



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ANNE SÜTÜYLE MARUZ KALINAN SENTETİK GIDA
BOYALARININ SIÇANLARDA ÖĞRENME VE
NÖRODAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİSİ**

SEDEN SERT ZAYIF

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

ISPARTA-2017



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ANNE SÜTÜYLE MARUZ KALINAN SENTETİK GIDA
BOYALARININ SIÇANLARDA ÖĞRENME VE
NÖRODAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİSİ**

SEDEN SERT ZAYIF

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4676-D2-16 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 161**

ISPARTA-2017

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: 24/07/2017

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD

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

Üye : Prof. Dr. Mehmet AKDOĞAN
Sakarya Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim KILINÇ
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa SAYGIN
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil AŞCI
Süleyman Demirel Üniversitesi

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

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Anne Sütüyle Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boyalarının Sıçanlarda Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkisi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Seden SERT ZAYIF

İmza

Danışman

Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda; öncelikle tez danıőmanım Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞU'a; araştırma laboratuvarlarında uzun uĐraőlarda destek olan asistan arkadaőlarıma teşekkür ederim.

Tez çalıőmasında; deney aőamalarının kurulumu ve uygulanmasında her zaman destek olan Dr. İlter İLHAN, Dr. Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM ve Dr. Ahmed YAHYA İSMAİL'e, istatistik değerlendirmelerinde destek olan Özgür KOSKAN hocama teşekkür ederim.

Dr. Seden SERT ZAYIF

Isparta, 2017.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	iii
BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Gıda Katkı Maddeleri	3
2.1.1.Tanımı	3
2.1.2.Tarihçesi.....	3
2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar	4
2.1.4. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Toksikolojik Değerlendirmeler	5
2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	7
2.2. Renklendiriciler	9
2.2.2. Gıda Boyalarının Kullanım Alanları.....	11
2.3. Öğrenme ve Hafıza	13
2.3.1. Öğrenme.....	13
2.3.2. Hafıza.....	13
2.3.3. Hafıza ve Öğrenmenin Hücresel Mekanizması.....	15
2.3.4. Beynin Hafıza Bölgeleri ve Hipokampus	16
2.3.5. Hafızada Mesajcı Moleküller ve Glutamat	18
2.3.6. NMDA Reseptörleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gereç	24
3.1.1.Deney Hayvanları	24

3.1.2. Gıda Boyası.....	24
3.1.2.1.Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Gıda Boyaları ve Özellikleri.....	25
3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	33
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.2. YÖNTEM.....	36
3.2.1. Öğrenme, Hafıza ve Nörodavranışsal Testler	36
3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze:	36
3.2.1.2. Açık Alan Testi - Open Field Test:	38
3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi - Forced Swim Testi	40
3.2.2.1. Hipokampusların Eldesi	40
3.2.2.2. Hipokampusların Homojenizasyonu:.....	41
3.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektrofrez (SDS-PAGE)	41
3.2.4. Western Blot Yöntemi	42
3.3. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR	44
5.1. Morris Su Labirenti Verileri.....	44
5.2. Probe Test Verileri.....	48
5.3. Görünür Platform Testi Verileri	49
5.4. Açık Alan (Open Field) Testi Verileri	49
5.5. Zorlanmış Yüzme Testi Verileri	50
5.TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
ÖZET.....	61
SUMMARY	63
7.KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	72
BEYAN.....	72
ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADI	: Acceptable Daily Intake (Kabul edilebilir günlük alım miktarı)
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CAC	:Codex Alimentarius Commission (Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu)
CCFAC	: Codex Committee on Food Additives and Contaminants
DEHB	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DG	: Dentat Girus
EK	: Entorinal Korteks
EU	: Avrupa Birliği
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Organizasyonu)
GABA	: Gamma aminobütirik asit
GLP	: Good Laboratory Practice (İyi Laboratuvar Uygulamaları)
INS	: International Numbering System (Uluslararası Numaralandırma Sistemi)
JECFA	: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi)
KA	: Kainat Reseptörleri
LTD	: Long Term Depression (Uzun Dönem Baskılama)
LTM	: Long term memory (Uzun Süreli Hafıza)
LTP	: Long Term Potentiation (Uzun Dönem Güçlendirme)
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat

- NOAEL** : No Observed Advers Effect Level (Gözlenebilen Hiçbir Yan Etki Göstermeyen Doz)
- PKC** : Protein Kinaz C
- SSS** : Santral Sinir Sistemi
- TGKY** : Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
- TSH** : Thyrotrophin-Stimulating Hormone (Tiroid Bezini Uyarıcı Hormon)
- WHO** : Dünya Sağlık Örgütü



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Gıda katkı maddelerinin fonksiyonel sınıfları, tanımları ve alt sınıfları.....	7
Tablo 2: Doğal gıda boyaları ve elde edildikleri kaynaklar	10
Tablo 3: Deneyde kullandığımız gıda boyalarının ADI ve NOAEL Dozları.....	42
Tablo 4: Dış kadranda katedilen yol, dış kadrandaki yüzme hızı ve dış kadranda geçirdiği süre açısından grupların karşılaştırılması.....	46
Tablo 5: Probe test verilerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 6: Tüm grupların açık alan testi verilerinin karşılaştırılması.....	49
Tablo 7: Western Blot analizi ile NR1, NR2A ve NR2B reseptörlerinin optik dansiteleri.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Entorinal korteks ve hipokampüs arasındaki sinyal iletimi	18
Şekil 2: Glutamaterjik nöronlar ve reseptörleri.....	20
Şekil 3: NMDA reseptörünün yapısı	22
Şekil 4: Tartrazinin yapısal formülü	25
Şekil 5: Sunset Yellow F.C.F.'nin yapısal formülü	25
Şekil 6: Ponceau 4R'nin yapısal formülü	26
Şekil 7: İndigotin'in yapısal formülü	27
Şekil 8: Azorubinin yapısal formülü	28
Şekil 9: Eritrosinin yapısal formülü	29
Şekil 10: Allura Red AC'nin yapısal formülü	30
Şekil 11: Amaranın yapısal formülü	30
Şekil 12: Brilliant Blue FCF'nin yapısal formülü	31
Şekil 14: Deney gruplarının sınıflandırılması.....	32

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Tartrazin	25
Resim 2: Sunset Yellow F.C.F.	25
Resim 3: Ponceau 4R	26
Resim 4: İndigotin	27
Resim 5: Azorubin	28
Resim 6: Eritrosin	29
Resim 7: Allura Red AC	30
Resim 8: Amarant	30
Resim 9: Brilliant Blue FCF	31
Resim 10: Morris su labirenti için kullandığımız havuz.....	37
Resim 11: Hipokampus izolasyonu ve homojenizasyonunda kullandığımız aletler..	41
Resim 12: Su labirenti testinde sıçanın ilk günü	47
Resim 13: Su labirenti testinde sıçanın beşinci günü.....	47
Resim 14: NR1'e ait Western Blot örneği.....	53
Resim 15: NR2A'ya ait Western Blot örneği.....	53
Resim 16: NR2B'ye ait Western Blot örneği.....	53

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Grup içi hedef platformu bulma sürelerinin günlere göre değişimi	44
Grafik 2: Gruplar arası hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması.....	45
Grafik 3: Dişi ve erkek sıçanların hedef platformu bulma süreleri açısından karşılaştırılması	45
Grafik 4: Grup ve cinsiyet açısından ortalama yüzme hızlarının karşılaştırılması...	48
Grafik 5: Açık alan verilerinin cinsiyete göre karşılaştırılması	50
Grafik 6: Zorlanmış yüzme testinde grupların karşılaştırılması	51
Grafik 7: NR2B reseptör konsantrasyonlarının dişilerde gruplar arası % ekspresyon düzeyleri.....	52

1.GİRİŞ

Beslenme, insanların hayatlarını sürdürebilmeleri için en temel ihtiyaçlardan biridir. Geçmiş yıllardan günümüze değişen hayat şartları, gelişen teknoloji gibi nedenlerle beslenme alışkanlıklarımızın oldukça farklılaştığını görebilmekteyiz. Günümüzde hem zaman darlığından, hem pratik olduklarından, hem de çekici görüntüleri nedeniyle, üzerinde çok da fazla düşünmeden tükettiğimiz hazır yiyeceklerle doğal besinlerden hızla uzaklaşıyoruz (1, 2).

Gıda katkı maddeleri, tek başına gıda olmayıp, gıdalara üretim, depolama, ambalajlama gibi aşamalarda ilave edilen madde veya madde karışımlarıdır. Gıda endüstrisi açısından katkı maddelerinin pek çok yararı ve işlevi olmakla birlikte insan sağlığı üzerine olası etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan çalışmalar gıda katkı maddelerinden sentetik gıda boyalarının ürtiker, anjiödem, anaflaksi gibi allerjik reaksiyonlara yol açabildiğini göstermiş (3) bunun yanında, çocuklarda davranış bozukluğu, hiperaktivite, dikkat eksikliği, algılama ve öğrenme zaafına kadar birçok yan etkisi olduğu da gösterilmiştir (3). Dr. Benjamin Feingold yaklaşık 40 yıl önce gıdalardaki bazı küçük moleküllü maddelerin duyarlı çocuklarda hiperaktivite ve bazı nöropsikolojik bozukluklara yol açtığını iddia etmiştir. Sonraki yıllarda Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) ile katkı maddeleri arasında da ilişki kurulmaya çalışılmış ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (3, 4).

Tanaka farklı sentetik gıda boyalarını farklı konsantrasyonlarda kullanarak iki nesil üzerinde çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda bu gıda boyalarının davranışsal parametreler ve öğrenme yetileri üzerinde olumsuz etkilerini ortaya koymuştur. Bu etkiler cinsiyete ve tüketilen madde miktarına ve boya türüne göre farklılık göstermiştir (5-9) .

Gebeliğin 6. ayından doğumdan birkaç yıl sonrasına kadar olan kritik gelişme döneminde Santral Sinir Sistemi (SSS) dışardan gelen uyarılara daha duyarlıdır. Bu

dönemde gıda katkı maddelerine maruziyet öğrenme ve davranış üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Ancak bu etkilerin SSS’de hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği açık değildir.

Beyinde belleğin oluşmasındaki en önemli bölge hipokampus iken bu olgunun en önemli nörotransmitteri glutamattır (10). Hipokampüste öğrenme ve hafızanın oluşmasında, glutamat reseptörleri, bu reseptörlerden de özellikle NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörlerinin subtipleri; NR1, NR2A ve NR2B uzun dönem güçlendirme (Long term potentiation, LTP) ve uzun dönem baskılamayı (Long term depression, LTD) kapsayan ‘sinaptik plastisite’ adı verilen değişimin oluşmasında oldukça önemlidir (10, 11) .

Literatürde gıda boyaları ile ilgili birçok çalışma olmakla beraber, laktasyon döneminde gıda boya maruziyetinin yavru sıçanlarda hipokampal reseptör alt tipleri üzerine etkileri ve öğrenme, mekânsal hafıza, anksiyete ve depresyon düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanamamıştır. Çalışmamızda laktasyon dönemi boyunca ADI (Günlük alınımına izin verilen miktar - Acceptable Daily Intake) ve NOEL (Gözlenebilen Hiçbir Yan Etki Oluşturmayan Doz - No Observed Advers Effect Level) dozunda maruz kalınan sentetik gıda boyalarının erişkin dönemde sıçanlarda öğrenme hızı, bellek, nörodavranış, lokomotor aktivite üzerine ve moleküler düzeyde bazı hipokampal reseptörler (NR1, NR2A ve NR2B) üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Gıda Katkı Maddeleri

2.1.1.Tanımı

Katkı maddesi terimi latince ‘addere’ olarak ifade edilen ‘katmak’ kelimesinden türetilmiştir. Uluslararası gıda kodeks komisyonu (Codex Alimentarius Commission -CAC) tarafından verilen tanıma göre Gıda Katkı Maddesi ‘ tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketleme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında gıdalara teknolojik amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddeler’ olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım gıdalara istenilmediği halde bulaşan kontaminantları veya besleyici kaliteyi artırmak amacıyla katılan maddeleri içermemektedir (12).

2.1.2.Tarihçesi

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, Milattan Önce (MÖ) 3000 yıllarında et ürünlerini kürlemede tuzdan yararlandığı, MÖ 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra eklenen nitratın etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve botulizmi önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (2, 12). William Henry Perkin’in 1856 yılında anilin ile çalışmalarını yaparken potasyum bikromat ile tepkimesinden çökelti oluştuğunu gördüğünde çökelti rengini değiştirmek adına karışıma etanol ekleyip mor rengi elde etmesi ve bu rengin aynı zamanda ipeği boyadığını fark etmesiyle ilk sentetik boya bulunmuştur (Resim 1-2) (13). Perkin’in bu çalışması yapay boyalar üzerinde yapılan çok sayıda çalışmaya öncülük etmiştir.

Onsekizinci yüzyılda tereyağı safranla boyanmış, 19. yüzyılda da bazı boyaların kullanılması ticaret hayatına girmiştir. Yiyeceklere eklenen katkılarla ilgili araştırmalarda tatlıların kurşun kromat, civa sülfat, kurşun oksit, bakır arsenitle, şekerlemelerin ise elbise boya ile boyandığı tespit edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1956 yılında 40 ülkeyi kapsayan ve 114 yapay renk maddesi ile 50 doğal renk maddesini içeren listeyi onaylayarak katkı maddelerinin gıda sektöründe kullanılmasının önünü açmıştır (14).

2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar

Gıda üretiminin güvenlik yönünden standartlaştırılması ve güvenli gıda tüketimi, üzerinde iyi çalışılması ve kontrol mekanizması olması gereken bir konudur. Bu ihtiyaçtan yola çıkılarak aşağıdaki uluslararası yapılar oluşturulmuştur.

1.CAC (Codex Alimentarius Commission - Gıda Kodeks Komisyonu)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization = FAO) tarafından 1963 yılında kurulmuştur. Kuruluşun görevi dünyada gıda ile ilgili uygulamalarının sağlık ve teknoloji yönünden standartlaştırılmasıdır. Kodeks standartları ülkeler için uygulanması zorunlu standartlar değildir. Ancak ülkeler ulusal standartlarını hazırlarken kodeks standartlarını dikkate alırlar (1, 12, 14).

2. EFSA (The European Food Safety Authority - Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)

Avrupa Birliği (AB) Komisyonu tarafından 2002 yılında kurulmuştur. EFSA'nın görevi, gıda zincirindeki riskleri bilimsel olarak değerlendirmek ve risk iletişimini sağlamak, böylece Avrupa'da güvenilir gıdanın garanti edilmesine yardımcı olmaktır (15).

3. FDA (Food and Drug Administration - Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)

1930 yılında kurulan FDA, yukarıda belirtilen kuruluşlar içerisinde en eski kuruluş tarihine sahip olanıdır. Her ne kadar Amerika Birleşik Devletleri'nin ulusal kuruluşu ise de dünya ülkelerinin de referans olarak kabul ettiği bir konumdadır (1, 12, 14, 16).

4. JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi)

JECFA, 1956 yılından beri gıda katkı maddelerinin insan sağlığı yönünden değerlendirilmesi için toplanan FAO/WHO ortak uzmanlar komitelerine verilen isimdir. Bu komite gıda katkı maddeleri için tüm bilimsel verileri inceleyerek değerlendirmeler yapmakta ve ADI (Acceptable Daily Intake= Kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerlerini tespit etmektedir. JECFA bugüne kadar 1500 gıda katkı maddesini değerlendirmiştir. JECFA, gıda katkı maddeleri için ADI değerlerinin yanısıra, safsızlık gibi diğer spesifikasyonlarını da belirlemektedirler (1,14, 16, 18).

JECFA'nın raporları CCFAC (Gıda Katkı Maddeleri ve Kirlenici Madde Kodeksi - Codex Committee on Food Additives and Contaminants) tarafından değerlendirilerek her gıda ürün grubunda sakıncasızca kullanılacak katkıları ve üst limitleri belirlenmekte, ve ilgili Kodeks dokümanına dahil edilmektedir.

WHO'nün tüm Dünya ülkeleri tarafından benimsenen ve imzalanan anlaşmaları gereği olarak, her ülke kendi ulusal mevzuatını hazırlarken Gıda Kodeks dokümanlarını referans almak durumundadır.

2.1.4. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Toksikolojik Değerlendirmeler

Gıda katkı maddelerinin izin sürecinde tek hedef, kullanımda insan sağlığının korunmasıdır. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin kullanım izni uluslararası ve ulusal sağlık otoritelerinin son derece dikkatli incelemesi sonucunda verilir.

Kullanımı insan sağlığının korunması yönünden en sıkı denetim altında tutulan kimyasal madde grubu gıda katkı maddeleridir.

Her kimyasal madde doza bağımlı olarak toksiktir. Gıda katkı maddelerinin kullanım izni sürecinde ilk basamak “zararsızlık limitlerinin” tespitidir. Test edilecek kimyasal madde, deney hayvanlarında, yüksek dozlar da dahil olmak üzere çeşitli dozlarda verilerek muhtemel tüm toksik etkiler araştırılır. Kullanılan dozun birimi mg/kg’dır. Toksikite testlerinde öncelikle kemiricilerin kullanılmasının nedeni, bu hayvanların memeli hayvanlar grubunda olması, anatomi ve fizyolojilerin iyi bilinmesi, test süresince test koşullarının kontrol edilebilmesi ve istatistiksel sonuçlara ulaşılabilmesi için yeterli sayıda hayvan kullanılabilme imkanır. Toksikite testleri uluslararası kuruluşların belirlediği ‘İyi Laboratuvar Uygulamaları’ (Good Laboratory Practice –GLP) kurallarına göre çalışan laboratuvarlarda yapılır (1).

Günümüzde gıda katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirmeleri uluslararası boyutta ele alınmakta olan bir konu olup, söz konusu değerlendirmelerde akut, genetik ve farmakokinetik çalışmalara yer verilmektedir.

A. Toksikokinetik çalışmalara: İncelenen katkının, organizmada absorpsiyonu, dağılımı, atılımı, biyotransformasyonu (vücutta diğer kimyasallara dönüşümü) ve enzimler üzerine etkileri incelenir.

B. Toksikite testleri: Deney hayvanları üzerinde akut ve kronik toksisite testleri, özel toksisite testleri; teratojen, mutajen ve karsinojenik etkileri araştırılır.

C. Toksikolojik testler: Bu kapsamında maddenin allerji ve tolerans yetersizliği gibi etkilerini araştırmak üzere insanlar üzerinde çalışmalara gerçekleştirilir.

Toksikite test sonuçları uluslararası/ulusal kuruluşlarca oluşturulan bilimsel komitelerce değerlendirilerek güvenli kullanım için uygun olan doz belirlenir. İncelenen kimyasal madde uzun yıllardır kullanıyorsa insan gruplarından elde edilen epidemiyolojik çalışma sonuçlarından da yararlanılarak güvenli doz belirlenir.

NOAEL

Toksisite test sonuçlarından elde edilen verilerden ulaşılan ilk değer NOAEL’dir. Deney hayvanlarının ortalama yaşamlarının % 70-80’ini kapsayacak sürede test edilen gıda katkısının, deney hayvanında hiçbir yan etki oluşturmayan, kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına düşen maksimum madde miktarıdır (mg / kg). İnsanlarda güvenli olan doza ulaşılabilmesi için NOAEL değeri, güvenlik faktörüne bölünür. Güvenlik faktörü, genellikle ‘100’ olarak kullanılır. Ancak gıda katkısının toksisite verilerinde herhangi bir şüpheli durum olduğunda bu değer 1000’ e kadar çıkabilir. Ya da epidemiyolojik verilerle gıda katkısının güvenliği kanıtlandı ise güvenlik faktörü 100’ den küçük olabilir. Diğer bir deyişle deney hayvanlarında hiçbir yan etki yaratmayan dozun yüzde biri insanlarda genellikle güvenli kabul edilmiştir.

ADI

Yetişkin bir insanın kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına ömrü boyunca hiçbir zararlı etki görmeden tüketebileceği katkı maddesinin mg cinsinden değeridir.

2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması ile ilgili olarak CAC tarafından 1979’da katkı maddeleri ve bunların hangi gıdalarda ne kadar kullanılacaklarını belirten bir rehber yayınlanmıştır.

Tablo 1: Gıda katkı maddelerinin fonksiyonel sınıfları, tanımları ve alt sınıfları

FONKSİYONEL SINIF	TANIM	ALT-SINIF
ANTİOKSİDAN	Gıdada yağ acılaşması ve renk değişimleri gibi oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatır.	Antioksidan, antioksidan sinerjisti, şelat ajanı
ASİT	Gıdanın asitliğini artırır veya gıdaya ekşi bir tat kazandırır.	Asitleştirici
ASİT DÜZENLEYİCİ	Gıdanın asitliğini veya alkaliliğini değiştirir veya kontrol eder.	Asit, alkali, baz, tamponlayıcı madde, pH

		ayarlayıcı ajan
EMÜLGATÖR	Gıdada yağ ve su gibi birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın karışmasını sağlar.	Emülgatör, plastikleştirici, yüzey aktif ajan, sürfaktan, nemlendirme ajanı
EMÜLSİFİYE EDİCİ TUZ	İşlenmiş peynirlerin üretiminde peynir proteinlerini yeniden düzenleyerek yağ ayrışmasını önler.	Eritme tuz, şelat ajanı
HACİM ARTTIRICI	Su veya hava dışındaki bir madde olup, gıdanın enerji değerini belirgin bir şekilde arttırmadan hacmini artırır.	Hacim verici ajan, dolgunlaştırıcı
İTİCİ GAZLAR	Gıdanın içinde bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışında bir gazdır.	İtici gaz
JELLEŞTİRME AJANI	Gıdaya jel oluşumu ile doku kazandırır.	Jelleştirme ajanı
KABARTMA AJANI	Gaz açığa çıkararak hamurun hacmini artırır.	Hamur kabartma ajanı, kabartma ajanı
KORUYUCU	Gıdada mikroorganizmalar nedeniyle oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü artırır.	Antimikrobiyal koruyucu
KÖPÜRTME AJANI	Sıvı veya katı bir gıda içerisinde gaz fazının oluşumunu veya tek düze bir şekilde dağılımını sağlar.	Çırpma ajanı, havalandırma ajanı
KÖPÜRMEYİ ÖNLEYİCİ AJAN	Köpürmeyi önler veya azaltır.	Köpürmeyi önleyici ajan
LEZZET ARTTIRICI	Gıdadaki mevcut tat veya kokuyu artırır.	Lezzet arttırıcı, lezzet kuvvetlendirici
NEM VERİCİ	Düşük nemlilik oranına sahip bir ıslatma ajanı işlevi görerek, gıdaların kurumasını önler.	Nem/su tutma ajanı, ıslatma ajanı
PARLATMA AJANI	Gıdanın dış yüzeyinde parlak bir görünüm veya koruyucu bir tabaka oluşturur.	Kaplama maddesi, yapıştırma ajanı, cila
RENKLENDİRİCİ	Gıdaya renk kazandırır veya rengini onarır.	Renklendirici
RENK STABİLİZASYON AJANI	Gıdanın rengini stabilize eder, kalıcılığını sağlar.	Renk sabitleyici, renk stabilizörü
SIKILAŞTIRICI AJAN	Meyve ve sebzelerin dokularını sıkılaştırır veya jelleştirme ajanlarıyla etkileşerek jel oluşumunu veya jelin sağlamlaştırılmasını sağlar.	Sıkılaştırıcı ajan

STABİLİZÖR	Gıdada birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın tek düze dağılımını sağlar.	Bağlayıcı, sertleştirme ajanı, nem/su tutma ajanı, köpük stabilizörü
TATLANDIRICI	Gıdalara şeker kullanmadan tat vermeyi sağlar.	Tatlandırıcı, yapay tatlandırıcı, besleyici
TOPAKLANMAYI ÖNLEYİCİ	Gıdanın partiküllerinin birbirine yapışmasını önler.	Topaklanmayı önleyici ajan, yapışmayı önleyici ajan, kurutma ajanı
UN İŞLEME AJANI	Unun pişme kalitesini veya rengini korur.	Ağartma ajanı, hamur düzeltici

Altuğ T. (2001)'den modifiye edilmiştir (13).

2.2. Renklendiriciler

Gıdalara renk veren veya rengini geri kazandıran, gıdaların doğal bileşenlerini ve genel olarak olduğu gibi gıda olarak tüketilmeyen doğal kaynakları içeren ve genellikle gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan maddeler ayrıca gıda maddelerinden ve diğer yenilebilir doğal kaynaklardan fiziksel ve/veya kimyasal ekstraksiyonla elde edilen diğer besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde pigmentlerin ekstraksiyonuyla oluşturulan preparatlardır (17).

Renklendiriciler gerek elde oldukları kaynaklar ve kimyasal yapıları, gerek ürüne sağladıkları renkler açısından çok geniş farklılıklar arz ederler.

Renklendiriciler elde edildikleri kaynağa göre sınıflandırıldıklarında üçe ayrılırlar:

1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Boyalar:

Doğal gıda boyları bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan ekstraksiyon veya izolasyon işlemleriyle elde edilen ve herhangi bir gıda ürününe katıldığında, bizzat kendi varlığıyla veya bu gıda ürününün bileşimindeki diğer bazı öğelerle reaksiyona girerek ona renk veren kimyasal veya kimyasal işlemlerden geçmiş boyar maddelerdir (18). Bunlar kısmen serbest halde bulunabildikleri gibi, şeker (glikozit halinde) veya proteinlerle birleşmiş olarak da bulunabilirler (19).

Doğal boyalar üretim masrafları nedeni ile sentetik ürünlere göre daha pahalıdırlar. Birçoğu, işleme sırasında sentetik boyalar gibi aynı kalıcılığa sahip değildirler. Işığa maruz kaldıklarında kolaylıkla solmakta ve yüksek ısı ile asitliğe karşı düşük direnç göstermektedirler. Buna karşılık yapayların sonuç vermediği durumlarda doğal renk maddeleri iş görmektedir (çedar peynirine annatto katılması gibi). En önemlisi de daha sağlıklı olmaları ve tüketici psikolojisine uymalarıdır (20-22).

Tablo 2: Doğal gıda boya ları ve elde edildikleri kaynaklar

BOYA	ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAKLAR
Antosiyanin	Üzüm kabuğu, mürver
Betalanin	Kırmızı pancar, pazı, kaktüs meyvesi
Karamel	Şeker
Kantaksantin	Mantar, balık, deniz yosunu
β -apo-karotenol	Portakal, yeşil sebzeler
Riboflavin	Süt, tereyağı, peynir
Turmerik	Zerdeçal

Atlı B. (2010)'dan modifiye edilmiştir (23).

2. Yarı Sentetik Gıda Boyaları

Doğal kaynaklardan elde edilen maddelere uygulanan çeşitli proseslerle üretilirler. Örneğin klorofilin bakır kompleksi veya sodyum-potasyum tuzları ile şekerin yaklaşık 150°C'de NaOH (sodyum hidroksit), NHOH (amonyum hidroksit) gibi katalistlerle yakılmasından elde edilen karamel bu tanıma girmektedir. Bunlardan karamelin Türkiye'de endüstriyel ölçekte üretildiği, ancak diğerlerinin dış-alım yoluyla sağlandığı bilinmektedir (20).

Kantaksantin en son onaylanmış yarı sentetik boyadır. Çok yüksek dozlarda uzun süre alınan kantaksantin'in göz retinasında değişiklik yaparak, görme bozukluklarına yol açtığı belirtilmiştir (21).

3. Sentetik Gıda Boyaları

Kimyasal yapıları itibariyle doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilen renk maddeleridir. Bunlara 'kömür katranı' boyalar (coal tar dyes) da denilmektedir. Çünkü hemen hepsinin sentezinde başlama maddesi kömür katranıdır. Büyük çoğunun yapısında $-(N = N)-$ grubu bulunduğu için bir kısmı azo boyalar olarak da tanınırlar. Bunlara örnek olarak tartrazin, amarant ve ponceau 4R verilebilir.

Doğal renklendiricilerle kıyaslandığında renk verme güçleri, renk aralıkları, dayanıklılıkları, kullanım kolaylıkları ve fiyat uygunlukları gibi faktörler açısından üstünlük sağlamaktadırlar. Yüksek oranda suda çözünme kapasitesine sahiptirler. Pek çoğu ısıya, ışığa, asitlere, alkalilere ve koruyucu maddelere karşı dayanıklıdır. Bu nedenle raf ömürleri de uzundur (24). Sentetik boyaların tümü Türkiye'ye ithal yolu ile girmektedir (20).

2.2.2. Gıda Boyalarının Kullanım Alanları

İçecekler: Gıda maddeleri açısından bakıldığında alkolsüz içecekler endüstrisinde renk maddeleri kullanımı oldukça yaygındır. Meyve aromalı pek çok içecekte de yapay renklendiriciler kullanılırken kola ve biralarda karamel ile renklendirilmektedir.

Şekerli Ürünler: Oldukça geniş bir renk aralığına sahip olan şekerleme ürünlerinin renklendirilmesinde kullanılan renklendiricilerin şekerin kaynama sıcaklıklarına (150°C), lezzet verici maddelere, şeker ve glikoz gruplarındaki (Kükürt dioksit) konsantrasyonuna karşı stabil olmaları gerekmektedir. Karmoisin, Ponceau 4R, Amaranth, Allura Red, Sunset Yellow ve Tartrazin şekerlemelerde en çok kullanılan yapay renklendiricilerdir. Çikletlerde, bonbon tipi şekerli tablet ve drajelerde yapay renklendiricilerin ağızda renk bırakmaları nedeni ile bu tip ürünlerde suda çözünmeyen lake renklendiricilerin kullanımı önerilmektedir.

Pastacılık Ürünleri: Kekler, bisküviler, gofretler ve hububat ürünlerinde olduğu gibi, renklendiricilerin pişirme sırasındaki yüksek sıcaklıklara (250°C), karbondioksite ve bazı durumlarda alkali kabartma tozlarına karşı renk stabiliteilerinin yüksek olması gerekmektedir. Hamurların yüksek nem içeriği nedeniyle renklendirici katılmasında çok fazla problem ortaya çıkmamaktadır. Yine pasta süslemede kullanılan renkli şekerler, pudra şekerine lakların kuru halde katılmasıyla elde edilirler.

Süt Ürünleri: Süt ürünlerinde kullanılan renklendiricilerin pastörizasyon sıcaklıklarına ve ışığa karşı stabiliteilerinin yüksek olması gerekmektedir. Karmoisin, Ponceau 4R, Amaranth, Allura Red, Sunset Yellow, Tartrazin, Eritrosin ve İndigo Karmin süt ürünlerinde sıklıkla kullanılan yapay renklendiricilerdir. Dondurmalarda renklendiriciler sıvı formda pastörizasyondan hemen sonra katılmaktadırlar. Çoğunlukla bütün dondurma çeşitlerinde yapay renklendiriciler kullanılmaktadır. Peynirlerde ise yapay renklendiriciler yeterince stabil olmadıklarından anotta ve β -karoten gibi doğal renklendiriciler tercih edilmektedir. Aynı şekilde margarin ve tereyağı endüstrisinde de β -karoten ve yağda çözünen anotta tercih edilir.

Et Ürünleri: Et ve balık ürünlerinde kullanılacak renklendiriciler elde edilecek ürünün işlem koşullarına uygun olarak kullanılmalıdır. Karmoisin, Ponceau 4R, Allura Red, Tartrazin ve Eritrosin bu amaçla kullanılacak en uygun renklendiricilerdir.

Konserve Gıdalar: Konserve edilerek üretilen gıdalarda kullanılacak renk maddelerinin yüksek sterilizasyon veya pişirme sıcaklıklarına ve asidik ortam koşullarına karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Karmoisin, Ponceau 4R, Amaranth, Allura Red, Sunset Yellow, Red 2G ve İndigo, Karmin konserve meyvelerde en çok kullanılan yapay renklendiricilerdir.

Toz Karışımlar: Kuru toz içecekler, tatlılar, krema tozu, çorbalar ve soslarda yüksek çözünürlüğe sahip, ışığa dayanıklı renklendiricilerin kullanılmaları gerekmektedir. Bu tip gıdalarda kullanılan renklendiriciler orta dereceli ısıl işlemlere karşı stabil olmalıdır. Karmoisin, Ponceau 4R, Amaranth, Allura Red, Sunset Yellow ve Tartrazin en sık kullanılan yapay renklendiricilerdir (23).

2.3. Öğrenme ve Hafıza

2.3.1. Öğrenme

Çevreden gelen uyarıların değerlendirilmesi ve uygun davranışların geliştirilmesi, öğrenme yoluyla olmaktadır. Öğrenme, belli durumlar ve sorunlar karşısında tepki ve davranış oluşturma ve gerektiğinde bunları değiştirip yenilerini edinebilme yeteneğidir.

Öğrenme ile beyin hücreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmacılar öğrenme süreci sonucunda nöronlarda yeni akson iplikçiklerinin oluştuğunu iddia etmektedirler. Buna göre, her öğrenme yeni sinaptik ağların oluşması demektir (25).

2.3.2. Hafıza

Hafıza öğrenilen bilgilerin daha sonra çağırılacak bir şekilde depolanmasıdır. Bu depo işlemi ise sinapsların görevidir. Belirli tiplerdeki duysal sinyalleri geçiren sinaps dizileri, aynı sinyalleri bir dahaki sefere daha kolay iletme yeteneği kazanırlar.

Belleğin, bilgiyi işleme ve yorumlamada (Information-Processing Model) farklı aşamalar kat ettiği bilinmektedir. Bunlar: duygusal kayıt, kısa süreli bellek (çalışan hafıza) ve uzun süreli bellektir (26).

1. Duygusal Kayıt: Çevre ile etkileşim halinde bulunan birey, duyu reseptörleri vasıtasıyla devamlı kendine gelen uyarıcıları algılar. Bireyin gördüğü, işittiği, duyduğu, tattığı ya da hissettiği şeyler duygusal kayıtın içeriğini oluşturmaktadır. Bu hafızanın kayıt hızı bir milyon/saniye olarak belirtilmektedir (27). Oldukça büyük bir kapasiteye sahip olan duygusal kayıt ne yazık ki bu kaydı saniyeler sonra kaybeder. Görsel bilgi 1 saniyeden az, dokunma ile ilgili bilgi 2–3 saniye, işitsel bilgi 4 saniye sonra kaybedilmektedir. Ancak yeterli dikkatin

harcanması durumunda duygusal kayıttaki bilgilerin kısa süreli belleğe aktarılması mümkün olabilmektedir (26).

2. Kısa Süreli Bellek (Primer bellek – Short term memory): Düşünmenin çoğunun ve bilgi işleminin gerçekleştiği kısa süreli bellek, belleğimizin en fazla iş gören bölümü olarak kabul edilmektedir. Gelen bilgiyi görüntülemesi ve sınırlı kapasite ve sürece sahip olması en belirgin özellikleridir. Kısa süreli bellekte bilgilerin çoğu ses olarak saklanmaktadır. Bu bellekte tutulan bilginin miktarı ve bilginin tutulma süresi yaşa göre değişmektedir.

Kısa süreli hafıza iki alt bileşene ayrılır:

- *Çok kısa süreli hafıza (Immediate memory):* Bilginin alındığı andan itibaren akılda aktif bir şekilde tutulmasından sorumlu sistemdir. Şu anki dikkatimizin odaklandığı bilgiyi tutar. Kapasitesi çok azdır, tekrarlama yapılmadığı takdirde 30 sn'den kısa sürelidir.
- *Çalışan hafıza (Working memory):* Çok kısa süreli hafızadaki bilgi etkin bir şekilde tekrarlanırsa, bellekte tutulma süresi arttırılabilir (dakikalarca). Çok kısa süreli hafızanın bu şekilde uzatılmış haline 'çalışan hafıza' adı verilmektedir (28, 29).

Kısa süreli belleğe gelen bilgi için üç alternatif bulunmaktadır. Bilgi ya ihmal edilir (unutulur), ya tekrar edilerek kısa süreli hafızada tutulur ya da tekrarlama ile daha önceki bilgilerle birleştirilerek uzun süreli belleğe transfer edilir. Kısa süreli belleğin işleyişinde nöron grupları arasındaki uyarı devreleri ön plandadır. Kısa süreli bellekteki bilgiler bir süre hipokampüste saklandıktan sonra uzun süreli belleğe aktarılmaktadır (26, 30).

Çalışan hafıza, bilgiyi kalıcı hafızaya (uzun süreli hafıza) aktarmak için gerekli işlemlerin, çağrışımların, ilişkilerin yapıldığı bölümdür. Çalışan hafızadaki bilgi belli bir süre kalır ve gerekli işlemler yapılmadığı takdirde kaybedilir.

Çalışan hafıza, mekansal ve mekansal olmayan hafıza olarak iki ayrı şekilde değerlendirilir.

- *Mekansal hafıza*, canlının çevresiyle ilgili duyuşsal verileri kullanarak çevresel konum ve oryantasyon bilgisinin kaydedilmesini ifade eder.
- *Mekansal olmayan hafıza* ise daha çok objelerin, yüzlerin, sayısal ve anlamsal ifadelerin hatırlanmasıyla ilgilidir.

Yakın zamanlarda yapılan araştırmalar kısa süreli belleğin, beyinde yeni sinapşların oluşması gibi yapısal değişiklere bağlı olmadığını, beyindeki elektriksel ve kimyasal olaylara bağlı olduğunu ifade etmektedir. Kısa süreli belleğin bilgileri depolama süresi milisaniyelerle ölçülürken uzun süreli bellekte anların kalıő süresi sonsuzdur (28).

3. Uzun Süreli Hafıza (*Long term memory– LTM*): Edinilen bilginin yıllarca, hatta yaőam boyu depolandığı hafıza türüdür.

2.3.3. Hafıza ve Öğrenmenin Hücreşel Mekanizması

Hücre gövdesi uyarıldığında oluşan elektrokimyasal sinyaller, akson sayesinde sinir ucuna hızla iletilir. Elektrokimyasal sinyal sinir ucuna geldiğinde, buradaki mesajcı (nörotransmitter) moleküller sinir ucundan bağlantı boşluğuna yani sinaps aralığına salgılanır. Sinaps boşluğuna gečen moleküller diğer hücrenin uyarılmasına yol açar. Bu sayede bir hücrede oluşan sinyal deta dalga şeklinde diğer hücrelere yayılır.

Hücreler arasındaki sinyal iletim gücü ve yönü hücreler arası bağlantı sayısına, mesajcı moleküllerin miktarına, türüne, salgılanma hızına ve bu moleküllerin diğer hücreye yapışma sayısına göre değişir. Bu unsurlar temelde genetik olarak belirlenmiş olsa da zaman içerisinde önemli değişiklikler gösterir. Beyne ulaşan uyarılara ve vücudun ihtiyaçlarına göre, beyin sinirler arasındaki bağlantı sayısını, salgıladığı mesajcı molekül miktarını veya türünü değiştirmek suretiyle sinyal iletim gücünü ayarlar. Beyinde sürekli devam eden bu değişime, esneklik anlamına gelen “plastisite” denir. Beyin plastisitesi, öğrenme ve hafızanın temel mekanizmasını oluşturur. Yeni bilgiler öğrenirken beyindeki sinir hücrelerinin sayısı artmaz, ancak bağlantı sayısı ve sinyal ileti gücü değişir. Bağlantı sayısı ve

gücü, o sınırların uyarılma sıklığıyla orantılıdır. Sürekli uyarılan sınırlar arasındaki bağlantılar artarken, kullanılmayan bağlantılar zayıflayarak kopar.

2.3.4. Beynin Hafıza Bölgeleri ve Hipokampus

Öğrenme ve hafıza konusunda ilk bilimsel deneyler 1885 yılında Herman Ebbinghaus, bir kaç yıl sonra da Ivan Pavlov ve Edgar Thorndike tarafından yapılmıştır. Pierre Paul Broca adlı bir bilim insanı 1863 yılında beynin belli bir bölgesindeki hücre kaybının konuşma işlevinin kaybına yol açtığını göstermiştir.

Şiddetli epilepsi nöbetleri geçiren bir hastada tedavi amacıyla beynin orta bölgesindeki bir bölgenin çıkarılması, hafıza ve öğrenme konusunda yeni bir çığır açmıştır. Hipokampus çıkarılan hastanın epilepsi nöbetleri geçmiş ve düşünme yetisinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşın hasta kahvaltıda ne yediğini dahi hatırlamıyor, hastanede yolunu bulamıyordu. Uzun yıllardır tanıdığı doktorunu, geçmişte olan olayları hatırlıyor ancak yakın zamanda olan olayları kesinlikle hatırlamıyordu. Ek olarak bu hasta yeni şeyler öğrenemiyor ancak geçmişte öğrendiklerini uygulamakta zorluk çekmiyordu. Bu tecrübe bilim insanlarına hafızanın merkezi ve türleri hakkında önemli ipuçları vermiştir (31).

Daha sonraki yıllarda yapılan hayvan deneyleri ve çeşitli görüntüleme teknikleri sayesinde beynin öğrenme ve hafızadan sorumlu bölgeleri büyük ölçüde belirlenmiştir. Beyin tarafından algılanan bilgiler ilk olarak hipokampus komşuluğundaki bölgelere gönderilmektedir. Daha sonra buradaki bilgiler hipokampüse gönderilir. Sağ hipokampüsteki hasar yön bulma hafızasına, sol hipokampüsteki hasarlar ise kelimeler, nesnelere ve insanlarla ilgili hafızaya zarar verir. Ancak her iki durumda da kısa süreli hafıza etkilenir, uzun süreli hafızaya zarar gelmez. Bu nedenle hipokampusun uzun süreli hafızanın ilk basamaklarında görev aldığı düşünülmektedir. Hipokampüste değerlendirilen bilgiler eğer uzun süreli hafızada saklanacaksa kortekse gönderilir.

Hipokampus, bir gri cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Hipokampus ve ona bağlı temporal lob yapıları; serebral

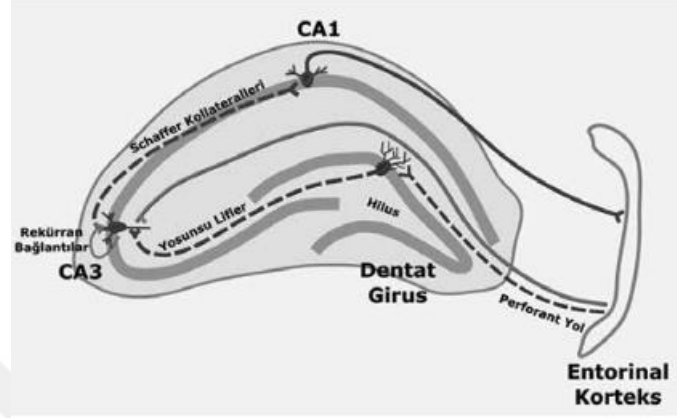
korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve “hipokampal formasyon” adını alır (32, 33).

Hipokampus, şekli nedeniyle Cornu Amonis (Ammon Boynuzu) olarak da adlandırılır ve baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki farklılıklardan dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 şeklinde farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 subiculuma, CA4 ise gyrus dentatusa yakın olan alandır (33).

Nöral bilginin işlenmesinde hipokampusun her bir bölgesinin ve bölgeler arası bağlantıların rol oynadığı bilinmektedir. Hipokampal ağın omurgasını EK (entorinal korteks), DG (dentat girus), CA3 ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre oluşturur (Şekil 1). DG, hipokampusta anahtar konumdadır. Kortikal girdiler hipokampusa DG'den girer. EK'den gelen uyarılar glutamaterjik eksitator sinaptik bağlantılarla DG granüler hücreleri dendritlerine yayılır (perforan yol). Trisinaptik halkanın ikinci yolu DG'nin CA3 ile yaptığı sinaptik bağlantıdır. DG granüler hücrelerinin aksonları CA3'teki piramidal hücrelerle yosunsu lifler aracılığıyla seyrek fakat güçlü bağlantılar yapar. CA3 piramidal nöronlarından Schaffer kollateralleri ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine yayılım ile trisinaptik yol tamamlanır (34). CA3'ten DG'ye geri dönen bağlantılar dışında CA3 piramidal nöronların akson kollaterallerinin kendi kendini kuvvetlendiren rekürren bağlantıları bulunur. Ayrıca EK'den aksonlar CA1'e de yayılır. CA1'den ya direkt olarak çeşitli kortikal alanlara (prefrontal, anterior singulat, orbitofrontal gibi) ya da EK üzerinden bu alanlara projeksiyon vardır; yani CA1 hipokampustan çıkış bölgesidir. Böylece beynin çeşitli kısımlarından bilgi EK üzerinden hipokampusa gelir, işlenir, konsolide edilir ve bütün beynin aktivitesini etkilemek için EK'ye geri döner (34).

Perforan yol ile DG'ye uğramadan CA3 ve CA1'e giden bağlantılar ise geri çağırma sırasında baskındır. DG'den yosunsu liflerle CA3'e giden projeksiyonların yeni ve ayırıcı kodların yaratılmasını yürüttüğüne ama yeniden aktivasyon için gerekli olmadığına dair kanıtlar vardır. CA3'teki rekürren bağlantılar sayesinde CA3 kendisine sunulan bilgilerin kuvvetlenip depolanmasını sağlar ve EK'den gelen

aktivasyona dayanarak kayıtlı paternleri geri çağırma görevi görür (35). DG'un geri çağırmandan ziyade konsolidasyonda rolü olduğunun bir başka kanıtı da hipokampal yosunsu lif sinapsları inaktive edildiğinde spasyal hafıza oluşumu bozulurken Morris Su Labirenti'nde geri çağırmanın bozulmamasıdır (36).



Şekil 1: Entorinal korteks ve hipokampus arasındaki sinyal iletimi

Kaptan Z, Üzüm G (2016)'dan modifiye edilmiştir (37).

Öğrenilmiş bilginin uzun süreli hafızaya atılırken konsolide edilmesinde hipokampus gereklidir. Hafıza yalnızca kısa bir süre için hipokampusta depolanır. Daha sonra sistem konsolidasyonu adı verilen bir süreçle diğer beyin yapılarına (medial prefrontal korteks, orbitofrontal ve anterior singulat korteks gibi neokortikal yapılar) aktarılır (38). Devam eden nörogenezin, bilgiler hipokampus dışında kortikal yapılarda depolandıkça hipokampustaki eski bilgilerin temizlenmesine ve böylece hipokampusta yeni bilgilerin depolanmasına olanak sağlayan aktif bir süreç olduğu düşünülmektedir (34).

2.3.5. Hafızada Mesajcı Moleküller ve Glutamat

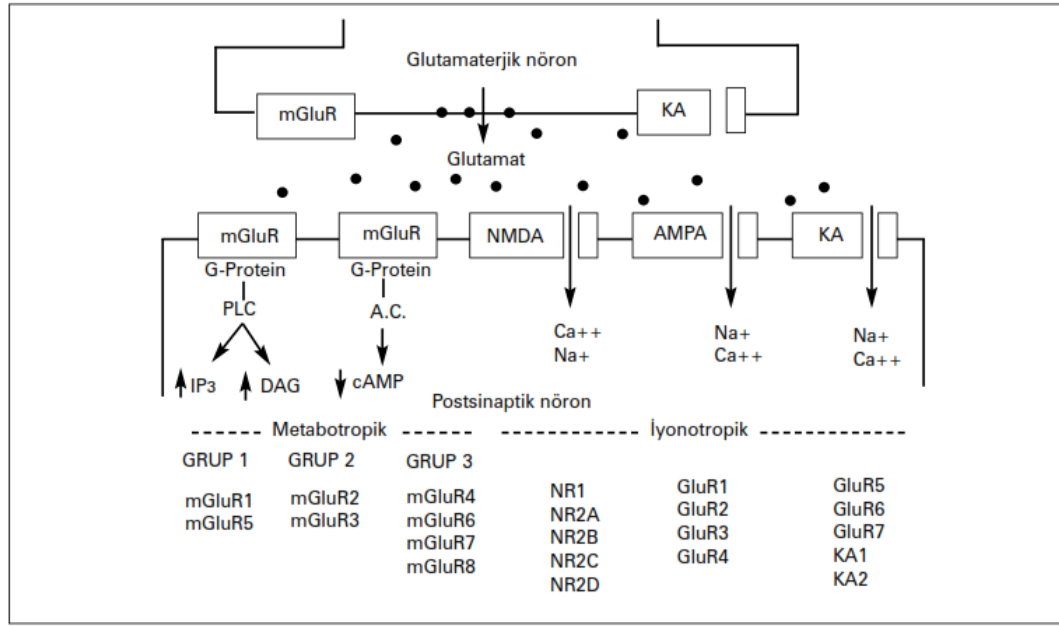
Mesajcı moleküller, sinir hücrelerinde oluşan elektrokimyasal sinyallerin diğer hücrelere iletilmesini sağlar. Mesajcılar sinir uçlarında üretilir ve depolanır. Sinir hücresi uyarıldığında, sinaps aralığına bir veya birden çok mesajcı yollar. Her mesajcının bağlı olduğu ayrı bir algılayıcı ve ilettiği ayrı bir mesaj vardır. Mesajcılarının

çoğu, tek bir amino asitten veya 8-30 amino asitin birleşmesinden oluşan protein yapısındaki moleküllerdir. Glutamat, glisin, aspartat ve GABA (Gamma aminobütirik asit) amino asit olan mesajcılardır. Mesajcı moleküllerin bazıları uyarıcı, bazıları ise baskılayıcı etki gösterir. Asetilkolin, noradrenalin, serotonin, histamin, dopamin, glutamat ve aspartat uyarıcı, GABA ve glisin ise baskılayıcı mesajcılardır.

Eksitator amino asitler beyinde bol miktarlarda bulunmaktadır. Memeli beyindeki nöronların %50'si nörotransmitter olarak glutamati kullanmaktadır. Glutamat, beyinde en bol bulunan eksitator amino asit nörotransmitterdir ve öğrenme ve hafızayla ilişkili olan önemli bir mesajcıdır. Bu molekül, sinapslarda oluşan uyarının giderek daha fazla güçlenmesini sağlar. Yani sinirde oluşan her sinyal diğer siniri, giderek artan şiddette uyarmaya başlar. Sinir ileti gücünde uzun süreli artma (LTP) hafızanın kalıcı olmasını sağlar.

Glutamat iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerini uyararak etkisini ortaya çıkarır (Şekil 2) (39, 40).

1. İyon kanalları ile eşleşmeli iyonotropik glutamat reseptörleri:
 - NMDA
 - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit (AMPA)
 - Kainat reseptörleri (KA) olarak sınıflandırılırlar (41).
2. Metabotropik glutamat reseptörleri: G proteinleri ile eşleşmeli olan ve göreceli olarak daha yeni glutamat reseptörleridir (mGlu) ve 8 farklı alt tipi tanımlanmıştır (Şekil 13). Sekiz adet olan bu metabotropik glutamat reseptörü aminoasit dizilişleri, reseptöre bağlanmaları, etkileri ve farmakolojik özellikleri göz önüne alınarak üç grupta incelenmektedir (42).



Şekil 2: Glutamaterjik nöronlar ve reseptörleri.

PLC: fosfolipaz C, A.C: adenil siklaz, IP3: inozitol trifosfat, DAG: diaçilgliserol, AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionik asit, KA: kainat reseptörleri, NMDA: N-metil D-aspartat reseptörleri, mGluR: metabotropik glutamat reseptörleri. Tural Ü, Önder E (2002)'den modifiye edilmiştir (43).

2.3.6. NMDA Reseptörleri

Merkezi sinir sisteminde yer alan NMDA reseptörü, eksitator L-glutamat reseptörünün büyük bir alt sınıfını oluşturur. NMDA reseptörleri esansiyel ve modulator alt birimlerin heterolog kompleksidir. Reseptör kompleksinde herbiri spesifik etki sağlayan yedi NMDA reseptör alt birimi tanımlanmıştır (44). Önce NR1 alt birimi tanımlanmış ve bunu dört tane NR2 alt birimi (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D) ve iki tane NR3 alt biriminin (NR3A ve NR3B) tanımlanması takip etmiştir (44-46). NMDA reseptörleri beyinde yaygın olarak bulunmasına karşılık en yüksek düzeyde hipokampusun CA1 bölgesinde bulunmaktadır.

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 105,5 kDA ağırlığında, 938 aminoasitten meydana gelmiştir. NR1 reseptör alt tip ekspresyonu SSS'nde hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Ekspresyonunun sıçan embriyosunda gestasyonun 14. gününde başlayıp doğum sonrası 3. haftaya kadar arttığı tespit edilmiştir.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 alt birimi bulunur.

NR2A: Beyinde postnatal eksprese edilir. 165.5 kDA ağırlığındadır ve 1464 aminoasitten meydana gelmiştir. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur. Fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun bulunmaktadır.

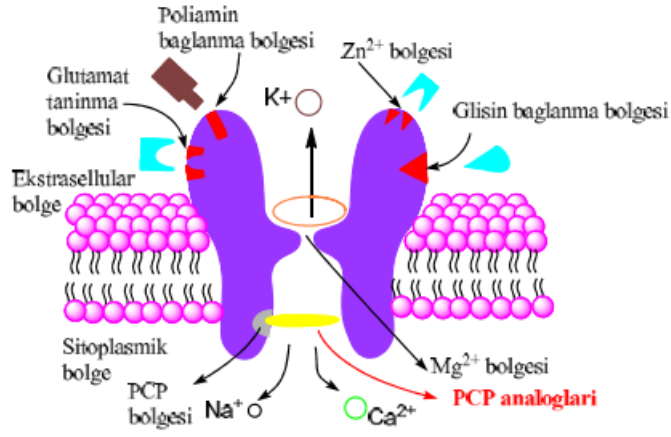
NR2B: Tüm embriyonik beyinde ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde eksprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde eksprese edilir. 165,9 kDA ağırlığında ve 1482 aminoasitten oluşmaktadır. Ekspresyonu ön beyinde, serebral korteks, hipokampus, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak serebellumda eksprese edilir. 135,4 kDA ağırlığındadır ve 1239 aminoasitten oluşur. Ekspresyonu serebellumda dominant iken, talamusta ve olfaktör bulbusta daha az orandadır.

NR2D: Diensefalon ve beyin sapında embriyonel ve neonatal olarak eksprese edilir. 142,9 kDA ağırlığındadır ve 1323 aminoasitten oluşur. Ekspresyonu orta beyin ve arkabeyinde yüksek iken; talamus, olfaktör bulbus ve beyin sapında da düşük düzeydedir.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olmak üzere iki çeşittir. NR3A'nın ekspresyonu serebellum hariç korteks, hipokampus, orta beyin, arkabeyin ve spinal korddadır (47-49).

NR1 alt birimi reseptör işlevi için gereklidir ve bu nedenle en az bir NR1 alt biriminin reseptör kompleksine dahil olması zorunludur. NR1 en azından bir NR2 (A-D) alt birimi ve daha seyrek olarak bir NR3 (A,B) alt birimi ile birleşir. Bu benzersiz heterolog yapı, bireysel biyolojik ve farmakolojik özellikler gösteren farklı heteromerlerle sinir sisteminin esnek modülasyonuna büyük bir potansiyel sağlamaktadır (44).



Şekil 3: NMDA Reseptörünün Yapısı (Atıla S, Alagöz Z (2010)'dan modifiye edilmiştir) (50).

NMDA reseptörlerinde çeşitli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır;

1. Agonist (NMDA, glutamat vb.) bağlama bölgesi
2. Mg⁺² bağlanma bölgesi
3. Glisin bağlanma bölgesi
4. Poliamin bağlanma bölgesi
5. Çinko bağlanma bölgesi
6. Antagonist tanıma ve bağlanma bölgesi
7. Katyon seçici kanallar (Na⁺, K⁺, Ca⁺²)

Agonist bağlanma bölgesi; NMDA, glutamat ve diğer agonistler ile reaksiyona girerek iyon kanalının açılmasını sağlar. Ancak kanaldan iyon akışının sağlanabilmesi için kanalın içinde yer alan Mg⁺²'un bağlanma bölgesinden ayrılması gerekir. İstirahat membran potansiyelinde (-70 mV) iyon kanalını bir tıkaç gibi kapatan Mg bloğu, membranın depolarize (AMPA ve Kainat reseptörleri ile) olması ve membran potansiyelinin (-30 mV) düzeylerine gelmesi sonucu elektrostatik etki ile bağlanma bölgesinden ayrılır ve kanaldan iyon akışına izin verir (51-53).

Merkezi sinir sisteminde inhibitör nörotransmitter olan glisin, kanalın açılması için bir kofaktör olarak ekstrasellüler ortamda bulunmalıdır (52).

Poliamin bağlanma bölgesine spermin ve spermidin bağlanarak glisine benzer şekilde reseptörün aracılık ettiği yanıtı artırır (53).

Çinko bağlanma bölgesi, inhibitör etki gösterir ve blokajı ise voltaj bağımlıdır.

Antagonist bağlanma bölgesi kanal kompleksinin alt bölümündedir ve antagonistin (fensiklidin, MK-801 vs.) bu bölgeye bağlanabilmesi için öncelikle agonistin reseptöre bağlanmış ve aynı zamanda Mg^{+2} bloğunun ortadan kalkarak kanalı açmış olması gerekir. Bu etki agonist bağımlı olmakla birlikte yarışmasızdır (nonkompetitif). Yarışmalı antagonistler ise agonist bağlanma bölgesi için glutamat ile yarışır (51, 53).

NMDA reseptörleri ile ilgili yapılan çalışmalardan birisi de 'protein kinaz C'(PKC) ile ilgilidir. Yavaş öğrenen fare mutantlarında daha düşük PKC seviyeleri saptanmıştır. PKC fosforilasyon yoluyla NMDA'nın aktivitesini artırır. Fosforilasyon Mg tarafından NMDA'nın bloke olmasını azaltır ve Ca akışını artırır. Sonuçta PKC tarafından proteinlerin fosforilasyonu nörotransmitter salınımını artırır ve K kanalları aracılığıyla K akışını azaltır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4676-D2-16 Proje numarası ile desteklenen çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezi ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan, 7 Ocak 2016 Tarih ve 07 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Wistar Albino cinsi toplam 18 adet dişi gebe sıçan kullanılmıştır. Deney boyunca sıçanlar standart ışık (12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık) ve ısı (23 °C) koşullarında yaşatılmış, yeteri kadar su ve yem ile beslenmiştir.

Sıçanlar Kontrol (K, n=6), ADI dozu (ADI, n=6) ve NOAEL dozu (NOAEL, n=6) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Gebe sıçanlar doğum yaptıktan sonra deneye başlanmıştır.

3.1.2. Gıda Boyası

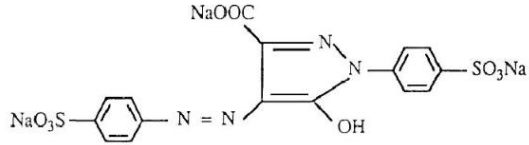
Kullanılan gıda boyaları için belirlenen ADI ve NOAEL dozları temel alınarak (Tablo 3) her bir sıçanın ağırlığına göre günlük alabileceği maksimum doz hesaplanmıştır. Hesaplanan dozlarda dokuz gıda boyası bir karışım halinde içme suyunda çözdürülüp gavaj emzirme dönemi boyunca verilmiştir. Deney gruplarında gıda boyası verilen anne sıçanlarla eş zamanlı olarak emzirme dönemi (21 gün) boyunca kontrol grubundaki annelere aynı hacimde her gün içme suyu gavaj yoluyla verilmiştir.

3.1.2.1.Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Gıda Boyaları ve Özellikleri

Tartrazin (E102)



Resim 1: Tartrazin



Şekil 4: Tartrazin'in yapısal formülü (54)

Diğer İsimleri: C.I. Food Yellow 4;

FD ve C Yellow No. 5

ADI ve NOAEL Dozu: 7,5 mg/kg/gün - 750 mg/kg/gün

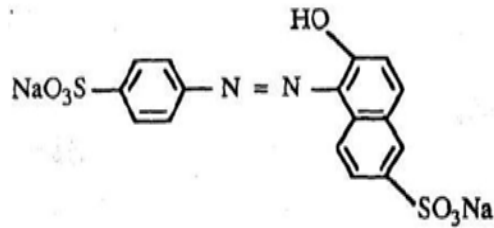
Kimyasal Özelliği: Tartrazin'in suda çözünen en az miktarı % 85 iken suda çözünmeyen madde miktarı en çok % 0,2' dir. Toz ve granül halinde portakal rengindedir.

Metabolizması: Tartrazin'in rat ve tavşan çalışmalarında oral verildiğinde %64-96 oranında idrarda değişmeden atıldığı tespit edilmiştir (55). İntravenöz uygulamada ise safra atılımının %1 oranında belirlenmiştir (56).

Sunset Yellow F.C.F. (E110)



Resim 2: Sunset Yellow F.C.F. **Şekil 5:** Sunset Yellow F.C.F.'nin yapısal formülü (57)



Diğer isimleri: C.I. Food Yellow 3

FD ve C Yellow No. 6

Crelboranges

Kimyasal Adı: Disodium 6-hydroxy-5-(4-sulfonato-phenylazo)-2-naphthalene-sulfonate

ADI ve NOAEL Dozu: 2,5 mg/kg/gün - 250 mg/kg/gün

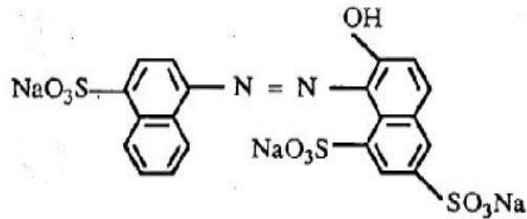
Kimyasal Özelliği: Toz ve granül halinde ve kırmızı-portakal rengindedir. Asitlerle reaksiyona girdiği zaman rengi değişmez. Kalay klorür ilave edildiği zaman Sunset Yellow F.C.F çözeltisinin rengi 2 dakika içinde açılır. Sodyum perborat eklendiğinde ise çözeltinin portakal rengi koyulaşır. Suda çözünen en az miktarı % 85' dir. Eser miktarda etanolde çözünür.

Metabolizması: Yapılan çalışmalarda karaciğer enzimlerinden ziyade intestinal bakteriler tarafından parçalandığı belirlenmiştir (58). Büyük kısmı feçesle atılırken az miktarda idrarla da atılmaktadır. Ayrıca sunset yellow FCF'nin faz I ve faz II enzim metabolizması üzerinde de etkili olduğunu gösterilmiştir (59).

Ponceau 4R (E124)



Resim 3: Ponceau 4R



Şekil 6: Ponceau 4R'nin yapısal formülü (60)

Diğer isimleri: C.I. Food Red 7

Cochineal Red A

New Coccine

Kimyasal Adı: Trisodium-2-hydroxy-1-(4-sulfonato-1-aphthylazo)naphthalene-6.8-disulfonate-

ADI ve NOAEL Dozu: 4 mg/kg/gün - 70 mg/kg/gün

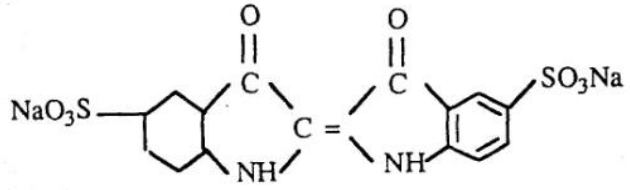
Kimyasal Özelliği: Kırmızımsı toz granül halinde bulunur. Suda çözünür nitelikte olup etanolde çok az çözünmektedir.

Metabolizması: Büyük kısmı feçesle az miktarda idrarla atılmaktadır. Çok az miktarda intestinal hücrelerden emilmektedir (61).

İndigotin (E132)



Resim 4: İndigotin



Şekil 7: İndigotin'in yapısal formülü (62)

Diğer isimleri: C.I. Food Blue 1

FD ve C Blue No. 2

Indigo Carmine

Kimyasal Adı: Dissodium 3,3'-dioxo-2,2'-bi-indolyli=dene-5-5'-Disulfonate

ADI ve NOAEL Dozu: 5 mg/kg/gün - 500 mg/kg/gün

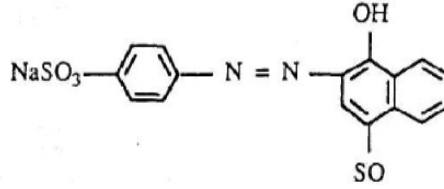
Kimyasal Özelliği: Mavi renkli ve toz halindedir. Suda çözünür, etanolde eser miktarda çözünür.

Metabolizması: İntravenöz uygulama sonrası 6 saat içinde verilen miktarın %63'ü idrarda ve %10'u safrada tespit edilmiştir. Oral uygulamadan sonrası üçüncü günde ise sadece %2 oranında idrara, %61-80 oranında ise feçese atıldığı belirlenmiştir (62).

Azorubin (E122)



Resim 5: Azorubin



Şekil 8: Azorubinün yapısal formülü (63)

Diğer isimleri: Carmoisine

C.I. Acid Red 14

Food Red 3 C.I. No. 14720

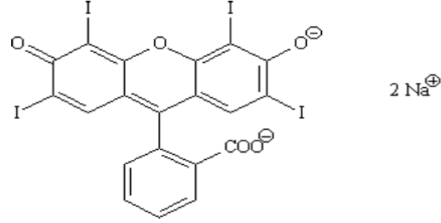
Kimyasal Adı: 2-(4-sulfo-1-Naphthazo)-1-Naphthol-4-Sulfonic acid disodium

ADI ve NOAEL Dozu: 4 mg/kg/gün - 400 mg/kg/gün

Kimyasal Özelliği: Suda çözünür, eser miktarda etanolde çözünür. Kırmızı toz veya granül haldedir.

Metabolizması: Sınırlı miktarda absorbe olur. İntravenöz yolla verildiğinde dokulara (karaciğer, akciğer, testis, dalak) yaklaşık sekiz saat sonra hızlıca taşınmıştır. Oral yolla verildiğinde testis, dalakta ve akciğerde tespit edilmemiştir. Transplasental geçiş tespit edilmiş ve maternal ve fetüs dokularında benzer seviyede bulunmuştur. İlk 24 saatte büyük oranda idrar ve feçesle (%65-70) atılmaktadır (63).

Eritrosin (E127)



Resim 6: Eritrosin

Şekil 9: Eritrosinin yapısal formülü (64)

Diğer isimleri: C.I. Food Red 14

FDC RedNo. 3

EC No. E 127

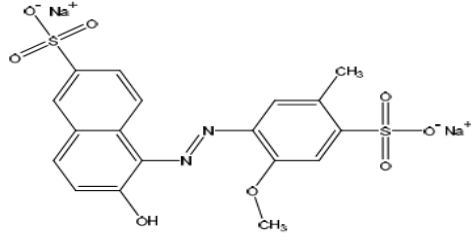
Kimyasal Adı: Disodium 2', 4', 5', 7'-tetraido-3'-6'-dioxidospiro-[isobenzofuran-1 (3H), 9'-(9H) xanthen]-3-onehydrate Monohydrate 9-(0-carboxyphenyl)-6-hydroxy-2,4,5,7-tetraido-3H-xanthen 3-one, disodium

ADI ve NOAEL Dozu: 0,1 mg/kg/gün - 10 mg/kg/gün

Kimyasal Özelliği: Etanolde ve suda çözünür. Kırmızı renkli toz ve granül halindedir. pH 7,0 ve pH 10,0 da mor renk verir, pH 2,5 da çöker. Sülfürik asit, nitrik asit ve hidroklorik asitteki çözeltileri sarı renktedir, asetik asitteki çözeltisi sarı-turuncu renktedir.

Metabolizması: İdrar (%1 den az) ve feçesle atılmaktadır. Gastrointestinal sistemden emildiği ve büyük kısmı karaciğerde olmak üzere beyin, tiroid ve böbreğe taşındığı tespit edilmiştir. İyot içerdiğinden dolayı serumda iyot ölçümünde interferansa neden olmaktadır. Düşük dozlarda TSH (Thyrotrophin-Stimulating Hormone - Tiroid Bezini Uyarıcı Hormon), düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmezken yüksek dozlarda anlamlı artış görülmüştür (64).

Allura Red AC (E129)



Resim 7: Allura Red AC **Şekil 10:** Allura Red AC'nin yapısal formülü (65)

Diğer isimleri: Food Red No. 40;

Food red 17;

FD&C Red No. 40

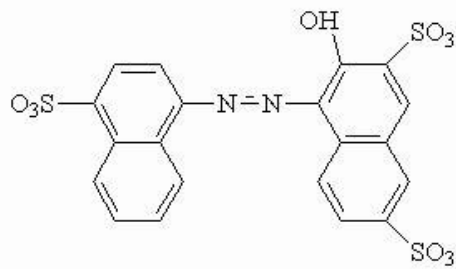
Kimyasal Adı: disodium;(5E)-5-[(2-methoxy-5-methyl-4-sulfonatophenyl)hydrazinylidene] -6-oxonaphthalene-2-sulfonate

ADI ve NOAEL Dozu: 7 mg/kg/gün - 700 mg/kg/gün

Kimyasal Özelliği: Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çözünmemektedir.

Metabolizması: Yüksek oranda feçesle atılırken, önemsiz miktarda idrarla atılmaktadır. Beyin omurilik sıvısına (BOS) geçtiğine dair tartışmalı bilgiler vardır. Faz I ve Faz II ilaç metabolizması üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (65).

Amarant (E123)



Resim : Amarant

Şekil 11: Amarantın yapısal formülü (66)

Diğer İsimleri: CI Food Red 9

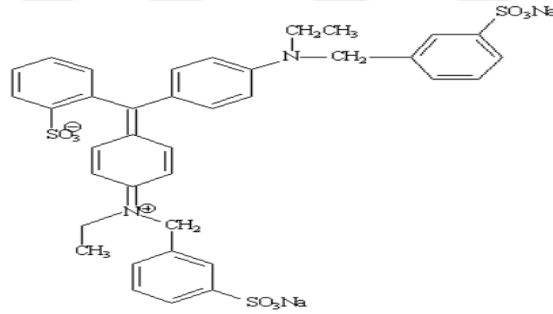
Kimyasal Adı: Trisodium 3-hydroxy-4-(4-sulfonato-1-naphthylazo)-2,7-naphthalene Disulfonate

ADI ve NOAEL Dozu: 0,5 mg/kg/gün - 15 mg/kg/gün

Kimyasal Özelliği: Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir.

Metabolizması: Beyine geçiş gösterilmemiştir. Karaciğer, dalak ve kalpte tespit edilmiştir. Büyük kısmı feçesle olmak üzere, idrar ve safra ile de atılmaktadır. Çiftleşme ve hamilelik dönemi boyunca amarant verilen ratların fetüslerinde ve amniyon sıvılarında da amarantın metabolitlerine rastlanmıştır (66).

Brilliant Blue FCF (E133)



Resim 9: Brilliant Blue FCF **Şekil 12:** Brilliant Blue FCF'nin yapısal formülü (67)

Diğer İsimleri: CI Food Blue 2

FD&C Blue No.1

Kimyasal Adı: Disodium 3-[N-ethyl-N-[4-[[4-[N-ethyl-N-(3-sulfonatobenzyl) amino] phenyl] (2-sulfonatophenyl)methylene]-2,5-cyclohexa-diene-1ylidene] ammonio methyl] – benzenesulfonate

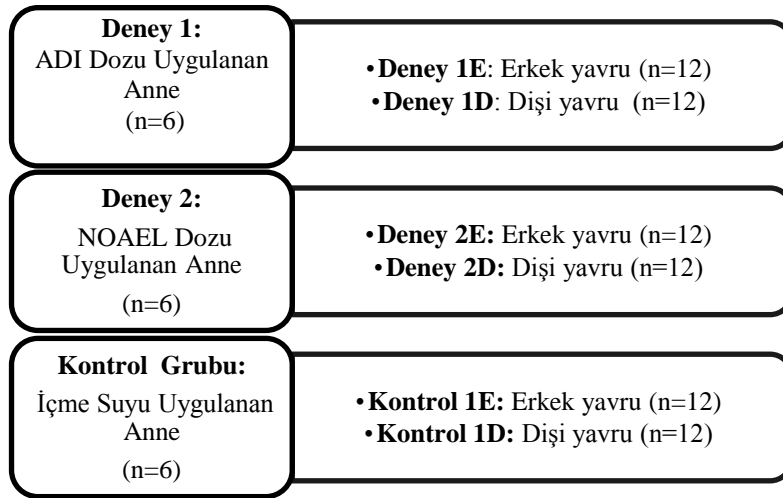
ADI ve NOAEL Dozu: 12,5 mg/kg/gün - 600 mg/kg/gün

Kimyasal Özelliği: Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir.

Metabolizması: Büyük oranda (% 92) feçesle atılmaktadır. Safra atılımı % 0,05'ten daha azdır.

Tablo 3: Deneyde Kullandığımız Gıda Boyalarının ADI ve NOAEL Dozları

GIDA BOYASI	ADI DOZU	NOAEL DOZU
ALLURA RED AC (E129)	7 mg/kg/gün	700 mg/kg/gün
AMARANTH (E 123)	0.5 mg/kg/gün	15 mg/kg/gün
AZORUBİNE/CARMOİSİNE (E 122)	4 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün
BRILLIANT BLUE FCF (E 133)	12.5 mg/kg/gün	600 mg/kg/gün
ERYTHROSİNE (E 127)	0.1 mg/kg/gün	10 mg/kg/gün
INDIGOTİNE (E 132)	5 mg/kg/gün	500 mg/kg/gün
PONCEAU 4R (E 124)	4 mg/kg/gün	70 mg/kg/gün
SUNSET YELLOW FCF (E 110)	2,5 mg/kg/gün	250 mg/kg/gün
TARTRAZİNE (E 102)	7.5 mg/kg/gün	750 mg/kg/gün



Şekil 13: Deney Gruplarının Sınıflandırılması

Emzirme dönemi sonunda her bir gruptan 12 adet erkek ve 12 adet dişi yavru seçilmiştir. Sıçanlar seçilirken genetik çeşitliliği sağlamak için her anneden en az bir

erkek ve bir dişi yavru alınmasına 6zellikle dikkat edilmiştir. Erkek ve dişi yavrular arasından seşim rastgele yapılmıştır. Sonuçta her biri 12 sıçandan oluşan altı grup oluşturulmuştur (şekil 13). Her bir gruptaki yavru sıçanlar 14 haftalık olana kadar standart ışık (12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık) ve ısı (23 °C) koşullarında yaşatılmış, yeteri kadar su ve yem ile beslenmiştir. Emzirme d6neminin sonunda sıçanlar 6đrenme, hafıza ve n6rodavranışsal testlerin uygulanacağı laboratuara taşınmış ve adaptasyonu için 5 g6n beklenmiştir. 09:00- 17:00 arasında eğitime tabi tutulacak sıçanların gece-g6nd6z uyku d6ng6leri değiştirilmiştir. 6đrenme ve n6rodavranışsal testlerin tamamlanmasından 24 saat sonra sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan %10' luk ketamine HCl (90mg/kg) ve %2'lik ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezi altında dekapite edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

- 1- Soğutmalı santrif6j: Eppendorf MR5415
- 2- Santrif6j: Jouan B4İ (Fransa)
- 3- Derin dondurucu: Uğur (T6rkiye)
- 4- Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsvişre)
- 5- Vorteks: N6ve NM 100 (T6rkiye)
- 6- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- 7- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- 8- Manyetik karıştırıcı: N6ve (T6rkiye)
- 9- Elektroferez cihazı: Thermo Fisher Scientific (ABD)
- 10- Kodak İmage Station 2000 MM (USA)
- 11- Cam-Teflon homojenizat6r
- 12- Protein transfer tankı: Bio-Rad (Italy)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

- 1- Akrlamid-bisakrlamid %30 T, %2,6 C; Sigma (Almanya)
- 2- Tris, Merck (Almanya)
- 3- Glisin, Merck (Almanya)
- 4- SDS, Merck (Almanya)
- 5- APS, Merck (Almanya)
- 6- TEMED, Merck (Almanya)
- 7- 2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- 8- Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- 9- Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- 10- Tween 20, Merck (Almanya)
- 11- Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
- 12- EDTA, Merck (Almanya)
- 13- EGTA, Merck (Almanya)
- 14- Leupeptin, Sigma (Almanya)
- 15- Aprotinin, Sigma (Almanya)
- 16- Benzamidin, Sigma (Almanya)
- 17- Triton X-100, Sigma (Almanya)
- 18- Immobilon-P, Sigma (Almanya)
- 19- Kromotografi filter kağıdı, Whatman (İngiltere)
- 20- Metanol, Sigma (Polonya)

- 21- Hidroklorik Asit, Sigma (Danimarka)
- 22- Anti NR 1, Abcam (UK)
- 23- Anti NR2A, Sigma (ABD)
- 24- Anti NR2B, Sigma (ABD)
- 25- Monoklonal anti-rabbit IgG, Sigma (ABD)
- 26- BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (ABD)
- 27- Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (ABD)

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılan Çözeltiler

1. Homojenizasyon Tamponu: pH: 7,5 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM Benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 90 ml'ye tamamlandı.

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

3. 4 x Çözücü Tampon: 1,5 M Tris HCl, pH:8,8

36,3 g Tris 200 ml'ye distile suyla tamamlanıp pH: 8,8'e ayarlanır.

4. 4 x Paketleyici Tampon: 0,5 M Tris HCl, pH:6,8

12,1 g Tris, 200 ml'ye distile suyla tamamlanıp pH: 6,8'e ayarlanır.

5. Çözücü jel: (%9'lük konsantrasyonda)

Distile su, acril: bisacril (%30 T, %2,6 C), çözücü tampon, %10 SDS, %10 APS ve TEMED içerir.

6. Paketleyici Jel: (%4'lük konsantrasyonda)

Distile su, acril: bisacril (%30 T, %2,6 C), çözücü tampon, %10 SDS, %10 APS ve TEMED içerir.

7. Yürütücü Tampon: 2,25 g Tris, 10,8 g Glisin, 0,75 g SDS, pH:8,3'e ayarlanıp distile su ile 750 litreye tamamlanır.

8. Transfer Tamponu: 2,43 g Tris, 11,53 g Glisin ve 4 ml %10 SDS, distile su ile 636 ml' ye pH: 8,2-8,4 olacak şekilde tamamlanır. Üzerine 160 ml metanol eklenir.

9. TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 30,25 g Tris, 43,75 g NaCl, 5 ml Tween 20 (yoğun bir madde olduğu için yavaşça çekilir) pH: 7,5 olarak ayarlanıp 5 litreye distile su ile tamamlanır.

10. Primer Antikorlar: NR1 1/1000 + β actin 1/2000, NR2A 1/5000 + β actin 1/2000, NR2B 1/1000 + β actin 1/2000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS içinde hazırlanmıştır.

11. Sekonder Antikor: Antirabbit IgG (Alkalen fosfataz konjuge) 1:10000 oranında, taze %1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlanır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Öğrenme, Hafıza ve Nörodavranışsal Testler

3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze:

Morris Su Labirenti, kognitif (bilişsel, kavramsal) fonksiyonu gösteren bir test olup hipokampüse dayalı mekânsal hafızayı değerlendiren bir düzenektir. Su labirenti, 150 cm çapında, 80 cm yüksekliğinde dairesel galvanik metalden yapılmış ve iç yüzeyi beyaz bir havuzdur.



Resim 10: Morris Su Labirenti için kullandığımız havuz

Su labirentinin bulunduğu mekan güneş ışığının giremeyeceği şekilde organize edilmiştir ve labirentin dört yanına yerleştirilmiş tavana bakan lambalarla indirek olarak aydınlatılmıştır. Su labirentinin çevresinde sabit olarak tutulan bazı görsel ipuçları (lambaların birine bağlanan kurdela, tablo, sandalye, masa) vardır. Deney öncesi su labirenti su ile doldurulmuş ve 23°C'ye ısıtılmıştır. Ardından suda, hayvanlar için toksik olmayan, koyu sarı toz boya çözdürülerek su renklendirilmiştir. Smart Versiyon 2.5 programı kullanılarak (Smart Video- Tracking, Panlab, Barcelona, Gspanya) havuz "1. kadran", "2. kadran", "3. kadran" ve "4. kadran" olmak üzere dört hayali kadrana ayrılmıştır. Su seviyesinin 2 cm altında kalacak şekilde gizli bir platform yerleştirilmiş ve saklı platformun bulunduğu bu kadran 'hedef kadran' kabul edilmiştir. Su labirentinde tüm öğrenme egzersizleri boyunca ve bellek testinde, gizli platformu bulma süresi, katedilen yol, yüzme hızı, hedef kadranda geçirilen süre gibi veriler bu program yardımıyla kaydedilmiştir. Su labirentinin tam üzerinde, tüm egzersizler ve bellek testi boyunca sıçanların hareketlerini kaydeden bir video kamera (Sony SSC-DC398P, Japonya) verileri bilgisayara aktarmakta ve veriler Smart 2.5 versiyonu tarafından işlenmektedir. Ayrıca her kadran dış 1/3 kısmından çizilen yaylarla her kadran iç ve dış kısım olarak ikiye ayrılmış ve dış kadranda yüzme süreleri de değerlendirmeye alınmıştır.

Deneye başlamadan, sıçanların su labirentine alışması için hepsine bir gün serbest yüzme yaptırılmıştır. Deney süresince havuza bırakılırken sıçanların yüzlerinin labirentin duvarına bakar pozisyonda olmasına dikkat edilmiştir. Havuzdan alındıktan sonra sıçanlar kafeslerine geri bırakılmadan bir havlu ve 40-W beyaz ampul (OSRAM) altında tutularak kurutulmuşlardır. Günlük eğitimlerde sıçanlar, hedef kadran dışındaki kadrarlardan rastgele (zon 1, 2 ve 4) suya

bırakılmıştır. Sıçanlara aynı eğitim günü içinde her bir sıçan için egzersizler arasında en az 20 dk'lık aralar olmasına dikkat edilerek toplam 4 egzersiz yaptırılmıştır. Bu şekilde Morris'in protokolü kullanılarak, mekansal ipuçlarını ve yönsel stratejileri kullanarak platformun yerini öğrenme egzersizleri ardışık 5 gün yaptırılmıştır. Egzersizlerde sıçanlara yüzmeleri için 60 sn'lik bir süre tanınmıştır. Sıçanlar, 1. gün saklı platformu 60 sn'de bulamadı ise hedef platforma elle yönlendirilerek, platformu tanıması ve platformun sudan kurtuluş anlamına geldiğini göstermek için platformda 30 sn kalmasına ve çevresini algılamasına izin verilmiştir. Deneyin 2. gününde sıçanlar 60 sn'de platformu bulamaz ise yine araştırmacı tarafından platforma yönlendirilmiştir ancak bu kez platformda 15 sn kalmalarına izin verildikten sonra alınmıştır. Daha sonraki günlerde sıçanlar platformu bulamadıysa yönlendirme yapılmadan alınmıştır. Beşinci günün sonunda her sıçan toplamda 20 kez öğrenim egzersizi yapmış ve eğitim dönemini tamamlamıştır (68, 69).

Altıncı günde 'Probe trial' adı verilen test uygulanmıştır. Bu test için hedef kadrandaki saklı platform kaldırılmış ve sıçanlar, saklı platformun bulunmadığı diğer kadrarlardan (1., 2. ve 4. kadrar) bırakılmış ve 60 sn yüzmesine izin verilmiştir. Bu süre boyunca daha önce saklı platformun bulunduğu hedef kadranda (3. kadrar) geçirdikleri süre ve diğer kadrarlarda geçirdiği süre kaydedilmiştir. Bu süre mekansal hafızanın göstergesi olarak değerlendirilmiştir (68, 69). Daha sonra yine 6. günde sıçanlara bu deneyin ipucu içeren versiyonu 'Visible (görünür) Platform' testi uygulanmıştır. Bu test gıda boyalarının sıçanlarda görme, lokomotor aktivitede değişiklik ya da motivasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bu test uygulanırken görünür platform hedef kadrardan farklı kadrarlara taşınarak (1., 2. ve 4.) sıçanlar her seferinde hedef (3.) kadrardan bırakılmıştır. Görünür platformu bulma süreleri kaydedilmiştir (77).

3.2.1.2. Açık Alan Testi - Open Field Test:

'Açık alan testi' lokomotor aktivite, eksploratuar (keşifçi) davranış paterni ve anksiyete ile ilişkili davranışları değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bunun için 100 x100 cm'lik kare bir alan ve 40 cm yükseklikte duvara sahip, siyah renkli,

ahşaptan yapılmış bir aparat kullanılmaktadır. Zemin beyaz çizgilerle 16 eşit kareye ayrılmıştır. Aparatı çevreleyen 4 halojen lamba duvara yansıtılarak indirekt ve diffüz aydınlanma sağlanmıştır. Hayvanlar sessiz bir ortamda teste tabi tutulmuş ve 5 dk'lık periyot boyunca tüm hareketleri sistemi tavandan kayda alan bir video kamera yardımıyla kaydedilmiştir (Sony SSC-DC398P, Japonya). Smart versiyon 2.5'in kullanıldığı program ile aparatın video kamera tarafından alınan görüntüsü dış, orta, merkez alanlar olmak üzere iç içe hayali 3 kadran oluşturulmuş ve bu kadrarlarda kalma süresi ayrı ayrı kaydedilmiştir. Her bir sıçan 'açık alan testi'nde tek tek değerlendirilmiş ve 5 dk boyunca alanı keşfetmelerine izin verilip davranışları skorlanmıştır (70, 71).

Davranış skorlaması şu şekilde yapılmıştır:

- ✓ **Çizgi Sayısı (Line Crosses):** En az 3 ayağıyla geçtiği çizgi sayısı, bu veri sıçanın lokomotor davranışının (horizontal lokomotor aktivite) bir formudur.
- ✓ **Şahlanma (Rearing):** Arka iki ayağı üzerinde ayağa kalkıp koklama hareketinin sayısı.
- ✓ **Duvara Tırmanma (Walling):** Aparatın duvarlarına iki ayağı üzerinde kalkıp tırmanma hareketinin sayısı.
- ✓ **Kenarda Kalma Süresi (Edge Duration):** Aparatın kenarında, dış kadrarında geçirdiği süre.
- ✓ **Merkezde Kalma Süresi (Centre Duration):** Aparatın merkezinde geçirdiği süre.
- ✓ **Merkez Karedeki Aktivite Sayısı (Center Square Activity):** Kare alanın tam ortasına çizilmiş 25cm x 25cm'lik merkez kareden geçme sayısını ifade etmektedir.

Ayrıca herbir sıçanın verilen süredeki dışkılama ve idrar yapma sayısı kaydedilmektedir. Geçtiği çizgi sayısının, şahlanma sayısının, duvara tırmanma sayısının, merkez karedeki aktivite sayısının ve aparatın merkezinde geçirdiği sürenin fazlalığı artmış lokomotor aktivite ve keşifçi davranışı yansıtırken, aparatın kenarında geçirdiği sürenin fazlalığı, aparatın içinde hareketin ve geçilen çizgi

sayısının azlığı, dışkılama ve idrar yapma sayısında artış, keşifçi davranışı azalması ve yüksek anksiyete düzeyini yansıtmaktadır (72).

3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi - Forced Swim Testi

Yarıçapı 10 cm, yüksekliği ise 50 cm olan şeffaf silindirik tanka 30cm yüksekliğe kadar su konulmuştur. Tankın içindeki su oda ısısına (23⁰C) gelene kadar ısıtılmıştır. Suyun sıcaklığı termometre ile kontrol edilmiştir. Hayvanlar sessiz bir ortamda teste tabi tutulmuş ve 6 dk'lık periyot boyunca tüm hareketleri sistemi tavandan kayda alan bir video kamera yardımıyla kaydedilmiştir (Sony SSC-DC398P, Japonya). Smart versiyon 2.5'in kullanıldığı program ile aparatın video kamera tarafından alınan görüntüsü kaydedilmiştir. Her bir sıçan tek tek değerlendirilmiş ve sıçanların kafaları suya değmeyecek şekilde, baş aşağı tankın içerisine bırakılmıştır (76-77). Bir hayvanın yüzme, tırmanma, mobil veya hareketsiz kalma süresi, deneme kaydını bir kronometre ile analiz ederek elde edilebilir.

Bu testin amacı stresli ortamda hayvanın davranışlarını gözlemektir. Genellikle hayvanların, testin ilk birkaç dakikasında mücadele eden kurtulmaya çalışma davranışları sergiler, ancak umutsuzluğa kapıldığında hareketsiz hale gelir ve suyun üstünde sadece başı kalacak şekilde küçük hareketlerle yüzmeye devam etmesi beklenir. Umutsuzluk hali hayvan için kaçışın imkânsız olduğunu, vazgeçtiğini ve mücadele hareketlerini bıraktığı dönem olarak tanımlanır. Tüm test kaydedilir (6 dk) ve genel olarak testin son 3 dakikası içinde sergilediği spesifik davranışların kaydı ile analiz edilir. İlk iki dakika boyunca, hayvanlar genellikle davranışlarında çok aktiftir ve başlangıçtaki hareketleri, tedavinin olası etkilerini maskeleyebilir. Altı dakikanın sonunda sıçanlar sudan alınarak kurutulurlar.

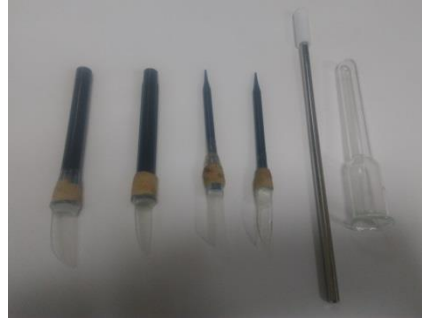
3.2.2.1. Hipokampuslerin Eldesi

Öğrenme testleri tamamlandıktan 24 saat sonra sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin HCl (90 mg/kg)- % 2'lik ksilazin HCl (10 mg/kg)

anestezisi altında dekapite edilmiştir. Soğuk fosfat tamponuyla ıslatılmış buz aküsü üzerinde, herbir sıçanın kafatası kemikleri tam orta hattan başlanarak dikkatle uzaklaştırıldıktan sonra her iki lop ayrılmış, frontal loplara küçük birer kesi atılarak düz bir kenar elde edilmiştir. Beyin dokusu frontal kısım üzerinde dik şekilde kaldırılıp hipokampusler beyin dokusundan ayrılmıştır.

3.2.2.2. Hipokampuslerin Homojenizasyonu:

Sıçanların hipokampusleri ayrı ayrı soğuk fosfat tamponu dolu ependorf tüplerine konulmuştur. Aynı gruptaki sıçanların herbir hipokampus örneği tartılıp uygun protein konsantrasyonunu sağlamak üzere üç sıçanın hipokampusleri birleştirilmiş ve antiproteaz kokteyli içeren özel homojenizasyon tamponu içinde önce cam teflon homojenizasyon aparatıyla 20 darbe ile parçalanmıştır. Tüm homojenizasyon basamakları soğuk zincire uygun olarak yapılmıştır. Homojenatlar 10000 g'de ve +4 °C'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve en az 5 parça olacak şekilde porsiyonlanarak -80 °C'ye kaldırılmıştır.



Resim 11: Hipokampus izolasyonu ve homojenizasyonunda kullandığımız aletler

3.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE prosedürü Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışılmıştır (73). Elektrofrez öncesi ilgili homojenatlar çözündürülüp süpernatantlarından Lowry metodu ile protein tayini yapılmıştır (74). Daha sonra doku homojenatı sample buffer (Laemmli buffer) ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Günlük olarak % 9'lük lower ve % 4'lük upper jeller hazırlanmıştır.

Ekilecek numune volümleri kuyucuk başına konsantrasyon 25 µgr protein olacak şekilde hesaplanmıştır. Numuneler ve marker örnekleri (Prestained molecular weight marker, Sigma, SDS7B2) 95 °C'deki etüvde 5 dk aktive edilir, jelin ilk kuyucuğuna 'marker' daha sonra ise sırasıyla K, D1, D2 grupları ve tekrarları olmak üzere 10 kuyucağa ekim yapılmıştır. 110 V ve jel başına 17 mA elektrik akımı uygulanarak 1,5 saat elektroforez yapılmıştır.

3.2.4. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre göç etmiştir. Jel genişliğinde polyvinylidene difluorid (PVDF) membran (immobilon-P) 30 sn methanol ve 2 dk distile suda bekletilerek aktive edilmiş ve jel ile birlikte transfer edilmek üzere transfer tankına alınmıştır. Transfer işlemi 100V, 300 mA elektrik akımı uygulanarak 1,5 saatte yapılmıştır.

Transfer prosedürü sonrası membranlar ayrı ayrı anti β-actin + anti NR2A, anti β-actin + anti NR2B, anti β-actin + anti NR1 içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletilmiştir. Tüm gece inkübasyonda bekleyen membran, TTBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikorla (Sigma Aldrich, USA, 1/10000 konsantrasyonda) 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tekrar TTBS ile yıkayıp taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletilmiştir. Oluşan bantlar görüntüleme cihazı (Kodak Image 2000MM) kullanılarak taranmış ve optik dansitesileri ölçülmüştür. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için β-actin ile normalize edildikten sonra kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (69).

3.3. İstatistiksel Analiz

Su labirenti egzersiz dönemi testinden hedef platformu bulma süresi, dış kadrantlarda kat edilen mesafe, dış kadrantlarda geçirilen süre, dış kadrantlardaki ortalama yüzme hızı, kat edilen toplam mesafe ve ortalama yüzme hızı özellikleri bakımından elde edilen veriler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü 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, gün faktörünün ise 5 seviyesi mevcuttur. Tekrarlanan ölçümler gün faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir.

Zorlanmış yüzme testi verilerinden aktif yüzme süresi, dinlenme süresi ve ortalama yüzme hızı özellikleri bakımından elde edilen veriler son 3 dakikalık dönem faktöriyel düzende 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 (2 yönlü ANOVA).

Açık alan testinde geçilen çizgi sayısı, dış zonda geçirilen süre, iç zonda geçirilen süre, merkez karede geçirilen süre, iç zona giriş sayısı, merkeze giriş sayısı, şahlanma (rearing) sayısı, duvara tırmanma (walling) sayısı, idrar yapma sayısı ve dışkılama sayısı özellikleri bakımından elde edilen veriler faktöriyel düzende varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiştir. Sayılarak elde edilen özelliklerin verileri

analize dahil edilmeden önce karekök $\sqrt{x + \frac{3}{8}}$ transformasyonuna tabi tutulmuştur.

Çalışmada cinsiyet faktörünün dişi ve erkek olmak üzere 2 seviyesi, grup faktörünün K, D1 ve D2 olmak üzere 3 seviyesi mevcuttur (2 yönlü).

Probe testte hedef kadranda geçirilen süre, ortalama hız ve kat edilen toplam mesafe özellikleri bakımından elde edilen veriler faktöriyel düzende 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 kat edilen toplam mesafe ve platformu bulma süresi özellikleri bakımından elde edilen veriler faktöriyel düzende 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.

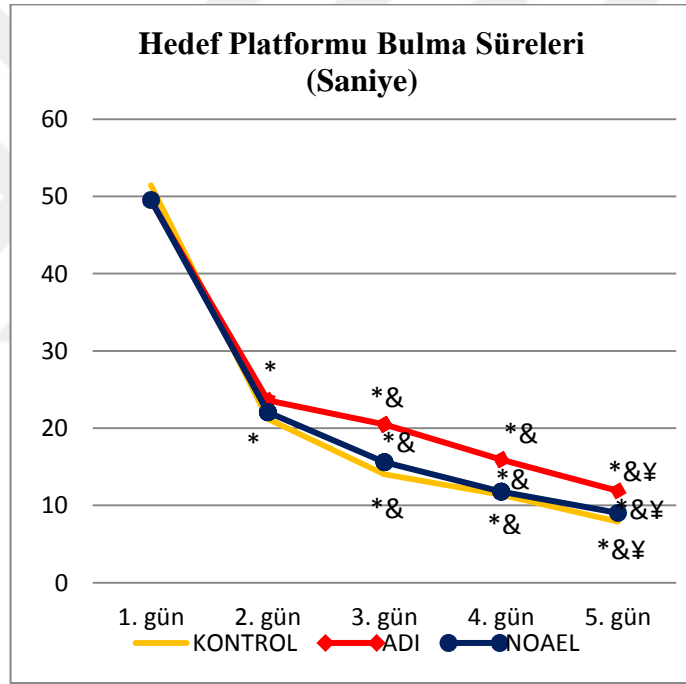
Western blot analizi sonrası dansitometrik elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartını sağlamadığı için (normal dağılım ön şartı için Kolmogorov Smirnov testi sonucunda normal dağılıma uymadığı saptanmıştır, Levene testi sonucunda da varyansların homojenliği ön şartının sağlanmadığı saptanmıştır) grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Grupların rank ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz her iki cinsiyet için ayrı ayrı uygulanmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

5.1.Morris Su Labirenti Verileri

5.1.1. Hedef Platformu Bulma Süreleri

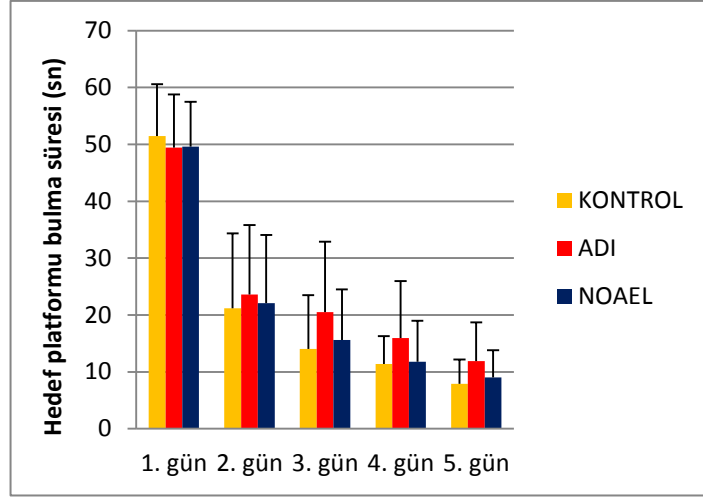
Her üç grubun kendi içinde günden güne su labirentinde öğrenme durumları değerlendirildiğinde 1. günden itibaren 5. güne kadar (eğitim dönemi) hedef platformu bulmak için harcadıkları süre her üç grupta da anlamlı düzeyde kısalmıştır ($p<0.05$), bu veri tüm grupların sistemi öğrendiğini ifade etmektedir (Grafik 1).



Grafik 1: Grup içi Hedef Platformu Bulma Sürelerinin Günlere Göre Değişimi

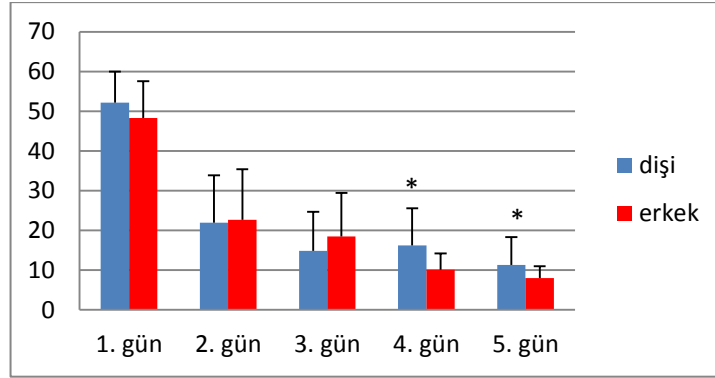
‘*’ işareti 1. güne göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$) . Tüm gruplarda 1. gün ile diğer tüm eğitim günleri arasında anlamlı düzeyde fark vardır. ‘&’ işareti 2. güne göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$). 2. gün ile 3., 4. ve 5. gün arasında anlamlı fark vardır. ‘¥’ işareti 3. güne göre anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$). 3. eğitim günü ile 5. günü arasında tüm gruplar açısından anlamlı bir fark vardır ($p<0.05$).

Ancak her bir eğitim günü için gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Grafik 2).



Grafik 2: Gruplar arası hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması

Bu veriler ile cinsiyetin etkisini değerlendirdiğimizde ise 4. ve 5. eğitim günlerinde her bir grupta dişi ve erkek sıçanların hedef platformu bulma süresi açısından anlamlı fark saptanmıştır. Erkek sıçanlar dişi sıçanlara göre hedef platformu anlamlı düzeyde daha kısa sürede bulmuşlardır ($p < 0.05$). Ancak her bir grup eşit sayıda dişi ve erkek sıçan içerdiği için gruplar arası anlamlı bir fark saptanmamıştır (Grafik 3).



Grafik 3: Dişi ve Erkek Sıçanların Hedef Platformu Bulma Süreleri Açısından Karşılaştırılması

*' Aynı gün içerisinde dişi sıçanların hedef platformu bulma süreleri erkek sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzun olduğunu göstermektedir.

5.1.2. Dış Kadrandaki Katedilen Yol, Dış kadradaki Yüzme Hızı ve Dış Kadrandaki Geçirdiği Süre

Dış kadranda katedilen yol ve geçirilen süre açısından labirentteki ilk eğitim gününde en yüksek düzeyde olma eğiliminde iken sıçanların görevini kavraması ve öğrenme süreciyle beşinci güne doğru katedilen yol ve süre azalmaktadır. Her üç grubun kendi içinde günden güne dış kadranda katettikleri yol ve süre açısından değerlendirildiğinde 1. günden itibaren 5. güne kadar dış kadranda katettikleri yol ve geçirdikleri süre her üç grupta da anlamlı düzeyde kısalmıştır ($p < 0.05$), bu veri tüm grupların günden güne sistemi öğrendikçe anksiyetesinin azaldığını ifade etmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Dış Kadrandaki Katedilen Yol, Dış kadradaki Yüzme Hızı ve Dış Kadrandaki Geçirdiği Süre Açısından Grupların Karşılaştırılması

Gün	Grup	Dış kadranda katedilen mesafe	Dış kadradaki ortalama yüzme hızı	Dış kadranda geçirdiği süre
1. Gün	K	628,77 ± 158,66 ^{b,c}	21,59 ± 3,34*	32,24 ± 6,57 ^{b,c}
	ADI	595,68 ± 173,63 ^{b,c}	20,66 ± 3,67*	30,45 ± 7,27 ^{b,c}
	NOAEL	667,92 ± 168,92 ^{b,c}	24,61 ± 5,05	30,61 ± 5,72 ^{b,c}
2. Gün	K	145,28 ± 132,85 ^{a,c}	20,01 ± 4,37 ^{c,*}	8,25 ± 7,46 ^{a,c}
	ADI	185,61 ± 148,91 ^{a,c}	21,20 ± 3,48 ^{c,*}	10,10 ± 8,89 ^{a,c}
	NOAEL	213,62 ± 205,89 ^{a,c}	24,34 ± 4,62 ^c	9,41 ± 8,56 ^{a,c}
3. Gün	K	72,33 ± 78,32 ^{a,b}	21,81 ± 4,33 ^{b,*}	4,36 ± 5,99 ^{a,b}
	ADI	151,68 ± 141,89 ^{a,b}	23,51 ± 5,72 ^{b,*}	8,05 ± 8,01 ^{a,b}
	NOAEL	102,44 ± 81,42 ^{a,b}	26,44 ± 5,16 ^b	4,66 ± 4,04 ^{a,b}
4. Gün	K	44,69 ± 36,22 ^{a,b}	23,15 ± 3,97 ^{a,b,*}	2,16 ± 1,79 ^{a,b}
	ADI	105,13 ± 105,24 ^{a,b}	23,81 ± 4,71 ^{a,b,*}	5,66 ± 5,83 ^{a,b}
	NOAEL	65,25 ± 54,05 ^{a,b}	27,46 ± 5,36 ^{a,b}	2,96 ± 2,78 ^{a,b}
5. Gün	K	34,02 ± 43,02 ^{a,b,c}	26,25 ± 5,91 ^{a,b}	1,54 ± 2,04 ^{a,b,c}
	ADI	70,98 ± 52,40 ^{a,b,c}	23,54 ± 5,66 ^{a,b}	3,64 ± 3,46 ^{a,b,c}
	NOAEL	44,74 ± 57,17 ^{a,b,c}	25,48 ± 5,05 ^{a,b}	1,88 ± 2,27 ^{a,b,c}

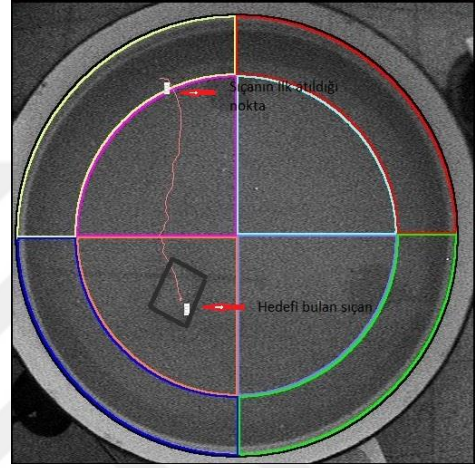
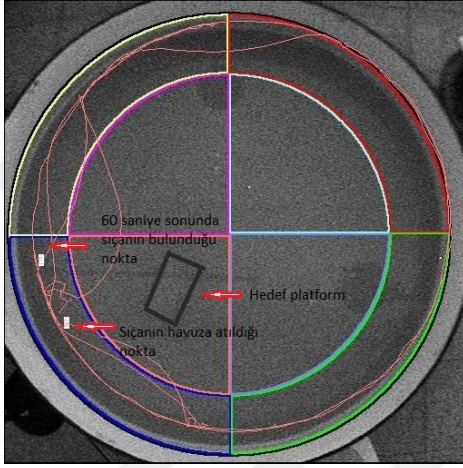
'a' işareti: 1. güne göre grup içi anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$). 'b' işareti: 2. güne göre grup içi anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$). 'c' işareti: 3. güne göre grup içi anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$). '*' işareti: D2 grubuna göre aynı gün içerisinde anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

Dış kadranda yüzme hızı açısından, günler arasında ve her bir gün için gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Birinci ve 2. güne göre 4. ve 5. günlerde dış kadranda yüzme hızı tüm gruplarda anlamlı düzeyde artmıştır, ayrıca K

ve ADI grubuna göre NOAEL grubunun yüzme hızı 1., 2., 3. ve 4. günlerde anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0.05$) (Tablo 5).

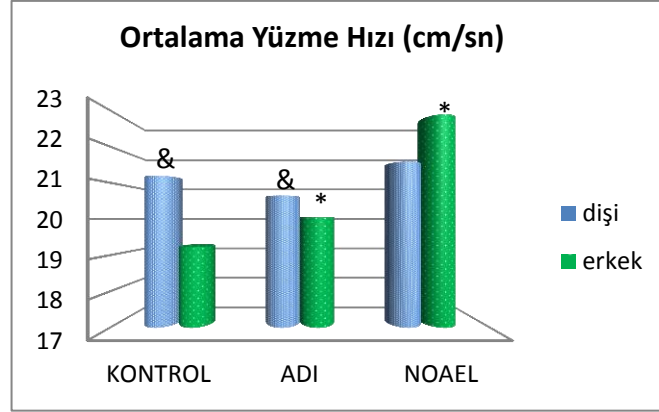
5.1.3. Su Labirentinde Katedilen Toplam Yol ve Ortalama Yüzme Hızı

Labirentte katedilen toplam yol açısından 1. günden itibaren 5. güne kadar (eğitim dönemi) her üç grupta da anlamlı düzeyde kısalma saptanmıştır (Resim 17-18).



Resim 12: Su labirenti testinde sıçanın ilk günü **Resim 13:** Su labirenti testinde sıçanın beşinci günü

Ortalama yüzme hızları ise her grup için 1. günde 3., 4. ve 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. Grup ve cinsiyet açısından karşılaştırıldıklarında K ve ADI gruplarında dişilerin yüzme hızları erkeklere göre anlamlı düzeyde yüksektir. Ayrıca kontrol erkek grubuna göre ADI ve NOAEL erkek grubunun yüzme hızı anlamlı düzeyde yüksektir (Grafik 4).



Grafik 4: Grup ve cinsiyet açısından ortalama yüzme hızlarının karşılaştırılması

‘*’ işareti: Kontrol erkek grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir. ‘&’ işareti: Buldukları gruptaki erkeklere göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

5.2. Probe Test Verileri

Öğrenilen bilgilerin test edildiği ‘Probe Test’ aşamasında hedef kadranda geçirilen ortalama süre, ortalama hız ve katedilen ortalama yol parametreleri değerlendirilmiştir (Tablo 5). Bu verilere göre katedilen ortalama yol ve ortalama hız açısından grup içi ve gruplararası anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Hedef kadranda geçirdikleri ortalama süre açısından karşılaştırıldıklarında kontrol dişilerin ADI ve NOAEL dişilere göre hedef kadranda anlamlı düzeyde fazla kaldığı bulunmuştur. Ayrıca grup içi karşılaştırma yapıldığında kontrol dişilerin kontrol erkeklere göre anlamlı düzeyde hedef kadranda daha uzun süre geçirdiği tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Probe test verilerinin karşılaştırılması

Gruplar	Hedef Kadranda Geçirilen Ortalama Süre (sn)	Ortalama Hız (cm/sn)	Katedilen Ortalama Yol (cm)
Kontrol Erkek	18,17 ± 4,52*	20,13 ± 2,62	1206,70 ± 157,39
Kontrol Dişi	23,92 ± 4,53	20,94 ± 2,62	1254,70 ± 157,53
ADI Erkek	16,29 ± 3,86	19,83 ± 3,72	1189,38 ± 224,18
ADI Dişi	15,82 ± 3,26*	21,01 ± 3,12	1259,26 ± 187,32
NOAEL Erkek	18,08 ± 5,92	21,50 ± 2,96	1289,04 ± 177,24
NOAEL Dişi	17,73 ± 5,16*	21,50 ± 3,17	1289,23 ± 190,02

‘*’ işareti: Kontrol dişiye göre anlamlılığı ifade etmektedir.

5.3. Görünür Platform Testi Verileri

Görünür platform testinde görünür platformu bulma süresi ve katedilen yol verileri esas alınmıştır. Her iki veri içinde gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p>0.05$). Bu da hayvanın deneye uyumunu gösterir

5.4. Açık Alan (Open Field) Testi Verileri

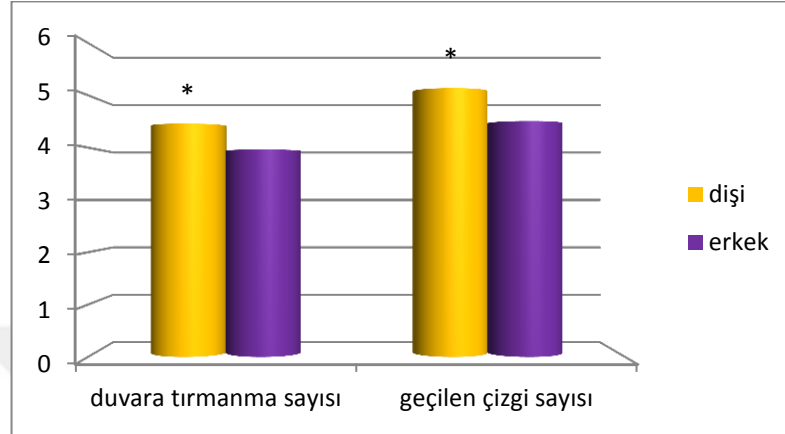
Açık alan testinde gruplar arası ve grup içi karşılaştırmada iç zona giriş sayısı, merkeze giriş sayısı, şahlanma sayısı, idrar yapma sıklığı ve dış zonda geçirdikleri süre açısından istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (Tablo 6).

Tablo 6: Tüm grupların açık alan testi verilerinin karşılaştırılması

Gruplar	Kontrol Dişi	Kontrol Erkek	ADI Dişi	ADI Erkek	NOAEL Dişi	NOAEL Erkek
Geçilen çizgi sayısı	5,21±0,67	4,28±1,15	5,20±0,98	4,40±0,91	4,98±1,21	4,84±0,89
Duvara tırmanma sayısı	4,36±0,51	4,11±0,81	4,31±0,62	3,71±0,98	4,69±0,77	4,05±0,50
Şahlanma sayısı	1,44±0,81	2,05±1,24	1,49±0,66	1,65±0,93	1,2±0,65	1,49±1,03
İç zona giriş sayısı	0,82±0,33	0,95±0,48	0,90±0,34	0,89±0,29	0,81±0,28	0,79±0,27
Merkeze giriş sayısı	0,82±0,33	0,88±0,43	0,95±0,63	0,71±0,35	0,74±0,31	0,61±0,00
Dış zonda geçirdiği süre	285,85±9,53	286,15±12,24	281,65±12,32	292,10±4,06	289,47±8,91	288,97±6,01
İç zonda geçirdiği süre	3,15±2,31	5,68±7,03	5,65±3,97	1,83±2,53*	2,78±3,67	2,48±2,33
Merkez karede geçirdiği süre	0,75±1,00	2,18±4,06	4,70±7,84 ^a	0,21±0,42	1,38±2,08	1,31±2,51
İdrar yapma sayısı	1,89±0,56	1,7±0,62	1,68±0,31	1,56±0,52	1,92±0,59	1,89±0,62
Dışkılama sayısı	2,49±0,50	2,05±0,58	2,34±0,52	1,95±0,64	2,32±0,38	1,71±0,68

‘*’ işareti: ADI dişi grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. ‘a’ işareti: Kontrol dişiye göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

Duvara tırmanma, gaita yapma sıklığı ve geçilen çizgi sayısı bakımından gruplar arası anlamlılık yoktur ancak cinsiyet açısından bakıldığında erkeklerin dişilere göre daha az duvara tırmandığı ve daha az çizgi geçtiği belirlenmiştir (Grafik 5).



Grafik 5: Açık alan verilerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

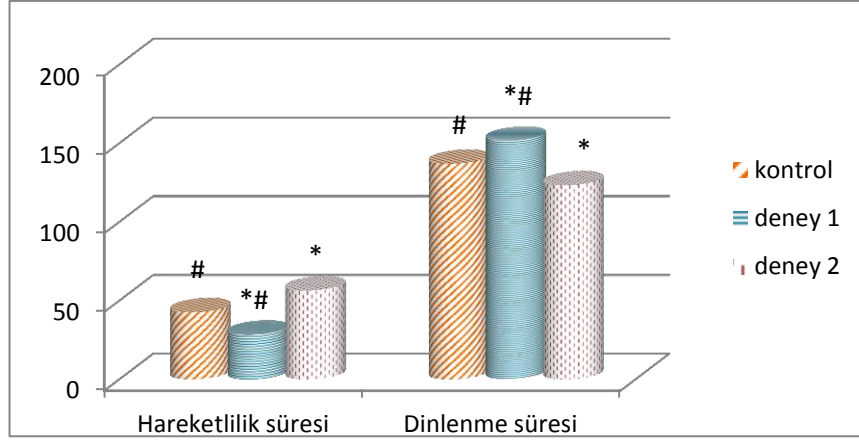
‘*’ işareti: Aynı veri içerisinde erkeklere göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

İç zonda geçirilen süre açısından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmamıştır ancak grup içi karşılaştırmada ADI dişilerin, ADI erkeklere göre iç zonda anlamlı düzeyde daha uzun süre geçirdiği belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 6).

Merkezde geçirilen süre açısından grup-cinsiyet interaksyonu karşılaştırmasında kontrol dişilerin, ADI dişilere göre anlamlı düzeyde daha az kaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 6).

5.5. Zorlanmış Yüzme Testi Verileri

Zorlanmış yüzme testinde stresli ortamda sıçanın davranışını yansıtan son üç dakika içinde sıçanın hareketli kaldığı süre, hareketsiz geçirdiği süre ve ortalama hızı değerlendirilmiştir. Her üç parametre için de gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. ADI grubunun, kontrol ve NOAEL grubuna göre anlamlı düzeyde daha az hareketli ve daha yavaş olduğu bulunmuştur. Kontrol ve ADI grubuna göre NOAEL grubunun hareketli geçirdiği sürecin anlamlı düzeyde uzun olduğu belirlenmiştir. Hız açısından ise NOAEL grubunun en hızlı olduğu ancak istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hızlı olmadığı belirlenmiştir (Grafik 6).



Grafik 6: Zorlanmış yüzme testinde grupların karşılaştırılması

‘*’ işareti: Aynı veri içerisinde kontrole göre anlamlı farklılığı göstermektedir. ‘#’ işareti: Aynı veri içerisinde NOAEL’e göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

5.6. Western Blot Verileri

Reseptör konsantrasyonları değerlendirilirken tüm gruplar için normalizasyon amaçlı beta-aktin çalışılmış ve her bir reseptör dansitesi ile oranlanmıştır. Beta-aktin uygulaması her bir kuyucuğa eşit miktarda protein ekimi yapılmış olduğunun kontrolünü sağlamaktadır. Her bir cins için kontrol grubunun her bir reseptör için optik dansite verilerinin ortalaması alınmış, bu veri 100 kabul edilmiştir. Daha sonra, ADI ve NOAEL grubu optik dansiteleri ile oranlanarak sonuçlar verilmiştir. Hipokampus eldesi ve Western Blotting aşamasında hipokampuslar ayrı ayrı alınmış ve çalışılmış olduğundan dolayı kontrol dişi, deney 1 dişi, deney 2 dişi ve kontrol erkek, deney 1 erkek ve deney 2 erkek şeklinde 6 grup olarak değerlendirmeler yapılmıştır.

Tüm grupların, her bir reseptör için ortalama optik dansiteleri Tablo 7’de toplu olarak verilmiştir. Her bir reseptörün western blot görüntü örnekleri ise resim 14, 15 ve 16’da verilmiştir.

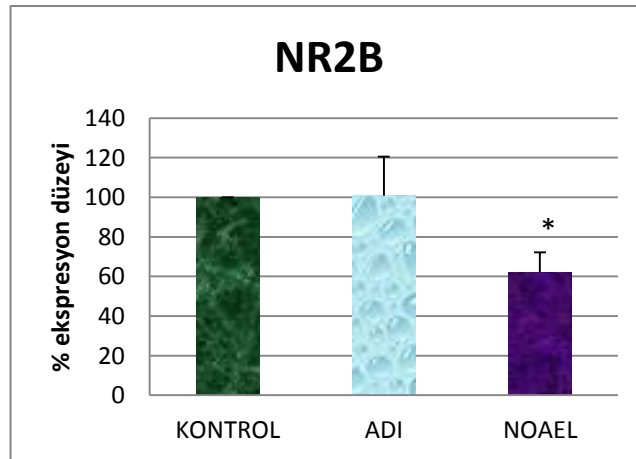
Tablo 7: Western Blot analizi ile NR1, NR2A ve NR2B reseptörlerinin optik dansiteleri

GRUP	NR1	NR2A	NR2B
Kontrol Dişi	100±0	100±0	100±0
ADI Dişi	101,98± 5,10	155,18±24,39	100,76±19,71
NOAEL Dişi	110,73±7,03	171,16±28,35	62,08±10,14*
Kontrol Erkek	100±0	100±0	100±0
ADI Erkek	113,28±16,45	111,46±8,03	105,47±14,71
NOAEL Erkek	100,52±8,13	103,11±7,36	125,34±22,24

“*”: İlgili reseptör için kendi grubunun kontrolüyle karşılaştırıldığında anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). İstatistiksel değerlendirme Kruskal Wallis testi yapılmıştır.

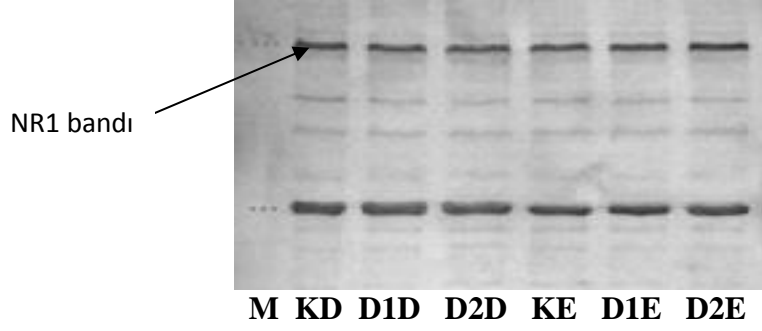
NR1, NR2A reseptör konsantrasyonları karşılaştırıldığında kendi içinde hem dişiler hem de erkeklerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

NR2B konsantrasyonu açısından dişilerde Kontrol ve ADI grubu arasında ve ADI ile NOAEL arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak dişi kontrol grubuna göre dişi deney 2 grubunda % 40 oranında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Grafik 7). Erkeklerde ise hem gruplararası hem de grup içi anlamlı bir fark saptanmamıştır.



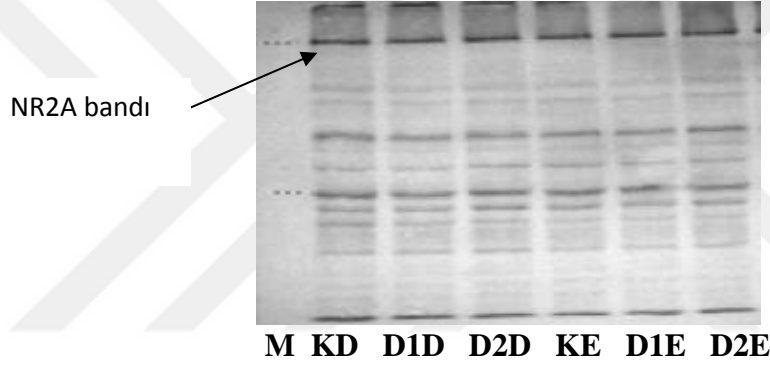
Grafik 7: NR2B reseptör konsantrasyonlarının dişilerde gruplar arası % ekspresyon düzeyleri

“*”: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.



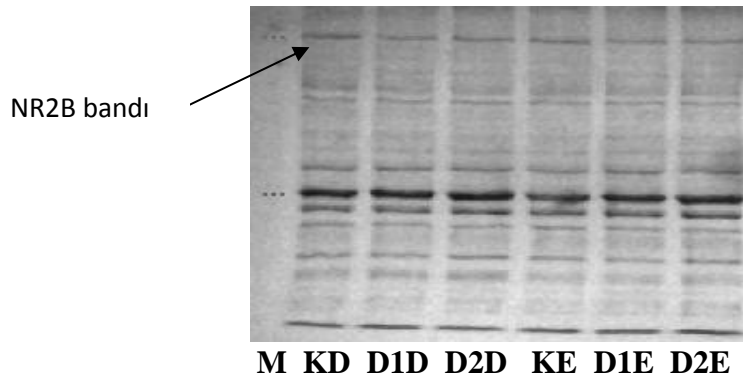
Resim 14: NR1 'e ait Western Blot örneği

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



Resim 15: NR2A'ya ait Western Blot örneği

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



Resim 16: NR2B'ye ait Western Blot örneği

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

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda, Morris su labirentinde eğitim dönemi sonunda tüm sıçanlar sistemi öğrenmiştir. Tüm gruplardaki sıçanların ‘hedef platformu bulma süresi’ 1. günden itibaren 5. güne kadar anlamlı ölçüde kısalmıştır. Ancak her bir eğitim günü için gruplar karşılaştırıldığında öğrenme hızları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu ADI ve NOAEL dozunda uygulanan sentetik gıda boyası karışımlarının öğrenme üzerine bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Dış kadranda katedilen yol, geçirilen süre gibi veriler anksiyetenin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Eğitim günleri boyunca bu verilerin azalması ve sıçanların hedefe yönelmesi beklenir. Dış kadranda katedilen yol ve geçirilen süre açısından tüm gruplara bakıldığında labirente ilk konuldukları gün ile beşinci gün arasında anlamlı ölçüde azalma saptanmıştır. Dış kadranda yüzme hızları açısından tüm gruplar için 1. günden 5. güne anlamlı düzeyde artış olmuş ancak NOAEL grubu tüm gruplardan daha hızlı yüzmüştür. 1-4. eğitim günlerinde NOAEL grubu diğer gruplara göre anlamlı düzeyde hızlı yüzmüştür. NOAEL dozunda katkı maddesine maruz kalan yavruların lokomotor aktivitesi artmıştır.

Tüm eğitim dönemi boyunca sıçanların ortalama yüzme hızları değerlendirildiğinde yine NOAEL grubunun yüzme hızının kontrol ve ADI grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Cinsiyetin etkisini değerlendirdiğimizde K ve ADI gruplarında dişilerin yüzme hızları erkeklere göre anlamlı düzeyde yüksektir. Bu dişi cinsin erkek cinsiyete göre performans farkını ortaya koymaktadır. Bu farklılık NOAEL grubunda ortadan kalkmakta ve NOAEL dişi ve erkek sıçanlar arasında yüzme hızı açısından anlamlı bir fark kalmamaktadır. Diğer taraftan kontrol erkek grubuna göre ADI ve NOAEL erkek grupları anlamlı düzeyde hızlı yüzmektedir. Bu veri erkek cinsinde katkı maddesine maruziyetin yüzme hız-lokomotor aktivite üzerinde arttırıcı bir etki yaratmıştır.

‘Probe Test’ aşamasında hedef kadranda geçirdikleri ortalama süre açısından karşılaştırıldıklarında kontrol dişilere göre ADI ve NOAEL dişilerin hedef kadranda

geçirdikleri süre anlamlı düzeyde kısadır. Bu bize ADI ve NOAEL dozunda sentetik gıda boyalarının dişi cinsiyette mekânsal hafızayı olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Açık alan testinde cinsiyet açısından bakıldığında erkeklerin dişilere göre daha az duvara tırmanma sayısı, çizgi geçme sayısının daha az sayıda olduğu belirlenmiştir. Bu veriler keşfetme ve kurtulma isteğinin dişilere göre daha düşük olduğunu ifade etmektedir. Ancak bu veriler tüm grupları aynı düzeyde etkilemiş ve gruplar arası bir farklılık söz konusu olmamıştır. İç zonda geçirilen süre açısından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmamış ancak grup içi karşılaştırmada ADI dişilerin, ADI erkeklere göre iç zonda anlamlı düzeyde daha uzun süre geçirdiği belirlenmiştir. Bu veri ile de dişilerin alanı daha rahat kullandığı, keşifçi yaklaşımının daha gelişmiş olduğu görülmektedir. Merkezde geçirilen süre açısından kontrol dişilere göre ADI dişilerin daha uzun süre kaldığı tespit edilmiştir. Bu veri ADI dozunda gıda katkı maddesinin dişi cinsiyet üzerine etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Zorlanmış yüzme testinde esas alınan veri son 3 dakikadaki mobil faz ve immobil fazdır. Mobil fazın yüksek oluşu kurtulma istek ve gayretini ifade etmekte, immobil fazın yüksek oluşu ise depresyon eğilimi ve teslimiyet duygusunu ifade etmektedir. Kontrol ve ADI grubuna göre NOAEL grubunun mobil fazı anlamlı düzeyde yüksek ve immobil fazı anlamlı düzeyde düşüktür. NOAEL dozunda gıda boyasına maruziyet lokomotor aktiviteyi arttırdığı gibi ve kurtulma eylemini destekler davranışı arttırmaktadır.

Katkı maddelerinin öğrenme ve hiperaktivite üzerine etkisini inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır. Dr. Benjamin F. Feingold 1976 ve 1977 yıllarında yaptığı çalışmalarda gıdalardaki bazı küçük moleküllü maddelerin duyarlı çocuklarda hiperaktivite ve nöropsikolojik bozukluklara yol açtığını iddia etmiştir (4). Sonraki yıllarda Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) ile gıda katkı maddeleri arasında ilişki kurulmaya çalışılmış ve bu konu ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve çelişkili veriler elde edilmiştir.

Conners ve arkadaşları tarafından yapılan ve hiperaktif 15 erkek çocuğun dahil edildiği çalışmada, Feingold'un önerdiği sentetik renklendirici, tatlandırıcı ve salisilatlardan arındırılmış diyet ile beslenen çocukların hiperaktif belirtilerinde öğretmen değerlendirmesine göre anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir. Bu çalışmada ebeveyn değerlendirilmesi esas alındığında ise belirtilerde herhangi bir değişiklik olmadığı sonucuna varılmıştır (75). Hiperaktivite bozukluğu olan kız çocuklarında yapılan başka bir çalışmada da 11 ay boyunca bir gruba Feingold diyeti uygulanırken diğer gruba yapay gıda boyası verilmiştir. Gıda boyası verilen grupta hiperaktif davranışların sıklığında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (76). Gıda katkı maddelerinin davranış ve bilişsel etkilerinin araştırıldığı en kapsamlı klinik araştırma 1997 yılında Ward tarafından yapılmıştır. Yaşları 7-13 arasında değişen 486 hiperaktif çocuğun dâhil edildiği bu çalışmada anket değerlendirme sonuçlarına göre hiperaktif çocukların %60'ında gıda katkı maddeleri ile davranış bozukluğu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (77). Bateman ve arkadaşlarının yaptığı 3 yaşındaki 277 çocuğu kapsayan plasebo kontrollü çift kör bir çalışmada, çocuklara başlangıçta bir hafta kimyasal renklendirici ve koruyuculardan arındırılmış gıda ve sonra üç hafta boyunca rastgele seçilen gruplara ayrı ayrı günlük 20 mg renklendirici (sunset yellow FCF, tartrazin, karmosin, ponso 4R), 45 mg koruyucu (sodyum benzoat) ve plasebo verilmiştir. Çalışmanın sonunda klinik testlerle saptanamayan ancak ailelerin değerlendirme raporlarında kimyasal renklendirici ve koruyucuların diyetten eklenmesiyle hiperaktif davranışlarda belirgin bir artış ortaya çıktığı, bu maddelerin diyetten uzaklaştırılmasıyla hiperaktif davranışlarda belirgin bir azalma olduğu gösterilmiştir (78).

McCann ve ark. 3 yaş ve 8-9 yaş grubundaki toplam 267 çocuğun diyetlerine farklı oranlarda katkı maddesi ihtiva eden iki ayrı karışımı (karışım A, B) randomize olarak eklemiştir. (Karışım A: Tartrazin, ponso 4R, sunset yellow FCF, karmosin ve sodyum benzoat; karışım B: Kinolin sarısı, sunset yellow FCF, allura red, karmoisin ve sodyum benzoat). Ardından bir hafta boyunca plasebo içecek verilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada öğretmen gözlemi, ebeveyn gözlemi ve sınıf içi gözlemi esas alarak sentetik renklendiricilerin ve koruyucuların davranış modelleri üzerine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Karışım A verilen 3 yaşındaki çocukların davranış modellerinde plasebo verilen döneme kıyasla belirgin etkilenim görülürken,

karışım B alanlarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak 8 yaşındaki hasta grubunda her iki karışımın da davranış modelleri üzerine olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkileşimin doz ve yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (79).

Diğer taraftan Mattes ve Gittelman, 11 hiperaktif çocuğa birer hafta süre ile sırasıyla Feingold'un katkılardan arındırılmış diyeti, gıda boyası ihtiva eden diyet ve gıda boyası ihtiva eden ancak görünü ve koku olarak gıda boyası içerdiği belli olmayan diyet (plasebo) vermiştir. Belirti skorunu öğretmen, ebeveyn ve psikiyatrist verileri ve psikolojik testler ile değerlendirdiklerinde Feingold diyetinin belirtilerde belirgin bir değişikliğe neden olmadığını gözlemlemişlerdir (80). Mattes, 1976 - 1983 yılları arasındaki gıda katkı maddeleri ve hiperaktivite ilişkisini araştıran tüm raporları gözden geçirmiş ve hiperaktif belirtilerde azalma üzerine Feingold diyeti uygulamasının anlamlı bir etkisi olmadığını iddia etmiştir (81).

Bu alanda yapılan hayvan deneylerini inceleyecek olursak, Tanaka 5 haftalık dişi farelere eritrosin, ponso 4R, sunset yellow FCF, amarant ve allura red AC'nin çeşitli konsantrasyonlarını ayrı ayrı uygulamıştır ve iki nesil üzerinde gerçekleştirdiği çalışmalarda çeşitli lokomotor, nörodavranışsal testler yapmıştır. Sıçanlar 9 haftalık olduklarında gebe kalmaları sağlanmış, gebelik süresince katkı maddeleri verilmeye devam edilmiştir. Doğan yavrulara da 9 hafta oluncaya kadar katkı maddeleri verilmeye devam edilmiştir. Bu çalışmada katkı maddelerinin annelerde üremeye etkileri, yavrularda ise gelişimsel ve davranışsal etkileri araştırılmıştır. Çalışmada her bir gıda boyasının bireysel etkileri ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Sonuçta sentetik gıda boyalarının farelerin davranışsal parametrelerini ve öğrenme yetilerini olumsuz şekilde etkilediği ve bu etkilerin cinsiyete ve tüketilen katkı madde tipi ve miktarına göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (5-9). Biz de çalışmamızda özellikle dişi cinsiyette mekânsal hafıza performansının etkilendiğini, diğer taraftan NOAEL dozu uygulanan sıçanların yüzme hızı ve kurtulma güdülerinde anlamlı bir artış saptadık. Tanaka'nın çalışmalarında kullanılan test tipi, uygulama periodu ve değerlendirme parametrelerinde farklı olması ve gıda boyalarının tek tek uygulanmış olması bizim çalışmamızdan ayrılan yönleri olmakla beraber Tanaka'nın çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde doz bağımlı bir sonuç elde edilmiştir. Ek olarak cinsiyetler arasında

bazı veriler açısından farklar saptanmıştır. Doğu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dişi sıçanlara gebe kalmadan bir hafta önce ve gebelikleri boyunca ADI dozunda sentetik gıda boyası karışımı verilmiştir. Bunlardan doğan sıçanlarda Morris su labirent testi, açık alan testi ve zorlanmış yüzme testi yaptırılmıştır. Çalışma sonucunda ADI dozunda maruz kalınan sentetik gıda boyalarının mekânsal hafıza üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı, ancak dişi cinsiyette keşifçi davranışı arttırıcı, horizontal lokomotor aktiviteyi arttırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir (72). Bu veriler bizim çalışmamızla kısmen uyumludur. Çalışmamızda açık alan testinde dişi sıçanların erkek sıçanlara göre keşifçi davranışlarının daha fazla olduğu, ADI dozunda sentetik gıda boyasına maruziyetin dişi cinsiyette hem kendi kontrolüne hem de erkek grubuna göre keşifçi davranışı arttırmıştır. Doğu ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada aynı sentetik gıda boyası karışımı NOAEL dozunda gebelik boyunca uygulanmış ve 1 aylık yavrularda nörodavranışsal etkilerine bakılmıştır. Mekansal bellek üzerine bir etki saptanmazken, motivasyonun değerlendirildiği testte deney grubu dişi sıçanlarının deney erkek grubuna göre motivasyonunda anlamlı bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır (82). Zorlu yüzme testinde deney grubunun mobil süresi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir, bu veri bizim verilerimizle paralellik göstermektedir.

NMDAR konsantrasyonları açısından incelendiğinde NR1, NR2A reseptör konsantrasyonları açısından gruplar arasında bir fark saptanmamış ve bu reseptör konsantrasyonuna cinsiyet etkisi olmamıştır. NR2B reseptör konsantrasyonları erkeklerde gruplar arası anlamlı fark göstermezken dişilerde kontrol grubuna göre deney 2 grubunda %40 oranında bir azalma saptanmıştır.

NMDAR alt birimlerinin ekspresyonları reseptörün fonksiyonunu belirlemede önemlidir. Farklı düzeyde eksprese olmaları farklı etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Farklı klinik tablolarda farklı alt birimlerin ekspresyonu artmakta ya da azalmaktadır. Post-mortem insanların beyinlerinde yapılan bir çalışmada amiloid plağının birikim derecesiyle NR1, NR2A ve NR2B reseptörlerinin ekspresyonuna bakılmıştır. Alzheimer hastalığı nöropatolojisindeki artış ile NR1 ve NR2B ekspresyonlarında azalma görülürken, NR2A reseptör ekspresyonunun değermediği gözlenmiştir (eberz) Diğer bir çalışmada Alzheimer hastalarının beyinlerinde progresyon ile

beraber hem nöronal nACh reseptörlerinin hem de NMDA reseptörlerinin aşağı doğru düzenlendiği (down regulasyona uğradığı) görülmüştür (83). NMDA reseptörlerinin, özellikle de NR2B alt birimlerinin azalmasının, hafıza bozukluğuna katkıda bulunduğu düşünülmekte diğer taraftan NR2B alt biriminin artmış ekspresyonunun mekânsal öğrenme ve hafızayı arttırdığı görülmüştür (84). Bizim çalışmamızda dişi cinsiyette laktasyonda NOAEL dozunda gıda katkı maddesine maruz kalan sıçanlarda NR2B ekspresyonundaki anlamlı azalma ve aynı grupta hafıza testindeki olumsuz gelişme bu verilerle uyumludur.

NMDAR ekspresyonuna gıda katkı maddelerinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ceyhan ve arkadaşlarının Gebelik boyunca ADI dozunda uyguladığı sentetik gıda boyası karışımının sıçanların hipokampuslerinde bazı NMDA reseptörler alt tipleri ve asetilkolin reseptörler alt tipleri üzerine etkileri çalışılmıştır. NR2A ekspresyonunun değişmediği, ancak NR2B ekspresyonunun erkek sıçanlarda arttığı, dişi sıçanlarda ise azaldığı tespit edilmiştir (3). Bizim çalışmamızda ise ADI dozunda maruziyetin NR2A ve NR2B ekspresyonlarında anlamlı bir farka neden olmadığı ancak NOAEL dozunda maruziyetin NR2B ekspresyonunda dişi sıçanlarda anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. NR2A ekspresyonu benzer şekilde değişiklik göstermemiştir. Uygulama şekli ele alınacak olursa bizim çalışma grubumuzdaki sıçanlar sadece laktasyon döneminde maruziyet yaşamıştır ve ADI dozunun anne sütüne geçişi NOAEL dozuna göre oldukça az olacaktır. Diğer taraftan gebelik süresi 28 gün iken laktasyon süresi 21 gündür ve bu süre de bu farkı etkileyebilecek faktörlerden bir diğeridir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçta çalışmamızda uyguladığımız ADI ve NOAEL dozlarından NOAEL dozu dışı cinsiyette hipokampüse dayalı hafıza performansı ve NR2B reseptör ekspresyonu üzerine olumsuz etkiler ortaya koymuştur. Diğer taraftan aynı doz erkek cinsiyette yüzme hızı ve lokomotor aktivitede anlamlı artışa neden olmuştur.

Beyin gelişiminin en hızlı olduğu dönem yaşamın ilk birkaç yılıdır. Nörogenez ve hızlı bir sinaptogenezin olduğu bu dönem öğrenme, bellek ve nörodavranış üzerinde oldukça önemlidir. Tüm bu işlemler genetik yapı ve çevrenin etkisi ve etkileşimi ile gerçekleşir. Bu nedenle yaşamın yaklaşık ilk iki yılını kapsayan laktasyon döneminde annenin beslenmesi çocuğun beyin gelişiminde ve dolayısıyla nörodavranışı üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Laktasyon döneminde günlük alınan sentetik gıda boyası miktarının ADI dozunu aşp aşmadığı ya da ne kadar aştığını ve hangi tip boyaların bir arada alındığını belirlemek zordur. Bu nedenle endüstriyel ürünler ile alınmakta olan sentetik boya içeriği yüksek gıdaların öğrenme sürecinde olumsuz etkileri olabileceği akılda tutulmalıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuca kullandığımız boyalardan hangisinin ya da hangilerinin neden olduğunu bilmemekle beraber sentetik gıda boyalarının sinerjistik ya da antagonistik etki yapabileceğini belirlemek için her bir renk maddesinin hem ayrı ayrı hem de farklı kombinasyonlarının değerlendirildiği ileri çalışmalar planlanmalıdır.

ÖZET

Anne Sütüyle Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boyalarının Sıçanlarda Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkisi

Gıda boyaları gıdaların albenilerini artırmak veya üretimleri sırasında oluşan istenmeyen renk farklılıklarını gidermek amacıyla kullanılan gıda katkı maddeleridir.

Gebelik dönemi ve çocukluk döneminde sentetik gıda boyalarına maruziyetin öğrenme ve davranış üzerine etkileri ortaya konmuştur. Ancak literatür taramasında, bu maddelere laktasyon döneminde maruziyetin erişkin döneme etkilerini gösteren araştırmalara rastlanmamıştır.

NMDAR (N-metil- D-aspartat reseptörleri)'nin öğrenme ve hafızanın oluşma sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla, çalışmamızda laktasyon dönemi boyunca ADI ve NOAEL dozlarında maruz kalınan sentetik gıda renklendiricilerinin (Eritrosin, Ponceau 4R, Allura Red AC, Sunset Yellow FCF, Tartrazin, Amarant, Brilliant Blue, Azorubin, Indigotine) erişkin döneme geldiklerinde sıçanlarda NMDA reseptörü alt birimlerinden NR1, NR2A, NR2B ekspresyonu ve öğrenme deneyleriyle öğrenme ve davranış üzerine etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda 18 adet dişi gebe sıçan kontrol, ADI ve NOAEL grubu olmak üzere üç eşit gruba bölündü. Gıda boyası grubuna, emzirme dönemi boyunca (21 gün) 9 sentetik renklendirici karışım halinde ADI ve NOAEL dozlarında günlük olarak verildi. Ardından yavrular 3 aylık olunca her grupta 12 dişi 12 erkek olacak şekilde rastgele seçildi bir hafta boyunca öğrenme deneylerine tabi tutuldu. Test sonunda hipokampusleri çıkarılarak homojenatlarında NR1, NR2A ve NR2B reseptörleri çalışıldı. NR2A ve NR1 reseptör ekspresyonu açısından her iki cinsiyette de kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). NR2B ekspresyonunun deney grubu dişilerde kontrol dişiye göre anlamlı oranda azaldığı saptandı ve öğrenme deneylerinde de dişilerin hafıza deneylerinde performanslarının düştüğü tespit edildi. Bu veri reseptör ekspresyonundaki düşüşü destekler bir bulgudur.

Anne karnında gıda boyalarına maruziyet erişkin dönemde öğrenmede rol alan reseptörlerin bazılarının düzeylerini etkilemekte ve bu etki cinsiyete göre farklılık göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Sentetik gıda renklendiricileri, NMDA reseptör, Morris su labirenti



SUMMARY

Effects of Artificial Food Colorings Exposed via Breastfeeding on Learning and Neurobehavior in Rats

Food colorings are the additives used to increase the allure of foods or eliminate unwanted color variations that occur during production.

Exposure to food additives during the critical development period, which extends from the sixth month of gestation to several years after birth in human, has been implicated in the induction and severity of some childhood behavioral and development disorders and learning disabilities. However, the effects of synthetic food colors exposed via breastfeeding on learning and behavior in adult rats haven't been reported yet.

N-methyl- D-aspartate receptors (NMDARs) are thought to be effective in the learning and memory generating process. In this study, we aim to investigate the effects of exposure to synthetic food colors (Erythrosine, Ponceau 4R, Allura Red AC, Sunset Yellow FCF, Tartrazine, Amaranth, Brilliant Blue FCF, Azorubine and Indigotine) in ADI and NOAEL doses via breastfeeding on subunit concentration of NMDARs (NR1, NR2A and NR2B isoforms) in rats by Western-Blotting and on learning and neurobehaviour by learning trials in offspring when they became adults.

In our study, 18 female pregnant rat were divided into three groups as control, ADI and NOAEL groups. A mixture of 9 food colors was given daily to the food colour group during twenty-one day. When they became 3 month-old, 12 male and 12 female offspring were selected from the each group randomly. Selected rats were subjected to learning experiments for one week. At the end of learning experiments, hippocampus were removed, NR1, NR2A and NR2B receptors were studied in homogenates. There was no statistically significant difference in NR2A and NR1 receptor expression in both genders as compared to the control group ($p > 0.05$). NR2B expression was found to decrease significantly in the experimental group compared to the control group. Also in female experiment group memory

performance was significantly decreased which supports the findings in receptor expression.

The results indicate that exposure to synthetic food colors during reast feeding in offspring may lead to alterations of expression of nmdar su units which is related to learning process. these alterations differ according to gender.

Keywords: Artificial food colourings, NMDARs and Morris water maze



7. KAYNAKLAR

1. Akbulut M. Gıda Katkı Maddeleri, Fonksiyonları ve Kaynakları. 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi. 2011: 59-68.
2. Çalışır E, Çalışkan D. Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2003; 32 (3): 193-206.
3. Ceyhan BM, Gultekin F, Doguc DK, Kulac E. Effects of Maternally Exposed Coloring Food Additives on Receptor Expressions Related to Learning and Memory in Rats. Food and Chemical Toxicology. 2013; 56: 145-8.
4. Feingold BF. Hyperkinesis and Learning Disabilities Linked to The İngestion of Artificial Food Colors and Flavors. Journal of Learning Disabilities. 1976; 9 (9): 551-9.
5. Tanaka T. Reproductive and Neurobehavioural Toxicity Study of Tartrazine Administered to Mice in The Diet. Food and Chemical Toxicology. 2006; 44 (2): 179-87.
6. Tanaka T. Reproductive and Neurobehavioral Effects of Sunset Yellow FCF Administered to Mice in The Diet. Toxicology and Industrial Health. 1996; 12 (1): 69-79.
7. Tanaka T. Reproductive and Neurobehavioural Toxicity Study of Ponceau 4R Administered to Mice in The Diet. Food and Chemical Toxicology. 2006; 44 (10): 1651-8.
8. Tanaka T. Reproductive and Neurobehavioral Effects of Amaranth Administered to Mice in Drinking Water. Toxicology and Industrial Health. 1992; 9(6): 1027-35.
9. Tanaka T. Reproductive and Neurobehavioral Effects of Allura Red AC Administered to Mice in The Diet. Toxicology. 1994; 92 (1): 169-77.
10. Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M. Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing The Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. Science. 2004; 304(5673): 1021-4.
11. 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.
12. Altuğ T. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım, İzmir. 2001: 115-7.

13. Meth-Cohn O, Smith M. What did WH Perkin Actually Make When He Oxidised Aniline to Obtain Mauveine? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1994(1):5-7.
14. Saldamlı İ, Uygun Ü. Gıda Katkı Maddeleri. *Gıda Kimyası*. 1998. 20-50.
15. EFSA. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/foodsafetycooperationtr.pdf. [Erişim Tarihi 09.05.2017]
16. Furia TE. *CRC Handbook of Food Additives*: CRC Press; 1973. 13-5.
17. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Goster/42410>. [Erişim Tarihi 09.05.2017]
18. Rizvi SS, Benado A, Zollweg J, Daniels J. *Supercritical Fluid Extraction: Fundamental Principles and Modeling Methods*. Food Technology (USA). 1986.
19. Cakmakci S, Celik I. *Food Additives*. Ataturk University, Agric Fac Pub. 1995 (164).
20. Karaali A, Özçelik B. Gıda katkısı olarak doğal ve sentetik boyalar. *Gıda/The Journal of Food*. 1993; 18(6).
21. Yentür G, Ekşi A, Bayhan A. Ankara Piyasasından Sağlanan Pasta Süsleri ve Bazı Şekerlerde Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1996; 43: 479-84.
22. Yentür G, Yaman M, Bayhan A. Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması. *Gıda Dergisi*. 1998; 23(3).
23. Atlı B. *Gıda Boyaları*: Namık Kemal Üniversitesi; 2010.
24. Dinç M. *Gıdalara Katılan Bazı Suda Çözünen Sentetik Boyaların Belirlenmesi*: Namık Kemal Üniversitesi; 2007.
25. Hebb DO. The Role of Neurological Ideas in Psychology. *Journal of Personality*. 1951; 20(1): 54-5.
26. Banikowski AK, Mehring TA. Strategies to Enhance Memory Based on Brain Research. *Focus on Exceptional Children*. 1999; 32(2): 1.
27. Soylu H. *Fen Öğretiminde Yeni Yaklaşımlar: Keşif Yoluyla Öğrenme*: Nobel Yayın-Dağıtım; 2004.
28. Keleş E, Çepni S. Beyin ve Öğrenme. *Türk Fen Eğitimi Dergisi*. 2006; 3(2): 66-82.
29. Squire LR. *Memory Systems of The Brain: A Brief History and Current Perspective*. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2004; 82(3): 171-7.

30. Ziylan Y. Kontrol Sistemleri Sindirim ve Boşaltım Fizyolojisi. İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 2001.
31. Özten Ö. Öğrenme ve Hafızada Hücresel-Molekuler Mekanizmalar.
32. Nöroanatomi DF. Fonksiyonel Nöroloji. Adana: Okullar Pazarı Kitabevi. 1990: 58-9.
33. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2001; 21(5): 427-31.
34. Wojtowicz JM. Adult Neurogenesis. From Circuits to Models. Behavioural Brain Research. 2012; 227(2): 490-6.
35. Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern Separation in The Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. Science. 2008; 319(5870): 1640-2.
36. Becker S. A Computational Principle for Hippocampal Learning and Neurogenesis. Hippocampus. 2005; 15(6): 722-38.
37. Kaptan Z, Üzüm G. Erişkin Hipokampal Nöroenezin Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonlarındaki Rolü. Turkish Journal of Neurology/Türk Nöroloji Dergisi. 2016; 22(4).
38. Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, et al. Adult Neurogenesis Modulates The Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory. Cell. 2009; 139(4): 814-27.
39. Conn PJ, Pin J-P. Pharmacology and Functions of Metabotropic Glutamate Receptors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1997; 37(1): 205-37.
40. Sanacora G. Evidence for GABAergic and Glutamatergic Involvement in The Pathophysiology and Treatment of Depressive Disorders. Biological Psychiatry. 2002: 739-49.
41. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The Excitatory Amino Acid Receptors: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties in The Function of The Central Nervous System. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1989; 29(1): 365-402.
42. Pin J-P, Duvoisin R. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. Neuropharmacology. 1995; 34(1): 1-26.
43. Tural Ü, Önder E. Glutamerjik Sistem, N-Metil- D-Aspartik Asit Reseptörleri ve Depresyon. Klinik Psikiyatri. 2002;4:30-4.
44. Chaffey H, Chazot PL. NMDA Receptor Subtypes: Structure, Function and Therapeutics. Current Anaesthesia & Critical Care. 2008; 19(4): 183-201.

45. Moriyoshi K, Masu M. Molecular Cloning and Characterization of The Rat NMDA Receptor. *Nature*. 1991; 354(6348): 31.
46. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M. Molecular Characterization of The Family of the N-methyl-D-aspartate Receptor Subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(4): 2836-43.
47. 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): 301-10.
48. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor Trafficking and Targeting: Implications for Synaptic Transmission and Plasticity. *Trends in Neurosciences*. 2002; 25(11): 571-7.
49. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA Receptor Subunits: Diversity, Development and Disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 2001; 11(3): 327-35.
50. Atila S, Ateş Alagöz Z. NMDA Reseptör Antagonistlerinin Nöropatik Ağrıdaki Rollerini Ankara Ecz Fak De. 2010; 39(1): 51-68.
51. Haberny KA, Paule MG, Scallet AC, Sistare FD, Lester DS, Hanig JP. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor System and Susceptibility to Neurotoxicity. *Toxicological Sciences*. 2002; 68(1): 9-17.
52. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*: McGraw-hill New York; 2000.
53. Petrie RX, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate Receptor, Synaptic Plasticity, and Depressive Disorder: A Critical Review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 87(1): 11-25.
54. Tartrazine. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-458.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
55. Jones R, Ryan A, Wright S. The Metabolism and Excretion of Tartrazine in The Rat, Rabbit and Man. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1964; 2: 447-52.
56. Ryan A, Wright S. Biliary Excretion of Some Azo Dyes Related to Tartrazine. *Nature*. 1962; 195(4845): 1009.
57. Sunset Yellow. FCF. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph11/additive-450-m11.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
58. Radomski J, Mellinger T. The Absorption, Fate and Excretion in Rats of The Water-Soluble Azo Dyes, FD&C Red No. 2, FD&C Red No. 4, and FD&C Yellow No. 6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1962; 136(2): 259-66.

59. Kuno N, Mizutani T. Influence of Synthetic and Natural Food Dyes on Activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2005; 68(16): 1431-44.
60. Ponceau 4R. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph11/additive-329-m11.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
61. Phillips J, Bex C, Gaunt I. The Metabolic Disposition of ¹⁴C-labelled Ponceau 4R in The Rat, Mouse and Guinea-pig. *Food and Chemical Toxicology*. 1982; 20(5): 499-505.
62. Indigotine. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph10/additive-234-m10.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
63. Azorubine. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-050.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
64. Erythrosine. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-174.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
65. Allura Red AC. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-011.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
66. Amaranth. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-018.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
67. Brilliant Blue Fcf. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/additive-059-m1.pdf>. [Erişim Tarihi 14.07.2017].
68. Morris R. Developments of A Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in The Rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1984; 11(1): 47-60.
69. 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): 762-70.
70. Brotto LA, Barr AM, Gorzalka BB. Sex Differences in Forced-swim and Open-field Test Behaviours After Chronic Administration of Melatonin. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 402(1): 87-93.
71. 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): 345-63.
72. Doguc DK, Ceyhan BM, Ozturk M, Gultekin F. Effects of Maternally Exposed Colouring Food Additives on Cognitive Performance in Rats. *Toxicology and Industrial Health*. 2013; 29(7): 616-23.

73. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
74. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1): 265-75.
75. Connors CK, Goyette CH, Southwick DA, Lees JM, Andrulonis PA. Food Additives and Hyperkinesis: A Controlled Double-Blind Experiment. *Pediatrics*. 1976; 58(2): 154-66.
76. Rose TL. The Functional Relationship Between Artificial Food Colors and Hyperactivity. *Journal of Applied Behavior Analysis*. 1978; 11(4): 439-46.
77. Ward NI. Assessment of Chemical Factors in Relation to Child Hyperactivity. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. 1997; 7(4): 333-42.
78. Bateman B, Warner JO, Hutchinson E, Dean T, Rowlandson P, Gant C. The Effects of a Double Blind, Placebo Controlled, Artificial Food Colourings and Benzoate Preservative Challenge on Hyperactivity in a General Population Sample of Preschool Children. *Archives of Disease in Childhood*. 2004; 89(6): 506-11.
79. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K. Food Additives and Hyperactive Behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old Children in The Community: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *The Lancet*. 2007; 370(9598): 1560-7.
80. Mattes JA, Gittelman R. Effects of Artificial Food Colorings in Children with Hyperactive Symptoms: A Critical Review and Results of A Controlled Study. *Archives of General Psychiatry*. 1981; 38(6): 714-8.
81. Mattes JA. The Feingold Diet: A Current Reappraisal. *Journal of Learning Disabilities*. 1983; 16(6): 319-23.
82. Kumbul Doguc D, Aylak F, Ilhan I, Kulac E, Gultekin F. Are There Any Remarkable Effects of Prenatal Exposure to Food Colourings on Neurobehaviour and Learning Process in Rat Offspring? *Nutritional Neuroscience*. 2015; 18(1): 12-21.
83. Narahashi T, Marszalec W, Moriguchi S, Yeh JZ, Zhao X. Unique Mechanism of Action of Alzheimer's Drugs on Brain Nicotinic Acetylcholine Receptors and NMDA Receptors. *Life Sciences*. 2003; 74(2): 281-91.
84. Mesches MH, Gemma C, Veng LM, Allgeier C, Young DA, Browning MD. Sulindac Improves Memory and Increases NMDA Receptor Subunits in Aged Fischer 344 rats. *Neurobiology of Aging*. 2004; 25(3): 315-24.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı:	Seden	Soyadı:	SERT ZAYIF
Doğum Yeri:	Kayseri	Doğum Tarihi:	10.07.1984
Uyruğu:	TC	Tel:	05309217662
Email:	sedensert20@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi	2008
Lise	Küçükçalık Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görev	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Pratisyen Hekim	Kitreli Sağlık Ocağı	2008-2010
Pratisyen Hekim	Uluborlu Toplum Sağlığı Merkezi	2010-2013

Yabancı Dil	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	63,75	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

Seden SERT ZAYIF

İmza

Danışman

Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

İmza





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

SAYI : 21438139 - 08
KONU: Etik Kurul Kararı

07/01/2016

SAYIN
Yrd. Doç. Dr. Betül MERMİ CEYHAN
(SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.)

"Anne Sütüyle Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boyalarının Sıçanlarda Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkisi" konulu projeniz Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 07 OCAK 2016 tarih ve 07 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

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

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
07.01.2016	01	07

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07 OCAK 2016 tarihinde Saat 09:30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Betül MERMİ CEYHAN'ın yürütücüsü olduğu Arş. Gör. Seden SERT ZAYIF'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Anne Sütüyle Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boyalarının Sıçanlarda Öğrenme ve Nörodavranış Üzerine Etkisi" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan	Dişi	18 Gebe (Doğacak olan 72 Erkek 72 Dişi Yavru)	10-14 hafta / 250-350 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
		
Prof. 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
		