



**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PREPUBERTAL DÖNEM SÜRESİNCE YAVRU SIÇANLARDA  
MONOSODYUM GLUTAMAT'A MARUZİYETİN ÖĞRENME  
VE NÖRODAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Arş. Gör. Dr. Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi ÖYP Koordinasyon Birimi tarafından  
ÖYP05543-DR-13 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez. No: 169**

**ISPARTA-2018**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/04//2018

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

Üye : Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa SAYGIN  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Halil AŞCI  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hasan Basri SAVAŞ  
Alaaddin Keykubat Üniversitesi

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

.....  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

“Prepubertal Dönem Süresince Yavru Sıçanlarda Monosodyum Glutamat’a Maruziyetin Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkileri” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM

Danışman

Duygu KUMBUL DOĞUÇ

## TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim boyunca desteğini hiç bir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam ve tez danıőmanım Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOğU'a, bilgisi ve bilimsel deneyimiyle eğitimimde bŸyŸk katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Fatih GÖLTEKİN'e, birlikte çalıőtıęımız sŸre içinde yardımlarını eksik etmeyen başta Dr. İlter İLHAN olmak Ÿzere tŸm değerli asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar çalıőanlarına, bu gŸnlere onların sayesinde geldiğim annem ve babama, can yoldaőım eőime ve beni sabırla bekleyen kızıma teőekkŸrlerimi sunarım.

**Dr. Halil İbrahim BŸYÖKBAYRAM**

**Isparta, 2018**

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI .....</b>	<b>ii</b>
<b>BEYAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>xi</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Gıda Katkı Maddeleri .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Kullanım Amaçları.....	3
2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinde Aranan Nitelikler ve Kullanımlarında Temel İlkeler .....	3
2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenliği İle İlgili Kuruluş ve Yasal Düzenlemeler .....	4
2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirilmesi .....	7
2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması .....	9
2.1.6. Monosodyum Glutamat .....	12
<b>2.2. Öğrenme ve Hafıza .....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Öğrenme ve Hafızanın Tanımı ve Hafızanın Sınıflandırılması .....	14
2.2.2. Öğrenme ve Hafızada Hipokampusün Rolü .....	16
2.2.3. Öğrenme ve Hafızanın Biyokimyasal Mekanizmaları .....	17
2.2.4. Öğrenme ve Hafızada Rol Alan Reseptörler .....	20
2.2.4.1. Glutamat ve Reseptörleri .....	20
2.2.4.1.1. Öğrenme ve Hafızada Glutamat Reseptörleri .....	23
2.2.4.2. Asetilkolin ve Reseptörleri .....	24
2.2.4.2.1. Öğrenme ve Hafızada Asetilkolin Reseptörleri.....	25
2.2.4.3. Serotonin ve Reseptörleri .....	26
2.2.4.3.1. Öğrenme ve Hafızada Serotonin Reseptörleri.....	26

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Deneş Hayvanları .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Monosodyum Glutamat.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Kullanılan Gereçler .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Kullanılan Çözeltiler .....</b>	<b>32</b>
3.5.1. Numune çözeltileri .....	32
3.5.2. Poliakrilamid Jel Çözeltileri .....	32
3.5.3. SDS-PAGE ve Western Blot Çözeltileri .....	33
3.5.4. Antikor Çözeltileri .....	33
<b>3.6. Yöntem.....</b>	<b>34</b>
3.6.1. MSG Uygulanması.....	34
3.6.2. Öğrenme Deneyleri ve Davranışsal Testler .....	35
3.6.2.1. Morris Su Labirenti Testi (Morris Water Maze Test) .....	35
3.6.2.1.1. Deneş Prosedürü .....	37
3.6.2.2. Açık Alan Testi (Open Field Test).....	38
3.6.2.2.1 Açık Alan Test Prosedürü.....	39
3.6.2.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test) .....	40
3.6.3. Hipokampusların Eldesi .....	41
3.6.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS- PAGE).....	43
3.6.5. Western Blot .....	44
<b>3.7. İstatistiksel Analiz .....</b>	<b>46</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Morris Su Labirenti Verileri.....</b>	<b>48</b>
4.1.1. Egzersiz Dönemi Verileri .....	48
4.1.2. Probe Test Verileri .....	54
4.1.3. Görünür Platform Verileri .....	54
<b>4.2. Açık Alan (<i>Open Field</i>) Testi Verileri .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Zorlanmış Yüzme Testi Verileri .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4. Reseptör Konsantrasyonları .....</b>	<b>57</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>70</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>72</b>

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>73</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>87</b>
<b>MATERYAL KULLANIMI İZİNİ TALEP FORMU .....</b>	<b>87</b>
<b>MATERYAL KULLANIM İZİNİ.....</b>	<b>88</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>89</b>
<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....</b>	<b>90</b>
<b>ETİK KURUL ONAY BELGESİ (Sayfa 1/2) .....</b>	<b>91</b>
<b>ETİK KURUL ONAY BELGESİ (Sayfa 2/2) .....</b>	<b>92</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADI</b>	: Acceptable Daily Intake
<b>ADME</b>	: Absorbtion, Distribution, Metabolism, Eimination
<b>AMPA</b>	: $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4- izoksazol propiyonik asit
<b>ANOVA</b>	: Analysis of Variance
<b>ANS</b>	: Food Additives and Nutrient Sources Added to Food
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>CA</b>	: Cornu Ammonis
<b>CAC</b>	: Codex Alimentarius Commission
<b>CaMKII</b>	: Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz 2
<b>CCFAC</b>	: Codex Committee on Food Additives and Contaminants
<b>CNS</b>	: Central Nervous System
<b>EFSA</b>	: European Food Safety Authority
<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>GABA</b>	: Gama amino bütirik asit
<b>GRAS</b>	: Generally recognised as safe
<b>IFIC</b>	: International Food Information Council
<b>INS</b>	: International Numbering System
<b>JECFA</b>	: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
<b>LTD</b>	: Long Term Depression
<b>LTP</b>	: Long Term Potentiation
<b>mAChR</b>	: Muskarinik Asetilkolin Reseptörü
<b>MRL</b>	: Maximum Residue Limit



<b>MSG</b>	: Monosodyum Glutamat
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>nAChR</b>	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
<b>NMDA</b>	: N-Metil D-Aspartat
<b>NMDAR</b>	: NMDA Reseptörü
<b>NOAEL</b>	: No Observed Adverse Effect Level
<b>PVDF</b>	: Polivinil Diflorid
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SDÜ</b>	: Süleyman Demirel Üniversitesi
<b>TTBS</b>	: Tween 20-Tris Buffered Saline
<b>WHO</b>	: World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Monosodyum Glutamat'ın Formülü .....	12
Şekil 2. Hipokampus ve entorinal korteks arasındaki bağlantılar. ....	17
Şekil 3. Glutamat Reseptörleri .....	21
Şekil 4. NMDA Reseptörünün Yapısı. ....	22
Şekil 5. Morris Su Labirentinin şematik görünümü .....	35



## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonel Sınıflaması.....	10
<b>Tablo 2.</b> Glutamat Türevleri ve E Kodları.....	13
<b>Tablo 3.</b> Deney Grupları.....	29
<b>Tablo 4.</b> Açık Alan Testi Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	55
<b>Tablo 5.</b> Açık Alan Testi Verilerinin Farklı Cinsiyetlerde Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	56
<b>Tablo 6.</b> NR2A ve NR2B Ortalama Reseptör konsantrasyonları .....	58
<b>Tablo 7.</b> 5-HT <sub>2A</sub> ve nAChR $\alpha$ 7 Ortalama Reseptör konsantrasyonları .....	58

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> Hedef Platformu Bulma Sürelerinin Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	48
<b>Grafik 2.</b> Farklı Gruplarda Platformu Bulma Sürelerinde Günlere Göre Değişimler .....	49
<b>Grafik 3.</b> Farklı Gruplarda Dış Kadrandaki Geçirilen Sürelerde Günlere Göre Değişimler .....	50
<b>Grafik 4.</b> Dış Kadrandaki Geçirilen Sürelerin Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	50
<b>Grafik 5.</b> Kat Edilen Yolların Günlere Göre Değişimi .....	51
<b>Grafik 6.</b> Kat Edilen Yolların Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	52
<b>Grafik 7.</b> Ortalama Yüzme Hızlarında Günlere Göre Değişim.....	53
<b>Grafik 8.</b> Ortalama Yüzme Hızlarının Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	53
<b>Grafik 9.</b> ProbeTestte Hedef Kadrandaki Geçirilen Süreler .....	54
<b>Grafik 10.</b> Görünür Platformu Bulma Sürelerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması ..	55
<b>Grafik 11.</b> Hareketsiz Kalınan Sürelerin Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	57

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Deney hayvanlarına ait görseller .....	29
<b>Resim 2.</b> Öğrenme Laboratuvarı ve Morris su Labirenti.....	36
<b>Resim 3.</b> Su tankında bir sıçanın tepe kamerasından görünüşü .....	37
<b>Resim 4.</b> Açık Alan Testi düzeneği ve tepe kamerasından görünüşü .....	40
<b>Resim 5.</b> Zorlanmış Yüzme Testi Sistemi ve Tepe Kamerasından Görünüşü.....	41
<b>Resim 6.</b> Hipokampus çıkarmada kullanılan aparatlar .....	42
<b>Resim 7.</b> Bio rad Mini Protean 3 sistemi ve yürütme tankı içinde elektroforeze hazır jeller.....	44
<b>Resim 8.</b> Transfer sonrası PVDF membran görünümü .....	45
<b>Resim 9.</b> BCIP/NBT içerisinde bekleyen boyanmış PVDF membranlar .....	45
<b>Resim 10.</b> NR2A reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü .....	59
<b>Resim 11.</b> NR2B reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü .....	59
<b>Resim 12.</b> 5-HT <sub>2A</sub> reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü .....	60
<b>Resim 13.</b> nAChR $\alpha 7$ reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü .....	60

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Monosodyum glutamat (MSG), gıdalarda lezzet artırıcı olarak yaygın şekilde kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Birçok hazır gıdada bulunmakla birlikte özellikle pane harcı, köfte harcı, sucuk, salam, hazır çorbalar, et suyu tabletleri, tavuk suyu tabletleri, cipsler ve bazı konserveleler MSG'nin sıklıkla kullanıldığı hazır gıdalardır (1).

MSG 1909 yılında ilk kez bitkisel kaynaklı olarak üretilmeye başlanmış olup, 1950'lerden itibaren bakteriyel fermentasyon yoluyla elde edilmeye başlanmıştır (2). Yaklaşık 100 yıllık geçmişi olan bu katkı maddesi ile ilgili pek çok klinik ve deneysel araştırma yapılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration: FDA), gıdalara MSG eklenmesini genel olarak güvenli (generally recognised as safe: GRAS) şeklinde değerlendirmektedir (3). Bu nedenle, birçok katkı maddesinde güvenli doz belirlenmesinde kullanılan yan etki gözlenmeyen maksimum doz (No Observed Adverse Effect Level: NOAEL) ve günlük kabul edilebilir alım miktarı (Acceptable Daily Intake: ADI) değerleri MSG için belirlenmemiştir. MSG, her ne kadar FDA tarafından güvenli olarak değerlendirilse de, yapılan çalışmalarda MSG'nin birçok olumsuz etkisinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle glutamatın merkezi sinir sisteminde (MSS) en önemli uyarıcı nörotransmitter olması, araştırmacıları MSG'nin sinir sistemi üzerine olan muhtemel etkileri üzerine yoğunlaşmasına neden olmuş ve yapılan birçok çalışmalarda, MSG'nin beyin üzerine toksik etkilerinin olduğu bulunmuştur (4-9).

MSS'de en yüksek miktarda bulunan ve temel uyarıcı özellikli nörotransmitter olan glutamat, etkisini birçok alt tipi olan glutamat reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Glutamat reseptörlerinin, beyinde en çok buldukları bölge, öğrenme ve hafızanın oluşumu ile ilgili beyin bölgesi olan hipokampüstür (10, 11). Dolayısıyla MSG'nin olası toksik etkilerinin hipokampüste de görülmesi muhtemeldir.

Hipokampüste öğrenme ve hafızanın oluşmasında glutamat reseptörleri, bu reseptörlerden de özellikle NR2A ve NR2B alt tipleri uzun dönem güçlendirme (Long term potentiation, LTP) ve uzun dönem baskılamayı (Long term depression,

LTD) kapsayan sinaptik plastisite adı verilen değişimin oluşmasında oldukça önemlidir (12, 13). Sinaptik plastisite, iç ve dış uyarılara bağlı olarak sinapsların yapı ve fonksiyonlarındaki uzun dönemde oluşan değişim olarak tanımlanabilir. Bu değişiklikler; dendritik dallanmalarda artış ya da azalma, sinaps oluşumu ya da mevcut sinapsın ortadan kalkması, yeni nöron oluşumu, apoptoz ve hücrelerin ömrünü ya da direncini etkileyen metabolik süreçlerdeki bazı değişiklikleri ifade etmektedir (14).

Glutamat reseptörleri dışında, serotonin reseptörlerinden özellikle 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri de hem hipokampal aktivitenin düzenlenmesinde, hem de öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (15, 16). Ayrıca nikotinik asetilkolin reseptörlerinden, özellikle nAChR  $\alpha$ 7 subtipinin hipokampüste yüksek oranda eksprese edildiği ve sinaptik iletimin düzenlenmesinde, plastisitede ve nörodejeneratif süreçlerde önemli bir rolünün olduğu ifade edilmiştir (17).

Bu doğrultuda yapılan pek çok çalışmada, MSG tüketiminin öğrenme ve hafızaya olumsuz etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (18-23).

Çalışmamızda öğrenmenin en yoğun ve kritik olduğu çocukluk döneminde farklı dozlarda MSG'ye maruziyetin her iki cinsiyette öğrenme ve hafıza üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Buna yönelik insanlarda çocukluk döneminde alınan günlük ortalama MSG dozları incelenmiş ve çalışmada kullanılacak dozlar bu çalışma esas alınarak belirlenmiştir (24). MSG sıçanlara çocukluk dönemi boyunca (6 hafta) oral gavaj ile uygulanmış, ardından mekansal öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite düzeylerini, ayrıca nörodavranışsal açıdan anksiyete ve depresyon durumlarını değerlendirmek amacıyla Morris Su Labirenti Testi, Açık Alan Testi ve Zorlanmış Yüzme Testi uygulanmıştır. Ardından sakrifiye edilen sıçanların hipokampus dokularında, NMDAR'lerden (N-Metil D-Aspartat reseptörleri) NR2A ve NR2B alt tiplerinin, nikotinik asetilkolin reseptörlerinden (nAChR)  $\alpha$ 7 alt tipinin ve serotonin reseptörlerinden 5-HT<sub>2A</sub> alt tipinin konsantrasyonları Western Blot yöntemi ile saptanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Gıda Katkı Maddeleri

#### 2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Kullanım Amaçları

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission: CAC) tarafından gıda katkı maddesinin tanımı şu şekildedir: Gıda katkı maddeleri, ‘tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında, gıdalara teknolojik (organoleptik dahil) amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan veya dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddelerdir’ (25).

Gıda katkı maddelerinin kullanım alanları yine Codex Alimentarius tarafından detaylı olarak listelenmiştir (26). Buna göre gıda katkı maddeleri gıdalarda asitlik düzenleme, renklendirme, kıvam arttırma, yapışmayı önleme, köpüklenmeyi önleme, lezzet arttırma vb. amaçlar için kullanılmaktadır. Tablo 1’de CAC’a göre gıda katkı maddelerinin kullanım amaçlarına göre sınıflaması listelenmiştir.

#### 2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Nitelikler ve Kullanımlarında Temel İlkeler

Gıda katkı maddelerinin ticari olarak kullanılabilmesi için bir takım kriterleri karşılaması gerekmektedir.

Kullanılmakta olan ya da kullanılması önerilen tüm gıda katkı maddelerinin toksikolojik çalışmaları yapılmalıdır. Bu çalışmalar sonunda günlük kabul edilebilir alım miktarı (ADI) belirlenir. ADI değeri, yapılan toksikolojik değerlendirme sonrası elde edilen ve oral olarak alındığında yüksek dozlarda gösterdiği toksik etkinin görülmediği maksimum doz değerinin (NOAEL) güvenlik faktörü olan 100’e



bölünmesiyle elde edilir. ADI değeri, tüm gıda katkı maddeleri için ayrı ayrı belirlenmekte ve yetişkin bir insanın ömür boyu zarar görmeden tüketebileceği günlük katkı maddesi miktarı olarak ifade edilmektedir (25).

Ayrıca Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre gıda katkı maddelerinde bulunması gereken özellikler şu şekilde özetlenebilir:

- a. Tüketiciler için faydalı ve avantajlı olmalıdır.
- b. Bilimsel kanıtlara dayalı olarak önerilen katkı maddesinin kullanım miktarı tüketici sağlığı açısından güvenlik riski oluşturmamalıdır.
- c. Kullanımı için makul teknolojik bir ihtiyaç bulunmalıdır.
- d. Kullanımı tüketiciyi yanıltmamalıdır.
- e. Gıdanın besin değerini korumalıdır.
- f. Gıdanın doğasını, içeriğini ve kalitesini değiştirmeden stabilite ve kalitesinin korunmasına yardımcı olmalı ya da gıdanın organoleptik özelliklerini geliştirmelidir.
- g. Özel beslenme gereksinimi olan tüketiciler için üretilmiş gıdalarda gerekli bileşenleri sağlamalıdır.

### **2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenliği İle İlgili Kuruluş ve Yasal Düzenlemeler**

Gıda katkı maddelerinin uluslararası düzeyde değerlendirilmesi ilk olarak 1955 yılında İsviçre'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından ortaklaşa yapılan konferans ile başlamıştır (27). Bu konferans temelinde 1956 yılında kurulan, gıda katkı maddelerinin güvenliği ile ilgili en eski ve en aktif kurum olan FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesi (JECFA) ile birlikte aşağıda bu konuda önemli uluslararası ve ulusal kuruluşlar listelenmiştir (28).

### **1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) :**

1956 yılında kurulan JECFA, gıda katkı maddelerinin güvenliğini değerlendirmenin yanında kirletici maddelerin, doğal olarak ortaya çıkan zehirli maddelerin ve hayvansal gıdalardaki veteriner ilaçlarının kalıntılarını da değerlendirmektedir. Kuruluşundan bugüne kadar 2600'ün üzerinde gıda katkı maddesini değerlendirmiştir.

JECFA, mevcut toksikolojik veriler ve diğer bilgileri kullanarak gıda katkı maddeleri ve veteriner ilaçları kalıntıları için ADI değerlerini belirler. Ayrıca veteriner ilaçları için maksimum kalıntı limitini (MRL) belirleyerek ilacın doğru şekilde kullanıldığında gıdalarla alınan kalıntı kısmının ADI değerini aşmayacak düzeyde olmasını sağlar. Ayrıca risk ölçümleri yaparak FAO, WHO, CAC ve üye ülkelere tavsiyelerde bulunur. Komiteler yılda iki kere toplanmaktadır. Her toplantının sonunda düzenlenen raporlar JECFA, FAO ve WHO'nun internet sitelerinde yayınlanmaktadır (29).

### **2. Codex Alimentarius Commission (CAC):** Uluslararası Gıda Kodeks

Komisyonu FAO ve WHO tarafından 1963 yılında kurulmuştur. Basitçe komisyonun amacı, gıda ile ilgili standartları belirlemek, uygulama kurallarını, yönerge ve diğer tavsiyeleri saptayarak Codex Alimentarius'ta yayınlamaktır (30).

Kodeks Komisyonu, farklı konularda çalışan 24 aktif komite ile çalışmalarını yürütmektedir (31). Komisyonun 600'den fazla üyesi bulunmaktadır. Ayrıca 130'un üzerinde hükümet komisyona üyedir ve 40 organizasyon da gözlemci olarak katkı sağlamaktadır. Komisyonun başkan yardımcıları Afrika, Asya, Avrupa, Latin Amerika ve Karayipler, Yakın Doğu, Kuzey Amerika ve Güney Batı Pasifik'in bölgelerinden seçilmektedir (30).

### **3. Codex Committee on Food Additives and Contaminants**

**(CCFAC):** Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonunun komitelerinden biri olan CCFAC'nin görevleri, gıda katkı maddelerinin maksimum kullanım limitlerini belirlemek, toksik analizi yapılacak olan gıda katkı maddelerini öncelik sırasına koyup JECFA'ya toksik çalışma için önermek, gıda katkı maddelerinin fonksiyonel sınıflarını belirlemek, saflık kriterlerini belirlemek, ayrıca gıdaların içinde bulunan katkı maddelerinin tanımlanması için analiz metotları geliştirmektir (32).

**4. Food and Drug Administration (FDA):** Amerika Birleşik Devletleri'nin ulusal bir kuruluşu olsa da tüm dünyada referans kabul edilen Gıda ve İlaç İdaresi katkı maddeleri alanında gıdalarda kullanılan katkıları, gıda içeriklerini ve boya katkılarını değerlendirir. Bu maddelerin bileşenlerini, özelliklerini, tüketilecek miktarlarını göz önüne alarak orta ve uzun vadeli sağlık etkilerini ve çeşitli güvenlik faktörlerini değerlendirir. Bunun yanında FDA 2 grup katkı maddesini güvenlik değerlendirmesi dışında tutar. Birincisi 1958'de düzenlenen gıda katkı maddeleri yasasından önce güvenliği FDA ve Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından kabul edilmiş olan gıda katkı maddeleridir. İkincisi ise GRAS kısaltması ile sınıflanan, güvenli oldukları uzmanlarca bilimsel delillere dayanarak veya 1958 öncesinde kapsamlı kullanımlarına dayanarak kabul edilmiş gıda katkı maddeleridir. Bununla birlikte üreticiler FDA'dan bir katkı maddesinin GRAS statüsü belirlenmesini isteyebilmektedir (33).

**5. International Food Information Council (IFIC):** Uluslararası Gıda Bilgi Konseyi, 1991'de Washington'da kurulan kar amacı gütmeyen, bir eğitim vakfidir. Kuruluşun faaliyetleri gıda güvenliği konusunda araştırma yapmak, yapılan araştırma ve bilimsel çalışmalarını paylaşmak, raporlamak, bilimsel konferanslarla katılımcıları bir araya getirmek, medya yoluyla toplumu bilgilendirmek ve profesyonel anlamda eğitim düzenlemek olarak özetlenebilir (34).

**6. European Food Safety Authority (EFSA):** 2002 yılında Avrupa Birliği tarafından uygulamaya geçirilen Genel Gıda Kanunu temelinde kurulmuştur (35). EFSA'nın ana sorumlulukları gıda güvenliği ile ilgili risk ölçümü yapmak ve risk iletişimini sağlamaktır (28). EFSA'nın çalışmalarının çoğu Avrupa Komisyonu, Avrupa Parlamentosu ve üye devletlerin bilimsel tavsiye talepleri üzerine gerçekleşir (36). EFSA, çalışmalarını alanında uzman kişilerden oluşan 10 adet bilimsel panel ile yürütmektedir. Bu paneller çalışma alanları ayrılmış olarak hayvan sağlığı, hayvan yemlerindeki katkı maddeleri, biyolojik tehlikeler, kontaminantlar, diyetetik ürünler, gıda katkı maddeleri, gıdaya temas eden maddeler, enzimler, tatlandırıcılar ve işleme yardımcıları, genetiği değiştirilmiş organizmalar, bitki sağlığı ve bitki koruma ürünleri alanlarında çalışma yapmaktadır (35).

Ülkemizde 29.12.2011 tarihinde uygulamaya koyulan ve 2013 yılında güncellenerek resmi gazetede 30.06.2013 tarih ve 28693 sayı ile yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, gıdalarda kullanılacak katkı maddelerini, kullanım şartlarını, sınırlamaları ve düzenlemeleri içermektedir. Yönetmelik 1333/2008/EC sayılı Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Tüzüğüne paralel olarak hazırlanmış olup katkı maddelerinin sınıflandırılması ve tanımlanmasında E kodları temel alınmıştır (37). 2017 yılında ise Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddelerinin Spesifikasyonları Hakkında Yönetmelik yayınlanmış, bu düzenleme ile gıda katkı maddelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirtilerek saflıkları ile ilgili kriterler düzenlenmiştir (38).

#### **2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirilmesi**

Bir gıda katkı maddesi kullanıma sunulmadan önce güvenliği hakkında bir takım testlere tabi tutulur. Bu testler, toksikokinetik çalışmaları, genotoksik çalışmaları, akut-subkronik-kronik toksisite testlerini, üreme ve gelişimsel toksisite testlerini içerir. Toksikokinetik çalışmalarda ADME olarak kısaltılan (absorbtion, distribution, metabolism, excretion) emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçleri incelenir. Genotoksik testlerde mutasyon analizleri ve gen hasarı analizleri yapılırken toksisite deneylerinde tüm doku ve organlarda histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikler incelenir. Ek olarak insan çalışmaları, immünotoksisite ve hipersensitivite çalışmaları da yapılabilmektedir. İnsan çalışmaları, ancak önceden yapılmış hayvan çalışmaları ve diğer benzer çalışmalarda yeterli veri olması durumunda yapılabilir. İnsan çalışmaları genel olarak tolerans çalışmaları ve emilim, metabolizma, dağılım, atılım süreçlerini inceleyen testler olarak 2 ana gruba ayrılır (39).

FDA tarafından gıda katkı maddelerinin güvenliği ile ilgili yapılması önerilen toksisite test prensipleri, 2000 yılında yayınlanan ve 2007’de gözden geçirilmiş olan kılavuzda detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Özet olarak toksikolojik değerlendirme FDA’ya göre şu aşamalardan oluşur (40):

**1. Kısa dönem Genetik Toksikite Testleri:** Bu testler bakteri mutasyon testleri, in vitro memeli hücrelerinde mutasyon testleri ve in vivo memeli eritrosit mikronükleus testlerini içermektedir.

**2. Akut Oral Toksikite Testleri:** Çoğu akut toksisite testinde, test edilmek istenen madde deney hayvanlarına görece yüksek dozda uygulanır ve 1-2 haftalık gözlem sonrasında nekropsi yapılarak olası etkiler değerlendirilir.

**3. Kısa Dönem Toksikite Çalışmaları:** Bu çalışmalar ileri aşamada yapılacak olan subkronik ve kronik toksisite çalışmalarında verilecek dozların belirlenmesine, bazı durumlarda NOAEL dozlarının belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Katkı maddesi deney hayvanlarına (kemirici olarak sıçan veya fare kullanılır, kemirici olmayan hayvanlardan köpekler tercih edilir) en az 3 farklı dozda 2-4 hafta boyunca her gün uygulanır. Uygulama süresi içinde hayvanların vücut ağırlıkları, yiyecek alımları, hareketleri, postürleri gibi özellikleri günlük olarak değerlendirilir, ayrıca fizik muayeneleri düzenli olarak yapılır. Yine düzenli olarak kan örnekleri alınarak hematolojik parametreleri, rutin biyokimyasal belirteçleri değerlendirilir, idrar örnekleri mikroskopik ve biyokimyasal olarak analiz edilir. Test sonunda tüm organ ve dokuların spesifik olarak patolojik ve/veya mikroskopik incelemeleri yapılır.

**4. Subkronik Toksikite Çalışmaları:** Kemirici ve kemirici olmayan hayvanlarda gerçekleştirilen bu çalışmalar, genelde 3 aylık uygulama süresini kapsar ancak bu süre 12 aya kadar uzatılabilir. Değerlendirme kısa dönem toksisite çalışmalarındaki gibi yapılır.

**5. Kronik Toksikite Çalışmaları:** En az 1 yıl süreyle uygulanan kronik toksisite çalışmaları uzamış ve tekrarlanan dozda uygulanan katkı maddesinin toksikolojik karakterinin belirlenmesine ve NOAEL dozunun belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

**6. Karsinojenite çalışmaları:** Kemirgenlere en az 2 yıl boyunca her gün uygulama yapılmak suretiyle gerçekleştirilen çalışmalardır.

**7. In Utero maruziyet fazı çalışmaları:** Kemirgenlere çiftleşmeden 10 hafta öncesinden başlanarak çiftleşme, gebelik, doğum ve emzirme dönemleri boyunca katkı maddesi uygulanır. Bu süre içinde anne-baba ve yavrular gözlem, fizik

muayene ve çeşitli testlerle değerlendirilir. Süre bitiminde nekropsi uygulanarak histopatolojik incelemeler yapılır.

**8. Üreme ve gelişme çalışmaları:** Katkı maddesinin sonraki nesillerde ortaya çıkarabileceği muhtemel etkileri ve üreme sistemlerine etkilerini incelemek için yapılır.

**9. Nörotoksisite çalışmaları:** Kısa dönem, subkronik ve kronik toksisite çalışmalarında katkı maddesinin nörotoksik etkileri de rutin olarak değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme, deney hayvanlarında nörotoksisiteyi işaret eden davranışsal, nörolojik ve fizyolojik değişiklikleri saptayan test ve değerlendirmeleri, ayrıca merkezi ve periferik sinir sistemindeki yapıların ayrı ayrı histopatolojik incelemesini içermektedir. Bu testler sonucu nörotoksik etkiler belirtildikten sonra, gerekli görüldüğü halde daha spesifik testlerle nörotoksik etkiler değerlendirilebilmektedir.

Yapılan tüm bu çalışmaların sonucunda ana hedef, katkı maddesi olarak kullanılacak maddenin ADI düzeyini belirlemektir. Uluslararası düzeyde bu görevi JECFA üstlenmiştir.

#### **2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması**

Gıda katkı maddeleri Codex Alimentarius tarafından 1989 yılında fonksiyonlarına göre sınıflandırılarak 23 gruba ayrılmış, 2016 yılında Kodeks Komisyonu'nun 39. sezon toplantısına göre yeniden güncellenerek sınıf sayısı 27'ye çıkarılmıştır (26, 41). Avrupa Birliği'nde ise gıda katkı maddeleri E kodu ile numaralandırılmaktadır. E kodlarına göre de ayrı bir sınıflandırma mevcuttur. CAC, E kodlarını temel alarak INS (International Numbering System) kodlarını hazırlamıştır. Aşağıda CAC'a göre gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması Tablo 1'de verilmiştir (41).

**Tablo 1.** Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonel Sınıflaması

	<b>FONKSİYONEL SINIF</b>	<b>TANIM</b>	<b>ALT SINIFLAR (TEKNOLOJİK FONKSİYONLAR)</b>
1.	<b>Asitlik Düzenleyiciler</b>	Gıdanın asitlik veya alkaliliğini kontrol eder.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Asit</li><li>• Asitleştirici</li><li>• Asitlik Düzenleyici</li><li>• Alkali</li><li>• Tampon</li><li>• Tamponlayıcı Ajan</li><li>• pH Ayarlayıcı Ajan</li></ul>
2.	<b>Topaklanmayı Önleyiciler</b>	Gıda partiküllerinin birbirine yapışmasını önler.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Topaklanma Önleyici</li><li>• Yapışma Önleyici</li><li>• Kurutucu Ajan</li></ul>
3.	<b>Köpürmeyi Önleyiciler</b>	Köpürmeyi önler ya da azaltır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Köpüklenmeyi Önleyici</li><li>• Köpüksüzleştirici</li></ul>
4.	<b>Antioksidanlar</b>	Gıdayı oksidasyondan koruyarak ömrünü uzatır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Esmerleşmeyi Önleyici</li><li>• Antioksidan</li><li>• Antioksidan Sinerjisti</li></ul>
5.	<b>Renksizleştiriciler</b>	Pigment içermeden gıdayı renksizleştirir.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Renksizleştirici</li></ul>
6.	<b>Hacim Vericiler</b>	Enerji değerini değiştirmeden gıdanın hacmini artırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hacim Verici</li><li>• Doldurucu</li></ul>
7.	<b>Karbonatlaştırıcı Ajanlar</b>	Gıda maddesinde karbonatlaşmayı sağlar	<ul style="list-style-type: none"><li>• Karbonatlaştırıcı</li></ul>
8.	<b>Taşıyıcılar</b>	Gıda katkı maddesi veya besin maddesini, işlenmesini kolaylaştırmak amacıyla fonksiyonunu değiştirmeden çözdürmek, seyreltmek ya da başka bir şekilde fiziksel olarak değiştirmeye yarar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Taşıyıcı</li><li>• Taşıyıcı Çözücü</li><li>• Dilüent ya da Diğer Katkı maddeleri</li><li>• Kapsülsüzleştirici</li><li>• Besin Taşıyıcı</li></ul>
9.	<b>Renklendiriciler</b>	Gıdaya renk ekler ya da rengini düzenler.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Boya</li><li>• Dekoratif Pigment</li><li>• Yüzey Boyayıcı</li></ul>
10.	<b>Renk Tutucular</b>	Gıdanın rengini korur, stabilize eder ya da yoğunlaştırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Renk Ekleyici</li><li>• Renk Sabitleyici</li><li>• Renk Tutucu</li><li>• Renk stabilize edici</li></ul>
11.	<b>Emülsifiye Ediciler</b>	Gıdadaki iki ya da daha fazla fazı tek bir emülsiyon haline getirir.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bulanıklaştırıcı</li><li>• Kristalizasyon Önleyici</li><li>• Yoğunluk Ayarlama Ajanı</li><li>• Dağıtıcı Ajan</li><li>• Emülsifiye Edici</li><li>• Plastikleştirici</li><li>• Yüzey Aktif Ajan</li><li>• Süspansiyon Ajanı</li></ul>
12.	<b>Emülsifiye Edici Tuzlar</b>	İşlenmiş gıdalarda proteinleri yeniden düzenleyerek yağ ayrışmasını önler.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Emülsifiye Edici Tuz</li><li>• Birleştirici Tuz</li></ul>
13.	<b>Sıkılaştırıcı Ajanlar</b>	Meyve sebze dokularını sıkılaştırır ya da jelleştirici ajanlarla etkileşime girerek jel oluşumunu ya da jelin sağlamlaşmasını sağlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sıkılaştırıcı Ajan</li></ul>

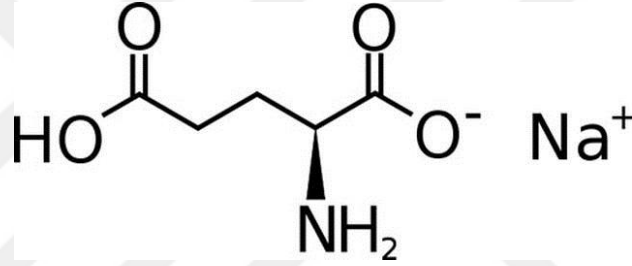
**Tablo 1.** Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonel Sınıflaması (Devam)

	FONKSİYONEL SINIF	TANIM	ALT SINIFLAR (TEKNOLOJİK FONKSİYONLAR)
14.	<b>Lezzet Arttırıcılar</b>	Gıdanın tadı veya kokusunu arttırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lezzet Arttırıcı</li><li>• Lezzet Sinerjisti</li></ul>
15.	<b>Un İşleme Ajanları</b>	Unun rengini ya da pişme kalitesini arttırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hamur Şekillendirici</li><li>• Hamur Sağlamaştırıcı</li><li>• Un ağartıcılar</li><li>• Un İyileştirici</li><li>• Un İşleme Ajanı</li></ul>
16.	<b>Köpürtme Ajanları</b>	Gaz fazındaki bir ajanın sıvı ya da katı fazda homojen olarak dağılmasını sağlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Havalandırma Ajanı</li><li>• Köpürtme Ajanı</li><li>• Çırpma Ajanı</li></ul>
17.	<b>Jelleştirici Ajanlar</b>	Jel oluşumu yoluyla gıdaya bir doku kazandırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Jelleştirici Ajan</li></ul>
18.	<b>Parlatıcı Ajanlar</b>	Gıdanın dış yüzüne sürülerek koruyucu bir katman ya da parlak bir görünüm kazandırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kaplama Ajanı</li><li>• Film Oluşturucu</li><li>• Cilalama Ajanı</li><li>• Parlatma Ajanı</li><li>• Kapatma Ajanı</li><li>• Yüzey Pürüzsüzleştirici</li></ul>
19.	<b>Nem Tutucular</b>	Gıdanın kurummasını önler.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nemlendirici</li><li>• Su-Nem Tutucu</li><li>• Islatici Ajan</li></ul>
20.	<b>Paketleme Gazları</b>	Oksidasyon ve bozulmayı önlemek amacı ile gıdanın bulunduğu pakete doldurulan gaz.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Paketleme Gazı</li></ul>
21.	<b>Koruyucular</b>	Mikroorganizmaların neden olduğu bozulmadan gıdayı korur.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Antimikrobiyal Koruyucu</li><li>• Antimikrobiyal Sinerjisti</li><li>• Küf Önleyici</li><li>• Antimikotik</li><li>• Bakteriyofaj Kontrol Ajanı</li><li>• Fungostatik Ajan</li><li>• Koruyucu</li></ul>
22.	<b>İtici Gazlar</b>	Gıdanın bir paketten çıkmasını sağlayan gaz.	<ul style="list-style-type: none"><li>• İtici Gaz</li></ul>
23.	<b>Kabartıcı Ajanlar</b>	Gaz açığa çıkarıp hamurun hacminin artmasını sağlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kabartıcı Ajan</li></ul>
24.	<b>İyon Tutucular</b>	Oksidasyona yol açan bazı iyonları şelatlayarak gıdanın kalite ve ömrünü arttırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• İyon Tutucu</li></ul>
25.	<b>Stabilizatörler</b>	Gıdadaki iki ya da daha fazla bileşenin tekdüze hale gelmesini sağlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kolloid Stabilizatör</li><li>• Emülsiyon Stabilizatör</li><li>• Köpük Stabilizatör</li><li>• Stabilizatör</li></ul>
26.	<b>Tatlandırıcılar</b>	Şekerlerin haricinde gıdaya tat vermeyi sağlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kütle Tatlandırıcı</li><li>• Yoğun Tatlandırıcı</li><li>• Tatlandırıcı</li></ul>
27.	<b>Kıvam Arttırıcılar</b>	Gıdanın viskozitesini arttırır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bağlayıcı</li><li>• Şekil Verici Ajan</li><li>• Dolgu Verici Ajan</li><li>• Kıvam Arttırıcı</li></ul>



### 2.1.6. Monosodyum Glutamat

Monosodyum glutamat ve türevleri (Bkz. Tablo 2) sucuk, salam, hazır çorbalar, et suyu tabletleri, tavuk suyu tabletleri, cipsler, konserveleler, köfte harçları, gıda takviyeleri, dondurulmuş mezeler ve krakerler gibi birçok hazır gıdada yaygın olarak kullanılan lezzet artırıcılar sınıfından bir gıda katkı maddesidir (1, 42). MSG'nin tatlı, tuzlu, acı ya da ekşi olmayan bir tadı vardır ve bu tada ilk defa Japonyalı bilim adamı Kikunae Ikeda tarafından 'umami' adı verilmiştir (2). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu tadın sadece MSG'ye has olmadığı, MSG'nin yanı sıra 50'nin üzerinde peptid yapıdaki bileşiğin de umami tadını verdiği tespit edilmiştir. (43).



Şekil 1. Monosodyum Glutamat'ın Formülü

MSG gıda katkı maddesi olmasının haricinde doğal olarak süt, elma, soğan, sarımsak, badem, havuç, et ve yumurta gibi yiyeceklerde de çeşitli konsantrasyonlarda bulunmaktadır (42). MSG'nin gıda katkı maddesi olarak kullanımı uluslararası kuruluşlarca genel olarak güvenli kabul edilmektedir. FDA, MSG'yi GRAS statüsünde değerlendirirken, JECFA tarafından çoğu gıda katkı maddesi için belirlenen ADI değeri MSG için belirlenmemiştir (ADI not specified) (44, 45). Ancak Annex 2 kriterlerine göre gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum miktar (maximum permissible level=MPL) MSG için belirli gıdalardaki kısıtlamaların haricinde her kilogram ya da litre gıda başına 10 gram olarak belirlenmiştir (46). Bununla birlikte tuz yerine kullanılan gıda maddelerinde, çeşniler ve baharatlarda bu limit söz konusu değildir. Bu gıdalarda MSG'nin kullanım sınırı için kılavuzda '*quantum satis*' yani 'yeteri kadar' ibaresi yer almaktadır (47).

MSG için ADI değeri JECFA tarafından belirlenmemesine karşın, EFSA tarafından ANS (Food Additives and Nutrient Sources Added to Food) Paneli'nin 20-22 Haziran 2017 tarihinde yapılan 74. toplantısında Avrupa Komisyonunun talebi üzerine glutamik asit ve türevleri (E 620-625, Bkz. Tablo 2) yeniden değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda nörogelişimsel bir toksisite çalışması kaynak gösterilerek MSG için 3200 mg/kg düzeyinde bir NOAEL dozu, buna bağlı olarak 30 mg/kg düzeyinde bir ADI dozu tespit edilmiştir (47).

Diyetle alınan glutamat oral alımı takiben diğer aminoasitler gibi ince bağırsaklardan aktif transportla mukozal hücrelere alınmaktadır. Burada glutamat transaminasyon ve deaminasyona uğramaktadır. Diyetle alınan glutamatın büyük oranda (%95) bağırsaklarda metabolize edildiği ve burada enerji kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Glutamat bunun yanında prolin, arjinin, glutatyon, glutamin, GABA ve N-asetilglutamat gibi önemli bileşiklerin sentezinde de prekürsör olarak rol oynamaktadır (48-51). Glutamatın plazmaya geçişi doza ve konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. JECFA tarafından oral gavaj ile 30 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda plazma glutamat seviyelerinde artış olduğunu bildirilmiştir (52).

Glutamatın kan-beyin bariyerini geçemediği ifade edilmekte ise de, yapılan çalışmalarda deney hayvanlarına çeşitli dozlarda uygulanan MSG'nin bazı beyin bölgelerinde hasara, nöron harabiyetine ve beyin dokusunda oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir (4, 53-58).

**Tablo 2.** Glutamat Türevleri ve E Kodları (59)

<b>E620</b>	L- Glutamik asit
<b>E621</b>	Monosodyum Glutamat
<b>E622</b>	Monopotasyum Glutamat
<b>E623</b>	Kalsiyum Diglutamat
<b>E624</b>	Monoamonyum Glutamat
<b>E625</b>	Magnezyum Diglutamat

## 2.2. Öğrenme ve Hafıza

### 2.2.1. Öğrenme ve Hafızanın Tanımı ve Hafızanın Sınıflandırılması

Öğrenme, insanın yeni bilgiler kazanması sonucunda davranışlarında oluşan değişiklikleri ifade ederken; hafıza ise öğrenilen bilgilerin beyinde kodlanması, depolanması ve geri çağırılması süreçlerini kapsamaktadır (60).

Yıllar içinde farklı bilim adamları tarafından insan hafızasının işleyişini ortaya koymak için çeşitli hafıza modelleri ortaya konmuştur (61-63). Bu modellerin birbirlerine göre bazı farkları olmasına karşın temelde hafıza, depolanan bilginin türüne göre ve bilginin depolanma zamanına göre sınıflanabilmektedir (60).

Bilginin depolanma süresine göre hafıza kısa dönem hafıza ve uzun dönem hafıza olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bunların dışında çok kısa süreli hafıza ya da duyuşal hafıza, duyuşal kayıt gibi isimlerle anılan bir hafıza türü de Atkinson-Shiffrin modeline göre tanımlanmıştır (61). Duyuşal hafıza, duyu organları ile algılanan bilginin (görme, işitme, dokunma vb.) çok kısa bir süre için saklanması ifade etmektedir. Atkinson modeline göre maksimum bir kaç saniyelik bu sürenin sonunda bilgi ya silinmekte ya da kısa süreli hafızaya kaydedilmektedir.

**Kısa Dönem Hafıza:** Bilgiyi saniyeler - dakikalar için saklama görevini kısa dönem hafıza üstlenmektedir. Çalışan hafıza (*working memory*) terimi çoğunlukla kısa dönem hafıza ile eş anlamlı olarak kullanılsa da, bazı bilim adamları kısa dönem hafıza ile çalışan hafızanın iki ayrı form olduğunu ifade etmektedirler (64). Buna göre kısa dönem hafıza öğrenilen bilginin kısa bir süre için depolanmasından sorumlu iken, çalışan hafıza ise kısa dönem hafızada depolanan bilginin tutulması, düzenlenmesi ve yönetilmesi için dikkatin kullanıldığı çok bileşenli bir sistemin parçasıdır.

Kısa dönem hafıza temelde sözel ve görsel- uzamsal olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Sözel alt sistem, örneğin bir telefon numarasını kısa süreli olarak akılda tutmaya yarar. Bu sistemin de depolama ve geri çağırma olarak iki birimi

mevcuttur. Depolama işlevinden posterior pariyetal korteks sorumlu iken, geri çağırma işlevinden ise Broca alanı sorumludur.

Kısa dönem hafızanın görsel-uzamsal alt sistemi ise nesnelerin görsel şekillerini ve uzaydaki konumlarını akılda tutmaya yaramaktadır. Bu tür bilgiler beyinde frontal ve premotor kortekslerle birlikte pariyetal korteks, inferior temporal korteks ve ekstrastriatal oksipital korteks tarafından düzenlenmektedir (60). Bunun yanında hipokampüsün de kısa süreli topografik hafızanın oluşumunda önemli olduğu ifade edilmiştir (65). Ayrıca görsel ve sözel alt sistemin sol hemisferde, uzamsal alt sistemin ise sağ hemisferde baskın olduğu belirtilmiştir (66).

**Uzun Dönem Hafıza:** Uzun dönem hafıza günler-yıllar süresince bilginin kapasite sınırı olmaksızın kalıcı olarak saklanabildiği ve geri çağırılabilirdiği hafıza türüdür (67). Uzun dönem hafıza, deklaratif (*implicit*) ve deklaratif olmayan (*explicit*) hafıza olmak üzere iki sınıfta incelenir. Deklaratif hafıza insanlar, nesnelere ya da mekanlarla ilgili bilgiler gibi bilgi türlerinin depolandığı, esnek, bilinçli olarak geri çağırılabilen, birbiriyle ilişkilendirilip değiştirilebilen hafıza türüdür. Buna karşın deklaratif olmayan hafıza bilinçli geri çağırma yerine daha çok otomatize olan, motor becerilerin, alışkanlıkların ve şartlanmaların depolandığı hafıza türüdür. Deklaratif hafıza kuvvetle hipokampüs, subikulum ve entorinal korteksin içinde olduğu medial temporal lob ile ilişkili iken, deklaratif olmayan hafıza ise medial temporal lobdan bağımsız olarak neokorteks, serebellum ve bazal ganglionlarla ilişkilidir (60, 68, 69).

Deklaratif hafıza semantik ve epizodik hafıza olmak üzere iki bileşene sahiptir. Epizodik hafıza daha çok kişisel deneyimlerle ilgili ve yaşadığımız olaylara ilişkin mekan, zaman, kişi, neden bilgileri gibi hatıralarla ilişkili iken, semantik hafıza kişisel deneyimlerden çok genel geçer bilgilerle, örneğin ülkelerin başkentleri, renklerin isimleri gibi dış dünyaya ait bilgilerle ilişkilidir (60, 70).

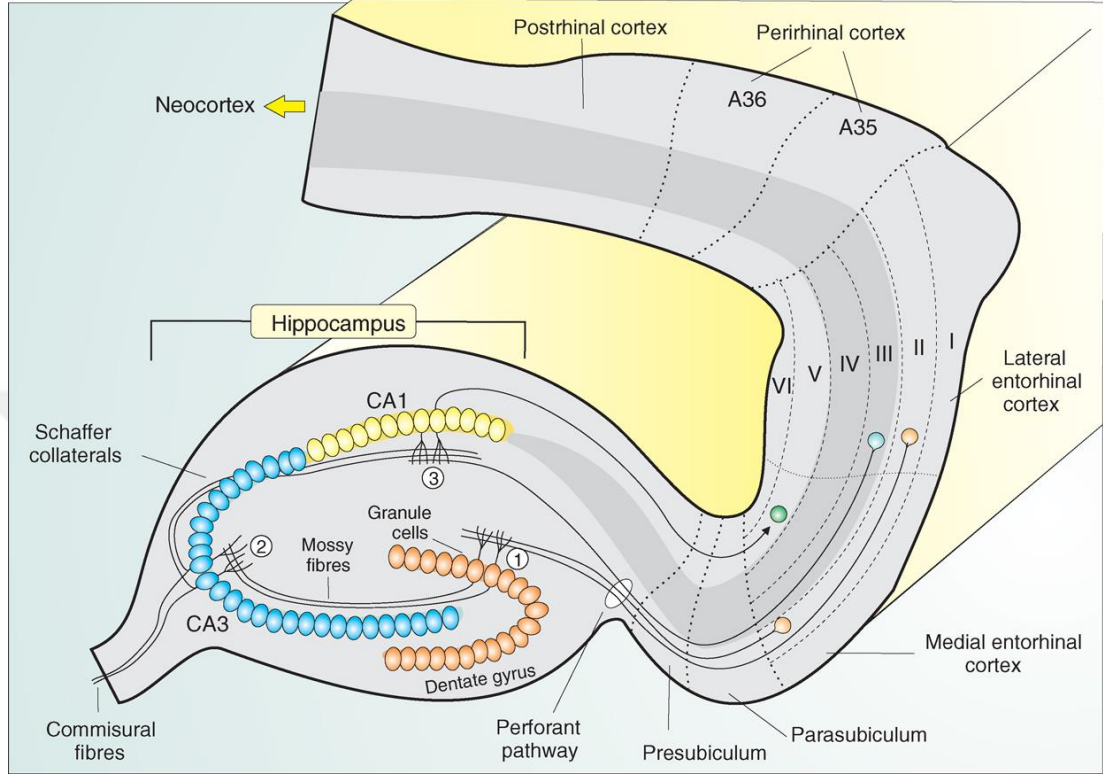
### 2.2.2. Öğrenme ve Hafızada Hipokampüsün Rolü

Hipokampüs beyinde temporal lobun iç kısmında, anteriordan posteriora uzanan, boynuz şeklinde kıvrılmış, lateral ventrikülün medial duvarında bulunan silindirik şekilde bir yapıdır (Şekil 2). Şeklinin mitolojide bir hayvanın ayaklarına benzetilerek hipokampüs adını aldığı bilinmektedir. Ayrıca boynuz benzemesinden dolayı ‘*Cornu Amonis* = Amon Boynuzu’ adını almıştır. Hatta transvers kesitte hipokampüsün bölümleri bu ada ithafen CA kısaltması ile isimlendirilmektedir (71-73).

Hipokampüsün hafızadaki rolü 1950’lerde epilepsi tedavisi amacıyla temporal lobektomi uygulanan hastaların hafızalarının etkilenmesi ile ortaya konmuştur. Bu hastalardan üzerinde en çok çalışma yapılanı 2008 yılında ölen, o ölene kadar da bilim dünyasının H.M. olarak tanıdığı Henry Molaison’dur. Ameliyattan sonra bu hastanın kısa dönem hafızası korunmuştu, ancak hasta uzun dönem hafızasına yeni kayıt yapamıyordu. Bu vaka ve benzer vakalar, hipokampüsün ve medial temporal lobun hafıza ile ilişkisini ilk kez açık bir şekilde ortaya koymuştur (74). Hipokampüsün öğrenme ve hafızadaki görevleri henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, epizodik hafıza ve mekansal hafıza ile ilişkili olduğu konusunda bilim dünyasında çoğunlukla bir mutabakat vardır (75, 76). Bunun yanında sol hipokampüsün daha çok sözel hafıza ile sağ hipokampüsün ise mekansal hafıza ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (77).

Hipokampüs, özellikle yakınındaki entorinal korteksten perforan yollar olarak bilinen nöronal bağlantılar aracılığıyla duyuşal ve mekansal bilgi girdileri almaktadır. Hipokampüsün majör çıktısı ise CA1 bölgesindeki piramidal nöronlardan entorinal kortekse olmaktadır (60, 78). Bununla birlikte hipokampüsle diğer beyin bölgeleri arasında birçok kompleks nöronal bağlantı bulunmaktadır. Örneğin beyindeki sensörimotor alanlar, dikkatle ilişkili bölgeler, yüksek vizüel kortikal alanlar, frontal kontrol bölgeleri ve subkortikal yapılar bunlar arasında sayılabilir (79).

Hipokampüsün öğrenilen bilgilerin kısa dönem hafızadan uzun dönem hafızaya kaydedilmesinin dışında, hafızadaki bilgilerin başarılı bir şekilde geri çağırılmasında da oldukça önemli olduğu ortaya koyulmuştur (79, 80).



**Şekil 2.** Hipokampüs ve entorhinal korteks arasındaki bağlantılar.

Yayıncı kuruluşun izniyle kullanılmıştır (78).

### 2.2.3. Öğrenme ve Hafızanın Biyokimyasal Mekanizmaları

Beynin işleyişi, insanlık tarihi boyunca merak edilen ve ilgi çeken bir konu olmuştur. Bilim dünyasında uzun yıllardan beri beyinde öğrenme ve hafızanın nasıl gerçekleştiğini anlamaya yönelik birçok araştırma yapılmış ve halen yapılmaya devam edilmektedir.

Öğrenme ve hafızanın biyokimyasal mekanizmaları konusundaki yaklaşımları anlamak için sinaptik plastisite ve engram terimlerinin anlaşılması gerekmektedir. Sinaptik plastisite, iç ve dış uyaranlara bağlı olarak sinapsların yapı ve fonksiyonlarındaki uzun dönemde oluşan değişim olarak tanımlanabilmektedir. Bu

değişiklikler; nöronların dendritik dallanmalarında artış ya da azalmayı, yeni sinapsların oluşumunu ya da mevcut sinapsların ortadan kalkmasını, yeni nöron oluşumu, apoptoz ile hücre ömrünü ya da direncini etkileyen bazı metabolik süreçlerdeki değişiklikleri kapsamaktadır (14).

Beypinde sinyal iletimi hücre gövdesinde akson boyunca elektriksel olarak gerçekleşmekte iken hücreler arası sinyal iletimi sinapslar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sinapsların iletim şekillerine göre elektriksel ve kimyasal tipleri ve yerleşimlerine göre akso-dendritik, akso-aksonik, akso-somatik vb. gibi tipleri vardır (81, 82). Klasik bilgi olarak hücreler arası uyarı iletimi, presinaptik nöronun akson terminalinden postsinaptik nöronun dendritine doğrudur. Akson gövdesinden akson terminaline yayılan aksiyon potansiyeli, burada bulunan sinaptik veziküllerde depolanan ve nörotransmitter adı verilen moleküllerin sinaptik aralığa geçmesini sağlar. Sinaptik aralığa salınan nörotransmitterler ise postsinaptik nöron dendritlerinde bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak postsinaptik nörondaki elektriksel potansiyelin değişmesini sağlar (83). Bu değişim depolarizasyona neden olup postsinaptik nöronda aksiyon potansiyelini başlatırsa eksitatör etkiden, hiperpolarizasyona neden olursa inhibitör etkiden bahsedilir (84).

1973 yılında Tim Bliss ve arkadaşları, tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda belirli bir sinapstan geçen uyarıya karşı oluşan postsinaptik cevaptaki etkinliğin tekrarlayan tetanik uyarılarla %50 oranında arttığını ve bu artışın uzun süre korunduğunu göstermişler ve LTP'nin varlığını ilk kez ortaya koymuşlardır (85, 86). Sonrasında yapılan çalışmalarda LTP'nin sinaptik plastisitede, dahası öğrenme ve hafızada oldukça önemli rol oynadığı keşfedilmiştir (87-90).

LTP'nin erken ve geç faz olmak üzere 2 tipi mevcuttur. Erken faz LTP, zayıf, yüksek frekanslı bir tetanik uyarının ardından gerçekleşmektedir ve sinaptik etkinlikte 1-2 saat süren bir artışa neden olmaktadır (91). Yeni protein sentezinin olmadığı erken faz LTP'de reseptör aktivasyonu ile ikinci mesajcılar aracılığıyla (özellikle CaMKII = kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz 2) postsinaptik membranda AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4- izoksazol propiyonik asit) tipi glutamat reseptörlerinin sayısında ve iletkenliğinde artış gerçekleşmektedir (92-94). Erken faz LTP kısa dönem hafıza ile ilişkilendirilmektedir (91, 95). Geç faz LTP ise

tekrarlayan, güçlü ve yüksek frekanslı tetanik uyarılar ile gerçekleşmektedir ve bu uyarılara yanıt olarak gelişen sinaptik etkinlikteki artış 8 saat, hatta birkaç gün devam etmektedir (91, 95). Geç faz LTP'deki sinaptik etkinlikteki artış erken fazdan farklı olarak protein sentezine bağlıdır (93, 96). Geç faz LTP uzun dönem hafızanın oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (95). Postsinaptik membranın düşük frekanslı uyarılması sonucu ise fizyolojik etki olarak LTP'nin tersi olan LTD ortaya çıkmaktadır (97). LTD her ne kadar LTP'nin tersi etkilere neden olsa da, hipokampus aracılı mekansal öğrenmede LTD'nin de önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (98).

Öğrenme ve hafızada bilinmesi gereken diğer mekanizma engram teorisidir. İlk olarak 20. yüzyılın başlarında Richard Semon tarafından ortaya atılan engram teorisi, hafızanın beyinde fiziksel olarak nasıl kodlandığını açıklamaya çalışmaktadır. Ortaya atıldığı yıllarda bilim dünyası tarafından kabul görmese de, 20. yüzyılın sonlarına doğru yeniden gündeme gelmiş ve gelişen teknoloji ile hafızanın açıklanmasına katkı sağlamıştır (99). Engram, yeni bir bilginin öğrenilmesi sonucu, bu bilgiye dair oluşturulan, hafıza ilişkilerini barındıran belirli sinir hücrelerinde gerçekleşen fiziksel ve/veya kimyasal değişiklikler olarak tanımlanabilmektedir (99). Engram kısaca hafızanın beyinde bıraktığı iz olarak da ifade edilmiştir. Beyinde engram hücreleri olarak tanımlanan ve belirli bir tip hafızanın oluşmasında primer rol oynayan hücreler bulunmaktadır. Yeni bir bilginin öğrenilmesi sırasında bu hücreler beyindeki bazı diğer hücrelerle simültane olarak uyarılırlar ve bu uyarılma sonucu gerçekleşen fiziksel ve kimyasal değişikliklerle bu hücreler boyunca sinaptik ileti gücünün artmasıyla öğrenilen bilgiye has bir engram devresi ya da yolağı meydana gelir. Öğrenilen bilginin geri çağırılmasında da bu hücrelerden bir kısmı uyarıldığında, kaydedilen engram devresinin tamamı simültane olarak uyarılmakta ve bilginin geri çağırılması mümkün olmaktadır (99-102). Engram teorisinin ve dolayısıyla sinaptik plastisitenin önemli bileşenleri olan LTP ve LTD'nin reseptör aracılı mekanizmalarla gerçekleşmesi, araştırmacıları öğrenme ve hafızada reseptörlerin rollerinin net olarak ortaya koyulması konusuna yönlendirmiştir.

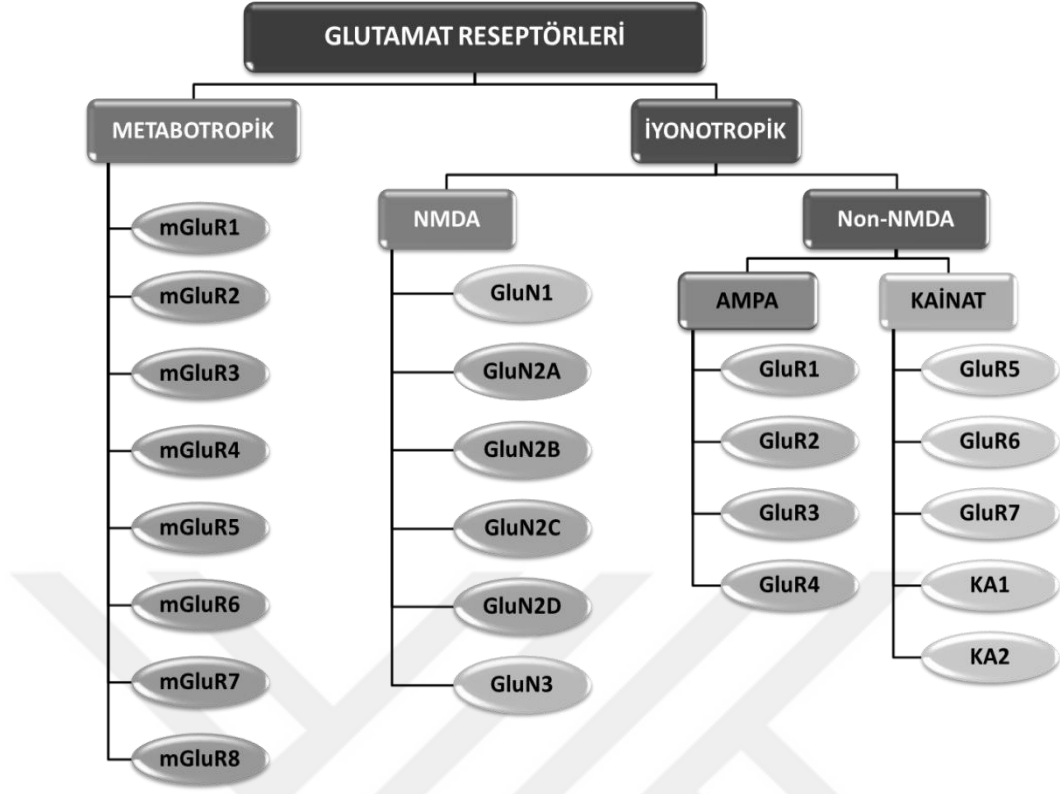


#### **2.2.4. Öğrenme ve Hafızada Rol Alan Reseptörler**

Öğrenme ve hafızada çok sayıda molekülün görevi ve etkisi olsa da, bunlardan en dikkat çekenleri ve üzerinde çalışılanları nörotransmitterlerdir. Yapılan çalışmalarda başta glutamat olmak üzere GABA, dopamin, asetilkolin, serotonin ve norepinefrin gibi nörotransmitterlerin öğrenme ve hafızanın gelişiminde önemli bir yer tuttukları gösterilmiştir (103, 104). Bu bölümde ilgili nörotransmitterler ve reseptörleri incelenmeye çalışılmıştır.

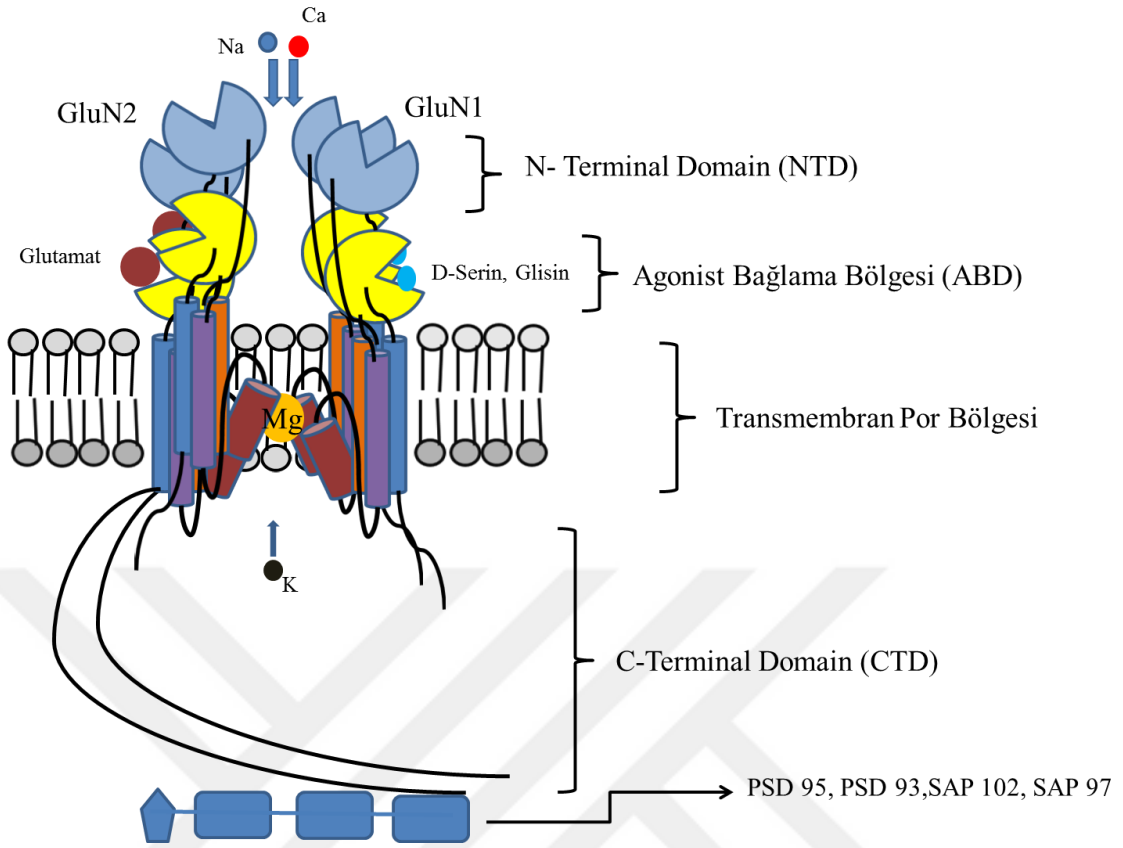
##### **2.2.4.1. Glutamat ve Reseptörleri**

Glutamat MSS'de ana eksitator nörotransmitterdir ve MSS'nin her yerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Glutamat etkisini spesifik reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Glutamat reseptörleri temelde metabotropik ve iyonotropik reseptörler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. İyonotropik reseptörler temel olarak iyon kanalı görevi görmekte iken metabotropik reseptörler G proteini ve ikinci haberciler aracılığıyla fonksiyon göstermektedir. Metabotropik reseptörler ayrıca hücre zarında bulunan iyon kanallarının ve iyonotropik reseptörlerin işlevlerini de düzenlemektedir (105). Şekil 3'te glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 3.** Glutamat Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri, NMDA ve non-NMDA (AMPA ve Kainat reseptörleri) olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. NMDA reseptörleri, MSS’de yaygın olarak eksprese edilen, 3 farklı alt birimin (GluN1, N2, N3) farklı şekillerde birleşmesiyle oluşan, tetramerik, katyon kanalı tipinde glutamat reseptörleridir.



**Şekil 4.** NMDA Reseptörünün Yapısı.

Paoletti P. (2010) ve Groc L. (2011)'den modifiye edilmiştir.

NMDA reseptörünün 4 fonksiyonel bölgesi bulunur (Şekil 4):

**N-Terminal Domain:** NR2 alt biriminde allosterik modülatör bağlanma bölgesi içermektedir (Zn, H, poliaminler) (106).

**Agonist Bağlama Bölgesi (Agonist Binding Domain- ABD):** GluN2 için glutamat, GluN1 ve GluN3 için D-serin ve glisin agonist görevi yapmaktadır (107).

**Por Yapısı:** M1, M3 ve M4 alt birimi; bunun yanında P loop ya da M2 olarak adlandırılan, iyon kanalı yapısını oluşturan bir domainden oluşmaktadır (108). Por yapısı sodyum ve kalsiyumun hücre içine alınmasını ve potasyumun hücre dışına geçişini sağlar.

**C-Terminal Domain:** Farklı alt birimlerde farklı uzunlukta olup, hücre içi bazı proteinlerle (PSD 95, SAP 102 vb.) etkileşmektedir (107).

NMDAR'nin aktivasyonu için iki agonist gerekmektedir (Glutamat + Glisin ya da D-serin). NMDAR'ler voltaja bağımlı olarak Mg ile inhibe olurlar. İstirahat membran potansiyelinde iken Mg kanal yapısını tıkayarak iyon geçişini engeller. Membran depolarize olduğunda ise Mg iyonları kanaldan uzaklaşır ve blokaj ortadan kalkar (108).

NR2A ve 2B içeren reseptörler, 2C ve 2D içerenlere göre Mg bloğuna daha duyarlıdır. NMDA reseptörleri AMPA ve Kainat reseptörleri ile kıyaslandığında daha yavaş ve uzun süreli aktive olurlar. Aktiviteleri allosterik modülatörlerle düzenlenebilir (108, 109).

Hipokampüste yapılan çalışmalar, NR2B'nin NR2A'ya göre erken postnatal dönemde fazla olduğunu, ilerleyen gelişim süreci içinde bu oranın tersine döndüğünü göstermiştir (109).

NMDAR'ler, sinaptik ve ekstrasinaptik olarak belirgin ve ayrı dağılım göstermektedir. Yapılan çalışmalarda sinaptik NMDAR'lerin plastisite, öğrenme, *pro-survival* etkilerden sorumlu olduğu, ekstrasinaptik NMDAR'lerin ise daha çok eksitotoksisite, nörodejenerasyon ve pro-apoptotik sinyallerden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (110). Buna karşın, LTP ve NMDA aracılı eksitotoksisitenin sinaptik NMDAR'lara bağlı olduğu, LTD için ise hem sinaptik hem de ekstrasinaptik NMDAR'ların gerektiğini ifade eden çalışmalar da mevcuttur (111).

#### **2.2.4.1.1. Öğrenme ve Hafızada Glutamat Reseptörleri**

Glutamat reseptörleri, bilgilerin hafızaya kaydedilmesini sağlayan LTP ve LTD'nin gerçekleşmesinde ana rolü üstlenmektedirler. Sinapsın güçlü ve yüksek frekanslı uyarılması (10-100 Hz) LTP'yi başlatmaktadır. Bu süreçte presinaptik bölgeden salınan glutamat postsinaptik nörondaki AMPA tipi reseptörleri uyarmakta ve hücre içine  $Na^+$  ve  $K^+$  akışı ile postsinaptik nöronda depolarizasyon meydana gelmektedir. Ayrıca NMDA reseptörleri aracılığıyla hücre içine  $Ca^{++}$  akışının olması LTP'yi indüklemekte, bu durum postsinaptik membranda AMPA reseptör sayısının artmasına, dendritik uçların büyümesine ve dallanmaların artmasına neden

olmaktadır. Düşük frekanslı (1-5 Hz) ve düşük amplitüdü, uzun süreli uyarılar ise bu durumun tam tersine neden olmakta, AMPAR'lerin sayısı azalmakta ve dendritik uçların büyüklüğü ve dallanmaların sayısında azalmayla sonuçlanmaktadır ki bu da LTD olarak isimlendirilmektedir (112). Bunun yanında sinaptik plastisitenin indüklenmesinde NMDAR'lerinin önemli olduğu, ancak devam ettirilmesinin ve kalıcı hale getirilmesinin metabotropik glutamat reseptörleri ile sağlandığı ileri sürülmüştür (113).

Davis ve arkadaşları NMDAR antagonisti D-AP5 uygulanan sıçanlarda LTP ve mekansal hafızanın bozulduğunu göstermişlerdir (114). Yine Butelman ve arkadaşları (1989) bir NMDA antagonisti olan MK-801 ile yaptıkları çalışmada intraperitoneal yolla uygulanan MK-801'in sıçanlarda 8 kollu maze testinde performans düşüklüğüne neden olduğunu tespit etmişlerdir (115).

NMDAR'lerinden NR1 ve NR2A'nın açık alan testi ve nesne tanıma testleri süresince artış gösterdiği, NR2A ve NR2B reseptörleri genetik olarak çıkarılmış farelerde mekansal hafızanın etkilendiği gösterilmiştir (116, 117).

Liu ve arkadaşları (2004) yaptıkları bir çalışmada in vitro olarak NR2A içeren NMDAR'lerinin bloke edilmesi sonucu yalnızca LTP'nin, NR2B içeren NMDAR'lerinin selektif blokajı sonrası ise yalnızca LTD'nin etkilendiğini göstermişlerdir (12).

Bu çalışmalar glutamat reseptörlerinin farklı alt tiplerinin farklı rollerinin olduğunu, ancak öğrenme ve hafızada glutamat reseptörlerinin önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

#### **2.2.4.2. Asetilkolin ve Reseptörleri**

Asetilkolin reseptörleri (AChR) MSS'de, ganglionlarda ve nöromusküler kavşakta yaygın olarak bulunurlar. Yapıca 2 ana gruba ayrılırlar: Ligand aracılı iyon kanalı şeklinde olan nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) ve G protein bağlı ikinci haberci aracılı fonksiyon gösteren muskarinik asetilkolin reseptörleri

(mAChR). Nöromusküler kavşakta nAChR'ler bulunurken ganglionlarda ve MSS'de hem nAChR'ler hem de mAChR'ler bulunmaktadır (118).

Muskarinik reseptörlerin  $M_1$ 'den  $M_5$ 'e kadar 5 alt tipi vardır.  $M_1$  alt tipi MSS'de korteks, hipokampus ve striatumda yaygın olarak bulunmaktadır.  $M_1$  alt tipinin bilişsel fonksiyonlarda, öğrenme ve hafızada önemli olduğu bildirilmiştir (119).

nAChR'ler,  $\alpha(1-7)$ ,  $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\beta(1-4)$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\epsilon$  alt birimlerinden beşinin farklı şekillerde bir araya gelmeleri ile oluşan pentamerik yapıda katyon kanalı şeklinde transmembran reseptörlerdir. Alt birimlerin çeşitlerine göre fizyolojik, biyokimyasal ve farmakolojik özellikleri değişmektedir. Kas hücrelerinde bulunan alt tipler ile nöronlarda bulunan alt tipler belirgin olarak farklı alt birimlerden oluşmaktadır. MSS'de nöronal nAChR'lerinden  $\alpha_4\beta_2$  ve  $\alpha_7$  alt tipleri yaygın olarak bulunmaktadır (120). Nöronal nAChR'ler  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Ca^{++}$  gibi monovalan ve divalan katyonlara karşı geçirgendir.  $\alpha_7$  alt tipinin özellikle  $Ca^{++}$  iyonlarına karşı geçirgenliği yüksektir (121, 122). MSS'de  $\alpha_7$  ve  $\alpha_4\beta_2$  alt tipindeki reseptörler hem presinaptik hem de postsinaptik olarak dağılım göstermektedirler (123, 124).

#### **2.2.4.2.1. Öğrenme ve Hafızada Asetilkolin Reseptörleri**

Kolinerjik sistemin öğrenme ve hafızada önemli rol oynadığına dair literatürde birçok çalışma mevcuttur.

Blokland ve arkadaşları (1992) sıçanlarda hipokampüse bir antikolinerjik ajan olan skopolamin enjeksiyonu sonrasında sıçanların mekansal hafızalarında bozulma olduğunu ortaya koymuşlardır (125). Bunce ve arkadaşları, kolinerjik agonist olan karbakolün sıçanlarda hafızayı olumsuz etkilediğini göstermişlerdir (126).

nAChR  $\alpha_7$  ve  $\alpha_4\beta_2$  reseptörlerinin sinaptik plastisitede, öğrenme ve hafızada önemli rollerinin olduğuna dair literatürde pek çok çalışma mevcuttur (127-130). Levin ve arkadaşları nAChR  $\alpha_7$  agonisti olan AR-R 17779'un sıçanlarda öğrenme ve hafızayı arttırdığını göstermişlerdir (131).

nAChR  $\alpha 7$ subtipi, presinaptik ve postsinaptik olarak dağılım göstermekte ve hücre içine  $Ca^{++}$  girişini sağlayarak LTP ve sinaptik plastisitenin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bunun yanında nikotinic aktivitenin zamanlaması ve lokalizasyonunun da sinaptik plastisiteyi artırıp azaltabileceği ifade edilmiştir (132).

### **2.2.4.3. Serotonin ve Reseptörleri**

Serotonin, triptofanın hidrosilasyonu ve dekarboksilasyonu yoluyla sentezlenen, vücutta hormonal etkileri olan, mitojen etkileri olan ve MSS'de nörotransmitter rolü oynayan önemli bir biyojen amindir. Serotonin etkisini spesifik reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Serotonin reseptörleri, 5-HT<sub>1</sub>'den 5-HT<sub>7</sub>'ye kadar olan 7 ana grupta incelenirler. Bu grupların da bazılarının alt tipleri tanımlanmıştır 5-HT<sub>3</sub> haricindeki reseptörler G proteini aracılı ikinci haberciler yoluyla etki gösterirken 5-HT<sub>3</sub> iyon kanalı yapısındadır. 5-HT<sub>1</sub> ve 5-HT<sub>5</sub>, inhibitör G proteini (G<sub>i</sub>) ile eşlenirken 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> ve 5-HT<sub>7</sub> reseptörleri stimulatör G proteini (G<sub>s</sub>) ile eşleniktir. 5-HT<sub>2</sub> reseptörleri ise G<sub>q</sub> proteini ile bağlıdır (133, 134).

#### **2.2.4.3.1. Öğrenme ve Hafızada Serotonin Reseptörleri**

Serotonin reseptörlerinin çeşitliliğinin fazla olması, bu reseptörlerin MSS'de yaygın olarak presinaptik, postsinaptik ve ekstrasinaptik olarak dağılım göstermesi ve diğer birçok nörotransmitterle kompleks modülatör ilişkilerinin olması serotoninin öğrenme ve hafızadaki rollerinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

MSS'de serotonerjik hücre gövdeleri en yoğun olarak raphe nükleusunda bulunmaktadır ve bu bölgeden çıkan hücre uzantıları birçok beyin bölgesine uzanmaktadır. Hipokampus de bu serotonerjik liflerin önemli bir hedefi konumundadır. Hipokampüste neredeyse tüm 5-HT reseptörleri ekprese edilmektedir (135).

Yapılan çalışmalar, 5-HT reseptörlerinin öğrenme, hafıza ve sinaptik plastisitede önemli rol oynadığını ortaya koymuştur.

Meneses ve arkadaşları (1997) spesifik 5-HT antagonistlerini kullanarak yaptıkları çalışmada 5-HT<sub>1B/1D</sub> ve 5-HT<sub>2A/2C</sub> reseptörlerinin öğrenmedeki etkilerini ortaya koymuşlardır (136). Bunun yanı sıra Bombardi ve Giovanni (2013), amigdala ve hipokampüste, özellikle GABAerjik ara nöronlarda bulunan 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerinin GABA salınımını indüklediğini ve hipokampus ve amigdala nöronal iletişimi düzenlediğini ifade etmişlerdir. Yine bu derlemede, 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerinin hipokampüste glutamat salınımı ve presinaptik nörotransmisyon üzerine etkili olabileceği ileri sürülmüştür (16). Benzer olarak Zhang ve arkadaşları (2016) 5-HT<sub>2A</sub> agonisti uygulanan sıçanlarda mekansal olmayan nesne tanıma hafızasının geliştiğini göstermişlerdir. Bu durumun 5-HT<sub>2A</sub> aracılı ekstraselüler glutamat konsantrasyonunda artış ve hipokampal nöronal aktivite artışı sonucu olabileceğini ifade etmişlerdir (137). Yine Zhang ve arkadaşlarının yakın zamanda (2017) yaptıkları bir çalışmada halusinojen bir spesifik 5-HT<sub>2A</sub> agonisti olan TCB-2'yi kullanarak su labirenti deneyinde farelerde mekansal hafıza değişikliklerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada TCB-2'nin mekansal arama davranışını başlatmayı geciktirdiğini ancak görsel ipuçlarını kullanmayı etkilemediğini bulmuşlardır. Ayrıca mekansal bilginin kaydedilmesi ve geri çağırılmasında bir değişiklik gözlememekle birlikte CA1 nöronlarında hafıza ile ilgili oluşan değişikliklerin uzun süreli stabilitesinin bozulduğunu göstermişlerdir (138).

Bu çalışmalar ve benzeri çalışmalar, 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerinin öğrenme ve hafızada oldukça önemli rollerinin olduğunu ortaya koymaktadır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneysel araştırma çalışmamız için Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 05.11.2015 tarih ve 08 sayılı karar ile izin alınmıştır. Çalışmamız SDÜ Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinasyon Birimi tarafından, 19.01.2016 tarih ve 2016/1 no'lu toplantıda ÖYP05543-DR-13 proje numarası ile desteklenmiştir. Hayvanların bakımı, MSG uygulanması ve sakrifikasyon işlemleri SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Öğrenme deneyleri SDÜ Tıp Fakültesinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğrenme Laboratuvarında, Western Blot çalışmaları ise Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Deney Hayvanları

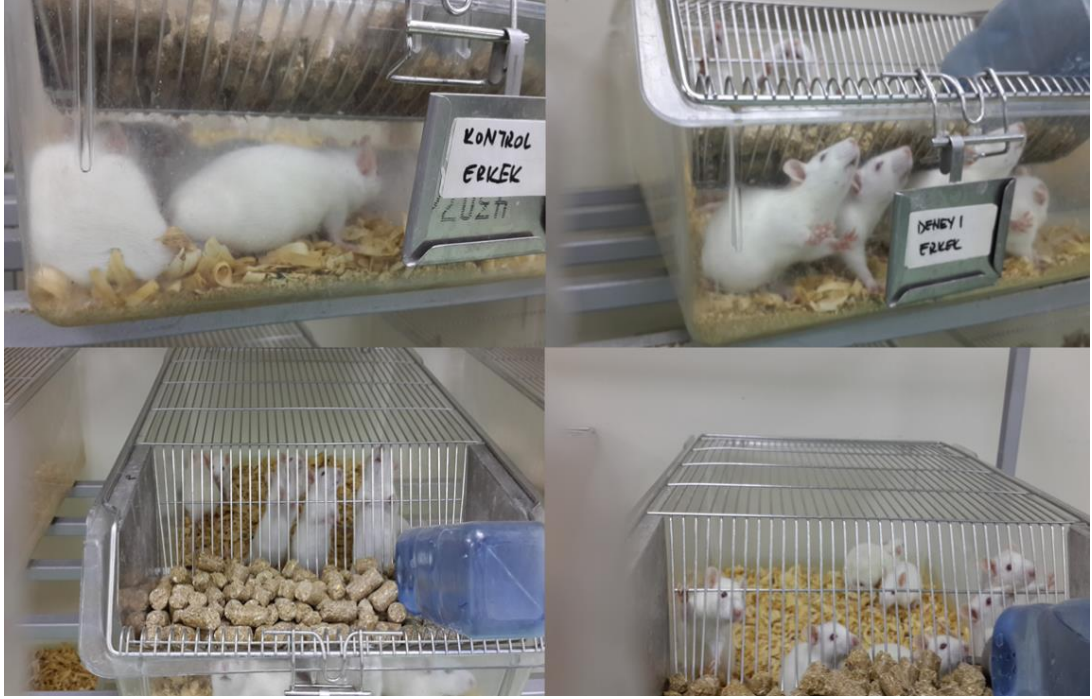
Araştırmamızda MSG'ye çocukluk dönemi boyunca maruziyetin öğrenme, hafıza ve nörodavranışsal etkileri incelenmek istenmiştir. Bu nedenle sıçanların anne sütünden kesildiği 1. ayın sonundan başlayarak cinsel olgunluğa eriştiği döneme (~10. hafta) kadarki süre boyunca (6 hafta) MSG uygulanması hedeflenmiştir (139).

Çalışmamızda 33 adet erkek ve 33 adet dişi olmak üzere toplam 66 adet Wistar Albino cinsi yavru sıçan kullanılmıştır. Kullanılan sıçanlar SDÜ Deney Hayvanları Üretimi Ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Doğum sonrası sıçanların ilk 1 ay anne sütü alması beklenmiş ve anne sütünden kesilmelerinin ardından (4. haftanın sonu), her grupta eşit sayıda dişi ve erkek sıçan olacak şekilde kontrol ve deney grupları oluşturulmuş (Kontrol: n=22; Deney 1: n=22, Deney 2: n= 22) ve MSG uygulamasına başlanmıştır (Tablo 3).

**Tablo 3.** Deney Grupları

Gruplar	Cinsiyet	Uygulanan Madde
Grup 1: Kontrol (n=22)	Erkek=11, Dişi=11	İçme Suyu
Grup 2: Deney 1 (n=22)	Erkek=11, Dişi=11	25 mg/kg/gün MSG
Grup 3: Deney 2 (n=22)	Erkek=11, Dişi=11	2,5 g/kg/gün MSG

Çalışma boyunca erkek ve dişi sıçanlar ayrı kafeslerde olmak üzere standart sıcaklık (23°C) ve ışık koşullarında (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) yaşatılmış, yeteri kadar (ad libitum) su ve yem ile beslenmişlerdir (Resim 1). Çalışmaların 08:00-17:00 saatleri arasında yapılabilmesi için sıçanların uyku uyanıklık döngüleri değiştirilmiştir.



**Resim 1.** Deney hayvanlarına ait görseller

### 3.2. Monosodyum Glutamat

Çalışmada  $\geq 98.0\%$  saflık düzeyinde MSG kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, USA, 49621; lot no: BCBL0102V).

### **3.3. Kullanılan Gereçler**

- 1- Çeşitli boylarda gavaj iğneleri
- 2- Tek kullanımlık enjektör
- 3- Hassas Terazisi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
- 4- Çeşitli ölçülerde otomatik pipetler: Gilson (Fransa), Eppendorf (Almanya)
- 5- Vorteks: Nüve NM100 (Türkiye)
- 6- Manyetik Karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 7- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- 8- Santrifüj Cihazı: Nüve (Türkiye)
- 9- Soğutmalı Santrifüj Cihazı: Eppendorf (Almanya)
- 10- Derin Dondurucu: Uğur (Türkiye)
- 11- Elektroforez-Western Blot Sistemi: Bio rad Mini Protean 3 (İtalya)
- 12- Biyokimya Otoanalizörü: Beckman Coulter AU 5800 (Japonya)
- 13- Kodak Image Station 2000MM (ABD)
- 14- Cam teflon homojenizatör
- 15- Distile Su Cihazı: Ekoloji 100 Plus (Türkiye)

### **3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- 1- Anti NR2A, Sigma (ABD)
- 2- Anti NR2B, Sigma, (ABD)
- 3- Anti nAChR  $\alpha 7$ , Abcam (İngiltere)
- 4- Anti 5-HT<sub>2A</sub>, Abcam (İngiltere)
- 5- Anti  $\beta$ -actin, Abcam (İngiltere)

- 6-** Monoklonal Anti-rabbit IgG, Sigma (ABD)
- 7-** Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (ABD)
- 8-** BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (ABD)
- 9-** Akrilamid: Bisakrilamid %30 T, %2,6 C; Sigma (ABD)
- 10-** Tris, Merck (Almanya)
- 11-** Glisin, Merck (Almanya)
- 12-** Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Merck (Almanya)
- 13-** Amonyum persülfat (APS), Merck (Almanya)
- 14-** TEMED, Merck (Almanya)
- 15-** 2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- 16-** Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- 17-** Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- 18-** Tween 20, Merck (Almanya)
- 19-** Bovine Serum Albumin (BSA), Merck (Almanya)
- 20-** EDTA, Merck (Almanya)
- 21-** EGTA, Merck (Almanya)
- 22-** Leupeptin, Sigma (ABD)
- 23-** Aprotinin, Sigma (ABD)
- 24-** Benzamidin, Sigma (ABD)
- 25-** Triton X-100, Sigma (ABD)
- 26-** Immobilon P, Millipore (Avustralya)
- 27-** Kromatografi Filtre Kağıdı, Whatman (İngiltere)
- 28-** Metanol, Merck (Almanya)
- 29-** Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- 30-** Sodyum Hidroksit, Merck (Almanya)

### 3.5. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.5.1. Numune çözeltileri

##### a. Homojenizasyon Tamponu:

30 ml homojenizasyon tamponu içinde 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25µg/ml leupeptin, 25 µg/ml aprotinin, 10 µM benzamidin ve %1 Triton X-100 bulundurur. Bileşenler distile su içinde çözülerek tampon çözelti hazırlanmıştır.

##### b. Numune Tamponu:

0,5 M Tris HCl (pH: 6,8), %10 SDS, 2-Merkaptoetanol, gliserol ve %0,1 (w/v) Brom fenol blue içerir.

#### 3.5.2. Poliakrilamid Jel Çözeltileri

a. **Çözücü Tampon Çözeltisi (4x):** 1,5 M Tris HCl, pH:8,8. 36,3 g Tris tartılarak distile su içinde çözdürülerek 170 ml'ye tamamlanmıştır. pH 8,8'e ayarlandıktan sonra çözelti soğutulup pH ayarı tekrar yapılmıştır. Distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

##### b. Çözücü Jel (%9'luk):

- Distile su
- Acril: bisacril %30 T, %2,6 C
- Çözücü tampon
- %10 SDS
- %10 APS
- TEMED

1- **Paketleyici Tampon Çözeltisi:** 0,5 M Tris HCl, pH:6,8. 12,1 g Tris, distile suda çözdürülerek 170 ml'ye tamamlanır. pH 6,8'e ayarlanmıştır. Çözelti soğutularak pH tekrar 6,8'e ayarlanmış ve son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır.

2- **Paketleyici Jel (%4'lük):**

Çözücü jel ile aynı bileşenlere sahiptir ancak bileşenlerin miktarları %4'lük jelle göre ayarlanmıştır.

### 3.5.3. SDS-PAGE ve Western Blot Çözeltileri

1- **Yürütücü Tampon:** 15 g Tris, 72 g Glisin, 5 g SDS distile suda çözülür ve pH 8,3'e ayarlanmıştır. Çözelti 1 litreye tamamlandıktan sonra distile su ile 5x sulandırılarak kullanılmıştır.

2- **Transfer Tamponu:** 0,606 g Tris, 2,882 g Glisin, 1 ml %10 SDS distile suda çözdürülerek son hacim 160 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin üzerine 40 ml metanol eklenmiştir.

3- **TTBS (Tween 20-Tris Buffered Saline):** 43,75 g NaCl ve 30,25 g Tris distile suda çözülmüştür. Çözeltiye 5 ml Tween 20 ilave edilip pH 7,5'e ayarlanmış ve son hacim distile su ile 5 litreye tamamlanmıştır.

4- **Bloklama Çözeltisi:** %3'lük Bovine Serum Albumin (BSA) TTBS içinde çözdürülerek hazırlanmıştır. 30 ml çözelti için 0,9 g BSA tartılarak TTBS içinde çözdürülmüş ve son hacim 30 ml'ye tamamlanmıştır.

### 3.5.4. Antikor Çözeltileri

1- **Primer Antikorlar:** %1 BSA-TTBS içinde hazırlanmıştır.

- NR2A 1/5000
- NR2B 1/1000
- 5-HT<sub>2A</sub> 1/1000

- nAChR  $\alpha 7$  1/1000
- $\beta$ -actin 1/2000

2- **Sekonder Antikor:** Antirabbit IgG (Alkale Fosfataz Konjuge), %1 BSA TTBS içinde 1/10000 konsantrasyonda hazırlanmıştır.

### 3.6. Yöntem

#### 3.6.1. MSG Uygulanması

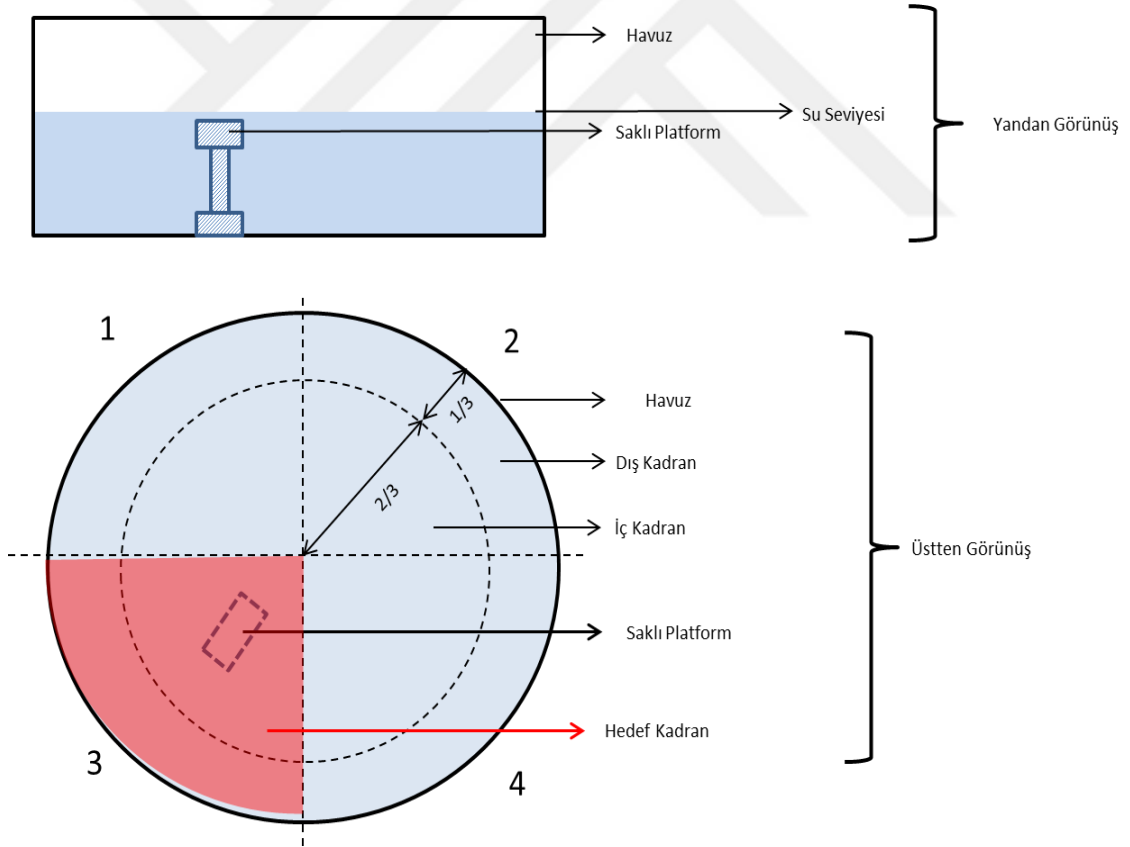
Sıçanlara verilecek MSG dozları, literatürde belirtilen çocukluk dönemindeki ortalama tüketim miktarına göre belirlenmiştir (24) . Bu dozlar Deney 1 grubu için 25 mg/kg/gün, Deney 2 grubu için ise bu dozun 100 katı yani 2,5 g/kg/gün olarak belirlenmiştir. Oral gavaj yoluyla verilecek olan MSG miktarı, sıçanların ağırlıklarına göre hesaplanmış, daha sonra hassas terazide tartılan MSG içme suyunda çözdürülerek çözeltiler hazırlanmıştır. Hesaplamalar yapılırken sıçanlara oral gavajla tek seferde verilebilecek maksimum sıvı hacminin (5-20 ml/kg) aşılmasına riayet edilmiştir (140). Hazırlanan çözeltiler deney gruplarındaki sıçanlara 6 hafta boyunca her gün tek seferde uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlara ise aynı hacimde içme suyu oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulamalar 4 haftalık anne sütü döneminin bitmesi ile başlamış ve 10 haftalık dönemin sonuna kadar 6 hafta boyunca devam etmiştir.

MSG uygulama işlemleri sona erdiğinde sıçanlar öğrenme deneylerinin yapılacağı Öğrenme Laboratuvarına transfer edilmiş ve adaptasyonları için 3 gün beklenmiştir. Daha sonra sıçanlara Morris Su Labirenti, Açık Alan ve Zorlanmış Yüzme Testleri uygulanmıştır.

### 3.6.2. Öğrenme Deneyleri ve Davranışsal Testler

#### 3.6.2.1. Morris Su Labirenti Testi (Morris Water Maze Test)

Morris Su Labirenti, sıçanlarda mekansal hafızayı ve bilişsel fonksiyonu ölçmek için Richard Morris tarafından geliştirilen bir testtir (141). Testin yapıldığı düzenek, 150 cm çapında ve 80 cm yüksekliğinde dairesel bir havuzdan oluşur. Havuz yaklaşık yarısına kadar, içine toksik olmayan renkli bir boya eklenerek opak görünüm kazandırılmış su ile doldurulmuştur. Havuz içerisine su yüzeyinin 2 cm altında, yaklaşık 10 x 20 cm yüzey alanına sahip sabit bir saklı platform bulunmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Morris Su Labirentinin şematik görünümü

Su labirentinin bulunduğu laboratuvarın pencereleri ışık geçirmeyen perdelerle örtülmüş, aydınlatmanın homojen olabilmesi için yönü tavana bakan

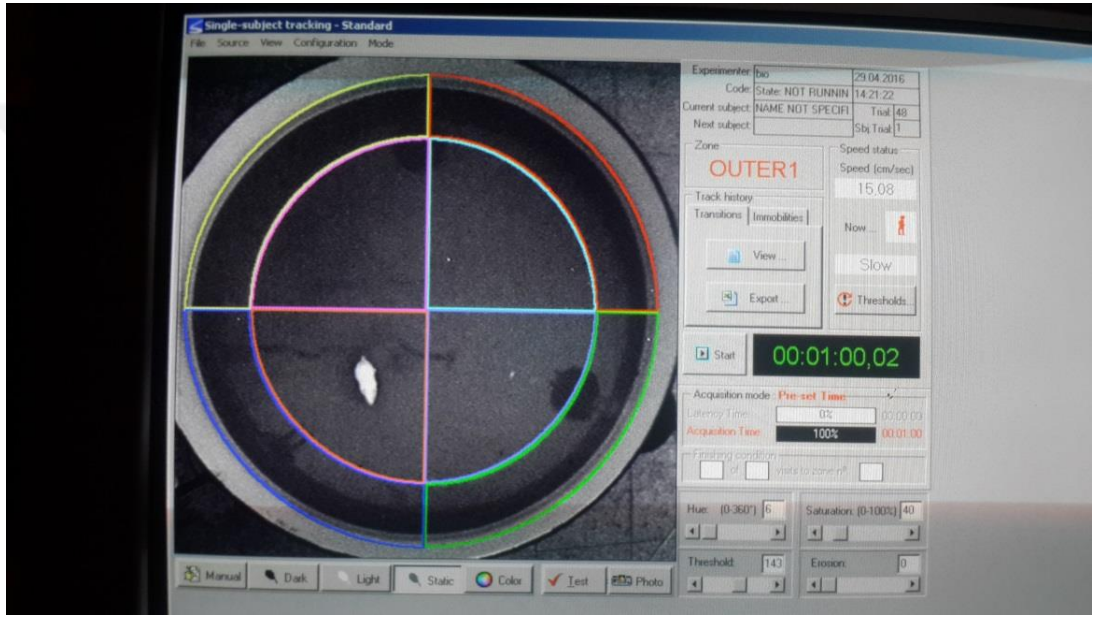


halojen ampullü 3 adet armatür kullanılmıştır. Böylece su labirentinde indirekt ve homojen bir aydınlatma sağlanmıştır. Deney süresince hayvanların yön belirlemede yararlanması amacıyla havuzun etrafına hayvanların yüzerken görebileceği şekilde çeşitli ipuçları (renkli kurdela ve bezler, tablolar) yerleştirilmiştir. Bu yönlendirici ipuçlarının tüm deney süresi boyunca yerlerinin değiştirilmemesine özen gösterilmiştir (Resim 2).



**Resim 2.** Öğrenme Laboratuvarı ve Morris su Labirenti

Deneyin kaydedilmesi ve değerlendirilmesinde Smart v2.5 bilgisayar programı kullanılmıştır (Smart Video Tracking, Panlab, Barcelona, İspanya). Havuzu tepeden gören bir video kamera aracılığıyla (Sony SSC-DC398P, Japonya) havuz hayali 4 kadrana ayrılmıştır. Bu kadrانlar 1'den 4'e kadar numaralandırılmıştır ve saklı platformun bulunduğu kadrان (3 no'lu kadrان) 'hedef kadrان' olarak tanımlanmıştır. Ayrıca her kadrانın merkez 2/3'lük kısmı ile dış 1/3'lük kısmı ikiye ayrılmıştır (Şekil 5 ve Resim 3).



**Resim 3.** Su tankında bir sıçanın tepe kamerasından görünüşü

### 3.6.2.1.1. Deney Prosedürü

İlk gün tüm sıçanlar, su labirentine alışmaları için birer kere havuzda yüzdürülmüş, takip eden günde ise asıl egzersizlere başlanmıştır. Egzersiz dönemi, her bir sıçana günde 4 egzersiz yaptırılmak suretiyle 5 gün sürdürülmüş, böylece her sıçanın toplamda 20 egzersiz yapması sağlanmıştır. Deneyin 6. gününde probe test ve görünür platform testleri uygulanarak Morris su labirenti deneyi tamamlanmıştır (142).

Deneye başlamadan önce havuzdaki boyalı suyun sıcaklığı rezistanslı ısıtıcı yardımıyla 23°C'ye ayarlanmıştır. Sıçanlar havuza her egzersiz için hedef kadran haricinde rastgele seçilen bir kadrandan (1,2 ve 4) kuyruklarından tutularak yüzleri havuzun kenarına bakacak şekilde nazikçe bırakılmıştır.

Deney esnasında hedef platformu bulmaları için hayvanlara 60 saniye süre verilmiş, bu süre içinde platformu bulamayan hayvanlar 1. ve 2. gün el yardımıyla platforma yönlendirilerek platformu bulmaları sağlanmıştır. Sonraki günlerde ise platformu 60 saniyede bulamayan hayvanlar, yönlendirme yapılmaksızın havuzdan alınmıştır. Tüm hayvanlara görsel-mekansal tanımanın gerçekleşmesi için ilk gün platformda 30 saniye bekleme süresi tanınmıştır. Öğrenme egzersizleri boyunca hayvanların hedef platformu bulma süreleri, dış kısımlarda geçirdikleri süreler, dış kısımlarda kat ettikleri mesafeler ve dış kısımlarda ortalama yüzme hızları, yüzdükleri süre boyunca ortalama hızları ve havuzda kat ettikleri mesafeler kaydedilmiştir.

Probe testte, platform havuzdan alınmış ve hayvanlar platformun olduğu hedef kadran (3 no'lu kadran) haricindeki kadranslardan rastgele seçilen ikisinden bırakılmıştır. Bu testte hayvanların 60 sn içerisinde, platformu hedef kadranda arayıp aramadıklarını öğrenmek için hedef kadranda ne kadar süre geçirdikleri gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir. Görünür platform testinde ise platform su yüzeyinin üzerinde, hayvanların yüzerken görebileceği şekilde konumlandırılmıştır. Ancak bu kez, platform ilk konumundan farklı ve rastgele seçilen 2 kadrana taşınmış, hayvanlar ise platformun ilk bulunduğu kadrandan (3 no'lu kadran) bırakılmıştır. Bu şekilde hayvanların görünür platformu bulma süreleri kaydedilmiştir.

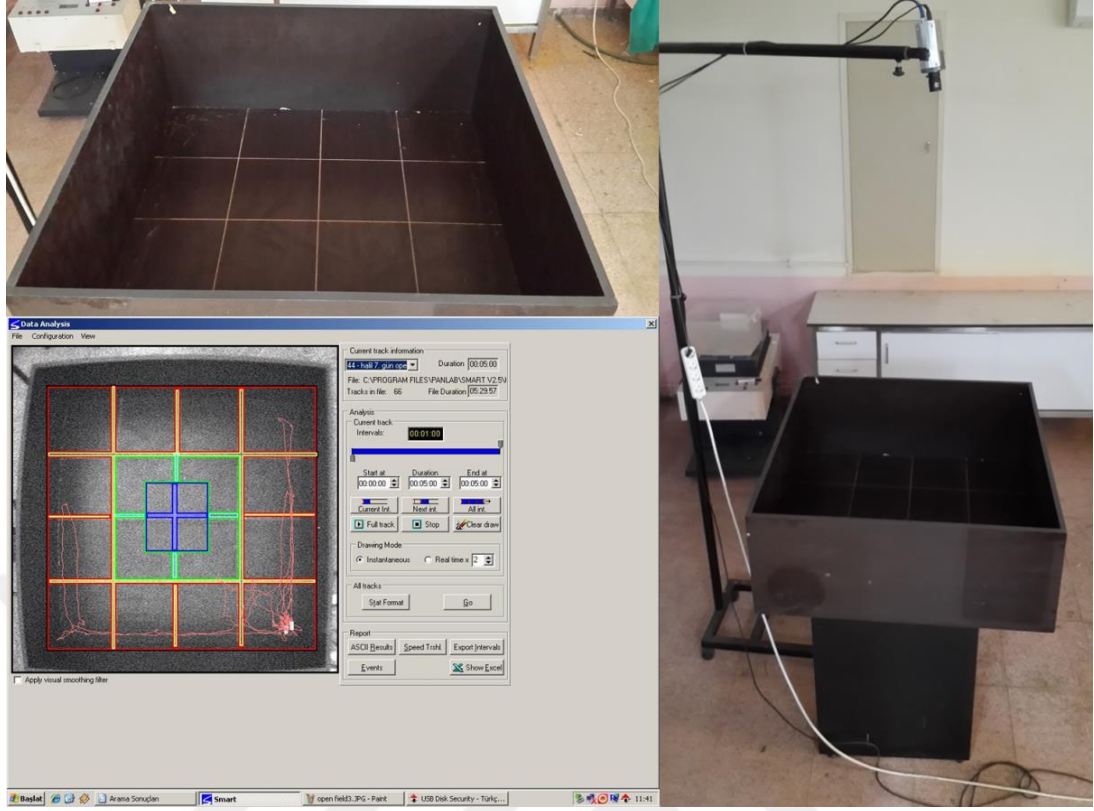
### **3.6.2.2. Açık Alan Testi (Open Field Test)**

Açık alan testi sıçanların aktivite, keşifçi davranış ve anksiyete ile alakalı davranışlarını değerlendirmek için kullanılan bir testtir (143). Bu test için, 40 cm duvar yüksekliği olan 100x100 cm taban ölçülerine sahip kare şeklinde bir aparat kullanılmıştır. Test aparatı ahşaptan yapılmış ve siyaha boyanmıştır. Tabanı beyaz renkli çizgilerle 25x25 cm'lik 16 eşit kareye ayrılmıştır (Resim 4). Aparatın

bulunduğu ortam yönü tavana bakan halojen armatürler ile aydınlatılarak indirekt ve diffüz aydınlatma sağlanmıştır.

### **3.6.2.2.1 Açık Alan Test Prosedürü**

Test süreci Sony marka SSC-DC398P model tepe kamerası ile kaydedilmiştir. Smart v 2.5 video takip programı kullanılarak açık alan platformunun görüntüsü 16 eşit kareye ayrılmıştır. Ayrıca merkez kare (mavi), iç kadran (yeşil) ve dış kadran (kırmızı) olmak üzere açık alan test platformu iç içe 3 hayali kadrana ayrılmıştır (Resim 4). Hayvanlar sessiz bir ortamda platformun belirli bir köşesinden düzeneğin içine bırakılarak 5 dakika boyunca düzenekte kalmaları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde hayvanların geçtikleri toplam çizgi sayıları, merkez karede geçirdikleri süreler ve merkeze giriş sayıları bilgisayar programı yardımıyla kaydedilmiştir. Geçilen çizgi sayısı hesaplanırken en az 3 ekstremitesinin çizgiyi geçmiş olması şart koşulmuştur. Ayrıca görsel olarak şahlanma sayısı (rearing), idrar yapma ve dışkılama sayıları da kaydedilmiştir. Şahlanma, sıçanın arka iki ayağı üzerine kalkması şeklinde tanımlanmaktadır (144).



**Resim 4.** Açık Alan Testi düzeneği ve tepe kamerasından görünüşü

Geçilen çizgi sayısı ve şahlanma sayılarının artması, artmış lokomotor aktivite ve keşifçi davranış ile ilişkilendirilirken, bu davranışların azalması anksiyete ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında merkez karedeki aktivite süresinin artışı, artmış keşifçi davranış paterni ve azalmış anksiyete ile ilişkilendirilmektedir. İdrar ve dışkılama sayısının artışı ise artmış anksiyete lehine yorumlanmaktadır (143, 145).

### 3.6.2.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test)

Zorlanmış yüzme testinde sıçanlar 20 cm çapında şeffaf, silindirik, içerisine 30 cm derinliğine kadar su konulmuş bir tankta 6 dakika boyunca yüzdürülmüş ve görüntüleri bir tepe kamerası yardımıyla kaydedilerek aktif olarak yüzdükleri ve yüzme eylemi olmadan bekledikleri süreler, Smart v2.5 programı kullanılarak kayıt altına alınmıştır (Resim 5). Bu testte sıçan, deney başladığında yüzerek ve silindirin

kenarlarına tırmanmaya çalışarak kaçıp kurtulmaya çalışmaktadır (146). Bir süre sonra kaçamayacağını anladığında ise davranışsal çaresizlik olarak değerlendirilen durumda hareketsiz kalarak beklemektedir. Sıçanların hareketsiz kaldıkları sürenin artmış olması kötüleşmiş ruh hali ve depresyon ile ilişkilendirilmiştir (147, 148).



**Resim 5.** Zorlanmış Yüzme Testi Sistemi ve Tepe Kamerasından Görünüşü

### 3.6.3. Hipokampüslerin Eldesi

Öğrenme ve davranışsal testlerin tamamlanmasından 24 saat sonra hayvanlara intraperitoneal yolla ketamin HCl (%10'luk, 90 mg/kg)- ksilazin HCl (%2'lik, 10 mg/kg) verilerek anestezi sağlanmış, ardından dekapitasyon ile sakrifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sakrifikasyonun ardından sıçanların kafaları hızlıca buz aküsü üzerine alınmıştır. Kafa derileri sagittal düzlemde orta hattan cerrahi makasla kesilmiş, kafatası kemikleri dikkatlice uzaklaştırılarak beyinleri çıkarılmış ve buz aküsü üzerine alınmıştır. Beyinler soğuk fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hemisferler bistüri ile birbirinden ayrılmıştır. Her iki hemisferden hipokampüsler,

özel olarak tasarladığımız aparatlar yardımıyla çıkarılmış ve bekletilmeden soğuk fosfat tamponuna alınmıştır (Resim 6).



**Resim 6.** Hipokampüs çıkarmada kullanılan aparatlar

Soğuk fosfat tamponu içerisindeki hipokampüs örnekleri laboratuvara transfer edilmiştir. Aynı gruptaki hipokampüsler tartılarak uygun numune miktarını sağlamak için üçerli olarak birleştirilmiştir. Daha sonra içinde çeşitli proteaz inhibitörleri olan özel olarak hazırlanmış homojenizasyon tamponu içinde cam teflon homojenizatör ile her bir numuneye 20 darbe uygulanarak homojenize edilmiştir.

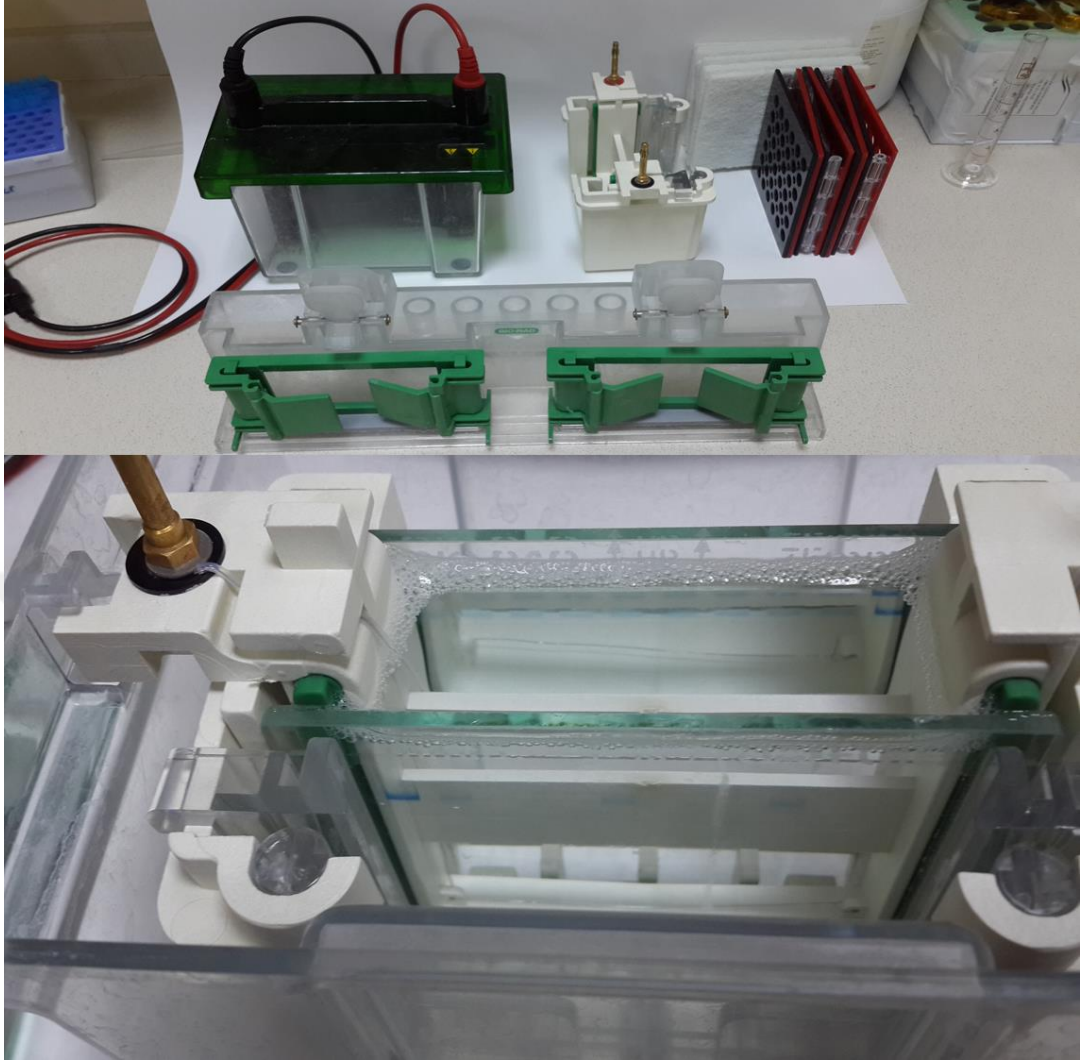
Ardından numuneler 30 sn süreyle sonike edilerek homojenizasyon işlemi tamamlanmıştır (Bandelin UW-2070, Almanya). Homojenizasyon işlemi sıçanların sakrifiye edildikleri gün, bekletilmeden yapılmıştır ve işlemler esnasında numune tüpleri, içinde buz-kar dolu olan kapların içinde tutulmuştur. Elde edilen homojenatlar vortekslenip eppendorf tüplere uygun sayıda porsiyonlandıktan sonra numuneler çalışma gününe kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (WiseCryo WUF 400, Kore).

#### **3.6.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)**

Eksi  $80^{\circ}\text{C}$ 'de bekleyen hipokampüs homojenatları çözdürülüp  $+4^{\circ}\text{C}$  ve 10000 g'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Almanya). Hızla pipetlenen süpernatantların her birinden Lowry yöntemi ile protein miktarları tayin edilmiştir (149). Protein tayini, Beckman Coulter AU 5800 (Japonya) biyokimya otoanalizöründe uygun ticari kit kullanılarak yapılmıştır. Protein tayininden sonra numuneler 1:1 oranında Laemmli buffer (sample buffer) ile karıştırılarak elektroforeze hazır hale getirilmiştir. SDS-PAGE işlemi, Ulrich K. Laemmli'nin tanımladığı prosedür temel alınarak gerçekleştirilmiştir (150).

SDS-PAGE, Biorad Mini Protean 3 Elektrofrez ve Western Blot sistemi kullanılarak yapılmıştır (Resim 7). Bir jelde 10 kuyucuk olacak şekilde her gün 2 jel hazırlanmıştır (Paketleyici jel %4'lük, çözücü jel %9'lük). İlk kuyucuğa marker (prastained molecular weight marker) ekilmiş, sonrakilere ise numuneler ekilmiştir. Ekim sırası Marker-KE-D1E-D2E-KD-D1D-D2D şeklinde olup, son 3 kuyucuğa da bir gün erkekler, diğer gün dişiler olmak üzere tekrarlar ekilmiştir. Ekilecek numune hacimleri, kuyucuk başına 25  $\mu\text{g}$  protein içerecek şekilde her numune için ayrı ayrı belirlenmiştir. Ekim öncesi numuneler ve marker, etüvde  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk süre ile aktive edilmiştir. Günlük taze olarak hazırlanan yürütücü tampon solüsyonunda 110 V gerilim ve jel başına 17 mA akım verilerek 90 dk boyunca elektrofrez uygulanmıştır.





**Resim 7.** Bio rad Mini Protean 3 sistemi ve yürütme tankı içinde elektroforeze hazır jeller (ilk kuyucuklarda ekilmiş markerlar mavi renkte seçilmektedir).

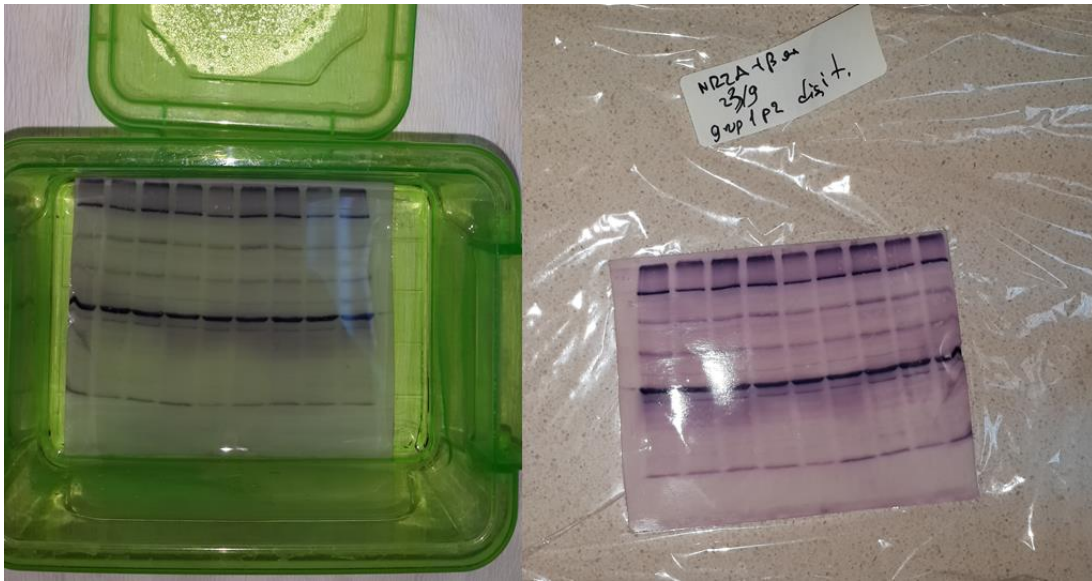
### 3.6.5. Western Blot

Elektroforez sonrası jeldeki numuneler, 30 sn metanol ve 2 dk distile suda bekletilerek aktive edilmiş olan polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi Biorad Mini Protean 3 sistemi içerisinde 100 V gerilim, 300 mA akım uygulanarak 90 dakikada tamamlanmıştır.



**Resim 8.** Transfer sonrası PVDF membran görünümü

Transferden sonra membranlar, çalışılacak reseptöre ait antikoru içeren solüsyonlarda (Anti NR2A 1/5000, Anti NR2B 1/1000, Anti nAChR  $\alpha 7$  1/1000, Anti 5-HT<sub>2A</sub> 1/1000) +4°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 1/10000'lik sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen membranlar, 5 ml BCIP/NBT boya solüsyonunda yeterli boyanma gerçekleşene kadar bekletilmiştir.



**Resim 9.** BCIP/NBT içerisinde bekleyen boyanmış PVDF membranlar

Boyanması tamamlanan membranların optik dansiteleri Kodak Image Station 2000MM görüntüleme cihazında ölçülmüş, bant yoğunlukları her bir membran için  $\beta$ -actin ile normalize edilerek hesaplanmış ve deney grupları kontrol gruplarına göre oranlanarak değerlendirilmiştir.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Su labirenti egzersiz dönemi testinden hedef platformu bulma süresi, dış kadranda geçirilen süre, toplam kat edilen yol ve ortalama yüzme hızı özellikleri bakımından elde edilen veriler, Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve verilerin normal dağılıma uyduğu görülmüş; sonrasında veriler tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir. Tekrarlanan ölçümler gün faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Denemenin sonunda her grubun kendi içinde günler arası çapraz karşılaştırmasında Bonferroni testi kullanılmıştır. Önemlilik düzeyi  $p < 0.05$  olarak alınmıştır. Egzersiz döneminde elde edilen bu verilerin her egzersiz günündeki gruplar arası farkı ise iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

Probe testte hedef kadranda geçirilen süre bakımından elde edilen veriler iki yönlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir. Çalışmada cinsiyet faktörünün dişi ve erkek olmak üzere 2 seviyesi, grup faktörünün K, D1 ve D2 olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur.

Görünür platform testinde platformu bulma süresi bakımından elde edilen veriler iki yönlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir. Çalışmada cinsiyet faktörünün dişi ve erkek olmak üzere 2 seviyesi, grup faktörünün K, D1 ve D2 olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur.

Açık alan testinde geçilen çizgi sayısı, merkez karede geçirilen süre, merkeze giriş sayısı, şatlanma sayısı, idrar yapma sayısı ve dışkılama sayısı özellikleri bakımından elde edilen veriler Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Cinsiyet etkisini incelemek amacıyla veriler farklı cinsiyet gruplarında da aynı yöntemle değerlendirilmiştir.

Zorlanmış yüzme testinde hareketsiz kalınan süreler için veriler 2 yönlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir. Çalışmada cinsiyet faktörünün dişi ve erkek olmak üzere 2 seviyesi, grup faktörünün K, D1 ve D2 olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur.

Western blot analizi sonrası dansitometrik yöntemle elde edilen ve  $\beta$ -actin ile normalize edilerek hesaplanan değerler parametrik testlerin ön şartını sağlamadığı için (normal dağılım ön şartı için Kolmogorov Smirnov testi sonucunda normal dağılıma uymadığı saptanmıştır, Levene testi sonucunda da varyansların homojenliği ön şartının sağlanmadığı saptanmıştır) grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz her iki cinsiyet için ayrı ayrı uygulanmıştır.

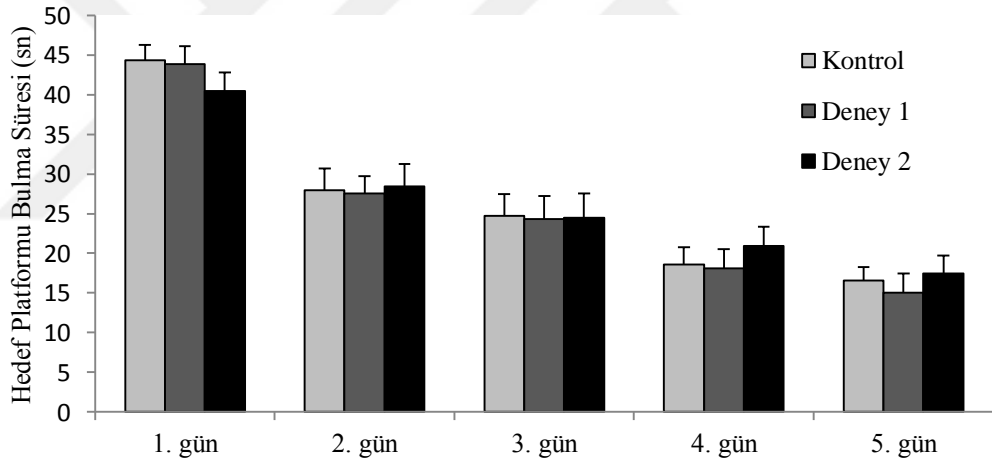


## 4. BULGULAR

### 4.1. Morris Su Labirenti Verileri

#### 4.1.1. Egzersiz Dönemi Verileri

Hedef platformu bulma süreleri gün içi gruplar arası değerlendirildiğinde egzersiz günlerinin hiçbirinde gruplar arası istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Özellikle 1. günde gruplar arası farkın olmaması, tüm sıçanların egzersize eşit koşullarda başladığını, 5. günde gruplar arası farkın olmaması ise tüm grupların egzersiz dönemi sonunda platformu bulmayı öğrendiğini göstermiştir (Grafik 1).

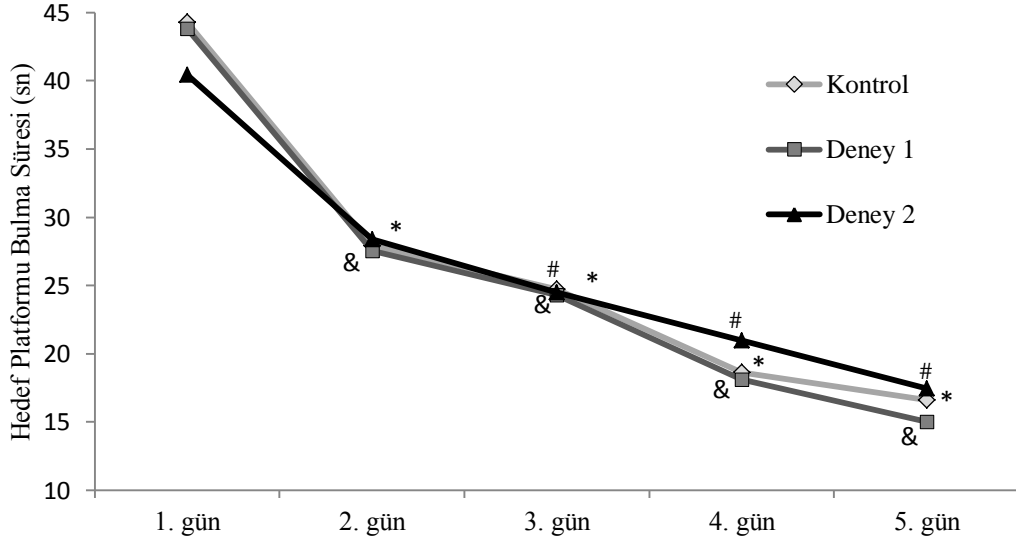


**Grafik 1.** Hedef Platformu Bulma Sürelerinin Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

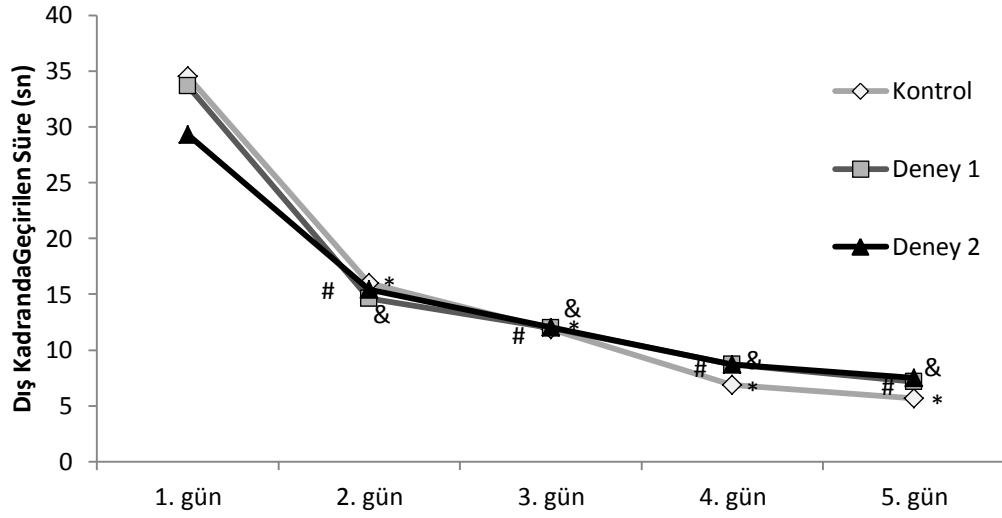
Hedef platformu bulma süresi açısından yapılan günler arası değerlendirmede tüm gruplarda hedef platformu bulma sürelerinin günden güne azalma gösterdiği görülmüştür ( $F = 73.310$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.550$ ). Tekrarlayan ölçümlü varyans analizi sonuçlarına göre, Kontrol ve Deney 1 gruplarında hedef platformu bulma sürelerinde 1. güne göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmanın 2. gün başladığı, ancak Deney 2 grubunda bu azalmanın 3. günde başladığı görülmüştür

(Grafik 2). Ortaya çıkan sonuçlarda cinsiyetin herhangi bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır (grup\*cinsiyet interaksyonu için  $F=0.161$ ,  $p=0.976$ ,  $\eta^2 = 0.013$ ).



**Grafik 2.** Farklı Gruplarda Platformu Bulma Sürelerinde Günlere Göre Değişimler ‘\*’ Kontrol grubunda, ‘&’ Deney 1 grubunda, ‘#’ ise Deney 2 grubunda 1. gün ortalamasına göre anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p<0.05$ ).

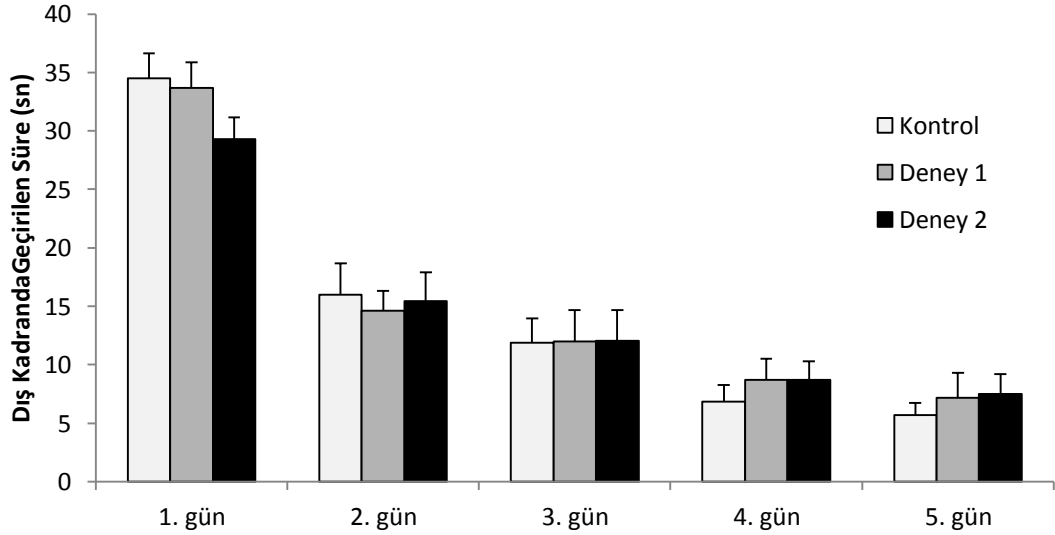
Dış kadrarlarda geçirilen süreler açısından gruplar değerlendirildiğinde, tüm gruplarda dış kadranda geçirilen sürelerin günden güne azaldığı görülmüştür ( $F = 139.354$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.699$ ). İlk egzersiz günündeki verilere göre her 3 grupta da 2. günden itibaren istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmanın olduğu görülmüştür (Grafik 3). Sonuçlarda cinsiyet farkının önemsiz olduğu görülmüştür (grup\*cinsiyet interaksyonu için  $F=0.274$ ,  $p=0.761$ ,  $\eta^2 = 0.009$ ).



**Grafik 3.** Farklı Gruplarda Dış Kadrandaki Geçirilen Sürelerde Günlere Göre Değişimler

‘\*’ Kontrol grubunda, ‘&’ Deney 1 grubunda, ‘#’ ise Deney 2 grubunda 1. gün ortalamasına göre anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

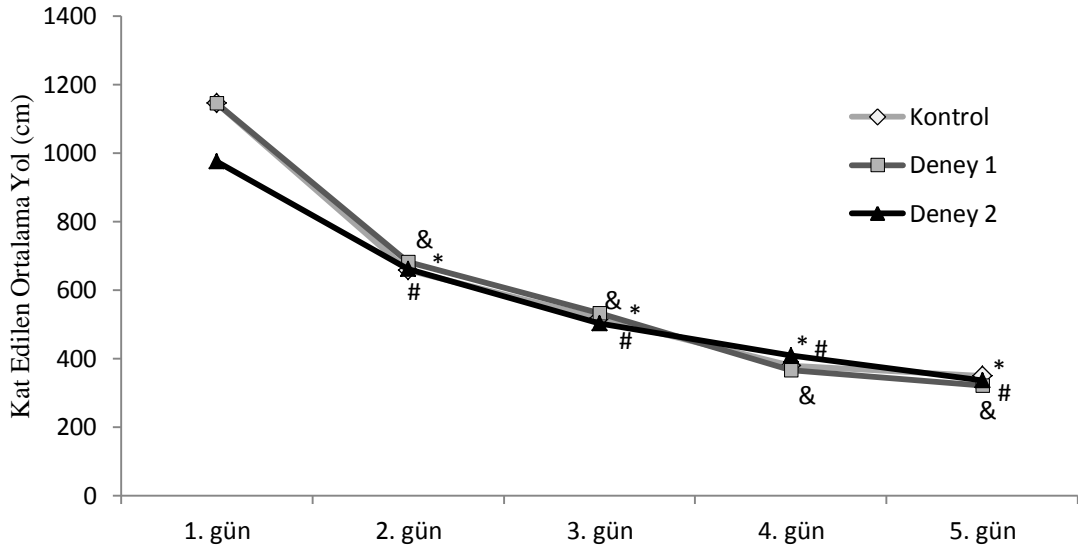
Dış kadranda geçirilen süreler gün içi gruplar arası değerlendirildiğinde ise egzersiz günlerinin hiçbirinde gruplar arası anlamlı farklılığın oluşmadığı gözlenmiştir (Grafik 4).



**Grafik 4.** Dış Kadrandaki Geçirilen Sürelerin Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

Kat edilen ortalama yol açısından gruplar değerlendirildiğinde, kat edilen yolların tüm gruplarda günden güne azalma gösterdiği tespit edilmiştir ( $F = 102.983$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.632$ ). İlk egzersiz günündeki verilere göre her 3 grupta da 2. günden itibaren istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmanın olduğu grlmştir (Grafik 5). Sonuçlarda cinsiyet farkının önemsiz olduğu grlmştir (grup\*cinsiyet interaksyonu için  $F=0.4$ ,  $p=0.672$ ,  $\eta^2 = 0.013$ ).

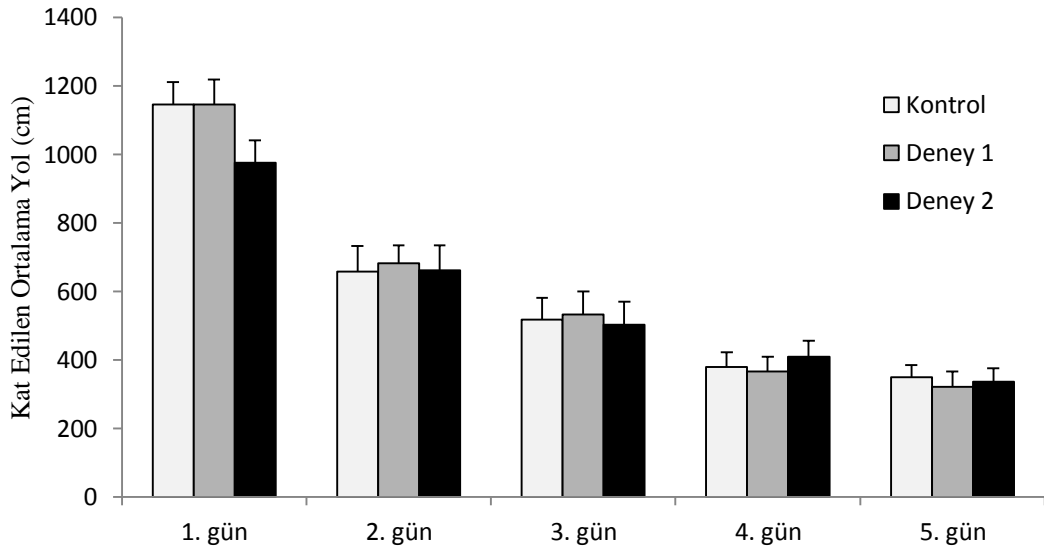


**Grafik 5.** Kat Edilen Yolların Günlere Göre Değişimi

\*' Kontrol grubunda, '&' Deney 1 grubunda, '#' ise Deney 2 grubunda 1. gün ortalamasına göre anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

Kat edilen yollar gün içi gruplar arası değerlendirildiğinde ise egzersiz günlerinin hiçbirinde gruplar arası anlamlı farklılığın oluşmadığı gözlenmiştir (Grafik 6).

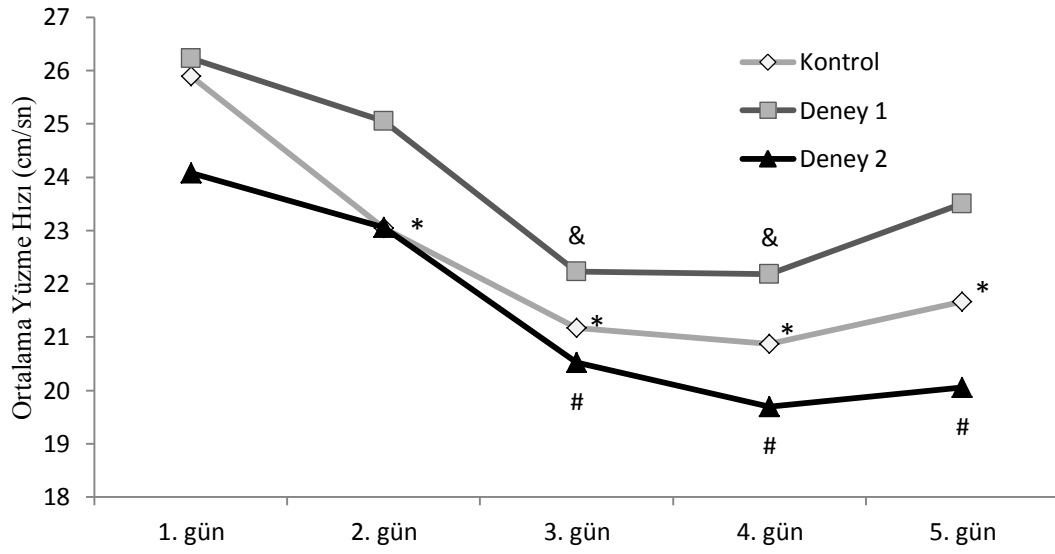




**Grafik 6.** Kat Edilen Yolların Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

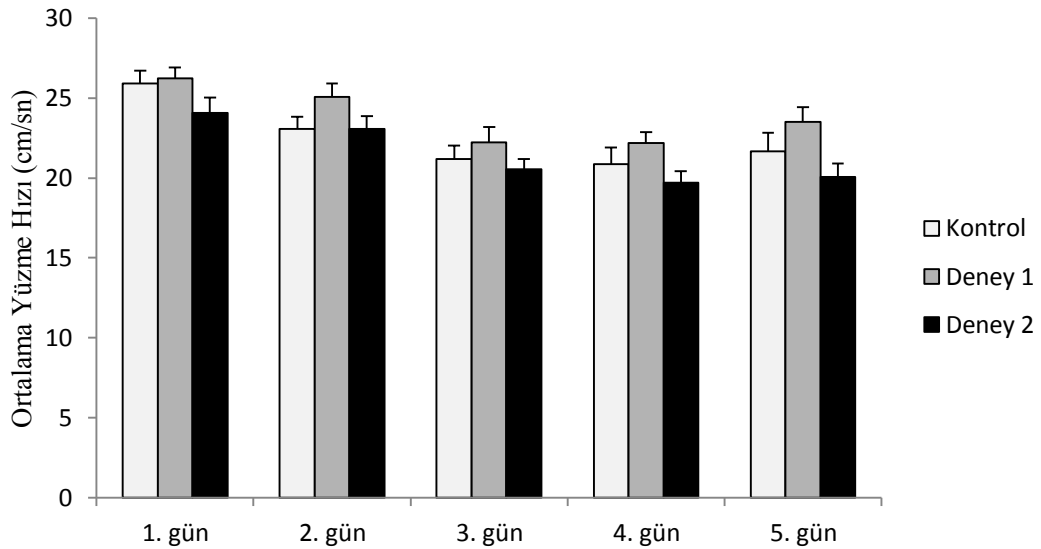
Ortalama yüzme hızları açısından yapılan değerlendirmede tüm grupların ortalama yüzme hızlarında tüm gruplarda günden güne düşüş olduğu görülmektedir ( $F = 30.427$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.336$ ). Cinsiyet farkının sonuçlara etkisinin olmadığı görülmüştür (grup\*cinsiyet interaksyonu için  $F=1.308$ ,  $p=0.278$ ,  $\eta^2 = 0.042$ ). Kontrol grubunda ortalama yüzme hızının ilk güne göre 2. egzersiz gününde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaldığı görülmüş ancak bu azalmanın Deney 1 ve Deney 2 gruplarında 3. günde oluşmaya başladığı görülmüştür. Beşinci egzersiz gününde ortalama yüzme hızının tüm gruplarda minimal düzeyde artış eğilimine girdiği görülmüştür (Grafik 7). Her ne kadar istatistiksel açıdan önemli olmasa da bu artış, platformu bulmayı öğrenen sıçanların egzersize başlar başlamaz hızlı bir şekilde platforma yönelmesi ile açıklanmıştır.



**Grafik 7.** Ortalama Yüzme Hızlarında Günlere Göre Değişim

‘\*’ Kontrol grubunda, ‘&’ Deney 1 grubunda, ‘#’ ise Deney 2 grubunda 1. gün ortalamasına göre anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

Ortalama yüzme hızı açısından yapılan gün içi gruplar arası karşılaştırmada ise egzersiz günlerinin hiçbirinde gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır (Grafik 8).

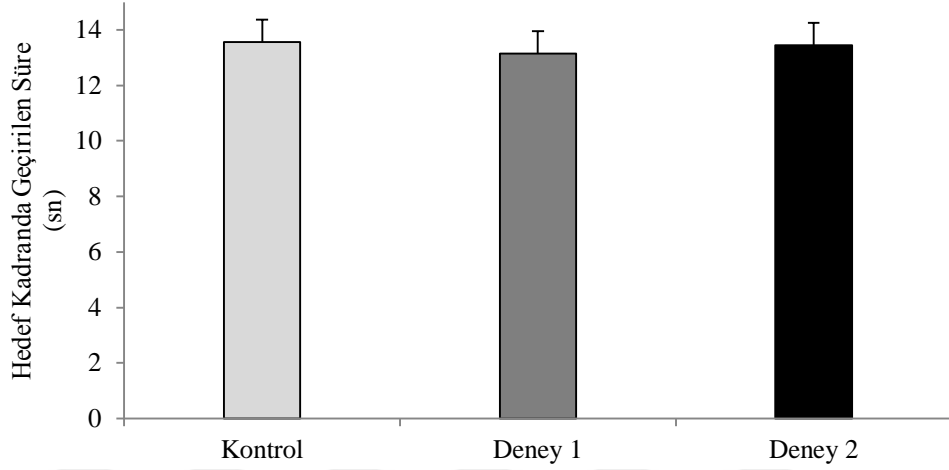


**Grafik 8.** Ortalama Yüzme Hızlarının Gün İçi Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

#### 4.1.2. Probe Test Verileri

Probe testte hedef kadranda geçirilen süreler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $F= 0.072$ ,  $p= 0.930$ ); grup\*cinsiyet interaksyonunda da anlamlı bir fark yoktur ( $F= 1.612$ ,  $p= 0.208$ ) (Grafik 9) .

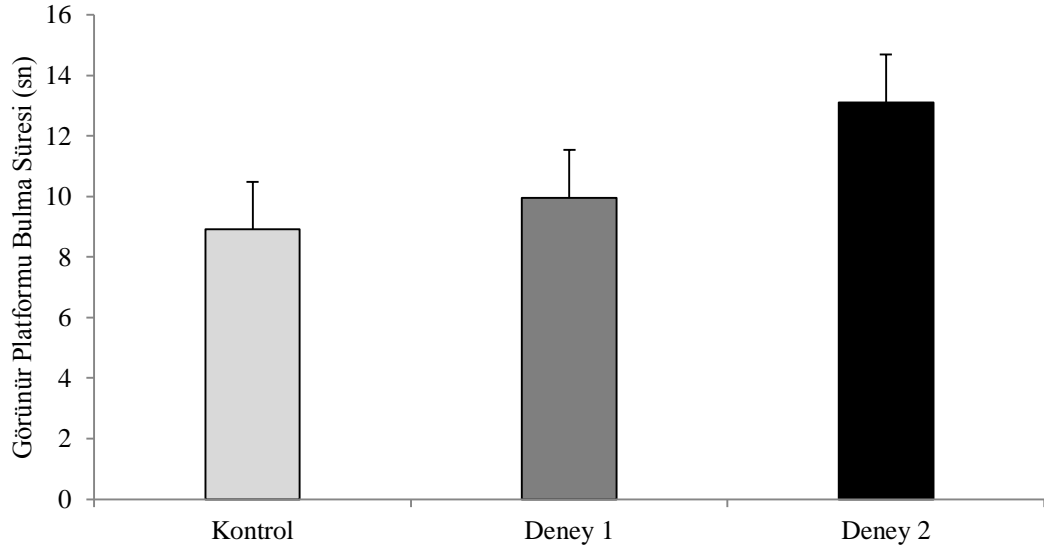


**Grafik 9.** Probe Testte Hedef Kadranda Geçirilen Süreler

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

#### 4.1.3. Görünür Platform Verileri

Görünür platformu bulma süreleri açısından gruplar arası bir fark saptanamamıştır ( $F= 1.914$ ,  $p= 0.156$ ); grup\*cinsiyet interaksyonunda da anlamlılık yoktur ( $F= 0.358$ ,  $p= 0.700$ ) (Grafik 10).



**Grafik 10.** Görünür Platformu Bulma Sürelerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

#### 4.2. Açık Alan (*Open Field*) Testi Verileri

Açık alan testi verilerinde yapılan Kruskal Wallis analizi sonrası şahlanma sayısı ve merkez kareye giriş sayısı bakımından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (Tablo 4). Merkez kareye giriş sayısı bakımından cinsiyetler arasında fark olduğu gözlenmiştir (Tablo 5).

**Tablo 4.** Açık Alan Testi Verilerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

	Kontrol	Deney 1	Deney 2
<b>Geçilen Çizgi Sayısı</b>	26,4±2,2	24,4±2,4	20,9±2,2
<b>Şahlanma Sayısı</b>	19,3±2,5	12,4±1,2	<b>10,1±1,4*</b>
<b>Merkez Kareye Giriş Sayısı</b>	1,9±0,5	0,7±0,1	<b>0,4±0,1*</b>
<b>Merkez Karede Geçirilen Süre</b>	2,4±1,0	0,7±0,2	0,6±0,2
<b>İdrar Yapma Sayısı</b>	2,0±0,3	1,7±0,1	2,0±0,2
<b>Dışkılama Sayısı</b>	4,1±0,4	5,1±0,5	3,9±0,3

\*', Kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlılığı ifade etmektedir (p<0.05).

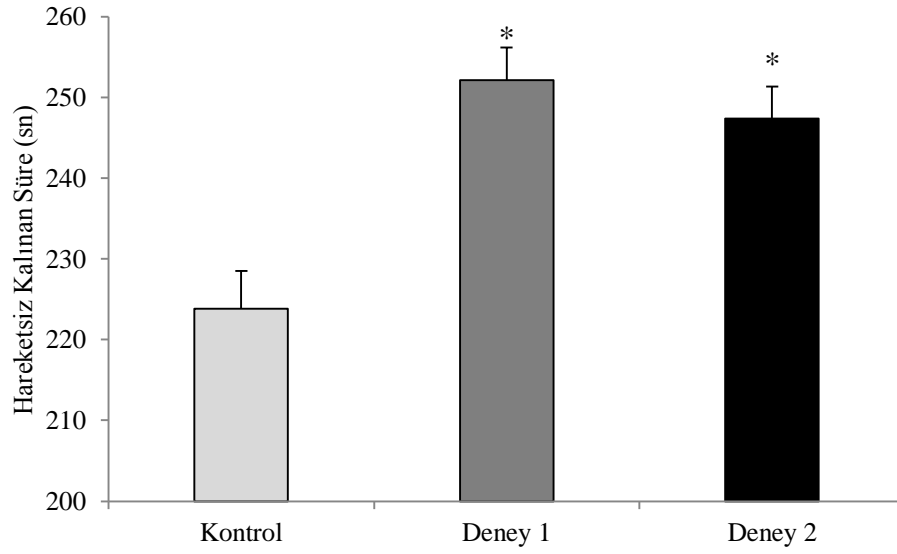
**Tablo 5.** Açık Alan Testi Verilerinin Farklı Cinsiyetlerde Gruplar Arası Karşılaştırılması

		<b>Kontrol</b>	<b>Deney 1</b>	<b>Deney 2</b>
<b>Geçilen Çizgi Sayısı</b>	Erkek	21,7±3,0	21,7±2,9	19,0±3,2
	Dişi	31,0±2,7	27,1±3,8	22,7±2,9
<b>Şahlanma Sayısı</b>	Erkek	18,8±4,7	9,6±1,0	<b>7,9±1,9*</b>
	Dişi	19,8±1,9	15,3±1,9	<b>12,4±1,8*</b>
<b>Merkeze Giriş Sayısı</b>	Erkek	1,9±1,0	0,5±0,2	0,3±0,1
	Dişi	1,8±0,5	0,9±0,2	<b>0,5±0,2*</b>
<b>Merkez Karede Geçirilen Süre</b>	Erkek	3,0±2,0	0,5±0,2	0,3±0,1
	Dişi	1,7±0,6	0,9±0,3	0,8±0,4
<b>İdrar Yapma Sayısı</b>	Erkek	2,5±0,5	1,7±0,2	2,1±0,3
	Dişi	1,5±0,3	1,7±0,2	1,9±0,2
<b>Dışkılama Sayısı</b>	Erkek	4,6±0,6	5,6±0,7	3,9±0,4
	Dişi	3,6±0,6	4,5±0,6	3,9±0,5

‘\*’, Kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p<0.05$ )

### 4.3. Zorlanmış Yüzme Testi Verileri

Toplam 6 dakikalık test süresi boyunca sıçanların hareketsiz kaldıkları süreler iki yönlü ANOVA testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel düzeyde gruplar arası anlamlı fark saptanmış ( $F= 12.432$ ,  $p<0.0001$ ), ancak grup\*cinsiyet interaksyonu anlamlı bulunmamıştır ( $F=0.211$ ,  $p=0.810$ ). Gruplar arasında yapılan çapraz karşılaştırmada Kontrol grubuna göre Deney 1 ve Deney 2 gruplarının ortalamalarının istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla  $p<0.0001$  ve  $p=0.001$ ) (Grafik 11).



**Grafik 11.** Hareketsiz Kalınan Sürelerin Gruplar Arası Karşılaştırılması

‘\*’ Deney 1 ve Deney 2 grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı farkı göstermektedir ( $p<0.05$ ). Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

#### 4.4. Reseptör Konsantrasyonları

Western blot analizi sonucunda öğrenme ile ilişkili reseptörlerin konsantrasyonları arasındaki farklar her iki cinsiyette ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirmede dişi hayvanlarda NR2A reseptör konsantrasyonları açısından Deney 2 grubunun ortalaması Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ( $p<0.01$ ). nAChR  $\alpha 7$  reseptör konsantrasyonlarında ise Deney 1 ve Deney 2 grubunun ortalamalarının Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu bulunmuştur ( $p<0.01$ ). NR2B ve 5-HT<sub>2A</sub> reseptör konsantrasyonları açısından ise grupların ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo 6-7).

Erkeklerde NR2A reseptör konsantrasyonlarında Deney 2 grubunun ortalamasının Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca 5-HT<sub>2A</sub> reseptör düzeylerinde Deney 1 grubunun ortalaması Kontrol ve Deney 2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Erkeklerde NR2B ve nAChR  $\alpha 7$  reseptörleri için

grupların ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 6-7).

**Tablo 6.** NR2A ve NR2B Ortalama Reseptör konsantrasyonları (Kontrol Grubuna Göre Oranlanmış)

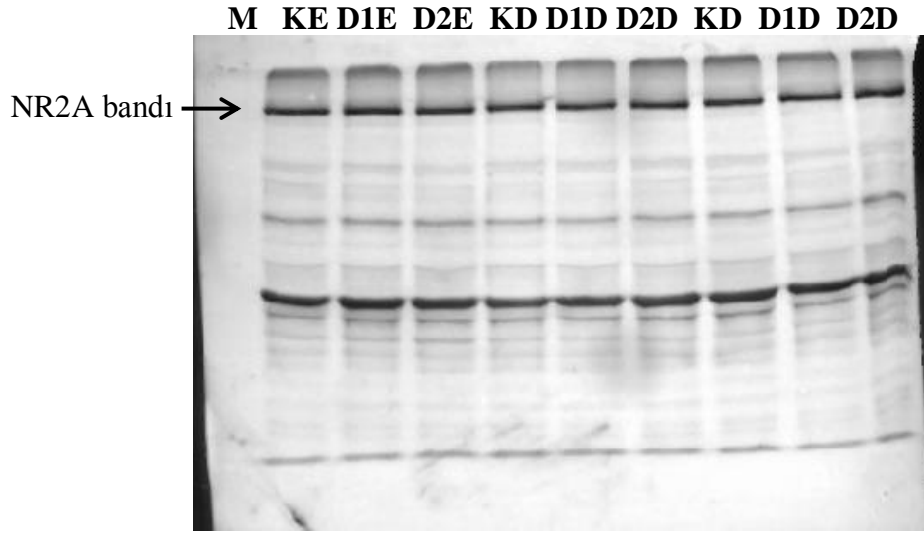
		NR2A	NR2B
	GRUP	Ortalama	Ortalama
Dişi	Kontrol	100,0±0	100,0±0
	Deney 1	116,3±7,0	100,5±0,8
	Deney 2	115,8±5,9 <sup>a</sup>	100,8±1,2
Erkek	Kontrol	100,0±0	100,0±0
	Deney 1	122,4±9,0	99,3±0,4
	Deney 2	139,6±11,3 <sup>b</sup>	100,6±0,9

Reseptör konsantrasyonları kontrole göre oranlanarak ve ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. 'a', dişilerde, 'b' ise erkeklerde NR2A reseptör konsantrasyonlarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,01).

**Tablo 7.** 5-HT<sub>2A</sub> ve nAChR α7 Ortalama Reseptör konsantrasyonları (Kontrol Grubuna Göre Oranlanmış)

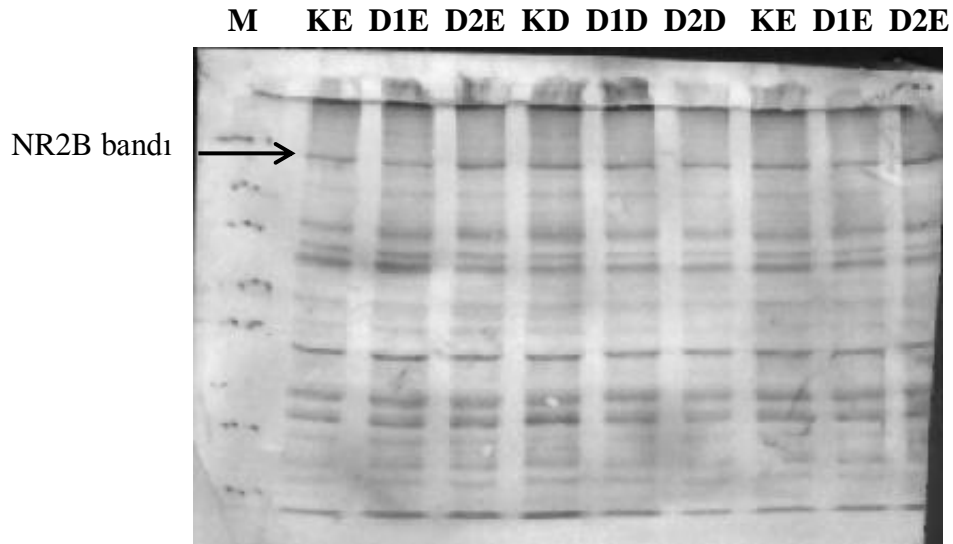
		5HT <sub>2A</sub>	nAChR α7
	GRUP	Ortalama	Ortalama
Dişi	Kontrol	100,0±0	100,0±0
	Deney 1	96,0±1,5	97,5±1,1 <sup>a</sup>
	Deney 2	95,1±1,7	98,4±1,5 <sup>a</sup>
Erkek	Kontrol	100,0±0	100,0±0
	Deney 1	101,3±0,5 <sup>b</sup>	99,4±0,6
	Deney 2	99,9±0,7	98,9±0,7

Reseptör konsantrasyonları kontrole göre oranlanarak ve ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. 'a', dişilerde nAChR α7 reseptör konsantrasyonlarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,01). 'b', erkeklerde 5HT<sub>2A</sub> reseptör konsantrasyonlarında Kontrol ve Deney 2 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,01).



**Resim 10.** NR2A reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü

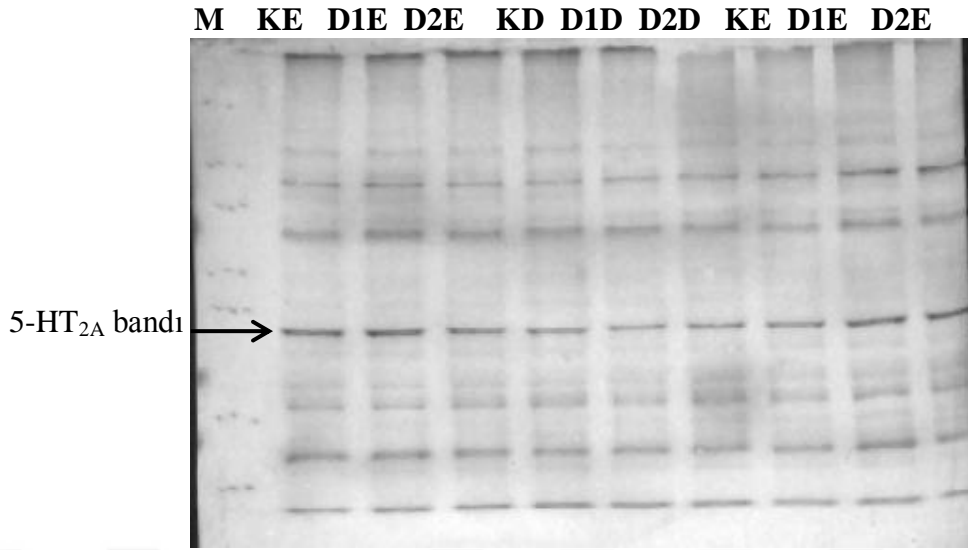
(M: Marker, KE: Kontrol Erkek, D1E: Deney 1 Erkek, D2E: Deney 2 Erkek, KD: Kontrol Dişi, D1D: Deney 1 Dişi, D2D: Deney 2 Dişi)



**Resim 11.** NR2B reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü

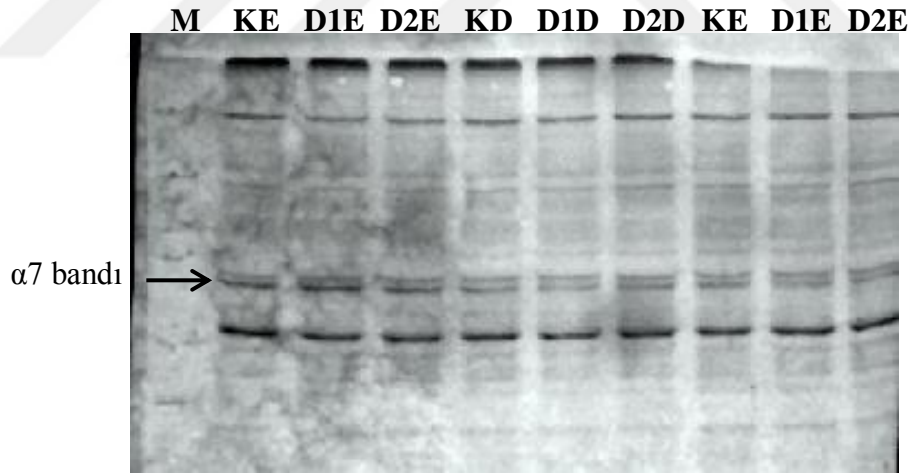
(M: Marker, KE: Kontrol Erkek, D1E: Deney 1 Erkek, D2E: Deney 2 Erkek, KD: Kontrol Dişi, D1D: Deney 1 Dişi, D2D: Deney 2 Dişi)





**Resim 12.** 5-HT<sub>2A</sub> reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü

(M: Marker, KE: Kontrol Erkek, D1E: Deney 1 Erkek, D2E: Deney 2 Erkek, KD: Kontrol Dişi, D1D: Deney 1 Dişi, D2D: Deney 2 Dişi)



**Resim 13.** nAChR α7 reseptörüne ait örnek bir PVDF membran görüntüsü

(M: Marker, KE: Kontrol Erkek, D1E: Deney 1 Erkek, D2E: Deney 2 Erkek, KD: Kontrol Dişi, D1D: Deney 1 Dişi, D2D: Deney 2 Dişi)

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda MSG'nin çocukluk döneminde öğrenme, hafıza ve lokomotor aktiviteye etkilerini çeşitli davranışsal testlerle değerlendirdik. Mekansal hafıza ve öğrenmeyi değerlendiren Morris Su Labirenti Testinde, anksiyete ve keşifçi davranışı değerlendiren Açık Alan Testinde, ayrıca davranışsal çaresizlik ve depresif duygu durumu değerlendiren Zorlanmış Yüzme Testinde MSG'nin çeşitli düzeylerde anlamlı etkiler oluşturabildiğini gözlemledik. Bunun yanında hipokampüsteki öğrenme ve hafıza ile ilişkili nörotransmitter reseptörlerinden NR2A, 5-HT<sub>2A</sub> ve nAChR  $\alpha 7$  reseptörlerinin konsantrasyonlarında da farklı düzeylerde etki oluşturabildiğini, ve bu etkinin cinsiyetlere göre farklı olabildiğini saptadık.

Çalışmamızda mekansal hafıza ve öğrenmeyi değerlendiren Morris Su Labirenti testinin verileri her grupta günler arası değerlendirildiğinde Kontrol grubundaki sıçanların hedef platformu 2. günden itibaren ilk güne göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha kısa sürede bulduğu görülmüş, buna karşın yüksek doz (2,5 g/kg/gün) MSG verilen Deney 2 grubunda ilk test gününe göre anlamlı farklılığın 3. günde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 5. egzersiz gününde ve probe testte gruplar arası farklılığın olmaması, öğrenme hedefine ulaşmada Deney 1 ve Deney 2 gruplarının Kontrol grubunu yakaladığını göstermiştir. Bu sonuçlar ile yüksek dozda MSG'ye maruz kalan sıçanların öğrenme hedefine ulaştıkları, ancak öğrenmenin bu gruplarda kontrol grubuna göre daha yavaş gerçekleştiği öne sürülebilir.

Literatürde konuyla ilgili yapılan çalışmaların büyük kısmında MSG uygulanmasını takiben deney hayvanlarının Morris Su Labirenti performansında bozulma gösterilmiştir.

Abu-Taweel ve arkadaşları (2014) 8-10 haftalık erkek farelere 8 mg/kg/gün dozunda 1 ay süreyle içme sularına karıştırmak suretiyle MSG uygulamanın Morris Su Labirentinde platformu bulma süresini arttırdığını, ayrıca probe testte hedef kadranda geçirilen süreyi azalttığını göstermişlerdir (19). Bu çalışmada MSG ve aspartam (ASM, 32 mg/kg/gün), ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmış, ASM'nin de MSG ile paralel etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında MSG ve

ASM'nin kombine olarak uygulandığı gruptaki test performanslarının tek başına MSG ya da ASM uygulanan gruplara göre de istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bozuk olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada 4 günlük Morris Su Labirenti testi süresi boyunca ANOVA ile gün içi gruplar arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızdaki gibi grup içi günler arası test performansları değerlendirilmemiştir. Ayrıca çalışmada uygulandığı ifade edilen MSG dozu bizim çalışmamıza göre düşük görünse de, bu çalışmada MSG'nin içme suyuna karıştırılarak ortalama bir tüketim hesabıyla verilmesi gerçekte tüketilen miktarın değişebileceği şeklinde bir olasılığı da beraberinde getirmektedir. Ancak en azından test performanslarının MSG alan grupta bozulması, bizim çalışmamızla uyumlu bir sonuç olarak kabul edilebilir. Abu-Taweel ve arkadaşları çalışmalarında ayrıca, farelerin ön beyinlerinde serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin de düzeylerini HPLC yöntemi ile ölçmüşlerdir. Dopamin ve serotonin düzeylerinin tek başına MSG ya da ASM alan gruplarda değişmediği, ancak kombine olarak MSG ve ASM alan grupta bu nörotransmitterlerin düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığını göstermişlerdir.

Khaliq ve arkadaşları (2015) çalışmalarında 4 aylık erkek sıçanlara 3 hafta süreyle 4 mg/kg/gün dozunda MSG'yi cilt altı enjeksiyon yoluyla uygulamışlar, daha sonra su labirenti testi ve obje tanıma testleri ile öğrenme ve hafızalarını değerlendirmişlerdir (21). Kısa ve uzun dönem hafızayı değerlendirmek için egzersizden 1 saat sonra ve 24 saat sonra olmak üzere yaptırılan iki egzersiz sonucunda da hedef platformu bulma sürelerinin MSG alan sıçanlarda kontrol grubuna göre daha uzun olduğunu göstermişlerdir. Objeye tanıma testinde de MSG alanların performansında bozulma tespit etmişlerdir. Bu çalışmada uygulanan doz bizim çalışmamızda kullandığımız dozlardan daha düşük olmakla birlikte, deneyde kullanılan sıçanların yaşları, MSG'nin uygulama süresi ve özellikle uygulama yolu açısından da bizim çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Oral alımı takiben MSG'nin büyük kısmının gastrointestinal sistemde metabolize olduğu ve sistemik dolaşıma geçen miktarın azaldığı bilinmektedir (47). Bu çalışmada ise MSG'nin cilt altı enjeksiyonla uygulanmasının gastrointestinal sistemin by-pass edilmesi ve böylece sistemik dolaşıma göreceli olarak daha çok MSG'nin geçmesine neden

olarak görece düşük dozda uygulanan MSG'nin bu etkilere neden olmuş olabileceği söylenebilir.

Xu ve arkadaşları (2012) glutamat aracılı bilişsel bozulmaya karşı asiyatik asitin koruyucu etkisini araştırmışlardır (151). Bu çalışmada farelere postnatal 7-13. günler arası cilt altı enjeksiyonla 2,5 g/kg dozunda MSG uygulanmıştır. Yalnızca MSG uygulanan grupta Morris Su Labirenti performanslarında bozulma olduğu gösterilmiştir. Egzersiz döneminde gün içi gruplar arası karşılaştırmada 3. ve 4. egzersiz günlerinde MSG alanların hedef platformu bulma süreleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. Ayrıca probe testte de hedef kadranda geçirilen sürelerde MSG alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşüklük tespit edilmiştir.

Minor ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada farelerde hipotalamus arkuat nükleus hasarı oluşturmak amacıyla postnatal 5. günde 4g/kg dozunda cilt altı MSG enjeksiyonu uygulamışlardır Arkuat nükleus hasarı ve nöropeptit Y'nin kalori kısıtlaması uygulanmış farelerde fiziksel performans ve bilişsel fonksiyonlara etkisinin araştırıldığı çalışmada MSG enjekte edilen farelerde Morris Su Labirenti test performanslarının ve probe test performanslarının bozulduğu gösterilmiştir (152).

Çalışmamızda, keşifçi davranış ve anksiyete ile ilişkili olan açık alan testinde Deney 2 grubunda şahlanma sayısı ve merkez kareye giriş sayısı açısından Kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu iki parametrenin ortalamaları Kontrol grubunda en yüksek iken, Deney 1 ve Deney 2 gruplarında azalma göstermektedir. Bu azalma, şahlanma sayısı bakımından her iki cinsiyette Deney 2 grubunda Kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı iken, merkez kareye giriş sayısı bakımından yalnızca dişilerde Deney 2 grubunda Kontrol dişi grubuna göre anlamlıdır. Bu veri yüksek doz MSG alan grupta keşifçi davranışın azaldığını, kurtulma iç güdüsünün baskılandığını ifade etmektedir. Ayrıca bu etkinin özellikle dişi sıçanlarda anlamlı olması MSG'nin cinsiyetler üzerine etkilerinde fark olduğunu göstermektedir.

Vitor-de-Lima ve arkadaşlarının (2016) MSG'nin egzersiz yapan ve yapmayan sıçanlarda anksiyete-depresyon durumlarına etkisini değerlendirmek için

yaptıkları çalışmada sıçanlara postnatal 7-27. günler arası oral gavaj yoluyla 1 ve 2 g/kg/gün dozlarında MSG uygulanmış, ardından sıçanların bir kısmına egzersiz yaptırılmış, daha sonra sıçanlara açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi uygulanmıştır. Açık alan testinde MSG alan sıçanların merkez kareye giriş sayılarında, merkez karede geçirdikleri sürelerde ve kat ettikleri toplam yollarda anlamlı düşüklük olduğu tespit edilmiştir (153).

Solomon ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmada MSG 7 haftalık farelere oral yolla 100, 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarında 21 gün süreyle uygulanmıştır. Daha sonra farelere davranışsal testlerden Y labirent testi, yükseltilmiş artı labirent testi, karanlık-aydınlık bölge testi, açık alan testi ve zorlanmış yüzme testi uygulanmıştır. Uygulanan bu testlerde yalnızca 500 mg/kg/gün dozunda MSG verilen grupta zorlanmış yüzme testinde hareketsiz kalman süre kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptanırken, açık alan testi de dahil olmak üzere diğer davranışsal testlerde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (56). Bu çalışmadaki dozlar, bizim düşük dozumuzdan (25 mg/kg/gün) daha yüksek olmakla birlikte uygulama süresi bizim çalışmamızdan 3 hafta daha kısadır. Ayrıca deneyde kullanılan deney hayvanı türü de farklıdır.

Ramalho ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada 5 haftalık sıçanlara 2 g/kg/gün dozunda 10 gün süreyle oral gavaj yoluyla MSG uygulamanın açık alan testinde şaşlanma sayısı ve geçilen çizgi sayısına anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (154). Bu çalışmada uygulanan MSG dozu, bizim çalışmamızda kullandığımız yüksek doza (2,5 g/kg/gün) yakın olup sıçanlara MSG'nin verilmeye başlandığı yaş çalışmamızla benzerlik gösterse de, açık alan testinde farklı sonuçlar elde etmemizin nedeninin uygulama süresindeki yaklaşık 30 günlük farklılık olduğu şeklinde bir yorum yapılabilir.

Çalışmamızda davranışsal çaresizlik ve depresyona eğilimi değerlendirmek için yaptığımız zorlanmış yüzme testinde, sıçanların hareketsiz kaldığı sürelerin her iki cinsiyette de Deney 1 ve Deney 2 gruplarında Kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğunu saptadık.

Quines ve arkadaşları (2014) MSG'nin depresif ve anksiyojenik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında sıçanlara postnatal 1-5. günler arası 4 g/kg/gün dozunda

cilt altı enjeksiyon yoluyla MSG uygulamışlar, daha sonra postnatal 60. gün zorlanmış yüzme testini de içeren 3 farklı davranışsal testle deney hayvanlarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda MSG verilen grupta zorlanmış yüzme testinde hareketsiz olarak geçirilen süreler kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (9). Aynı araştırmacı 2016 yılında yaptığı ve difenil diselenid'in MSG verilen sıçanlardaki antidepresan etkisinin araştırıldığı çalışmasında da aynı doz ve sürede MSG ile zorlanmış yüzme testinde benzer sonuçlar elde etmiştir (155). Quines ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda deney grupları eşit sayıda erkek ve dişi sıçan içermesine karşın araştırmacılar cinsiyet faktörünün etkisini değerlendirmemişlerdir.

Çalışmamızın moleküler kısmında hipokampüste öğrenme ve hafıza ile ilgili konsantrasyonu çalışılan nörotransmitter reseptörlerinden NR2A reseptörünün konsantrasyonu hem erkek hem de dişi cinsiyette Deney 2 gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. nAChR  $\alpha 7$  reseptörü açısından erkek gruplarda anlamlı bir fark saptanmazken, dişilerde Deney 1 ve Deney 2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşüklük saptanmıştır. 5-HT<sub>2A</sub> reseptör konsantrasyonunda ise erkeklerde Deney 1 grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir artış saptanırken, Deney 2 grubu ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir.

Yönden ve arkadaşları (2016) MSG ve ASM'nin hipokampal NMDA reseptör konsantrasyonlarına etkisini inceledikleri çalışmada, sıçanlara oral gavaj yoluyla 8 hafta boyunca 120 mg/kg/gün MSG uygulamanın hipokampal NR2A, NR2B ve NR1 reseptör konsantrasyonlarını değiştirmediğini göstermişlerdir. Aynı uygulama yolu ve süresinde 40 mg/kg/gün dozunda ASM'nin NR2B ve NR1 konsantrasyonunda artışa neden olduğu ancak NR2A konsantrasyonunu değiştirmediği tespit edilmiştir. MSG ve ASM'nin kombine olarak uygulandığı gruplarda ise her üç reseptörün de artış gösterdiği bulunmuştur (156). Bu çalışmada uygulanan MSG dozu, bizim çalışmamızda NR2A reseptör konsantrasyonunda fark oluşturan doza göre daha düşük kalmaktadır.

Beas-Zárate ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise sıçanlara cilt altı enjeksiyon yoluyla postnatal 1, 3, 5 ve 7. günlerde 4 g/kg dozunda

MSG uygulanmış ve postnatal 60. günde sıçanlar sakrifiye edilerek korteks, striatum ve hipokampüste NR1, NR2A ve NR2B subünit genlerinin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda deney grubunda hipokampus ve striatumda her üç reseptör subünit geninin ekspresyon düzeyi de kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (157). Bu çalışmada hem uygulanan dozun yüksek olması, hem de cilt altı enjeksiyon yoluyla uygulanmış olması NR2B ekspresyonundaki artıştan sorumlu olabilir. Ayrıca neonatal dönemde NR2A/NR2B oranının erişkin döneme göre NR2B lehine olması da bu sonuçta etkili olmuş olabilir.

Hipokampal NMDA reseptörleri ile mekansal hafıza arasındaki ilişki yapılan birçok çalışmada güçlü şekilde kanıtlanmıştır (114-117, 158, 159).

Baez ve arkadaşları 2013 yılında, 5 dakika süreyle açık alan platformunda mekansal alışma sürecine bırakılan erişkin sıçanlarda, KCl ile plastisitenin stimüle edildiği hipokampal hücre kültürlerinde ve teta dalga stimülasyonu ile LTP'nin uyarıldığı hipokampal kesitlerde NR1 ve NR2A'nın artış gösterdiğini, buna karşın NR2B reseptör konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir (159). Aynı araştırmacılar 2017 yılında yayınlanan çalışmalarına bu kez 1 aylık, 2 aylık ve 3 aylık sıçanları da dahil etmişler, ayrıca açık alan testine ilave olarak obje tanıma hafızasının etkisini de değerlendirmişlerdir. Önceki yaptıkları çalışmaya paralel şekilde, sıçanların yaşlarından ya da uygulanan testin çeşidinden (mekansal tanıma - obje tanıma) bağımsız olarak hafızanın kayıt edilmesi sürecinde hipokampal NR1 ve NR2A reseptör konsantrasyonunun arttığını, NR2B'nin ise değişmediğini bulmuşlardır (116). Çalışmamızda mekansal hafızanın kayıt edilmesi sürecindeki etkilenmeye rağmen NR2B reseptör konsantrasyonunda bir değişikliğin gözlenmemesi, bu çalışmalar göz önüne alındığında uyumsuz bir sonuç olarak değerlendirilmemiştir.

Liang ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada mekansal hafızanın oluşturulması sürecinde glutamat reseptörlerinden NMDA ve AMPA reseptörlerinin, hafızanın konsolidasyonunda görece NMDA reseptörlerinin, kaydedilen bilginin geri çağırılması sürecinde ise AMPA reseptörlerinin daha önemli olduğu ifade edilmiştir (158). Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar da bu bilgiyi destekler niteliktedir.

Zira biz de çalışmamızda yüksek doz MSG alan gruplarda öğrenmenin geciktiğini ve bu gruplarda NR2A tipindeki NMDA reseptör konsantrasyonlarının değiştiğini bulduk. Buna karşın hafızanın geri çağırılma sürecini değerlendiren probe testte gruplar arası anlamlı bir farkın olmadığını saptadık. Biz her ne kadar çalışmamızda AMPA reseptör konsantrasyonlarını değerlendirmemiş olsak da, NR2A reseptör konsantrasyonundaki değişiklik ile birlikte öğrenme hızında azalma olduğunu, buna karşın NR2A'daki bu değişimin bilgiyi geri çağırma sürecini etkilemediğini destekleyen bir sonuç bulmuş olduk.

Bahsedilen çalışmalarda öğrenme sürecinde hipokampal NR2A reseptörlerinde artış olduğu ifade edildiği halde, çalışmamızda NR2A reseptörlerinde artışla birlikte öğrenme hızının yavaş oluşu, ilk bakışta bir tezat gibi görülebilir. Ancak literatürdeki çalışmalarda bahsedilen artış, normal bir fizyolojik değişikliği ifade etmektedir. Oysa MSG uygulanmasını takiben meydana gelen NR2A reseptör konsantrasyonunun artışı, patolojik bir durumdur.

NMDA aracılı eksitotoksosite, literatürde oldukça iyi tanımlanmış olmakla birlikte, bu süreçte moleküler düzeyde gerçekleşen değişimler ile ilgili çalışmalara halen devam edilmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı NMDA alt tiplerinin ve bu alt tiplerin sinaptik ya da ekstrasinaptik olarak farklı yerleşimlerinin eksitotoksitede farklı etkilere neden olduğu ifade edilmiştir. Çoğunlukla benimsenen kanı, NR2B reseptörlerinin daha çok ekstrasinaptik yerleşimli olduğu ve patolojik süreçlerde eksitotoksik hücre hasarı ya da ölümünde etkin rol oynadığı, buna karşın NR2A reseptörlerinin daha çok sinaptik yerleşimli olup nörogenez, plastisite ve LTP ile ilişkili olduğu yönündedir (160-163). Ancak her iki reseptörün de fizyolojik şartlarda öğrenme ve hafızada önemli görevlerinin olduğu da vurgulanmaktadır (12, 164).

Çalışmamızda yüksek dozda MSG alan gruplarda NR2B reseptör konsantrasyonlarında artış saptanmazken, NR2A reseptör konsantrasyonunda artış görülmüştür. Bu yönde yapılan çalışmalar incelendiğinde, literatürde artmış NR2A/NR2B oranının bilişsel fonksiyonlar, hafıza ve nöroplastisiteye olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Xu ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, NR2A/NR2B oranındaki değişimin LTP ve/veya LTD'nin uyarılma durumunu değiştirdiği gösterilmiştir (165). Cui ve arkadaşları (2013)



yaptıkları çalışmada, NR2A ekspresyonu arttırılan transgenik farelerde obje tanıma testi, korku koşullama testi ve artı labirent havuz testini de içeren davranışsal testlerdeki performansların bozulduğunu göstermişlerdir. Ayrıca elektrofizyolojik çalışmalarla LTP ve LTD'nin farklı düzeylerde etkilendiğini göstermişlerdir (166). Jacobs ve arkadaşları, 2014 yılında yine NR2A reseptör ekspresyonu genetik olarak arttırılmış transgenik fareler üzerinde yaptıkları çalışmada NR2A/NR2B oranının artışının uzun dönem sosyal tanıma hafızası ve koku hafızasında bozulmaya yol açtığını göstermişlerdir (167).

Literatürdeki bu veriler, çalışmamızda bulduğumuz sonuçları desteklemektedir. Ancak, artmış NR2A/NR2B oranının hangi moleküler mekanizmalarla öğrenme ve hafızayı etkilediği üzerine tartışmak, elde ettiğimiz verilerle mümkün değildir. İleride yapılacak farklı moleküler çalışmalarla bu konunun açıklığa kavuşturulabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda serotonerjik reseptörlerden 5-HT<sub>2A</sub> reseptörünün konsantrasyonu yalnızca erkek cinsiyette ve düşük doz MSG alan grupta istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu veri cinsiyetler arasında MSG'ye cevapta farklar olabildiğini göstermiştir. Diğer taraftan bu değişikliğin spesifik olarak hafıza, öğrenme ve nörodavranışsal testlere yansımaları gözlenmemiştir. MSG uygulama süreci ve dozu bu cevapta bir faktör gibi görünmektedir.

Santral sinir sisteminde serotonin düzeylerinin, serotonin etkinliğinin ve serotonerjik reseptör gen ekspresyonlarının cinsiyetler arası farklılık gösterdiğine dair literatürde az sayıda kanıt bulunmaktadır (168-170). Sumner ve arkadaşları, dişi sıçanlarda MSS'nin bazı bölgelerinde 5-HT<sub>2A</sub> reseptör konsantrasyonunun östrojen tarafından arttırıldığını 1995 yılında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (171). Bunun yanı sıra Zhang ve arkadaşları hipokampüste 5-HT<sub>2A</sub> reseptör ekspresyonları açısından cinsiyetler arası farklılık saptamamışlar, ancak dişilerde 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerinin ligand bağlama gücünün diğer beyin bölgelerine kıyasla yalnızca hipokampüste yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (168).

Çalışmamızda nAChR  $\alpha 7$  reseptörü açısından erkek gruplarda anlamlı bir fark saptanmazken, dişilerde Deney 1 ve Deney 2 grubunda istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşüklük saptanmıştır.

nAChR  $\alpha 7$  reseptörleri ve mekansal hafıza arasındaki ilişki, yapılan çalışmalarda açık bir şekilde ortaya koyulmuştur. Ren ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmalarında, nAChR  $\alpha 7$  reseptör geninin hipokampüse rekombinant vektörlerle uygulanması sonucunda Morris Su Labirenti performanslarında artış olduğunu göstermişlerdir (172). Curzon ve arkadaşları ise, nAChR  $\alpha 7$  reseptörü için spesifik antisense oligonükleotidler kullanarak hipokampal nAChR  $\alpha 7$  reseptör ekspresyonu engellenmiş olan sıçanlarda Morris Su Labirenti test performanslarının bozulduğunu ve hipokampal nAChR  $\alpha 7$  reseptör yoğunluklarında azalma olduğunu göstermişlerdir (173). Bu çalışmalar, nAChR  $\alpha 7$  reseptör konsantrasyonu ve mekansal hafıza performansı arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda deney dişi gruplarının nAChR  $\alpha 7$  reseptör konsantrasyonlarındaki azalma bu reseptör konsantrasyonu üzerine cinsiyet etkisini sergilemiştir. Bu veri ve mekânsal hafıza testleriyle direk bir ilişki kurulamamıştır. Çalışmamızda hipokampüse dayalı mekânsal hafıza ölçütlerinden birini kullandık, ancak hafızanın farklı tipleri ve ölçütleri mevcuttur. Farklı hafıza tiplerine MSG'nin etkilerini ölçen testler ile bu veri desteklenebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda çocukluk ve ergenlik dönemlerini kapsayacak şekilde sıçanlara farklı dozlarda oral gavaj yoluyla uygulanan MSG'nin mekansal hafıza, lokomotor aktivite, anksiyete ve depresyona yatkınlık üzerine etkilerini inceledik. Aynı zamanda eşit sayıda dişi ve erkekten oluşan gruplarımız ile MSG'nin farklı cinsiyetlerdeki etkilerini de değerlendirdik. Ardından hipokampüste öğrenme ve hafıza ile ilişkili bazı nörotransmitter reseptörlerinin düzeylerini de inceledik ve nörodavranışsal parametrelerle bu reseptörlerin konsantrasyonlarındaki değişimleri birlikte yorumlamaya çalıştık.

Çalışmamızın sonucunda özellikle yüksek doz MSG'nin (2,5 g/kg/gün) öğrenme hızını yavaşlatabildiğini, bunun yanında anksiyete ve depresyonla ilişkilendirilen açık alan testi ve zorlanmış yüzme testlerinde de performans kayıplarına yol açabileceğini gözlemledik. Buna karşın düşük doz MSG (25 mg/kg/gün) uygulanan sıçanlarda ise nörodavranışsal testlerde yalnızca zorlanmış yüzme testinde olumsuz yönde bir etkilenme olduğunu saptadık. Uyguladığımız nörodavranışsal testlerde az sayıda veride cinsiyetler arası fark saptadık.

Çalışmamızın moleküler kısmında ise hipokampal NR2A reseptör konsantrasyonlarında yüksek doz MSG alan gruplarda her iki cinsiyette de anlamlı yükselme tespit ettik. Bu yükselmenin eksitotoksinite ile ilişkili olabileceğini ve öğrenme hızındaki anlamlı azalma ile ilişkilendirilebileceğini düşünüyoruz. Bunun yanında yine düşük dozda MSG'nin 5-HT<sub>2A</sub> ve nAChR  $\alpha$ 7 reseptör konsantrasyonlarında farklı cinsiyetlerde farklı değişikliklere neden olması, düşük dozlarda da MSG'nin SSS'de nörotransmitter konsantrasyonlarında bazı etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Bu etkilerin nörodavranışsal sonuçları çok farklı olabilir. Her ne kadar çalışmamızda hipokampüse dayalı mekânsal hafıza etkilenmemiş olsa da farklı hafıza tipleri ve ölçütleri üzerine etkilerini bilemeyiz.

Çalışmamız ile ilgili limitasyonlarımızı belirtmemiz gerekirse; uyguladığımız Western Blot analizinin semi-kantitatif bir yöntem olması, reseptör konsantrasyonlarının analizinde kullandığımız istatistiksel test yönteminin non-

parametrik olması, çalışmamızda göz ardı edilmemesi gereken kısıtlılıklar olarak değerlendirilmelidir.

Bu bağlamda ileride araştırmacılar tarafından planlanacak olan çalışmalarda düşük dozda MSG tüketimi (ADI dozu) ile davranışsal çaresizlik ve depresyona yatkınlık arasındaki ilişkinin daha detaylı olarak irdelenmesi literatüre katkı sağlayabilir. Ayrıca 5-HT<sub>2A</sub> ve nAChR  $\alpha$ 7 reseptör ekspresyon düzeylerinde görülen cinsiyetler arası farklılık göz önüne alındığında bu reseptörlerin etkilenme duyarlılıklarında cinsiyet faktörünün etkisi bir diğer araştırma konusu olabilir.

EFSA, yakın bir zaman önce MSG ile ilgili ADI ve NOAEL dozlarını sırasıyla 30 mg/kg ve 3,2 g/kg olarak belirlemiştir. Biz çalışmamızı planladığımız tarihte ise MSG için henüz belirlenmiş bir ADI ve NOAEL değeri yoktu. Bu bakımdan bizim literatür taraması yoluyla belirlediğimiz yaklaşık dozlar, EFSA'nın belirlediği ADI ve NOAEL dozlarına oldukça yakındır. Bu, günümüzde kullanılmasına izin verilen dozların etkilerini yansıtması açısından literatüre katkı sağlamıştır.

## ÖZET

### Prepubertal Dönem Süresince Yavru Sıçanlarda Monosodyum Glutamat'a Maruziyetin Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkileri

MSG işlenmiş gıdalarda lezzet artırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Yapılan birçok çalışmada MSG'nin MSS üzerine olan olumsuz etkileri gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda çocukluk döneminde MSG tüketiminin öğrenme, hafıza ve bazı nörodavranışsal parametreler üzerine etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda anne sütünden ayrılmış 4 haftalık 66 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar eşit sayıda erkek ve dişi içeren 3 gruba ayrılmıştır (K, D1, D2). Oral gavaj yoluyla 6 hafta boyunca D1 grubundaki sıçanlara 25 mg/kg/gün, D2 grubundakilere 2,5 g/kg/gün dozunda MSG uygulanırken, K grubundakilere aynı hacimde içme suyu uygulanmıştır. Daha sonra sıçanların Morris Su Labirenti Testi, Açık Alan Testi ve Zorlanmış Yüzme Testindeki performansları değerlendirilmiştir. Bu testlerden sonra sakrifiye edilen sıçanların hipokampuslarından Western Blot yöntemiyle NR2A, NR2B, 5-HT<sub>2A</sub> ve nAChR  $\alpha$ 7 reseptörlerinin konsantrasyonları ölçülmüştür.

Morris Su Labirentinde D2 grubunda öğrenme hızının kontrol grubuna göre yavaş olduğu, 'Açık Alan testi'nde şahlanma sayısı ve merkez kareye giriş sayısının D2 grubunda K grubuna göre yine anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır. Zorlanmış yüzme testinde ise D1 ve D2 grubunda hareketsiz geçirilen sürelerin anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur. Bu veriler MSG'nin nörodavranışsal çaresizlik ve anksiyete yarattığını desteklemektedir. Çalışılan reseptörlerden NR2A konsantrasyonunda her iki cinsiyette D2 gruplarında K grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda yüksek dozda MSG'nin öğrenme hızı ve nörodavranışsal çaresizlik üzerine etkilerinin olduğu ve NR2A reseptöründeki artışın eksitotoksiste ile ilişkili olarak bu verilerle ilişkilendirilebileceğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan nAChR  $\alpha$ 7 ve 5-HT<sub>2A</sub> düzeylerinde cinsiyetler arasında anlamlı farklılıklar olması MSG'nin dişi ve erkek cinsiyette farklı etkiler yaratabileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda Katkı Maddeleri, NMDAR, hafıza, Morris Su Labirenti

## ABSTRACT

### **Effects of Monosodium Glutamate Exposure During Prepubertal Term on Learning and Neurobehaviour in Young Rats**

MSG is a food additive used as a flavor enhancer in processed foods. Many studies have shown the negative effects of MSG on the central nervous system. We have investigated the effects of MSG consumption in childhood period on learning, memory and some neurobehavioral parameters.

Sixty-six post-weaning 4 weeks old rats were used in our study. The rats were divided into 3 groups including equal numbers of male and female. MSG was administered at 25 mg/kg/day for the rats in group E1 and 2.5 g/kg/day for the group E2 for 6 weeks by oral gavage, while the same volume of tap water was applied to the rats in the C group. Later, the performances of the animals in the Morris Water Maze Test, Open Field Test and Forced Swim Test were evaluated. After these tests, concentrations of NR2A, NR2B, 5-HT<sub>2A</sub> and nAChR  $\alpha$ 7 receptor concentrations were analyzed by Western Blot method from the hippocampi of the rats sacrificed.

In the Morris Water Maze Task, it was found that the learning speed was slower in the D2 group compared to the control group, and the number of rearings in the open field test and the number of the central square entries were significantly lower than the C group in the E2 group. In the Forced Swim Test, it was found that immobility times in E1 and E2 were significantly increased compared to C group. These data support that MSG creates neurobehavioral despair and anxiety. There was also a significant increase in the concentration of NR2A receptors in the E2 groups of both sexes compared to the C groups.

In our study, we suggest that high doses of the MSG affect learning and neurobehavior, and this may be associated with excitotoxicity, through the increase of the NR2A receptors. On the other hand, significant differences between sexes in nAChR  $\alpha$ 7 and 5-HT<sub>2A</sub> levels have shown that MSG can produce different effects in female and male genders.

**Keywords:** Food Additives, NMDAR, memory, Morris Water Maze

## KAYNAKLAR

1. Gültekin F. Gıda Katkı Maddelerine Yönelik Tüketici Rehberi. Vol. 1. 2014: Server İletişim s. 83-220.
2. Sano C. History of glutamate production. The American journal of clinical nutrition 2009; 90(3): 728-732.
3. FDA - Questions and Answers on Monosodium glutamate (MSG). İnternet Adresi: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm328728.htm> Erişim Tarihi: 05.04.2017.
4. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science 1969; 164(3880): 719-721.
5. Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Anden N, Anden M, Theodorsson E. Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. Experimental brain research 1989; 76(2): 343-368.
6. Bogdanov MB, Tjurmina OA, Wurtman RJ. Consumption of a high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats. Brain research 1996; 736(1): 76-81.
7. Park CH, Choi SH, Piao Y, Kim S-H, Lee Y-J, Kim H-S, Jeong S-J, Rah J-C, Seo J-H, Lee J-H. Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. Toxicology letters 2000; 115(2): 117-125.
8. Prastiwi D, Djunaidi A, Partadiredja G. High dosage of monosodium glutamate causes deficits of the motor coordination and the number of cerebellar Purkinje cells of rats. Human & experimental toxicology 2015; 34(11): 1171-1179.
9. Quines CB, Rosa SG, Da Rocha JT, Gai BM, Bortolatto CF, Duarte MMM, Nogueira CW. Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. Life sciences 2014; 107(1): 27-31.
10. Monaghan DT, Cotman CW. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] glutamate-binding sites in rat brain. J neurosci. 1985; 5(11): 2909-2919.
11. Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behavioral and neural biology 1993; 60(1): 9-26.
12. Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. Science 2004; 304(5673): 1021-1024.
13. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). Cold Spring Harbor perspectives in biology 2012; 4(6): a005710.

14. Karakaş S. Kognitif Nörobilimler. 3. Baskı. Ankara, Türkiye, Nobel Tıp Kitabevleri, 2010. s. 256-257.
15. Bombardi C. Neuronal localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in the rat hippocampal region. *Brain research bulletin* 2012; 87(2): 259-273.
16. Bombardi C, Di Giovanni G. Functional anatomy of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the amygdala and hippocampal complex: relevance to memory functions. *Experimental brain research* 2013; 230(4): 427-439.
17. Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A. Ultrastructural distribution of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2001; 21(20): 7993-8003.
18. Sanabria E, Pereira M, Dolnikoff M, Andrade I, Ferreira A, Cavalheiro E, Fernandes M. Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats. *Brain research bulletin* 2002; 59(1): 47-51.
19. Abu-Taweel GM, Zyadah M, Ajarem JS, Ahmad M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. *Neurotoxicology and teratology* 2014; 42: 60-67.
20. Rivera-Cervantes MC, Castañeda-Arellano R, Castro-Torres RD, Gudiño-Cabrera G, y Velasco AIF, Camins A, Beas-Zárate C. P38 MAPK inhibition protects against glutamate neurotoxicity and modifies NMDA and AMPA receptor subunit expression. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015; 55(3): 596-608.
21. Khaliq S, Mujahid R, Haider S, Anis L, Mustafa S, Farooq U, Khan A. Repeated Monosodium Glutamate (Chinese Salt) Administration Impaired Memory Functions in Rats: Relationship with Decreased Plasma and Brain Tryptophan. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 2015; 37(2): 390-394.
22. Hlišák Z, Gandalovičová D, Krejčí I. Behavioral deficits in adult rats treated neonatally with glutamate. *Neurotoxicology and teratology* 2005; 27(3): 465-473.
23. Narayanan SN, Kumar RS, Paval J, Nayak S. Effect of ascorbic acid on the monosodium glutamate-induced neurobehavioral changes in periadolescent rats. *Bratislavske Lekarske Listy* 2010; 111(5): 247-252.
24. Beyreuther K, Biesalski H, Fernstrom J, Grimm P, Hammes W, Heinemann U, Kempster O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate—an update. *European journal of clinical nutrition* 2007; 61(3): 304-313.
25. Altuğ T. Gıda Katkı Maddeleri. 2001, İzmir: Meta Basım s. 3.
26. Food Additive Functional Classes. İnternet Adresi: <http://www.fao.org/gsfonline/reference/techfuncs.html> Erişim Tarihi: 29.06.2017.



27. Joint FAO/WHO Conference on Food Additives: Report, World Health Organization Technical Report Series, Doc. No. 107, 1956. İnternet Adresi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40362/1/WHO\\_TRS\\_107.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40362/1/WHO_TRS_107.pdf) Erişim Tarihi: 04.12.2017.
28. Magnuson B, Munro I, Abbot P, Baldwin N, Lopez-Garcia R, Ly K, McGirr L, Roberts A, Socolovsky S. Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. Food additives & contaminants: Part A 2013; 30(7): 1147-1220.
29. Fact Sheet - What Is JECFA? FAO/WHO Joint Secretariat to JECFA, İnternet Adresi: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/FactSheet-whatIsJECFA.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/FactSheet-whatIsJECFA.pdf?ua=1) Erişim Tarihi: 03.06.2016.
30. Codex Alimentarius Understanding codex. 2016, Rome: WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland 978-92-5-109236-1 s. 1-30.
31. Codex Alimentarius - List of Codex Committees: Active. İnternet Adresi: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/en/> Erişim Tarihi: 04.07.2017.
32. Codex Committee on Food Additives. İnternet Adresi: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee-detail/en/?committee=CCFA> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
33. Overview of Food Ingredients, Additives & Colors - International Food Information Council (IFIC) and U.S. Food and Drug Administration. 04.2010; İnternet Adresi: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm094211.htm#types> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
34. The International Food Information Council (IFIC) Foundation. İnternet Adresi: <http://www.foodinsight.org/pages/faqs#1> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
35. EFSA - Bilim tarladan sofraya tüketicileri koruyor, TM-30-12-865-TR-C.doi: 10.2805/3520. [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/efsa-corporate-brochure\\_tr.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/efsa-corporate-brochure_tr.pdf).
36. EFSA - How we work. İnternet Adresi: <http://www.efsa.europa.eu/en/about/howwework> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
37. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. İnternet Adresi: <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Goster/42410?AspxAutoDetectCookieSupport=1> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
38. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddelerinin Spesifikasyonları Hakkında Yönetmelik. İnternet Adresi: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/04/20170403M1-1.htm> Erişim Tarihi: 12.07.2017.
39. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Guidance for submission for food additive evaluations. EFSA Journal 2012; 10(7): 2760.

40. Redbook. Guidance for industry and other stakeholders, toxicological principles for the safety assessment of food ingredients, Administration FaD. İnternet Adresi: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm2006826.htm> Erişim Tarihi: 06.09.2017.
41. Class Names and The International Numbering System for Food Additives CAC/GL 36-1989. 2016; İnternet Adresi: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B36-1989%252FCXG\\_036e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B36-1989%252FCXG_036e.pdf) Erişim Tarihi: 14.07.2017.
42. Kazmi Z, Fatima I, Perveen S, Malik SS. Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *International Journal of Food Properties* 2017(just-accepted).
43. Zhang Y, Venkitasamy C, Pan Z, Liu W, Zhao L. Novel Umami Ingredients: Umami Peptides and Their Taste. *Journal of food science* 2017; 82(1): 16-23.
44. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) - MONOSODIUM L-GLUTAMATE. İnternet Adresi: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2257> Erişim Tarihi: 21.07.2017.
45. Questions and Answers on Monosodium glutamate (MSG). İnternet Adresi: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm328728.htm> Erişim Tarihi: 21.07.2017.
46. Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union L* 2011; 295(4): 12.11.
47. Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U, Leblanc JC. Re evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal* 2017; 15(7).
48. Monosodium Glutamate A Safety Assessment Technical Report Series No: 20 2003. New Zealand. Food Standards Australia New Zealand. İnternet Adresi: <http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/MSG%20Technical%20Report.pdf> Erişim Tarihi: 04.12.2017.
49. L-Glutamic Acid and Its Ammonium, Calcium, Monosodium And Potassium Salts. İnternet Adresi: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v22je12.htm> Erişim Tarihi: 09.08.2017.
50. Janeczko MJ, Stoll B, Chang X, Guan X, Burrin DG. Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. *J Nutr.* 2007; 137(11): 2384-90.

51. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr.* 2000; 130(4S Suppl): 978-982.
52. Walker R, Lupien JR. The safety evaluation of monosodium glutamate. *J Nutr.* 2000; 130(4S Suppl): 1049-1052.
53. Hawkins RA. The blood-brain barrier and glutamate. *The American journal of clinical nutrition* 2009; 90(3): 867-874.
54. Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970; 227(5258): 609-611.
55. Arees EA, Mayer J. Monosodium glutamate-induced brain lesions: electron microscopic examination. *Science* 1970; 170(3957): 549-550.
56. Solomon U, Gabriel OO, Henry EO, Adrian IO, Anthony TE. Effect of Monosodium Glutamate on Behavioral Phenotypes, Biomarkers of Oxidative Stress in Brain Tissues and Liver Enzymes in Mice. *World Journal of Neuroscience* 2015; 5: 339-349.
57. Onaolapo OJ, Onaolapo AY, Akanmu M, Gbola O. Evidence of alterations in brain structure and antioxidant status following 'low-dose' monosodium glutamate ingestion. *Pathophysiology* 2016; 23(3): 147-156.
58. Shivasharan B, Nagakannan P, Thippeswamy B, Veerapur V. Protective effect of *Calendula officinalis* L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2013; 28(3): 292-298.
59. Current EU approved additives and their E Numbers. İnternet Adresi: <https://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist> Erişim Tarihi: 11.08.2017.
60. Kandel ER. *Principles of Neural Science*. 5th ed. 2013, New York: McGraw-Hill s. 1441-1519.
61. Atkinson RC, Shiffrin RM. Human memory: A proposed system and its control processes. *Psychology of learning and motivation* 1968; 2: 89-195.
62. Baddeley AD, Hitch G. Working memory. *Psychology of learning and motivation* 1974; 8: 47-89.
63. Baddeley A. Working memory: theories, models, and controversies. *Annual review of psychology* 2012; 63: 1-29.
64. Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Progress in brain research* 2008; 169: 323-338.
65. Hartley T, Bird CM, Chan D, Cipolotti L, Husain M, Vargha-Khadem F, Burgess N. The hippocampus is required for short-term topographical memory in humans. *Hippocampus* 2007; 17(1): 34-48.
66. Jonides J, Lewis RL, Nee DE, Lustig CA, Berman MG, Moore KS. The mind and brain of short-term memory. *Annual review of psychology* 2008; 59: 193-224.

67. Nadel L, Hardt O. Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36(1): 251-273.
68. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93(24): 13445-13452.
69. Buckner RL, Petersen SE, Ojemann JG, Miezin FM, Squire LR, Raichle M. Functional anatomical studies of explicit and implicit memory retrieval tasks. *Journal of Neuroscience* 1995; 15(1): 12-29.
70. Binder JR, Desai RH. The neurobiology of semantic memory. *Trends in cognitive sciences* 2011; 15(11): 527-536.
71. Duvernoy HM. *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. 2005: Springer Science & Business Media 3540231919 s. 1.
72. Knowles WD. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*. 1992; 9(2): 252-263.
73. Small SA. The longitudinal axis of the hippocampal formation: its anatomy, circuitry, and role in cognitive function. *Reviews in the neurosciences* 2002; 13(2): 183-194.
74. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1957; 20(1): 11.
75. Ekstrom AD, Ranganath C. Space, Time and Episodic Memory: the Hippocampus is all over the Cognitive Map. *Hippocampus* 2017; 00: 1-8.
76. Sapiurka M, Squire LR, Clark RE. Distinct roles of hippocampus and medial prefrontal cortex in spatial and nonspatial memory. *Hippocampus* 2016; 26(12): 1515-1524.
77. Chen KH, Chuah LY, Sim SK, Chee MW. Hippocampal region-specific contributions to memory performance in normal elderly. *Brain and cognition* 2010; 72(3): 400-407.
78. Berridge, M.J. (2014) *Cell Signalling Biology*; doi:10.1042/csb0001010. Internet Adresi: [http://www.cellsignallingbiology.org/csb/010/csb010fig10\\_hippocampus.htm?resolution=HIGH](http://www.cellsignallingbiology.org/csb/010/csb010fig10_hippocampus.htm?resolution=HIGH) Erişim Tarihi: 22.09.2017.
79. Geib BR, Stanley ML, Dennis NA, Woldorff MG, Cabeza R. From hippocampus to whole brain: The role of integrative processing in episodic memory retrieval. *Human brain mapping* 2017; 38(4): 2242-2259.
80. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current Biology* 2013; 23(17): 764-773.
81. Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy* 1959; 93(Pt 4): 420.
82. Pereda AE. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2014; 15(4): 250-263.

83. Bilgin H. Nörofizyoloji. Yoğun Bakım Derneği Dergisi 2005; 3(1): 11-18.
84. Özten N. Öğrenme ve Hafızada Hücresel-Moleküler Mekanizmalar. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yıllığı 2003; 4(1): 1-5.
85. Bliss TV, Gardner-Medwin A. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 1973; 232(2): 357-374.
86. Bliss TV, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 1973; 232(2): 331-356.
87. Eichenbaum H. Spatial learning. The LTP-memory connection. *Nature* 1995; 378(6553): 131.
88. Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S. LTP, memory and structural plasticity. *Current molecular medicine* 2002; 2(7): 605-611.
89. Diamond DM, Rose GM. Stress impairs LTP and hippocampal-dependent memory. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 746(1): 411-414.
90. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology* 1994; 4(3): 389-399.
91. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of learning and memory* 2008; 89(3): 312-323.
92. Penn A, Zhang C, Georges F, Royer L, Breillat C, Hosy E, Petersen J, Humeau Y, Choquet D. Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature* 2017; 549(7672): 384-388.
93. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell* 2014; 157(1): 163-186.
94. Byth LA. Ca<sup>2+</sup>-and CaMKII-mediated processes in early LTP. *Annals of Neurosciences* 2014; 21(4): 151.
95. Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 1997; 88(5): 615-626.
96. Li L, Wan J, Sase S, Groger M, Pollak A, Korz V, Lubec G. Protein kinases paralleling late-phase LTP formation in dorsal hippocampus in the rat. *Neurochem Int.* 2014; 76: 50-8.
97. Bramham CR, Srebro B. Induction of long-term depression and potentiation by low-and high-frequency stimulation in the dentate area of the anesthetized rat: magnitude, time course and EEG. *Brain research* 1987; 405(1): 100-107.
98. Dong Z, Bai Y, Wu X, Li H, Gong B, Howland JG, Huang Y, He W, Li T, Wang YT. Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* 2013; 64: 65-73.

99. Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, Redondo R. Memory engram cells have come of age. *Neuron* 2015; 87(5): 918-931.
100. Tonegawa S, Pignatelli M, Roy DS, Ryan TJ. Memory engram storage and retrieval. *Current opinion in neurobiology* 2015; 35: 101-109.
101. Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 2016; 531(7595): 508-512.
102. Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 2012; 484(7394): 381-385.
103. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews* 2003; 41(2): 268-287.
104. Lovinger DM. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 2010; 58(7): 951-961.
105. Pin J-P, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995; 34(1): 1-26.
106. Flores-Soto M, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda R, Beas-Zarate C. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología (English Edition)* 2012; 27(5): 301-310.
107. Bard L, Groc L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2011; 48(4): 298-307.
108. Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience* 2011; 33(8): 1351-1365.
109. Petralia RS. Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *The Scientific World Journal* 2012; 2012(267120): 1-11.
110. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 2010; 11(10): 682.
111. Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-P, Oliet SH. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 2012; 150(3): 633-646.
112. Kennedy MB. Synaptic signaling in learning and memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2016; 8(2): a016824.
113. Mukherjee S, Manahan-Vaughan D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 2013; 66(2013): 65-81.

114. Davis S, Butcher S, Morris R. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *Journal of Neuroscience* 1992; 12(1): 21-34.
115. Butelman ER. A novel NMDA antagonist, MK-801, impairs performance in a hippocampal-dependent spatial learning task. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1989; 34(1): 13-16.
116. Cercato MC, Vázquez CA, Kornisiuk E, Aguirre AI, Colettis N, Snitcofsky M, Jerusalinsky DA, Baez MV. GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2017; 10: 242.
117. Bannerman DM. Fractionating spatial memory with glutamate receptor subunit-knockout mice. *Biochemical Society Transactions* 2009; 37(6): 1323-1327.
118. Guzman F. Acetylcholine receptors: muscarinic and nicotinic. İnternet Adresi: <http://pharmacologycorner.com/acetylcholine-receptors-muscarinic-and-nicotinic/> Erişim Tarihi: 09.10.2017.
119. Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic and Autacoid Pharmacology* 2006; 26(3): 219-33.
120. Millar NS, Gotti C, Marks MJ, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors, introduction. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. 15.10.2014; İnternet Adresi: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=76> Erişim Tarihi: 09.10.2017.
121. Zoli M, Pistillo F, Gotti C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 2015; 96: 302-311.
122. Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *Journal of Neuroscience* 1993; 13(2): 596-604.
123. Garduño J, Galindo-Charles L, Jiménez-Rodríguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S, Hernandez-Lopez S. Presynaptic  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neuroscience* 2012; 32(43): 15148-15157.
124. Matsubayashi H, Amano T, Seki T, Sasa M, Sakai N. Postsynaptic  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 7$  type nicotinic acetylcholine receptors contribute to the local and endogenous acetylcholine-mediated synaptic transmissions in nigral dopaminergic neurons. *Brain research* 2004; 1005(1): 1-8.
125. Blokland A, Honig W, Raaijmakers WG. Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. *Psychopharmacology* 1992; 109(3): 373-376.

126. Bunce JG, Sabolek HR, Chrobak JJ. Intraseptal infusion of the cholinergic agonist carbachol impairs delayed non match to sample radial arm maze performance in the rat. *Hippocampus* 2004; 14(4): 450-459.
127. McLean SL, Grayson B, Marsh S, Zarroug SH, Harte MK, Neill JC. Nicotinic  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  agonists enhance the formation and retrieval of recognition memory: potential mechanisms for cognitive performance enhancement in neurological and psychiatric disorders. *Behavioural brain research* 2016; 302: 73-80.
128. Targowska-Duda KM, Wnorowski A, Budzynska B, Jozwiak K, Biala G, Arias HR. The positive allosteric modulator of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors, 3-furan-2-yl-N-p-tolyl-acrylamide, enhances memory processes and stimulates ERK1/2 phosphorylation in mice. *Behavioural brain research* 2016; 302: 142-151.
129. Freund RK, Graw S, Choo KS, Stevens KE, Leonard S, Dell'Acqua ML. Genetic knockout of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor gene alters hippocampal long-term potentiation in a background strain-dependent manner. *Neuroscience letters* 2016; 627: 1-6.
130. Kenney JW, Gould TJ. Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Molecular neurobiology* 2008; 38(1): 101-121.
131. Levin E, Bettgowda C, Blosser J, Gordon J. AR-R 17779, an [alpha] 7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behavioural pharmacology* 1999; 10(6-7): 675-680.
132. Ji D, Lape R, Dani JA. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 2001; 31(1): 131-141.
133. Mohammad-Zadeh L, Moses L, Gwaltney-Brant S. Serotonin: a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2008; 31(3): 187-199.
134. Barnes NM, Andrade R, Bockaert J, Butler A, Hamon M, Hensler J, Herrick-Davis K, Hoyer D, Maroteaux L, Martin GR, Peters JA, Roth B, Sharp T, Villalon CM, Neumaier J. 5-Hydroxytryptamine receptors, introduction. *IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*. 10.08.2015; İnternet Adresi: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=1> Erişim Tarihi: 09.10.2017.
135. Berumen LC, Rodriguez A, Miledi R, Garcia-Alcocer G. Serotonin receptors in hippocampus. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 823493.
136. Meneses A, Terrón JA, Hong E. Effects of the 5-HT receptor antagonists GR127935 (5-HT 1B/1D) and MDL100907 (5-HT 2A) in the consolidation of learning. *Behavioural brain research* 1997; 89(1): 217-223.
137. Zhang G, Cinalli D, Cohen SJ, Knapp KD, Rios LM, Martínez-Hernández J, Luján R, Stackman RW. Examination of the hippocampal contribution to serotonin 5-HT 2A receptor-mediated facilitation of object memory in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology* 2016; 109: 332-340.



138. Zhang G, Cinalli D, Stackman RW, Jr. Effect of a hallucinogenic serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist on visually guided, hippocampal-dependent spatial cognition in C57BL/6J mice. *Hippocampus* 2017; 27(5): 558-569.
139. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine* 2013; 4(6): 624.
140. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2011; 50(5): 600-613.
141. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 1984; 11(1): 47-60.
142. Doguc DK, Delibas N, Vural H, Altuntas I, Sutcu R, Sonmez Y. Effects of chronic scopolamine administration on spatial working memory and hippocampal receptors related to learning. *Behavioural pharmacology* 2012; 23(8): 762-770.
143. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychological bulletin* 1976; 83(3): 482.
144. Eweka A, Om'Iniabohs F. The effects of monosodium glutamate on the open field locomotor activities in adult Wistar rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness* 2008; 6(2): 251-259.
145. Mesembe O, Bisong S, Ekong M, Ekeoma A. Neurobehavioural Activity In Albino Wistar Rats In The Open Field Maze Following Long Term Tobacco Diet Ingestion. *The Internet Journal of Neurology* 2008; 10(2): 345-363.
146. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266(5604): 730-732.
147. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology* 1978; 47(4): 379-391.
148. Porsolt R, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 1977; 229(2): 327-336.
149. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 1951; 193(1): 265-275.
150. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
151. Xu M, Xiong Y, Liu J, Qian J, Zhu L, Gao J. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012; 33(5): 578-587.

152. Minor RK, Villarreal J, McGraw M, Percival SS, Ingram DK, de Cabo R. Calorie restriction alters physical performance but not cognition in two models of altered neuroendocrine signaling. *Behavioural brain research* 2008; 189(1): 202-211.
153. Vitor-de-Lima SM, Medeiros LdB, Benevides RdDL, dos Santos CN, Lima da Silva NO, Guedes RCA. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. *Nutritional Neuroscience* 2016: 1-9.
154. Ramalho JB, Izaguirry AP, Soares MB, Spiazzi CC, Pavin NF, Affeldt RF, Lüdtkke DS, Pinton S, Santos FW, Prigol M. Selenofuranoside improves long-term memory deficits in rats after exposure to monosodium glutamate: Involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiology & Behavior* 2017; 184(2018): 27-33.
155. Quines CB, Rosa SG, Velasquez D, Da Rocha JT, Neto JS, Nogueira CW. Diphenyl diselenide elicits antidepressant-like activity in rats exposed to monosodium glutamate: A contribution of serotonin uptake and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Behavioural brain research* 2016; 301: 161-167.
156. Yonden Z, Ozcan O, Cimen AY, Delibas N. The effects of monosodium glutamate and aspartame on rat hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunits and oxidative stress biomarkers. *Int J Clin Exp Med.* 2016; 9(2): 1864-1870.
157. Beas-Zárate C, Rivera-Huizar S, Martinez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendariz-Borunda J. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochemistry international* 2001; 39(1): 1-10.
158. Liang K, Hon W, Tyan Y-M, Liao W-L. Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. *The Chinese journal of physiology* 1994; 37(4): 201-212.
159. Baez MV, Oberholzer MV, Cercato MC, Snitcofsky M, Aguirre AI, Jerusalinsky DA. NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction. *PLoS One* 2013; 8(2): e55244.
160. Li V, Wang YT. Molecular mechanisms of NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications for neuroprotective therapeutics for stroke. *Neural regeneration research* 2016; 11(11): 1752.
161. Zhang K, Li Y-j, Yang Q, Gerile O, Yang L, Li X-b, Guo Y-y, Zhang N, Feng B, Liu S-b. Neuroprotective effects of oxymatrine against excitotoxicity partially through down-regulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Phytomedicine* 2013; 20(3): 343-350.

162. MacDougall G, Anderton RS, Edwards AB, Knuckey NW, Meloni BP. The neuroprotective peptide poly-arginine-12 (R12) reduces cell surface levels of NMDA NR2B receptor subunit in cortical neurons; investigation into the involvement of endocytic mechanisms. *Journal of Molecular Neuroscience* 2017; 61(2): 235-246.
163. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2013; 14(6): 383-400.
164. Zhang X-H, Liu S-S, Yi F, Zhuo M, Li B-M. Delay-dependent impairment of spatial working memory with inhibition of NR2B-containing NMDA receptors in hippocampal CA1 region of rats. *Molecular brain* 2013; 6(1): 13.
165. Xu Z, Chen RQ, Gu QH, Yan JZ, Wang SH, Liu SY, Lu W. Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *J Neurosci.* 2009; 29(27): 8764-73.
166. Cui Z, Feng R, Jacobs S, Duan Y, Wang H, Cao X, Tsien JZ. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Scientific reports* 2013; 3: 1036.
167. Jacobs SA, Tsien JZ. Overexpression of the NR2A subunit in the forebrain impairs long-term social recognition and non-social olfactory memory. *Genes Brain Behav* 2014; 13(4): 376-84.
168. Zhang L, Ma W, Barker J, Rubinow D. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience* 1999; 94(1): 251-259.
169. Carlsson M, Svensson K, Eriksson E, Carlsson A. Rat brain serotonin: biochemical and functional evidence for a sex difference. *Journal of neural transmission* 1985; 63(3-4): 297-313.
170. Belcheva I, Tashev R, Belcheva S. Hippocampal asymmetry in serotonergic modulation of learning and memory in rats. *Laterality* 2007; 12(6): 475-86.
171. Sumner BE, Fink G. Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1995; 54(1): 15-20.
172. Ren K, Thinschmidt J, Liu J, Ai L, Papke R, King M, Hughes J, Meyer E.  $\alpha 7$  Nicotinic receptor gene delivery into mouse hippocampal neurons leads to functional receptor expression, improved spatial memory-related performance, and tau hyperphosphorylation. *Neuroscience* 2007; 145(1): 314-322.
173. Curzon P, Anderson DJ, Nikkel AL, Fox GB, Gopalakrishnan M, Decker MW, Bitner RS. Antisense knockdown of the rat  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor produces spatial memory impairment. *Neuroscience letters* 2006; 410(1): 15-19.

## EKLER

### MATERYAL KULLANIM İZİNİ TALEP FORMU

portlandpresslimited  
publishing innovation

#### Request for Permission to Reproduce Previously Published Material

(please save this file to your desktop, fill out, save again, and e-mail to [permissions@portlandpress.com](mailto:permissions@portlandpress.com))

Fields marked with an asterisk (\*) must be completed

\* Your Name: Hallı Ibrahim Büyükbayram \* E-mail: hallibrahimbuyukbayram@hotmail.com  
Affiliation/Company: Suleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry  
Address: Suleyman Demirel University Hospital, Isparta, Turkey

\* Description of Portland Press material to be reproduced (check all that apply):

- Figure  Partial Article  Abstract  
 Table  Full Article  Book Chapter  
 Other (please describe):

Are you an author of the Portland Press material to be reproduced?  Yes  No

Please provide all applicable information about the Portland Press material you wish to use:

\* Author(s): Michael Berridge  
\* Article or Chapter Title: Neuronal Signalling  
\* Journal or Book Title: Cell Signaling Biology  
\* Volume (and issue): \_\_\_\_\_ Page No(s): \_\_\_\_\_ \* Year: 2014  
Figure No(s): \_\_\_\_\_ Table No(s): \_\_\_\_\_ please complete Figure/Table no(s) as appropriate  
(If you are reproducing figures or tables from more than one article, please fill out and send a separate form for each citation.)

Please provide all applicable information about where the Portland Press material will be used:

\* How will the Portland Press material be used?   
If "other," please describe: PhD Doctorate thesis  
\* Requestor type:   
\* Title of publication where Portland Press material will be used (if used in an article or book chapter, please provide the journal name or book title as well as the article/chapter title):  
PREPUBERTAL DÖNEM SÜRESİNCE YAVRU SIÇANLARDA MONOSODYUM GLUTAMAT'A MARUZİYETİN  
ÖĞRENME VE NÖRODAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİLERİ  
Publisher (if journal or book): \_\_\_\_\_  
URL (if website): \_\_\_\_\_  
Date of Publication (if known): \_\_\_\_\_  
\* Method of distribution/format  No of copies/print run \_\_\_\_\_  
If "other," please describe:  
\* Will readers be charged for the material:  Yes  No

Additional Information:

Hi, I'm requesting to use the figure named "Module 10: Figure Hippocampus" in the Neuronal Signalling Section of Cell Signaling Biology contents in the Introduction section of my thesis which is about learning and memory. I couldn't be able to write the numbers of volume, page, figure of the content which I request because there aren't any numbers. I'm not sure but if it's appropriate, I'd like to write the URL of the material here:  
[http://www.cellsignalingbiology.org/csb/010/csb010fig10\\_hippocampus.htm?resolution=HIGH](http://www.cellsignalingbiology.org/csb/010/csb010fig10_hippocampus.htm?resolution=HIGH)  
Regards

# MATERYAL KULLANIM İZİNİ

## RE: Permission Request Form

Portland Press – Production <production@portlandpress.com>

27.9.2017 (Çar) 18:03

Kime:halil ibrahim büyükbayram <halilibrahimbuyukbayram@hotmail.com>;

Bilgi:Portland Press – Production <production@portlandpress.com>;

Dear Halil Ibrahim Büyükbayram,

Thank you for your request. Please regard this message as permission to reuse a figure from 'Neuronal Signalling' in *Cell Signalling Biology* at no charge, subject to the following conditions:

1. Your reproduced figure must cite the article and author, both in the reference list and in the figure legend.
2. When referencing/citing please hyperlink to the relevant chapter in *Cell Signalling Biology* using the DOI: 10.1042/csb0001010 and the link <http://csb.portlandpresspublishing.com/content/6/csb0001010>
3. If you modify the original figure in any way, please ensure that it is labelled as a modified version of the original.
4. If modified, this version should not imply approval from the original authors, unless such approval is separately sought.

If you also require a formal licence, please visit [copyright.com](http://copyright.com) and make your request following the steps on this site. Please note that whilst we do not charge for re-using figures in the manner that you are requesting, you may be charged an admin fee of \$3.50 USD by the Copyright Clearance Center if you seek permission on [copyright.com](http://copyright.com).

Kind regards

Fleurie Crozier

Publishing Assistant  
Portland Press Limited | Biochemical Society

---

From: halil ibrahim büyükbayram [mailto:halilibrahimbuyukbayram@hotmail.com]  
Sent: 22 September 2017 13:16  
To: Portland Press – Production <production@portlandpress.com>  
Subject: Permission Request Form

Portland Press Ltd registered in England and Wales No. 2453983.

Registered Office: Charles Darwin House, 12 Roger Street, Third Floor, London, WC1N 2JU.

VAT registration number GB 523 2392 69.

The contents of this email are for the recipient only.

If you are not this person (or not responsible for delivery to this person), then notify the sender and delete the email immediately.

Any opinions contained in this message are those of the author and are not given or endorsed by Portland Press Ltd or the division through which this message is sent unless otherwise clearly indicated in this message.

Charles Darwin House, 12 Roger Street, Third Floor, London, WC1N 2JU

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı:</b>	Halil İbrahim	<b>Soyadı:</b>	BÜYÜKBAYRAM
<b>Doğum Yeri:</b>	ISPARTA	<b>Doğum Tarihi:</b>	10.10.1984
<b>Uyruğu:</b>	TC	<b>Telefon:</b>	05053086963
<b>E- posta:</b>	halilibrahimbuyukbayram@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi	2011
<b>Lise</b>	Isparta Gazi Lisesi	2002

### İş Deneyimi

<b>Görev</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Araştırma Görevlisi Dr.	Pamukkale Üniversitesi	2012-2012
Pratisyen Hekim	Mudurnu İlçe Hastanesi	2011-2012

<b>Yabancı Dil</b>	<b>E-YDS Puanı</b>	<b>(Diğer) Puanı</b>
İngilizce	75	İyi

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

### **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

**Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM**

Danışman

**Duygu KUMBUL DOĞUÇ**

## ETİK KURUL ONAY BELGESİ (Sayfa 1/2)



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 21438139 - 302  
KONU: Etik Kurul Kararı

05/11/2015

SAYIN  
Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ  
(SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.)

“Prepubertal Dönem Süresince Yavru Sıçanlarda Monosodyum Glutamat’a Maruziyetin Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkileri” konulu projeniz Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 05 KASIM 2015 tarih ve 08 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. İbrahim BARUT  
SDÜ-HADYEK Başkanı

Ek: 1 Adet HADYEK Kararı



## ETİK KURUL ONAY BELGESİ (Sayfa 2/2)

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

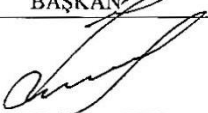

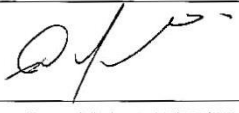

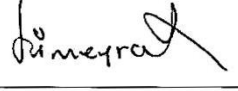
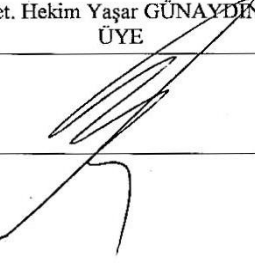
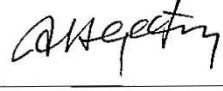
TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
05.11.2015	20	08

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05 KASIM 2015 tarihinde Saat 09:30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'un yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN, Doç. Dr. Yonca SÖNMEZ, Arş. Gör. Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Prepubertal Dönem Süresince Yavru Sıçanlarda Monosodyum Glutamat'a Maruziyetin Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Wistar Albino)	Erkek-Dişi	66	4 Haftalık / 100±25 gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof. Dr. İbrahim BARUT BAŞKAN	Prof. Dr. Mustafa Çağrı SAVAŞ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof. Dr. Ersin USKUN ÜYE
		KATILMADI
Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN ÜYE	Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
	KATILMADI	
Arş. Gör. Sümeyra KAYAN ÜYE	Vet. Hekim Yaşar GÜNAYDIN ÜYE	Öğretmen Hasan Ali ÇETİN ÜYE
		

Adres: SDÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Zemin Kat (Hastane karşısı)  
32260 Çanır / ISPARTA E- mail: hadyek@sdu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Murat ÖZKAN SDÜ - HADYEK Sekreteri  
İrtibat Tel: 0246 211 3770, Faks: 0246 237 1164