reveals an inhibitory effect of betamethasone on growth hormone secretion in adult rats. *Neuroendocrinology* 1990; 51: 85-92.
28. Nagata M, Suzuki W, Maruyama H, Takeda S, Aburada M, Miyamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese Mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim* 2006; 55: 109-115.
29. Toth L, Karscu S, Feledi J, Kreutzberg GW. Neurotoxicity of monosodium L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta Neuropathol* 1987; 75: 16-22.
30. Bojanic V, Bojanic Z, Najman S. Diltiazem prevention of toxic effects of monosodium glutamate on ovaries in rats. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28: 149-154.
31. Sisk DR, Kuwabara T. Histologic changes in the inner retina of albino rats following intravitreal injection of monosodium L-glutamate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985; 23: 250-258.
32. Temel HE, İnal ME. Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. 2008; ss: 5-9.
33. Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Jelonek T. Nitric oxide, induced by wounding, mediates redox regulation in pelargonium leaves. *Plant Biol* 2009; 11: 650-663.

34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. 1989; pp: 188-196.
35. Van Breusegem F, Dat JF. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 2006; 141: 384-390.
36. Van Camp W, Van Montagu M, Inze D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 1998; 3: 330-334.
37. Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, et al. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* 2003; 160: 509-515.
38. Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; 48: 251-275.
39. Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis, Washington DC. 1997; pp: 79-120.
40. Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: 2240-2246.
41. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* 2007; 53: 1-2.
42. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 885-888.
43. Güngör N, Knaapen AM, Munnia A, et al. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis* 2010; 25: 149-154.
44. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, Davies MJ. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 35-46.
45. Mugnaini V, Lucarini M. Hydrogen bonding affects the persistency of alkyl peroxy radicals. *Org Lett* 2007; 9: 2725-2728.
46. Sharp EN, Rupper P, Miller TA. The structure and spectra of organic peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys* 2008; 10: 3955-3981.

47. Coffey MD, Cole RA, Colles SM, Chisolm GM. In vitro cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid, and peroxy radicals. *J Clin Invest* 1995; 96: 1866-1873.
48. Rayner BS, Hua S, Sabaretnam T, Witting PK. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochem J* 2009; 25: 423: 169-177.
49. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 1993; 49: 481- 493.
50. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems 1990; 15: 129-135.
51. Maestro Del RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980; 492: 153-168.
52. Basaga HS. Biochemical aspect of free radicals. *Biochem Cell Biol.* 1990; 68: 989-998.
53. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-5.
54. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819.
55. Southom PA, Powis G. Free radicals in medicine I: Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 390- 408.
56. Katı Ö. Korozif Özofagus Yanıklarında N-Asetilsistein Etkinliğinin Erken ve Geç Dönemde Histopatolojik ve Biyokimyasal Değişikliklerle Değerlendirilmesi. *Başkent Üniversitesi, Ankara.* 2010: 12-13.
57. Öztürk M, Güzelhan Y. Yaygın Gelişimsel Bozukluğu Olan Çocuklarda Plazma Malondialdehit ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001; 11: 155-159.

58. Ögüş E, Yılmaz FM. Hemodiyaliz ve Periton Diyalizi Hastalarında Serum Malondialdehit Düzeyleri ve ksidasyona Yatkınlık. *T Klin J Med Sci* 2004; 24: 316-322.
59. Daschner M, Lenhartz H, Bötticher D, et al. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney Int* 1996; 50: 1268-1272.
60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telzer J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
61. Yerer B, Aydoğan S. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 2006; 15: 153-160.
62. Baskin SI, Salem H. *Oxidants, antioxidants, and free radicals*. Taylor and Francis, Washington DC 1997; pp: 26-35.
63. Marklund S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7634-7638.
64. Garewal HS. *Antioxidants and disease prevention*. CRC Press LLC, Florida 1997; pp: 3-19.
65. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 326-334.
66. McNeil JJ, Robman L, Tikellis G, Sinclair MI, McCarty CA, Taylor HR. Vitamin E supplementation and cataract: randomized controlled trial. *Ophthalmology* 2004; 111: 75-84.
67. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000; 87: 349-354.
68. Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: prooxidant effect in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 535-540
69. Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem* 2008; 107: 690-700.

70. Sumien N, Heinrich KR, Shetty RA, Sohal RS, Forster MJ. Prolonged intake of coenzyme Q10 impairs cognitive functions in mice. *J Nutr* 2009; 139: 1926-1932.
71. Sinha S, Singh SN, Ray US. Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native highlanders: role of uric acid. *High Alt Med Biol* 2009; 10: 269-274.
72. Soriani M, Pietraforte D, Minetti M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 180-188.
73. Çaylak E. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2011; 9: 73-83
74. Güven A. İmportance of Acetylcholinesterase and Its Inhibitors. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi* 2000; 6: 145-151.
75. Vale, J. A. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorus(OP) Insecticide Poisoning. *Toxicology Letters* 1998; 102-103: 649-652.
76. Carvalho F. Acetylcholine and Choline Effects on Erythrocyte Nitrite and Nitrate Levels. *Journal of applied toxicology J. Appl. Toxicol* 2004; 24: 419-427.
77. Kahraman N, Yanturalı S. Evaluating the relationship between serum acetylcholinesterase levels and clinical course and mortality of patients presented with organophosphate and carbamate poisonings *Turk J Emerg Med* 2008; 8: 121-126.
78. Selmi S, El-fazaa S, Gharbi N. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2012; 34: 753-760.
79. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimehoate- Induced Effects on Antioxidant Status of Liver and Brain of Rats Following Subchronic Exposure. *Toxicology* 2005; 215: 173-181.
80. Türköz Y, et al. Nitric oxide : actions and pathological roles. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997; 4: 453-461.
81. Mutlu C, Koyuturk M, Karpuz V. Preeklampitik ve normal plasentada endotelial nitrik oksit sentetaz immunreaktivitesinin incelenmesi. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 109-115.



82. Grdol F, Ademoğlu E, (Editorler). Biyokimya Azotlu Biyomoleküllerin Metabolizması İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006; ss: 438-439.
83. Kürkçü E.Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümörlerinde Cucurmin'in Arginaz Enzim Aktivitesi, Ornitin ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstirs, Edirne. 2008: 15-23.
84. Lancaster JR, Ignarro LJ, ed.JR in Nitric Oxide: Biology and Pathobiology Academic Press, San Diego, CA. 2000; pp: 209-224.
85. Kuyumcu A, Duzgun PA, Ozmen MM, Besler TH.Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolu. Ulus. Travma Dergisi 2004; 10: 149-159.
86. Kuşcuoğlu U.Deneysel omurilik yaralanmasında agmatin'in doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniği, İstanbul. 2004; ss: 35-37.
87. Shareef S, Sawada A, Neufeld AH.Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 2884-2891.
88. Wiesinger H.Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. Progress in Neurobiology 2001; 64: 365-391.
89. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U.Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. Medicina (Kaunas) 2003; 39: 333-341.
90. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK.The role of nitric oxide in tumour progression. Nat Rev Cancer 2006; 6: 521-534.
91. Simmons RM, Rubin E, Pisch J.Breast cancer. In: Harvey JC, Beattle EJ (Eds.) Cancer surgery. W.B. Saunders Company: NY USA 1996; pp: 525-561.
92. Sun-Edelstein C, Mauskop A.Foods and Supplements in the Management of Migraine Headaches. The Clinical Journal of Pain 2009; 25: 446-452.
93. Ianas O, Olivescu R, Badescu I.Melatonin involvement in oxidative process. Rom J Endocrin 1991; 29: 117-123.
94. Brzezinski A.Melatonin in humans. N Engl J Med 1997; 336: 186-195.

95. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
96. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-1155.
97. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol* 1988; 29: 205-229.
98. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151-180.
99. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45: 922-932.
100. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14: 151-168.
101. Acuna CD, Reiter RJ, Menendez PA, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16: 100-112.
102. Forsling ML. Melatonin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2001; 8: 147-153.
103. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-357.
104. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom J Endocrinol* 1991; 29: 117-123.
105. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
106. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998; 24: 96-101.
107. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J*. 1996; 10: 891-896.

108. Yamamoto HA, Tang HW. Melatonin attenuates L-cysteine induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. *J Pineal Res* 1996; 21: 108-113.
109. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1265-1272.
110. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
111. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998; 24: 83-89.
112. Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM. The role of melatonin in the human fetus (review). *Int J Mol Med* 1998; 1: 539-543.
113. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 412-420.
114. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, et al. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; 32: 69-75.
115. Yazıcı C. Sentetik Seks Steroidlerinin ve Melatoninin Oksidan Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Rat Modelinde Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Erciyes Ün. Tıp Fakültesi Biyokimya A.D, Kayseri. 1999; ss: 151.
116. Urata Y, Honma S, Goto S, et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 838-847.
117. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res*. 1998; 25: 34-40.
118. Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JI. Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production

- after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Pineal Res.*1997; 23: 24-31.
119. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al.Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2001; 30: 129-138.
120. Montilla P, Tunez I, Munoz MC, Lopez A, Soria JV.Hyperlipemic nephropathy induced by adriamycin: Effect of melatonin administration. *Nephron* 1997; 76: 345-350.
121. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I,Laborit H.Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993; 80: 211-223.
122. Montilla PL, Vargas JF, Tunez IF, Munoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES.Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 1998; 25: 94-100.
123. Yenerel M.N.Herediter eritrosit membran anomalileri. *Türkiye Klinikleri J Hematoloji* 2004; 2: 125-130.
124. Yazıcı C, Köse K, Gökalp S, Canöz Ö, Utaş C.Siklosporin A nefrotoksitesinde protein oksidasyonunun yeri ve melatoninin koruyucu etkisi. 19. TND Ulusal Nefroloji Hipertansiyon Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi Bildiri Özet Kitabı, Antalya. 2002: ss: 119.
125. Deveci S, Yazıcı C, Köse K, Gökalp S.S.Siklosporin A ve/veya melatonin uygulanan ratlarda kanser riskini artıran oksidatif stresin değerlendirilmesi. *Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu Özet Kitabı*, Bursa. 2002: ss: 21.
126. Reiter RJ.Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17: 273-285.
127. Yılmaz B.Fizyoloji. 2. Baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara. 2000; ss: 221-222
128. Noyan A.Fizyoloji Ders Kitabı, 2. Baskı. Meteksan Baskı Tesisleri, Ankara. 1980; ss: 323-336, 445-446.
129. Guyton AC, Hall JE.Tıbbi Fizyoloji 12. Baskı. Çeviri; Çağlayan Yegen B.Nobel matbaacılık. İstanbul. 2011; ss: 416-421.

130. Reece WO. *Dukes Veteriner Fizyoloji*. 12. baskı. New York. 2004; pp: 33-34.
131. Konuk T. *Pratik Fizyoloji*. 2. baskı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınlar, Ankara. 1981; ss: 19-21.
132. Bhagavan NV. *Biochemistry*, 2nd ed. Philadelphia, JB. Lippincott Company. 1978; pp: 407-471, 718-721.
133. Copley AL. The rheology of blood. A survey *J Colloid Sci* 1952; 7: 323-333.
134. Yenerel, M.N. Herediter eritrosit membran anomalileri. *Hematoloji* 2004; 2: 125-130.
135. Sadava DE. *Cell Biology: Organelle structure and function*. Jones and Bartlett Publishers, Londra. 1993; pp: 2-8.
136. Discher E, Carl P. New insights into red cell network structure, elasticity, and spectrin unfolding a current review. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2001; 6: 593-606.
137. Agre P, Parker JC. *Red blood cell membranes*. Marcel dekker inc. New York 1989; pp: 401-421
138. Güleşçi N. Kapaisin ve tarçının (cinnamon) yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakılan insan eritrositlerinde (in vitro) protein glikazasyonu,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPaz,  $\text{Ca}^{+2}$  ATPaz ve lipid peroksidasyonu düzeylerine etkisinin araştırılması., Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş. 2006: ss:
139. Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 707-717.
140. Liao JC, et al. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8757-8761
141. Stamler JS, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-2037.
142. Jia L, et al. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 221-226.

143. Cosby K, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*, 2003; 9: 1498-505.
144. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15: 1-18.
145. Asetilkolinesteraz inhibisyonu. Asetilkolin parçalanması. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>
146. Anwar MM, Mohamed NE. Impact of Flax Seed and Canola Oils Mixture Supplementation on The Physiological and Biochemical Changes Induced by Monosodium Glutamate in Rats *J. Rad. Res. Appl. Sci.* 2010; 3: 943-964.
147. Akanya HO, Peter1 S, Ossamulu IF, Oibiokpa FI, Adeyemi HY. Evaluation of the Changes in Some Liver Function and Haematological Parameters in MSG Fed Rats *International Journal of Biochemistry Research & Review* 2015; 6: 113-120.
148. Sauganth Paul MV, Abhilash M. Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol against oxidative stress related to nephrotoxicity by monosodium glutamate in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2012; 22: 625–630.
149. Ahluwalia P, Tewari K, Choudhary P. Studies on the effects of monosodium glutamate (MSG) on oxidative stress in erythrocytes of adult male mice. *Toxicology Letters* 1994; 84: 141-145
150. Petrov AK, Malomouzh AI, Kovyazina IV. Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via N-methyl-D-aspartate receptor activation *European Journal of Neuroscience* 2013; 37: 181–189.
151. Toth L, Karcsu S, Feledi J, Kreutzberg GW. Neurotoxicity of monosodium-L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta Neuropathol.* 1987; 75: 16-22.
152. Luchese C, Brandao R, Oliveira R, Nogueira CW. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice *Toxicology Letters* 2007; 173: 181–190.

## EKLER

## EK 1. ETİK KURUL ONAYI

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL KURUL BAŞKANLIĞI**  
**KAYSERİ-TÜRKİYE**

**ETİK KURULUN ADI:** Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

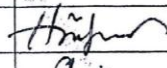


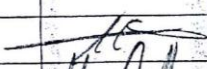
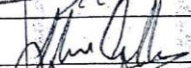
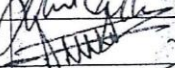
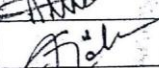

**ETİK KURULUN ADRESİ:** Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)

**Tarih:** 11.09.2013

**Toplantı Sayısı:** 08

**Karar No:**13/116

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu **11.09.2013** tarihinde **Prof. Dr. Harun ÜLGER**'in başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANÖZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	Katılmadı
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Prof. Dr. Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	Katılmadı
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	Katılmadı
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	
Gökçen DİNÇ	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNDAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardımcı Değerlendirici	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinden **Prof. Dr. Sami AYDOĞAN** tarafından sunulan "MSG (Monosodium glutamat) kaynaklı oksidatif strese, eritrosit asetilkolin esteraz ve nitrik oksit değişikliklerinin hemoreolojik önemi, melatoninin rolü" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi

**Tarih** : 11.09.2013

**Etik kurul Başkanı** : Prof. Dr. Harun ÜLGER

**İmzası** :



ASLINA AYKIRI

  
**Prof. Dr. Harun ÜLGER**  
 Erciyes Üniversitesi  
 Hayvan Deneyleri  
 Yerel Etik Kurul Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Muhammed AKTOPRAK  
**Doğum Tarihi** : 08.07.1981  
**Doğum Yeri** : Tortum/Erzurum  
**Ünvanı** : Biyolog  
**Medeni Durumu** : Evli

### İLETİŞİM BİLGİLERİ

**Adres** : Kındam Mahallesi 1876. Sokak Güneş Sitesi No: 12 / KIRŞEHİR  
**Telefon** : 0 505 889 40 86  
**E-mail** : lidersg@gmail.com

### EĞİTİM DURUMU

<b>Derece</b>	<b>Kurum</b>	<b>Mezuniyet Tarihi</b>
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri	Devam ediyor
Tezsiz Yüksek Lisans	AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum	2006
Lisans	AÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji, Erzurum	2004
Ön Lisans	AÜ Açıköğretim Fakültesi Adalet, Eskişehir	2015

### İŞ DENEYİMİ

<b>Yıl</b>	<b>Kurum</b>	<b>Görev</b>
2015-	Kırşehir Çözüm Temel Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2014-2015	Kırşehir Uğur Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni
2008-2012	Nextpharma İlaç Paz.Tic.A.Ş.	Bölge Müdürü
2005-2008	Erzurum Elit Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni

### Yabancı Dil

İngilizce