

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DOĞUM ÖNCESİ MARUZ KALINAN SENTETİK GIDA
BOYALARININ ÖĞRENMEDE ROL ALAN
RESEPTÖRLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Betül MERMİ CEYHAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN

ISPARTA 2010

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DOĞUM ÖNCESİ MARUZ KALINAN SENTETİK GIDA
BOYALARININ ÖĞRENMEDE ROL ALAN
RESEPTÖRLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Betül MERMİ CEYHAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 1860-TU-09 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ISPARTA 2010

TEŞEKKÜR

Gerek uzmanlık tezimin hazırlanmasında gerekse eğitimim süresince, bilgi ve önerileri ile katkıda bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bizlerin de önemli tecrübeler edinmesini sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. İrfan ALTUNTAŞ, Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ, Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN, Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Esin KULAÇ'a ve Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER'e, laboratuarda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Betül MERMİ CEYHAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i1
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ixx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	4
2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihçesi.....	4
2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı.....	4
2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları.....	5
2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinde Aranan Nitelikler ve Kullanımlarındaki Temel İlkeler	6
2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar ve Yasal Düzenlemeler.....	7
2.1.6. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirme.....	10
2.1.7. Gıda Katkı Maddelerinin Risk Yarar Dengesi.....	12
2.1.8. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması.....	15
2.2. Gıda Boyaları.....	17
2.2.1. Gıda Boyalarının Sınıflandırılması.....	18
2.2.1.1. Doğal Boyalar.....	18
2.2.1.2. Yapay Boyalar.....	20
2.2.2. Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Renklendiriciler ve Özellikleri.....	20
2.2.3. Sentetik Gıda Boyalarının Endüstriyel Kullanım Alanları.....	22
2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sistemler Üzerine Etkileri.....	23
2.4. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları.....	24
2.5. Glutamat Reseptörleri.....	24
2.5.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri.....	26
2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri.....	30
2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı.....	31

2.6. Asetilkolin Reseptörleri (AChR).....	31
2.6.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR).....	32
2.6.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerin Alt Birimleri.....	35
2.6.3. Nöronal Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri	36
3. MATERYAL ve METOT	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Deney Hayvanları	38
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	39
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler.....	41
3.2. Metot.....	43
3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	43
3.2.2. SDS-PAGE Yöntemi	43
3.2.3. Western Blot Yöntemi	44
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	45
5. BULGULAR	46
5.1. Western Blot Analizi ile NR2A, NR2B, nACh $\alpha 7$ ve nACh $\alpha 4\beta 2$ Reseptör Düzeyi ...	46
6. TARTIŞMA.....	53
ÖZET	59
SUMMARY	60
KAYNAKLAR.....	61

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
ACPD	: <i>trans</i> -(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit
ADI	: Acceptable Daily Intake- Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat
CAC	: Codex Alimentarius Commission-Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
CCFAC	: Codex Committee on Food Additives and Contaminants- Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi
DEHB	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
EPSP	: Eksitator Postsinaptik Potansiyel
FDA	: Food and Drug Administration- Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi
FAO	: Food and Agriculture Organization- Gıda Tarım Teşkilatı
GF	: Güvenlik Faktörü
GRAS	: Generally Recognize as Safe
INS	: International Numbering System- Uluslararası Numaralama Sistemi
iGluR	: İyonotropik Glutamat Reseptörü
JECFA	: Joint Expert Committee on Food Additives- Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi
JMPR	: The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues
LTD	: Long Term Depression
LTP	: Long Term Potentiation
mACh	: Muskarinik ACh
MPI	: Maximal Permissible Intake Per Day- Günlük Alınmasına İzin Verilen Madde Miktarı
MPL	: Maximum Permissible Level in the Food- Gıdada Bulunmasına İzin Verilen En Yüksek Düzey

nACh	: Nikotirik Asetilkolin
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NOAEL	: No Observed Advers Effect Level- Gözlenebilir Kötü Bir Etki Oluşturmayan Düzey
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
SCF	: EU-Scientific Committe on Food- Avrupa Birliğine Bağlı Gıda Kontrol Komitesi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TEMED	: N, N, N ¹ , N ¹ - Tetrametilen-diamin
TGKY	:Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
TMRI	:Therotical Maximum Residue Intake- Teorik Maksimum Kalıntı Miktarı
TTBS	:Tris-Tween-Buffer Saline
WHO	: World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bir Kimyasalın Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılmasına İzin Verilinceye Kadar Geçirdiği Aşamalar.....	14
Şekil 2. NR2A'ya Ait Western Blot Örneği.....	48
Şekil 3. NR2B'ye Ait Western Blot Örneği	49
Şekil 4. nAChR $\alpha 7$ 'ye Ait Western Blot Örneği.....	50
Şekil 5. nAChR $\alpha 4$ 'e Ait Western Blot Örneği	51
Şekil 6. nAChR $\beta 2$ 'ye Ait Western Blot Örneği.....	52

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	16
Tablo 1(devam). Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	17
Tablo 2. Gıda Boyalarının Uluslar Arası Numaralandırılması.....	19
Tablo 3: Western Blot Analizi ile NR2A, NR2B, nAChR $\alpha 7$ ve nAChR $\alpha 4\beta 2$ Reseptör Yoğunluklarının Ortalama ve Standart Sapmaları.....	46

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. NR2A'ya Ait Optik Dansite Sonuçları.....	48
Grafik 2. NR2B'ye Ait Optik Dansite Sonuçları.....	49
Grafik 3. nAChR $\alpha 7$ 'ye Ait Optik Dansite Sonuçları.....	50
Grafik 4. nAChR $\alpha 4$ 'e Ait Optik Dansite Sonuçları.....	51
Grafik 5. nAChR $\beta 2$ 'ye Ait Optik Dansite Sonuçları.....	52

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında yaşanan bilimsel ve teknolojik gelişmeler ile bu gelişmelerin zorunlu kıldığı toplumsal yaşam koşullarının değişimi, insanların beslenme şekillerini ve tercih ettikleri gıda tiplerini eskisinden oldukça farklı hale getirmiştir. Teknolojik işlemlerden geçmiş hazır yiyeceklerin günlük kullanımda artan bir yer tutmasıyla birlikte, bu tür gıda maddeleri ve ürünlere katkı maddeleri eklemek kaçınılmaz hale gelmiştir. Doğumdan ölüme kadar maruz kalınan bu maddelerin, insanlarda uzun süreli tüketime bağlı olarak oluşturabileceği yan etkiler oldukça önem kazanmıştır. Günlük tüketilen bu katkı maddelerinin miktarları tam olarak tespit edilemediğinden maruz kalınan gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerinde uzun dönemde oluşturacağı istenmeyen etkiler de henüz tam olarak bilinmemektedir (1-3).

Dr. Benjamin F. Feingold 1976 ve 1977 yıllarında yaptığı çalışmalarda gıdalardaki bazı küçük moleküllü maddelerin duyarlı çocuklarda hiperaktivite ve bazı nöropsikolojik bozukluklara yol açtığını iddia etmiştir (4,5). Sonraki yıllarda Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) ile katkı maddeleri arasında da ilişki kurulmaya çalışılmış ve bu konu ile ilgili pek çok çalışmada çelişkili raporlar elde edilmiştir (6-10).

1976 yılında Connors ve ark. 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 (7). Connors bir diğer çalışmasında yaşları 4-11 arasında değişen 16 hiperaktif çocuğa gıda boyalarından arındırılmış Feingold diyeti vermiş ve çocukların ebeveyn değerlendirmesine göre % 57'sinde, öğretmen değerlendirmesine göre ise % 34'ünde hiperaktif belirtilerde azalma gözlemlenmiştir. Diyete gıda boyası eklenmesini takiben sadece 3 çocukta gıda boyası alımından 1 saat sonra oluşan görsel-motor dikkat performansında azalma tespit etmiştir (8).

1978 yılında Harley ve ark. Feingold hipotezinin aksine gıda katkı maddelerinin davranış üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığını rapor etmişler, ancak daha sonraki çalışmalarında bu hipotezlerini destekleyememişlerdir (9,10).

Spring ve ark. Feingold hipotezini test etmek amacı ile 6 hiperaktif çocuğa önce katkı maddelerinden arındırılmış diyet uygulamışlar ve bütün ebeveynler bu diyetin etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Fakat diyete katkı maddesi eklenmesi ile sadece 1 çocukta hiperaktif belirtilerde artma gözlemlenmiştir. Yazarlar bu verileri Feingold'un hipotezini desteklemesi açısından yetersiz olduğunu iddia etmişlerdir (11).

DEHB çocukluk çağının en sık rastlanan psikiyatrik bozukluklarından biri olup, okul dönemindeki çocukların yaklaşık olarak %3-10'unu etkilemekte ve erkek çocuklarda daha sık görülmektedir. DEHB, sıklıkla 3 yaşından sonra dikkat dağınıklığı, aşırı hareketlilik, dürtüsellik, engellemelere karşı tahammülsüzlük, ters mizaçlılık, saldırganlık, uyum güçlüğü, duygu oynaklığı, fevri davranış gibi bulgular ile kendini belli etmeye başlar. Okulun ilk senelerinde ise öğrenme kabiliyetinde yetersizlik, algılama sorunları ve okul başarısızlıkları gibi bulgular öne çıkar (12-14).

Öğrenme ve hafızada hipokampüsteki sinaptik plastisitenin bir türü olan Long Term Potentiation (LTP)'nin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin indüksiyonu bir dizi olayı içermektedir. Bu olaylar dizisinde N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri ve Nikotinik Asetilkolin (nACh) reseptörleri önemli rol almaktadır. Hipokampüste yaygın olarak bulunan, NMDA reseptörleri ve nACh reseptörleri hipokampüse bağımlı mekânsal ve mekânsal olmayan hafızaların oluşmasında rol oynayarak öğrenme, hafıza ve kavrama fonksiyonundan sorumlu tutulmaktadır (15).

Bilgilerimize göre; şimdiye kadar yapılan çalışmalarda gıda katkı maddeleri ile DEHB bulguları arasında klinik düzeyde bir ilişki gösterilmiş olsa da; sentetik gıda boyalarının direkt olarak öğrenme üzerine olan etkilerinin moleküler düzeyde araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada her ne kadar katkı maddelerinin öğrenme veya DEHB gibi konularla klinik ilişkisi araştırılmadıysa da, bu durumlarla moleküler düzeyde ilişkili olabilen reseptör düzeyleri araştırılmıştır. Katkı maddeleri-öğrenme ilişkisinin objektif veriler ile ortaya konması hem bu konuda çalışan araştırmacılara, hem de

duyarlı tüketicilerin endişelerini gidermede bilimsel katkı sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda doğum öncesi anne karnında maruz kalınan sentetik gıda renklendiricilerinin, erişkin hale geldiği zaman öğrenmede rol oynayan NMDA reseptörlerinden NR2A ve NR2B ile nACh reseptörlerinden $\alpha7$, $\alpha4$ ve $\beta2$ alt birimleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

2.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihçesi

Gıdalara eklenen katkı maddelerinin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir ve tarihsel geçmiş incelendiğinde tuz ve odun tütsüsünün bilinen en eski katkı maddeleri olduğu görülmektedir. M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini saklamada tuzdan yararlanılmış, M.Ö. 900 yıllarında hem tuz, hem de odun tütsüsü gıda saklama yöntemleri olarak kullanılmıştır. Ortaçağda tuz ve odun tütsüsünün yanı sıra, etlere nitrat konularak hem botilizm önlenmeye çalışılmış, hem de etin renginin daha sağlıklı görüldüğü fark edilmiştir (16,17). Milattan önce 50 yılında Eski Romalılar tarafından sağlanan baharatların İngiltere’de “aroma verici” olarak kullanıldığı bilinmektedir. Gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık olarak 3500 yıl kadar önce eski Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmış ve “khand” adı verilen boyanmış şeker, ilk kez Büyük İskender’e Hindistan’dan Avrupa’ya döndüğünde hediye olarak sunulmuştur. Yakın tarihimizde ise ilk olarak 1856 yılında “anilin moru” adlı renk maddesinin sentezi ile yapay boya maddelerinin üretimi başlamıştır (18). İzleyen yıllarda, 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. Bu tarihten itibaren endüstriyel ilerlemelere paralel olarak gelişen teknolojinin getirdiği üretim teknikleri ve tüketici beğenisinin çeşitlilik kazanması sonucunda gıda katkı maddelerinin besin endüstrisinde kullanılmasında hızlı bir artış olmuştur (19)

2.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı

Gıda katkı maddeleri; hammadde hazırlık, imalat, paketlenme ve depolama gibi işlemler sırasında gıdaların bazı özelliklerini düzeltmek, iyileştirmek, biyolojik ve

besleyici değeri korumak veya düzeltmek, bunun yanı sıra gıdada meydana gelebilecek istenilmeyen değişiklikleri engellemek, ürünün kalite ve raf ömrünü artırmak amacı ile bilinçli olarak kullanılan doğal ve yapay kaynaklı madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (18).

Gıda katkı maddeleri kavramı tesadüfen oluşmuş metal bulaşımalarını hiçbir zaman içermez. 1997 tarihli Resmi gazetede yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY)'nde ise "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu, kendisi ya da yan ürünleri, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olan maddeler" olarak tanımlanmıştır (20). Daha basit bir tanımla ise; doğal olarak besinlerin bileşiminde bulunan veya besinlerden çeşitli yöntemlerle saf olarak elde edilen veya kimyasal olarak yapıldıktan sonra, çeşitli amaçlar için besinlere katılan öğelere denilmektedir (16,18).

Bütün bu tanımlamalardan anlaşılacağı üzere gıdaların yapısına giren her türlü maddeye gıda katkı maddesi gözüyle bakmak yanlıştır. Gıda katkı maddeleri yasaların ön gördüğü sınırlarda ve teknolojinin gerektirdiği ölçüde kullanmak zorunda olduğumuz maddelerdir. Etkileri spesifik ve çok amaçlı olabilmektedir (19).

2.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçları aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir:

- *Gıdanın besleyici değerinin korunması, kayıpların azaltılması ve raf ömrünün uzatılması:* Ekmeğin küflenmesini önlemede kalsiyum propiyonat, kür edilmiş et ürünlerinde botilizmi engellemede nitrat ve nitrit, yağların acılaşmasına karşı butillendirilmiş hidroksianisol gibi maddelerin kullanımı, bu amaca örnek olarak verilebilir.

- *Gıdaların duysal özelliklerinin düzeltilmesi ve geliştirilmesi:* Bu amaçla kullanılan katkı maddelerine örnek olarak emülgatörler, renklendiriciler, lezzet vericiler, lezzet arttırıcılar, tatlandırıcılar, hacim arttırıcılar verilebilmektedir.

- *Gıda kalite karakteristiklerinin muhafaza edilmesi:* Salata soslarında yağ ayrılmasını önleme amacıyla katılan emülgatörler veya unlu mamullerde kullanılan kabartma ajanları bu amaçla kullanılan katkı maddeleridir.

- *Gıda hazırlamaya yardımcı olmak:* Hazır pudinglerin elde edilmesinde fosfatlı katkı maddelerinden yararlanılması örnek verilebilir.

- *Besleyici değerin korunması:* Gıdalarda C vitamini gibi kolay bozulan besleyici özellikteki maddeleri korumak amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır.

- *Gıdada hastalık yapıcı mikroorganizmaların gelişmelerinin önlenmesi:* Ham karanfil, kuru erik, yoğurt gibi bazı gıdalarda doğal olarak bulunan benzoik asit genellikle sodyum tuzu formunda, gıdalarda antimikrobiyal koruyucu olarak uzun süredir kullanılmaktadır.

- *Özgün diyet ihtiyaçları olanlar için özel bir gıda üretim imkânının sağlanması*
- *Gıda çeşitliliğinin sağlanması (16,21,22).*

2.1.4. Gıda Katkı Maddelerinde Aranılan Nitelikler Ve Kullanımlarındaki Temel İlkeler

Gıda katkı maddelerinin; gıda satışını kolaylaştırmak maksadı ile kötü kalitede veya bozulmuş gıdayı maskeleyen veya hatalı ürün elde etme tekniğini gizleme, taklit gıda yapımı ve tüketiciyi aldatma, ürünün besleyici değerini azaltma ve istenilen etkiyi oluşturacak teknik miktardan fazla miktarlarda kullanma gibi amaçlar ile gıdaya katılmaları yasal olmayan uygulama biçimleridir. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin ticari amaçlı kullanılabilmesi için bazı nitelikleri ve temel ilkeleri taşıması gerekmektedir (16,18). Bu ilkeler ve temel nitelikler aşağıdaki şekilde özetlenebilmektedir:

- Gıda katkı maddeleri hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın, her şeyden önce tüketici açısından zararsız olduğunun bilinmesi, kullanılma miktarının yasalarla belirtilmiş ve onaylanmış olması gerekir.

- Halen kullanılmakta olan ve kullanılması önerilen tüm gıda katkı maddelerine toksikolojik değerlendirme uygulanmalıdır. Sadece Gıda Katkıları Ortak

Uzmanlar Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA) tarafından elde edilen veriler doğrultusunda önerilen düzeylerde kullanıldıklarında tüketici sağlığına zarar vermeyecekleri belirlenen katkı maddelerinin kullanımına izin verilmelidir.

- Bir gıda katkı maddesinin tavsiye listesinde veya gıda standardında yer alabilmesi için, söz konusu katkı için belirlenen kabul edilebilir günlük alım miktarı (Acceptable Daily Intake- ADI) veya buna benzer eşdeğer değerlendirme ile birlikte tüm kaynaklardan günlük olarak vücuda alımı mümkün olan miktarının da dikkate alınması gerekmektedir.

- Gıda katkı maddesinin özel tüketici grupları tarafından tüketilmesi söz konusu olduğunda, günlük olarak tahmini tüketme miktarı göz önünde bulundurulmalıdır.

- Gıda katkı maddeleri istenilen etkiyi oluşturacak en düşük miktarlarda kullanılmalıdır.

- Gıda katkı maddelerine ait pozitif listeler uluslararası gıda mevzuatında yer almasının yanı sıra ulusal mevzuatlarda da kabul edilmiş olmalıdır.

- Bu ürünler gıda maddesinin görünüşünü, kalitesini ve doğal besleyici değerini düşürmemelidir.

- Yeterli ve ilgili kurumlarca saptanmış bütün teknik özellikleri yapısında taşınmalıdır.

- İmalatçı tarafından rahatlıkla satın alınabilmeleri için de ekonomik olmalıdır.

- İçine konulduğu gıda maddesinin içinde homojen olarak dağılabilmelidir (16,18,21,23).

2.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar ve Yasal Düzenlemeler

Gıda sanayinin hızla ilerlemesi nedeni ile katkı maddelerinin kullanımındaki artış, bu konuda yasal düzenlemelerin gerçekleştirilmesini gerektirmiştir. Tarihsel süreç içerisinde gıda katkı maddeleri her zaman yararlı amaçlar için kullanılmamıştır. Pek çok eski kaynakta un, çay, şarap ve biranın yaygın biçimde hile ile tağış

(bozulma ve kötü kalitenin maskelenmesi veya ürünün ağırlığının arttırılması) edildiği durumlar belirtilmektedir. Bu nedenle söz konusu dönemlerde de gıda katkı maddelerinin zararlı veya ucuz dolgu maddeleri olarak kullanılmalarını önlemek amacıyla yasalar çıkarılmıştır. Gıda mevzuatının yer aldığı ilk bulgu, Anadolu’da Hitit devrine ait bir sütunda yer almaktadır. Bundan yaklaşık 3500 yıl öncesine ait olan bu sütunda, “Komşunun etini zehirlenme ve komşunu aldatma” yazmaktadır (24).

Katkı maddelerinin sistematik bir şekilde ele alınması ilk olarak 1956’da WHO ve Gıda Tarım Teşkilatı (Food and Agriculture Organization-FAO) tarafından 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 200’e yakın kimyasal maddenin gıda maddelerinde kullanımda olduğu tespit edilmiştir (25).

Sonraki yıllarda gıda katkı maddelerinin güvenli kullanımı için oluşturulan uluslararası kuruluşların önde gelenleri ve bu kuruluşların görevleri aşağıdadır:

1. CAC (Codex Alimentarius Commission- Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu): WHO ve FAO’nun gıda sanayisine rehberlik etmek ve tüketici sağlığını korumak amacıyla 1963 yılında müştereken oluşturduğu Gıda Standartları Programını yürütmek üzere kurdukları Birleşmiş Milletlere bağlı uluslararası bir kuruluştur. Bu komitenin amacı, kaliteli ve güvenli ürünlerin üretilmesi ve tüketicilere sunulmasının sağlanması yanında dünya gıda ticaretinde yer alan gıda maddelerinin kalite ve hijyen kriterlerinin belirlenmesi, teknoloji ve sağlık açısından standardize edilmesidir.

2. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants- Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi): CAC’ın bünyesinde oluşturulan bu komite, katkı maddelerini ilgilendiren tüm konularda öneri ve tavsiyeler veren bir kuruluştur. Bu kuruluşun sorumlulukları:

- Gıda katkıları ile ilgili sınırlamalar getirmek ve bu maddelerin gıdalarda bulunmasına izin verilebilecek maksimum miktarlarını belirlemek,
- JECFA tarafından toksikolojik değerlendirmeleri yapılacak olan katkı maddelerinin listelerini hazırlamak,
- Gıda katkı maddeleri ile ilgili tanı ve saflık kriterlerini belirlemek,
- Gıdalarda katkı maddelerinin analizleri ile ilgili yöntemleri geliştirmek olarak özetlenebilmektedir.

3. JECFA: Birleşmiş Milletlere bağlı FAO/WHO bünyesinde müştereken kurulan ve CCFAC'ın bir alt komitesi olan JECFA, gıda katkıları konusunda uzmanlık düzeyinde bilgiye sahip kişilerden oluşmaktadır. Bu komite gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan güvenilirliği ile ilgili çalışmalar ve değerlendirmeler yapmaktadır. Genetik ve farmokokinetik çalışmalar ile mutajenik, teratojenik ve kanserojenik araştırmalar da yürütmektedir. Ayrıca bu kurum gıda katkı maddelerinin kimyasal özelliklerini belirlemekte ve ADI değerlerini tespit etmektedir. JECFA'nın raporları CCFAC tarafından değerlendirilerek her gıda ürün grubunda kullanılabilir katkılar ve üst limitleri belirlenmekte ve ilgili Kodeks dokümanına dâhil edilmektedir.

4. JMPR (The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues): Bu kuruluş gıda ürünlerindeki böcek ilacı kalıntılarını değerlendiren ve gıdalarda günlük alımda insan sağlığına zarar vermeyecek maksimum pestisit miktarlarını belirleyen bir kuruluştur.

5. SCF (EU-Scientific Committee on Food- Avrupa Birliğine Bağlı Gıda Kontrol Komitesi): Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme konularında yetkili olan komitesidir.

6. FDA (Food and Drug Administration- Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi): Yukarıda bahsedilen kuruluşlar arasında en eski tarihe sahip olan kuruluştur. ABD'nin ulusal kuruluşu olsa da tüm dünyada referans olarak gösterilen bir kurumdur (16,17,23,25).

WHO'nun tüm dünya ülkeleri tarafından benimsenen ve imzalanan anlaşmaları gereği olarak, her ülke kendi ulusal mevzuatını hazırlarken CAC'ın dokümanlarını referans almak durumundadır. Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen katkı maddelerine bir "E" kodu verilmektedir. "E" harfi Avrupa Birliği'ni temsil etmektedir. "E" sistemi, üye ülkeler içinde bu katkıların güvenilir kabul edildiğini göstermekte olup, Amerika'daki GRAS (Generally Recognize as Safe) listesinin Avrupa'daki karşılığıdır. E numarası alan katkı maddelerinin sayısı sürekli değişmektedir. Halen kullanılmakta iken zararları ortaya çıkmış olanlar iptal edilirken yeni katkı maddeleri de ilave edilebilmektedir. Bir maddenin "E" numarasına sahip olması direkt olarak zararlı veya zararsız olduğu hakkında bilgi vermez. Ancak "E" numarası olmayanlara göre bir olumlu özellik olarak

değerlendirilebilir. E listesinden ayrı olarak CCFAC, başka bir numaralama sistemi geliştirmiştir. Uluslararası Numaralama Sistemi (International Numbering System - INS) adı verilen bu sıralama E listeleri esas alınarak hazırlanmıştır. INS, E listesinden daha geniş kapsamlıdır (16,18).

Ülkemizde katkı maddeleri ile ilgili olarak ilk kez 1983 yılında Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı tarafından bir yönetmelik çıkarılmış ve 1984'te buna ek bir yönetmelik yürürlüğe girmiştir. 1990 yılında yine sağlık bakanlığı bu konu ile ilgili olarak yeni bir yönetmelik çıkarmış ve bunu takip eden yıllarda bu yönetmeliğe ekler getirilmiştir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca hazırlanmış olan ve 16 Kasım 1997 tarihinde yayınlanan Resmi Gazete ile yürürlüğe giren TGKY ile katkı maddelerinin kullanımları konusunda yeni düzenlemeler getirilmiştir. Söz konusu kodekste gıda katkı maddeleri tanımlanmış ve bu maddelerin E kodları, adları, kullanılabilecekleri gıda grupları ve izin verilen maksimum miktarları listeler halinde açıklanmıştır (16,20).

Dünyadaki gelişmelere paralel olarak Türkiye'de de gıda güvenliği zamanla çok daha önem kazanmış 27.05.2004 tarihinde 5179 sayılı "Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanun" kabul edilmiş ve gıda güvenliğinin temini bu kanunun doğrudan amacı olmuştur. Bu kanun çerçevesinde bir dizi yönetmelik ve tebliğler yayınlanmıştır (26).

2.1.6. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenilirliği ve Toksikolojik Değerlendirme

Gıda katkı maddeleri ilaçlar gibi vücuda dışarıdan alınarak metabolize edilen maddeler olarak kabul edilmektedir ve tavsiye edilen dozlardan daha yüksek miktarda kullanıldıklarında toksik etki oluşturmaları söz konusu olabilmektedir. Gerek katkı maddeleri kullanımında, gerekse genel anlamda gıda tüketiminde toksikoloji biliminin öncülerinden Paracelcus' un (1493-1541) "Her madde toksindir, ancak toksin ile ilacı birbirinden ayıran dozudur" sözü gıda katkı maddesinin güvenilirliğinin temelini oluşturmaktadır (27).

Gıda maddelerinde herhangi bir nedenle yer alan ve son üründe varlığı saptanan bir kimyasal bileşiğin sağlık açısından güvenilirliği konusuna, temelde deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen toksikolojik bazı testler ile karar verilmektedir.

Toksikolojik çalışmalarda aşağıda verilen parametreler değerlendirilmektedir:

1. Maddenin biyokimyasal özellikleri (Emilimi, dağılımı ve atılımı, biyotransformasyonu ve enzimler üzerine etkileri)

2. Deney hayvanları üzerindeki toksikolojik etkiler

Aşağıda belirtilen testler doğrultusunda mutajenik, karsinojenik, teratojenik immünotoksik, nörotoksik ve üreme fonksiyonları üzerine olan toksik etkiler ortaya konmaktadır.

- **Akut toksisite testi:** En az üç doz ve tek seferde uygulanan ve 1, 2, 24, 48, 72 ve 96 saat gibi kısa süreler içinde uygulanan testlerdir.

- **Subakut toksisite testi:** Kimyasal madde deney hayvanlarına her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde verilir. Test süresi 1-3 haftadır.

- **Subkronik toksisite testi:** Sıçan ve köpek gibi deney hayvanlarının seçildiği bu testte deney süresi 3 aydır.

- **Kronik toksisite testi:** Deneyde kullanılan hayvanın tüm ömrünce maruz kaldığı kimyasal maddenin yol açtığı toksik etkilerin değerlendirildiği testlerdir. Bu süre sıçanlarda yaklaşık 2 yıl, köpeklerde ise 5-7 yıl kadardır (18,25).

Ayrıca toksikolojik değerlendirmeler kapsamında maddenin alerji veya tolerans yetersizliği gibi etkilerini araştırmak üzere insanlar üzerinde de çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir (16,18, 25).

Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen toksikolojik testlerin genel hedefi, NOAEL (No Observed Advers Effect Level- Gözlenebilir kötü bir etki oluşturmeyen düzey) değerini belirlemektir. NOAEL, deney hayvanlarında ters bir etki oluşturmeyen, kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına düşen maksimum mg madde miktarıdır. Diğer bir ifade ile diyetle çeşitli konsantrasyonlarda yer alan bir maddenin, daha yüksek dozlarda gösterdiği olumsuz (toksik) etkiye neden olmayacak minimum dozu olarak açıklanmaktadır. Deneysel toksikolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen NOAEL dozu, insana yönelik olarak

hesaplanırken, “güvenlik faktör”lerine (GF) bölünmektedir. İnsan gıdalarında katkı olarak kullanılması planlanan bir maddenin hayvan deneyleri sonucunda elde edilen NOAEL değeri, 100 olarak kabul edilen GF’ye bölünerek, söz konusu maddenin günlük alınabileceği miktar yani ADI değeri hesaplanmaktadır. ADI değeri yetişkin bir insanın kilogram cinsinden vücut ağırlığı başına bir ömür boyunca hiçbir zararlı etki görmeden tüketebileceği bir katkı maddesinin miligram cinsinden değeridir (16,18).

$$\text{ADI (mg/kg insan vücut ağırlığı)} = \text{NOAEL (mg/kg hayvan vücut ağırlığı)}/\text{GF.}$$

Gıda toksikolojisi ile ilgili diğer iki parametre MPI (Maximal Permissible Intake Per Day- Günlük alınmasına izin verilen madde miktarı) ve MPL (Maximum Permissible Level in the Food- Gıdada bulunmasına izin verilen en yüksek düzey) değerleridir. Bu değerler, ADI, gıda faktörü ve 60 kg olarak kabul edilen yetişkin vücut ağırlığı dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Gıda faktörü bir gıda maddesinin günlük diyetinde kabul edilen ortalama alım miktarıdır (18).

$$\text{MPI (mg/gün)} = \text{ADI} \times 60$$

$$\text{MPL (mg/kg)} = \text{MPI} / \text{gıda faktörü}$$

Bir günlük diyetinde, söz konusu gıda katkı maddesini içeren et, sebze, meyve ve içecekler gibi fazla sayıda gıda çeşidi yer alıyorsa, diyeti oluşturan her çeşidin tüketimdeki katkısının dikkate alınması gerekmektedir. Bu durumda ise TMRI (Theoretical Maximum Residue Intake- Teorik maksimum kalıntı miktarı) değerinden söz edilmelidir. TMRI değeri, MPI’ yı geçmesine izin verilmeyen ve diyetinde yer alan teorik maksimum kalıntı miktarıdır (16,18).

Bir kimyasalın gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilmeye kadar geçirdiği aşamalar şekil 1’de verilmiştir (18).

2.1.7. Gıda Katkı Maddelerinin Risk Yarar Dengesi

Amerikan gıda, ilaç ve kozmetik yasasına göre, gıda katkı maddeleri beslenme açısından yararlı bir etki sağlamak zorunda olmayıp beklenen teknolojik fonksiyonları sağlamalıdır. Bu nedenle bir gıda katkı maddesinin fonksiyonları onun yararları olarak kabul edilmektedir. Aksi halde gıda katkı maddelerini yararlı ve

zararlı katkı maddeleri olarak sınıflamak gerekir ki bu da bilimsel olarak büyük bir hatadır. Çünkü zararı saptanan bir kimyasalın katkı maddesi olarak kullanılması zaten yasalara uygun değildir. Kimyasal katkı maddeleri ya doğrudan ya da ambalaj materyalinden gıdaya geçebilmektedir. Bunun sonucu olarak da sahip olduğu fonksiyonu gıdada göstermekte ve gıdanın bazı özelliklerini etkileyebilmektedir. Ancak genel bir ifade ile gıda katkı maddeleri, fonksiyonu doğrultusunda üretici, imalatçı ve tüketiciye yararlar sağlamaktadır. Gıda endüstrisinde bilinçli ve teknolojik amaçlara yönelik olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin tüketiciyi ilgilendiren yönü kullanım miktarıdır. Bu katkı maddeleri fazla miktarda tüketildiğinde ve duyarlı risk grupları tarafından kullanıldığında toksikolojik açıdan tehlikeli olabilmekte, kısa ve uzun vadede vücutta birikme olasılıklarından dolayı da bir takım riskleri beraberinde getirebilmektedir. Bu açıdan risk kavramının temel unsurları içinde öncelikle tehlikenin belirlenmesi, doz etki ilişkilerinin ortaya konması, maruz kalma miktarı ve risk sınıflamasının da ortaya konması gerekmektedir (18,19).

Kabul edilebilir riski tanımlamak üzere FDA 4 durum belirlemiştir:

1. Maddeye ilişkin herhangi bir risk yoktur.
2. Maddeye ilişkin kabul edilemez düzeyde risk bulunmuştur.
3. Maddenin risk oluşturduğu düzey kabul edilen eşik değerinin altındadır.
4. Maddenin risk oluşturduğu düzey kabul edilen eşik değerinin üzerindedir.

Tanımlanmış bir risk taşımayan maddenin kullanımında herhangi bir sakınca yoktur. Tanımlanmış risk taşıyan maddenin kullanımına hiçbir koşulda izin verilmemektedir. Ancak risk değeri eşik değerinin altında olan maddeler için oluşturduğu yararlar dikkate alınır ve buna göre izin verilir. Riski eşik değerinin üzerinde olan maddeler için ise sağladığı yararın riskin çok üzerinde olması gerekir. Örneğin kürlenmiş etlerde *Clostridium botulinum* toksinine karşı kullanılan nitritin kanserojen nitrozaminlere dönüştüğü iyi bilinmektedir. Ancak nitritin kullanılmaması durumunda bu gıdaların tüketimi halinde tüketici botulinum gibi çok tehlikeli bir toksine maruz kalacak ve sonuç ölüm olacaktır (18).



Gıda katkısı

Şekil 1: Bir kimyasalın gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilinceye kadar geçirdiği aşamalar

2.1.8. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması

Gıda katkı maddelerine ilişkin çalışmalar ve bunların sınıflandırması kronolojik bir sıralama içinde incelendiğinde; bu konu ile ilgili kavram ve sınıflandırmaların, zaman içinde ilerleyen teknoloji, bulunan yeni formülasyonlar ve yeni hammaddeler nedeni ile sürekli bir değişme ve gelişme içinde olduğu görülmektedir. İlk olarak Oser tarafından 1960 yılında yapılan sınıflandırmaya göre gıda katkı maddeleri; besleyici nitelikte olanlar, tazeliği koruyanlar, duysal nitelikliler, imalat teknolojisinin gereğini yerine getirici maddeler şeklinde gruplandırılmıştır (19). CAC tarafından 1979 yılında yayınlanan rehberde gıda katkı maddeleri alfabetik sırayla sınıflandırılmış ve ne miktarda kullanılabilecekleri belirtilmiştir. CAC'ın 1992 yılında yayınladığı rehberde ise gıda katkı maddeleri, 23 alt gruba ayrılarak ve INS numaraları ve fonksiyonları esas alınarak yeniden sınıflandırılmıştır (Tablo 1). Avrupa Birliği Bilimsel Komitesinin direktiflerine göre 2008 yılında CAC'ın yaptığı sınıflandırmada bir takım değişiklikler yapılarak gıda katkı maddeleri tekrar gruplandırılmıştır. Buna göre yeni sınıflamaya CAC'ın sınıflandırmasından farklı olarak modifiye nişasta, ambalajlama gazları, şelat ajanları ve taşıyıcılar ayrı bir katkı maddesi sınıfı olarak eklenmiş, renk stabilizasyon ajanları ise bu sınıflamadan çıkarılmıştır (16,23,25).

Tablo 1: Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması

FONKSİYONEL SINIF	TANIM	ALT – SINIFLAR
ANTIOKSİDANLAR	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 disperse edici ajan, yüzey aktif ajan, sürfaktan, nemlendirme ajanı
EMÜLSİFİYE EDİCİ TUZLAR	İşlenmiş peynirlerin üretiminde peynir proteinlerini yeniden düzenleyerek yağ ayrışmasını önler.	Eritme tuz, şelat ajanı
HACİM ARTTIRICILAR	Su veya hava dışındaki bir madde olup, gıdanın enerji değerini belirgin bir şekilde artırmadan hacmini artırır.	Hacim verici ajan, dolgunlaştırıcı
İTİCİ GAZLAR	Gıdanın içinde bulunduğu kaptan dışarı fırlamasını sağlayan hava dışında bir gaz.	İtici gaz
JELLEŞTİRME AJANLARI	Gıdaya jel oluşumu ile doku kazandırır.	Jelleştirme ajanı
KABARTMA AJANLARI	Gaz açığa çıkararak hamurun hacmini artırır.	Hamur kabartma ajanı, kabartma ajanı
KALINLAŞTIRICILAR	Gıdanın viskozitesini artırır.	Kalınlaştırma ajanı, doku verici, yapıyı düzeltici
KORUYUCULAR	Gıdada mikroorganizmalar nedeniyle oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü artırır.	Antimikrobiyal koruyucu, antimikotik ajan, bakteriyofaj kontrol ajanı, kimyasal sterilizatör/sarap, olgunlaştırma ajanı, dezenfeksiyon ajanı
KÖPÜRTME AJANLARI	Sıvı veya katı bir gıda içerisinde gaz fazının oluşumunu veya tekdüze bir şekilde dağılımını sağlar.	Çırpma ajanı, havalandırma ajanı
KÖPÜRMEYİ ÖNLEYİCİ AJANLAR	Köpürmeyi önler veya azaltır.	Köpürmeyi önleyici ajan
LEZZET ARTTIRICILAR	Gıdadaki mevcut tat veya kokuyu artırır.	Lezzet artırıcı, lezzet kuvvetlendirici

Tablo 1 (devam): Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması

<i>NEM VERİCİLER</i>	Düşük nemlilik oranına sahip bir ıslatma ajanı işlevi görerek, gıdaların kurumasını önler.	Nem/su tutma ajanı, ıslatma ajanı
<i>PARLATMA AJANLARI</i>	Gıdanın dış yüzeyinde parlak bir görünüm veya koruyucu bir tabaka oluşturur.	Kaplama maddesi, yapıştırma ajanı, cila
<i>RENKLENDİRİCİLER</i>	Gıdaya renk kazandırır veya rengi onarır.	Renklendirici
<i>RENK STABİLİZASYON AJANLARI</i>	Gıdanın rengini stabilize eder, kalıcılığını sağlar.	Renk sabitleyici, renk stabilizörü
<i>SIKILASTIRICI AJANLAR</i>	Meyve ve sebzelerin dokularını sıkılaştırır veya jelleştirme ajanlarıyla etkileşerek jel oluşumunu veya jelin sağlamlştırılmasını sağlar.	Sıkılaştırıcı ajan
<i>STABİLİZÖR</i>	Gıdada birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın tek düze dağılımını sağlar.	Bağlayıcı, sertleştirme ajanı, nem /su tutma ajanı, köpük stabilizörü
<i>TATLANDIRICILAR</i>	Gıdalara şeker kullanmadan tat vermeyi sağlar.	Tatlandırıcı, yapay tatlandırıcı, besleyici tatlandırıcı
<i>TOPAKLANMAYI ÖNLEYİCİLER</i>	Gıdanın partiküllerinin birbirine yapışmasını önler.	Topaklanmayı önleyici ajan, yapışmayı önleyici ajan, kurutma ajanı
<i>UN İŞLEME AJANLARI</i>	Unun pişme kalitesini veya rengini korur.	Ağartma ajanı, hamur düzeltici

2.2. Gıda Boyaları

Gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin dışında kalan kalite kavramı içine ürünün rengi, tat-kokusu, görünümü ve besleyici özellikleri girmektedir. Gıdanın albenisini artıran özelliği rengidir ve hemen her gıda maddesi için alışılmış bir renk istenmektedir. Bundan dolayı tüketici açısından fark edilen kalite daha çok duysal özelliklere ve bunun da ötesinde gıdanın rengine dayanmaktadır. Duysal açıdan renk lezzet açısından beklenti oluşturmaktadır. Gıdanın tüketim öncesi gözlenen bu özelliği hammaddenin yetiştirilmesi sırasındaki etmenler ile ve imalat sürecindeki üretim parametrelerinin etkisi ile değişime uğrayabilmektedir (16,28). Renkte görülen bu farklılaşmalar, tüketici tercihini genellikle olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle renk maddeleri, teknolojik işlem görmüş et, meyve-

sebze, unlu mamüller, süt ürünlerinde ve şekerleme endüstrisinde kaybolan rengi geri vermek, kısmen kaybolmuş olan veya hiç olmayan rengi yapıya kazandırmak amacı ile çok sık kullanılan gıda katkı maddeleridir (28-30).

2.2.1. Gıda Boyalarının Sınıflandırılması

Renklendirici maddelerin sayıca çok oluşu, kimyasal yapılarının, fiziksel özelliklerinin ve elde ediliş yöntemlerinin farklı oluşu bu maddelerin sınıflandırılmasında güçlükler yaratmaktadır. Bu nedenle literatürde renklendiriciler ile ilgili çeşitli sınıflandırmalar ile karşılaşmaktadır. Elde ediliş şekillerine göre renklendiriciler doğal ve yapay renklendiriciler olarak sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte bazı doğal renklendiriciler yapay olarak da elde edilebilmektedir. Bu durumda bu maddeler doğala özdeş renklendiriciler olarak sınıflandırılmaktadır. E kodlama sistemine göre gıda boyalarının uluslar arası numaralandırılması E100 – E180 aralığında belirlenmiştir (Tablo 2) (18, 29-31).

2.2.1.1. Doğal Boyalar

Mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigmentlerdir. Renk aralıkları sınırlı ve dayanıklılığı az olan bu maddeler, zayıf bir renklendirme özelliğine sahiptir ve ışık, sıcaklık, pH ve redoks ajanlarına daha hassastırlar. Gıdalarda 1800'lerin ortalarına kadar, sadece safran, havuç, dut, çiçek, bakır ve demir cevherlerini içeren mineraller, hayvansal ürünler ve sebzeler gibi doğal kaynaklardan elde edilen renklendiriciler kullanılmıştır. Eski çağlardan itibaren çeşitli şekillerde kullanılan bu renk maddeleri, günümüzde gelişen teknolojilere bağlı olarak birçok doğal kaynağın özütü olarak hazırlanmaktadır. Bu grupta yer alan renk maddelerinin çok az bir kısmı suda çözünebilmektedir. Bu da doğal renklendiricilerin renk çeşitliliği sağlamasını sınırlamaktadır. Bu nedenle yağda çözünen doğal renk maddeleri, uygun bir emülsifiye edici ajanla işlenerek su esaslı gıdalarda kullanılabilir bir yapıya dönüştürülebilmektedir. Doğal renklendiriciler organik ve inorganik olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (28,30).

Tablo 2: Gıda boyalarının uluslar arası numaralandırılması

Numara	İsim	Fonksiyon	Numara	İsim	Fonksiyon
E100	Kurkumin	Turuncu-sarı renk	E154	Kahverengi FK	Kahverengi renk, azo boyası
E100(ii)	Turmerik	Turuncu-sarı renk	E155	Kahverengi HT	Kahverengi renk, azo boyası
E101	Riboflavin	Sarı renk, vit. B2	E160a	Alfa-, Beta- ve Gama- Karoten	Doğal, turuncu-sarı renk
E101(ii)	Riboflavin- 5'-Fosfat	Sarı renk, vit. B2	E160b	Annatto, Biksin, Norbiksin	Doğal, sarı renk
E102	Tartrazin	Sarı renk, azo boyası	E160c	Paprika ekstraktı	Doğal, turuncu renk
E104	Kunolin Sarı	Yeşil-sarı renk sentetik	E160d	Likopen	Doğal, kırmızı renk
E106	Riboflavin-5-Sodyum fosfat	Sarı renk, vit. B2	E160e	Beta-apo-8'-karotenol	Doğal, turuncu-sarı renk
E107	Sarı2G	Sarı renk, azo boyası	E160f	Etil esteri beta-apo-8'-karotenik asit	Doğal turuncu-sarı renk
E110	Sunset yellow FCF	Sarı renk, azo boyası	E161a	Flavoksantin	Doğal, sarı renk
E120	Karmin, Kokhineal	Kırmızı renk, doğal	E161b	Lutein	Doğal, sarı renk
E122	Azorubin	Kırmızı renk, azo boyası	E161c	Kriptoksantin	Doğal, sarı renk
E123	Amarant	Kırmızı renk, azo boyası	E161d	Rubiksantin	Doğal, sarı renk
E124	Ponso 4R	Kırmızı renk, azo boyası	E161e	Violaksantin	Doğal, sarı renk
E127	Eritrosin	Kırmızı renk, sentetik	E161f	Rodoksantin	Doğal, sarı renk
E128	Kırmızı 2G	Kırmızı renk, sentetik	E161g	Santhaksantin	Doğal, turuncu renk
E129	Alura kırmızısı AC	Kırmızı renk, azo boyası	E161h	Sitranaksantin	Doğal, sarı renk
E131	Patent Mavi V	Mavi renk, sentetik	E162	Pancar kökü kırmızısı	Doğal, kırmızı renk
E132	Indigotin	Mavi renk, sentetik	E163	Antosiyaninler	Doğal, kırmızı-mor renk
E133	Parlak Mavi FCF	Mavi renk, sentetik	E170	Kalsiyum karbonat	Beyaz renk
E140	Klorofiller	Yeşil renk, doğal	E171	Titanyum dioksit	Beyaz renk
E141	Klorofil bakır kompleksleri	Yeşil renk, sentetik	E172	Demir oksitleri	Doğal kırmızı-kahverengi renk
E142	Yeşil S	Yeşil renk, sentetik	E173	Alüminyum	Metal renk
E150a-d	Karamel	Kahverengi renk	E174	Gümüş	Metal renk
E151	Parlak Siyah BN	Siyah renk, azo boyası	E175	Altın	Metal renk
E153	Karbon	Doğal siyah renk	E180	Lithol Rubin BK	Kırmızı renkl, azo boyası
			E181	Tanenler	Sarı-beyaz renk

2.2.1.2. Yapay Boyalar

Yapay renklendiriciler, kimyasal yapıları itibariyle doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilen renk maddeleridir. Sentetik renklendiricilerin gıda sanayisinde kullanımı, güvenilirliği hakkında herhangi bir bilgi olmaksızın 1800'lerin sonlarında başlamıştır. İlk sentetik boya organik kömür katranından türetilmiştir ve ilk olarak tereyağı ve peynirlerde kullanılmıştır. Son yıllarda tüketici sağlığı açısından izin verilen sentetik boyaların sayıları azalmasına rağmen, çok çeşitli sentetik gıda boyaları düşük maliyetleri, yüksek etkinliği ve mükemmel dayanıklılığına bağlı olarak dünyanın her yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (22,30).

Yapay renklendiricilerin hemen hepsinin sentezinde başlangıç materyali olarak kömür kullanılmaktadır. Doğal renklendiricilerle karşılaştırıldığında renk verme güçleri, renk aralıkları, dayanıklılıkları, kullanım kolaylıkları ve fiyat uygunlukları gibi faktörler açısından üstünlük sağlamaktadırlar. Yapay renklendiriciler çok yüksek oranlarda suda çözünme özelliğine sahiptirler. Pek çoğu ısıya, ışığa, asitlere, alkalilere ve koruyucu maddelere karşı dayanıklıdır. Bu nedenle raf ömürleri de oldukça uzundur. Ürüne konuldukları miktarlarda zamana bağlı bir azalma görülmemektedir. Bu konuda yapılan araştırmalara göre 15 yıl süre ile depolanan gıdalara konulan renk katkılarında miktar azalması ve bir değişme saptanmamıştır (28-30).

Yapay renklendiricilerin sınıflandırılmasında kimyasal özellikleri açısından çözünürlükleri önem kazanmaktadır. Buna göre yapay renklendiriciler suda çözünenler, yağda çözünenler ve lake renklendiriciler olmak üzere üç grupta toplanmaktadır (29).

2.2.2. Çalışmamızda Kullanılan Sentetik Renklendiriciler ve Özellikleri

Eritrosin (E127): Benzoat yapısında ksanten sınıfından bir renklendiricidir. Kırmızı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda veya etanolde çözünmektedir. ADI değeri 0,1 mg/kg olup molekül ağırlığı 897,88 g/mol'dür (32).

Ponso 4R (E124): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Kırmızımsı toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olup etanolde çok az çözünmektedir. ADI değeri 4,0 mg/kg olup molekül ağırlığı 631,51 g/mol'dür (33).

Allura Red AC (E129): Sülfonat yapısında monoazo sınıfından bir renklendiricidir ve koyu kırmızı renkte toz veya granül halde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çözünmemektedir. ADI değeri 7 mg/kg olup molekül ağırlığı 496,43 g/mol'dür (34).

Sunset Yellow FCF (E110): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Turuncu-kırmızı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI değeri 2,5 mg/kg olup molekül ağırlığı 452,38 g/mol'dür (35).

Tartrazin (E102): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Açık turuncu renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir ADI değeri 7,5 mg/kg olup molekül ağırlığı 534,37 g/mol'dür (36).

Amarant (E123): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Kırmızımsı kahverengi/koyu kırmızımsı kahverengi toz veya granül halde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI değeri 0,5 mg/kg olup molekül ağırlığı 604,48 g/mol'dür (37).

Brilliant Blue FCF (E133): Triaril metan sınıfından bir renklendiricidir. Mavi renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde az çözünmektedir. ADI miktarı 12,5 mg/ kg olup molekül ağırlığı 792,86 g/mol'dür (38).

Azorubin (E122): Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Kırmızımsı kahverengi/koyu kırmızımsı kahverengi toz veya granül halde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. ADI miktarı 4 mg/kg olup molekül ağırlığı 502,44 g/mol'dür (39).

İndigotin (E132): İndigoid sınıfından bir renklendiricidir. Mavi renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde

etanolda çok az çözünmektedir. ADI miktarı 5 mg/kg olup molekül ağırlığı 466,36 g/mol'dür (40).

2.2.3. Sentetik Gıda Boyalarının Endüstriyel Kullanım Alanları

Gıda boyaları alkolsüz içecek endüstrisinde sık olarak kullanılmaktadır. Gazlı içeceklere vitamin aktivitesi ve antioksidan özelliğinden dolayı askorbik asidin eklenmesi sentetik boyaların verdiği renkte açılmaya neden olmaktadır bu da doğal boyaların kullanılmasını gerektirmektedir. Meyve aromalı birçok içecekte ise yapay renklendiriciler kullanılırken, kola ve birada renk verici olarak karamel tercih edilmektedir (29).

Gıda boyalarının bir diğer sık kullanım alanı da unlu mamullerdir. Hamurların yüksek nem içeriği nedeni ile boya katılmasında fazla problem olmamakta ancak istenen renk tonunu elde etmek zor olmaktadır. Bu da koyu renkli bazı ürünlerde fazla miktarda renklendirici kullanımına yol açmaktadır. Bu tip ürünlerde yapay ve doğal boyaların birlikte kullanımı önerilmektedir. Ponso 4R, Allura Red AC, Sunset Yellow FCF, Tartrazin ve Brown HT unlu mamullerde en sık kullanılan yapay boyalardır (29,39).

Süt ürünlerinde de gıda boyaları kullanılmaktadır. Birçok dondurma çeşidinde yapay boyalar tercih edilmektedir. Peynir, margarin ve tereyağında yapay boyalar dayanıklı olmadığı için β -karoten ve Anatto gibi doğal boyalar tercih edilmektedir. Buz kremlerde, sütlü bazı soslarda ve meyveli yoğurtlarda ise lake renklendiriciler önerilmektedir (29).

Şekerleme ürünlerinde, kuru toz içecekler, tatlılar, krema tozu, çorba ve soslarda daha çok lake renklendiriciler tercih edilmektedir. Et ve balık ürünleri ile konserve meyve ve sebzelerde ise yapay renklendiricilerin yanı sıra doğal renklendiriciler de kullanılmaktadır (29,30).

2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sistemler Üzerine Etkileri

Günümüzde gıda katkı maddelerinin kullanımı kaçınılmaz bir gereksinimdir. Tüketimdeki hızlı tırmanmaya paralel olarak ve bilinçsizce veya önerilenden daha fazla miktarda tüketildiklerinde organizma üzerinde tehlikeli olabilecek bir takım istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Bu etkiler ürtiker, anjiyoödem, anaflaksi, makülopapüler döküntü, astım, pruritus ve kutanöz vaskülit gibi akut alerjik reaksiyonlardan çocuklarda davranış bozukluğu, hiperaktivite, dikkat eksikliği, algılama ve öğrenme zaafına ve hatta kromozomal anomalilerden kanser gelişimine kadar değişkenlik gösterebilmektedir (1, 6,12,41).

Tüm dünyada 2.000-20.000 arasında katkı maddesinin besin endüstrisinde kullanıldığı tahmin edilmektedir. Bu kadar çeşitlilik gösteren katkı maddesi, duyarlı kişilerde ölüme kadar varabilen çok ciddi alerjik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Toplumdaki görülme sıklığı kesin olarak bilinmiyorsa da katkı maddelerine bağlı alerjik reaksiyonlar inanılanın aksine çok yüksek değildir. Çocuklarda yapılan araştırmalarda prevalansın %1-2 arasında olduğu gösterilmiştir. Genel olarak katkı maddelerine bağlı ürtiker ve diğer kutanöz reaksiyonlar astımdan daha sık görülmektedir. Anafilâksi daha nadirdir. İstenmeyen allejik reaksiyonlara en sık neden olan 3 katkı maddesi sülfite, monosodyum glutamat ve tartrazindir (1).

Antioksidan ve antimikrobiyal koruyucu özellikleri nedeniyle kullanılan sülfidler, besinlerde havayla temas edince ortaya çıkan renk değişikliğini (kahverengiye dönüşmeyi) önlerler. Genel popülasyonla kıyaslandığında astımlılarda sülfite duyarlılığı yaklaşık 100 kat daha fazladır ve oral yolla alındığında tip I hipersensitivite aracılı veya IgE bağımsız mekanizmalar ile sıklıkla bronkokonstrüksiyona neden olarak solunum sıkıntısına ve ürtikere yol açmaktadır (1,42).

Duyu tat reseptörlerini uyarak besinlere lezzet arttırıcı olarak eklenen monosodyum glutamat özellikle Çin, Japon ve Doğu Asya yemeklerinde oldukça bol miktarda bulunmakta ve bir öğünde yaklaşık 6 gr kadar tüketilebilmektedir. Gıda alımını takiben 15- 20 dakika içerisinde ortaya çıkan ve flushing, baş ağrısı, bulantı,

terleme, göğüs sıkışması ve solunum sıkıntısını içeren Çin Restoranı Sendromu en iyi bilinen ve en sık gözlenen yan etkisidir (1,6).

Besinlerde sarı boya olarak yer alan tartrazin, özellikle aspirin intoleransı olanlarda ürtiker, makulopapüler döküntü, purpurik lezyonlar, kutanöz vaskülit gibi deri reaksiyonlarına ve solunum sıkıntısına neden olabilmektedir (1).

2.4. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır (43).

Hipokampüs, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır. Hipokampüs ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve "hipokampal formasyon" adını alır. Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, SSS'nin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampüsü etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyonun sol hipokampüste olduğu zamanda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. Hipokampüsün değişik alanlarının uyarılması durumunda hiddet, edilgenlik, hiperseksüalite gibi davranış biçimleri görülür. Hipokampüs, hipereksitabilite özelliğine sahiptir. Hafif elektriksel uyarılmasında, uyarı bittikten sonra saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampüsün normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (44).

2.5. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli Santral Sinir Sistemi (SSS)'inde önde gelen eksitatör nörotransmitterdir. Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı

sinapslarda major nörotransmitterdir. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşmekte ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize etmektedirler. Glutamat reseptörleri memelilerin SSS'deki çoğu uyarıcı sinir iletimini düzenlemektedir. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletimde rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır (45,46).

Glutamat reseptör ailesinin aminoasit dizilişi ACh, GABA ve glisin reseptörlerine çok az benzer. Glutamat ayrı bir ailenin üyesidir (47).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkincil haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder (47-49).

Bugüne kadar memeli SSS'inde 16 adet iGluR cDNA'sı ve 8 adet metabotropik glutamat reseptör cDNA'sı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar izole edilen 16 adet iGluR cDNA'sının; 4 tanesi Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat (AMPA) reseptör alt birimi (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), 5 tanesi kainat reseptör alt birimi (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) ve 7 tanesi NMDA reseptör alt birimidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B). Günümüzde glutamat reseptör genlerinin ekspresyonunu manipüle edici birçok farklı teknik kullanılarak, glutamat reseptörlerinin tüm fizyolojisi ve patolojisi geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Birçok olguda iGluR alt birimleri değişik laboratuvarlar tarafından ayrı ayrı ve de eş zamanlı olarak klonlandığı için benzer alt birimlere her biri farklı isimler vermişlerdir (45).

I. İyonotropik Glutamat Reseptörleri:

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iGluR'e bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal meydana getirmektedir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren

bir integral katyon seçici kanal içeren iyonotropik glutamat reseptörleri 3 geniş gruba ayrılır:

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozol propionat tercih eden (AMPA) reseptörler
2. Kainat tercih eden reseptörler
3. N-metil D-aspartat tercih eden (NMDA) reseptörler (47-49).

II- Metabotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik reseptörler GTP-bağlayıcı proteinlerle (G proteinleri) bağlantılıdır ve intraselüler mesajcılarının üretimini kontrol etmektedirler (50-52). *Trans*-(1S,3R)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar. Glutamat, iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir (47-49).

2.5.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri 2-amino-5-phaphono valerik asit ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione ile bloke olurlar. Bu nedenlerle AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilmektedir (53).

NMDA reseptör agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli exitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da glutamat gibi NMDA reseptörlerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPA reseptörleri ve kainat reseptörlerine bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDA reseptörleri ile AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri arasında benzerlik az iken AMPA reseptörleri ve kainat reseptörlerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Tüm NMDA reseptör alt birimleri nötral aminoasit içermektedir. Bir tek M2 bölgesinde polar asparajin rezidüsü bulunmaktadır (49,54).

Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPA reseptörü hem de NMDA reseptörü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDA reseptörleri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içermektedir (15,55). Non-NMDA iyonotropik reseptörler motor nöronlarda ve beyinde eksitator postsinaptik potansiyel'in (EPSP) büyük erken komponentini oluşturmaktadır. Yani birçok sinapsta AMPA reseptörleri eksitator aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki etmektedir. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na^+ ve K^+ 'a geçirgen iken Ca^{+2} 'a geçirgen değildirler. Bu sırada NMDA reseptörleri, intrasellüler enzimler ve ikincil mesajcıların aktivelerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} komponenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlamaktadır (49,54).

EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır:

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na^+ ile K^+ 'un yanı sıra Ca^{+2} 'a da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması bir ko-faktör olarak glisinin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağımlıdır. Kanal sadece glisinin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDA reseptör kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalinedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetatif antagonistleridir.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDA reseptörlerini diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir (45,49).

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrinsek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstrensek bloker olan Mg^{+2} (ekstrasellüler Mg^{+2}) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran potansiyelinde (-65 mV'da) Mg^{+2} kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (örneğin, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg^{+2} elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na^+ ile Ca^{+2} 'un

geçişine izin verir. Bu nedenle NMDA reseptörlerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle NMDA reseptörü sinaptaki presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranmakta ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca^{+2} 'un girişine imkân vermektedir. Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik değişiklikleri başlatmaktadır (45,49,54).

Birçok hücrede hem non-NMDA reseptörler hem de NMDA reseptörler bulunmaktadır. Mg^{+2} , istirahat membran potansiyelinde NMDA reseptör kanalını bloke ettiği için, NMDA reseptörlerinin EPSP'lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg^{+2} NMDA reseptör kanalından uzaklaşmakta ve NMDA reseptör açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşmektedir (47-50).

NMDA reseptör kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunmasıdır. EPSP'nin geç fazı, Mg^{+2} 'un kanalı bloke etmesi nedeniyle, tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu durumda NMDA reseptörü büyük ölçüde Ca^{+2} 'un katkısı ile daha büyük akımlara yol açmaktadır. NMDA reseptör aktivasyonu sonucu, post-sinaptik hücrelerde, Ca^{+2} 'a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girmektedir. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir. Öğrenme ve bellek oluşumunda, sinapta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma aktiviteye bağımlı sinaptik modifikasyonlar denmektedir (47,49).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDA reseptörüne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan bu deneyler, CA1 hipokampal NMDA reseptörünün hipokampusa bağımlı mekânsal hafıza ve

mekânsal olmayan hafızanın oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (15). Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan “uzun süreli potansiyalizasyon-long term potention (LTP)” öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (49,53). LTP, sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış potansiyel olarak tanımlanabilir (54). Daha önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının mekânsal öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (49). Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin indüksiyonu bir dizi olayı içermektedir. İlk olarak NMDA reseptör kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekmektedir. Kanalın açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak vermektedir. Ca^{+2} 'daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozitid düzeylerindeki yükselmeye birlikte proteinkinaz C (PKC) ve CAMKII'nin de dâhil olduğu proteinkinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlemektedirler (54).

Homosinaptik “uzun süreli depresyon-long term depression-(LTD)” ise sinaptik kuvvetin aktiviteye bağımlı uzamış zayıflaması olarak tanımlanır ve bir anlamda LTP'nin fonksiyonel karşıtıdır. CA1 alanındaki LTP gibi LTD'nin indüksiyonu da NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır (15,54).

Sinaptik aktivitenin regülasyonunda protein fosforilasyonu ve defosforilasyonunun önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. NMDA reseptör kanalının alt birimleri farklı proteinkinazlar ve protein fosfatazlar tarafından doğrudan fosforile ve defosforile edilmektedir. NR1, NR2A ve NR2B alt birimleri hem cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) hem de PKC tarafından farklı bölgelerden fosforile edilebilmektedir. CAMKII, NR2B alt biriminin karboksi terminal ucundaki spesifik bir kalıntıyı ve/veya onun NR2A alt birimindeki karşılığını fosforile etmektedir. Protein tirozin kinaz da NR2A ve NR2B alt birimlerini fosforile etmektedir (56).

2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri

NMDA reseptörlerinin şu ana kadar tanımlanan yedi tane alt birimi vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B. NMDA reseptörleri beyin tümünde yaygın olarak bulunmaktadır ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampusun CA1 bölgesidir (45).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör alt birim ekspresyonu SSS'de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

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

NR2A: Beyinde postnatal eksprese edilir. 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165,5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır.

NR2B: Tüm embriyonik beyinde eksprese edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde eksprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde eksprese edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve 165,9 kDA ağırlığındadır. NR2B'nin ekspresyonu önbeyinde, serebral korteks, hipokampus, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak serebellumda eksprese edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C'nin ekspresyonu ise serebellumda dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktor bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: Diencephalon ve beyin sapında embriyonal ve neonatal olarak eksprese edilir. 1323 aminoasitten oluşur ve 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktor bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunununa tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda eksprese edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlamaktadır (48,49).

2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı

Şu anda genellikle hemfikir olunan nokta; NMDA reseptörlerinin NR1 alt birimleri ve beraberinde NR2 alt birimlerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğu şeklindedir. NR2 alt birimlerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. Membrana doğru dizilmiş her glutamat reseptör alt birimi, farklı yaklaşımların bir bileşkesinden ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar kaçınılmaz bir kanıt ortaya koymuştur: NMDA reseptör, AMPA reseptör ve kainat reseptör alt birimleri 3 adet membrana uzanan domain içermektedir (M1, M3 ve M4). M2 domaini membrana sitoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büklüm oluşturmaktadır. Her NMDA reseptör alt birimi geniş bir ekstrasellüler N-terminal domaini ve intrasellüler C- terminali içermektedir (48,49,54).

NMDA reseptör poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur. NMDA reseptör, voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDA reseptörlerinin aktivitesi, Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği, pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit kalıntılarına dayanmaktadır. Katyon seçiciliği, M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NR1 ve NR2 alt birimlerinde bulunan bir asparajin kalıntısı tarafından oluşturulmaktadır. NR2 alt birimi, membranın ekstrasellüler yüzünden gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içermektedir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin kalıntıları veya onlara çok yakın olan aminoasit kalıntılarının etkileşimine dayanmaktadır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir. NR1 kalıntıları, kanalın dış vestibülünü oluşturmaktadır. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (47-49,54).

2.6. ACh Reseptörleri

Kolinerjik Sistem, sempatik ve parasempatik sistemin 1. sıra nöronlarından ve parasempatik sistemin 2. sıra nöronlarından oluşur. Bu nöronların ganglionlardaki

veya nöroefektör kavşaklardaki akson uçlarından salıverilen ve sinaptik aşırımdan sorumlu olan nörotransmitteri asetilkolindir (57).

ACh reseptörleri, farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma nikotin ve muskarin adlı iki alkaloidin reseptördeki farmakolojik aktivitesi üzerine kuruludur. Muskarinik ACh (mACh) reseptörlerinin antagonisti atropin ile nikotinik ACh (nACh) reseptörlerinin antagonisti d-tüboküarin adlı ajanların tamamen farklı aktiviteleri vardır. Bu da ACh için birden fazla reseptör olduğunu desteklemektedir (57-58).

Nöromusküler kavşaktaki nACh reseptörleri, N_1/N_m reseptörler; ganglionlardaki nACh reseptörleri N_2/N_g reseptörler olarak bilinir. SSS'de bulunan çok sayıda farklı nöronal nACh reseptör vardır. Bunlar kaslardakilerden çok ganglionlardaki nACh reseptörlerine benzerler. Günümüzde SSS'de en az 10 farklı nikotinik reseptör α alt birimi ve 4 farklı β alt birim geni tanımlanmış ve klonlanmıştır (59). Nikotinik ve muskarinik reseptörlerin alt birimleri periferik sinir sisteminde ayrı anatomik lokalizasyonlar gösterirler ve bu da sınıflandırmayı kolaylaştırır. İskelet kaslarının reseptörleri nöromusküler kavşak veya postsinaptik motor son plak bölgesinde birlikte bulunmaktadır (57).

Adrenal bezde parasempatik ve sempatik ganglionlarda postsinaptik nöronlarda ganglionik nikotinik reseptörler bulunur. Ganglionik nikotinik reseptörler embriyonik nöral krestten orijin alan dokularda bulunur. Sempatik ve parasempatik ganglionlarda benzer özellikler gösterir. Muskarinik reseptörler postganglionik parasempatik transmisyonundan sorumludur. Ancak terleme, piloereksiyon gibi sempatik sinir sisteminden kaynaklanan olaylar muskarinik reseptörlerce yönetilir (57).

2.6.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR)

İlk olarak Electrophorus Californica adlı balığın elektrik organından (elektroplaktan) sodyum dodecyl sülfat gibi bir anyonik deterjan kullanılarak

çözünmesi sağlanan nACh reseptörleri ayrıştırılıp saflaştırılarak ayrıntılı şekilde incelenmiş, aminoasit sekansları saptanmıştır (58).

nACh reseptörleri, yapıca ligand kapılı katyon kanallarıdır. nACh reseptör proteini beş polipeptid alt birimden oluşan pentamerik bir yapıya sahiptir. Bu alt birimlerin aminoasit kalıntılarının %30 ila 40'ı homologtur. Alt birimler α , β , γ , δ ve ϵ 'dur. Kaslarda α alt biriminin 2 kopyası vardır, diğer 3 alt birim β , γ ve δ tek kopya şeklindedir. Nikotinik reseptör protein kompleksinin molekül ağırlığı 280 kD'dur. Bu alt birimler bir merkezi kavite çevresinde yerleşmişlerdir. Reseptörün çok büyük bir kısmı ekstrasellüler yüzdedir. Bu merkezi kavite bir iyon kanalıdır. Dinlenme durumunda iyonlara geçirgen değildir. Aktive olduğunda 6,5 Å açılmakta ve açık kanal katyonlara selektif hale gelmektedir. Kanal temelde Na^+ , Ca^{+2} ve K^+ katyonlarını geçirmekle beraber, ACh ile aktive edilip açıldığında Na^+ kanalı gibi çalışır ve depolarizasyona yol açar. İki α alt birimi ve γ ile δ alt birimlerinin α alt birimine bakan yüzleri agonist ve kompetitif antagonist bağlanma bölgelerini oluşturur. Dolayısıyla α alt birimine ligand bağlanırken, β alt birimi reseptöre ligand bağlanmasını ve reseptörün desensitizasyon hızını modüle eder. Ligand kapılı katyon kanalı yapısındaki reseptör ailesinin hepsinde α alt biriminde 128. pozisyondaki sistein ile 142. pozisyondaki sistein arasında disülfid köprüsü vardır. Yine α alt birimini tanıtan yapısal özellik olarak 192-193. sistein aminoasitleri arasında disülfid köprüsü vardır. Son çalışmalar göstermiştir ki α alt birimindeki 185. ve 200. rezidüleri agonist ve antagonist bağlanma yüzeylerinin bir kısmını oluşturduğu için önemlidir. Agonist bağlayan bölgeler tirozin ve triptofan gibi aromatik yan zincirler içerirler ki bunlar agonistlerle katyonik etkileşim sağlarlar (57,58).

Her bir alt birim polipeptid zinciri 4 tane membranı kateden 4 hidrofobik segmentten oluşur. Bu transmembran bölgeler 210. kalıntıdan sonradır ve molekül ekstrasellüler yüzeyde amino terminal kısımla son bulur. Bu 4 segment, M_1 , M_2 , M_3 ve M_4 olarak isimlendirilmektedir. M_3 ve M_4 arasında geniş stoplazmik bir loop vardır. Bu intrasellüler loop serin/treonin kinazlar içindir. M_2 iyon kanalına göre proksimaldedir. α helikal yapıdadır ve kanal lümenine doğru serin ve treonin kalıntıları içerir. Reseptörün iyon kanalının, kanalın derinliklerinde stoplazmik bölgede yer alan bir kapısı olduğu düşünülmektedir. İyon selektivitesini kanalın çevresinde yerleşim gösteren her 5 alt birimin yüklü aminoasitlerinin oluşturduğu

halka kontrol eder. Bu kontrol bölgesi ekstrasellüler kısımda α -Glu 262'den stoplazmik kısımdaki α -Glu 241'e kadardır. α -Thr 244'e denk gelen pozisyondaki amidlerin hidrojen iskeletleri ve karbonil grupları ve hidrosillenmiş aminoasitlerin oluşturduğu halka ile iyon selektivitesi ve permeabilitesi ayarlanır (58).

nACh reseptörleri dinlenim konumundayken ACh'e göreceli olarak düşük affinite gösterir. Agonist bağlandığında, iyon kanalı kapalı-dinlenim konumundan açık konuma geçer, Na^+ , K^+ , ve Ca^{+2} akımı olur. Aktivasyon esnasında ACh'e ilgi artmıştır, allosterik etkileşimle diğer bir ACh molekülünün bağlanması artmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda ACh varlığında ACh'e affinite de artmaktadır. Agonistin ortamdaki varlığının devam etmesiyle iyon kanalı kapanır ve reseptör desensitize olur. Bu durumda, nACh reseptörleri agonist bağlanmasına yüksek affinite gösterse de aktivasyona dirençlidir. Desensitize haldeki reseptörün birçok durumu vardır. Desensitizasyon ve geri dönüş oranı nACh reseptör alt birimine göre değişir. Örn: $\alpha 7$ nACh reseptör çok hızlı desensitize olur. Uzayan agonist uygulaması reseptörü inaktive duruma geçirebilir ve geri dönüşü çok yavaş olur. $\alpha 4$ ve $\beta 2$ nöronal nACh reseptörleri kronik nikotin tedavisiyle inaktivasyona eğilimlidir. Dinlenim, açık ve desensitize konumlar arası geçişler reversibldir. Agonistler, reseptörü aktive (açık) konuma getirirler, antagonistler ise tercihen nACh reseptörlerini dinlenim veya desensitize konfigürasyonlardan biri şeklinde kapalı konumda tutarlar (58, 60).

nACh reseptörleri, daha önce değinildiği gibi bir katyon kanalının intrinsik bir bölümünü teşkil ederler veya başka bir deyişle bu kanalla direkt olarak kenetlenmişlerdir. nACh reseptörlerinin ACh ve diğer nikotidik reseptör agonistleri tarafından aktive edilmesi kanalın kısa bir süre için açılmasına neden olur; bu sırada kanalın iletkenliği nisbeten fazlaca artar (gangliyon alt-tipinde 35-40 ve çizgili kas alt-tipinde 35-50 pikoSiemens). nACh reseptörünün kenetlendiği katyon kanalı tipi esas olarak Na^{+} 'u ve daha az derecede olarak Ca^{+2} ve K^{+} 'u geçiren kanallardır. Bu kanalların açılması hücreleri depolarize eder; gangliyon ve iskelet kası hücrelerinde EPSP oluşturur. Bu potansiyel çizgili kasın nöromüsküler kavşağında son plak potansiyeli diye adlandırılır (57).

α 'ların en az 10 ve β 'ların en az 4 alt birimi vardır ($\alpha 1$ 'den $\alpha 10$ 'a kadar, $\beta 1$ 'den $\beta 4$ 'e kadar). Reseptörün yerine ve tipine göre içerdiği alt birim türleri değişkenlik

gösterir. nACh reseptörleri otonom ganglionlarda, adrenal kromaffin hücreleri, primer duysal nöronlarda ve iskelet kas liflerinde olmak üzere periferde geniş bir dağılım gösterir (58,59). Kas son plaktaki nACh reseptörleri $(\alpha_1)_2\beta_1\varepsilon\delta$ şeklindeki alt birim kombinasyonu gösterir hâlbuki ekstrasjunctional nACh reseptörleri $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ şeklindeki alt birim kombinasyonundan oluşur (Fetal ve denerve kaslarda) (58). Beynin hemen her bölgesinde hem presinaptik hem postsinaptik olarak yerleşmişlerdir. nACh reseptörleri daha çok prejunctionaldır (57).

2.6.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerin Alt Birimleri

Çizgili kasların nöromusküler kavşaklarındaki nACh reseptörleri ve otonomik ganglionlarla, adrenal medullanın kromaffin hücrelerindeki nACh reseptörleri belirli blokör ilaçlara karşı duyarlılığının farklı olmasına bakarak ayırt edilmiştir. Bunlardan 1. tip, çizgili kas tipi (N_1/N_m) reseptörler ve 2. tip, ganglion tipi (N_2/N_g) reseptörlerdir. Daha sonra SSS nöronlarında nöronal nACh reseptörleri tanımlanmıştır. Çizgili kas tipi (N_m) reseptörler α -tübokürarin, pankuronyum ve benzeri çizgili kas felç edici ilaçlar tarafından selektif ve güçlü bir şekilde bloke edilirler. Ganglion (N_g) tipi reseptörler heksametonyum, mekamilamin ve diğer gangliyon bloke edici ilaçlar tarafından selektif bir şekilde bloke edilirler; dimetilfenilpiperazinium (DMPP) maddesi bu reseptörlerin selektif bir agonistidir. Bir yılan zehiri olan α -bungarotoksin çizgili kas tipi reseptörleri selektif olarak bloke eder, fakat gangliyon tipi reseptörlere etkisizdir. Diğer bir yılan zehiri K-bungaratoksin (diğer adıyla nöronal bungarotoksin) gangliyon tipi reseptörleri selektif olarak bloke eder. ACh ve nikotin, çizgili kas ve gangliyon tipi kolinerjik reseptörlerin non-selektif agonistleridir. Nöronal SSS tipi reseptörlerin altbirim bileşimi diğerlerinden farklı olmakla beraber, yukarıda sayılan toksin ve ilaçlara duyarlılıkları gangliyon tipi reseptörlerinki ile aynıdır. N_m reseptörler, erişkin kasında 2 tane α_1 ve birer tane β_1 , ε ve δ alt birimlerinden oluşur, iletkenliği 35-50 pS'dir. Embriyonik kasta ε alt biriminin yerini γ alt birimi almıştır. N_g 'ler genellikle sadece α_3 ve β_4 alt birimlerinden oluşan pentamerlerdir (57)

2.6.3. Nöronal Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

1980’de [³H]-Nikotinin sıçan beyninde bağlanma bölgeleri olduğu ve bu bölgelerin eşsiz nikotinik farmakolojiye sahip olduğu rapor edilmiştir. [³H]-Nikotin, α -bungarotoksin ile bloke olmaz. Bildirilen klonlanmış ilk nöronal nACh reseptör alt birimi 1986’da $\alpha 3$ ’dür. Günümüzde memelilerde saptanan nöronal nACh reseptör alt birimleri 11 ($\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ – $\beta 4$) tanedir. Buna ek olarak kuş türünde $\alpha 8$ alt birimi tanımlanmıştır. α ve β alt birimleri ayrı fakat ilişkili gen familyasındandır (58).

nACh reseptörleri daha önce de belirtildiği gibi santral ve periferik sinir sisteminin her yerinde bulunurlar. Otonomik nörotransmisyon ve kas kontraksiyonunun başlatılması şeklindeki asıl rolüne ek olarak, SSS’de nACh reseptörleri daha çok modülatör rolü oynar. Nöronal nACh reseptörleri, AH, PH, Şizofreni, Tourette Sendromu, Dikkat Bozukluğu gibi hastalıklarla ilişkisi nedeniyle önem kazanmaya başlamıştır. Nöronal nACh reseptörleri bu hastalıkların tedavisinde ilaçlar için hedef olarak algılanmaktadır (58).

Nöronal nACh reseptörleri α ve β alt birimlerinin pentamerik kombinasyonlarından oluşur, bu da nöronal nACh reseptörlerine çeşitlilik sağlar. *Xenopus Oocytes* ve memeli hücre dizisinde nACh reseptörlerinin heterolog ekspresyonu bazı kurallarla düzenlenir bu da doğal nACh reseptörlerinin alt birimlerini sınırlar. $\alpha 2$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ alt birimlerinin $\beta 2$ ve $\beta 4$ alt birimleriyle ikili kombinasyonları fonksiyonel nACh reseptörlerini oluşturur, ancak $\alpha 5$ ve $\beta 3$ alt birimleri genellikle fonksiyonel nACh reseptörlerini oluşturamaz. Bunlar da en azından diğer alt birimlerle bir araya gelerek heteromerler oluştururlar. $\alpha 6$ alt birimi, $\beta 4$ ile fonksiyonel nACh reseptörü oluşturabiliyor. Yine $\alpha 6$ alt birimi $\beta 3$ ile kombinasyon oluşturuyor. $\alpha 6$ alt birimi biyojenik amin içeren nöronlarda lokalizedir. $\alpha 7$, $\alpha 8$ ve $\alpha 9$ alt birimleri sağlam homomerik reseptörler oluştururlar. $\alpha 10$ alt birimi sadece fonksiyonel $\alpha 9$ alt birimi ile birlikte reseptör oluşturacak şekilde eksprese edilir. $\alpha 9$ alt birimi içeren reseptörler muskarinik reseptörlerin bazı özelliklerini taşır (60).

Doğal sistemlerde, nACh reseptörlerinin alt birim kombinasyonu hakkında bilgi yetersizdir. Sadece birkaç major alt birim tanımlanmıştır. Bunlardan biri

$\alpha 4\beta 2$ 'dir. SSS'de göreceli olarak çok miktardadır, SSS'nin predominant kombinasyonudur. Diğer major alt birim $\alpha 7$ 'dir. Genellikle santral ve periferik sinir sisteminde homomerik nACh reseptörü şeklinde bulunur. İnvivo şartlarda $\alpha 7$ alt birimi içeren reseptörün yüksek Ca^{+2} permeabilitesi vardır. $\alpha 3$ alt birimi genellikle $\beta 2$, $\beta 4$ ve $\alpha 5$ alt birimleriyle daha çok periferik ganglionlarda bulunmaktadır. SSS'deki nACh reseptörleri presinaptik lokasyonlarda fonksiyon göstermekte ve bazı nörotransmitterlerin salınımını düzenlemektedirler. Elektrofizyolojik ve mikrodializ çalışmaları sonucunda elde edilen kanıtlar göstermektedir ki glutaminerjik, dopaminerjik, seratonerjik, peptiderjik ve kolinerjik yollar presinaptik nikotinik reseptörlerin kontrolü altındadır (58,60).

3. MATERYAL ve METOT

Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1860-TU-09 proje numarası ile desteklenen çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezi ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan 10.03.09 tarih ve 03 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda genetik çeşitliliğin sağlanması için başlangıçta Wistar Han cinsi toplam 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Bu sayede daha çok anneden yavru alınarak daha karma gruplar oluşturulması sağlandı. Sıçanlar Kontrol ve Gıda Boyası grupları olarak 15'erli 2 gruba ayrılmıştır. Çalışmada her bir sıçan ayrı bir kafese konulmuştur. Gıda boyası grubuna gıda boyası karışımı deney hayvanlarının gebe kalmalarından 1 hafta öncesinden itibaren verilmeye başlanmış ve doğuma kadar devam edilmiştir. Boya karışımı her bir sıçana maksimum 1 ml olacak şekilde her gün oral gavaj ile verilmiştir. Verilen gıda boyaları aşağıda belirtilen boyalar kullanılmak suretiyle içme suyunda çözdürülerek haftalık olarak hazırlanmış ve hafta boyunca buzdolabında saklanmıştır.

Kullanılan boyalar ve ADI değerleri: Eritrosin 0,1 mg/kg/gün (32), Ponso 4R 4 mg/kg/gün (33), Allura Red AC 7 mg/kg/gün (34), Sunset Yellow FCF 2,5 mg/kg/gün (35), Tartrazin 7,5 mg/kg/gün (36), Amarant 0,5 mg/kg/gün (37) Brilliant Blue FCF 12,5 mg/kg/gün (38), Azorubin 4 mg/kg/gün (39), ve İndigotin 5 mg/kg/gün (40).

ADI değerleri temel alınarak her bir sıçanın ağırlığına göre günlük alabileceği maksimum doz hesaplanmıştır. Gıda boyası grubuna eş zamanlı olarak kontrol grubuna da oral gavaj ile her gün 1 ml içme suyu verilmiştir. 1. haftanın sonunda her bir kafese çiftleşmenin sağlanması için birer erkek sıçan 5 gün süreyle bırakılmıştır. Gıda boyası ve kontrol grubu sıçanlarının gebe kalmaları bu şekilde sağlanmıştır. Erkek sıçanların kafeslere konulduğu gün gebeliğin 1. günü kabul edilmiştir. Gıda boyası grubundan 8 sıçan, kontrol grubundan da 8 sıçan doğum yapmıştır. Doğum sonrasında yavrular 1 ay süreyle anneye beraber kaldıktan sonra gıda boyası ve kontrol grupları da kendi içinde erkek ve dişi olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Tüm sıçanlar standart ışık (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) ve ısı (23°C) koşullarında yaşatılmış, yeteri kadar su ve yem (Korkutelim Yem, Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Yavru sıçanlar 3 aylık olduklarında her bir gruptan 12’şer adet sıçan seçilmiştir. Sıçanlar seçilirken her anneden en az bir erkek, bir dişi yavru alınmasına özellikle dikkat edilmiştir. Erkek ve dişi yavrular arasından seçim rastgele yapılmıştır. Sonuçta her biri 12 sıçandan oluşan dört grup oluşturulmuştur: Gıda Boyası Dişi (GBD), Kontrol Dişi (KD), Gıda Boyası Erkek (GBE) ve Kontrol Erkek (KE).

Daha sonra intraperitoneal olarak uygulanan % 10’ luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) - %2’lik ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) anestezisi altında sıçanların başı gövdesinden ayrılarak beyin dokuları alınmıştır. Beyindeki hipokampslerin izolasyonu için, buz paketlerinin üzerine fosfat tamponuyla ıslatılmış filtre kâğıtları yerleştirilerek bir düzenek hazırlanmıştır. Beyin dokuları alınır alınmaz bu düzenek üzerinde hipokampsler çıkarılmış, önceden hazırlanmış ve etiketlenmiş 50 mM fosfat tamponu içeren ependorf tüplerine konulmuş ve analizin yapılacağı tarihe kadar - 20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

- 1- Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
- 2- Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)

- 3- Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
- 4- Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
- 5- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- 6- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- 7- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- 8- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 9- Elektroforez cihazı: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
- 10- Biyokimya analizörü: Olympus AU2700 (Japonya)
- 11- Kodak Image Station 2000 MM (USA)
- 12- Cam-Teflon homojenizatör

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

- 1- Akrilamid: bisakrilamid % 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 filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
- 20- Metanol, Merck (Almanya)
- 21- Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- 22- Anti NR2A, Millipore (Avustralya)
- 23- Anti NR2B, Millipore (Avustralya)
- 24- Anti AchR α 7, Santa Cruz (ABD)
- 25- Anti AchR α 4, Santa Cruz (ABD)
- 26- Anti AchR β 2, Santa Cruz (ABD)
- 27- Monoklonal anti-rabbit IgG, Sigma (ABD)
- 28- BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (Almanya)
- 29- Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (ABD)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

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

36,3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 8,8'e ayarlanır. Soğutulup pH tekrar 8,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4 x Paketleyici Tampon: 0,5 M Tris HCl, pH: 6,8

12,1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 6,8'e ayarlanır. Soğutulup pH yeniden 6,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

3- Çözücü jel: (% 7,5'lük)

Distile su	4450 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	2500 µl
4 × çözücü tampon (tris HCl, pH: 8,8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

4- Paketleyici jel: (% 4'lük)

Distile su	3050 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	650 µl
4 × paketleyici tampon (tris-HCl, pH: 6,8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

5- Homojenizasyon Tamponu: pH: 7,5 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

6- Numune Tamponu:

Paketleyici tampon (0,5 M Tris-HCl, Ph: 6,8)	2,0 ml
Gliserol	1,6 ml
% 10 SDS	3,2 ml
2-Merkaptoetanol	0,8 ml
% 0,1(w/v) Brom fenol blue	0,4 ml

7- Yürütücü Tampon: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH: 8,3'e ayarlanıp distile su ile 1 litreye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

8- Transfer Tamponu: 0,606 gr Tris, 2,882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8,2-8,4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

9- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 18,15 gr Tris, 26,25 gr NaCl, 3 ml Tween 20 (yoğun bir madde olduğu için pipetle yavaşça çekilir) pH: 7,5 olarak ayarlanıp 3 litreye distile suyla tamamlanır.

10- Primer antikorlar: NR2A 1/500, NR2B 1/500, AchR α 7 1/200, AchR α 4 1/200, AchR β 2 1/200 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

11- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkale fosfat konjuge) 1:10000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartılıp yeterli protein konsantrasyonunu sağlamak amacıyla 4 hipokampus 1 örnek oluşturacak şekilde birleştirilmiş ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede homojenizasyon yapılmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de +4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarında Olympus AU2700 cihazına uyumlu ticari kit ile spektrofotometrik yöntem ile protein ölçümü yapılmıştır. Son olarak süpernatantları yedeklenerek çalışılincaya kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışılmıştır (61). % 7,5'lik çözücü jel ve % 4'lük paketleyici jel hazırlandı. Kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein eklemek için numunelerin proteinleri ölçüldü. Buna göre 50 µgr proteinin kaç µl

çözeltide bulunduğu hesaplanarak her kuyucuğa ekilecek numune hacmi belirlendi. Doku homojenatı numune tamponu ile 1/1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır.

3.2.3. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örneklerle elektroforez uygulanarak protein bantları elde edildi. Daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A, anti NR2B, anti nACh α_7 , anti nACh α_4 ve anti nACh β_2 içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000MM cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör alt birimi için kendi arasında karşılaştırıldı (62).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirmeler SAWP Statistic programı kullanılarak yapıldı. Grupların verileri ortalama ve standart sapma dağılımları ile gösterilmiştir.

Gruplar kontrol dişi- gıda boyası dişi ve kontrol erkek- gıda boyası erkek olmak üzere 2'li karşılaştırıldı. Levene Homojenite testi yapıldı. Dağılım homojen olmadığı için non-parametrik test olan Mann-Whitney U testi ile 2'li karşılaştırmalar yapıldı.

İstatistik anlamlılık değeri %95 güven aralığında %5 hata payı ile $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Western Blot Analizi ile NR2A, NR2B, nAChR α 7, nAChR α 4 ve nAChR β 2 Reseptör Düzeyleri

Tablo 3'te reseptörlerin optik dansiteleri toplu olarak verilmiştir. Şekil 2-6'da her reseptörün western blot görüntü örnekleri, grafik 1-5'te ise reseptörlerin optik dansiteleri verilmiştir.

Reseptör konsantrasyonları değerlendirilirken her cins kendi içinde karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu optik dansite ortalaması 100 kabul edilmiş ve optik dansiteler her iki grupta da kendi kontrolüne göre hesaplanmıştır.

Tablo 3. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B, nAChR α 7, nAChR α 4 ve nAChR β 2 reseptörlerinin optik dansiteleri. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

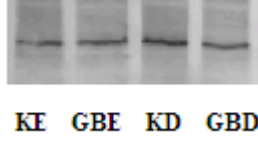
Gruplar	NR2A	NR2B	nAChR α 7	nAChR α 4	nAChR β 2
Kontrol Erkek (KE) (n=12)	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Gıda Boyası Erkek (GBE) (n=12)	100,67 \pm 13,05	117,00 \pm 3,61*	95,67 \pm 12,74	94,33 \pm 6,35*	106,70 \pm 5,98*
Kontrol Dişi (KD) (n=12)	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Gıda Boyası Dişi (GBD) (n=12)	103,33 \pm 7,09	86,00 \pm 6,56*	103,33 \pm 4,16	111,67 \pm 22,48	105,00 \pm 6,08

*: Kendi kontrolleriyle karşılaştırıldıklarında anlamlı gruplar ($p < 0,05$, Mann-Withney U testi).

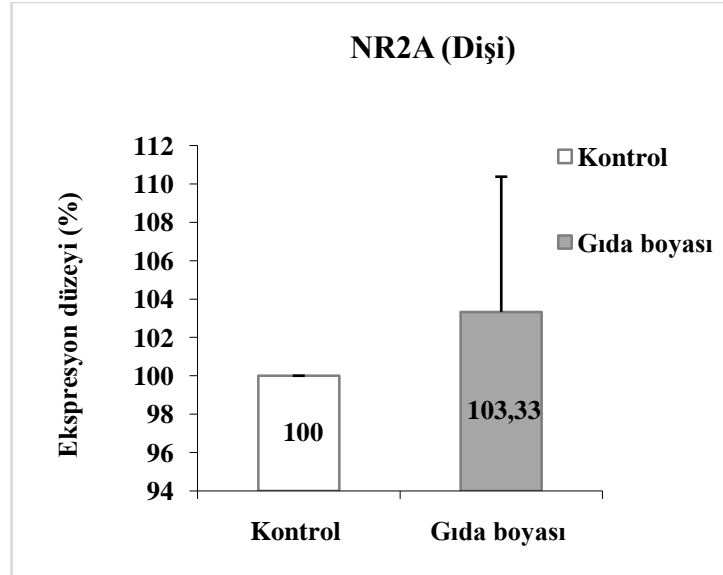
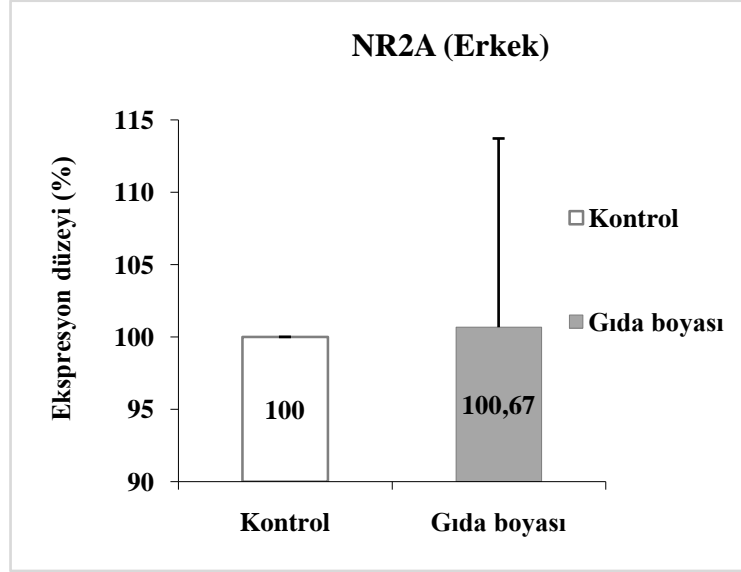
Tablo 3'te görüldüğü gibi, gıda boyası verilenlerde NR2B reseptör konsantrasyonları erkek sıçanlarda kontrol grubuna göre %17'lik bir artış gösterirken ($p < 0,05$) dişi sıçanlarda % 14'lük bir düşüş ($p < 0,05$) göstermiştir.

Gıda boyası verilen erkek sıçanlarda nAChR α 4 reseptör konsantrasyonu %5,67 azalırken, nAChR β 2 reseptörü %6,70 artmıştır (her ikisi için $p < 0,05$). Gıda boyası verilen dişi sıçanlarda ise her iki reseptörde de anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır ($p > 0,05$).

NR2A ve nAChR α 7 reseptörlerinde de her iki cinste kontrolleriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 2. NR2A'ya ait Western Blot örneği (KE: Kontrol Erkek, GBE: Gıda Boyası Erkek, KD: Kontrol Dişi, GBD: Gıda Boyası Dişi).

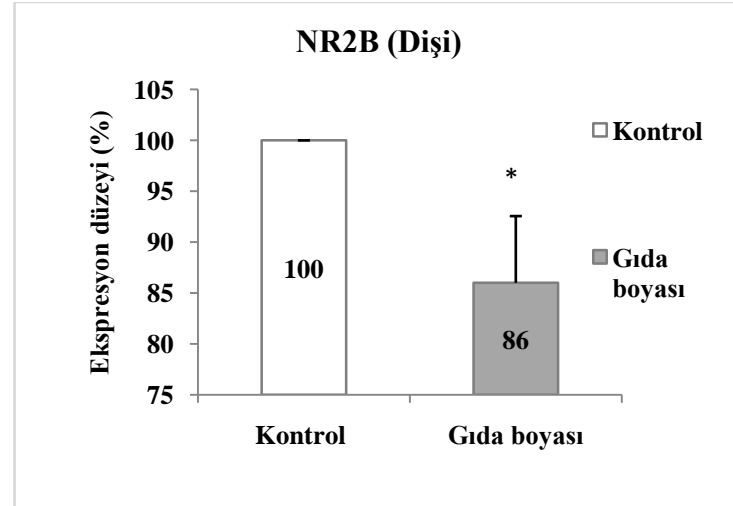
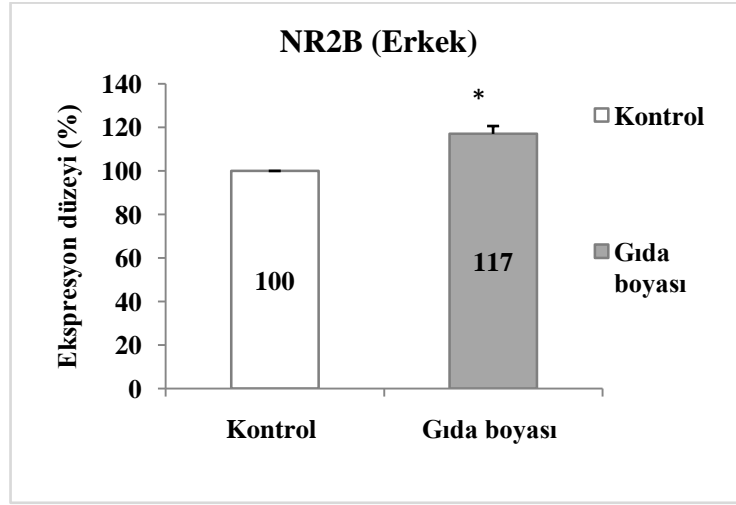


Grafik 1. NR2A'ya ait optik dansite sonuçları

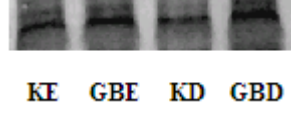


GBD KD GBE KE

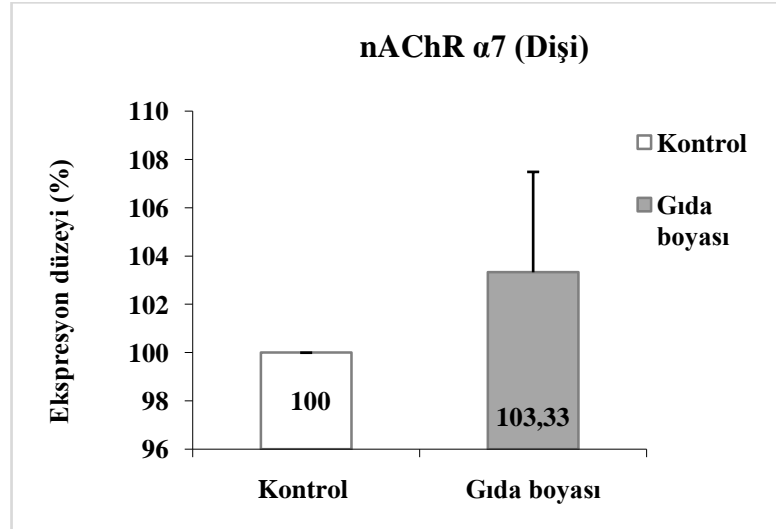
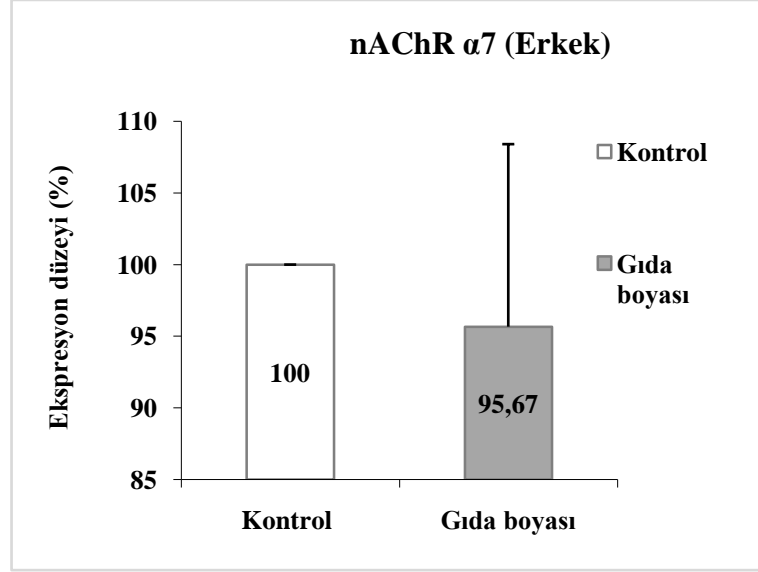
Şekil 3. NR2B'ye ait Western Blot örneği (KE: Kontrol Erkek, GBE: Gıda Boyası Erkek, KD: Kontrol Dişi, GBD: Gıda Boyası Dişi).



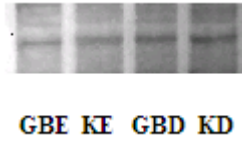
Grafik 2. NR2B'ye ait optik dansite sonuçları (*: Kontrolle karşılaştırıldığında anlamlılığı gösterir, $p < 0,05$, Mann-Withney U testi).



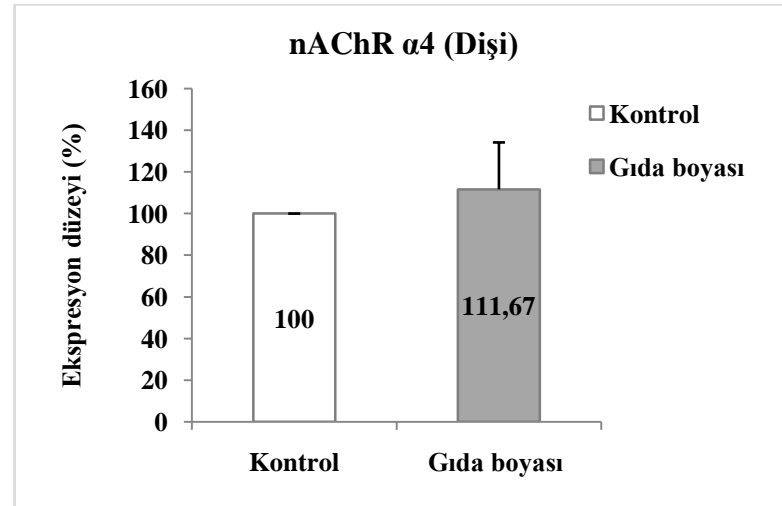
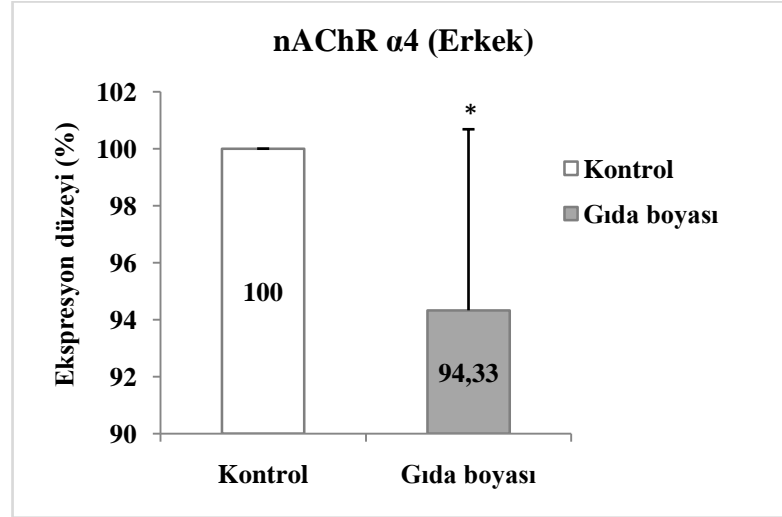
Şekil 4. nAChR $\alpha 7$ 'ye ait Western Blot örneği (KE: Kontrol Erkek, GBE: Gıda Boyası Erkek, KD: Kontrol Dişi, GBD: Gıda Boyası Dişi).



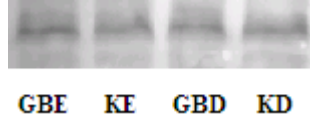
Grafik 3. nAChR $\alpha 7$ 'ye ait optik dansite sonuçları.



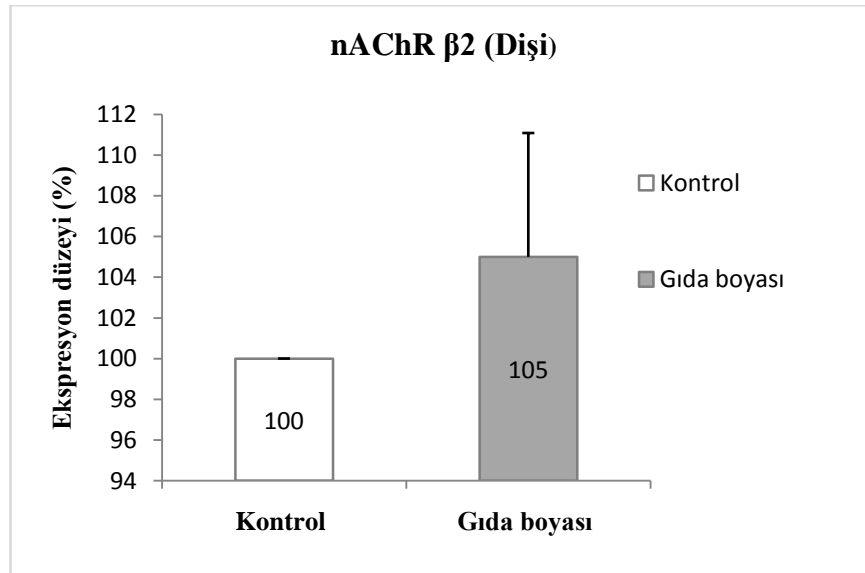
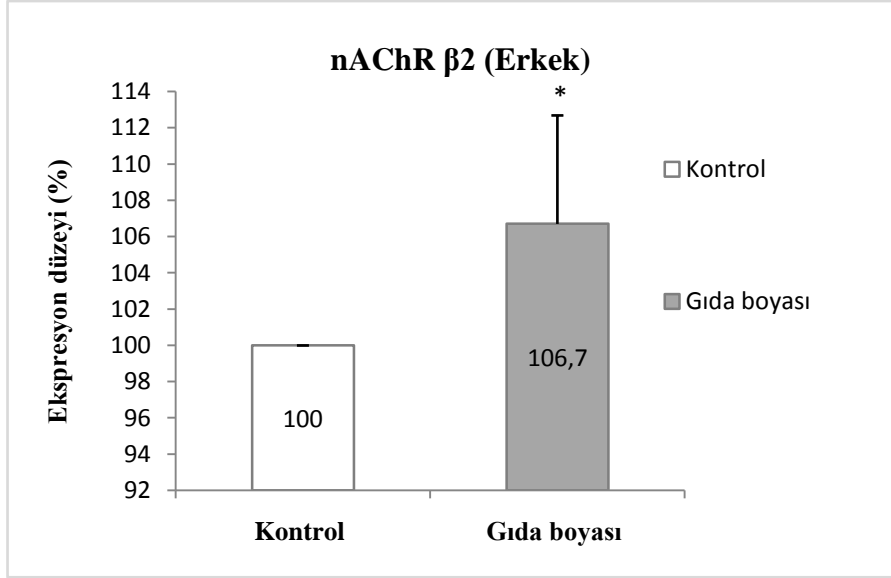
Şekil 5. nAChR $\alpha 4$ Western Blot örneği (KE: Kontrol Erkek, GBE: Gıda Boyası Erkek, KD: Kontrol Dişi, GBD: Gıda Boyası Dişi).



Grafik 4. nAChR $\alpha 4$ 'e ait optik dansite sonuçları (*: Kontrolle karşılaştırıldığında anlamlılığı gösterir, $p < 0,05$, Mann-Withney U testi).



Şekil 6. nAChR $\beta 2$ 'ye ait western blot örneği (KE: Kontrol Erkek, GBE: Gıda Boyası Erkek, KD: Kontrol Dişi, GBD: Gıda Boyası Dişi).



Grafik 5. nAChR $\beta 2$ 'ye ait optik dansite sonuçları (*: Kontrolle karşılaştırıldığında anlamlılığı gösterir, $p < 0,05$, Mann-Withney U testi).

6. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada anne karnında gıda boyalarına maruz kalan yavruların, erişkin hale geldiklerinde hipokampus bölgesindeki NMDA reseptör alt birimlerinden NR2A ve NR2B ile nACh reseptör alt birimlerinden nAChR $\alpha 4$, nAChR $\beta 2$ ve nAChR $\alpha 7$ düzeyleri araştırılmıştır. Sonuçta bazı reseptör düzeylerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıklar cinsiyete göre de değişkenlik göstermiştir. Gıda boyaları erkek sıçanlarda NR2B ve nAChR $\beta 2$ reseptör alt birimlerinin ekspresyonlarında artışa sebep olurken, nAChR $\alpha 4$ alt biriminde azalmaya yol açmıştır. Dişi sıçanlarda ise sadece NR2B ekspresyonunu azaltmıştır.

Çalışmamızda incelediğimiz NMDA ve nACh reseptörleri hipokampüste yaygın olarak bulunmaktadır. Bu reseptörler öğrenme, hafıza ve kavrama fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (15).

Gebeliğin 6.ayından doğumdan birkaç yıl sonrasına kadar olan kritik gelişme döneminde SSS dışarıdan gelen uyarılara daha duyarlıdır. Bu dönemde gıda katkılarına maruziyet, öğrenme ve davranış üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir (4,5,14). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, çeşitli katkı maddelerinin nöropsikiyatrik ve nörotoksik etkilerine işaret etmektedir. Ancak bu etkilerin SSS'de hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleşiyor olabileceği açık değildir. Bu yolağın NMDA reseptörleri ve nACh reseptörleri üzerinden olabileceği ya da bu reseptörlerin kısmen rol oynayabileceği düşüncesiyle bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Literatür taramalarında gıda katkı maddelerinin reseptör düzeylerine etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla tartışma, reseptörlerin işe karışabileceği öğrenme ve DEHB gibi konularla ilişkili literatürler üzerinden yapılmaya çalışılmıştır.

Katkı maddeleri ile öğrenme ve hiperaktivite ilişkisi deneysel modellerde ve hiperaktif çocuklar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Sıçanlar ile yapılan deneysel çalışmalardan birinde, neonatal dönemde maruz kalınan monosodyum glutamatın hipotalamusta nöronal nekroza yol açarak davranışsal anomalilere neden olduğu ve öğrenme kabiliyeti ve bilişsel fonksiyonları

azalttığı gösterilmiştir (63). Bir diğer araştırmada, Narayanan ve ark. 3 hafta süre ile oral monosodyum glutamat verilen periadelosan dönemdeki sıçanlarda hafıza ve davranışsal performansın olumsuz yönde etkilendiğini gözlemlemiş ve eşzamanlı verilen oral askorbik asidin, nöroprotektif etki göstererek hafıza ve davranışsal performans üzerine olan istenmeyen etkileri azaltıcı yönde etki ettiğini rapor etmişlerdir (64).

Sobotka ve ark. gebelik ve laktasyon döneminde %1-2 oranında tartrazin alan sıçanların dişi yavrularında hafif şiddette geçici nöromotor gelişimsel gecikmeler olduğunu göstermişlerdir (65).

Tanaka iki nesil üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, 5 haftalık dişi farelere bazı gıda katkı maddeleri vererek deneye başlamışlardır. 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. Bunun için labirent testi, yüzme testi, sırt üstü pozisyondan düz pozisyona geçme testi ve koku oryantasyonu testi gibi düzenekler kullanılmıştır. Çalışmada eritrosin, ponso 4R, sunset yellow FCF, amarant ve allura red AC'nin çeşitli konsantrasyonları ayrı ayrı uygulanarak bireysel etkileri ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Sonuçta eritrosin, ponso 4R, sunset yellow FCF, amarant ve allura red AC farelerin davranışsal parametrelerini ve öğrenme yetilerini olumsuz olarak etkilemiştir. Bu etkiler cinsiyete ve tüketilen katkı maddeleri miktarına göre farklılık göstermiştir (66-70).

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. Kontrol grubunda ise bu oran %12 olarak tespit edilmiştir (71).

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 görüntü 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 (72). Mattes, 1976 -1983 yılları arasındaki gıda katkı maddeleri ve hiperaktivite ilişkisini araştıran tüm raporları gözden geçirmiş ve Feingold diyeti ile hiperaktif belirtilerde azalma arasında belirgin bir ilişkinin olmadığını iddia etmiştir (73).

Borris ve Mandel, DEHB tanı kriterlerine uyan 26 çocuğun 19'unda Feingold'un katkılardan arındırılmış diyeti ile DEHB belirtilerinde belirgin gerileme gözlemlemişlerdir. Atopinin eşlik ettiği DEHB olan çocukların arındırılmış diyet tedavisine daha iyi yanıt verdiklerini rapor etmişlerdir (14).

Bateman ve ark. tarafından yapılan 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 kimyasal renklendirici ve koruyucuların diyetten çekilmesiyle hiperaktif davranışlarda belirgin bir azalma, bu maddelerin diyete eklenmesi ile anlamlı bir yükselme ortaya çıktığı ve bu değişikliğin altta yatan hastalıktan bağımsız olduğu gösterilmiştir (74).

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) çift kör ve randomize olarak eklemişler. (Karışım A: Tartrazin, ponso 4R, sunset yellow FCF, karmosin ve sodyum benzoat; karışım B: Kinolin sarısı, sunset yellow FCF, allura red, karmosin ve sodyum benzoat). 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 plaseboya 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 değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir (75).

Pelsser ve ark. DEHB tanısı almış 27 çocuk hastada katkı maddelerinden arındırılmış diyetin hastalık belirtileri üzerine etkisini araştırmış ve sonuçlar ebeveyn

ve öğretmenler tarafından değerlendirilmiştir. Ebeveyn değerlendirmesine göre çocukların %73'ünde, öğretmen değerlendirmesine göre ise %70'inde hastalık belirtilerinde gerileme olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise bu oranların sırasıyla %12 ve % 0 olduğu saptanmıştır (76).

Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesi ve belleğin oluşmasında sinaptik plastisitenin bir formu olan LTP rol oynamakta, LTP'nin indüksiyonu için ise NMDA reseptörlerine ihtiyaç bulunmaktadır (49,54). NMDA reseptör kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması sonucu postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu yükselmektedir. Ca^{+2} 'daki bu artış fosfoinozid düzeylerindeki yükselmeye birlikte çeşitli protein kinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu protein kinazlar daha sonra sinaptik plastisitede uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir. Öğrenme ve hafızada sinapsta gerçekleşen bu değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir (54).

NMDA reseptör alt birimlerinin ekspresyonları reseptörün fonksiyonunu belirlemede önemlidir. Farklı düzeyde eksprese olmaları farklı etkiler ortaya çıkarır. Farklı klinik tablolarda farklı alt birimlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Öğrenme ve belleğin bozulduğu yaşlı sıçanlarda NR2B alt birimi ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı fakat NR2A alt birim ekspresyonunun değişmediği görülmüştür (77). Alzheimer hastalarının beyinlerinde hem nöronal nACh reseptörlerinin hem de NMDA reseptörlerinin aşağı doğru düzenlendiği (down regulasyona uğradığı) görülmüştür (78). NMDA reseptörlerinin, özellikle de NR2B alt birimlerinin azalmasının, hafıza bozukluğuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. NR2B alt biriminin artmış ekspresyonunun mekânsal öğrenme ve hafızayı arttırdığı görülmüştür (79). Bizim çalışmamızda NR2B erkeklerde artarken dişilerde azalmıştır. Bu sonuçlar erkeklerde öğrenmenin lehine, dişilerde aleyhine gibi değerlendirilebilirse de, bu çalışmada hafıza ve öğrenme deneyleri yer almadığından NR2B ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ile öğrenme ve hafıza olgusunun direkt ilişkilendirilmesi doğru olmayabilir.

Diğer yandan, NMDA reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ise eksitotoksositeye yol açarak sinir harabiyetine neden olabilmektedir (80). Postsinaptik eksitatör membran reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu Ca^{+2} bağımlı voltaj kanalları

açılarak protein kinaz, fosfolipaz, proteaz, nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin aktivasyonlarını içeren bir olaylar dizisi başlar ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Eksitotoksisitenin geliştiği bu olaylarda NMDA reseptörleri, Ca^{+2} 'a karşı yüksek geçirgenliğinden dolayı diğer eksitator aminoasit reseptörlerine göre daha baskın rol oynamaktadır (81) Eksitotoksisitenin oluşmasında ikinci bir mekanizma da eksitator aminoasit reseptörlerinin yetersiz uyarılması sonucu apoptozisin tetiklenerek sinir harabiyetinin gelişmesidir (82).

Bizim çalışmamızda erkek sıçanlarda NR2B ve nAChR $\beta 2$ artmış, nAChR $\alpha 4$ ise azalmıştır. Dişi sıçanlarda ise NR2B azalmıştır. Bu sonuçlar reseptör düzeylerinde farklı etkilenmeler olduğunu göstermektedir. Reseptör ekspresyonlarında oluşan değişiklikler, yukarıda anlatılan mekanizmalar üzerinden eksitotoksisite meydana getirerek daha önceki çalışmalarda da ortaya konan katkı maddeleri aracılı nörotoksisiteden sorumlu olabilir.

NR2A doğumdan sonra sentezlenmeye başlamaktadır (48,49). Bu çalışmada NR2A düzeylerinde hem erkek hem de dişilerde bir farklılık bulunmamıştır. Embriyonik dönemde NR2A sentezi olmadığı için bu dönemdeki bir maruziyetten NR2A düzeylerinin etkilenmemesi beklenen bir sonuçtur.

Lau ve ark. sinir hücresi kültürlerine çeşitli gıda katkı maddelerini uygulayarak nörotoksisite geliştiğini saptamışlardır. Çalışmalarında aspartam ve L glutamik asit kaynaklı nörotoksisitenin NMDA reseptör antagonisti verilerek önlendiğini ancak kinolin sarısı ve brilliant blue FCF kaynaklı nörotoksisitenin geri dönmediğini ortaya koymuşlardır. Sonuçta kinolin sarısı ve brilliant blue FCF'nin sebep olduğu nörotoksisiteden NMDA reseptörlerinin sorumlu olmadığını savunmuşlardır (83). Bu sonuçlar bizim yorumlarımızla bir çelişki oluşturuyor gibi görünmektedir. Ancak bu araştırma, öncelikle in vitro bir deney olması, uygulama süre ve doz farklılıkları açısından bizim çalışmamızdan ayrılmaktadır. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında direkt olarak NMDA reseptör düzeylerini ölçmemişlerdir. Yorumlarını NMDA reseptör antagonistleri üzerinden dolaylı olarak yapmaya çalışmışlardır. Bizim çalışmamız ise in vivo olarak düzenlenen ve direkt reseptör ekspresyonlarının ölçüldüğü bir çalışmadır. Bu yüzden NMDA reseptör ekspresyonlarındaki değişiklik nörotoksisite lehine yorumlanabilir.

Çalışmamızda erkek ve dişilerde aynı katkı maddelerine farklı cevaplar elde ettik. Bir etkenin erkek ve dişiler üzerinde farklı etkiler gösterebilmesi birçok nedenden dolayı mümkündür. Nitekim Tanaka çeşitli katkı maddelerini farelere uygulamış ve öğrenme ve davranış testlerinde cinsiyetler arasında farklar olduğunu tespit etmişlerdir (66-70).

Biyolojik sistemler, düzenleyici bir işarete karşı üç tip zamansal yanıt verir. A tip yanıt, uyarıcı işaretin sürekli varlığına bağımlı olarak, gen ifade hızında bir artışla karakterizedir. Uyarıcı ortadan kalktığında gen ifade hızı bazal düzeye iner. B tip yanıt, düzenleyici işaret devamlı kalsa dahi gen ifadesinde geçici bir hız artışı olmasını gösterir. Düzenleyici işaret sonlandıktan ve hücreye kendi haline dönmesine izin verildikten sonra, tekrar düzenleyici bir işaret verilmesine ikinci bir geçici yanıt verildiği gözlenebilir. C tip yanıt, düzenleyici bir işarete karşı, hatta bu işaret ortadan kalktıktan sonra dahi gen ifade hızında sürekli kalan bir artışı belirler (84). Bizim çalışmamızda, anne karnında maruz kalınan katkı maddelerinin bazı olumsuz etkilerinin erişkin dönemde ortaya çıkması veya erişkin dönemde de devam etmesi, genlerin bu maddelere verdiği C tip zamansal yanıtla ilişkili olabilir.

Anne karnında gıda boyalarına maruziyet erişkin dönemde öğrenmede rol oynayan reseptörlerin bazılarının düzeylerini etkilemektedir. Bu etki cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Reseptör düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri katkı maddelerinin sebep olduğu öne sürülen nörotoksisite ile ilişkili olabilir. Ancak bu değişikliklerin fonksiyonel olarak bir etki oluşturup oluşturmadığının tam olarak tespit edilebilmesi için öğrenme deneyleri; nörotoksisitenin ortaya konması için ise nöron sayımı ve histopatolojik düzeyde incelemeleri içeren daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra ortaya çıkan etkinin, karışım halinde verilen gıda boyalarının hangilerinden kaynaklandığının ve bu boyaların sinerjistik etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi açısından her bir renk maddesinin hem ayrı ayrı hem de farklı kombinasyonlarının değerlendirildiği ileri çalışmalar planlanmalıdır.

ÖZET

Doğum Öncesi Maruz Kalınan Sentetik Gıda Boyalarının Öğrenmede Rol Alan Reseptörler Üzerine Etkisinin Araştırılması

Son yıllarda gıda katkı maddelerinin kullanımında belirgin artış vardır. Gebeliğin altıncı ayından doğum sonrası ilk birkaç yıla kadar olan dönem insanlar için kritik gelişme dönemidir. Bu dönemde gıda katkı maddelerine maruziyetin, çocuklarda bazı davranışsal ve gelişimsel rahatsızlıklara ve öğrenme problemlerine yol açtığı iddia edilmektedir. Katkı maddelerinin öğrenme üzerine etkilerinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. NMDA ve nACh reseptörlerinin öğrenme ve hafızada rol oynadığı düşünülmektedir. Bu amaçla, çalışmamızda doğum öncesi maruz kalınan sentetik gıda renklendiricilerinin NMDA reseptörü alt birimlerinden NR2A ve NR2B ile nACh reseptörü alt birimlerinden nAChRs; $\alpha 7$, $\alpha 4$ ve $\beta 2$ üzerine etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda 30 adet dişi sıçan kontrol grubu ve gıda boyası grubu olmak üzere iki eşit gruba bölündü. Gıda boyası grubuna, gebe kalmalarından bir hafta önce başlanarak gebelik sonlanıncaya kadar dört hafta boyunca, sık kullanılan dokuz sentetik renklendirici karışım halinde günlük olarak verildi. Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak içme suyu verildi. Doğan yavrular üç aylık olduklarında, her bir gruptan 12 dişi ve 12 erkek yavru sıçan rastgele seçildi. Seçilen sıçanların hipokampusleri çıkarılarak homojenatlarında NR2A, NR2B alt birimleri ve nACh reseptörü $\alpha 7$, $\alpha 4$, $\beta 2$ alt birimleri Western Blot yöntemi ile çalışıldı. NR2A ve nAChR $\alpha 7$ reseptör ekspresyonu açısından her iki cinsiyette de kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). Gıda boyasına maruz kalan erkek sıçanlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında NR2B ve nAChR $\beta 2$ reseptör ekspresyonunda sırası ile %17'lik ve %6,70'lik artış, nAChR $\alpha 4$ reseptör ekspresyonunda ise %5,67 azalma saptandı ($p < 0,05$). Gıda boyasına maruz kalan dişi sıçanlarda ise NR2B reseptör ekspresyonunda % 14'lük azalma gözlemlendi ($p < 0,05$).

Anne karnında gıda boyalarına maruziyet erişkin dönemde öğrenmede rol alan reseptörlerin bazılarının düzeylerini etkilemektedir. Bu etki cinsiyete göre farklılık göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Sentetik gıda renklendiricileri, NMDA reseptör, nACh reseptör

SUMMARY

Investigation of the Effects of Artificial Food Colorings, Exposed During Prenatal Term Via Mothers Diet, On The Receptors Involved in Learning And Memory

Recently, there has been a significant increase in the use of food additives. Exposure to food additives during the critical development window, which in humans extends from the sixth month of gestation to several years after birth, has been implicated in the induction and severity of some childhood behavioral and developmental disorders and learning disabilities. However, the mechanism of these effects of food additives on learning remains unclear. NMDARs and nAChRs are thought to be effective at learning and memory process. In this study, we aim to investigate the effects of intrauterine exposure to synthetic food colors on subunit concentration of NMDARs; NR2A and NR2B and nAChRs; $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ isoforms in rats.

Thirteen female rats were equally divided into two groups as control group and food color group. A mixture of nine food colors was given daily to the food color group during period of four weeks from the preconception to birth. The control group was given tap water during the same period. Three months after birth 12 male and 12 female offspring from the each group were selected randomly. Their hippocampi were extracted and NR2A, NR2B subunits and nAChR $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ isoforms were assessed by Western Blotting analysis. NR2A and nAChR $\alpha 7$ expression of the groups were not statistically significant ($p > 0,05$). NR2B and nAChR $\beta 2$ expression were significantly increased (respectively 17% and 6.70%) in male offspring exposed to food colors compared with the control, whereas nAChR $\alpha 4$ was significantly decreased (5.67%) ($p < 0,05$). In female offspring exposed to food colors, only NR2B expression was significantly decreased compared with the control (14%) ($p < 0,05$).

The results indicate that exposure to synthetic food colors during fetal period in rats may lead to alterations of expression of NMDA and nACh receptors in adulthood. These alterations differ according to sex.

Keywords: Artificial food colourings, NMDARs and nAChRs

KAYNAKLAR

1. Yılmaz Ö, Türkteş İ. Besin katkı madde reaksiyonları. *T Klin Allerji-Astım* 2003; 5:91-95.
2. Mantovani A, Maranghi F, Purificato I, Macri A. Assessment of feed additives and contaminants: an essential component of food safety. *Ann Ist Super Sanita* 2006;42(4):427-32.
3. Wüthrich B. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy* 1993; 71: 379-84.
4. Feingold BF: Hyperkinesis and learning disabilities linked to the ingestion of artificial food colors and flavors. *J Learn Disabilities* 1976; 9:19-27.
5. Feingold BF: Food Additives and Hyperkinesis: Letter to the editor. *J Learn Disabilities* 1977; 10:64-6.
6. Eigenmann PA, Haenggeli CA. Food colourings and preservatives allergy and hyperactivity. *Lancet* 2004; 364:823-4.
7. Conners CK, Goyette CH, Southwick DA, Lees JM, Andrulonis PA. Food additives and hyperkinesis: a controlled double-blind experiment. *Pediatrics* 1976;58(2):154-66.
8. Conners CK. Food Additives and Hyperactive Children. (New York: Plenum Press, 1980), pp. 45-54.
9. Harley JP, Matthews CG. The hyperactive child and the Feingold controversy. *Am Pharm.* 1978 ;18(6):44-6
10. Harley JP, Matthews CG, Eichman P Synthetic food colors and hyperactivity in children: a double-blind challenge experiment. *Pediatrics* 1978 ;62(6):975-83.
11. Spring C, Vermeersch J, Blunden D, Sterling H. Case studies of effects of artificial food colors on hyperactivity. *J Special Education* 1981;15:361-372.
12. Doğruyol H. Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları; Çocukluk Hiperaktivitesi. *Güncel Pediatri* 2006; 2: 42-8.
13. Mattes JA, Gittelman R. Effects of artificial food colorings in children with hyperactive symptoms. A critical review and results of a controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 1981;38(6):714-8
14. Boris M, Mandel FS. Foods and additives are common causes of the attention deficit hyperactive disorder in children. *Ann Allergy* 1994;72(5):462-8.
15. Yakamura T, Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology* 1999; 59:279-298.
16. Altuğ T. Gıda Katkı Maddeleri. In: Altuğ T, 3. Baskı, İzmir: Sidas Medya Ltd Şti, 2009:1-16.
17. Çalışır ZE, Çalışkan D. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Ecz Fak Derg* 2003;32 (3):207-206.
18. Saldamlı İ, Uygun Ü. Gıda katkı maddeleri. In: Saldamlı İ, Ankara: 2007: 533-577.
19. Saldamlı İ. Gıda Kimyası. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1998: 489-495,
20. <http://www.kkgm.gov.tr/yonetmelik/560.html> (Erişim tarihi 07.08 2010).
21. <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/Arama.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF4376734BED947CDE> (Erişim 10 Ağustos 2010).
22. Griffiths JC. Coloring Foods and Beverages. *Food Technology* 2005; 59: 38-44.
23. Erdoğan Y. Çeşitli Gıda katkı Maddelerinden Allium Ceba L.'de Mitöz bölünme, Kromozomlar ve DNA Miktarı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
24. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/1c542dfe6e4fc3d_ek.pdf?tipi=14&sube= (erişim tarihi 07.08.2010)
25. Yılmaz S. Gıda katkı maddeleri ve genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
26. <http://www.kkgm.gov.tr/kanun/5179.html> (Erişim tarihi, 06.07.2010)
27. Atman CÜ. Gıda katkı maddeleri ve gıda kontrolü *STED* 2004;13(3):86-8.

28. Dinç M. Gıdalara Katılan Bazı Suda Çözünen Sentetik Boyaların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
29. Demirdağ K, Uysal V. Renklendiriciler. In: Altuğ T, 3. Baskı, İzmir: Sidas Medya Ltd Şti, 2009:169-191.
30. Erdoğan Ş. Ankara Piyasasında Satışa sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
31. <http://www.food-info.net/tr/e/e100-200.htm> (Erişim tarihi 07.08.2010)
32. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-174.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
33. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-329.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
34. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-011.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
35. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph5/additive-450-m5.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
36. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-458.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
37. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-018.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
38. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/additive-059-m1.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
39. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-050.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
40. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph10/additive-234-m10.pdf> (Erişim tarihi 15.08.2010).
41. Wilson BG, Bahna SL. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005 ;95(6):499-507.
42. Simon R. Update on sulfite sensitivity. *Allergy* 1998;53: 78-9.
43. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomi, 4. Baskı (çeviri), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.
44. Dere F. Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji. Birinci baskı, Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, 1990.
45. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 1987;54: 581-618.
46. Heresco U. Glutamatergic neurotransmission modulation mechanisms of antipsychotic atypicality. *Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003;23: 1113-1123.
47. Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research*. 1999; 69: 164-170.
48. Cull-Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001.
49. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*. 2002; 25: 571-577
50. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research* 1999; 36(2-3): 189-204.
51. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 1999; 29(1): 83-120.
52. Smith Y, Charara A, Paquet M, Kieval JZ, Paré JF, Jesse E. Ionotropic and metabotropic GABA and glutamate receptors in primate basal ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001; 22(1-2): 13-42.
53. Petrie RXA, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. *Pharmacology and therapeutics* 2000; 7:11-25.

54. Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 2002; 25:571-577.
55. Candelario-Jalile E, Gonzalez-Falcon E. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* 2004; 1007:98-108.
56. Khanduja KL, Sohi KK. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. *Life Sciences* 2006; 78: 1662-1669.
57. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı. Bölüm 6: Santral sinir sisteminin farmakolojisinin temelleri, Bölüm 7: Kolinjerjik Sistem. 2000.
58. Kara Y. Kronik asetil salisilik asit ve c vitamini uygulamasının yaşlı sıçanlarda uzamsal hafıza, NMDA reseptörlerinden NR2a, NR2b ve nikotinik kolinjerjik asetilkolin reseptörlerinden $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ subtiplerine etkileri, Uzmanlık Tezi, Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya anabilim Dalı, 2009.
59. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Brickford PC, Tighe T, Sanberg PS. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences* 2002; 71.
60. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh Receptors, *Trends in Neurosciences* 1997; 20: 92-98
61. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-689.
62. Delibas N, Doguc DK, Sutcu R, Eroglu E, Gökalp O. Effect of Nicotine on hippocampal nicotinic acetyl choline $\alpha 7$ receptor and NMDA receptor subunits 2A and 2B expression in young and old rats. *International Journal of Neuroscience* 2005;115 (8):1151-1163.
63. Ali MM, Bawari M, Misra UK, Babu GN. Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-L-glutamate during early life. *Neurosci Lett* 2000;284(1-2):57-60.
64. Narayanan SN, Kumar RS, Paval J, Nayak S. Effect of ascorbic acid on the monosodium glutamate-induced neurobehavioral changes in periadolescent rats. *Bratisl Lek Listy* 2010;111(5):247-52.
65. Sobotka TJ, Brodie RE, Spaid SL. Tartrazine and the developing nervous system of rats. *J Toxicol Environ Health* 1977;2(5):1211-20.
66. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of Sunset yellow FCF administered to mice in the diet. *Toxicol Ind Health* 1996 Jan-Feb;12(1):69-79.
67. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol* 2006 ;44(10):1651-8.
68. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of amaranth administered to mice in drinking water. *Toxicol Ind Health* 1993;9(6):1027-35.
69. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioral effects of Allura Red AC administered to mice in the diet. *Toxicology* 1994;92(1-3):169-77.
70. Reproductive and neurobehavioral toxicity study of erythrosine administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol* 2001;39(5):447-54.
71. Ward NI. Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. *J Nutrition Environ Med* 1997;7:333-342.
72. Mattes JA, Gittelman R. Effects of artificial food colorings in children with hyperactive symptoms. A critical review and results of a controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 1981;38(6):714-8
73. Mattes JA. The Feingold diet: a current reappraisal. *J Learn Disabil* 1983;16(6):319-23.
74. Bateman B, Warner JO, Hutchinson E, et al . The effects of double blind, placebo controlled, artificial food colorings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Arch Dis Child* 2004; 89:506-11.
75. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, Warner JO, Stevenson J. 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. *Lancet* 2007;370(9598):1560-7.

76. Pelsser LM, Frankena K, Toorman J, Savelkoul HF, Pereira RR, Buitelaar JK. A randomised controlled trial into the effects of food on ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2009;18(1):12-9.
77. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of disease* 2004; 15:80-92.
78. Narahashi T, Marszalec W. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. *Life Sciences* 2003; 74:281-291.
79. Mesches H, Gemma C. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged Fischer 344 rats. *Neurobiology of aging* 2004; 25: 315-324.
80. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995;18(2):57-8.
81. Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* 1992;6(15):3338-44.
82. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283(5398):70-4.
83. Lau K, McLean WG, Williams DP, Howard CV. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicol Sci.* 2006; 90(1):178-87.
84. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. Regulation of Gene Expression, Harper's Illustrated Biochemistry 28th ed, New York: McGraw Hill, 2009: Bölüm 39.