BESİN KORUYUCULARIN SIÇAN DOKULARINDA SİALİK ASİT DÜZEYLERİ VE MEMBRAN GLİKOZAMİNOGLİKANLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Elvan BAKAR

DOKTORA TEZİ

2008 – EDİRNE

Danışman
Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Koruyucuların Sıçan Dokularında Sialik Asit Düzeyleri ve Membran Glikozaminoglikanları Üzerine Etkileri

Elvan BAKAR

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

2008

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Koruyucuların Sıçan Dokularında Sialik Asit Düzeyleri ve Membran Glikozaminoglikanları Üzerine Etkileri

Elvan BAKAR

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 04/04/08 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ
(Danışman)

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Prof. Dr. Firuzan DANE

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

ÖZET

Bu çalışmada, hazır gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve sitrik asitin, sıçan karaciğer ve böbrek dokuları glikozaminoglikanları (GAG) ve sialik asitleri üzerindeki etkileri histolojik ve biyokimyasal olarak incelendi.

Sodyum benzoat (2442 mg/kg/gün) ve sitrik asit (7020 mg/kg/gün) 10 gün süreyle günde bir defa olmak üzere gavaj yoluyla hayvanlara uygulandı. On günlük deney süresinin sonunda yapılan incelemelerde :

1) Hayvanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi;

2) Organ ağırlıkları ölçümlerinde, sadece sitrik asit grubunun karaciğerinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0.05$);

3) Serum sialik asitinin sodyum benzoat grubuna ait hayvanlarda önemli ölçüde azaldığı ($p< 0.05$), sitrik asit grubunda ise anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü;

4) Sodyum benzoat grubuna ait hayvanların hem karaciğer hem de böbrek dokularında sialik asit miktarlarının önemli olarak azaldığı ($p< 0.0001$), sitrik asit grubunda ise karaciğer dokusunda anlamlı bir değişiklik görülmez iken, böbrek dokusunda sialik asit seviyesinin önemli olarak arttığı saptandı ($p< 0.0001$).

5) Mikroskobik incelemeler sonucunda, sitrik asit ve sodyum benzoatın hem karaciğer hem de böbrekte dejeneratif değişikliklere neden olduğu gözlendi.

6) Nötral GAG'ların gösterilmesi için yapılan Periodik asid-Schiff (PAS), asidik GAG'lar için Alcian blue (AB) uygulaması sonucunda, karaciğerde nötral GAG' ların daha çok ekstraselüler alanlarda, buna karşılık asidik GAG' ların intraselüler alanlarda yoğunlaştığı görüldü. Sitrik asit uygulamasının GAG' larda azalmaya neden olduğu, sodyum benzoat uygulamasının ise nötral GAG'larda azalma meydana getirirken, asidik GAG'ların artışına neden olduğu gözlendi. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde asidik GAG'ların çok az, nötral GAG'ların yoğun olduğu; medulla bölgesinde ise, nötral GAG'ların ve asidik GAG'ların kortekse oranla daha yoğun olduğu gözlendi. Sitrik asit ve sodyum benzoat uygulamasının böbrek GAG'larında artış meydana getirdiği görüldü.

7) Membranlarda sialik asitlerin görülebilmesi için yapılan rutenyum kırmızısı (RR) uygulaması sonucunda, karaciğerde sitrik aside bağlı önemli bir değişiklik görülmez iken, böbrek dokusunda tubül hücelerinin mikrovilluslarında boyanmanın

daha belirgin olduğu gözlendi. Sodyum benzoat grubunda ise, hem karaciğer hem de böbrekte RR boyanması açısından kontrol grubuna oranla çok belirgin bir fark görülmedi.

Anahtar kelimeler: Glikozaminoglikan, sialik asit, besin koruyucu, karaciğer, böbrek, sıçan.

ABSTRACT

In this study, histological and biochemical effects of the sodium benzoate and citric acid, which are used as an addition agent in ready food, on glicasaminoglycane (GAG) and sialic acid of the rat liver and kidney tissues were investigated.

Sodium benzoate (2442 mg/kg/gün) and citric acid (7020 mg/kg/gün) were given to the animals once a day for ten days via gavage. At the end of the experimental period, following results were obtained:

1- No significant change in the body weight of the animals was observed.

2- In the organ weight measurements, the only significant rise was determined in the liver of citric acid group ($p<0.05$).

3- It was determined that serum sialic acid decreased significantly in sodium benzoate group ($p< 0.05$) and that there is no significant change in the sitric acid group.

4- It was determined that the amount of total sialic acid decreased significantly in both liver and kidney tissues of animals in the group of sodium benzoate ($p< 0.0001$). Although there was no significant change in liver of sitric acid group, the amount of total sialic acid level increased significantly in the kidney tissues ($p< 0.0001$).

5- As a result of microscobic investigation, it was observed that sodium benzoate and sitric acid caused degenerative changes both in liver and kidney.

6- As a result of asidic GAGs for Alcian Blue (AB) and Periodic acid-Schiff (PAS) for Neutral GAGs application, it was determined that neutral GAGs were existent more in extracellular area, but acidic GAGs were denser in intracellular area in liver. It was observed that citric acid caused decrease in GAGs, on the other hand sodium benzoate caused decrease in neutral GAGs and caused increase in acidic GAGs. In kidney tissues, acidic GAGs were very few but neutral GAGs were dense in cortex area; but in medullar area, neutral GAGs and acidic GAGs were denser than cortex area. It was observed that Sitric acid and sodium benzoate application caused increases in kidney GAGs.

7- As a result of Rutenium Red (RR) application which was conducted in order to determine sialic acid in membrane, no significant change occured in liver, but it was seen that stained parts were more clear in microvilli of tubular cells of kidney tissues.

There wasn't much difference for RR staining in sodium benzoate group in proportion to control group both in liver and kidney.

Key words: Glicasaminoglycanes, sialic acid, food protective, liver, kidney, rat.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yürütülmesi esnasında bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren T.Ü. Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı ve Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı değerli Hocam Prof. Dr. Tülin AKTAÇ Hanımefendiye, Biyoloji Bölümünde görev yapan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Ayşegül KABOĞLU'na, 2006 yılında hayatını kaybeden ve rahmetle andığım T.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Müberra UYGUN'a, T.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Gülnür KIZILAY'a içtenlikle teşekkür ederim. Deney Hayvanlarının bakımı ve beslenmeleri esnasında göstermiş olduğu anlayış ve desteklerinden dolayı T.Ü. Deney Hayvanları Biriminde görev yapan Veteriner Hekim Ziya ÇUKUR ve ekibine minnetle teşekkür ederim. Ayrıca her an manevi desteklerini hissettiğim sevgili aileme, eşime ve tüm hoşgörüleri için biricik kızıma sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Besin Koruyucuların Sıçan Dokularında Sialik Asit Düzeyleri ve Membran Glikozaminoglikanları Üzerine Etkileri' başlıklı 651 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın istatiksel analizleri Trakya Üniversitesi Merkez Kütüphane bünyesine bağlı İstatistik Bürosunda yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **I**
ABSTRACT ..... **III**
TEŞEKKÜR ..... **V**
İÇİNDEKİLER ..... **I**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **VIII**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **X**
KISALTMALAR ..... **XI**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **5**
2.1.KARACİĞER 5
2.2.BÖBREK 8
2.3.KARBOHİDRATLAR 12
2.3.1. Glukokonjugatlar 13
2.4.SİALİK ASİTLER 15
2.4.1. Sialik asitin metabolizması 21
2.5.GIDA KATKI MADDELERİ 25
2.5.1. Sodyum benzoat 28
2.5.2. Sitrik asit 30
3. MATERYAL VE METOT **32**
3.1. KULLANILAN HAYVANLAR VE KİMYASAL MADDE DOZLARI 32
3.2. BİYOKİMYASAL İNCELEME 32
3.2.1. Sialik asit standart grafiklerinin hazırlanışı 32
3.2.2. Serum sialik asit ölçümü 33
3.2.3. Doku sialik asit ölçümü 34
3.2.4. İstatistiksel analizler 34
3.3.MİKROSKOBİK İNCELEME 34
3.3.1. Işık Mikroskobu 34
3.3.2. Elektron Mikroskobu 35
4. BULGULAR **39**
4.1.VÜCUT AĞIRLIĞI VE ORGAN AĞIRLIĞI SONUÇLARI 39
4.2.SERUM SİALİK ASİT SONUÇLARI 39
4.3.DOKU SİALİK ASİT SONUÇLARI 40
4.4.IŞIK MİKROSKOBU BULGULARI 40
4.4.1. Karaciğer dokusu üzerindeki etkiler 40
4.4.1.1. Hematoksilen-Eozin ile boyama 40
4.4.1.2. Alcian-Blue (AB) ve Periodik Asid-Schiff (PAS) ile boyama 43

4.4.2. Böbrek dokusu üzerindeki etkiler 45
4.4.2.1. Hematoksilen-Eozin ile boyama 45
4.4.2.2. Alcian-Blue (AB) ve Periodik Asid-Schiff (PAS) ile boyama 49
4.5.ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR..... 56
4.5.1. Morfolojik inceleme..... 56
4.5.1.1.Karaciğer..... 56
4.5.1.2. Böbrek..... 60
4.5.2. Rutenyum Kırmızısı (RR) ile Sialik Asitlerin İncelenmesi 62
4.5.2.1. Karaciğer 62
4.5.2.2. Böbrek..... 66

5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 70

6. KAYNAKLAR 76

7. ÖZGEÇMİŞ..... 90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1 : Karaciğer dokusunun genel histolojik yapısı (Şematik) 7
Şekil 2.1.2 : Karaciğer lobülleri ve hepatik asinus (Şematik) 8
Şekil 2.1.3 : Karaciğer hepatik asinusu içindeki bölgeler (Şematik) 8
Şekil 2.2.1: Böbrek dokusu genel organizasyonu 11
Şekil2.2.2:Glomerular yapı 11
Şekil2.2.3: Böbrek histolojik yapısı 12
Şekil2.4.1:Sialikasitin (piranoz form) molekül yapısı 16
Şekil 2.4.2 : Sialik asit biyosentez basamakları 23
Şekil 2.4.3 : Sialik asitin hücre içi biyosentez ve membrana taşınma yolu 24
Şekil2.5.1.1:Benzoik asit ve Sodyum benzoat'ın moleküler yapıları 29
Şekil 2.5.2.1: Sitrik Asit (Monohidrat)'in moleküler yapısı 30
Şekil 3.1.1.1 : Serum Sialik Asit Standart Grafiği 33
Şekil 3.1.1.2 : Doku Sialik Asit Standart Grafiği 33
Şekil 4.4.1.1.1 : Kontrol grubu karaciğer dokusu (H-E) 41
Şekil 4.4.1.1.2 : Sitrik asit grubuna ait karaciğer dokusu (H-E) 41
Şekil 4.4.1.1.3 : Sitrik asit grubuna ait karaciğer dokusu (H-E) 42
Şekil 4.4.1.1.4 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu (H-E) 42
Şekil 4.4.1.2.1 : Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (AB-PAS boyanma) 43
Şekil 4.4.1.2.2 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu (AB-PAS) 44
Şekil 4.4.1.2.3 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu (AB-PAS) 44
Şekil 4.4.1.2.4 : Sodyum benzoat grubuna ait karaciğer dokusu (AB-PAS) 45
Şekil 4.4.2.1.1 : Kontrol grubuna ait böbrek dokusu (H-E) 46
Şekil 4.4.2.1.2 : Sitrik asit grubuna ait böbrek dokusu (H-E) 46
Şekil 4.4.2.1.3 : Sitrik asit grubu böbrek dokusu (H-E) 47
Şekil 4.4.2.1.4 : Sitrik asit grubuna ait böbrek dokusu (H-E) 47
Şekil 4.4.2.1.5 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu (H-E) 48
Şekil 4.4.2.1.6 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu (H-E) 48
Şekil 4.4.2.1.7 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu (H-E) 49
Şekil 4.4.2.2.1 : Kontrol grubuna ait böbrek korteks dokusu (AB-PAS) 50
Şekil 4.4.2.2.2 : Kontrol grubu böbrek korteks dokusu (AB-PAS) 51

Şekil 4.4.2.2.3 : Kontrol grubu böbrek medulla dokusu (AB-PAS) 51
Şekil 4.4.2.2.4 : Sitrik asit grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS) 52
Şekil 4.4.2.2.5 : Sitrik asit grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS) 52
Şekil 4.4.2.2.6 : Sitrik asit grubu (AB-PAS)..... 53
Şekil 4.4.2.2.7 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS) 53
Şekil 4.4.2.2.8 :Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS) 54
Şekil 4.4.2.2.9 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS) 54
Şekil 4.4.2.2.10 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek korteks bölgesi (AB-PAS) 55
Şekil 4.5.1.1.1: Karaciğer kontrol grubu karaciğer dokusu 57
Şekil 4.5.1.1.2 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu 57
Şekil 4.5.1.1.3 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu 58
Şekil 4.5.1.1.4 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu 58
Şekil 4.5.1.1.5 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu..... 59
Şekil 4.5.1.1.6 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu..... 59
Şekil 4.5.1.2.1 : Kontrol grubu böbrek dokusu..... 60
Şekil 4.5.1.2.2 : Sitrik asit grubu böbrek dokusu 61
Şekil 4.5.1.2.3 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu..... 61
Şekil 4.5.1.2.4: Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu..... 62
Şekil 4.5.2.1.1 : Nöraminidaz uygulanmamış kontrol grubu karaciğer dokusu..... 63
Şekil 4.5.2.1.2 : Nöraminidaz uygulanmış kontrol grubu karaciğer dokusu..... 63
Şekil 4.5.2.1.3 : Nöraminidaz uygulanmamış sitrik asit grubu karaciğer dokusu 64
Şekil 4.5.2.1.4 : Nöraminidaz uygulanmış sitrik asit grubu karaciğer dokusu 64
Şekil 4.5.2.1.5:Nöraminidaz uygulanmamış sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. ... 65
Şekil 4.5.2.1.6 : Nöraminidaz uygulanmış sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu 65
Şekil 4.5.2.2.1 : Nöraminidaz uygulanmamış kontrol grubu böbrek dokusu 66
Şekil 4.5.2.2.2 : Nöraminidaz uygulanmış kontrol grubu böbrek dokusu 67
Şekil 4.5.2.2.3 : Nöraminidaz uygulanmamış sitrik asit grubu böbrek dokusu 67
Şekil 4.5.2.2.4 : Nöraminidaz uygulanmış sitrik asit grubu böbrek dokusu 68
Şekil 4.5.2.2.5 : Nöraminidaz uygulanmamış sodyum benzoat grubu böbrek dokusu..... 68
Şekil 4.5.2.2.6: Nöraminidaz uygulanmış sodyum benzoat grubu böbrek dokusu..... 69

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Sodyum benzoat ve sitrik asitin vücut ağırlığı ve organ ağırlıkları üzerine etkileri 39
Tablo 4.2. Sodyum benzoat ve sitrik asitin serum ve doku sialik asit miktarları üzerine etkileri 40

KISALTMALAR

AB : Alcian blue
GAG : Glikozaminoglikan
H-E : Hematoksilen-Eozin
Neu5Ac : *N*-asetilnöraminik asit
Neu5Gc : *N*-asetilglikolilnöraminik asit
PAS : Periodik Asid-Schiff
PSA : Polisialik asit
RR : Rutenyum kırmızısı
TSA : Total sialik asit
^{o}C : Santigrad Celcius
gr : gram
mg : miligram
µg : mikrogram
M : molar
ml : mililitre
nm : nanometre
µ : mikron

1. GİRİŞ

Besin koruyucular (gıda katkı maddeleri), işlem görmüş gıdaların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu maddelerin kullanımı ile besinlerde oluşabilecek mikrobiyal üremeler ve istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarının oluşumları engellenmekte, böylece insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkiler ortadan kaldırılabilmektedir.

Gıda katkı maddelerinin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir ve günümüzde kullanımları yaygınlaşmıştır. Hazır gıdalarda besin koruyucuların kullanımının gerekliliği birçok araştırıcı tarafından önerilmektedir (Baldwin vd.,1995; Srour, 1998; Omonigho ve Ikenebomeh, 2000). Ancak günümüzde hazır gıdaların kullanımlarının hızla artması, insanların kimyasal maddelere maruz kalma oranını yükseltmekte ve insanları, bu kimyasalların muhtemel toksik etkileriyle karşı karşıya getirmektedir. Bu sebeple besin koruyucuların toksik etkileri ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır (Fujitani, 1993; Safer ve Nughamish, 1999; Kaboğlu ve Aktaç, 2002; Sasaki vd., 2002; Aktaç vd., 2003a, b; Stefanidou vd., 2003; Meng ve Nie, 2005).

Benzoik asitin sodyum tuzu olan sodyum benzoat hazır gıdalarda kullanılan antimikrobial bir maddedir. Günümüzde pek çok hazır gıdada özellikle margarinlerde, gazlı ve gazsız içeceklerde, meyve sularında, soslarda, kakaolu ürünlerde, bisküvi, gofret, kek ve kremalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO, 1996). Antioksidan etkiye de sahip olan sitrik asit de, günümüzde pek çok hazır gıdada özellikle bisküvilerde, keklerde, hazır çorbalarda, bebek mamalarında, margarinlerde, et ve balık ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Poerwono vd., 2001; Türkoğlu, 2007).

Bilindiği gibi özellikle organizma tarafından oral yolla alınan birçok kimyasal madde, öncelikle karaciğerde, daha sonra da böbreklerde detoksifiye edilmektedir. Dışarıdan alınan kimyasal maddeler, barsakta emildikten sonra hızla karaciğerde tutulurlar, safra yoluyla dışarı atılırlar. Karaciğer oldukça önemli bir enzimatik donanıma sahiptir. Bu sayede endojen ve eksojen bileşikleri biyotransformasyona

uğratmakta, daha sonra da bu maddeleri safra yoluyla dışarı atmaktadır. Birçok endojen ve eksojen maddenin karaciğerde biyotransformasyonu esnasında meydana gelen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda serbest radikaller meydana gelmekte ve açığa çıkan bu radikaller antioksidan savuma sisteminin karşı koyabileceği düzeyin üzerine çıktığında dokularda çeşitli tahribatlara yol açmaktadır. Bu tahribatlar arasında membran hasarları, DNA hasarları, enzim inaktivasyonları sayılabilir (Dökmeci, 2001; Atalay vd., 2004).

Böbrekler de karaciğer gibi organizmanın maruz kaldığı toksik maddelerin ve onların metabolitlerinin arındırılmasında fonksiyonel olan organlardır. Böbrekte, fonksiyonel temel ünite olan, filtrasyondan sorumlu nefronun tüm bölgeleri, toksik maddelerden etkilenebilmektedir. Böbrek tubüllerinde gerçekleşen geri emilim sonucunda toksik maddeler bu bölgelerde yoğunlaşabilmektedir. Bu yüzden ksenobiyotiklerin yoğunlukları kanda toksik düzeye ulaşmadığı halde böbrek dokusunda toksisite oluşturabilmektedirler. Toksik maddelerle karşı karşıya kalan böbreğin bu maddelere karşı başlıca tepkileri; hipertrofiye olma, poliferasyon, rejenerasyon mekanizmalarını devreye sokma ve bazı proteinlerin indüksiyonuna yol açma şeklindedir. Metallotionein ve ısı şok proteinleri adı verilen bu proteinler, toksik maddelere maruz kalma sonucunda böbrekte oluşabilmekte, böbreğin protein yapısının korunmasını ve zararlı proteinlerin parçalanmasını sağlayarak savunma görevini yapmaktadırlar. Ancak toksik maddelere yoğun biçimde maruz kalma koşullarında rejenerasyon mekanizmaları ve protein indüksiyonu yetersiz kalabilmekte ve doku tahribatları gözlenebilmektedir (Dökmeci, 2001; Atalay vd., 2004).

Karbohidratlar dünya yüzeyinde en çok bulunan makromoleküllerdir. Beslenmenin temelini oluşturmakla beraber, günümüzde karbohidratların oldukça önemli fonksiyonlarının bulunduğu pek çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Karbohidratlar, hayvansal organizmaların bağ dokusunda yapısal ve koruyucu elemanlar olarak bulunmalarının yanı sıra, bakteri ve bitki hücre duvarında da yapısal olarak önemlidirler. Protein ve lipitlere kovalent olarak bağlanarak hücre yüzeyine farklı özellikler kazandıran glikokonjugatları oluştururlar. Bu sayede hücrelerin birbirlerini tanımasında, birbirleriyle ve çevreleriyle haberleşmesinde, hücre

adezyonunda (Hook vd., 1984; Kelm vd., 1994, Varki, 2001), hücrelerin büyüme ve gelişmesinde, rejenerasyonunda önemli rollere sahiptirler (Bissell vd., 1982; Olden vd, 1982; Hay, 1984; Saxon ve Bertozzi, 2001 Buskas vd., 2006).

Bunlara ilave olarak memeli proteinlerinin %50'sinin glikozillenmiş olarak bulunması ve bu sayede proteinlerin farklı fonksiyonlar kazanmaları karbohidratların önemini açıklayan diğer bir noktadır.

Sialik asitler, yüksek organizmalarda ve bazı mikroorganizmalarda bulunan negatif elektrik yüküne sahip nöraminik asitten türemiş, elliye yakın üyesi olan bir monosakkarit ailesidir (Varki, 1992; Kelm ve Schauer, 1997; Schauer ve Kamerling, 1997; Karaçalı vd., 2003; İdiz vd., 2004). Hayvanlar aleminde sialik asitlerin doğal dağılımları oldukça önemlidir ve hayvansal organizmalar arasında akrabalık derecesinin anlaşılmasında önemli görülmektedirler (Schauer, 2004b). Sialik asitlerin eksternal pozisyonları, sahip oldukları negatif elektirik yükü ve hücre membranının dış yüzeyinde uygun biçimde konumlanmaları, hücre biyolojisi açısından önemlidir. Hücre yüzeyinde sialik asit miktarının artması, azalması ya da moleküler özelliklerinin değişmesi, hücrelerde ve dokularda farklı etkiler yaratmaktadır (Crook vd., 1997). Ayrıca son yıllarda serum sialik asit seviyeleri kardiovasküler hastalıklarda risk faktörü olarak görülmekte (Crook vd.,1994; Gökmen vd., 2002; Serdar vd., 2007) ve potansiyel tümör belirleyici olarak kabul edilmektedir (Crook vd., 1997; İşbilir vd., 2002). Total sialik asit seviyesinde meydana gelen bir artış, çeşitli kanser tiplerini (kolon, prostat, ovaryum, meme, akciğer kanseri ve lenfoma) kapsayan bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Kökoğlu vd., 1992; Crook vd., 1997; İşbilir vd., 2002; Manju vd., 2002; Değer vd., 2008; Saraniya vd., 2008; Erdoğan vd., 2008).

Besin koruyucular ile yapılan çalışmalar arasında, glikozaminoglikanlar (GAG) üzerindeki etkileriyle ilgili araştırmalara rastlanmamıştır. Oysa GAG'ların ve sialik asitlerin önemi düşünüldüğünde, bu moleküllerin besin koruyucuların etkisine maruz kalmalarının hücre metabolizmasını ve organ fonksiyonlarını da etkileyeceği kuşkusuzdur. Bu nedenle, bu çalışmada sodyum benzoat ve sitrik asidin karaciğer ve böbrek sialik asit düzeyleri ile, serum sialik asit düzeyi üzerindeki muhtemel etkileri

spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Ayrıca besin koruyucuların membran glikozaminoglikanları üzerindeki etkileri ışık mikroskobu düzeyinde Alcian blue (AB) ve Periodik Asid-Schiff (PAS) ile; elektron mikroskobu düzeyinde Rutenyum kırmızısı (RR) ile boyanarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Embriyonik ön barsağın dış cebinden gelişen karaciğer, yaklaşık olarak total vücut ağırlığının % 2'sini oluşturur. Karaciğer karın boşluğunun üst kısmında, diyaframın hemen altında yer alır.

Hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyona sahip olan organ, vücutta iki önemli damardan kan alır. Bunlardan ilki mideden ve ince barsaktan emilen besinleri taşıyan portal ven, diğeri metabolik olarak aktif olan karaciğer hücrelerine (hepatosit) oksijen sağlayan hepatik arterdir. Portal ven ve hepatik arter ile karaciğere giren kan, doku içerisinde sinüzoidlere akarak hepatositlerle yakın ilişki kurar. Daha sonra, dokudan hepatik venlerle toplanarak inferiyör vena kava ile dokuyu terk eder (Şekil 2.1.1). Duodenum lümenine verilen safra, karaciğerin ekzokrin salgısıdır; glikoz, lipoprotein ve plazma proteinleri ise kan içine bırakılan endokrin ürünlerdir.

Karaciğerin başlıca görevleri arasında safranın sentezi ve salgılanması; glukoz, glikojen, yağ, protein ve vitaminlerin depolanması; metabolik artıkların detoksifikasyonu, kan pıhtılaşma faktörlerinin sentezlenmesi sayılabilir. Hayati pek çok işlemi yerine getirdiği bilinen karaciğerin en önemli özelliği, rejenerasyon yeteneğidir. Normal yetişkin karaciğerde mitoz bölünme nadirdir. Bununla beraber karaciğerdeki hasarlar hepatositlerin mitotik aktiviteleri ile hızla onarılır. Ancak besinsel zehirlenme, alkolün zararlı etkileri ve tekrarlanan infeksiyonlar, hücresel onarım düzenini bozabilir. Bu düzensizlikler bağ doku hücrelerinin artmasına neden olur.

Karaciğer glisson kapsülü olarak adlandırılan bir kapsülle kaplıdır. Bu kapsül karaciğer kapısından içeri girerek karaciğer lobüllerini çevreler ve portal alanları oluşturur. Kapsülle birlikte kan damarları içeri girerken safra kanalı dışarı çıkar. Her bir karaciğer hücresini çevreleyen stroma (bağ doku) bir retiküler fibril ağıdır. Bu yapı lobülün periferinde bulunan portal alanlardaki bağ doku ile ilişkilidir. Retiküler ağ

yapısı, karaciğer parankimini desteklemekle beraber sinüzoidlerin açık kalmasını da sağlamaktadır.

Karaciğer, poligonal şekilli hepatositlerin oluşturduğu çok sayıda hepatik lobülden meydana gelmiştir. Hepatik lobüller karaciğerin anatomik birimleridir. Hepatik lobüllerin merkezinde bir merkezi ven ile köşelerinde periferal olarak konumlanmış portal alanlar bulunur. Bir ya da iki hücre kalınlığındaki hücre kordonları, merkezi venden dışa doğru ışınsal yapılar oluşturur (Şekil 2.1.1.). Hücre kordonları arasında kalan alanlar kan sinozoidleridir ve bu alanlar hepatik venlerin ve arterlerin kollarıyla beslenir. Arteriyal ve venöz kan, merkezi vene boşalmak üzere karışık olarak sinüzoidler içinden akar. Böylece lobülde, hepatositler ve sinüzoid içindeki kan arasında metabolit değişimi en yüksek değere ulaşır.

Karaciğer sinüzoidleri, diğer sinüzoidlerden, genişlik ve büyüklükleri, bazal membranlarının bulunmayışı ve sinozoidleri astarlayan hücreler açısından farklılık gösterir. Karaciğer sinüzoidlerini astarlayan bu hücreler;

1- Oldukça fazla miktarda bulunan, fagositik özelliğe sahip kupffer hücreleri,

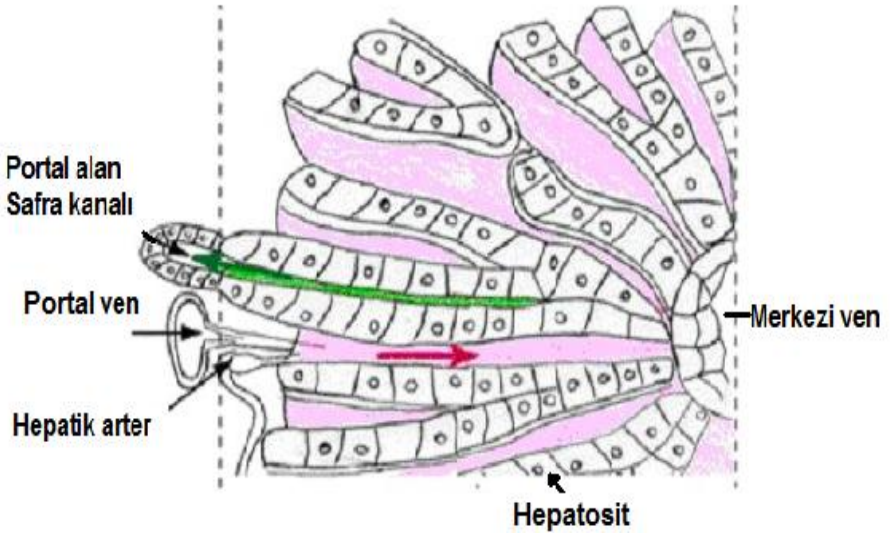
2- Lümene doğru çıkıntı yapan, oval bir nukleusa sahip, fagositoz yapmayan yassı endotel hücreleridir.

Sinozoidleri astarlayan bu endotel hücreleri, karaciğer hücrelerine sıkıca bağlı değildir ve endotel hücreleri ile hepatositler arasında, genişliği değişebilen perisinozoidal alan (Disse aralığı) yer alır. Bu alan sadece kan plazması içerir ve hepatositler ile kan arasında metabolitlerin değiştiği bölgedir.

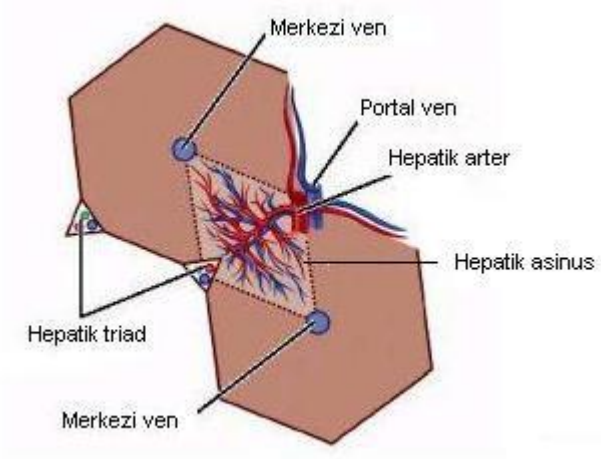
Karaciğerin fizyolojik birimi hepatik asinuslardır (Şekil 2.1.2.). Bu yapılar karaciğerin en küçük fonksiyonel üniteleridir. Bu üniteler, bitişik iki portal lobülün oluşturduğu baklava biçimindeki alanda bulunan hücrelerden meydana gelir. Hepatik asinuslar, hepatik venleri, hepatik arterlerin uç kollarını, lobüller arası safra kanalını, lemfatikleri ve sinirleri içerirler. Hepatik asinus içindeki hücreler asinusun damarlı eksenine olan yakınlıklarına göre izafi olarak bölgelere ayrılmıştır (Şekil 2.1.3.).

Birinci bölgede bulunan hücreler besleyici damarlara en yakın olanlardır. Bu hücreler toksik maddelerin zararlı etkilerine karşı uzun ömürlüdür ve rejenerasyon yetenekleri yüksektir. İkinci bölgede bulunan hücreler daha az ömürlüdür. Üçüncü bölgede bulunan hücrelerde ise rejenerasyon çok daha yavaştır ve toksik etkiler karşısında nekroz ilk olarak bu bölgede görülür.

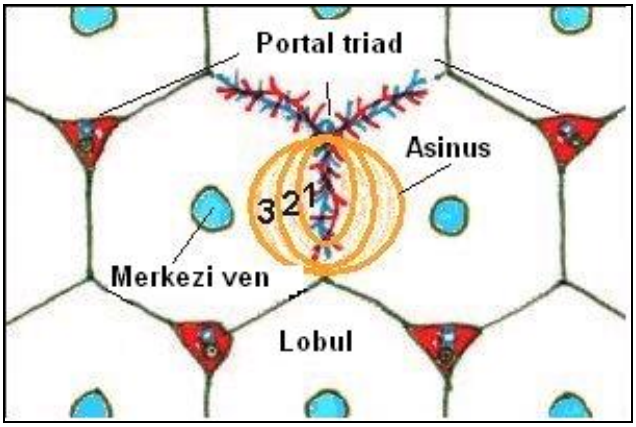
Karaciğer parankimasının % 60'ını oluşturan hepatositler, karaciğerin farklı fonksiyonlarını yerine getiren çok yönlü hücrelerdir. Bu hücreler, yapı ve büyüklüklerinde önemli farklılıklar olmamasına rağmen farklı fonksiyonları yerine getirirler. Genelde polihedral yapıda olan hepatositlerin sitoplazmaları, fazla sayıda mitokondri ve düz yüzlü endoplazmik retikulum içermeleri nedeniyle granüllü ve eozinofiliktir. Düz yüzlü endoplazmik retikulumda ilaçların detoksifikasyonları, kolesterol sentezi ve glikojenin glikoza dönüşümü gerçekleşir. Granüllü endoplazmik retikulum yassılaşmış üzüm salkımı şeklindedir ve bazofilik yapı ya da ergastoplazma olarak tanımlanır. Burada kan fibrinojenleri, protrombin ve kan albuminleri sentezlenir. Her bir hücrede yaklaşık olarak elli kadar Golgi kompleksi bulunmaktadır. Bir diğer sitoplazmik bileşen de karaciğerde fazla miktarda biriktirilen glikojendir. Aynı zamanda karaciğerde, kolesterol, yağ asitleri, trigliseritler ve basit yağlar gibi çeşitli lipitler de depolanmaktadır (Telford ve Bridgman, 1995a).



Şekil 2.1.1. Karaciğer dokusunun genel histolojik yapısı (Benhamouche,vd., 2006).



Şekil 2.1.2. Karaciğer lobülleri ve hepatik asinus (Şematik).
(http://www.thefreedictionary.com/)



Şekil 2.1.3. Karaciğer hepatik asinusu içindeki bölgeler (Şematik)
(http://www.vivo.colostate.edu)

2.2. Böbrek

Böbrekler, vücudun iç dengesinin korunmasında ve hayatın devamının sağlanmasında en önemli görevi üstlenmiş organlardır. Temel fonksiyonu boşaltım ve geri emilimdir. Böbrekler iç dengenin sağlanmasında, arterial basıncın

düzenlenmesinde rol oynarlar. Ayrıca, plazma proteinlerinden eritropoietinin oluşumunu sağlayarak endokrin bir foksiyonu da yerine getirirler.

Multilobüler böbrek yapısı incelendiğinde, organın ince dayanıklı bir kapsülle kuşatıldıkları görülür. Kapsülün alt kısmında granüllü görünümdeki koyu kahverengi korteks ile korteksin altında ışınsal çizgilenmeler göstererek on ile onbeş medullar piramide ayrılan medulla bölgesi bulunur. Korteks ve medullanın birleşme yerinde (kortikomedullar bölge) çok sayıda kan damarı yer alır. Medullar piramit çıkıntılarının papillaları, minör kalikslere ve daha sonra majör kalikslere açılırlar. Majör kaliksler renal pelvise açılırlar. Böbreklerin konkav bölgelerinde bulunan hilum; üreter, renal ven, lenf damarları ve sinirlerin çıktığı ve renal arterlerin böbreğe girdiği bölgedir.

Kortikomedullar bölgede göze çarpan önemli yapılar medullar ışınlardır. Bu ışınlar yelpaze şeklinde açılarak korteksin içine doğru yayılırlar ve korteksin dış kısmına yaklaştıkca seyrekleşerek kaybolurlar. Bu yapıların çizgili şekilde görülmeleri, düzenli tubüller ve vasküler yapılardan kaynaklanır. Bu tubüller medullaya uzanan ve daha sonra tekrar kortekse geri dönen proksimal ve distal tubüllerdir. Ayrıca idrar toplayıcı kanallar, doğrudan korteksten piramitin papillalarına geçerler (Şekil 2.2.1). Böbreğin korteksinde çok sayıda glomerulus görülür. Glomerulusların en önemli görevi ultrafiltrasyondur. Kan plazmasındaki, su ve iyon dengesi glomeruluslar sayesinde düzenlenir ve idrara geçirilir.

Böbreklerin fonksiyonel üniteleri nefronlardır. İnsanın her bir böbreğinde, bu ünitelerden yaklaşık olarak bir milyon kadar bulunmaktadır. Her bir nefron, renal kapsül ve renal tübüller olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Renal kapsül incelenecek olursa, bu yapının, glomerular kapsül (Bowman kapsülü), kapsülün içine giren afferent arteriol, kapiler yumak (glomerulus) ve efferent arteriolden meydana geldiği görülmektedir. Bowman kapsülü dışta parietal, içte glomerulusu çevreleyen viseral tabaka ile astarlanmıştır. Her iki tabaka da tek katlı yassı epiteldir. İki tabaka arasında kalan kapsüler alan, renal tübüle akıtılmadan önce idrarın toplandığı alandır. Kapsül, damar ve idrar kutbu olarak iki kutup içerir. Afferent ve efferent arteriollerin giriş çıkış yaptığı bölge damar kutbudur. Renal tubül ise kapsülün idrar kutbu ile ilişkilidir (Şekil 2.2.2).

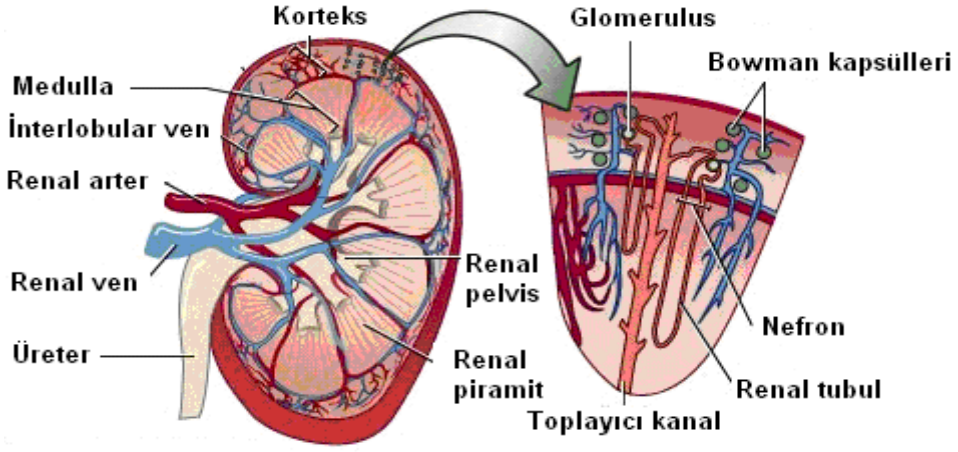
Bir kapiler ağ örgüsü şeklinde tarif edilen glomeruluslar, afferent ve efferent arteriolleri bağlayan yapılar olarak kabul edilirler. Afferent arteriyolun, glomerulusa girmesiyle birlikte arterial kapilerler oluşur, bu kapilerler daha sonra kıvrılarak anastomozlaşırlar ve efferent arteriol olarak glomerulusu terk ederler.

Nefronun diğer yapısal ünitesi olan renal tübüller, geri emilim ve sekresyonun gerçekleştiği yapılardır. Renal tübül, devamlı bir yapı olmasına rağmen bulunduğu çeşitli bölgelere göre değişik histolojik özellikler ile karakterize edilir. Tubülün, glomerulusun idrar kutbundan kıvrımlar yaparak ayrılan ilk kısmı, proksimal kıvrıntılı tübül adını alır. Tubülün devamı, düzdür ve korteksten medullaya uzanır. Burada henle'nin "U" şeklinde kıvrılan ince kolunu yapmadan önce henle'nin ince inici kolunu oluşturur, sonra kıvrılır ve henlenin kalın çıkıcı kolunu verir. Tubül glomerulus yakınlarında yeniden kıvrımlar oluşturarak distal kıvrıntılı tübülü meydana getirir. Proksimal tubül lümenini astarlayan epitel, mikroviluslu tek katlı kübik epiteldir. Henlenin ince kolu lümene doğru çıkıntılar yapan, oval nukleuslar içeren tek katlı yassı epitel ile astarlanmıştır. Distal tubülün lümenini astarlayan epitel hücreleri de tek katlı kübik hücrelerdir (Şekil 2.2.3).

Bowman kapsülünün idrar kutbunda parietel epitelyum genişleyerek proksimal kıvrıntılı tubülü oluşturur. Proksimal kıvrıntılı tubül glomerular filtrattan suyun ve sodyum iyonlarının % 75-80'nini geri emer, glukoz, aminoasit, C vitamini ve klor iyonlarını da absorbe eder.

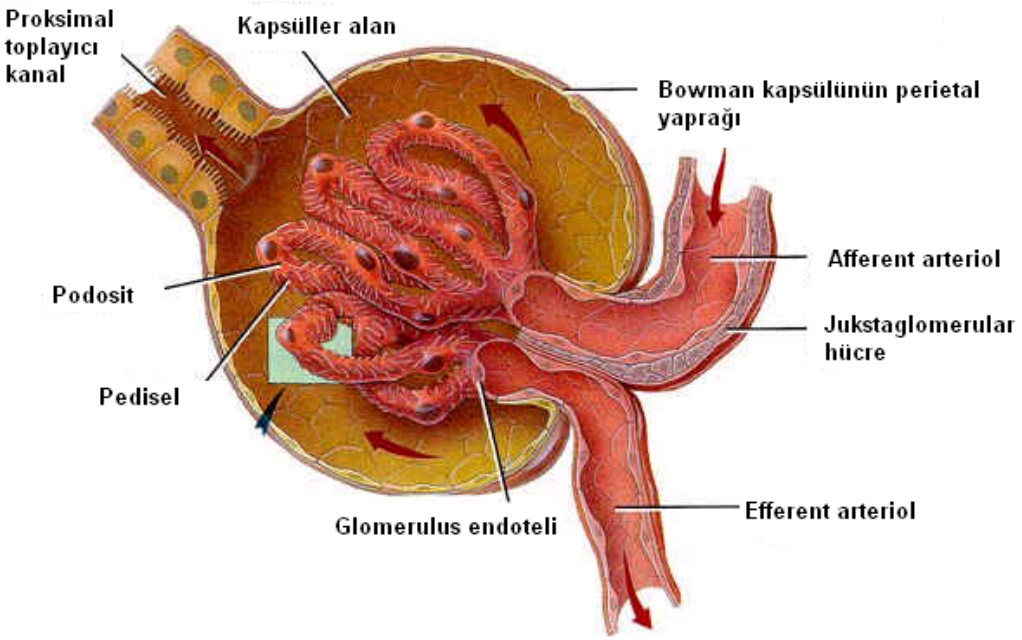
Proksimal tubülün devamı olan henle ince kolunun fonksiyonu, glomerular filtratın ozmoz yoluyla yoğunlaşmasını sağlamaktır. Kalın çıkıcı kol, makula densa ve distal tubülün kıvrıntılı bölümü, korteks içinde uzanan diğer yapılardır. Bu yapıların fonksiyonları, sodyum iyonlarının ve suyun % 9'unun tubüler sıvıdan geri emiliminin sağlanmasıyla beraber, hidrojen ve potasyum iyonlarının sekresyonudur. Distal kıvrıntılı tubül, vücudun elektrolit dengesinin, bir adrenal korteks hormonu olan aldesteron tarafından kontrol edildiği bölgelerden biridir.

Distal tubülün medulladaki uzantıları olan toplayıcı kanallar, medulla içine doğru ilerledikce daha geniş tubülleri (Bellini kanalı) oluştururlar ve bunlar minör kalikse boşalırlar. Toplayıcı kanallar idrarın nefrondan pelvise iletilmesini sağlarlar (Telford ve Bridgman, 1995b).



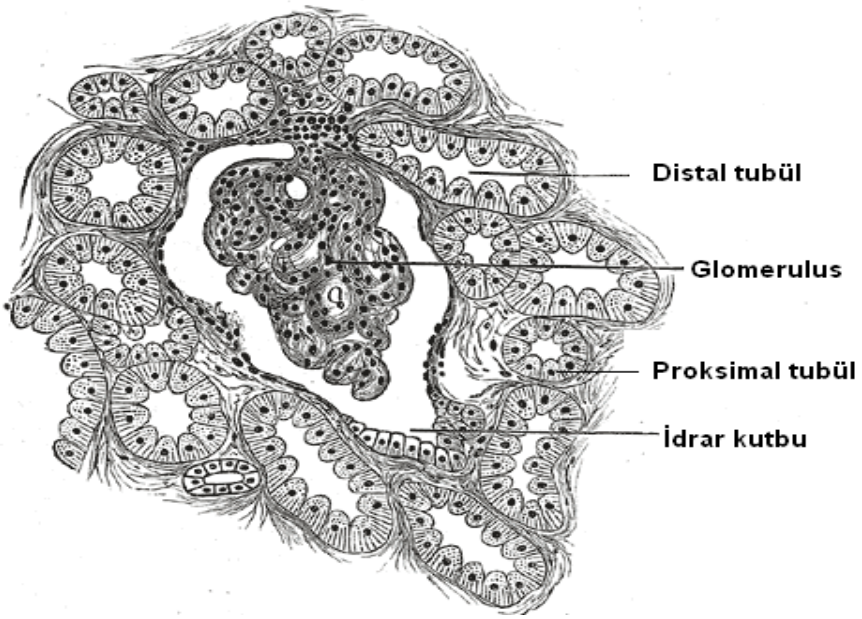
Şekil 2.2.1. Böbrek dokusu genel organizasyonu.

(http://www.yoursurgery.com./)



Şekil 2.2.2. Glomerular yapı.

(http://www.geocities.com/biology_4e/page10.htm)



Şekil 2.2.3. Böbrek histolojik yapısı.
(http://www.tigerpath.com/unit_06.htm)

2.3. Karbohidratlar

Karbohidratlar doğada en çok bulunan makromoleküllerdir. Belirli karbohidratlar temel gıda maddesi olarak tüketilmektedir. Karbohidratların oksidasyonu, fotosentetik olmayan birçok hücrede enerji elde etmede temel yoldur. Çözünmez karbohidrat polimerleri, bakteri ve bitkilerin hücre duvarında ve hayvanların bağ dokularında yapısal ve koruyucu elemanlar olarak bulunur ve hücre adezyonunda rol oynarlar. Protein ve lipitlere kovalent olarak bağlanan daha kompleks karbohidrat polimerleri, bu hibrit moleküllerin metabolik durumunu ve konumunu belirleyen sinyaller olarak görev yaparlar ve bu bileşikler glikokonjugatlar olarak adlandırılırlar.

Monosakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere üç ana sınıf karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Monosakkaritler ya da basit şekerler tek bir polihidroksi aldehit veya keton biriminden ibarettir. Oligosakkaritler, monosakkarit birimlerinin glikozidik bağ ile birleştiği kısa zincirlerden oluşur. Polisakkaritler ise yüzlerce ya da binlerce monosakkarit birimi içeren doğrusal ya da dallanmış zincirlerdir. Polisakkaritler glikanlar olarak da bilinmektedirler. Glikanlar,

birbirlerinden tekrarlayan monosakkarit birimleri, zincirlerin uzunluğu, birimlerin bağlanma tipleri, bağlanma derecelerine bağlı olarak farklılık gösterirler. Homopolisakkaritler tek bir monomer içerirken, heteropolisakkaritler iki veya daha fazla monomer çeşidi içermektedirler. Heteropolisakkaritler, tüm hayvanlar aleminde hücre dışı desteği sağlarlar. Hayvansal hücrelerde hücreler arası alan birkaç tip heteropolisakkarit tarafından doldurulur. Bu şekilde, bu moleküller hücreleri bir arada tutarak dokuyu korumayı ve hücreye şekil vermeyi sağlarlar (Kılıç, 2005) .

2.3.1. Glukokonjugatlar

Glukokonjugatlar, bir ya da daha fazla karbohidrat ünitesinden meydana gelen biopolimerler olarak tanımlanırlar ve yapısal olarak proteoglikan, glikoprotein ve glikolipit olarak temel üç sınıfa ayrılırlar. Karbohidratlar, karbohidrat olmayan yapılarla glikozid bağıyla birleşerek kompleks karbohidratları oluştururlar. Karbohidrat olmayan kısma aglikon, tüm yapıya glikozid adı verilmektedir. Memeli proteinlerinin % 50'si glikozillenmiş olarak bulunur. Glikoproteinler, oligosakkarit zincirlerinin proteinlere kovalent bağlanmasıyla oluşan karbohidrat-protein konjugatlarıdır. Bu moleküller, memeli ve bitki hücrelerinde sadece hücre membranında değil aynı zamanda vücut sıvılarında da bulunurlar. Karbohidrat molekülleri, lipit ve protein bakiyelerine bağlanarak oluşturdukları konjugat bileşikleriyle hücrelere çok önemli özellikler kazandırırlar. Böylece depo yakıtı ve yapısal rollerine ek olarak aynı zamanda sinyal iletiminde, hücreler arası haberleşmede, hücre adezyonunda rol oynarlar. Özellikle hücre membranına kazandırdıkları bu özellikler sayesinde glikokonjugatlar, sinir sistemi kök hücrelerinin gelişme sürecinde önemli fonksiyonlar üstlenirler (Yanagisawa ve Yu, 2007). Hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks arasındaki etkileşimlerde düzenleyici görev yaparlar. Özel karbohidrat içeren moleküller, hücrelerin birbirlerini tanımasında (Varki, 2001) hücre göçünde, kan pıhtılaşmasında, immün cevapta ve rejenerasyonda etkinlik gösterirler (Hook vd., 1984; Saxon ve Bertozzi, 2001).

Bağ dokunun ekstraselüler matriksinin yapısal elemanı olan glikozaminoglikanlar, doğrusal yapı gösteren polisakkaritlerdir. Glikozaminoglikanlar, proteoglikanlara *O*- bağlı olarak bulunurlar (Mulloy ve Foster, 2000). Bir veya daha

fazla glikozaminoglikan ile proteinlerin oluşturduğu kompleks bileşikler proteoglikan olarak adlandırılmaktadır. Glikozaminoglikanlar, genellikle sulfatlanmış veya sulfatlanmamış glukozamin veya galaktozamin içeren bir amino şeker ve üronik asitten (glukoronik asit veya iduronik asit) oluşmuş tekrarlayan disakkarit ünitelerinden ibaret polisakkaritlerdir. Genellikle proteinlere kovalent bağlı olarak bulunurlar. Glikozaminoglikan kısmı proteoglikanların kütlece en büyük kısmını oluşturur ve genellikle biyolojik etkinliğin esas yeridir. Bu bölgeler hücre yüzeyindeki diğer proteinlerle elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları aracılığıyla bağlanmak için uygun yerlerdir.

Ökaryotik hücreler tarafından salınan proteinlerin çoğu glikoproteinlerdir. Glikoproteinler, çoğunlukla plazma zarının dış yüzünde ekstraselüler matrikste ve kanda bulunurlar. Çok hidrofilik olan karbohidrat demeti konjuge olarak bağlandığı proteinin polaritesini ve çözünürlüğünü değiştirebilmektedir. Peptit ve oligosakkarit arasındaki sterik etkileşimler bazı katlanmaları engellerken bazılarının da gerçekleşmesini kolaylaştırır.

Glikoproteinlerdeki oligosakkaritlerin protein yapısındaki bu global fiziksel etkilerin ötesinde, özel biyolojik etkileri vardır ve bu biyolojik etkiler son derece çeşitlidir. Bu çeşitliliğin nedeni, oligosakkarit zincirlerin yapısal bilgi açısından muazzam biçimdeki zenginliğidir. Proteoglikanlar, her biri protein bakiyelerinden oluşan glikozaminoglikan zincirleri ve çeşitli *O*- ya da *N*- bağlı oligosakkarit zincirleri içeren önemli ekstraselüler moleküllerdir (Hascall ve Hascall, 1981). Proteoglikanlar, ekstraselüler matriksin önemli ve temel bileşenlerini oluşturan, hücre membranındaki ekstraselüler bileşenlerle birlikte bulunurlar (Rapraeger vd., 1985, 1986; Hayashi vd., 1987). Membran yapısına katılan bu bileşenler hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle haberleşmesinde önemli rollere sahiptir (Hook vd., 1984). Bu fonksiyonlar normal hücrelerin büyümesinde gelişmelerinde ve normal fonksiyonlarının sürdürülmesinde oldukça önemlidir (Bissell vd., 1982; Olden vd., 1982; Hay, 1984). Bu moleküllerin polianyonik yapıları, membranlardan makro moleküllerin difüzyonunda, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi önemli düzenleyici fonksiyonlara sahip moleküllerin geçişinde ve bölgesel katyonik dengenin düzenlenmesinde önemli roller oynar (Kanwar, 1984;

Lerner ve Torchia, 1986; Thomas ve Gimenez, 1986; Roberts vd., 1988; Crook vd., 1997).

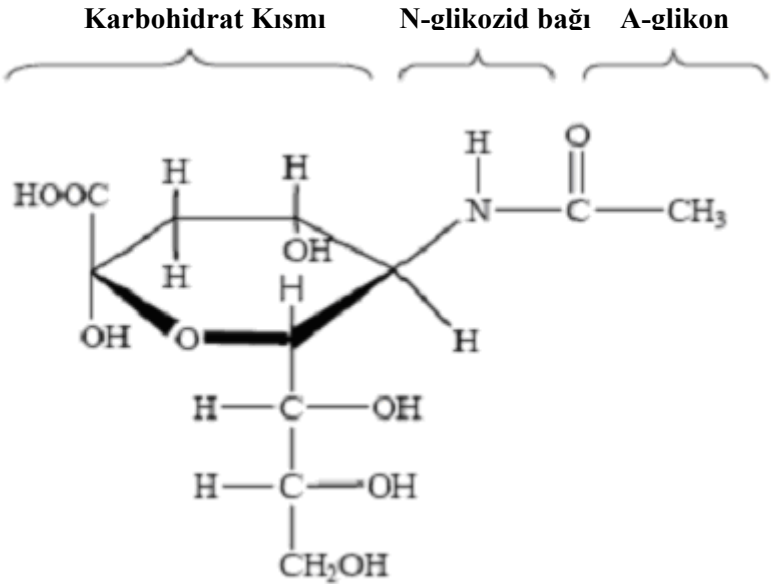
Glikolipitler de bir ya da iki karbohidrat ünitesine bağlı lipit moleküllerinden meydana gelen glikokonjugatlardır. Glikolipitler temelde glikosifingolipitler ve glikogliserolipitler olarak iki grupta incelenebilirler. Glikosifingolipitler ve glikogliserolipitler sırasıyla seramit ve gliserol içerirler. Glikosifingolipitler bir ya da daha fazla sialik asit bakiyesi içerir ve tüm omurgalı hücrelerinde, vücut sıvılarında ve özellikle de beyin hücrelerinde bol bulunurlar. Glikosifingolipitler hücreler arası haberleşmede, adezyonda, biyolojik olarak aktif moleküller için reseptör moleküller olarak ve sinyal iletici moleküller olarak önemli görevler yaparlar (Yanagisawa ve Yu, 2007).

Plazma membranında fosfolipitler ve sterollerden çok daha düşük oranda bulunan glikolipitler membranlara ayırt edici özellik kazandırmaları açısından oldukça önemlidirler. Glikolipitler, hidrofilik baş grupları oligosakkaritler olan zar lipitleri olarak tanımlanırlar. Plazma zarında lipitlere bağlı olarak bulunan oligosakkarit bakiyeleri, genellikle dış lipit tabakaya kovalent olarak bağlanırlar. Hayvansal membranlardaki glikolipitler daima sifingozin içerirken, bakteri ve bitki membranları ise gliserol içerirler.

2.4. Sialik Asitler

Sialik asitler, yüksek organizmalarda, bazı mikroorganizmalarda ve böceklerde bulunan negatif elektrik yüküne sahip, nöraminik asitten türemiş elli üyelik monosakkarit ailesidir. (Varki, 1992; Kelm ve Schauer, 1997; Schauer ve Kamerling, 1997; İdiz vd., 2004). Sialik asit ya da *N*-asetil nöraminik asit, glikoproteinlerin ya da glikolipitlerin *N*-terminal uçlarına bağlı olarak bulunur (Blom vd., 1990; Karaçalı vd., 2003). Sialik asitler (Nöraminik asit), mannozamin ve pirüvattan türeyen dokuz karbonlu şekerlerdir ve yaygın olarak asetatlar, sulfatlar, fosfatlar ve metil esterleriyle hidroksillenmiş gruplar içerir (Tanner, 2005). *N*-asetil nöraminik asit (Şekil 2.4.1), her biri değişik bölgelerinden asetillenmiş sialik asit ailesinin bir üyesidir. Bu bileşikler genellikle glikoprotein, glikolipid veya daha nadiren glikozaminoglikanların oligosakkarit yan zincirlerinin

terminal karbohidrat kalıntıları olarak bulunurlar. İnsan dokularında bulunan başlıca sialik asit, *N*-asetilnöraminik asittir (NeuAc). Memelilerde çok farklı sialik asit tipleri mevcuttur (Crocker ve Varki, 2001). Aglikon ile nöraminik asit, α(2→6) *N*-glikozid bağı ile bağlanarak N-asetilnöraminik asiti oluşturur (Altıntaş ve Kurtul 2006).



Şekil 2.4.1. Sialik asitin piranoz form molekül yapısı (Altıntaş ve Kurtul, 2006).

Çoğunlukla hücre membranındaki proteinlerin ve lipitlerin ana bileşenini oluşturan sialik asitler kompleks karbohidratların oluşumuna çok fazla yapısal farklılık katarak katkıda bulunurlar. Önemli pozisyonlardaki sialik asitler genelde bu moleküllerin dışında ve ucunda yer alırlar. Sialik asitler, çeşitli amino ya da hidroksil gruplar içerirler (Corfield ve Schauer, 1982; Varki, 1992; Schauer ve Kamerling, 1997; Schauer, 2000a; Schauer, 2000b; Angata ve Varki, 2002).

Hayvanlar aleminde sialik asitlerin doğal dağılımları oldukça önemlidir ve hayvanlar arasında genetik akrabalıkların anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir. En çok görülen sialik asitler *N*-asetilnöraminik asit (Neu5Ac) ve onu takip eden *N*-asetilglikolilnöraminik asit (Neu5Gc) ve *0*-asetillenmiş tipleridir (Schauer, 2004b).

Sialik asitler yüksek oranda yapısal farklılık gösterirler ve hücrede oldukça önemli fonksiyonlara sahiptirler. Hücre yüzeyindeki konumlarından dolayı bu asidik moleküller, makromolekülleri ve hücreleri örterek enzimatik ve immünolojik ataktan korur böylece doğuştan gelen immüniteye katkıda bulunur ve kan hücreleri ile serum glikoproteinlerinin uzun ömürlü olmalarına olanak sağlarlar (Crook vd., 1997). Sialik asitler aynı zamanda selektinler gibi birçok fizyolojik reseptör bölgelerinin tanınmasında önemli rol oynarlar, böylece toksinler ve mikroorganizmaların da koloni oluşturmalarına müsaade ederler. Birçok virüsün de, hücre enfeksiyonu için sialik asitleri kullandıkları bilinmektedir. Sialik asitler tümör biyolojisinde son derece önemli rollere sahiptirler ve çok yönlü moleküllerdir (Chefalo vd., 2004).

Karbohidrat moleküllerinin, kapiler duvarını astarlayan hücrelerin lenfositleri tanımalarında, aynı zamanda da lenfositlerin kan dokudan lenfoid dokuya geçişlerinde rol oynayabildikleri bilinmektedir. Proteinlerin karbohidratlarla kaplanması onlara oldukça farklı yetenek kazandırmaktadır. Bu özellik glikoproteinlerin makromoleküllere bağlanmasında, makromoleküllerin karaciğer hücrelerine taşınmasında ve makromoleküllerin endositozunda önemlidir (Schauer, 2004a). Hücre yapısında glikozilasyon artışı çeşitli patolojik işleyişlerde, onların patolojilerini anlamada önemlidir (Janega vd., 2002).

Sialik asitlerin eksternal pozisyonları tek başlarına, oligo ya da polimerik formlarla beraber oluşları ve hücre membranının dış yüzeyinde uygun biçimde bulunmaları hücre biyolojisine güçlü etkiler sağlamaktadır. Bu asidik monosakkaritler kolaylıkla diğer hücre yüzeyi bileşenleri, ekstraselüler maddeler ve effektör moleküllerle etkileşebilirler. Sialik asitler hücreler arası haberleşmede ve hücre adezyonunda önemli rol oynarlar (Schauer, 2004a; 2004b).

Hücre yüzeyindeki sialik asitlerin miktarlarının artması, azalması ya da sialik asitlerin özelliklerinin değişmesi, hücre ya da dokularda oluşan değişikliği ortaya koymaktadır. Sialik asitlerin negatif yükleri sayesinde onların pozitif yüklü moleküllere bağlanmalarında ve onların transportlarında hem çekici hem de hücreler ve moleküller açısından itici etkiye sahip oldukları görülür (Schauer 2004a). Örneğin, kan dolaşımında eritrositleri birbirinden uzaklaştırıcı etkiye sahiptirler. Sialik asitlerin bu

fizikokimyasal özellikleri sayesinde *0*-asetil, *0*-metil gruplarının hidrofobik bileşimlerini ayarlayabilir ya da *N*-asetil grupların yarısını hidroksilleyebilirler. Sialik asitlerin maskeleme etkileri negatif yükleri ile büyük hidrofobik moleküllerin kombinasyonları ile açıklanır.

Malignant hücrelerin yüzeylerinin sialilasyonu onların makrofajlar tarafından elimine edilmelerindeki en önemli noktadır. Benzer hücreler dikkatle incelendiğinde onların humöral ve hücresel savunmadan korundukları ve böylece bu hücrelerin metastaz yapma yeteneklerinin arttığı görülmektedir. Sialidasyonun fizyolojik sınırların üstüne çıkma stratejisi, daha fazla glikosializasyon alanları, kan serumunda daha uzun ömür ve daha iyi farmokinetik özellik sağlamaktadır. Bu sayede bazı bakteri hücrelerinin ve memeli hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve güçlü yapıştırıcı özellik kazandıran polisialik asit (PSA), hücre adezyonunu ve hücresel hareketi düzenleyebilmektedir.

Polisialik asitler, 8-100 α(2→8) bağlı sialik asit bakiyeleri içeren linear yapı gösteren ve özellikle sinir hücrelerinde adezyonu sağlayan temel moleküllerdir. Polisialiltrasferaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla sentezlenirler. Negatif elektirik yüküne sahip polisialik asit bakiyeleri beyin dokusunun gelişiminde, akson potansiyelinin düzenlenmesinde, sinapsların formasyonunda, miyelin kılıf oluşumunda, hücre farklılaşmasında ve hücre göçünde oldukça önemlidirler. Farelerde polisialik asit transferaz enziminde meydana gelen bir kayıp, gelişme ve davranış bozukluklarına yol açmaktadır. Polisialik asit transferaz enziminde meydana gelen hatalar, özellikle uzun süreli depresyonun nedenlerinden biri olarak görülmektedir. Polisialik asitlerin enzimatik olarak parçalanması kök hücre göçünü önlemekte ve yetişkin farelerde erken nöral farklılaşmaya neden olmaktadır (Yanagisawa ve Yu, 2007).

Serum sialik asit seviyeleri son dönemlerde kardiovasküler risk faktörleri olarak ilgi görmelerinin yanısıra potansiyel tümör belirleyicileri olarak da önem kazanmaktadırlar. Akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalarda da mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olsada polisialik asit seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Crook vd., 1997). Serum total sialik asit seviyelerinin kardiovasküler hastalıklarla ve mortalite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Serum sialik asitleri her zaman glikoproteinlere (α

β globulinlere) ya da glikolipitlere bağlı olarak bulunmaktadırlar (Mohamed vd., 2004). Damar tıkanıklığı olan kroner kalp hastalarında serum total sialik asit ve lipite bağlı sialik asit düzeyleri damar tıkanıklığı saptanmamış hastalara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Gökmen vd., 2002). Total sialik asit seviyelerinde meydana gelen bir artış çeşitli kanser tiplerini de kapsayan bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Kökoğlu vd., 1992; Manju vd., 2002; Chefalo vd., 2004). Bu hastalıklar arasında diabet (Crook, 2004) ve renal hastalıklar sayılabilir (İdiz vd., 2004). Hücre yüzeyi sialo glikokonjugatları insan kolon kanser hücrelerinde selüler adezyon ve metastaz ile ileşkili bulunmuşlardır (Dimitroff vd., 1999). Serum sialik asit seviyeleri prostat, ovaryum, kolon, göğüs kanseri, akciğer kanserleri gibi çeşitli kanser tiplerinde tümör belirteci olarak kullanılmaktadır. Polisialik asitler tümörün gelişimini ve yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

Bunlara ilave olarak serum sialik asit seviyeleri kronik karaciğer rahatsızlıklarında, Behçet hastalığında da önemli görülmektedir. Ayrıca kronik glomerulonefrit geçiren hastalarda da serum sialik asit seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Crook vd., 1997**)**. Romatoid artritte de serum total sialik asit seviyelerinin arttığı bildirilmiştir.Total sialik asit seviyeleri diyabetli çocuklarda kontrole göre yüksek bulunmuştur (Mohamed vd., 2004).

Sialik asitler tiroid bezinin proliferasyonunda ve salgı fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (Grollman vd., 1993) Patolojik şartlar altında tiroid bezinde hücre yüzeyi glikokonjugatlarında meydana gelen değişiklikler de direk olarak otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Hücre yüzeyi polisakkarit zincirleri, hücrede meydana gelen metabolik değişikliklerle ilişkili olarak yapısal farklılıklar gösterirler. Bu değişikliklerin bir çoğu hücrede enzimatik reaksiyonların değişmesi sonucunda oluşmaktadır (Janega vd., 2002). Glikozilasyonda genetiksel bir hatadan dolayı meydana gelen bir aksaklık, bir dizi sistemik hastalığın ortaya çıkmasından sorumludur. Moleküler düzeyde oluşan bu enzimatik aksaklıklar canlıların hayatını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Spiro, 2002; Winchester, 2005). Ayrıca serum sialik asitlerinin alkol bağımlılarında da bir gösterge olabileceği ve alkol alımına bağlı

olarak serum sialik asit düzeylerinin artığı belirtilmiştir (Bolkent, vd., 2003; İdiz vd., 2004).

Benzer şekilde kan hücrelerinin maskelenmemiş galaktoz moleküllerine bağlanmasından sonra, çok sayıda bakteri hücresi endotel hücrelerindeki mukus örtüye galaktoza özgü lektinler aracılığıyla saldırır. Örneğin, gastrointestinal sistemi astarlayan endotel hücrelerinin desialilasyonu sonucunda ortaya çıkan sondan bir önceki galaktoz molekülüne bağlanırlar. Bu gibi bakteriler sialidaz enzimi salgılarlar ki; bu enzim, koruyucu sialik asidi o bölgeden uzaklaştırır ve böylece bakteriler yayılır ya da hastalık yapma yeteneklerini arttırırlar. Sialik asitler, hücreleri immün sistem hücreleri tarafından tanınmalarına izin vermeyecek hale getirirler. Bu monosakkaritlerin hücre yüzeyinden kaybolması hücrenin kendi özelliklerini kaybetmesine ve böylece hücrelerin korunmasız olmasına yol açar. Bu nedenle sialik asitlerin immün sistemin doğuştan gelen üyeleri oldukları düşünülür (Schauer, 2004a).

Maskeleme fonksiyonunun tersine sialik asit molekülleri doğrudan doğruya organizmaların birbirlerini tanımasında da çok önemli roller üstlenirler. Bu ilk olarak yüzey karbohidratlarını konakçıya tutunmak için kullanan mikroorganizmalarda kaydedilmiştir. Sialilasyon mikroorganizmalarda da benzer bir yol izlemektedir. Ev sahibi organizmanın daha iyi bir yaşam sürmesini ve böylece hastalık yapma yeteneğini değiştirir. Sialik asitler, patojenik ve patojenik olmayan virüslere, bakterilere ve protozoalara bağlanan en yaygın ligantlar olarak görülürler. Polisialik asitler *E. coli*'de virulansı arttırırlar. Sialik asitlerin sadece mikroorganizmalar, bitkiler ve aşağı omurgalılar tarafından tanınmadığını aynı zamanda memeli reseptör proteinleri tarafından da tanındığını gösteren bazı kanıtlar mevcuttur (Lee vd., 1990; Varki, 2001; Karaçalı, 2003). Memelilerde sialik asit bağlayan selektinler, beyaz kan hücrelerinin endotele bağlanmasında ilk aşama olarak rol oynarlar (Schauer, 2004a). Endotel boyunca kümeler oluştururlar ve sonunda dokunun aşağı kısımlarına ilerlerler ki; burada dokunun oksijensiz kalmasına ve artık maddelerin naklinde hasarlara neden olurlar. Sialik asitler, sağlıklı biyolojik yapı açısından oldukça önemlidir, onların miktarlarında ya da kimyasal yapılarında meydana gelecek değişiklik hücrelerin biyolojilerini de değiştirir (Schauer, 2004a).

Kısacası sialik asitler fertilizasyonda, tümör gelişiminde, immünolojik reaksiyonlarda, apoptozu içeren hücre ömrünün belirlenmesinde, membranlar arası sinyal iletiminde, mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan inflamasyonlarda ve daha birçok biyolojik hücresel ve patolojik olayda oldukça büyük etkiye sahiptir.

Sialik asitin antioksidan olarak da fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir. H_2O_2 aerobik metabolizma sonucunda ve mikroorganizmalara karşı silah olarak kullanıldığı fagositik bağışıklıkta da yaygın olarak oluşmaktadır. Bununla beraber H_2O_2 bulunduğu ortamlarda oldukça toksiktik ve hücresel yaşlanmaya ve yaşlanmayı hızlandıran hastalıklara neden olur. Bu yüzden gerekli olmadığında elimine edilmesi zorunludur. H_2O_2'in katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından yok edildiği bilinmektedir. Bununla beraber H_2O_2'nin spesifik kimyasal süpürücülerinin bu kadar olmadığı, sialik asitin'ın bu grupta ilk sırada olabileceği düşünülmektedir. Sialik asitlerin bu anlamdaki reaksiyonu oldukça güvenlidir, çünkü sialik asitler oksijen radikallerinin oluşması açısından tehlikeli değildir. Reaksiyonda H_2O_2 ve sialik asit H_2O ve toksik olmayan karboksilik aside dönüşmektedir. Bu sebeple sialik asitin reaktif oksijen süpürücü olabileceği düşünülmektedir. Sialik asitin oksijen radikallerinin oluşturacağı hasarlara karşı hücre yüzeyini örterek, mukusta bulunarak hücreyi koruduğu ileri sürülmektedir (Iijima vd., 2004; Ogasawara vd., 2007).

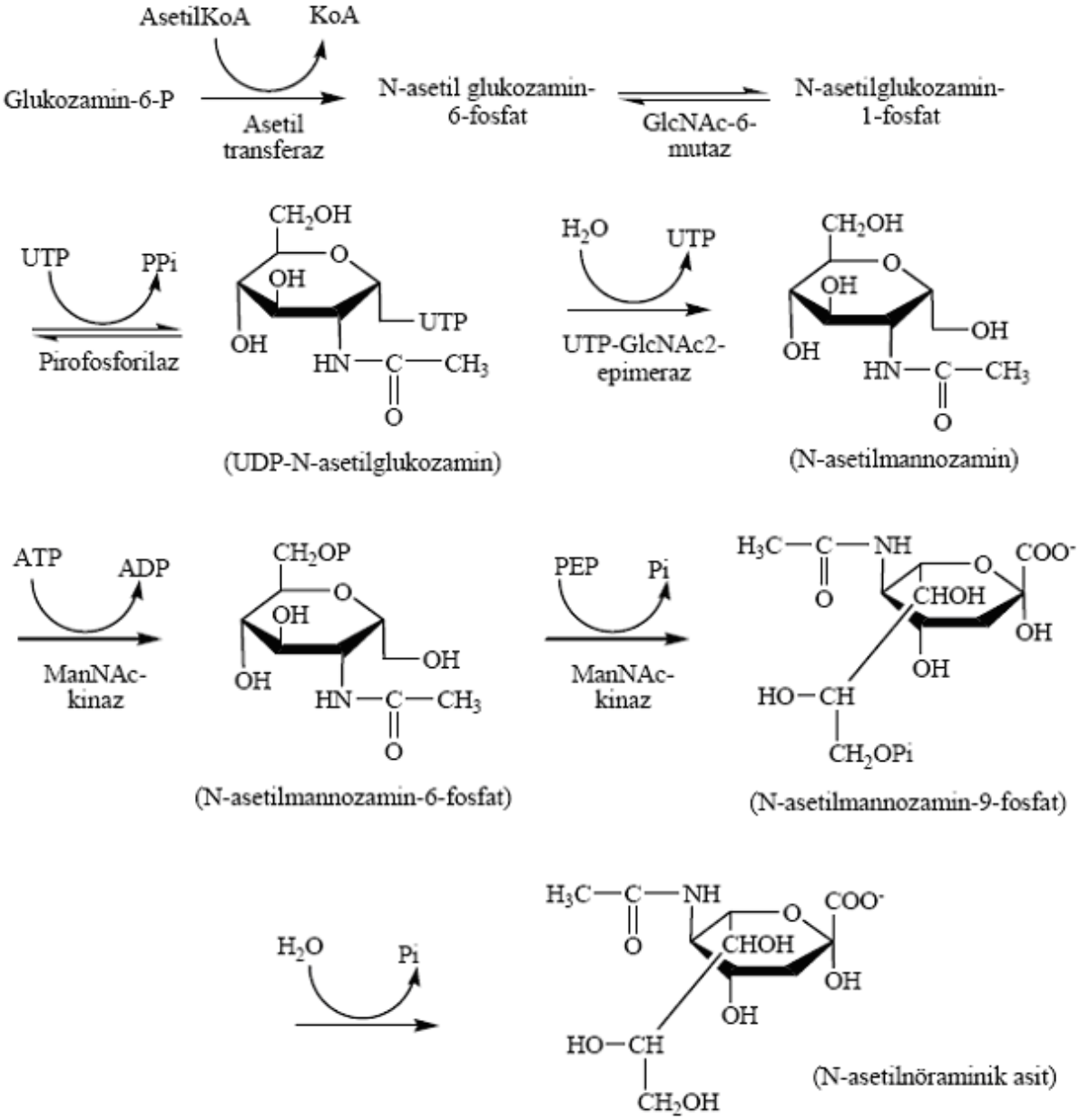
2.4.1. Sialik asitin metabolizması

Amino şekerler, glikozaminoglikan, glikoprotein, glikolipid ve bazı oligosakkaritlerin önemli yapı taşlarıdır. Bağ dokusunda amino şeker sentez yolu oldukça aktiftir ve glikozun % 20'si bu yolda kullanılmaktadır. Fruktoz-6-fosfat monosakkaridi *N*-asetil glikozamin ve *N*-asetilnöraminik asitin ön maddesidir (İşbilir vd., 2002). Amino grubu vericisi olarak glutaminin kullanılmasıyla fruktoz-6-fosfattan glikozamin-6-fosfat oluşmaktadır. Bu reaksiyon fruktoz-6-P aminotransferaz enzimi tarafından katalizlenir (Altıntaş ve Kurtul, 2006). Amino şekerler genelde *N*-asetillenmiş biçimde bulunur. Asetil verici asetil-KoA'dır. Sialik asitlerin sentezi sitozolde gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.2) . Glikozamin-6-P üç basamaklı bir enzimatik

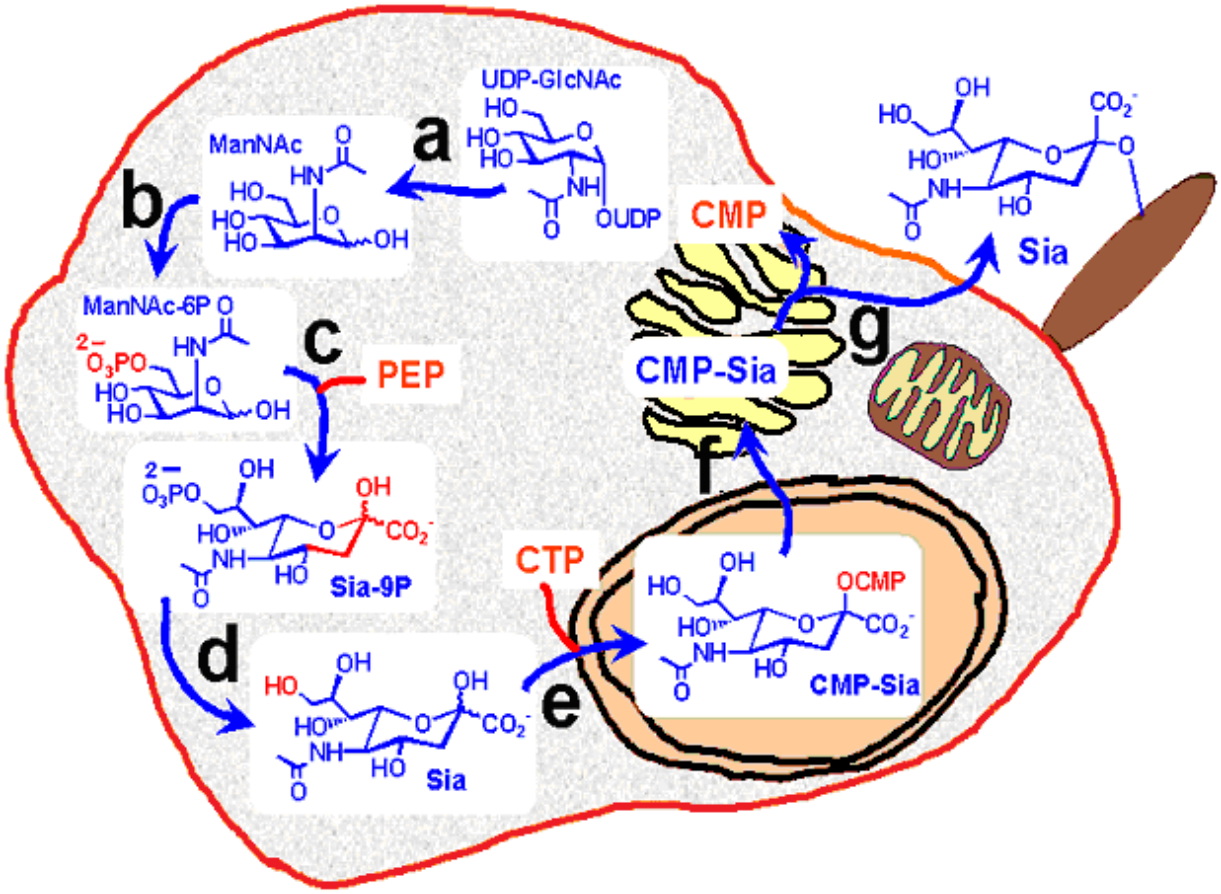
reaksiyon sonucu UDP-N-asetil glikozamine çevrilir. Sialik asit biyosentezi UDP-N-asetilglikozaminin epimerizasyonu ile devam eder. Oluşan *N*-asetilmannozamin, *N*-asetilmannozamin kinaz enzimi ile *N*-asetilmannozamin-6-fosfata çevrilir. Bu enzimatik reaksiyon basamaklarını katalizleyen UDP-*N*-asetilglikozamin epimeraz ve *N*-asetilmannozamin kinaz enzimleri insanlarda ve kemirgenlerde karakterize edilmiştir. *N*-asetilmannozamin-6-fosfat, aldol kondensasyonuyla fosfoenol piruvat ile birleşir ve *N*-asetilnöraminik asit-9-fosfatı oluşturur. Bu üründen fosfatın ayrılmasıyla *N*-asetilnöraminik asit meydana gelir (Saxon ve Bertozzi, 2001) *N*-asetilnöraminik asidin diğer tüm SA'lerin öncüsü olduğu bilinmektedir (Schauer, 2004a).

N-asetilnöraminik asitin bir oligosakkarite eklenmeden önce sitozin trifosfat ile reaksiyona girerek aktif forma geçmesi gerekmektedir (Şekil 2.4.3). Pirofosforilaz enzimi sitozin trifosfattan pirofosfatı uzaklaştırarak, kalan sitozin monofosfatı (CMP) bağlamaktadır (Şekil 2.4.3.). Bu aktivasyon reaksiyonları nukleusta gerçekleşmektedir (Hart, vd., 1989; Kean vd., 2004).

Glikoziltransferazlar oligosakkaritlerin, polisakkaritlerin ve glikokonjugatların biyosentezinde rol oynayan geniş bir enzim ailesidir (Kapitanov ve Yu, 1999; Breton vd., 2005**)**. Bu enzimler hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde glikozilasyon reaksiyonlarının çoğu Golgi organelinde gerçekleşmektedir (Buskas vd., 2006; Breton vd., 2005; Weerapana ve Imperiali, 2006).



Şekil 2.4.2. Sialik asid biyosentez basamakları. (Altıntaş ve Kurtul, 2006)



Şekil 2.4.3. Sialik asidin hücre içi biyosentez ve membrana taşınma yolu.
(http:// glycoses.ncifcrf.gov/mono/muramic.htm/)

s2.5. Gıda Katkı Maddeleri

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği"nde gıda katkı maddeleri; *"tek başına gıda olarak tüketilmeyen, gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamül maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılan maddeler"* olarak tanımlanmaktadır (http://www.kkgm.gov.tr). Diğer bir deyişle gıda katkı maddesi, bir ürünün ana bileşeni olmayan fakat o ürünün işlenmesi, ambalajlanması veya depolanması ile ilgili farklı amaçlar için ürüne ilave edilen kimyasal madde veya maddeler karışımıdır.

Gıda katkı maddelerinin izin sürecinde tek hedef, kullanımda insan sağlığının korunmasıdır. Gıda katkı maddeleri insanların karşılaştığı kimyasallar içerisinde çok özel bir gruptur. İnsanlar bu maddelere doğumdan ölüme kadar maruz kalabilmektedirler. Gıda katkı maddelerinin kullanımı günümüzde hızla artmıştır. Özellikle 20.yy. başlarında bu artış gözle görülür bir seviyeye çıkmıştır.

Tüketici sağlığına zarar vermeyen birçok kimyasal bileşenin yönetmelikçe belirlenmiş düzeylerde gıdalara katılması ile gıdaların mikrobiyolojik yolla bozulmasının önlenmesi yöntemine *'koruyucu maddelerle muhafaza'* denmektedir. Bu maddelerin etki mekanizmaları mikroorganizmalar üzerindedir. Bu maddeler mikroorganizmalar üzerinde membranın, hücre duvarının veya hücre metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktifliğini bozma veya azaltma şeklinde etkili olmaktadırlar.

Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması:

Gıda katkı maddeleri:

1. Gıdaların görünümünü düzeltici maddeler (Renk maddeleri, ağartıcı ve renk düzeltici maddeler).
2. Yapıyı düzeltici maddeler (Kalınlaştırıcılar, emülgatörler ve stabilizatörler)
3. Aroma maddeleri
4. Tatlılaştırıcı maddeler
5. Biyolojik değeri arttırıcı maddeler (Vitaminler, minareler, iz elementler)
6. Gıdaların depolama sürelerini arttırıcı maddeler (Koruyucu maddeler)

şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Uluslararası kuruluşlarca kabul görmüş katkı maddesine bir numara verilir. Numaralanmış bu listelerden Avrupa Ekonomik Topluluğu'nda kullanımına izin verilen katkı maddelerine E kodu verilmiştir. Numaranın başındaki "E" ya da EU Avrupa Birliği`ni simgelemektedir.

Ülkemizde de AET'ye uyum programı uygulandığı için aynı isimlendirme kullanılmaktadır. Kullanılmasına izin verilen katkı maddeleri için bazı ülkeler tarafından sınırlamalar getirilmiştir. Nitekim listelerde izin verildiği halde bazı katkı maddelerini, Amerika, Avusturya, Avrupa kendi ülke sınırları içerisinde yasaklamışlardır.

Avrupa Ekonomik Topluluğunca, gıda maddelerinde kullanılan katkı maddeleri ile ilgili yapılan çalışmalar dikkate alınarak bu maddeler kendi içlerinde gruplandırılmışlardır.

A_1 grubunda bulunan tüm maddelerin değerlendirilmeleri tamamlanmış ve günlük alınabilir dozlar (ADI) belirlenmiştir. Bunlar kullanımına izin verilen maddelerdir. A_2 grubunda bulunan maddelerin değerlendirmeleri henüz tamamlanmamış ancak, günlük kullanım miktarları belirlenerek geçici olarak kullanımına izin verilmiş olan maddelerdir.

B grubu listesinde bulunan katkı maddelerinin değerlendirilmesi tamamlanmamıştır. B_1 grubundaki maddelerde ise değerlendirmelere başlanmış olup, günlük alınabilir miktarlar tespit edilmemiştir. Bu gruptaki maddeler, üretimindeki önemlerinden dolayı teknolojik açıdan kullanımlarına izin verilen maddelerdir. B_2 grubunda ise hiç bir değerlendirmeye tabi tutulmamış, ancak değerlendirmeye aday olan katkı maddeleri bulunur.

C listesi olumsuz yapı listesidir. C_1 ve C_2 gruplarında toksikolojik verilere göre kullanımı tamamen sakıncalı olanlar ya da kullanımına kısmen izin verilenler yer alır. C_1 listesi gıda katkısı olarak kullanımları insan sağlığı için zararlı olarak kabul edilen katkı maddeleridir. ADI değerleri yoktur. C_2 listesi kullanımı ancak belirli amaçlar için sınırlandırılmış olan katkı maddelerini içerir.

Ürüne katılacak, katkı maddesinin maksimum miktarının tespiti ayrı bir çalışmayı gerektirmektedir. Ürünün üretim teknolojisinin gerektirdiği miktar ile, günlük doz miktarı aşılıyorsa, katkı maddesinin kullanılmasına izin verilmemesi gerekir.

Günlük doz, teknolojinin gerektirdiği miktarda aşılmıyorsa, bu sefer, günlük hayatımızda kullanılan ürünlerden kaç tanesinde bu katkı maddesinin kullanıldığına bakılır. Bu ürünlerin toplamındaki katkı madde miktarı, günlük maksimum alınmasına izin verilen dozu aşıyorsa, bu katkı maddesinin tüm ürünlerde kullanılmasının yasaklanması gerekir.

Uluslararası JECFA (Join Expert Commitee on Food Additive) komitesi, bütün faktörleri dikkate alarak gıda ürünlerinde kullanılacak katkı maddelerinin % miktarlarını tespit etmek zorundadır. Komitenin bütün ihtimamına rağmen vücut ağırlıkları farklı olan insanlarda riskli durumlar oluşabilecektir. 80 kg vücut ağırlığına sahip insanın günlük maksimum dozu 80 mg olsa, aynı gıda ürünlerini kullanan 60 kg.' lık bir insan için doz aşımının oluşması kaçınılmaz olacaktır.

Günümüzde 2000'den fazla katkı maddesinin gıda sanayinde kullanımına değişik amaçlarla izin verilmiş ve kullanım birçok ülkede yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Koruyucuların kullanımı kısıtlı olup her amaç için kullanılamamaktadır. Koruyucu kullanımı ile bozulan bir maddeden zararsız ve tüketilebilir bir madde yapmak mümkün değildir. Ayrıca koruyucu madde düşük kaliteli maddelerin iyileştirilmesinde de kullanılamaz.

Yalnızca bu güne kadar yapılan araştırmalarda tüketici sağlığına zarar vermeyen katkı maddelerinin kullanımına izin verilmesi, insan sağlığını koruma açısından yapılması gerekendir. Tüm katkı maddeleri sürekli kontrol altında tutulmalı ve kullanım durumları yeni bilimsel bulgular doğrultusunda gerekirse yeniden değerlendirilmelidir.

2.5.1. Sodyum benzoat

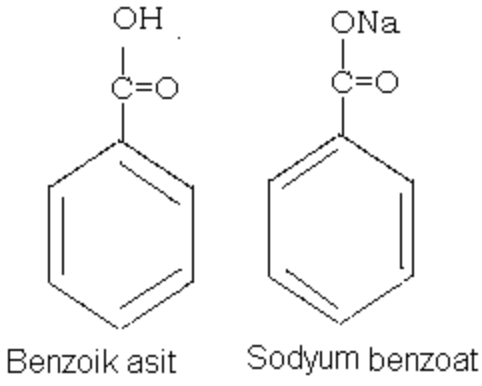
Benzoik asit (E 210) 'benzen halkası' içeren bir bileşiktir. Benzoik asit daha çok sodyum tuzu halinde kullanılan bir antimikrobiyal maddedir. Sodyum benzoat benzoik asitin sodyum tuzudur. Sodyum benzoatın ($C_7H_5O_2Na$) yaygın olarak kullanılma nedeni benzoik asitin suda çözülme niteliğinin düşük olmasıdır. Sodyum benzoat'ın moleküler ağırlığı 144.11 dir. Canlılar benzoik aside ya da Sodyum benzoat'a doğal yollarla (böğürtlengiller, kimyon, karanfil, tarçın, anasonda ve çeşitli erik türlerinde az miktarlarda bulunmaktadır) ya da antimikrobiyal ajan olarak gıdalara ilave edildiğinde maruz kalırlar. Benzoik asit, bazı süt ürünlerinde olduğu gibi birçok besinin yapısında doğal olarak yer almaktadır. Ancak bunun miktarı 40 ppm'i geçmemektedir. Koruyucu amacı ile kullanıldığında en yüksek benzoik asit ya da sodyum benzoat konsantrasyonunun 2000 ppm olması istenmektedir (Altuğ, 2006).

Sodyum benzoat özellikle işlenmiş yiyeceklerde bulunan bir katkı maddesidir. Çikolata, çeşitli meyve suları, şekerlemeler, dondurma, kremalar ve çikletler ve bazı ilaçlarda bulunmaktadır. Gıda sektöründe etkili bir antimikrobial ve antifungusit ajan olarak kullanılmaktadır (Chipley, 1983; Baldwin vd., 1995; Srour, 1998; Balachandra ve Sudha, 2007). Mikrobiyal üremeyi engellediği uygun pH sınırları 2.5 - 4.0 arasında

değişmektedir. Sodyum benzoat maya ve bakterilere karşı oldukça etkili bir antimikrobialdir. pH 2.3 - 2.4 arasında % 0,03 - % 0,02' lik sodyum benzoat çözeltisi, fermantasyon yapan mikroorganizmaların gelişimini önlemektedir.

Sodyum benzoat'ın gıdalara farklı ülkelerde farklı miktarda ilave edildiği bilinmektedir (WHO 2000). Oral olarak alınan Sodyum benzoat'ın sindirim sisteminde hızlı bir şekilde emildiği, insanlarda ve deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (US FDA 1972a, 1972b). İnsanlarda alındıktan sonra 1-2 saat içinde plazma konsantrasyonunda en yüksek düzeye ulaştığı bilinmektedir (Kubota ve Ishizaki, 1991). Sodyum benzoat dermal ya da oral yolla alındıktan sonra karaciğerde metabolize olmaktadır (Feillet ve Leonard, 1998).

Ağızdan alımı halinde benzoik asit gastrointestinal sistemde hızla absorbe edilir ve karaciğerde glisin ile birlikte hippürik asit yapılanmasını sağlar. Ardından ise hızlı bir şekilde idrar yolu ile atılır. Sodyum benzoat'ın kısa süreli oral alımına bağlı olarak serum gama glutamiltranspeptidaz, albumin, kolinesteraz seviyelerini değiştirdiği, özellikle periportal alandaki hepatositlerde camsı sitoplazmanın oluştuğu (Fujitani, 1993; Kaboğlu ve Aktaç, 2002) ancak böbrek dokusunda bir değişikliğin gözlenmediği bildirilmiştir (Fujitani, 1993). Benzoik asit'in oral, dermal ya da solunum yoluyla alımına bağlı olarak insanlarda düşük seviyelerde dahi astıma, deri döküntüleri gibi çeşitli allerjik raksiyonlara ve anaflaktik şoka neden olduğu bildirilmiştir (Bindslev-Jensen, 1998; Coverly vd., 1998).



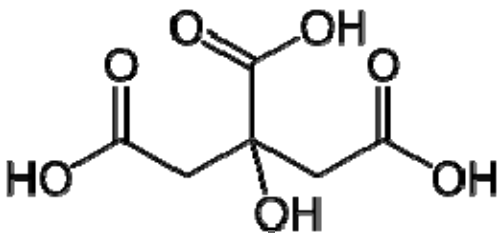
Şekil 2.5.1 : Benzoik asit ve Sodyum benzoat'ın moleküler yapıları.

(http://www.inchem.org/)

A.B.D.'de gıda endüstrisinde benzoik asit ve sodyum tuzlarının yasalar çerçevesinde kullanılması serbest bırakılmıştır. Bazı ülkelerde kullanımına sınırlamalar getirilmiş, bazı ülkelerde ise bu maddenin gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilmiştir. Besinlerde % 1 ve daha yüksek oranda kullanıldığında benzoik asit, toksik etkilere neden olmaktadır. Genellikle gıda katkı maddesi olarak kullanımında öngörülen miktarı % 0.2 – 0.3 arasında olup, yalnızca Fransa'da peynir mayasında kullanılmaktadır. Sodyum benzoat'ın günlük olarak alınmasına izin verilen miktarı 0–5 mg/kg vücüt ağırlığıdır (WHO, 1996; 2000).

2.5.2. Sitrik asit

İşlem görmüş gıdalara, antimikrobiyal üremeyi önlemek amacıyla kullanılan sitrik asit (E 330) oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Philips, 1999). Sudaki çözünürlüğünün yüksek olması ve maliyetinin düşük olması, yaygın olarak kullanılmasındaki en önemli nedenlerdir. Gazlı içeceklerde keskinliği sağlamak lezzeti arttırmak ve iz elementlerle şelat oluşturmak; reçellerde, marmelatlarda bisküvilerde, yağ ve konserve üretiminde pH' yı kontrol etmek ve mayhoşluğu sağlamak; kür edilmiş ve dondurulmuş et ürünlerinde şelat oluşturarak su tutma kapasitesini arttırmak amacıyla ve yağlarda antioksidan sinerjisti olarak kullanılmaktadır. Ayrıca konserve sebzelerde, süt ürünlerinde, özellikle peynirde asitliği düzenleyici olarak kullanılan sitrik asidin, peynirde lezzet ve aromayı geliştirme özelliği olduğu bilinmektedir (Altuğ, 2006). İlaç sektöründe pek çok ilaçta, temizlik sektöründe şampuan üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitrik asitin pH değeri 3.5 ve pKa değerleri yaklaşık olarak 3, 4 ve 5'tir.



Şekil 2.5.2 : Sitrik Asit (Monohidrat)'in moleküler yapısı.
(http://nl.wikipedia.org/wiki/Citroenzuur)

Aynı zamanda antioksidan olarakta kullanılan sitrik asit, diğer antioksidanlarla birlikte kullanıldığında onların etkisini artırır. 100 – 200 ppm oranında kullanılan bir antioksidana % 0.1 – 0.3 oranında katılabilir. Su ürünlerinde askorbik asit ile sinerjik etki oluşturarak enzimleri etkisiz hale getirip oksidasyonu önlediği bilinmektedir. Sitrik asit, karbohidratların okside olup karbondioksit ve suya dönüşmesi ve enerji açığa çıkmasında önemli bir rol oynayan sitrik asit döngüsü için oldukça önemlidir. Sitrik asit meyvelerde ve özellikle turunçgillerde bulunmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Kimyasal Madde Dozları

Deneylerde on iki haftalık genç ergin Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen hayvanların, on günlük deney süresi boyunca bakım ve beslenmeleri de aynı birimde yapıldı. Bu merkezde deney hayvanları 21 ^{o}C'de, % 50 - 55 nem ve 12/12 saat aydınlık/ karanlık periyodunda tutuldu (Kato vd., 1988).

Deneyler; kontrol grubu, Sitrik asit grubu ve Na-benzoat grubu olmak üzere, her biri on hayvandan oluşan üç grup halinde yürütülmüştür. Deney hayvanlarına Sitrik asit'in ve Na-benzoat'ın LD_{30} dozları, (sitrik asit : 576 mg/kg/vücut ağırlığı; Na-benzoat : 2442 mg/kg/vücut ağırlığı) kontrol grubuna ise içme suyu 10 gün süreyle günde bir defa olarak gavaj yolu ile uygulanmıştır. On günlük diyet sonunda kontrol ve deney grubuna ait hayvanlardan anestezi altında (Rompon 5-10 mg/kg ve Katalar 50-60 mg/kg) açılarak inceleme materyalleri (kalp kanı, karaciğer ve böbrek dokuları) alınmıştır. Hayvanların vücut ve organ ağırlıkları ölçülmüştür.

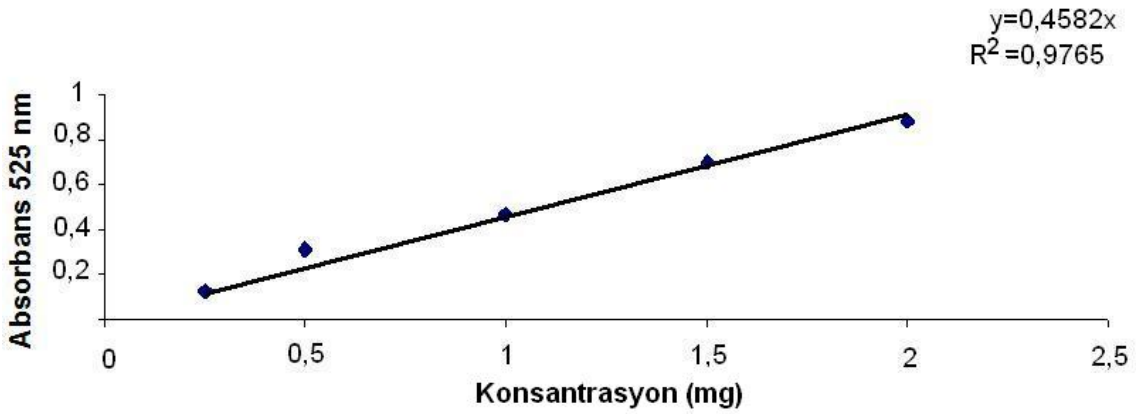
3.2. Biyokimyasal İnceleme

Çalışmanın bu bölümünde kan, karaciğer ve böbrek sialik asit miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Deney sonunda hayvanlardan alınan doku (%0,9'luk serum fizyolojik içinde) ve kan (serumu) örnekleri ölçümleri yapılana kadar –70 ºC de saklandı (İdiz vd., 2004).

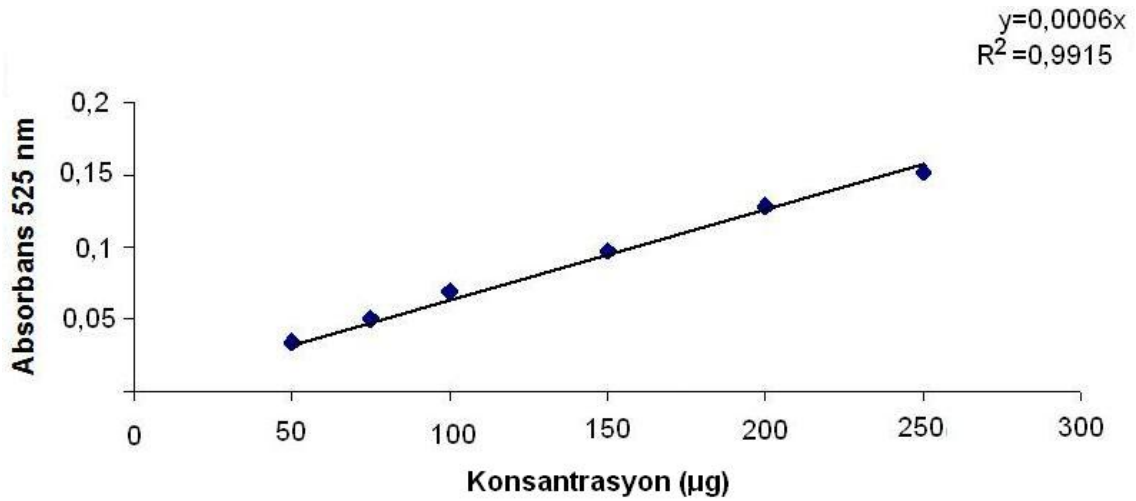
3.2.1. Sialik asit standart grafiklerinin hazırlanışı

Fosfat tamponu (pH 7.4, 0.1 M) kullanılarak 0,3 mg/10 ml *N*-asetil nöraminik asit çözeltisi hazırlanmış, hazırlanan bu stok çözelti seyreltilerek

belli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanarak doku ve serum sialik asit standart grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 3.1.1.1 : Serum Sialik Asit Standart Grafiği



Şekil 3.1.1.2 : Doku Sialik Asit Standart Grafiği

3.2.2. Serum sialik asit ölçümü

Hayvanlardan alınan kan örnekleri, 2500 rpm'de 10 dak. santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ölçümleri yapılana kadar –70 ºC de saklandı (İdiz vd., 2004).

Alınan serum örnekleri, perklorik asit çözeltisinde (0.2 ml örnek + 1.5 ml %5 perklorik asit olacak şekilde) 100°C' de 5 dakika inkübe edildi, 2500X g'de 4 dakika

santrifüjleme işleminden sonra alınan süpernatana 0.2 ml Ehrlich's reaktifi eklenerek 15 dakika 100°C' de inkübe edildi, soğutulduktan sonra 525 nm'de Shimadzu UV-VIS marka spektrofotometrede ölçümleri yapıldı. Hazırlanan standart grafikler kullanılarak serum sialik asit düzeyleri mg/ml olarak hesaplandı (Sydow, 1985; Karaçalı vd., 1995).

3.2.3. Doku sialik asit ölçümü

Deney sonunda hayvanlardan alınan doku (% 0,9'luk serum fizyolojik içinde) ölçümleri yapılana kadar – 70 ºC de saklandı (İdiz vd., 2004). Doku örnekleri 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.4) cam-cam homojenizatör kullanılarak 5 dakika homojenize edildi. Doku homojenatından alınan örneklerden sialik asit ölçümü serum sialik asit ölçümünde kullanılan yöntemle spektrofotometrik olarak 525 nm'de ölçüldü (Sydow, 1985; Karaçalı vd., 1995).

3.2.4. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analiz, SN: AXA 507C775506:FAN 3 seri numaralı STATISTICA AXA Programı ile yapıldı. Değişkenlere ait tanımlayıcı ölçümler X ± SS olarak verildi. Normal dağılıma uygunluğa tek örnek Kalmogorov Simirno²耀Testi uygulanmış, normal dağıldıkları için gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi, varyans analizi sonrasında ikili karşılaştırmalar için varyansları homojen olanlara Benferroni t testi, olmayanlara Dunnet T_3 testi uygulanmıştır. $P<0.05$ ve $p<0,0001$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.3. Mikroskobik İnceleme

3.3.1. Işık Mikroskobu

Işık mikroskobu incelemesi için karaciğer ve böbrek dokularından alınan parçaların bir bölümü Bouin'de 24 saat, bir bölümü ise +4 ºC' de Sainte-Marine tespit sıvısında 1 gece fikse edildi. Rutin takip işlemlerinden sonra, parafine gömülen dokulardan 5µ kalınlığında kesitler alındı.

a) Bouin'de fikse edilen kesitlere histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin boyası uygulandı.

b) Sante-Marine'de fikse edilmiş doku kesitleri, parafinden kurtarma ve hidrasyon işlemlerinden sonra %3'lük asetik asit çözeltisinde 3 dakika tutuldu, %1'lik Alcian blue (pH 2.5) ile oda ısısında 30 dakika boyandı, çeşme suyunda 2 dakika yıkandıktan sonra saf su ile çalkalandı. 5 dakika periyodik asit çözeltisinde tutulan kesitler daha sonra akarsuda her biri 10 dakika olacak şekilde üç kez yıkandı. Schiff solusyonunda 15 dakika tutulan kesitler, yıkama solusyonunda her biri 5 dakika olan üç banyodan geçirilerek, ardından akarsuda 5 dakika yıkandı. Dehidrasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden sonra kapatılarak incelendi. Membran glikozaminoglikanlarının (GAG) gösterilmesi için %1'lik Alcian blue (AB) 8Gx (pH 2.5) ve Periodik Asid-Schiff (PAS) ile boyandı. PAS dokulardaki nötral tipteki mukopolisakkaritleri (GAG) boyarken (bazal membranlar, kapsüller, kan damarları gibi), AB (pH. 2.5) asidik mukopolisakkaritleri (GAG) boyar.

3.3.2. Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobu incelemeleri için alınan doku parçaları üç gruba ayrıldı.

Birinci grup; doku tahribatının ince yapı analizi için, % 4'lük Gluteraldehit (0.1 M fosfat tamponu pH 7.2-7.4) tespit sıvısı ile fikse edildi ve % 1'lik OsO_4 (0.1 M fosfat tamponu pH 7.2-7.4) ile ikinci tespitleri yapıldı. Dokular yükselen aseton serilerinden geçirildikten sonra, Epon 812'ye gömüldü.

İkinci ve üçüncü gruplar ise dokuda glikokonjugatlardaki sialik asitlerin gösterilmesi amacı ile Rutenyum kırmızısı (RR) ile boyanmak üzere işleme alındı (Karaçalı vd., 2000). Hücre yüzeyinde bulunan glikokonjugatların anyonik grupları katyonik bir boya olan Rutenyum kırmızısı ile reaksiyona girerek onları elektronca yoğun granüller olarak boyar. Sitokimyasal olarak proteoglikanların karakterizasyonu, glikozaminoglikanları parçalayan çeşitli enzimlerin kullanılması ile gösterilir (Chan ve Wong, 1992). Nöraminidaz bu enzimlerden sadece bir tanesidir ve sialik asit bakiyelerinin çeşitli glikokonjugatlardan hidrolizini katalizler. İkinci gruptaki dokulara

sialik asit bakiyelerinin glikokonjugatlardan hidrolizi için Nöraminidaz (Sialidaz, Asetilnöraminik hidrolaz) uygulaması yapıldı. Üçüncü gruptaki dokulara ise enzim kontrolü ve sialik asitlerin görülmesi için Nöraminidaz uygulaması yapılmadı.

İkinci gruptaki dokular, *Vibrio cholerae*'dan elde edilen 10 unite/ml Nöraminidaz (Sialidaz, Asetilnöraminik hidrolaz EC 3.2.1.18 SIGMA) içeren asetat tamponda 37 ºC' de bir gece inkübe edildikten sonra, 1 ml'sinde 1 mg Rutenyum kırmızısı (RR) olacak şekilde hazırlanan Karnovski tespit sıvısıyla oda ısısında üç saat fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra 1ml'sinde 1mg Rutenyum kırmızısı olacak şekilde hazırlanan 0.1 M Kakodilat (pH 7.4) tamponunda yıkanıp, Kakodilat tamponunda 1:1 olacak şekilde hazırlanan OsO_4 ile ikinci tespitleri yapıldı. Dokular kısa süreli yıkama işlemleriyle fiksatiften kurtarıldı ve 1ml'sinde 1mg RR içeren %1'lik kakodilat tamponunda bir gece bekletildi. Daha sonra rutin takip işlemlerinden sonra Epon 812'ye gömüldü. Ultramikrotomda kesit alma işleminden sonra kontrast boya uygulamadan JEOL JEM 100 Marka elektron mikroskobunda bulgular değerlendirildi

Üçüncü grup dokuları enzim kontrolü amacıyla Nöraminidaz içermeyen 0.1 M kakodilat tamponuna (pH 7.4) alınarak (Chan ve Wong, 1992), bir gece inkübe edildikten sonra, 1ml'sinde 1mg Rutenyum kırmızısı olacak şekilde hazırlanan Karnovski tespit sıvısıyla oda ısısında üç saat fikse edilen dokuların bundan sonraki rutin takip işlemleri ikinci gruptaki gibi yapıldı.

Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Ehrlich Reaktifi
P-dimetilaminobenzaldehit……..2 gr
%20'lik HCl

%5'lik Perklorik asit
Perklorik asit……83 ml
Saf su……91.7 ml

%0.9 NaCl
NaCl……..9 gr
Saf su……1000 ml

Sainte Marine tespit sıvısı
% 95'lik Etil alkol …….99ml
Saf asetik asit……....1ml

Bouin tespit sıvısı
Suda doyurulmuş pikrik asit……75 ml
Formalin……...25 ml
Saf asetik asit……..5 ml

Hematoksilen
Hematoksilen…….1gr
Etil alkol……10 ml
Potasyum alanin……20 gr
Civa oksit……..0.5 gr
Saf su ……...200 ml
asetik asit……..1-2 damla

Eozin Y
Eozin Y……. 0.1 gr
%70 Etil alkol……100 ml
Saf asetik asit……..... 0.5 ml

Alcian Blue
Alcian Blue 8Gx…….1gr
% 3'lük asetik asit……...100 ml

Schift solusyonu
Bazik fuksin……..1 gr
Potasyum metabisülfit……..1 gr
1 N HCl…….20 ml
Aktif kömür……0.3 gr

Periyodik asit solusyonu
Periyodik asit…….1gr
Saf su…….100 ml

Yıkama solusyonları
a- % 10'luk Potasyum metabisülfit
b- % 10'luk 1 N HCl

Karnovski tespit sıvısı
% 8'lik Paraformaldehit……...…5 ml
%25'lik Gluteraldehit……2ml
Saf su…….3ml
Kakodilat tamponu……..10 ml

0.2 M Kakodilat Tamponu (pH 7.4)
Na- Kakodilat ……...4.28 gr
Saf su ……...95.72 ml
1N HCl ……100 ml

0.1 M Milloning Fosfat Tamponu (pH 7.2-7.4)
A Solusyonu ……41.5 ml
(2.26 gr $NaH_2PO_4.H_2O$ 100 ml saf suya tamamlanır)
B Solusyonu…….8.5ml
(2.52gr NaOH 100ml saf suya tamamlanır)
C solusyonu ……...5ml
(5.4gr Glukoz 100ml saf suya tamamlanır)
s

%4'lük Gluteraldehit
Gluteraldehit ……..16ml
Fosfat tamponu……...84ml

Gömme Maddesi
Epon 812…….47.40ml
DDSA…….24.6ml
MNA……..28ml
DMP 30……..1.5 ml

Toluidin-Blue
Toluidin-Blue……..0.5 gr
1 N NaOH……15 damla
Saf su……...50ml

Uranil Asetat
Uranil Asetat……2gr
Saf su……...100ml

4. BULGULAR

4.1. Vücüt Ağırlığı ve Organ Ağırlığı Sonuçları

Çalışma sonunda elde edilen vücut ve organ ağırlık ölçümlerinin sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tablodan da izlenildiği gibi, vücut ağırlığında meydana gelen değişimler istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer olarak böbrek ağırlık değişiklikleri de anlamlı değildir. Karaciğer ağırlıklarında ise sitrik asit grubunda kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış meydana geldiği *($p<0.05$); ancak sodyum benzoat grubundaki artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.1. Sodyum benzoat ve sitrik asitin vücut ağırlığı ve organ ağırlıkları üzerine etkileri

Deney grupları	**Vücut ağırlığı (gr)**		**Organ ağırlığı (gr)**	
	Deney öncesi	**Deney sonrası**	**Karaciğer**	**Böbrek**
Kontrol grubu	312.00 ± 34.049	312.09 ± 34.301	10.280 ± 0.8443	2.810 ± 0.3107
Na-benzoat grubu	324.70 ± 28.040	338.60 ± 30.471	11.250 ± 1.8810	2.700 ± 0.6000
Sitrik asit grubu	324.70 ± 30.623	330.34 ±31.097	12.243 ± 1.5087*	2.743 ± 0.3090

* ($p< 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı, tablo değerleri aritmetik ortalama ± SS (Std. deviation) olarak verilmiştir.

4.2. Serum Sialik Asit Sonuçları

Spektrofotometrik ölçümlere göre, sodyum benzoat grubuna ait hayvanların serum sialik asit miktarları kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli olçüde azalmıştır ($p<0.05$), (Tablo 4.2). Sitrik asit grubunda ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Sitrik asit ve sodyum benzoat grupları arasındaki fark da, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0.0001$).

4.3. Doku Sialik Asit Sonuçları:

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi, sodyum benzoat grubuna ait hayvanların hem karaciğer hem de böbrek dokularında sialik asit miktarları önemli olarak azalmıştır ($p<0.0001$). Sitrik asit grubunda karaciğerde anlamlı bir değişiklik görülmez iken, böbrek dokusunda sialik asit seviyesi önemli olarak ($p< 0.0001$) artmıştır. Sitrik asit ve sodyum benzoat grupları arasındaki fark da, her iki dokuda anlamlıdır ($p< 0.0001$).

Tablo 4.2. Sodyum benzoat ve sitrik asitin serum ve doku sialik asit miktarları üzerine etkileri.

Deney grupları	Serum sialik asit miktarı (mg)	Karaciğer sialik asit miktarı (µg)	Böbrek sialik asit miktarı (µg)
Kontrol grubu	14.108000 ± 3.6604456	2.35800 ± 0.514302	2.935000 ± 0.4703013
Na- Benzoat grubu	9.566000 ± 1.4289794*	0.87200 ± 0.673891**	1.169000 ± 0.3200503**
Sitrik asit grubu	14.285714± 1.4612992	2.57286 ± 0.811659	3.988571 ± 0.5565497**

* ($p<0.05$) ** ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı, tablo değerleri aritmetik ortalama ± SS (Std. deviation) olarak verilmiştir.

4.4. Işık Mikroskobu Bulguları

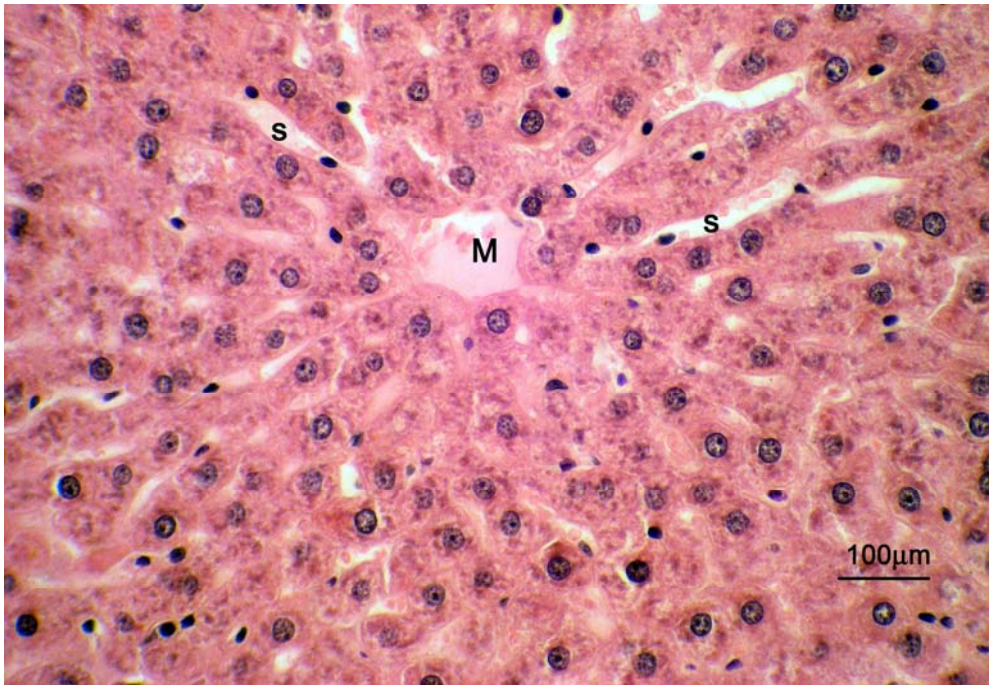
4.4.1. Karaciğer dokusu üzerindeki etkiler

4.4.1.1. Hematoksilen-Eozin ile boyama

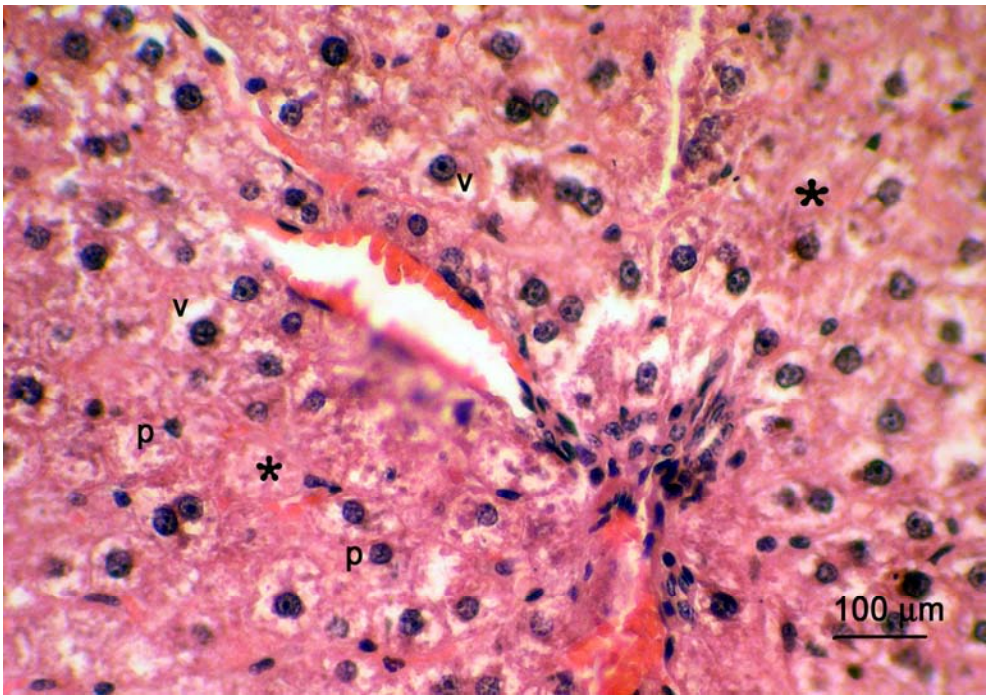
Işık mikroskobu düzeyinde yapılan incelemeler sonucunda, kontrol grubu (Şekil 4.4.1.1.1.) ile karşılaştırıldığında dokuların genel histolojik yapılarında dejeneratif değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir. Sitrik asit ile beslenen hayvanların karaciğer dokularında meydana gelen dejeneratif değişiklikler, karaciğer hücre kordonlarının yapısında bozulmalar (Şekil 4.4.1.1.2), karaciğer hücrelerinde vakuolizasyon, piknotik nukleuslar, hepatositlerde nukleus kayıpları (Şekil 4.4.1.1.2, Şekil 4.4.1.1.3), hepatositlerde hipertrofi, nukleus zarında invaginasyon, (Şekil 4.4.1.1.3) şeklinde sıralanabilir.

Sodyum benzoat ile beslenen hayvanların karaciğer dokularında meydana gelen dejeneratif değişiklikler, karaciğer hücrelerinde vakuolizasyon, piknotik nukleuslar,

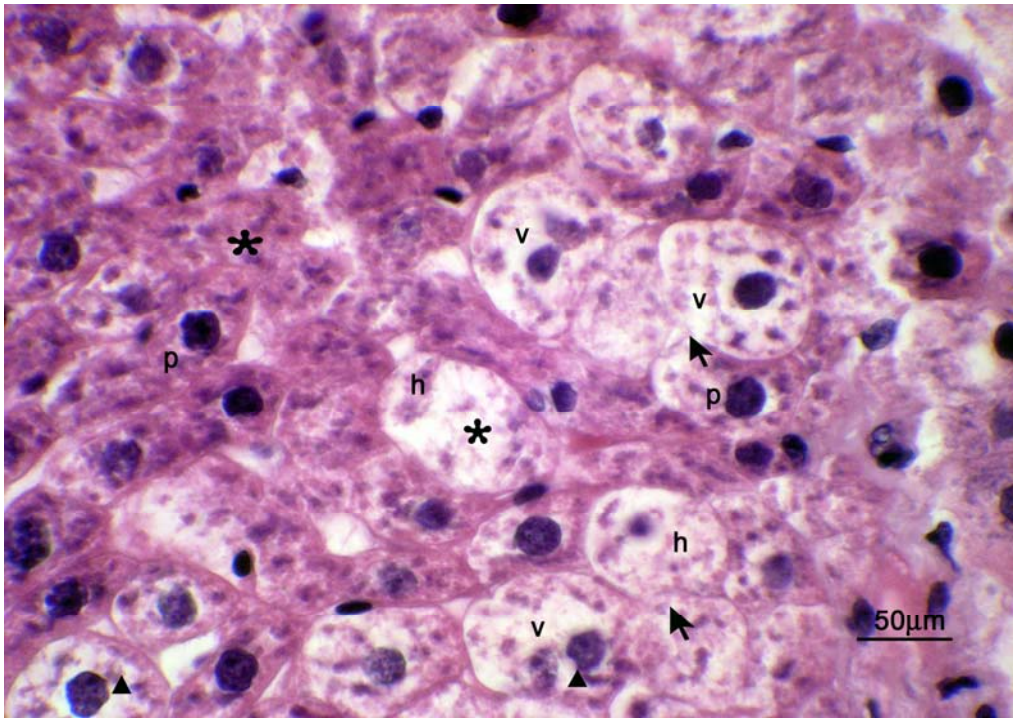
nukleus zarında invaginasyon, nukleus kaybı, hepatosit nukleuslarında zar invaginasyonları, hepatositlerde membran hasarı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.1.1.4).



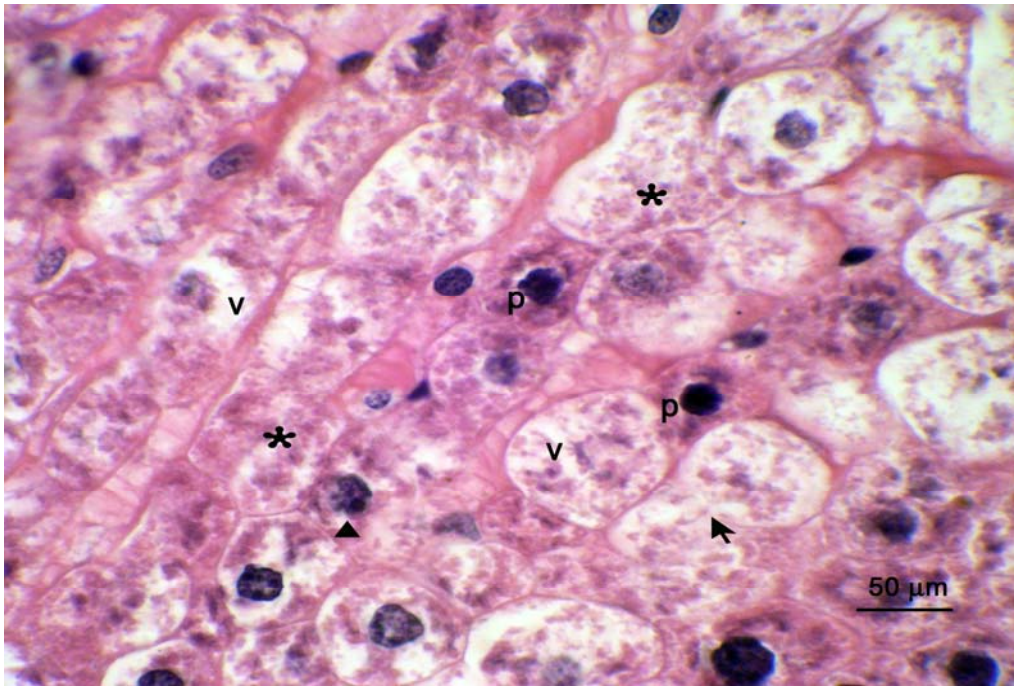
Şekil 4.4.1.1.1 : Kontrol grubu karaciğer dokusu. Merkezi ven (M), sinüzoit (s), (H-E boyama 200X).



Şekil 4.4.1.1.2 : Sitrik asit grubuna ait karaciğer dokusu. Piknotik nukleus (p), hepatositlerde vakuolizasyon (v), nukleuslarını kaybetmiş hepatositler (*), (H-E boyama 200X).



Şekil 4.4.1.1.3 : Sitrik asit grubuna ait karaciğer dokusu. Piknotik nukleus (p), hepatositlerde hipertrofi (h) ve vakuolizasyon (v), nukleuslarını kaybetmiş hepatositler (*), nukleus zar invaginasyonları (ok başı), hepatositlerde membran hasarı (ok), (H-E boyama 400X).

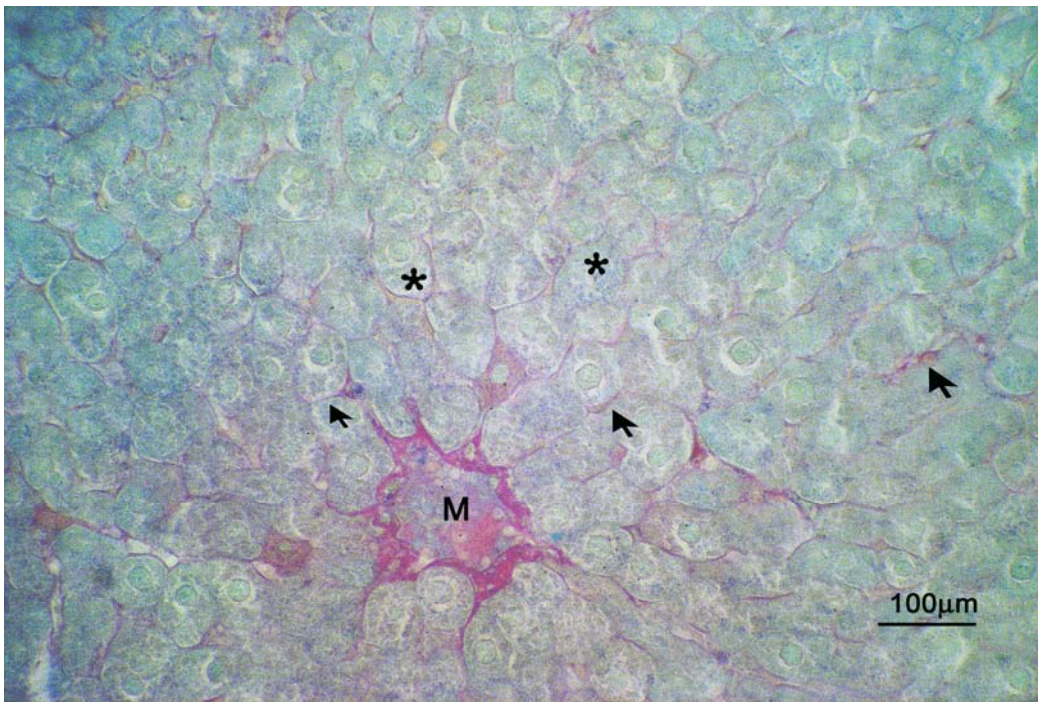


Şekil 4.4.1.1.4 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. Piknotik nukleus (p), hepatositlerde vakuolizasyon (v) ve membran hasarı (ok), nukleus kaybı (*), zar invaginasyonları (ok başı), (H-E boyama 400 X).

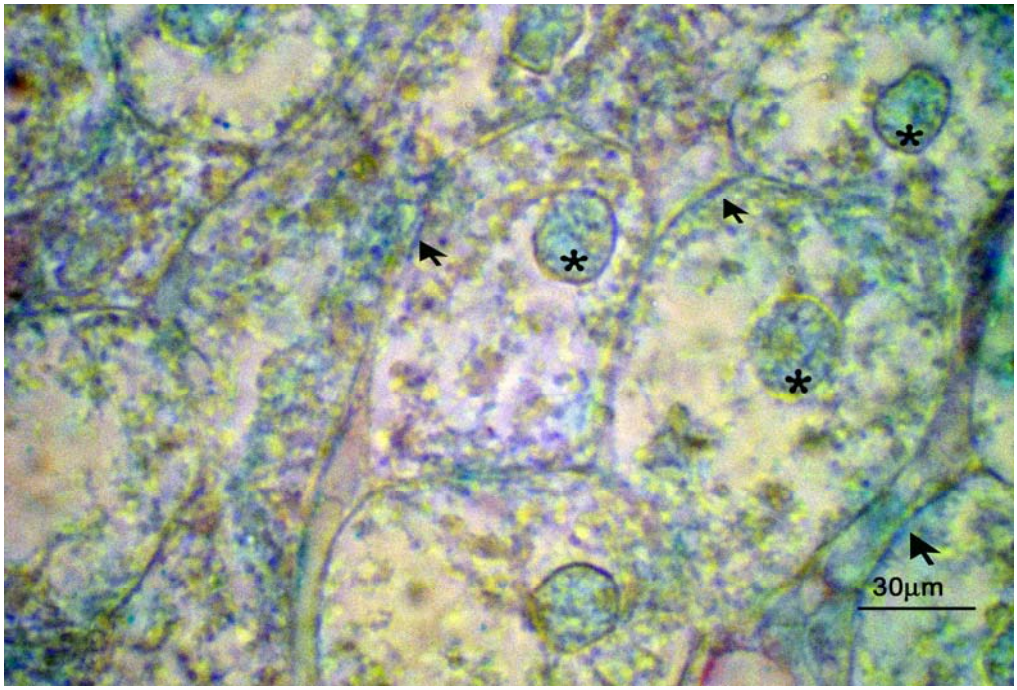
4.4.1.2. Alcian-Blue ve Periodik Asid-Schiff ile boyama

Alcian-blue (AB) ve Periodik Asid-Schiff (PAS) ile boyanan kontrol grubu karaciğer dokularında, PAS boyanmanın daha çok ekstraselüler alanlarda, özellikle damar etraflarında yoğun olduğu; buna karşılık AB boyanmanın intraselüler alanlarda yoğunlaştığı görülmüştür (Şekil 4.4.1.2.1). Sitrik asit grubunda ise, kontrole göre PAS ile boyanma daha az yoğun olarak görülmüştür. Ayrıca, hepatosit membranlarında ve intraselüler alanda da AB ile boyanma daha şiddetlidir (Şekil 4.4.1.2.2).

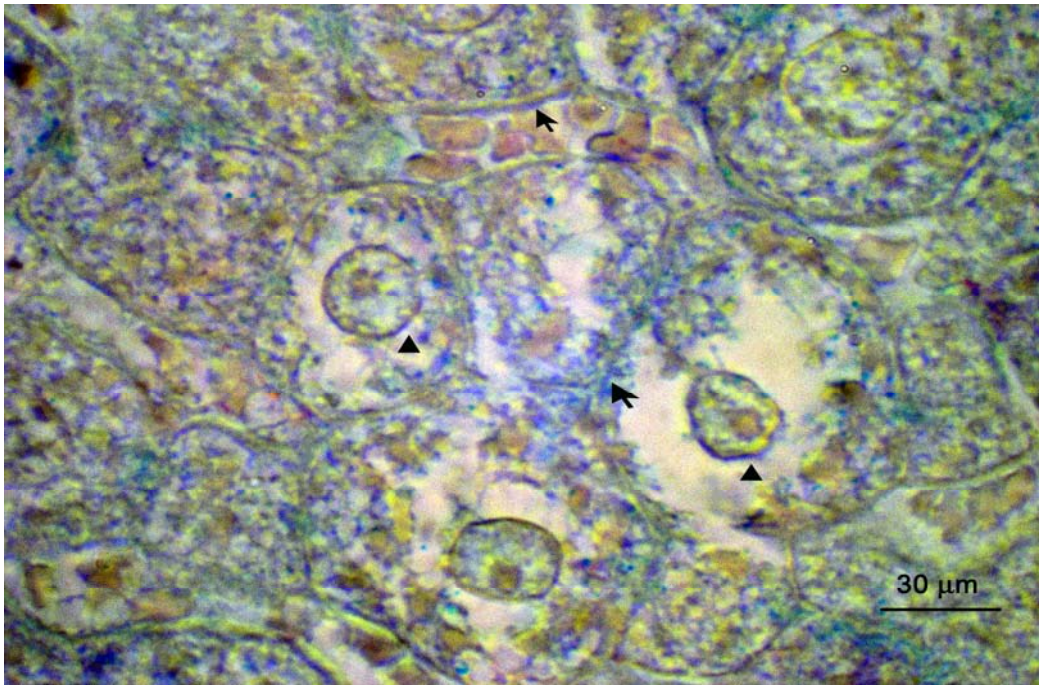
Sodyum benzoat grubunda, PAS boyanmanın çok zayıf olduğu, AB ile hem intraselüler hem de ektraselüler alanlarda boyanmanın daha şiddetli olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.1.2.3, Şekil 4.4.1.2.4).



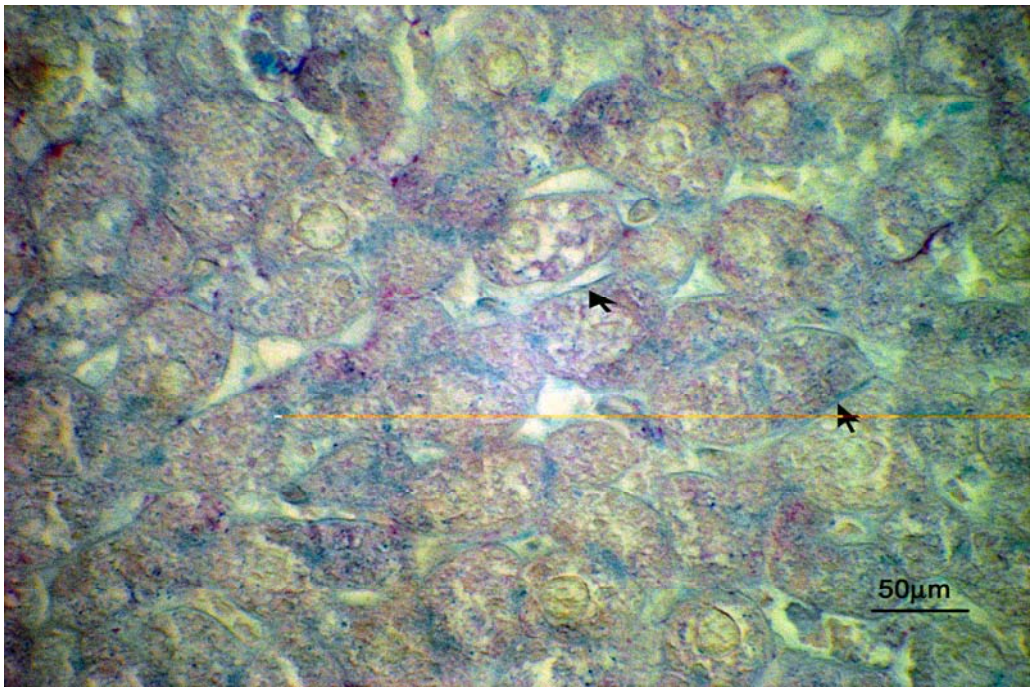
Şekil 4.4.1.2.1 : Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (AB-PAS boyanma). Merkezi ven (M), ekstraselüler alanda PAS ile boyanma (ok), intraselüler alanda AB ile boyama (*), (200X).



Şekil 4.4.1.2.2 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu (AB-PAS boyanma). Hepatosit membranında (ok) ve nukleuslarda (*) AB ile boyanma şiddetinde artış, PAS ile boyanma şiddetinde azalma (1000X).



Şekil 4.4.1.2.3 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu (AB-PAS boyanma). Hepatosit membranında (ok) ve nukleuslarda AB ile boyanma şiddetinde artış (ok başı), PAS ile boyanma şiddetinde azalma (1000X).



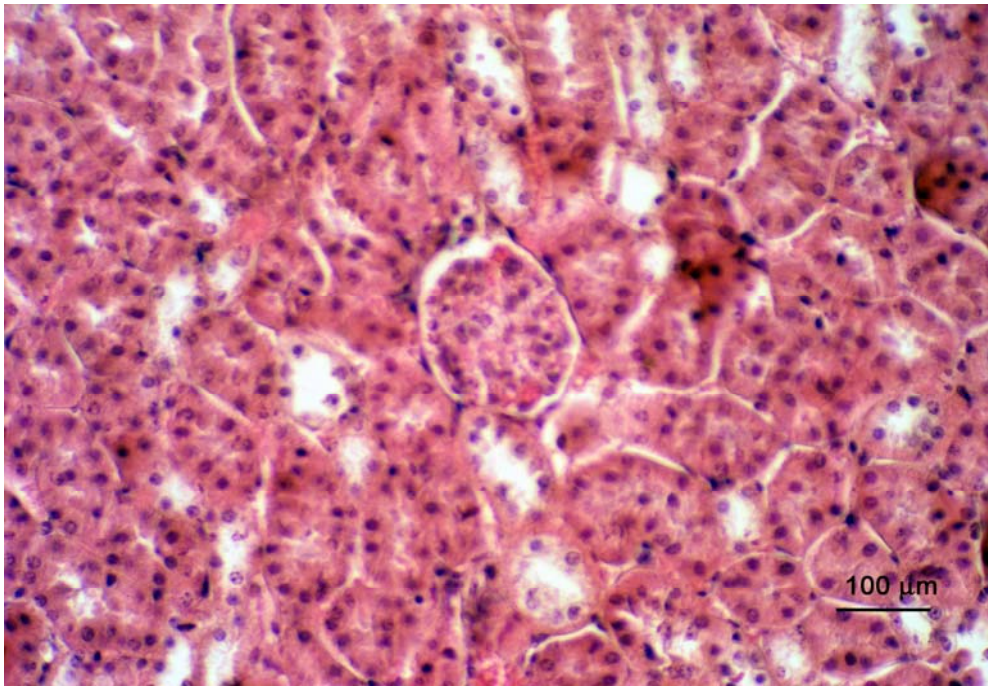
Şekil 4.4.1.2.4 : Sodyum benzoat grubuna ait karaciğer dokusu (AB-PAS boyanma). Hepatosit membranında (ok) ve ekstraselüler alanda AB ile boyanma şiddetinde artış (ok), PAS ile boyanma şiddetinde azalma (400X).

4.4.2. Böbrek dokusu üzerindeki etkiler

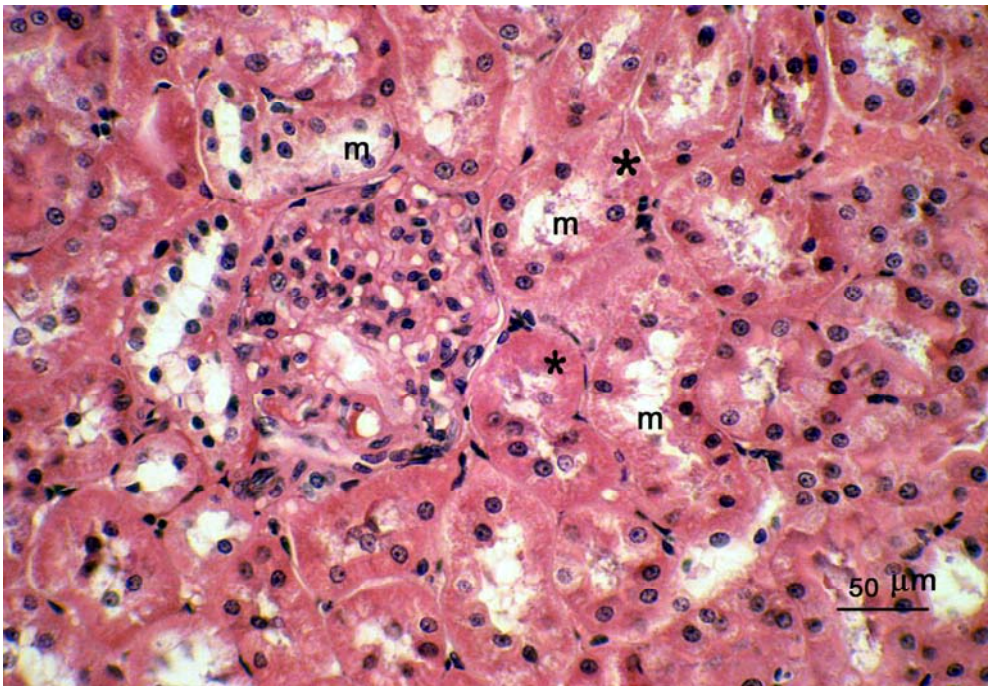
4.4.2.1. Hematoksilen-Eozin ile boyama

Böbrek dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 4.4.2.2.1,); sitrik asit grubu hayvanların böbrek tubül hücrelerinde piknotik nukleuslar (Şekil 4.4.2.1.2), tubül hücrelerinin apikal yüzeylerinde membran hasarı ve nukleuslarını kaybetmiş tubül hücreleri (Şekil 4.4.2.1.2 ve 3), nukleus zarında invaginasyon, bazal membranlarında hasar (Şekil 4.4.2.1.3), mononuklear hücre infiltrasyonu (Şekil 4.4.2.1.4), görülmektedir.

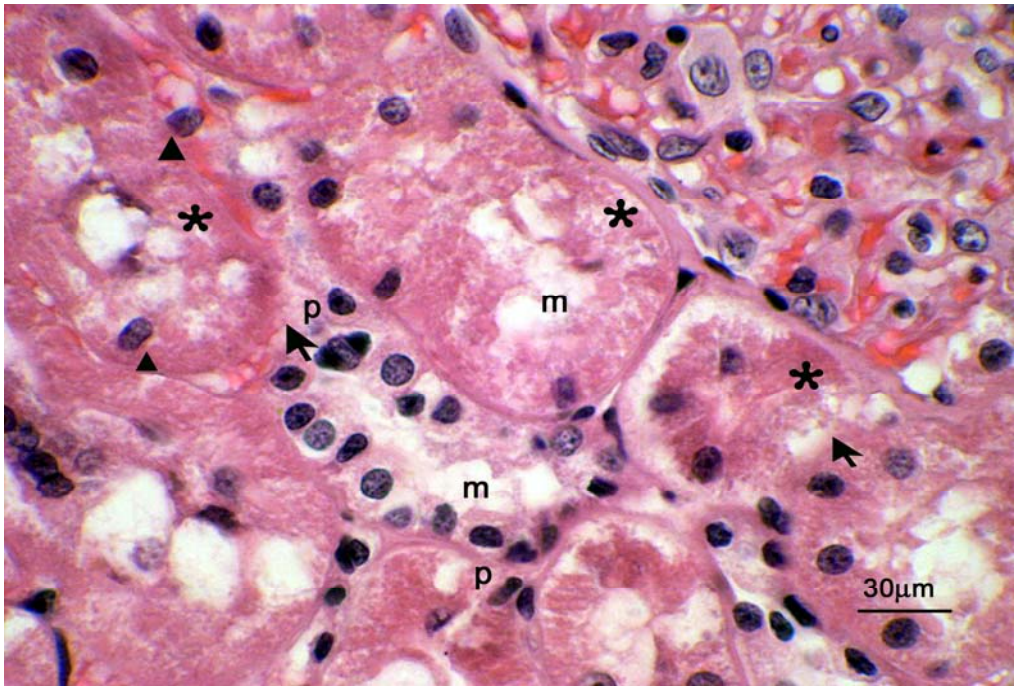
Sodyum benzoat grubunda ise; böbrek tubül hücrelerinin apikal yüzeylerinde membran hasarı ve nukleuslarını kaybetmiş tubül hücreleri, mononuklear hücre infiltrasyonu (Şekil 4.4.2.1.5-7), bazal membranlarında hasar görülmektedir (Şekil 4.4.2.1.7).



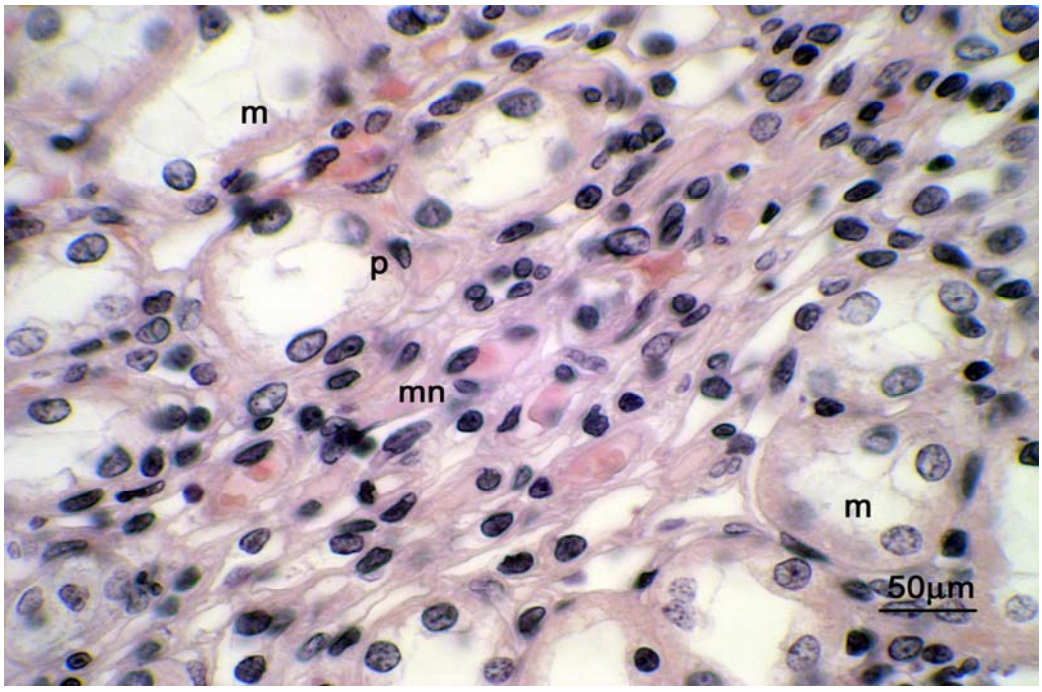
Şekil 4.4.2.1.1 : Kontrol grubuna ait böbrek dokusu, (H-E boyama 200X).



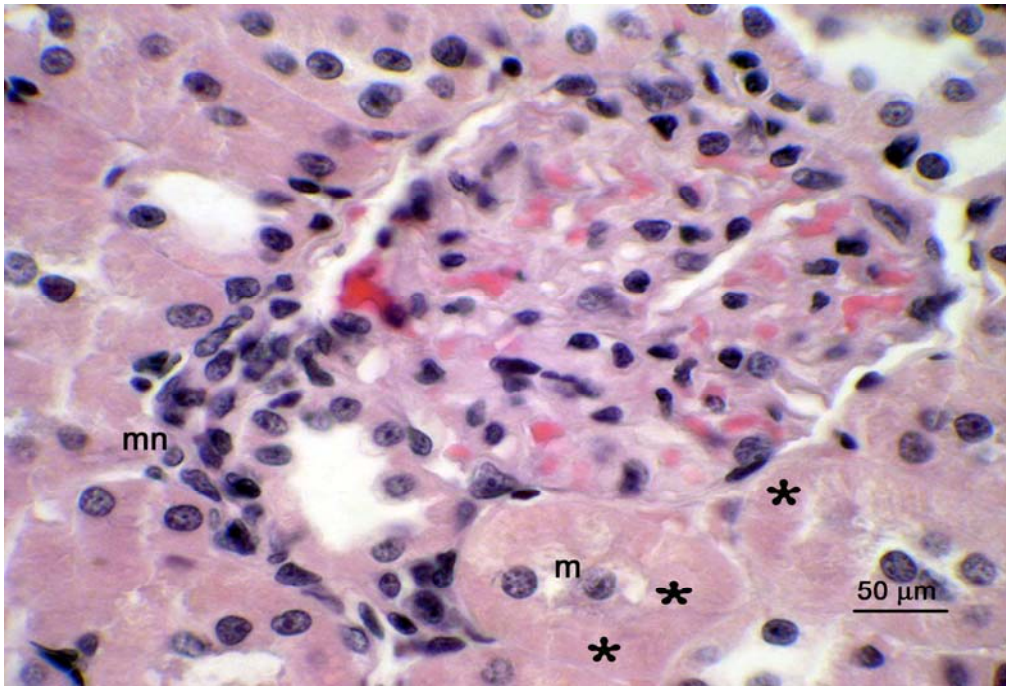
Şekil 4.4.2.1.2 : Sitrik asit grubuna ait böbrek dokusu. Piknotik nukleus (p), tubül hücrelerinde membran hasarı (m) ve nukleus kayıpları (*), (H-E boyama 400X).



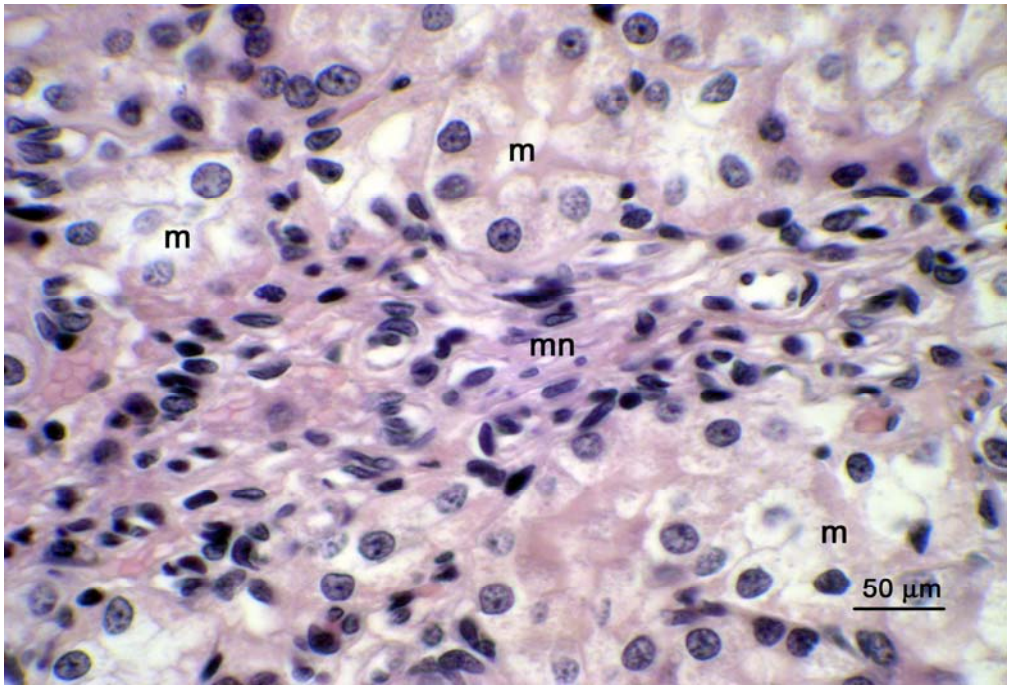
Şekil 4.4.2.1.3 : Sitrik asit grubu böbrek dokusu. Piknotik nukleuslar (p)**,** tubül hücrelerinde membran hasarı (m), nukleus kayıpları (*), bazal membran hasarı (ok), nukleus zarında invaginasyon (ok başı), (H-E boyama 1000X).



Şekil 4.4.2.1.4 : Sitrik asit grubuna ait böbrek dokusu. Piknotik nukleus (p), tubül hücrelerinde membran hasarı (m), mononuklear hücre infiltrasyonu (mn), (H-E boyama 400X).



Şekil 4.4.2.1.5 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Nukleuslarını kaybetmiş tubül hücreleri (*) , mononuklear hücre infiltrasyonu (mn), membran hasarı (m), (H-E boyama 400X).



Şekil 4.4.2.1.6 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Mononuklear hücre infiltrasyonu (mn), tubül hücrelerinde membran hasarı (m), (H-E boyama 400X).



Şekil 4.4.2.1.7 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Tubül hücrelerinde membran hasarı (m), nukleuslarını kaybetmiş tubül hücreleri (*), bazal membran hasarı (ok), (H-E boyama 1000X)

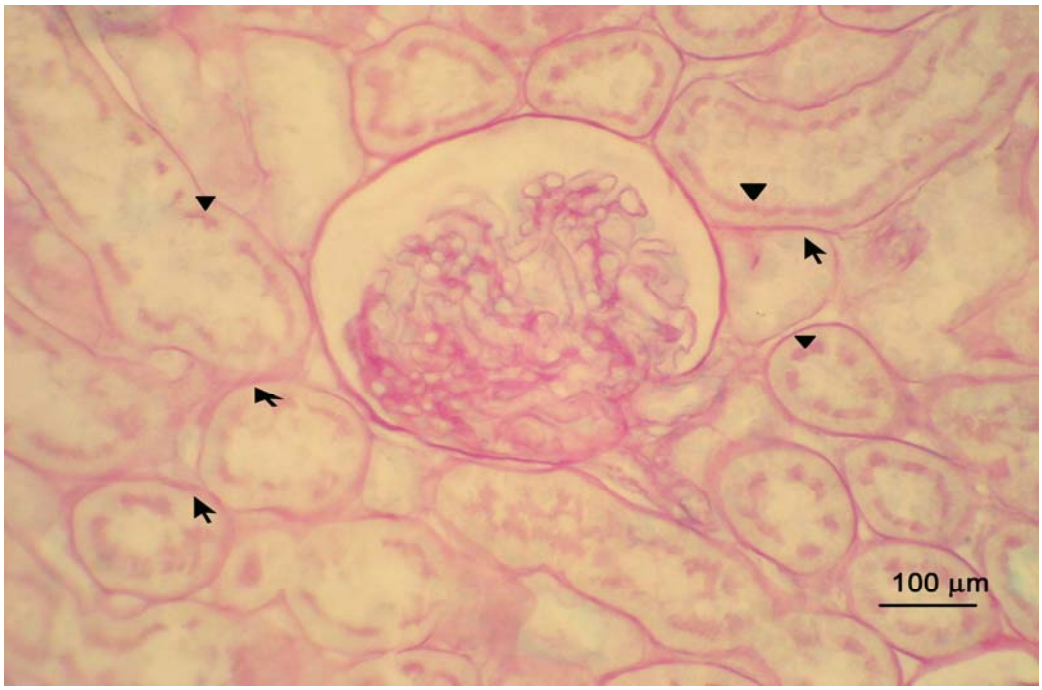
4.4.2.2. Alcian-Blue ve Periodik Asid-Schiff ile boyama

Kontrol grubu hayvanlarda böbrek dokusunun AB-PAS boyanmasında korteks ve medulla bölgeleri arasında farklılık gözlenmiştir. Korteks bölgesinde AB boyanmanın çok zayıf olmasına karşın, PAS boyanma şiddetlidir. PAS(+) bölgeler özellikle bazal membran; intraselüler alan ve tubül hücrelerinin apikal yüzeylerinde yoğunlaşmıştır (Şekil 4.4.2.2.1 ve 2). Medulla bölgesinde, PAS boyanmanın yanı sıra AB boyanma da şiddetli olarak görülmüştür. PAS (+) bölgeler bazal membran ve intertubüler alanlarda yoğunlaşırken, AB (+) bölgeler de yine intertubüler alanlarda ve tubüler hücrelerin apikal yüzeyinde gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.2.3).

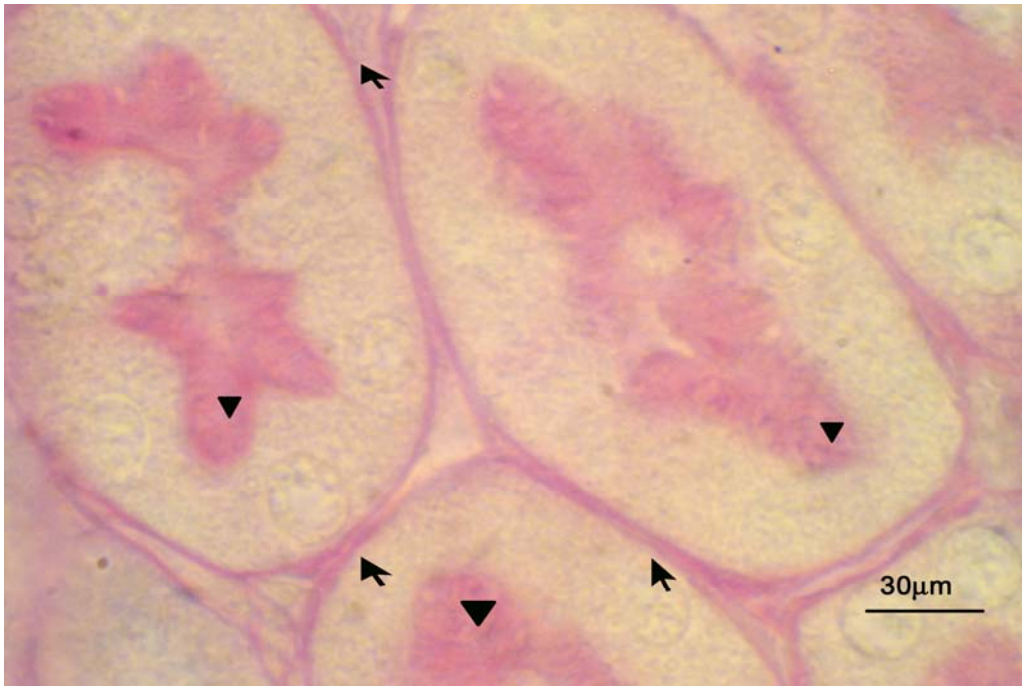
Sitrik asit grubunda; medulla bölgesinde kontrol grubuna kıyasla hem PAS hemde AB boyanmada azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.2.4-5). Korteks bölgesinde PAS boyanma şiddetinde azalma görülmüştür (Şekil 4.4.2.2.6).

Sodyum benzoat grubunda; medulla bölgesinde PAS ve AB boyanma şiddetinin arttığı gözlenmiştir. PAS (+) alanlar bazal membran ve intertubüller alanlarda (Şekil

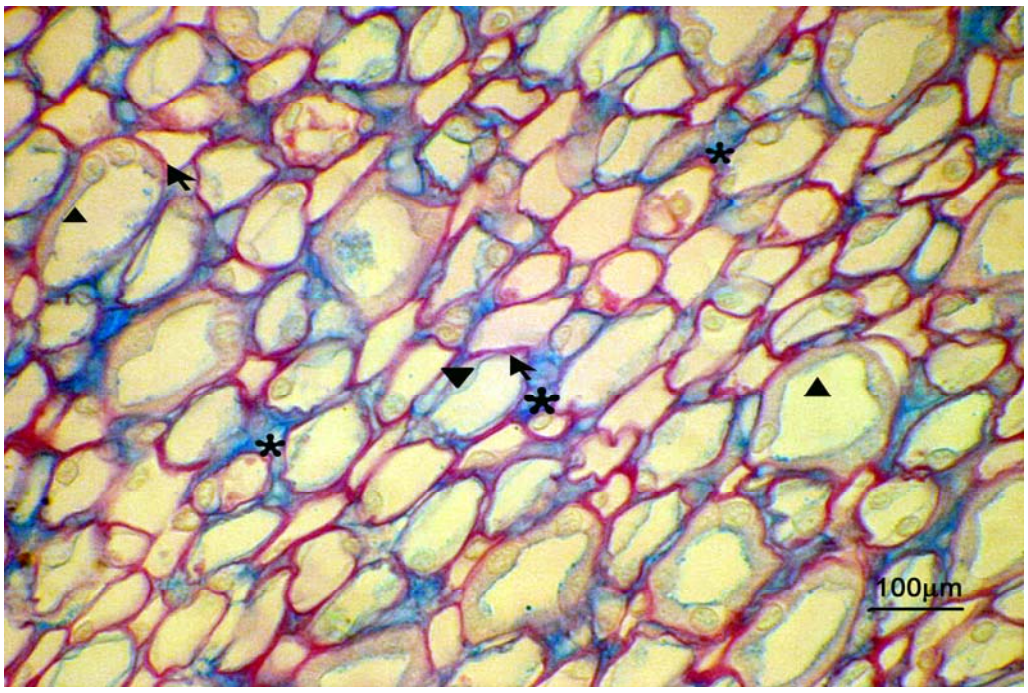
4.4.2.2.7) ve yer yer interselüler bölgede (Şekil 4.4.2.2.8) yoğunlaşırken; AB (+) bölgeler intertubüler (Şekil 4.4.2.2.7 ve 9) alanlar yer yer intraselüler alanlar (Şekil 4.4.2.2.9) ve tubül hücrelerinin apikal yüzeyleri (Şekil 4.4.2.2.7) olarak tespit edilmiştir. Korteks bölgesinde ise AB (+) bölgelerin kontrole göre arttığı (intertubüler alanlar ile bazal membranda tespit edilmiştir). Yine PAS boyanma şiddetininde özellikle intraselüler alanda arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.2.10).



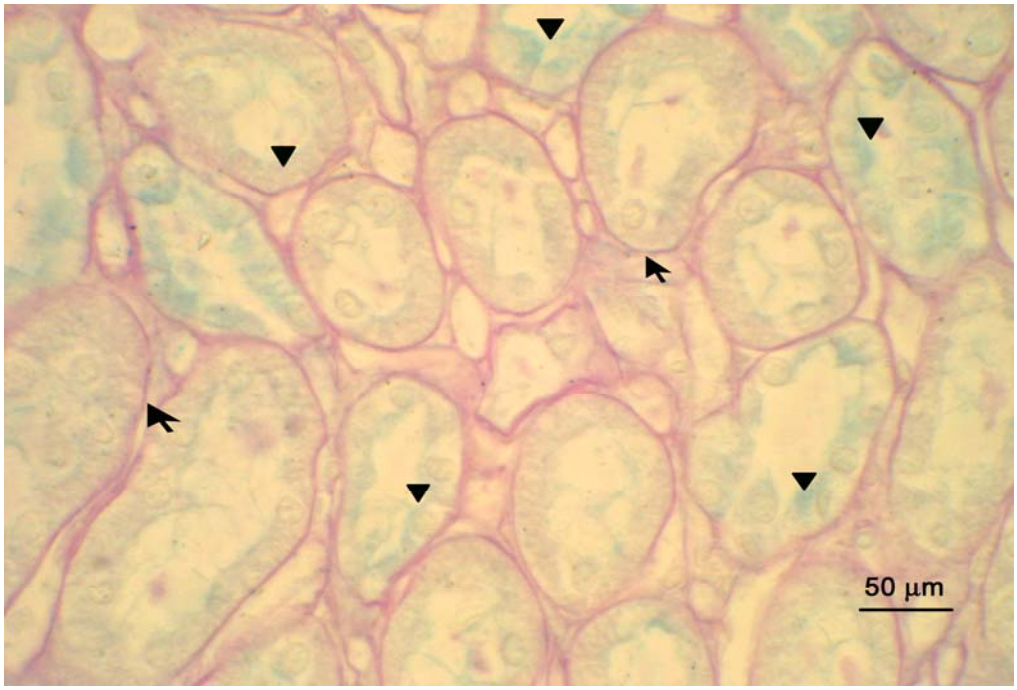
Şekil 4.4.2.2.1 : Kontrol grubuna ait böbrek korteks dokusu (AB-PAS boyama). AB boyanma şiddeti zayıf, bazal membran da (ok) ve tubül apikal yüzeylerinde PAS ile boyanma şiddetli (ok başı), (200X).



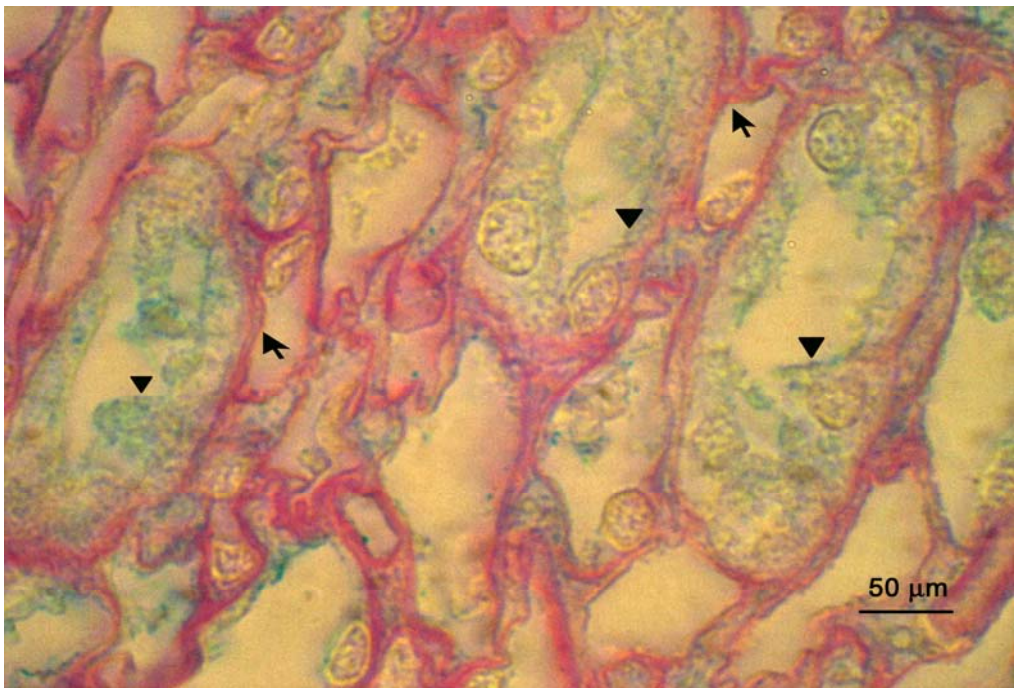
Şekil 4.4.2.2.2 : Kontrol grubu böbrek korteks dokusu proksimal tubüller (AB-PAS boyama). AB boyanma zayıf, hücrelerin apikal yüzeylerinde (ok başı), ve bazal membranda (ok) PAS ile boyanma şiddetli, (1000X).



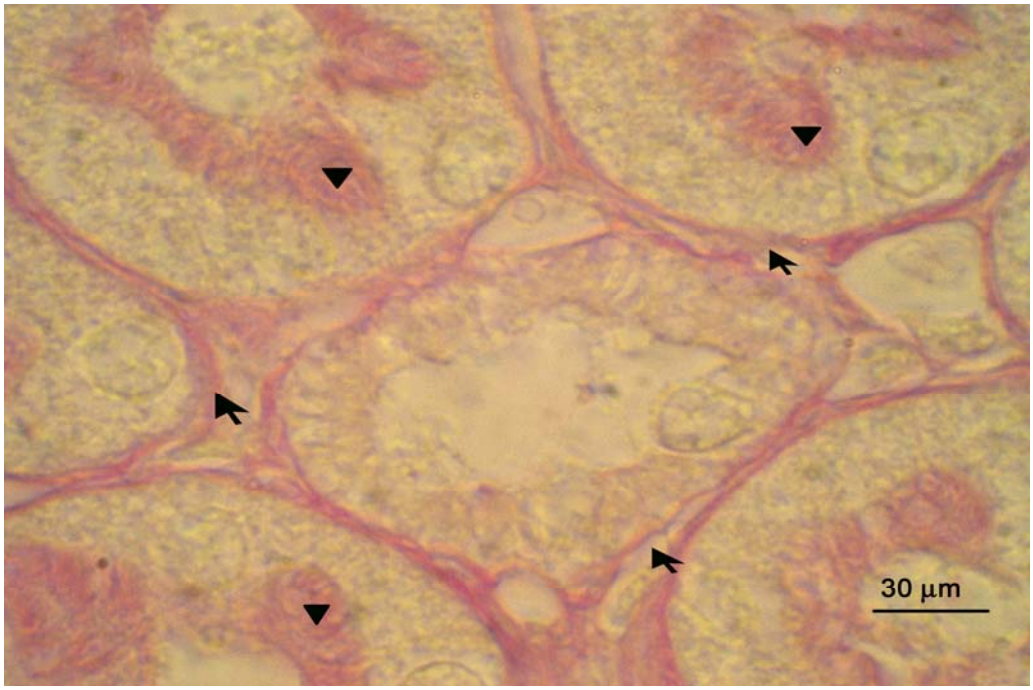
Şekil 4.4.2.2.3 : Kontrol grubu böbrek medulla dokusu (AB-PAS boyama). Ekstraselüler alanlarda AB (*) ve PAS ile sboyanma (ok), hücre apikal yüzeylerinde AB ile boyanma (ok başı) şiddetli, (200X).



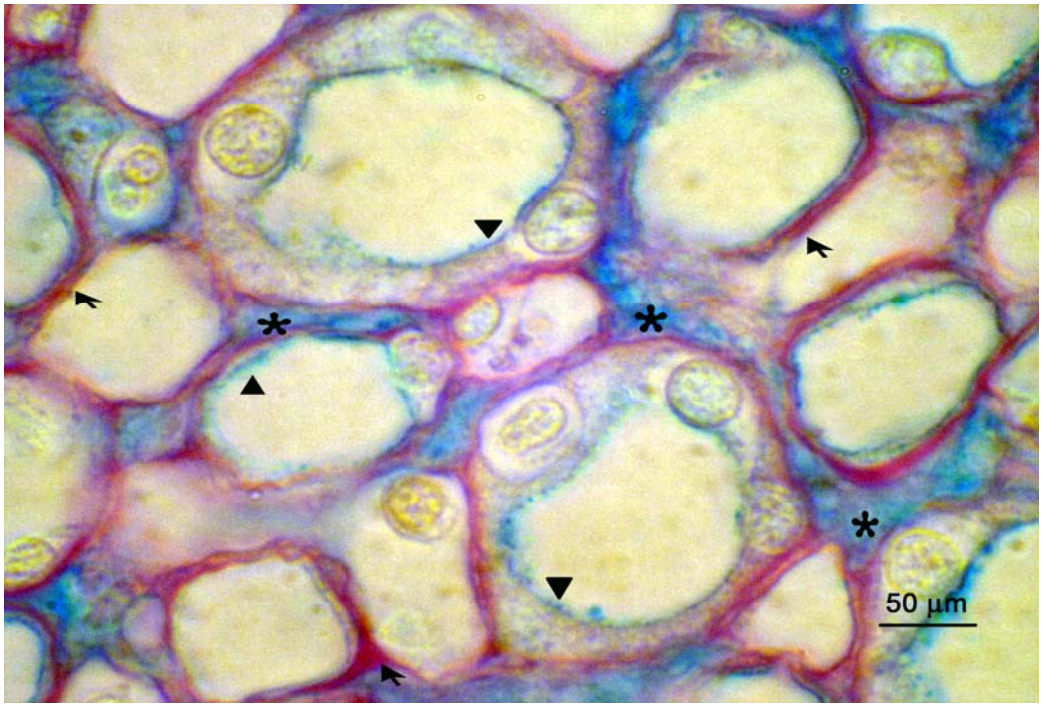
Şekil 4.4.2.2.4 : Sitrik asit grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS boyama). Bazal membranda PAS (ok) ve intraselüler alanda AB ile boyanma şiddetinde azalma (ok başı), (400X).



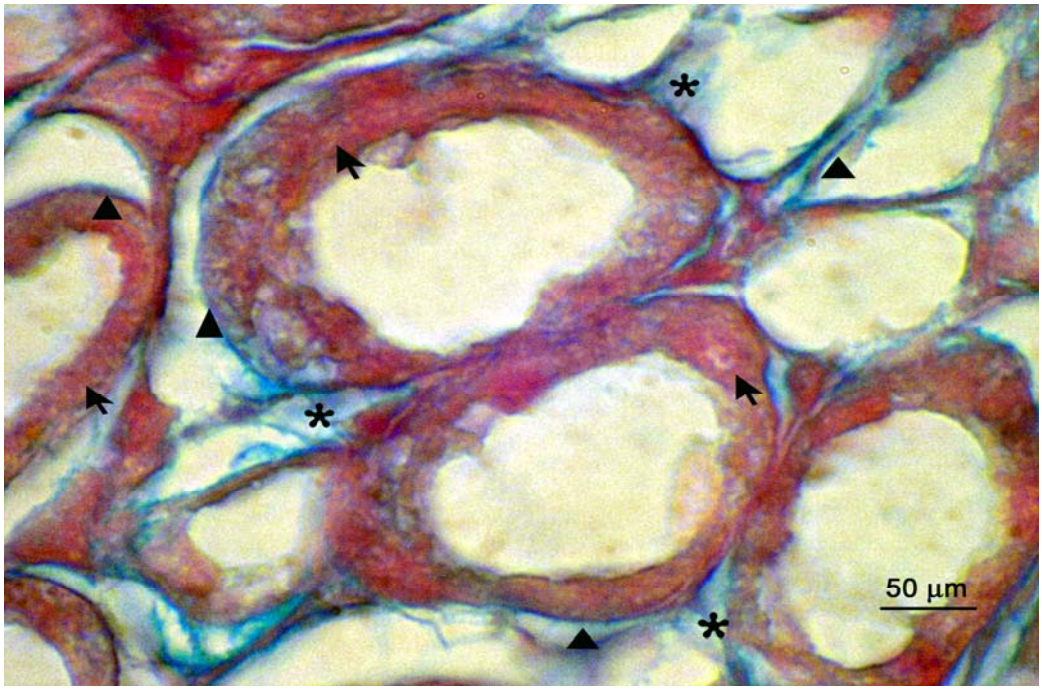
Şekil 4.4.2.2.5 : Sitrik asit grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS). Bazal membranda PAS ile boyanma (ok) ve intraselüler alanda AB ile boyanma şiddetinde azalma (ok başı), (400X).



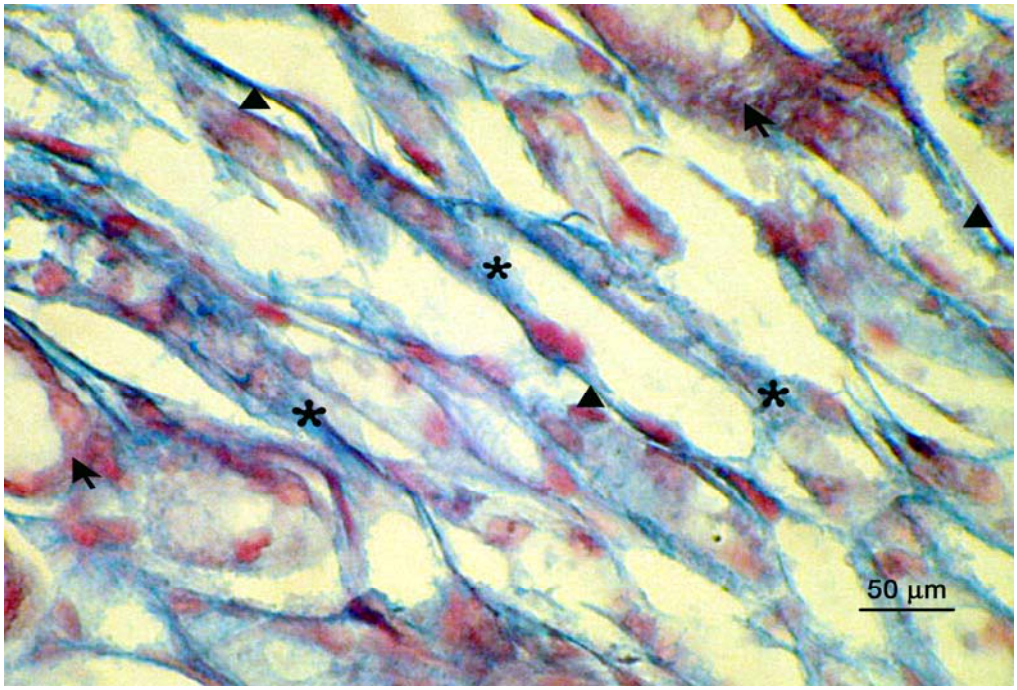
Şekil 4.4.2.2.6 : Sitrik asit grubu (AB-PAS boyama). Korteks tubül hücre bazal membranında PAS ile boyanma (ok) ve fırça kenarlarda PAS ile boyanma şiddetinde azalma (ok başı), (1000X).



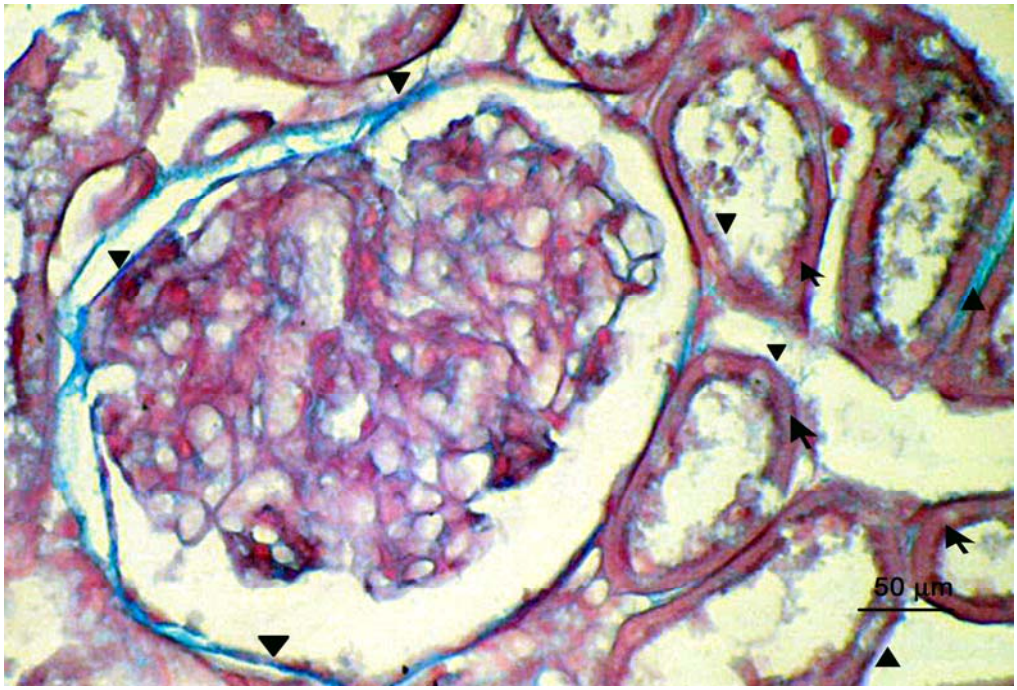
Şekil 4.4.2.2.7 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS boyama). Bazal membranda PAS ile boyanma (ok), hücre apikal yüzeylerinde AB ile boyanma (ok başı), tubüller arasında AB ile boyanma (*) şiddetinde artış, (400X).



Şekil 4.4.2.2.8 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS boyama). İntraselüler alanda PAS ile boyanma (ok), bazal membranda AB ile boyanma (ok başı) ve stubüller arasında AB ile boyanma (*) şiddetinde artış, (400X).



Şekil 4.4.2.2.9 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek medulla bölgesi (AB-PAS boyama). İntraselüler alanda PAS ile boyanma (ok), bazal membranda AB ile boyanma (ok başı) ve tubüller arasında AB ile boyanma (*) şiddetinde artış, (400X).



Şekil 4.4.2.2.10 : Sodyum benzoat grubu. Böbrek korteks bölgesi (AB-PAS boyama). İntraselüler alanda PAS ile boyanma (ok),ve bazal membranda AB ile boyanma (ok başı) şiddetinde artış, (400X).

4.5. Elektron Mikroskobik Bulgular

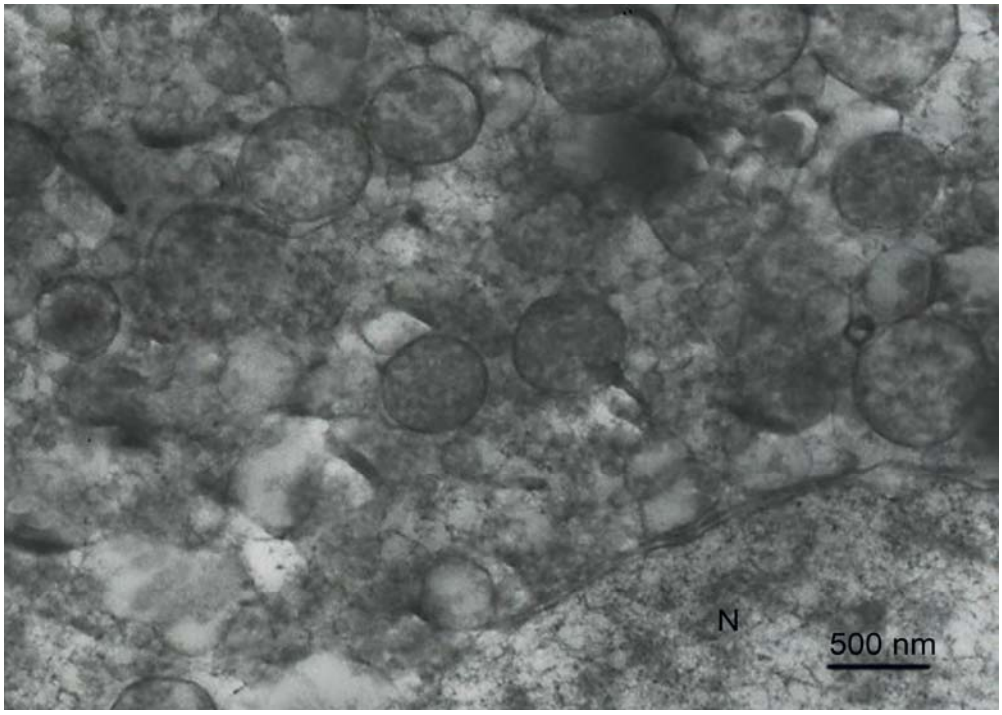
4.5.1. Morfolojik inceleme

4.5.1.1. Karaciğer

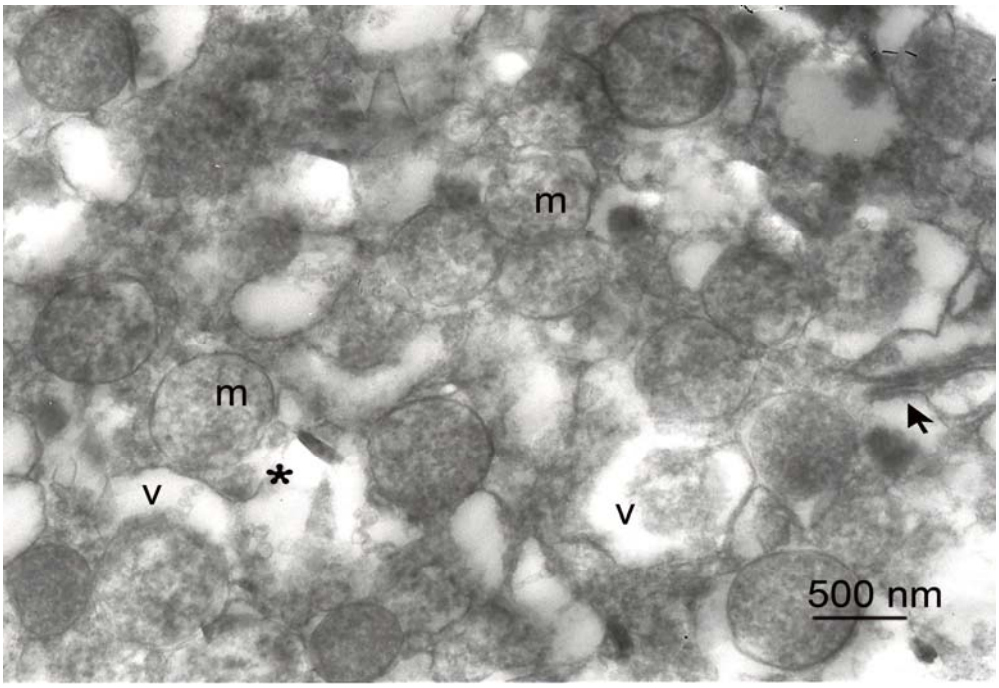
Elektron mikroskobik incelemede, sitrik asitle beslenen deney grubu karaciğer dokusunda kontrol grubu (Şekil 4.5.1.1.1) ile kıyaslandığında hepatositlerin genel sitolojik yapılarında dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür.

Sitrik asit ile beslenen hayvanların karaciğer dokularında; hepatositlerin sitoplazma bütünlüğünde bozulma (plazmoreksis), sitoplazma içinde bazı alanlarda organellerde erime (plazmoliziz), hepatositlerde mitokondri kristalarında kayıplar, mitokondri dış zarlarında hasar ve hepatositler içinde vakuolizasyon, miyelin figür (Şekil 4.5.1.1.2, 3) olarak sıralanabilir. Ayrıca nukleus zarında invaginasyon (Şekil 4.5.1.1.3), hepatositler arasında kollojen lifler gözlenmiştir (Şekil 4.5.1.1.4).

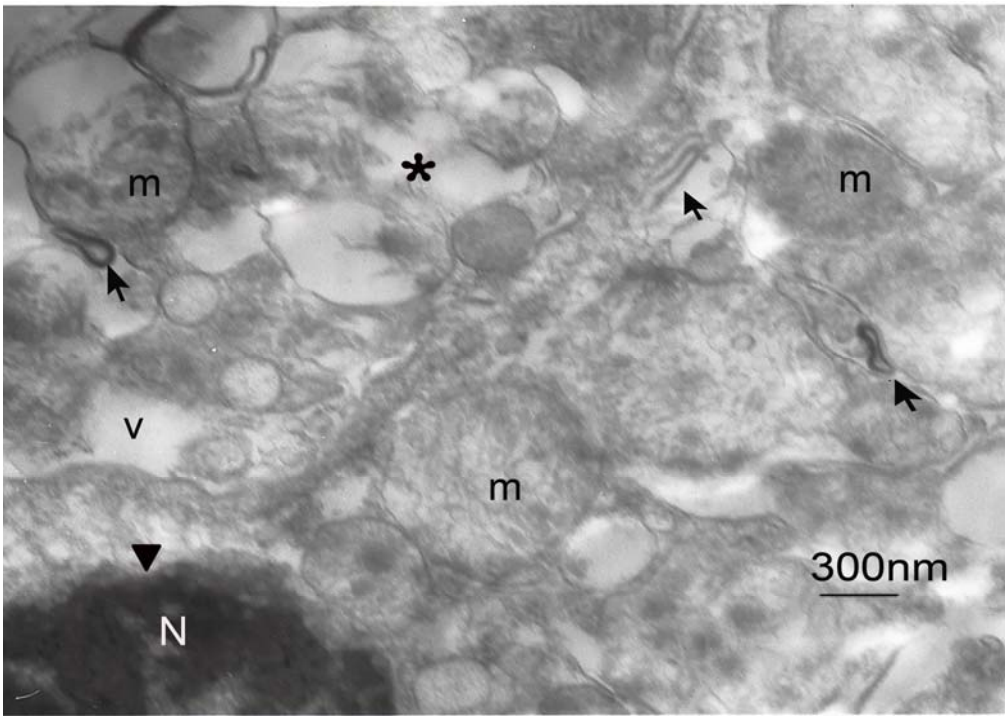
Sodyum benzoat ile beslenen hayvanların karaciğer dokularında; hepatositlerde membran kayıpları (Şekil 4.5.1.1.5), mitokondrilerde krista kaybı, mitokondri dış zarlarında erimeler, tubül hücrelerinde vakuolizasyon ve nukleus zarında parçalanma gözlenmiştir (Şekil 4.5.1.1.6).



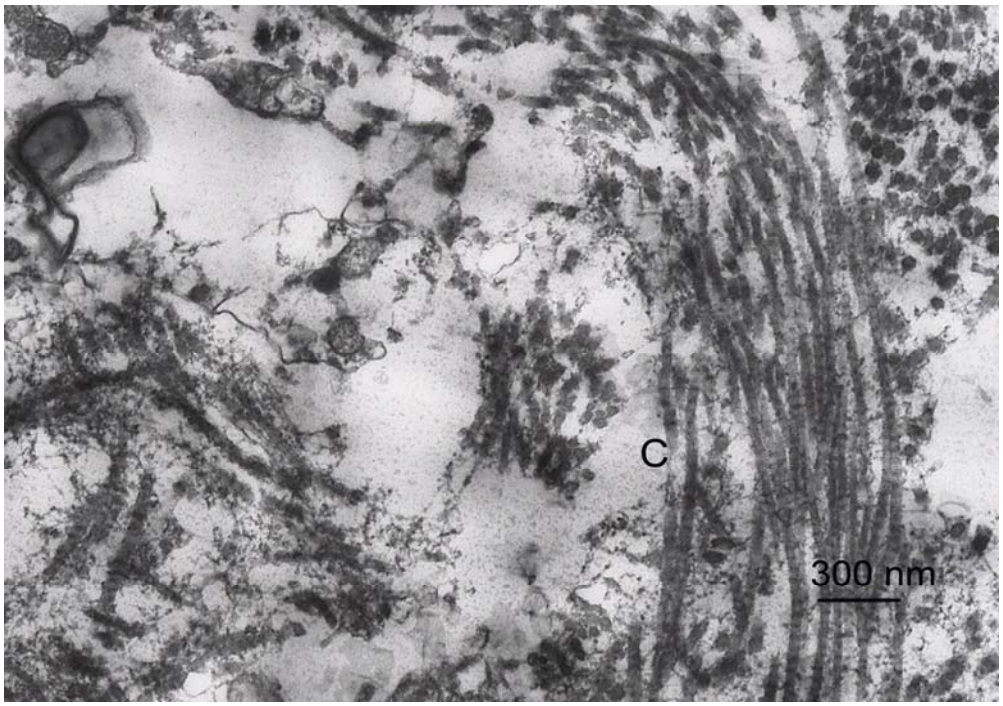
Şekil 4.5.1.1.1: Karaciğer kontrol grubu karaciğer dokusu. Nukleus (N).



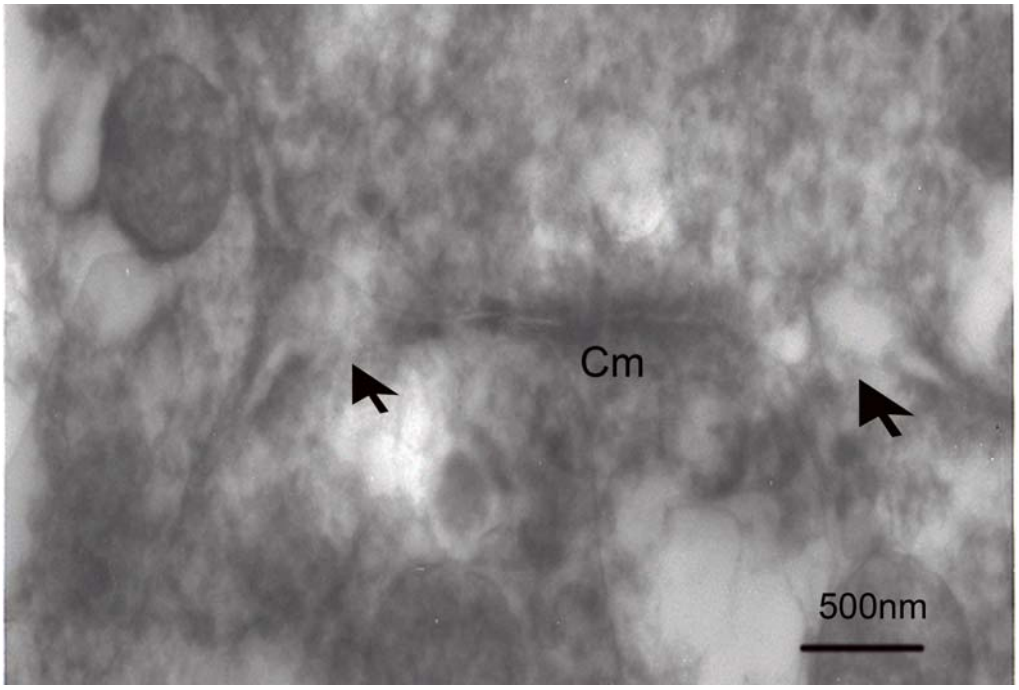
Şekil 4.5.1.1.2 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu. Nukleus (N), mitokondrilerde krista kaybı (m), vakuolizasyon (v), mitokondri membranında hasar (*), miyelin figür (ok).



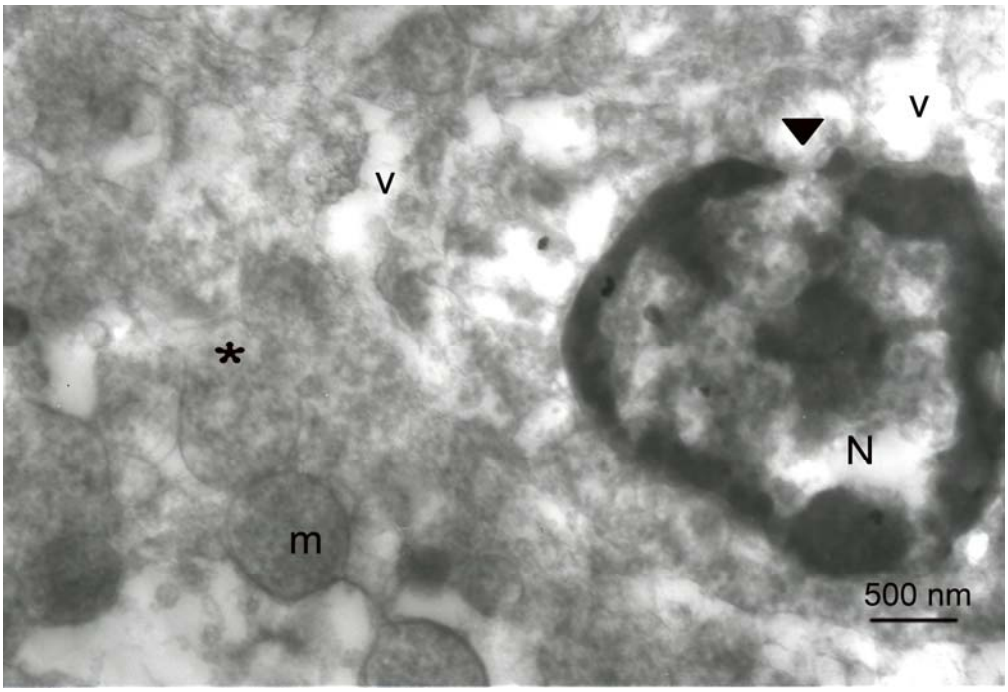
Şekil 4.5.1.1.3 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu. Nukleus (N), mitokondrilerde krista kaybı (m), vakuolizasyon (v), nukleus zarında invaginasyon (ok başı), mitokondri membranında hasar (*) , miyelin figür (ok).



Şekil 4.5.1.1.4 : Sitrik asit grubu karaciğer dokusu. Hepatositler arasında kollojen lifler (C).



Şekil 4.5.1.1.5 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm), hepatositlerde membran hasarı (ok).

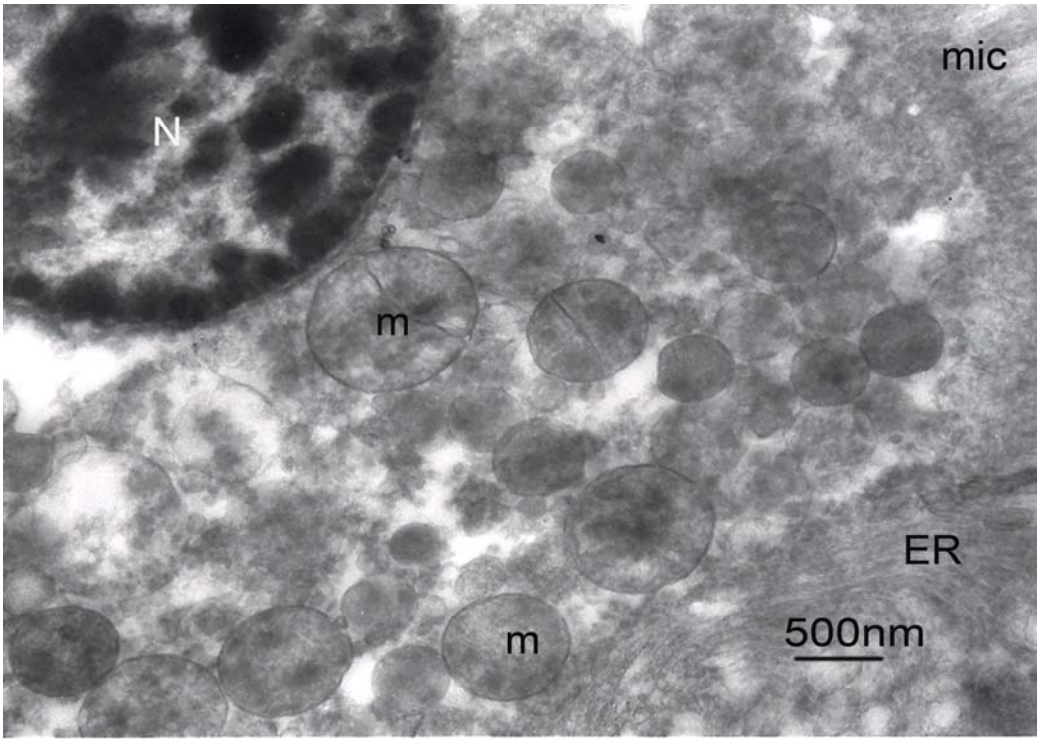


Şekil 4.5.1.1.6 : Sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. Nukleus (N), mitokondrilerde krista kaybı (m), vakuolizasyon (v), nukleus zarında parçalanma (ok başı), mitokondri membranında hasar (*).

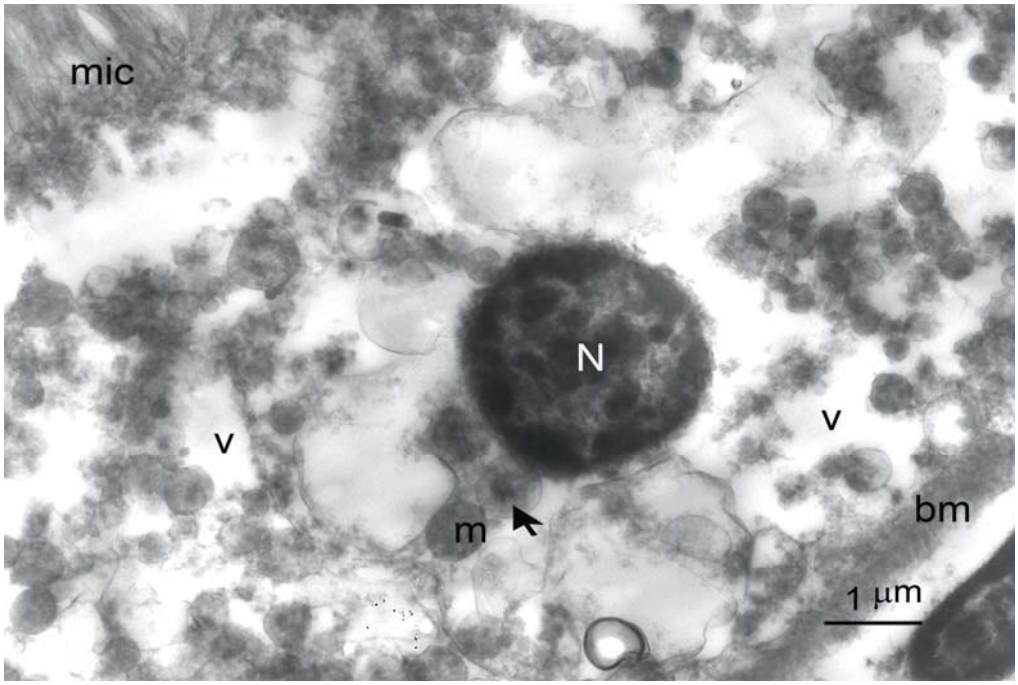
4.5.1.2. Böbrek

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 4.5.1.2.1) sitrik asit grubu böbrek dokusunda mitokondrilerde krista kayıpları elektronca yoğun granüller, düzensiz mikrovilluslar, tubül hücrelerinin sitoplazmalarında vakuolizasyon, sitoplazmada bütünlük kaybı (plazmoreksis) gözlenmiştir (Şekil 4.5.1.2.2).

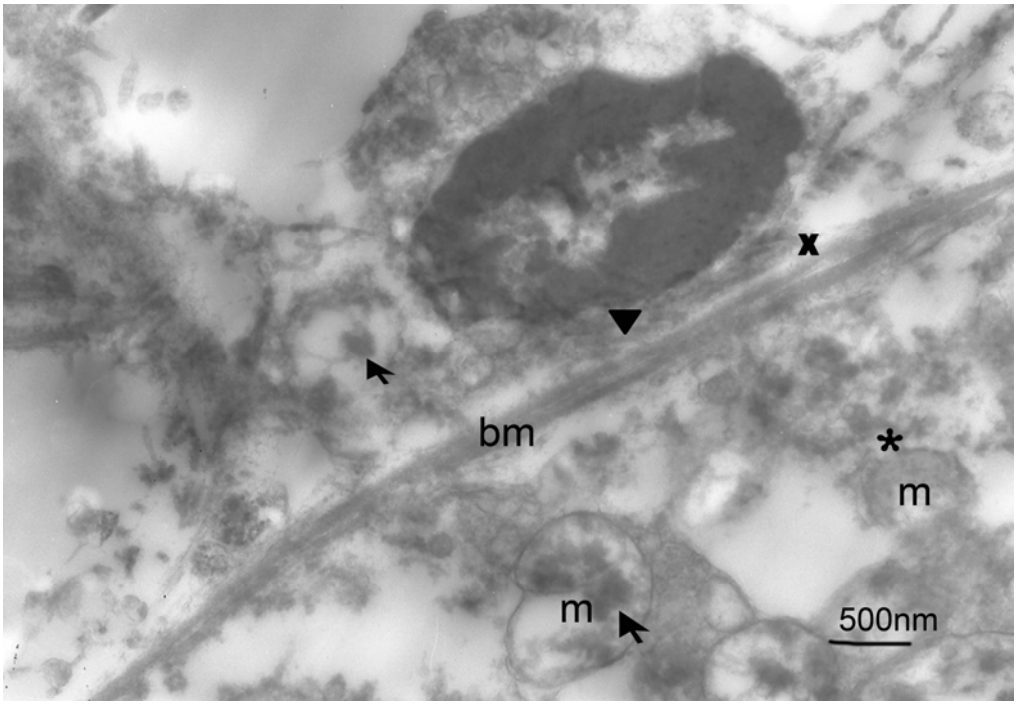
Sodyum benzoat ile beslenen hayvanların böbrek dokularında mitokondrilerde krista kaybı, dış zarlarında erime ve elektronca yoğun granüller; sitoplazmada bütünlük kaybı (plazmoreksis) ve vakuolizasyon, kromatin materyalinde düzensizlik; bazal membran da parçalanma (Şekil 4.5.1.2.3), ER keselerinde genişlemeler gözlenmiştir (Şekil 4.5.1.2.4).



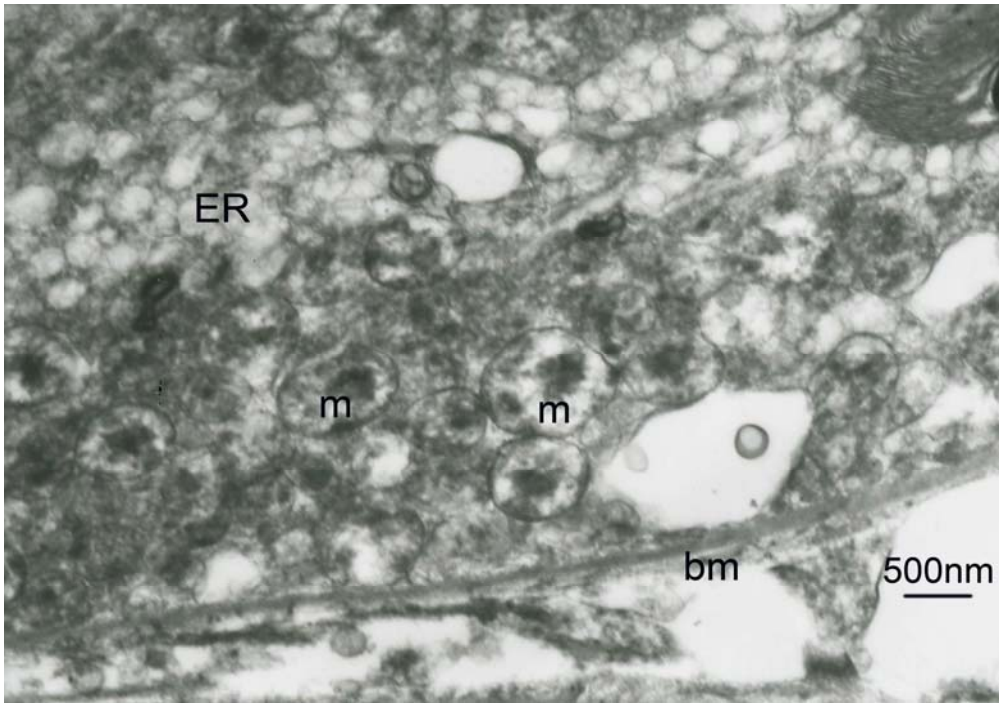
Şekil 4.5.1.2.1 : Kontrol grubu böbrek dokusu. Nukleus (N), mitokondri (m), Endoplazmik retikulum (ER), mikrovilluslar (mic).



Şekil 4.5.1.2.2 : Sitrik asit grubu böbrek dokusu. Nukleus (N), bazal membran (bm), mitokondri (m), elektronca yoğun granüller (ok), vakuolizasyon (v), mikrovilluslarda düzensizlik (mic).



Şekil 4.5.1.2.3 : Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Mitokondrilerde krista kayıpları (m), bazal membran (bm), nukleus zarında invaginasyon (ok başı), mitokondri içinde elektronca yoğun cisimler (ok), mitokondri membranında hasar (*), bazal membran hasarı (x).

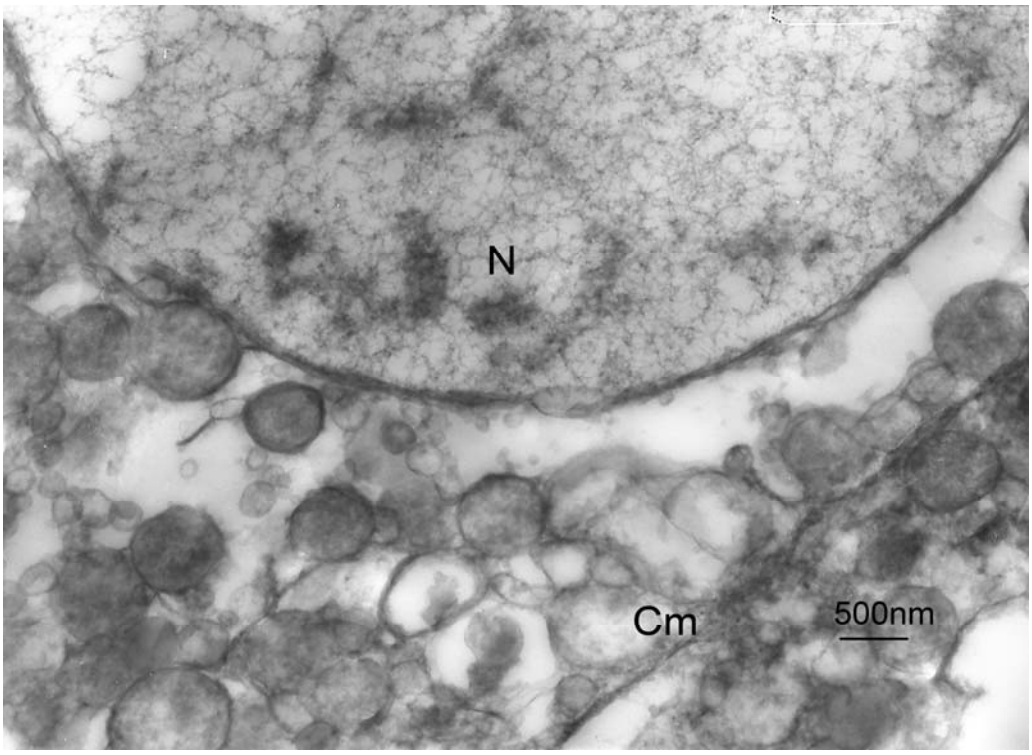


Şekil 4.5.1.2.4: Sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Düz yüzlü Endoplazmik retikulum keselerinde genişlemeler (ER), mitokondri (m), bazal membran (bm).

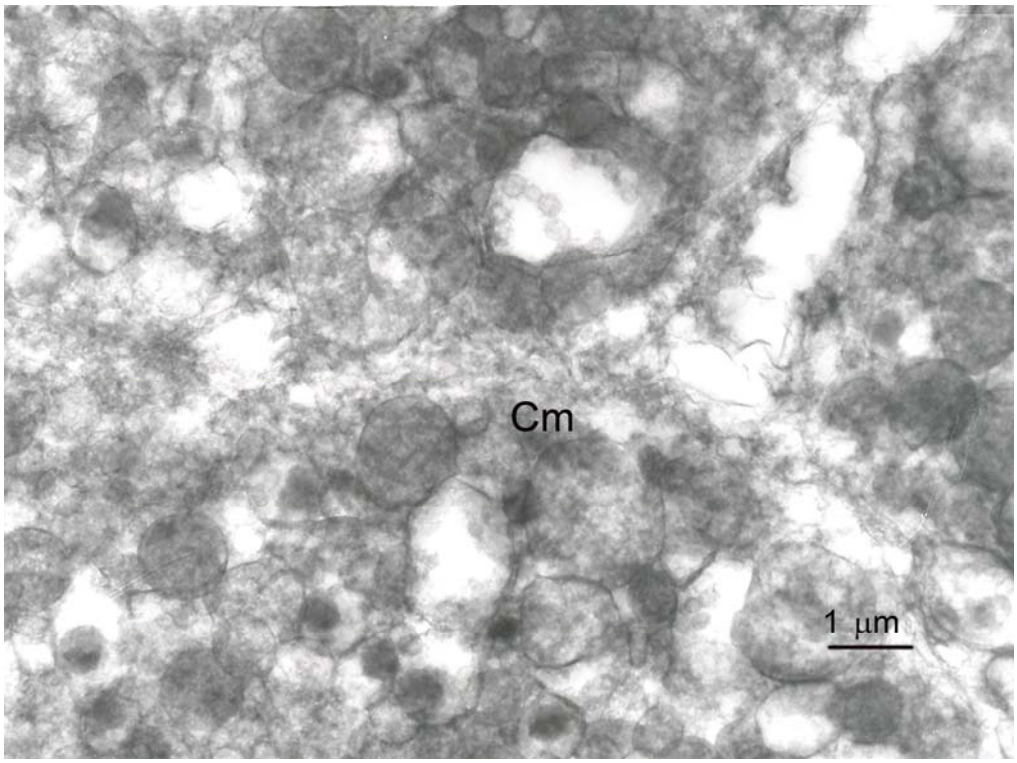
4.5.2. Rutenyum Kırmızısı (RR) ile Sialik Asitlerin incelenmesi

4.5.2.1. Karaciğer

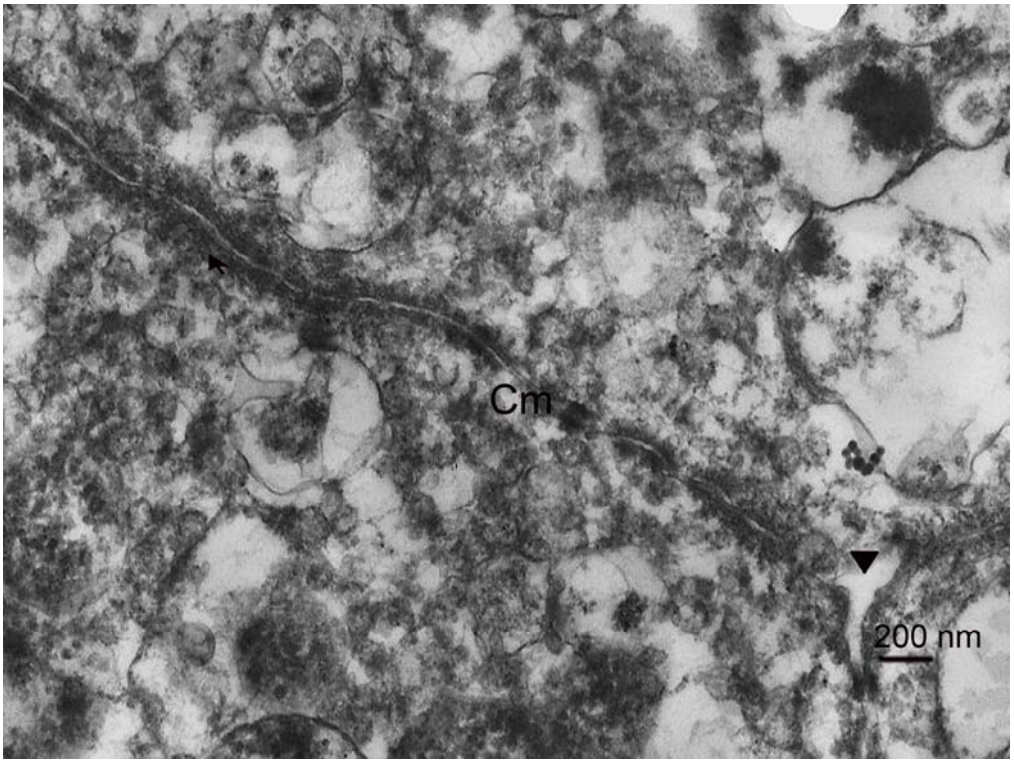
Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda, nöraminidaz uygulaması yapılmamış olanların hepatosit membranında RR ile boyanma belirgindir. (Şekil 4.5.2.1.1). Nöraminidaz uygulaması yapılanların membranında ise boyanma belirgin değildir (Şekil 4.5.2.1.2). Sitrik asit grubundaki hayvanlarda¸ kontrol grubu ile kıyaslandığında, hem nöraminidaz uygulanmamış (Şekil 4.5.2.1.3.) hem de nöraminidaz uygulanmış (Şekil 4.5.2.1.4) olanlarda RR boyanma görülmüştür. Ancak, bu grupta nöraminidaz uygulanmış dokuda boyanma bazı bölgelerde zayıf olarak gözlenmiştir (Şekil 4.5.2.1.4). Sodyum benzoat grubundaki hayvanların karaciğer hücrelerinde ise, boyanma nöraminidaz uygulanmamış olan dokuda, membranların sağlam olduğu bölgelerde görülmüştür (Şekil 4.5.2.1.5 ve 6).



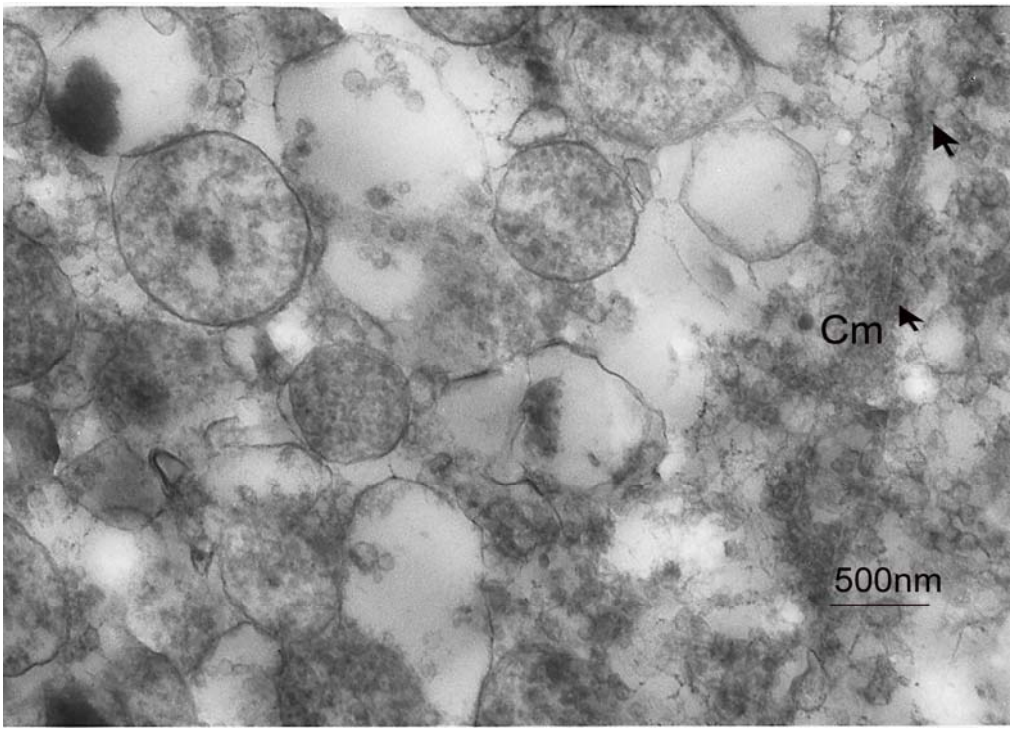
Şekil 4.5.2.1.1 : Nöraminidaz uygulanmamış kontrol grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm) , nukleus (N).



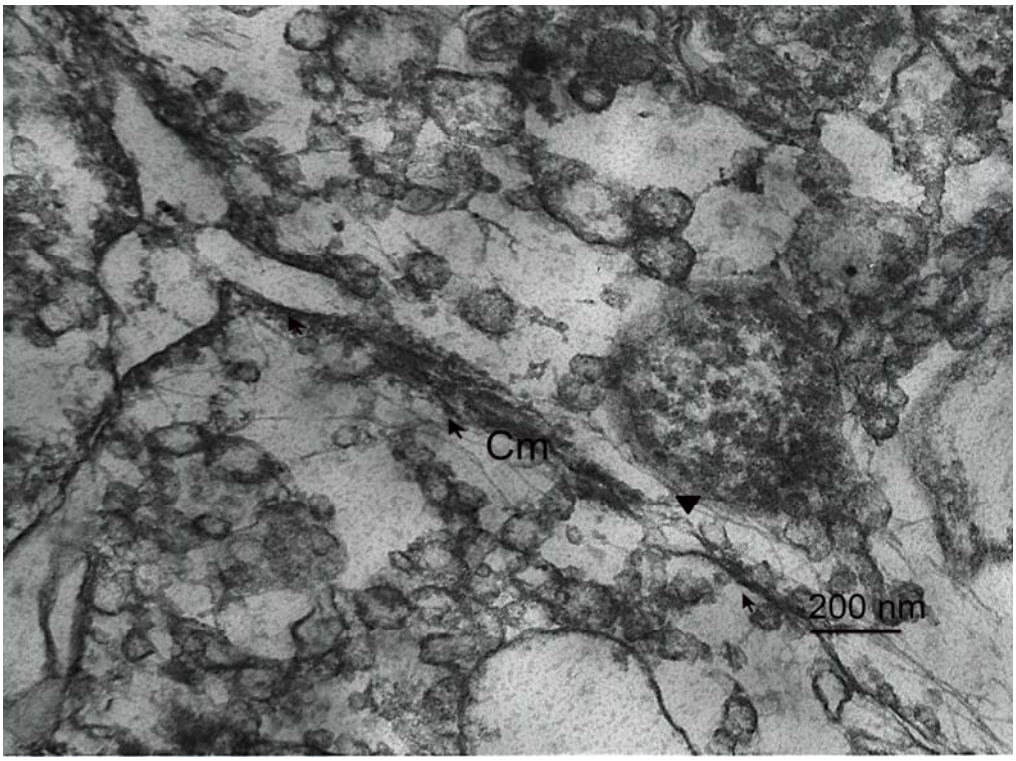
Şekil 4.5.2.1.2 : Nöraminidaz uygulanmış kontrol grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm).



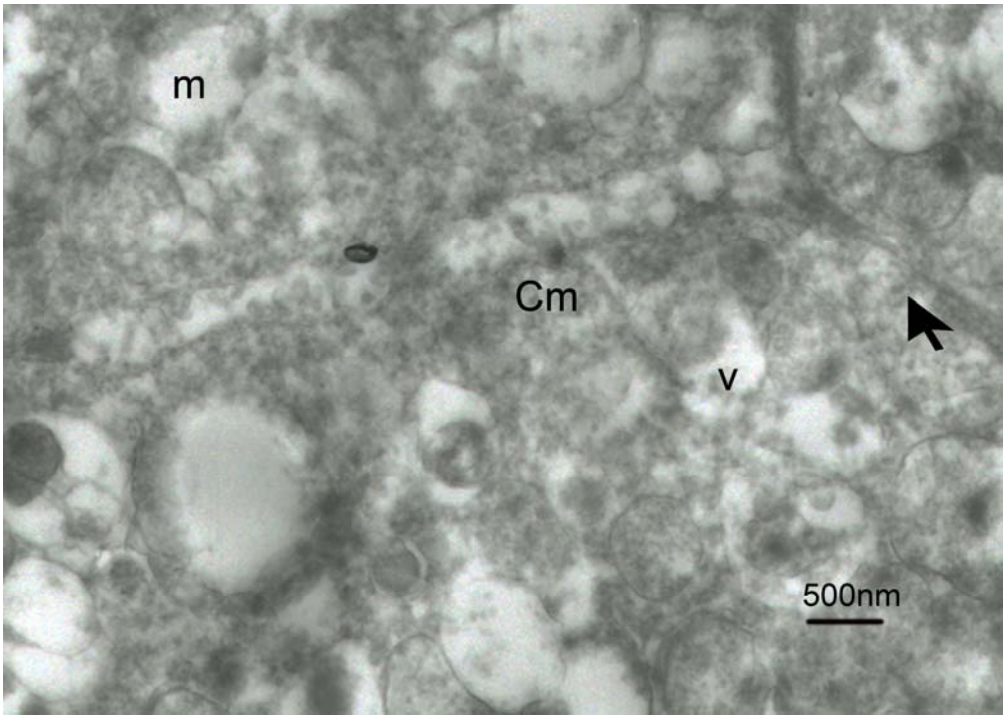
Şekil 4.5.2.1.3 : Nöraminidaz uygulanmamış sitrik asit grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm), Rutenyum kırmızısı ile boyanmış bölgeler (ok).



Şekil 4.5.2.1.4 : Nöraminidaz uygulanmış sitrik asit grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm), Rutenyum kırmızısı ile boyanmış bölgeler (oklar).



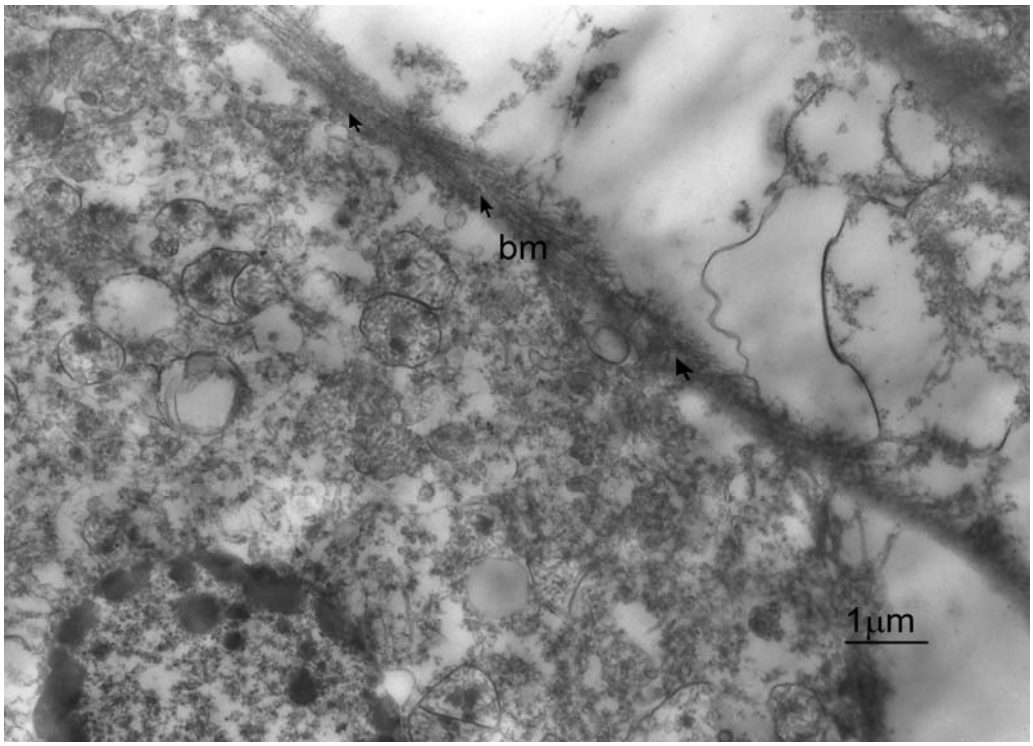
Şekil 4.5.2.1.5 : Nöraminidaz uygulanmamış sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm), Ruteyum kırmızısı ile boyanmış fibriller (ok), membran hasarı (ok başı).



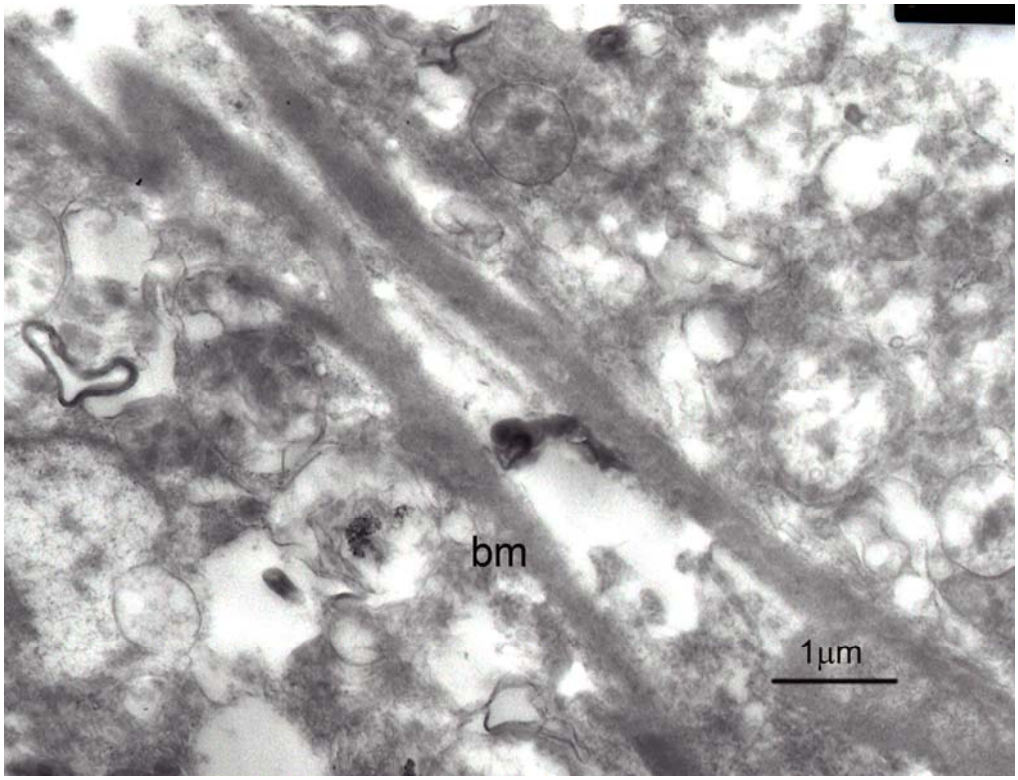
Şekil 4.5.2.1.6 : Nöraminidaz uygulanmış sodyum benzoat grubu karaciğer dokusu. Hücre membranı (Cm), mitokondri (m), hembran hasarı (ok).

4.5.2.2. Böbrek

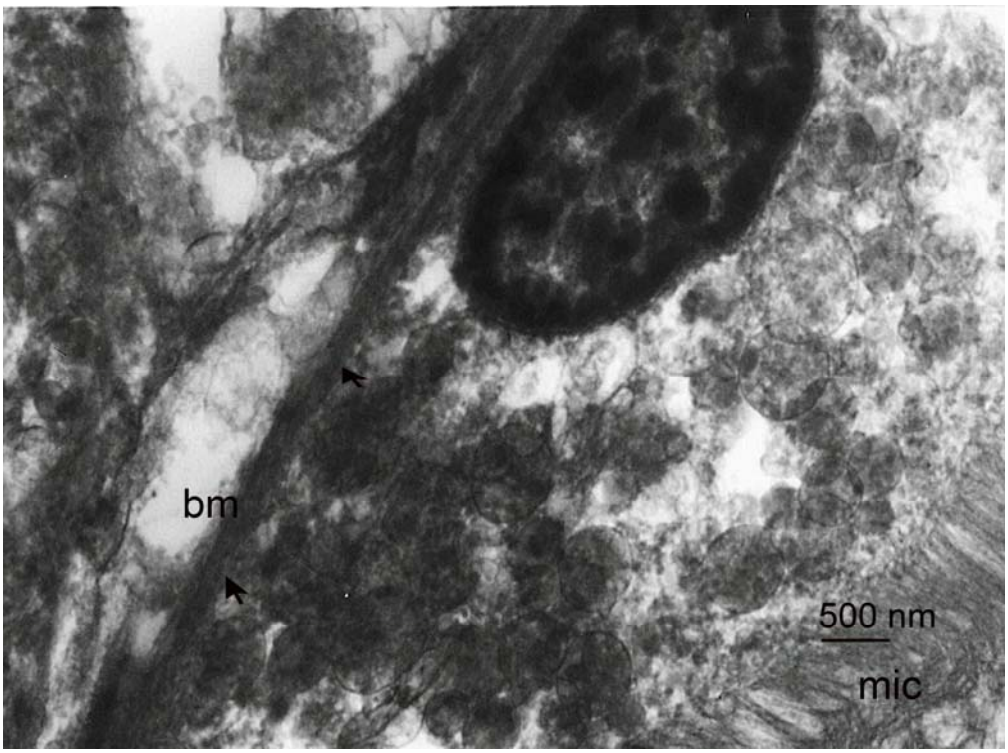
Böbrek dokularında özellikle GAG'ların yoğun olduğu bazal membranlarda, sitrik asit ve sodyum benzoat uygulanmış hayvanların böbrek dokularında Ruteyum kırmızısı boyanması açısından kontrol grubuna oranla çok belirgin bir fark görülmemiştir (Şekil 4.5.2.2.1-6**)**. Ancak sitrik asit grubunda tubül hücrelerine ait mikroviluslarda boyanmanın daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5.2.2.3).



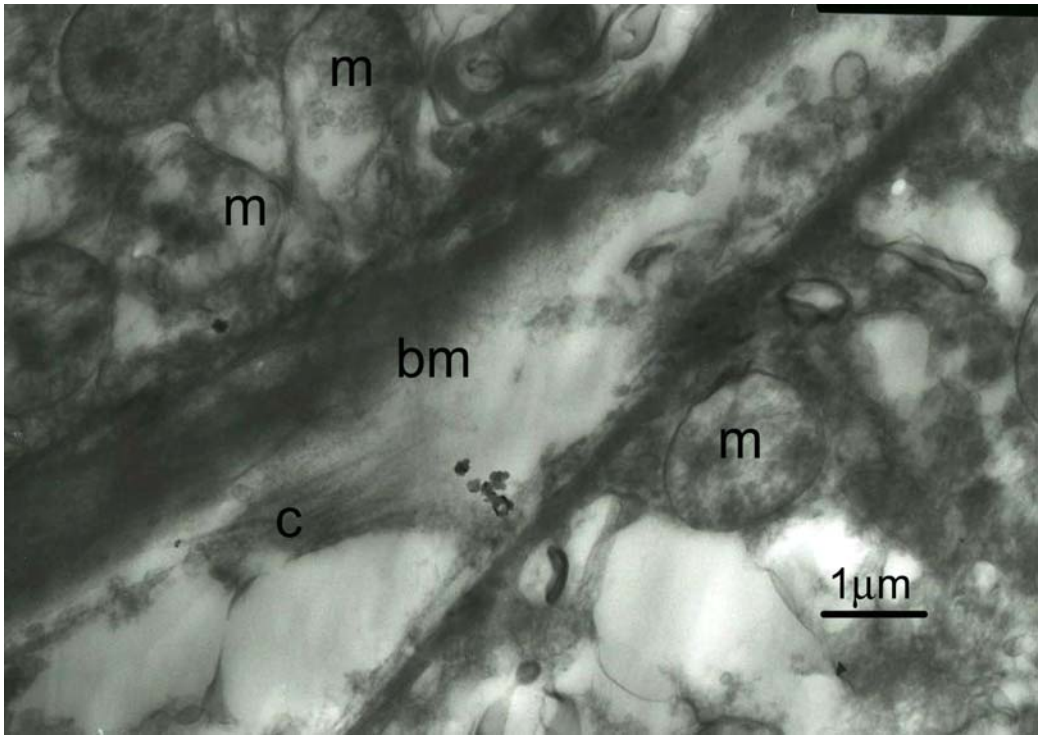
Şekil 4.5.2.2.1 : Nöraminidaz uygulanmamış kontrol grubu böbrek dokusu. Bazal membran (bm ve oklar).



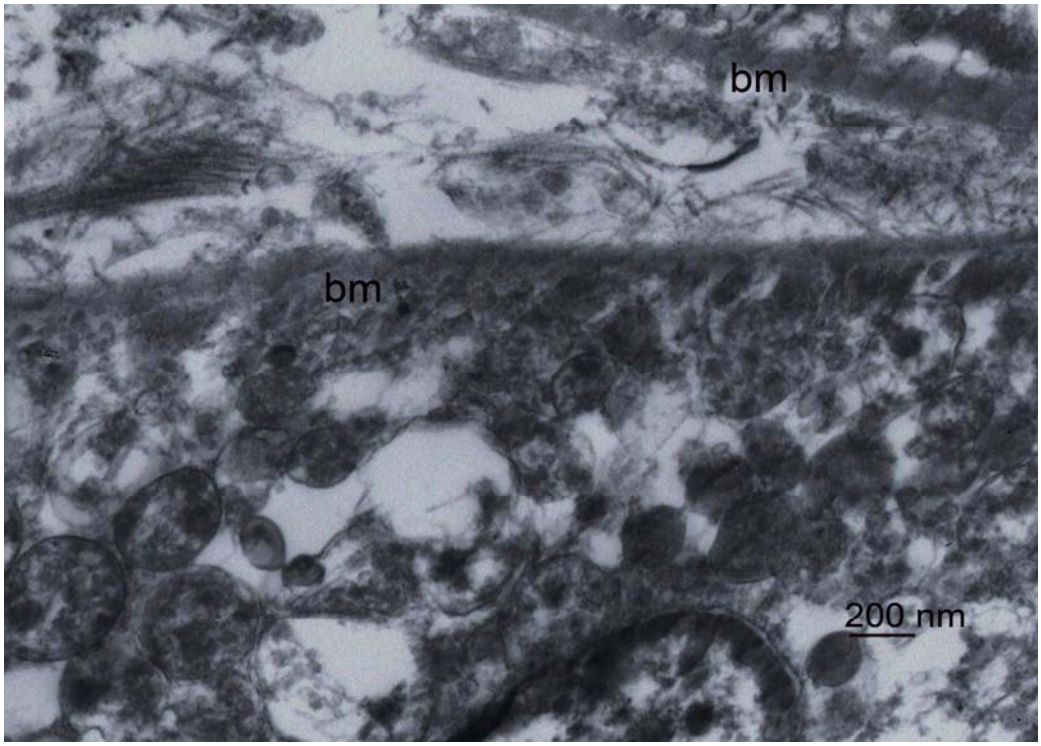
Şekil 4.5.2.2.2 : Nöraminidaz uygulanmış kontrol grubu böbrek dokusu. Bazal membran (bm).



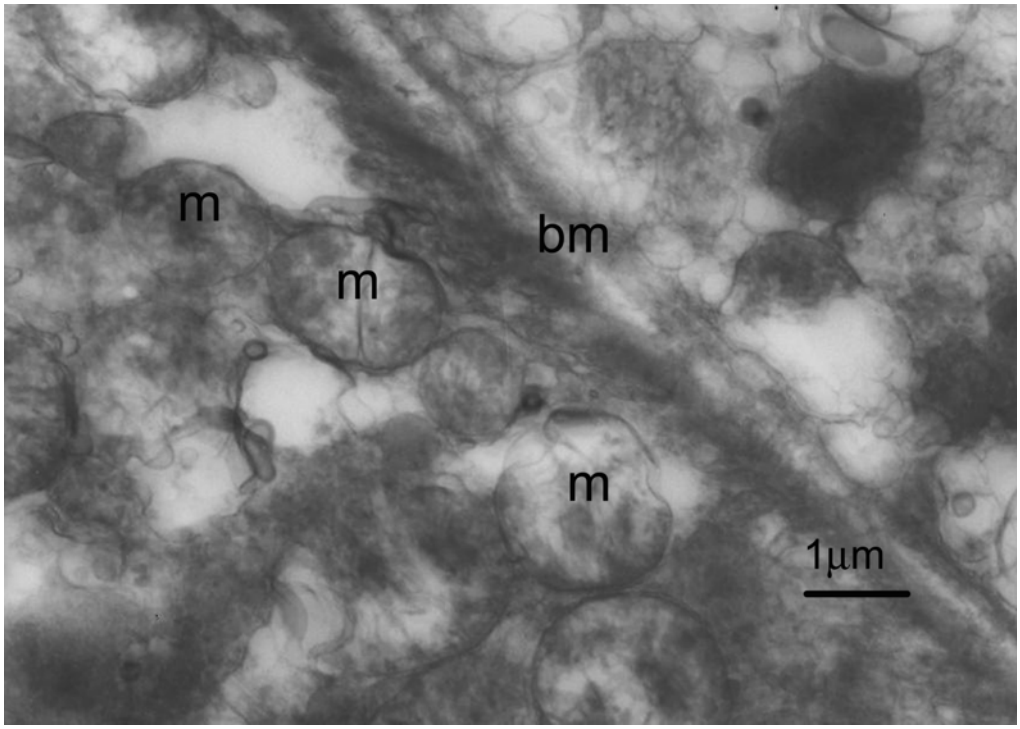
Şekil 4.5.2.2.3 : Nöraminidaz uygulanmamış sitrik asit grubu böbrek dokusu. Mikrovilluslar (mic), bazal membran (bm ve oklar).



Şekil 4.5.2.2.4 : Nöraminidaz uygulanmış sitrik asit grubu böbrek dokusu. Bazal membran (bm), kollojen lifler (c), mitokondri (m).



Şekil 4.5.2.2.5 : Nöraminidaz uygulanmamış sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Bazal membran (bm).



Şekil 4.5.2.2.6 : Nöraminidaz uygulanmış sodyum benzoat grubu böbrek dokusu. Bazal membran (bm), mitokondri(m).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Herhangi bir yolla vücuda giren kimyasal maddelerin detoksifiye edildiği temel organlar karaciğer ve böbreklerdir. Bu organlar zararlı kimyasal maddeleri içerdikleri özel mekanizmalarla etkisiz hale getirilirler. Bu mekanizmalardaki yetersizlik hücrelerin ve organların bozulmasına ve hatta nekrozuna sebep olabilir.

Hazır gıdaların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılan besin koruyucular da insanların hergün karşı karşıya kaldıkları kimyasal maddelerin başında gelmektedir. Bu nedenle, günümüzde besin koruyucuların muhtemel toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar büyük önem kazanmaktadır. Bazı besin koruyucuların canlılar üzerinde toksik etkili olabileceği daha önce yapılan araştırmalarda açıklanmıştır (Fujitani, 1993; Safer ve Nughamishi, 1999; Kaboğlu ve Aktaç, 2002; Sasaki vd., 2002; Aktaç vd., 2003a, 2003b; Meng ve Nie, 2005; Aktaç vd., 2008). Ancak yapılan literatür araştırmasında, besin koruyucuların doku GAG'ları ve sialik asitler üzerinde etkilerinin incelendiği çalışmalara rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, günümüzde yaygın olarak pek çok alanda kullanılan besin koruyucu maddeler olan sodyum benzoat ve sitrik asidin sıçan karaciğer ve böbrek dokularında GAG'lar ve sialik asit üzerindeki muhtemel etkileri araştırılmıştır.

Daha önce yapılan kronik çalışmalarda, fenolik antioksidanlar, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksiyanizol (BHA)'ün sıçanlarda (Nijhoff ve Peters, 1992) ve farelerde (Würtzen, 1990) vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu bildirilmişdir. Sodyum benzoat ile yapılan kısa süreli bir çalışmada B6C3F1 fareleri ve F344 sıçanlarında vücut ağırlığında değişiklik gözlenmemiştir (Fujitani, 1993). Yine Kaboğlu ve Aktaç (2002) farelerde kısa süreli bir çalışmada sodyum benzoatın doza bağlı olarak vücut ağırlığını azalttığını; Poerwono vd., (2001) ile Aktaç vd., (2003a) sitrik asitin farelerde vücut ağırlığında bir azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise hem sodyum benzoat hemde sitrik asit grubundaki hayvanların vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir (Tablo 4.1). Önceki çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın uygulanan doz ve uygulama süresine bağlı olduğu söylenebilir.

Çeşitli besin koruyucuların organ ağırlıkları üzerindeki ekilerinde de farklılıklar görülmektedir. BHT (Würtzen, 1990; McFarlene vd., 1997; Safer ve Nughamishi, 1999) ve BHA (Würtzen, 1990)' in farelerde karaciğer ağırlığını arttırdığı; sodyum benzoatın erkek sıçanlarda karaciğer ve böbrek ağırlığını arttırdığı (Fujitani, 1993) açıklanmıştır. Farelerde yapılan kısa süreli çalışmalarda ise, sodyum benzoatın (Kaboğlu ve Aktaç, 2002) ve sitrik asitin (Aktaç vd., 2003a, 2003b) karaciğer ve böbrek ağırlıklarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı açıklanmış ve bu farklılıkların doz ve süreyle bağlantılı olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmada da, sadece sitrik asit grubuna ait hayvanların karaciğerlerinde anlamlı bir ağırlık artışı gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Glikozaminoglikanlar büyük heterojen bir polisakkarit ailesidirler ve ekstraselüler matriksin temel bileşenlerini oluştururlar. Karaciğer hasarı sırasında, kan GAG'larının fizyolojik düzeylerinin önemli olarak arttığı (Bramley vd., 1991) ve bu artışın hepatik bağ doku tahribatından orjinlendiği, veya bu polisakkaritlerin karaciğerdeki düşük yıkım hızlarına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Fraser vd., 1997).

Sialik asitler, yüksek organizasyonlu hayvanların en önemli molekülleri arasında olan, asidik monosakkaritlerdir. Kompleks karbohidratlara bağlı olarak özellikle hüce membranlarında bulunurlar. Bu konumları nedeniyle birçok hücre fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Özellikle hücreleri ve makromolekülleri enzimatik ve immunolojik saldırılardan korurlar (Varki, 1992). Sialik asitler günümüzde pek çok hastalığın teşhisinde önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Özben, 1991; Sillanaukee vd., 1999; Janega vd., 2002; Manju vd., 2002; Karapehlivan vd., 2007). Özellikle kanser hastalığı ile sialik asit ilişkisi gün geçtikce önem kazanmaktadır. Doku ve serum sialik asit düzeyindeki artışlar çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmektedir (Kökoğlu vd., 1992; Manju vd., 2002; Raval vd., 2004; Goodarzi vd., 2005; Babal vd., 2006).

Bu çalışmada da, sodyum benzoat ve sitrik asit ile serum, karaciğer ve böbrek dokuları total sialik asit (TSA) içeriği arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmada, sodyum benzoat'ın kısa süreli uygulaması sonucunda serum ve dokulardaki TSA miktarlarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4. 2). Bu azalmanın sodyum benzoat etkisi ile gelişen doku hasarı sonucu sialik asit biyosentezininde ki bozulmalara bağlı olmuş olabileceği söylenebilir. Sodyum benzoatın farelerde karaciğerde

dejeneratif değişikliklere neden olduğu daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Kaboğlu ve Aktaç, 2002). Benzer olarak, bu çalışmanı histolojik bulguları da bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Sitrik asit grubundaki hayvanların sadece böbrek dokularının TSA değerleri yüksek bulunmuştur (Tablo 4. 2). Hücre membran glikolipitlerinin terminal uçlarında yerleşen sialik asitlerin salgılanmasının, muhtemel bir lipit peroksidasyonu ve hücre membranlarının yıkımı sonucunda meydana gelmiş olabileceği, ve TSA artışı ile sonuçlanan bu salgılanmanın membranlardaki glikolipitlerin yapısal bütünlüğünü değiştirmiş olabileceği önceki çalışmalarda açıklanmıştır (O'Kennedy vd., 1991; Shutter vd., 1992; Yasuda vd., 2006; Yapar vd., 2007). Yine önceki bir çalışmada, serum TSA konsantrasyonlarının bazı karaciğer hastalıklarında arttığı gösterilmiştir (Sillanaukee vd., 1999).

Karaciğer ve böbrek dokularının Hematoksilen - Eosin ile boyanmış kesitlerinde yapılan incelemede, gerek sodyum benzoat ve gerekse sitrik asidin dokularda dejeneratif nekrotik değişikliklere neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar sodyum benzoat ve sitrik asit ile yapılan daha önceki çalışmaların sonuçları ile benzerdir. Farelerde yapılan çalışmalarda, oral yolla (Poerwono vd., 2001; Aktaç vd. 2003a) ve intraperitonal olarak uygulanan (Aktaç vd. 2003b; 2008) sitrik asidin karaciğer ve böbrekte nekrotik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir. Yine oral alınan sodyum benzoat'ın ise farelerde doza bağlı olarak karaciğerde dejenerasyona neden olduğu açıklanmıştır (Fujitani 1993; Kaboğlu ve Aktaç 2002).

GAG'ların gösterilmesi amacıyla yapılan AB-PAS boyamalarında, PAS boyanmanın sodyum benzoat ve sitrik asit gruplarında kontrole göre çok daha az olması sodyum benzoat ve sitrik asit gruplarında özellikle nötral GAG'larda azalma meydana geldiğini düşündürdü. Yine, AB boyanmanın sitrik asit grubunda zayıfladığı, ancak sodyum benzoat grubuna ait karaciğer dokusunda AB boyanmanın ekstraselüler alanda yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Bu sonuca göre de, sitrik asid'in asidik GAG'larda azalmaya neden olduğu buna karşılık sodyum benzoat'ın asidik GAG'ların özellikle ekstraselüler alanda artmasına neden olduğu söylenebilir.

Böbrek dokusundaki AB-PAS ile yapılan incelemede, kontrol grubuna ait korteks bölgesinde AB boyanmanın çok zayıf olmasına karşın, PAS boyanma özellikle bazal membran, tubüller arası alan ve tubül hücrelerinin apikal yüzeylerinde yoğunlaşmıştır. Bu da korteks bölgesinde nötral GAG'ların yoğun olduğunu gösterir. Medulla bölgesinde ise, her iki boya da yoğun olarak görülmüştür. PAS (+) bölgelerin yoğun olduğu bazal membran ve tubüller arası alanda nötral GAG'ların, AB (+) olan tubüller arası alan ve apikal yüzeylerde ise asidik GAG'ların yer aldığı söylenebilir.

Sitrik asit grubunda, özellikle medulla bölgesinde, hem PAS hem de AB boyanmanın zayıfladığı görülmüştür (Şekil 4.4.2.2.4-6). Buna göre, sitrik asit'in nötral GAG'ların biyosentez mekanizmalarında muhtemel bir inhibisyon yarattığı, veya hücresel dejenerasyon sonucu biyosentez mekanizmasının bozulmuş olduğu söylenebilir.

Sodyum benzoat grubunda ise; AB ve PAS boyanma yoğunluğu artmıştır. Bu bölgede sodyum benzoat asidik ve nötral GAG'larda artışa neden olmuştur. GAG' ların bazal membranların temel bileşenleri olduğu, ve onların moleküler organizasyon ve fonksiyonların düzenlenmesinde glomerular geçirgenliği kontrol ederek anahtar rol oynadıkları (Yavuz, vd., 2000; De Muro vd., 2005) düşünüldüğünde, böbrek dokusu GAG'larındaki azalma ve artışın böbrek fonksiyonunu ve organizma sağlığını olumsuz etkileyeceği kuşkusuzdur.

Elektron mikroskobu incelemelerinde, hem sitrik asit hem de sodyum benzoat grubunun karaciğer ve böbrek dokularında dejenerasyon ve nekrotik değişiklikler gözlenmiştir. Karaciğerde hepatosit membranlarında hasar, mitokondrilerde krista kaybı, nukleus zarında parçalanmalar en yoğun gözlenen değişikliklerdir. Böbrekte ise mitokondrilerde krista kayıpları ve zar parçalanmaları, bazal katlanmaların kayboluşu, bazal membran ve nukleuslarda hasar, görülen değişiklikler olarak özetlenebilir. Çalışmada elde bu sonuçlar sodyum benzoat (Kaboğlu ve Aktaç 2002) ve sitrik asit (Aktaç vd. 2003b; 2008) ile yapılan önceki çalışmaların sonuçları ile benzerdir.

Yüzey glikokonjugatlarının sodyum benzoat ve sitrik asitten etkilenmelerini ince yapısal olarak görebilmek amacıyla EM kesitleri Ruthenium kırmızısı (RR) ile boyanmıştır. Glikokonjugatlardaki sialik asitlerin varlığını görebilmek için, RR öncesi dokulara nöraminidaz (NA) uygulaması yapılmıştır.

Kontrol grubuna ait hayvanların, enzim (NA) uygulaması yapılmamış karaciğer dokusunda RR boyanması belirgin iken, enzim uygulanmış dokularda boyanma yoktur. Bu durum, NA enziminin terminal sialik asitleri uzaklaştırmış olduğunu gösterir. Sitrik asit grubundaki hayvanların karaciğer dokularında RR boyanması (enzimli ve enzimsiz dokularda) görülmüştür, ancak boyanma enzim uygulaması yapılanlarda daha az yoğunluktadır. Boyanma, kontrol grubundaki durumdan çok farklı değildir. Bu sonuç, çalışmanın doku sialik asit ölçüm sonuçları ile paralellik göstermektedir (Tablo 4.2). Sodyum benzoat grubundaki hayvanların karaciğerlerinde nöraminidaz uygulanmamış olan dokuda muhtemelen doku tahribatı nedeniyle, ancak sağlam bölgelerde yer yer görülmüştür. Bu sonuç da, Tablo 4.2'de görülen total sialik asitteki azalmaya uygunluk göstermektedir.

Sitrik asit ve sodyum benzoat uygulanmış hayvanların böbrek dokularında, özellikle GAG'ların yoğun olduğu bazal membranlarda RR boyanması bakımından önemli farklar görülmemiştir. Ancak tubül hücrelerindeki mikrovilluslarda boyanmanın yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, özellikle sodyum benzoat grubu böbrek dokularının AB-PAS boyanma sonuçları ile benzerdir. Burada apikal hücre yüzeyinde AB (+) reaksiyon yoğunluğu gözlenmiştir. Yine bu bulgular Tablo 4.2'de görülen böbrek sialik asit ölçüm sonuçlarına uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre;

- Sodyum benzoat ve sitrik asitin karaciğer ve böbrek dokularının hücrelerinde, organellerde dejenerasyona neden olduğu ve bu dejenerasyonlar sonunda da hücresel metabolizmanın bozulmuş olabileceği;

- Organellerdeki yapısal bozuklukların (özellikle nukleus ve ER gibi glukokonjugatların biyosentezinde önemli rol oynayan) glikozilasyon mekanizmalarının da bozulmasına neden olduğu ve ;

- Sodyum benzoat ve sitrik asitin etkisi açısından kıyaslandığında, sodyum benzoatın daha fazla dejeneratif etkiye sahip olduğu söylenebilir. Ancak dokuda sializasyon artışı bakımından kıyaslandığında; sitrik asidin böbrek dokusunda önemli bir artışa neden olduğu görülmüştür. Sialik asit artışı ve kanserleşme arasındaki bulgular dikkate alındığında, sitrik asitin bu yönde bir etkiye sahip olabileceği de düşünülebilir. Bununla birlikte, bu konuda kesin yargıya varılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara da ihtiyaç duyulacağı da kuşkusuzdur.

6. KAYNAKLAR

AKTAÇ, T., KABOĞLU, A., ERTAN, F., EKİNCİ, F., HÜSEYİNOVA, G. (2003a) : The effects on citric acid (antioksidant) and benzoik acid (antimicrobial agent) on the Mouse liver: Biochemical and histopathological study. *Biologia, Bratislava* 58: 343-347.

AKTAÇ, T., KABOĞLU, (Ç) A., BAKAR, E., KARAKAŞ, H. (2003b) : The short-term effects of singel dose toxic of citric acid in mice. *J. Cell Mol. Biol.* 2: 19-23.

AKTAÇ, T., KABOĞLU, (Ç) A., KIZILAY, G., BAKAR, E. (2008) : The short term effect of single toxic dose of citric acid on the mouse tissues: histopathological study. *Fresenius Environmental Bulletin,* 17(3), 311-315.

ALTINTAŞ, S., KURTUL, N. (2006) : Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşcilerinde Plazma Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutatyon, Plazma Nitrik oksit ve Lipit Peraksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi.

ALTUĞ, T., (2006) : (Editör) Gıda Katkı Maddeleri. 2.Baskı. Bölüm: 6, S:112.

ANGATA, T., AND VARKI, A. (2002) : Chemical diversity in the sialic acids and related a}pha-keto acids, an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102: 439 – 469.

ATALAY, M., OKSALA, N. K. J., LAAKSONEN, D. E. KHANNA, S., NAKAO, C., LAPPALAİNEN, J., ROY, S., HÄNNİNEN O., AND SEN, C. K. (2004) : Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 97 : 605-611.

BABAL, P., JANEGA, P., CERNA, A., KHOLOVA, I., BRABENCCOVA, E. (2006) : Neoplastic transformation of the thyroid glands is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem.* 108:133 -140.

BALACHANDRA, S., SUDHA, D.R. (2007) : Estimation of sodium Benzoat in Ayurvedic Formulation. Kashaya (Water Decoction). *Assian Journal of Chemistry* Vol. 19, No: 5, 3421- 3426.

BALDWIN, E.A., NISPEROS – CARRIEDO, M.O., BAKER, R.A. (1995) : use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical reviews in food science and nutrition,* 35 (6): 509 - 524.

BENHAMOUCHE, S., DECAENS, T., GODARD, C., CHAMBREY, R., RICKMAN, D., MOINARD, C., VASSEUR-COGNET, M., KUO, C., KAHN, A., PERRET, C., COLNOT, S. (2006) : Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Developmental Cell, 10, 759-770

BISSELL, MJ., HALL, G., PARRY, G. (1982) : How does the extracellular matrix direct gene expression. *Journal of Theoretical Biology.* 99: 31- 68.

BINDSLEV-JENSEN, C. (1998) : ABC of allergies. Food allergy. British medical journal. 316: 1299 -1302.

BLOM, H.I., ANDERSSON, H.C., SEPPALA, R., TIETZE, F., GAHL, W.A. (1990) : Defective glucuronic acid transport from lysosomes of infantile free sialic acid storage disease fibroblasts. *Bioehem*. I. 268: 621- 625.

BOLKENT, Ş., YANARDAĞ, R., ÖZDİL, S., KOYUTÜRK, M., ARBAK, S. (2003) : Etanolle Oluşturulan Gastrik Mukozal Hasarda Serum Sialik Asit Düzeyleri Üzerine Vitamin C, Vitamin E ve Selenyumun Etkileri. *Birinci Ulusal Glikobiyoloji Kongresi,* 14-16 Mayıs, İzmir, 70.

BUSKAS, T., INGALE, S., BOONS, G.J. **(**2006) : Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiology vol.* 16 no. 8 pp. 113R–136R.

BRAMLEY, P.N., RATHBONE, B.J., FORBES, M.A., COOPER, E.H., LASOWSKY, M.S. (1991) : Serum Hyaluronate as a marker of hepatic derangement in acut liver demage. J. *Hepatol.* 13: 8 -13.

BRETON, C., ŠNAJDROVÁ, L., JEANNEAU, C., KOCA, J., IMBERTY, A. (2005) : Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology vol*. 16 no. 2 pp. 29R – 37R.

CHAN, L. AND WONG, Y.C. (1992) : Cytochemical localisation and characterisation of proteoglycans (glycosaminoglycans) in the epithelial-stromal inretface of the seminal vesicle of the guinea pig. *J. Anat.* 180: 41 - 56.

CHEFALO, P., PAN, Y., NAGY, N., HARDING, C., GUO, Z. (2004) : Preparation and immunological studies of protein conjugates of *N*-acylneuraminic acids. *Glycoconjugate Journal* 20: 407 – 414.

CHIPLEY, J.R. (1983) : Sodium benzoate and benzoic acid. In: Branen A.L., Davidson P.M., eds. *Antimicrobials in foods*. New York, N.Y., M. Decker, pp. 11-35.

CORFIELD, A.P., AND SCHAUER, R. (1982) : Occurrence of sialic acids. In: Schauer, R. (Ed.), Sialic Acids-Chemistry, Metabolism and Function. *Springer Verlag Wien*, New York, pp. 5 - 50.

COVERLY, J., PETERS, L., WHITTLE, E., BASKETTER, D.A. (1998) : Susceptibility to skin stinging, non-immunologic contact urticaria and acute skin irritation; is there a relationship? *Contact dermatitis,* 38 (2): 90 - 95.

CROOK, M., HAQ, M., HAQ, S., TUN, P. (1994) : Serum sialie acid and aeute phase proteins in patients with myocardial infarction. *AngW/ogy* 45: 709 -1S.

CROOK, M., CONSTABLE, S., LUMB, P., RYMER, J. (1997) : Elevated serum sialic acid in pregnacy. *J.Clin. Pathol.* 50: 494 - 495.

CROOK, M. (2004) : Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system. *An update. Diabet. Med.* 21: 203-207.

CROCKER, P.R., AND VARKI, A. (2001): Sigles, sialic acids and innate immunity. *Trends in Immunology.* Vol.22. No 6.

DEĞER, Y., MERT, H., MERT, N., YUR, F., KOZAT, S., YÖRÜK, I.H., SEL, T. (2008) : Serum selenium, vitamin e, and sialic acid concentrations in lambs with white muscle disease. *Biol.Trace Elem.Res.,* 121(1): 39-43.

DE MURO, P., FAEDDA, R., SATA, A., FINETTI, D., MASALA, A., CIGNI, A., SANNA, G.M., CHERCHI GM. (2005) : Urynary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. *J.of Nephrology,* 18(2): 154 - 160.

DIMITROFF, C.J., PERA, P., DALL'OLIO, F., MATTA, K.L., CHANDRASEKARAN, E.V., LAUJ, T.Y., BERNACKI, R.J. (1999) : Cell Surface *N*-Acetylneuraminic Acid ∞2,3 Galactoside-Dependent Intercellular Adhesion of Human Colon Canser Cells. *Biochem and Bioph .Research Communication* 256: 631 - 636.

DÖKMECİ, İ. (2001) : Toksikoloji Zehirlenmede Tanı ve Tedavi. Yeniden Düzenlenmiş III Baskı . *Nobel Tıp Kitapevleri* İstanbul, 127 -134.

ERDOĞAN, H.M., KARAPEHLİVAN, M., CİTİL, M., ATAKİŞİ, O., UZLU, E., ÜNVER, A. (2008) : Serum sialic acid and oxidative stres parameters cattle with leptospirosis. *Vet.Res.Commun.*, Feb.5 (Baskıda).

FEILLET, F., LEONARD, JV. (1998) : Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. *Journal of inheridet metabolic disease. Suppl*. 21 (1): 101 - 111.

FRASER, J.R., LAURENT, T.C., LAURENT, U.B. (1997) : Hyaluronan : its nature, distribution, fuctions and turnover. *J. Int.Med.,* 242: 27-33.

FUJITANI, T. (1993) : Short-term of sodium benzoat in F344 rats and B6C3F1 mice. *Tox. Lett.,* 69: 171-179.

GOODARZI, M.T., SHAFIEI, M., NOMANI, H., SHAHRIARAHMADI, A. (2005) : Relationship between total and lipid-bound serum sialic acid and some tumor markers. *Iran J. Med. Sci*. 30(3): 124 -127.

GROLLMAN, E.F., SAJI, M., SHIMURA, Y., LAU, J.T.Y., ASHWELL, G. (1993) : Thyrotropin regulation of sialic acid expression in rat thyroid cells. *J Biol Chem* 268: 3604 - 3609.

GÖKMEN, S.S., KILIÇLI, G., ÖZÇELİK, F., BİRSİN, A., GÜLEN, S. (2002) : Kroner Kalp Hastalarında Damar Tıkanıklığı ile Serum Total Ve Lipide Bağlı Sialik Asit Düzeyleri Arasındaki İlişki.*Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 19(1): 24-29.

HART, W.G., HALTIWANGER, R.S., HOLT, G.D., KELLY, W.G. (1989) : Glycosylation in the Nucleus and Cytoplasm. *Ann. Rev. Biochem*. 58: 841-74.

HASCALL, V.C., AND HASCALL, G.K. (1981) : Proteoglycans. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (ed. E. D. Hay), pp. 39-63. New York: Plenum Press.

HAYASHI K., HAYASHI, M., JALKANEN, M., FLRESTONE, J., TRELSTAD, R.L., BERNFIELD, M.R. (1987) : Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues: a light and electron microscopic study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 35: 1079-1088.

HAY, E.D. (1984) : Cell-matrix interaction in the embryo: cell shape, cell surface, cell skeleton, and their role in differentiation. In *The Role of Extracellular Matrix in Development* (ed. R. L. Trelstad), pp. 1-3 L. New York: Alan R. Liss.

http://www.thefreedictionary.com/ (08.12.2007)

http://nl.wikipedia.org/wiki/Citroenzuur (15. 03.2008)

http://www.inchem.org/ (20.01.2008)

http://www.vivo.colostate.edu (08.12.2007)

http://www.geocities.com/biology_4e/page10.htm (17. 01. 2008)

http://www.tigerpath.com/unit_06.htm (13.12.2007)

http:// www.kkgm.gov.tr (06.11.2007)

http:// glycoses.ncifcrf.gov/mono/muramic.htm/ (20.03.2005)

HOOK, M., KJELLER, L., JOHANSSON, S., ROBINSON, J. (1984) : Cell-surface glycosaminoglycans. *Annual Review of Biochemistry* 53: 847-869.

IIJIMA, R., TAHAHASHI, H., NAMME, R., IKEGAMI, S., YAMAZAKI, M. (2004) : Novel biologicalfunction of sialic acid (*N*-acetilneuraminic acid) as hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters* 561: 163-166.

İDİZ, N., GÜVENDİK, G., BOŞGELMEZ, İ.İ., SÖYLEMEZOĞLU, T., DOĞAN, Y.B., İLHAN, İ. (2004): Serum sialic acid and &- glutamyltransferase levels in alcohol – dependent individuals. *Forensic Science International* 146: 67-70.

İŞBİLİR, Ş.S., GÖKMEN, S.S., ÇAĞLAR, T., HATİPOĞLU, O.N., GÜLEN, S. (2002) : Akciğer kanserinde serum totol ve lipite bağlı sialik asit düzeylerinde yükselme ve bunun metaztaz ile ilişkisi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* cilt 19 sayı 2.

JANEGA, P., CERNA A., KHOLOVA, I., BRABENCOVA, E., BABAL, P. (2002) : Sialic acid expression in autoimmune thyroiditis. *Acta Histochem,* 104 (4): 343-347.

KABOĞLU, A., AND AKTAÇ T. (2002) : A study of the effects of sodium benzoate on the Mouse liver. *Biologia,* 57 / 3: 373-380.

KANWAR, Y.S. (1984) : Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Laboraıory Invesıigalion* 51: 7-21.

KAPITANOV, D., AND YU, R.K. (1999) : Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* vol. 9 no. 10 pp. 961–978.

KARAÇALI, S. (2003) : Glikobiyoloji Güncel Moleküler Biyoloji .*Turk. J. Vet. Anim. Sci* . 27: 489-495.

KARAÇALI, S., DEVECİ, R., DEVECİ, Ö., ONAT T., GÜRCÜ B. (1995) : Spectrophotometrical determination of sialic acid in the tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.,* 58: 59-67.

KARAÇALI, S., DEVECİ, R., PEHLİVAN, S., ÖZCAN, A. (2000) : Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic gland of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in the larval stage. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37, 2: 167-170.

KARAÇALI, S., KIRMIZIGÜL, S., DEVECİ, R., DEVECİ, Ö. (2003) : Precence of sialic acid in the hemolymph of *Dociostaurus maroccanu* (Orthoptera:Acrididae). *Invertebrate Reproduction and Development,* 43: 2- 91-94.

KARAPEHLİVAN, M., ATAKİŞİ, E., CİTİL, M., KANKAVİ, O., ATAKİŞİ, O. (2007) : Serum sialic acid levels in calves with pneumonia. *Vet. Res.Commun*.,31: 37-41.

KATO, S., ODA-TAMAI. S. AND AKAMATSU, N. (1988) : Postnatal changes in *N*-Linked oligosaccharides of glycoprotein in rat liver. *Biochem.* J. 253: 59-66.

KEAN, E.L., MÜNSTER- KÜHNEL, A.K., SCHAHN, R.G. (2004) : CMP- sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochemica et Biophysica Acta* 1673: 56-65.

KELM, S., SCHAUER, R., MANUGUERRA, J.-C., GROSS, H.-J., CROCKER, P.R. (1994) : Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22." *Glycoconjugate Journal* 11: 576-585.

KELM, S., AND SCHAUER, R. (1997) : Sialic acids in molecular and cellular interaction,Int. *Rev. Cytol.* 175: 137-240.

KILIÇ, N. (2005) : (Çeviri Editörü). Lehninger Biyokimya İlkeleri 3. Baskıdan çeviri. Palme Yayın Dağıtım Pazarlama, İç ve Dış Ticaret LTD.ŞTİ. Ankara.

KÖKOĞLU, E., SÖNMEZ, H., USLU, E., USLU, İ. (1992) : Sialic acid levels in various types of cancer. *Cancer Biochem. Biophys*. 13: 57-64.

KUBOTA, K., ISHIZAKI, T. (1991) : Dose-dependent pharmocokinetics of benzoik acid follwing oral administration of sodium benzoate to humans. European journal of clinical pharmacology. 41 (4) : 363-368.

LEE, R., KELM, S., MICHALSKI, J.C., SCHAUER, R. (1990) : Influence of sialic acid on the galactose- recognizing reseptor of rat oeritoneal macrophages.*Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371: 307-316.

LERNER, L., AND TORCHIA, D.A. (1986) : A multinuclear study of the interactions of cations with proteoglycans, heparin, and ficol. *Journal of Biological Chemistry* 261: 12706--12714.

MANJU, V., BALASUBRAMANIAN, V., NALINI, N. (2002) : Oxidative stress and tumor markers in cervical cancer patients. *J. Bioehem. Mol Biol. Biophys.* 6: 387-390.

MCFARLENE, M., PRICE, S.C., COTTREL, S., GRASSO, P., BREMME, J.N., BOMHARD, M.E., HINTON, H.R. (1997) : Hepatic and associated response of rats to pregnancy, lactation and smiltaneous treatment with butylated hydroxytoluene. *Food Chem.Toxicol.,*35: 753-767.

MENG, Z., AND NIE, A. (2005) : Effects of sodium metabisulfide on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidial neuron of rat hippocampus. *Food Chem.Toxicol*. 44: 225-232.

MOHAMED, A.A., MOUSSA, MARYA ALSAEID, THANAA, M.K., REFAI, NABILA ABDELLA NASHAMI AL- SHEIKH, JOSEPH, E., GOMEZ. (2004) : Association of Serum Sialic Acid With Cardiovascular Metabolic Risk Factors in Kuwaiti Children and Adolescent With Type 1 Diabetes. *Metabolism,* Vol 53, No 5 (May), pp 638-643.

MULLOY, B., AND FOSTER, M.J. (2000) : Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* vol. 10 no. 11pp. 1147–11.

NIJHOFF, W.A., AND PETERS, W.H.M. (1992) : Induction of rat hepatic and intestinal glutathion S-transferases by butylated hydroxyanisole. *Biochem.Pharmacol.,* 44: 596-600.

OGASAWARA, Y., NAMAI, T., YOSHINO, F., LEE, MC., ISHII, K. (2007) : Sialic acid is essential moiety of mucin as a hydroxyl radical scavenger. *FEBBS Letters* 581: 2473 -77.

OLDEN, K., PARENT, J.B., WHITE, S.L. (1982) : *Bioehim. Biophys. Acta* 650: 209-232.

OMONIGHO, S.E., AND IKENEBOMEH, M.J. (2000) : Effects of different preservative treatments on the chemical changes of pounded white yam (Diosorea roundata) in storage at 28+/- 2 degrees C. *Food Chem.,* 68(2) : 56.

O'KENNEDY, R., BERNS, G., MORAN, E., SMITH, H., CARROLL, K., THORNES, R.D. (1991) : A critical analysis of the use of sialic acid determination in the diagnosis of malignancy. *Cancer Lett.,* 58: 91-100.

ÖZBEN, T. (1991) : Elevated_serum and urine sialic acid levels in renal diseases. *Ann Clin. Biochem.,* 2844 - 48.

PHILIPS ,CA. (1999) **:** The effect of citric acid , lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri. Letters in Applied Microbiology,* 29 (6): 424 - 428.

POERWONO, H., HIGADHIYAMA, K., KUBO, H., POERNOMO, A.T., SUHARJONO, SUDIANA, K., INDRAYATO, G., BRITTAIN, G. (2001) : Citric Acid. Anal. Pro. Drug. *Subs. Excip.* 28 :1 -76.

RAPRAEGER, A.C., JALKANEN, M., ENDO, E., KODA, J., BERNFIELD, M.R. (1985) : The eell surfaee proteoglycan from mouse mammary epithelial eells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 160: 11046 -11052.

RAPRAEGER, A., JALKANEN, M., BERNFIELD, M. (1986) : Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral eell surface of mouse mammary epithelial eells. *Journal of Cell Biology* 103: 2683 - 2696.

RAVAL, GN., PAREKH, L.J., PATEL, D.D., JHA, F.P., SAINGER, R.N., PATEL, P.S. (2004) : Clinical usefulness of alterations in sialic acids, sialyltransferase and siaolproteins in breast cancer. *Indian J.Clinical Biochemistry.* 19(2): 60 -71.

ROBERTS, R., GALLAGHER, J., SPOONCER, E., ALLEN, T.D., BLOOMFIELD, F., DUTER, T.M. (1988) : Heparan sulfate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332: 376 - 378.

SAFER, A.M., AND NUGHAMISH, A.J. (1999) : Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxytoluene (BHT) in rats: an electron microscopical study. *Histol. Histopathol.,* 14(2) : 391-406.

SARANIYA, A., KONER, BC., DOURERADJOU, P., SELVARAJ, N., SHIVAGOUROU, V. (2008) : Altered malondialdehyde, protein carbonyl and sialic acid levels in plasma of microscopically abnormal semen. *Andrologia,* 40(1): 56-57.

SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI K., TSUDA, S. (2002) : The coment assay with 8 mouse organs: result with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519: 1003 - 119.

SAXON, E., AND BERTOZZI, C.R. (2001) :Chemical and Biologycal Strategies for Engineering Cell Surface Glycosylation. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*17:1-23.

SCHAUER, R., AND KAMERLING, J.P. (1997) : Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In: Montreuil,L., Vliegenthart, J.F.G.,S~hachter~H. (Eds.), Glycoproteins II. *Elsevier Science A.V,* Amsterdam, pp. 243-402.

SCHAUER, R. (2000a) : Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate J.* 17, 485-499.

SCHAUER, R., (2000b) : Biochemistry of sialic acid. diversity. In: Ernst, B., Hart, G.W., Sinay, P. (Eds.), Carbohydrates in Chemistry and Biology. Part II: *Biology of Saceharides,* Vol. 3. Wiley-VCH, Weinheirn, pp. 227-243.

SCHAUER, R. (2004a) : Sialic acids :fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology,* 107: 49-64.

SCHAUER, R. (2004b) : Victor Ginsburg's Influence On My Research Of The Role Of Sialic Acids in Biological Recognition. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 426: 132-141.

SERDAR, Z., SERDAR, A., ALTIN, A., ERYILMAZ, U., ALBAYRAK, S. (2007) : The relation between oxidant and antioxidant parameters and severity of acute coronary syndromes. *Acta Cardiol*., 62(4): 373-380.

SHUTTER, M.J., VISSER, J.J., KAMP, G.J., POULLY, S.M., DIJK, W., HILGERS, J. (1992) : The utility of lipid-associated sialic acid (LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. *Tumor Biol.,* 131: 121-132.

SILLANAUKEE, P., PÖNNIÖ, M., JAASKELAINEN, I.P. (1999) : Occurence of sialic acids in healtby humans and different disorders, *Eur. J. Clin. Inves I.* 29 : 413-425.

SROUR, R. (1998) : Benzoik acid and derivatives. In: Srour R, ed. Aromatic intermediates and derivatives. Paris, pp. A.IV.1- A.IV.17.

SPIRO, R.G. (2002) : Protein glycosylation: nature, distribution, enzimatic formation, and disease implication of glycopeptide bonds. *Glycobiology* vol. 12 no. 4 pp. 43R - 56R.

STEFANIDOU, M., ALEVISOPOULOS, G., CHATZIIOANNOU, A., KOUTSELINIS, A. (2003) : Controversies in toxicology. Assessing food additive toxicity using a cell model. *Vet. Human Toxicol.* 45 : 103 – 105.

SYDOW, G. (1985) : Asimplified guick methot for determination of sialic acid in serum.
Biomed.Biochim. Acta 44 11/12, S. 1721-1723.

TANNER, M. (2005) : The enzimes of sialic acid biosynthesis. *Bioorganic Chemistry* 33: 216-228.

TELFORD, I. R., AND BRİDGMAN, C.F. (1995a) : Intraduction to Functional Histolojy. Chapter 19 P. 339-347.

TELFORD, I. R., AND BRİDGMAN, C.F. (1995b) : Intraduction to Functional Histolojy. Chapter 20 P. 357-371.

THOMAS, K.A., AND GIMENEZ, G.G. (1986) : Fibroblast growth (actors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trentls in Biochemical Sciences ll*, 81-84.

TÜRKOĞLU, S. (2007) : Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutat. Res. 62 *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626 (1), P.4-14.

US FDA (1972 a) : *GRAS (Generally Recognized As Safe)* food ingradients: benzoik acid and sodium benzoate. washington, DC.US Food and Drug Administration.

US FDA (1972 b) : *Teratologic evaluation of FDA 71-37 (sodium benzoate).* East Orange , NJ, US Food and Drug Administration, Food and Drug Research Laboratory.

VARKI, A. (1992) : Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2, 25-40.

VARKI, A. (2001) : Biological roles of oligosaccharides. In Tools for Glycobiology. Novato: *Glyco Inc.,*7.18-7.32.

WEERAPANA, E., AND IMPERIALI, B. (2006) : Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* vol. 16 no. 6 pp. 91R–101R.

WHO (1996) : Toxicological evaluation of certain food additives. Prepared by the 46th meeting of the joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, World Health organization *(WHO Food Additives Series 37).*

WHO (2000) : Benzoik acid and sodium benzoate. Concise Iternational Chemical Assessement Document 26. Geneva.

WINCHESTER, B. (2005) : Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* vol. 15 no. 6 pp. 1R–15R.

WÜRTZEN, G. (1990) : Short comings of current strategy for toxicity testing of food chemicals : *Antioxidants. Food Chem.Toxicol*., 28: 743-745.

YANAGISAWA M. AND YU R. K., (2007) : The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology* vol. 17 no. 7 pp. 57R–74R.

YAPAR, K., KART, A., KARAPEHLİVAN, M., ATAKİŞİ, O., TUNCA, R., ERGİNSOY, S., CİTİL, M. (2007): Hepatoprotective effects of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Experimental and Toxicological Pathology*, 59: 121-128.

YASUDA, J., HIRONOBU, E., FUJIWARA, N., OOKAWARA, T., KOJIMA, S., YAMAGUCHI, Y., NISHIMURA, M., FUJIMOTO, J., SUZUKI, K. (2006) : Reactive oxygen species modfy oligosaccharides of glycoproteins in vivo : A study of a spontaneous acute hepatitis model rat (LEC rat). *Biochem.Biophys.Res.Commun*., 342: 127-134.

YAVUZ, D., TOPRAK, A., BUDAK, Y., ERSÖZ, Ö., DEYNELİ, O., TEZCAN, H., AKALIN, S. (2000) : Urynary glycosaminoglycan excretion in newly diagnosed essential hypertensive patients. *Clinical Chemistry*, 46(2): 299-301.

7. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Kırcali'de doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Bursa'da tamamladıktan sonra öğrenimime 1990 -1994 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün'de devam ettim. 1995 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Hücre Biyolojisi Programı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 1994 -1998 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı'na bağlı İlköğretim Okullarında Fen Bilgisi öğretmeni olarak görev yaptım. 1998 yılında yüksek lisansımı tamamladım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Hücre Biyolojisi Programında doktora eğitimime başladım. 1998 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir kız çocuğu annesiyim.