

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Mustafa MUNZUROĞLU

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

**FARKLI DOZLARDA SODYUM METABİSÜLFİT
ALIMI İLE DEPRESYON ARASINDAKİ İLİŞKİDE
NİTRİK OKSİTİN ROLÜ**

Mustafa MUNZUROĞLU

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

FARKLI DOZLARDA SODYUM METABİSÜLFİT
ALIMI İLE DEPRESYON ARASINDAKİ İLİŞKİDE
NİTRİK OKSİTİN ROLÜ

Mustafa MUNZUROĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Narin DERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5579 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir./....../2023

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ceren KENCEBAY MANAS
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Murat PEHLİVAN
Ege Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Deniz AKPINAR
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Melike CENGİZ

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Mustafa MUNZUROĞLU

İmza

Prof. Dr. Narin DERİN

İmza

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında eğitimim süresince gerek kişisel gerekse mesleki alanda desteğini esirgemeyen, her an yol göstericimiz olan, öğrencisi olmaktan dolayı büyük mutluluk ve gurur duyduğum sevgili danışman hocam Prof. Dr. Narin DERİN'e,

Doktora eğitimim süresince bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkılar sağlayan kıymetli bölüm hocalarım; Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR, Prof. Dr. Nazmi YARAŞ, Prof. Dr. Murat CANPOLAT, Doç. Dr. Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA'ya

Tez çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan değerli abim Erol NİZAMOĞLU ve arkadaşlarım Orhan ERKAN, Ekrem YAŞAR, Enis HIDIŞOĞLU, Betül DANIŞMAN, Tanju MERCAN, Muttalip ÇALKAN, Ayşegül GEMİCİ ve Osman SİNEN olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca, beni 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK'a

Son olarak, eşim Dandan QIN, annem Tülay MUNZUROĞLU ve babam Hikmet MUNZUROĞLU'na

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Sülfite toksisitesinin insan beyni üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak sülfite toksisitesi ile anksiyete-depresyon benzeri davranışlar arasındaki ilişki henüz belirlenmemiştir. Bu çalışma, sülfite toksisitesinin anksiyete-depresyon benzeri davranışlar üzerindeki etkilerini ve nitrik oksit (NO) bu etkileşimdeki rolünü, davranış ve biyokimyasal deneyler, Uzun Dönemli Güçlenme (UDG) ve Uzun Dönemli Baskılanma (UDB) kayıtları aracılığıyla araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: Yüz adet erkek *Wistar* sıçan dört gruba ayrıldı. S25, S100 ve S260 gruplarına, sırasıyla 25 mg/kg, 100 mg/kg ve 260 mg/kg taze hazırlanan sülfite gavaj yoluyla 35 gün boyunca verilirken, Kontrol (K) grubuna aynı hacimde distile su, gavaj yoluyla aynı süre boyunca verildi. Tüm gruplardan 15 sıçan davranış deneylerine tabi tutuldu. Her gruptan 5 sıçan UDG için, diğer 5 sıçan ise UDB kayıtları için kullanıldı. Hipokampusta nitrit/nitrat, nNOS ve iNOS seviyeleri analiz edildi.

Bulgular: Davranış deneyleriyle, özellikle 100 mg/kg ve daha yüksek dozlarda sülfite maruziyetinin, anksiyete-depresyon benzeri davranışlara neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, sülfite maruziyetinin hipokampusta UDG'nin bozulmasına neden olduğu ve UDB'yi kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. K grubuyla karşılaştırıldığında, S100 ve S260 gruplarında nitrit/nitrat, nNOS ve iNOS düzeyleri azalmıştır.

Sonuçlar: Sonuç olarak, sülfite toksisitesi yetişkinlerde anksiyete-depresyon benzeri davranışlara neden olabilir. Bu sonuçlar, sülfite kaynaklı anksiyete-depresyon benzeri davranışlarda NO üretimindeki azalmanın rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: sülfite, depresyon, hipokampus, nitrik oksit

ABSTRACT

Objective: It has been known that sulfite toxicity has detrimental effects on the human brain. However, the relationship between sulfite toxicity and anxiety-depression-like behaviors has not been determined yet. This study was carried out to investigate the effects of sulfite toxicity on anxiety-depression-like behaviors and the role of nitric oxide (NO) in this interaction using behavioral, biochemical experiments, and recordings of Long-Term Potentiation (LTP) and Long-Term Depression (LTD).

Method: One hundred male *Wistar* rats were divided into four groups. S25, S100, and S260 groups were given freshly prepared sulfite of 25 mg/kg, 100 mg/kg, and 260 mg/kg respectively for 35 days via gastric gavage while the control (C) group received equal volumes of distilled water via gavage for the same period. Fifteen rats from all groups were subjected to behavioral experiments. Five rats from each group were used for LTP, while the other five rats were used for LTD recordings. The levels of nitrite/nitrate, nNOS, and iNOS were analyzed on the hippocampi.

Results: Behavioral experiments demonstrated that sulfite exposure caused anxiety-depression-like-behaviors, especially greater than or equal to 100 mg/kg dose. Moreover, it was detected that sulfite exposure caused impaired LTP and facilitated LTD in the hippocampus. When compared to the C group, nitrite/nitrate, nNOS and iNOS levels in S100 and S260 groups were significantly decreased.

Conclusion: Consequently, sulfite toxicity in adults may induce anxiety-depression-like behaviors. These results suggest that the decrease in NO production may be involved in sulfite-induced anxiety-depression-like behaviors.

Keywords: sulfite, depression, hippocampus, nitric oxide

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Sülfıt	3
2.1.1. Gıda Katkı Maddeleri	3
2.1.2. Sülfıt	5
2.2. Hipokampus	11
2.2.1. Hipokampus ve Depresyon	14
2.3. Anksiyete ve Depresyon	15
2.4. Sinaptik Plastisite	17
2.4.1. Uzun Dönemli Güçlenme ve Uzun Dönemli Baskılanmanın Moleküler Mekanizması	18
2.5. Depresyon ve Nitrik Oksit Arasındaki İlişki	20
2.6. Nitrik Oksit	22
2.6.1. Nitrik Oksit Sentaz	23
2.6.2. Nitrik Oksitin Etkileri	24
2.7. Nitrik Oksit ile Sülfıt Arasındaki İlişki	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü	27
3.2. Davranış Deneyleri	28
3.2.1. Açık Alan Testi	28

3.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	28
3.2.3. Zorunlu Yüzme Testi	29
3.2.4. Sükroz Tercih Testi	30
3.3. Elektrofizyolojik Kayıt Alınması	30
3.3.1. Cerrahi Prosedür ve Elektrotların Yerleştirilmesi	31
3.3.2. Uzun Dönemli Güçlenme ve Uzun Dönemli Baskılanma Ölçüm Parametreleri	32
3.3.3. Input-Output Eğrisinin Elde Edilmesi ve Bazal Kayıtlarının Alınması	33
3.3.4. Yüksek Frekanslı Uyarı ve Uzun Dönemli Güçlenme	33
3.3.5. Düşük Frekanslı Uyarı ve Uzun Dönemli Baskılanma	34
3.4. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	35
3.4.1. Plazma-S-Sülfonat Düzeyi Tayini	35
3.4.2. Nitrit/Nitrat Düzeyi Tayini	35
3.4.3. nNOS ve iNOS ekspresyon Düzeylerinin Tayini	36
3.5. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Genel Görünüm	38
4.2. Davranış Deneyleri Bulguları	38
4.2.1. Açık Alan Testi	38
4.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	39
4.2.3. Zorunlu Yüzme Testi	40
4.2.4. Sükroz Tercih Testi	41
4.3. Elektrofizyolojik Bulgular	42
4.3.1. Uzun Dönemli Güçlenme	42
4.3.2. Uzun Dönemli Baskılanma	43
4.4. Biyokimyasal Bulgular	44
4.4.1. Plazma-S-Sülfonat Düzeyi	44
4.4.2. Nitrit/Nitrat Düzeyi	45
4.4.3. nNOS ve iNOS Ekspresyon Düzeyi	45
5. TARTIŞMA	47

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	80



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Bazı gıda katkı maddeleri ve bu maddelerin numerik kodları	4
Tablo 2.2.	Gıda endüstrisi tarafından en sık kullanılan sülfid çeşitleri	6
Tablo 2.3.	Gıda ve içeceklerdeki sülfid miktarı	8
Tablo 4.1.	Açık alan testinde iç kadranda geçirilen süre, dış kadranda geçirilen süre, iç/dış kadranda geçirilen süre oranı ve dışkı sayısı sonuçları	39
Tablo 4.2.	Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süre, açık kolda geçirilen süre indeksi, açık kola giriş sayısı ve kapalı kolda geçirilen süre sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Sodyum metabisülfidin yapısal formülü	6
Şekil 2.2.	Hipokampusun beyin içerisindeki konumu	12
Şekil 2.3.	Hipokampusun yapısı ve bağlantıları	13
Şekil 2.4.	Depresyon ile ilişkili beyin bölgeleri	14
Şekil 2.5.	Depresyonu tetikleyen ve depresyondan etkilenen mekanizmalar	17
Şekil 2.6.	UDG'nin moleküler mekanizmaları	20
Şekil 2.7.	NOS çeşitleri ve bulundukları bölgeler	24
Şekil 2.8.	NOS çeşitleri ve görevleri	26
Şekil 3.1.	Deney protokolünün akış şeması	28
Şekil 3.2.	Yükseltilmiş artı labirent testi düzeneği	29
Şekil 3.3.	Zorunlu yüzme testinden alınmış bir kayıt örneği	30
Şekil 3.4.	Sükroz tercih testinin şematik gösterimi	30
Şekil 3.5.	Elektrot yerleşimi sırasında sıçan ve stereotaksik düzenek (A) ve Elektrotların hipokampus içerisindeki konumlarının şematik gösterimi (B)	31
Şekil 3.6.	UDG ve UDB plastisitesi değerlendirme parametreleri	33
Şekil 3.7.	UDG protokolü	34
Şekil 3.8.	UDB protokolü	34
Şekil 4.1.	Açık alan testinde sıçanlar tarafından takip edilen yol örnekleri	38

Şekil 4.2.	Zorunlu yüzme testinde hareketsiz geçen süre ve latans değerleri	41
Şekil 4.3.	Deney gruplarının sükroz tercih yüzdesi	41
Şekil 4.4.	Tüm grupların zamana bağlı olarak fEPSP eğim değişim yüzdeleri (A) ve fEPSP eğim yüzde değişim ortalama değerleri (B)	42
Şekil 4.5.	Tüm grupların zamana bağlı olarak PS genliği yüzde değişim yüzdeleri (A) ve PS genlik yüzde değişim ortalamaları (B)	42
Şekil 4.6.	Deney gruplarının zamana bağlı olarak fEPSP eğim değişim yüzdeleri (A) ve fEPSP eğim yüzde değişim ortalama değerleri (B)	43
Şekil 4.7.	Deney gruplarının zamana bağlı olarak PS genliği değişim yüzdeleri (A) ve PS genliği yüzde değişim ortalama değerleri (B)	44
Şekil 4.8.	Deney gruplarının plazma-S-Sülfonat düzeyi	45
Şekil 4.9.	Deney gruplarının Nitrit/Nitrat düzeyi	45
Şekil 4.10.	Deney gruplarının hipokampus dokularına ait nNOS ve iNOS ekspresyon düzeyi bantları	46
Şekil 4.11.	Deney gruplarının hipokampus dokularına ait nNOS ekspresyon düzeyleri (A) ve hipokampus dokularına ait iNOS ekspresyon düzeyleri (B)	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADI	: Günlük kabul edilebilir alım
ALP	: Alkalın fosfataz
AMPA	: 2-amino-3-hidroksi-5-metil-okzalo-propiyonik asit
BH4	: Tetrahidrobiopterin
BMDL	: Referans doz sınırı
Ca⁺²	: Kalsiyum
CA	: Cornu ammonis
CAM	: Kalmodulin
CaMKII	: Kalsiyum/kalmodulin kinaz II
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
CREB	: cAMP-duyarlı eleman bağlama proteini
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cNOS	: Konstitütif NOS
DFU	: Düşük frekanslı uyarı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
eNOS	: Endotelyal NOS
EPSP	: Eksitatör postsinaptik potansiyel
FAO	: Gıda ve tarım örgütü
HPA	: Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen
IP₃	: İnositol 1,4,5 trifosfat
iNOS	: İndüklenebilir NOS
JECFA	: Gıda katkı maddeleri uzman komitesi

MDB	: Major depresif bozukluk
MOE	: Maruziyet etki sınırı
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na⁺	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-metil-d-aspartat
nNOS	: Nöronal NOS
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
NOAEL	: Yan etki görülmeyen düzey
NOS	: Nitrik oksit sentaz
¹O₂	: Moleküler oksijen
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PIP₂	: Fosfatidilinositol bisfosfat
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PS	: Popülasyon spike
SO₂	: Sülfür dioksit
SOX	: Sülfat oksidaz
UDB	: Uzun dönemli baskılanma
UDG	: Uzun dönemli güçlenme
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya sağlık örgütü
YFU	: Yüksek frekanslı uyarı

1. GİRİŞ

Moleküler yapılarında bulunan sülfid iyonu ile karakterize edilen sülfid ajanları, gıdaların raf ömürlerinin uzamasında rol alan sülfür dioksit (SO_2) salınımına neden olan inorganik sülfid formları olarak tanımlanmaktadır (Taylor ve ark., 1986; Vasile, 2010; Garcia-Fuentes ve ark., 2015). Günümüzde, sülfid ajanlarını içeren kolay hazırlanabilir gıdaların tercih edilmesi nedeniyle sülfid maruziyeti her geçen gün artmaktadır. (Abdelghany, 2015; Van Loco ve ark., 2015). Sülfid, ekzojen olarak dışarıdan alınabilirken insan vücudunda sistein ve metiyonin gibi sülfür içeren amino asitlerden endojen olarak da sentezlenebilmektedir (Nair ve Elmore, 2003). Ekzojen sülfid kaynakları arasında, ilaçlar, kozmetik ürünler ve solunum yoluyla alınan SO_2 gazı bulursa da en önemli ekzojen sülfid kaynağı tüketilen gıdalardır (Vally ve Misso, 2012). Sülfid, mitokondrinin membranlar arası boşluğunda lokalize olan sülfid oksidaz enzimi (SOX) tarafından çoğunlukla da karaciğerde sülfata oksitlenerek detoksifiye edilmekte ve sülfid metabolizmasının göstergesi olan sülfat ise idrar yoluyla hızlı bir şekilde vücuttan atılmaktadır (Johnson ve ark., 1980; Nair ve Elmore, 2003). Böylelikle, sülfidin düşük ve kararlı konsantrasyonda tutulması sağlanmakta ve toksisitesi önlenmektedir (Gunnison ve ark., 1987). Yüksek miktarda sülfid tüketildiğinde veya SOX enziminin yetersizliğinde sülfid toksisitesi ve buna bağlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, Avrupa Birliği Gıda Güvenliği İdaresi, Öztürk ve arkadaşları (Öztürk ve ark., 2011) tarafından yapılan çalışmayı maruziyet etki sınırının (Margin of Exposure = MOE) belirlenmesi için referans olarak, insanların günlük sülfid tüketimi için 38 mg SO_2 eşdeğeri/kg değerini referans doz sınırı (Limit of Benchmark Dose = BMDL) olarak belirlemiş ve bu değere 80 katlık bir güvenlik faktörü uygulamıştır (Younes ve ark., 2022). Bununla birlikte, toplumların sülfid maruziyetlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar, insanların günlük olarak tükettikleri sülfid miktarının bu referans doz sınırından yüksek olabileceğine işaret etmektedir (Younes ve ark., 2022). Sülfid toksisitesinin insanlar üzerindeki etkileri, en detaylı şekilde merkezi sinir sisteminde (MSS) araştırılmıştır (Younes ve ark., 2022). Sülfid toksisitesinin, MSS’de oksidatif stres ve apoptozis aracılığıyla nörotoksositeye yol açtığı, beyindeki hücrel enerji transferini bozduğu belirlenmiştir (Grings ve ark., 2013; Kencebay ve ark., 2013). Sülfidin MSS üzerindeki etkileri arasında anksiyete ve depresyon yer almaktadır (Noorafshan ve ark.,

2017). Bununla birlikte, hipokampus insan beyinde sinaptik plastisite mekanizmalarının en etkili olduğu bölgelerden biridir. Stres durumunda, sinaptik plastisitede değişim olduğu ve bu durumun depresyona katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Pittenger ve Duman, 2008). Uzun Dönemli Güçlenme (UDG, Long Term Potentiation = LTP) ve Uzun Dönemli Baskılanma'nın (UDB, Long Term Depression = LTD) stres durumunda değişebildiği, stresin Cornu Ammonis 1 (CA1) bölgesinde UDB oluşumunu tetiklediği, UDG'yi bozduğu görülmüştür (Foy ve ark., 1987; Xu ve ark., 1997; Richter-Levin ve Xu, 2018). Ayrıca, hipokampusun dopaminerjik yolağa etkileri, hipotalamus-hipofiz-adrenal (hypothalamus-pituitary-adrenal=HPA) eksen ve nöroenez üzerindeki etkileri de depresyon ile olan ilişkisini ortaya koymaktadır (Nestler ve ark., 2002; Lisman ve Grace, 2005; Dranovsky ve Hen, 2006; McEwen, 2007; Richter-Levin ve Xu, 2018). Öte yandan, sülfid maruziyetine bağlı olarak MSS'de görülen toksik etkilerin kaynağı, nitrik oksit (NO) ile sülfid arasındaki etkileşim olabilir. Çünkü, sülfidin insan vücudunda bronkokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu gibi NO tarafından düzenlenen mekanizmalar üzerinde etkileri gösterilmiştir (Harvey ve Nelsestuen, 1995). Sülfid toksisitesinde NO'nun hücre sel sinyal iletim yollarındaki etkinliği rol oynayabilir (Harvey ve Nelsestuen, 1995). NO'nun MSS'de depresyon ve duygu-durum bozuklukları fizyopatolojisinde etkili olduğu bilinmektedir (Dhir ve Kulkarni, 2011).

NO, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi tarafından L-arginin'in oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında L-sitrüline oksidasyonu sonucu üretilmektedir. Nöronal NOS (nNOS) NOS izomeri olup sinir hücrelerinde bol bulunur ve hücre sel iletişimde rol oynar (Ramesh ve ark., 2014). Diğer NOS izomerlerinden endotelial NOS (eNOS), endotelde; indüklenebilir NOS (iNOS) ise vasküler düz kas hücreleri, makrofajlar, vasküler endotel hücreleri vb. hücrelerde bulunmaktadır. iNOS'un MSS önemli görevler üstlendiği bilinmektedir (Ramesh ve ark., 2014). Bu bağlamda, çalışmamızda sülfid ile depresyon arasındaki ilişkinin varlığı ve olası ilişkide NO'nun rolü, davranış ve biyokimyasal deneyler, UDG ve UDB kayıtları, hipokampusta bulunan nitrit/nitrat, iNOS ve nNOS ekspresyon düzeyleri belirlenerek araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri ve Sülfite

2.1.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, temel olarak, gıdanın işlenmesi sürecinde renk kaybının önlenmesi (renklendirici), düşük şekerli ürünlerde tatlılığın sağlanması (tatlandırıcı), saklama ve depolama aşamasında bozulmaların önlenmesi (koruyucu) vb. amaçlarla gıdalara katılan doğal veya yapay maddelerdir (Street, 2010). Yapay olarak üretilen sentetik maddeler, gıda katkı maddelerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bira ve şarap gibi ürünler, kendiliğinden gelişen fermantasyon süreci sonrası, doğal olarak da gıda katkı maddeleri içerebilirler (Vasile, 2010). Avrupa Parlamentosu ve Konseyi, gıda katkı maddelerini, besleyici değeri olsun veya olmasın kendi başına normalde gıda olarak tüketilmeyen veya gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan, esas kullanım amacı gıdaların işlenmesi, paketlenmesi, taşınması veya saklanması olan herhangi bir madde olarak tanımlamaktadır (Avrupa Konseyi Yönetmeliği, Sayı - 1333/2008, Madde 3) (PEU, 2008). Gıda katkı maddeleri, yakın zamanda endüstri ve teknolojinin gelişmesiyle ortaya çıkmış ürünler değildir. Antik çağlarda insanlar, yalnızca ekili alanlarda besin yetiştirerek veya avlanarak değil, yetiştirdikleri ve topladıkları bu gıdaları komplike yöntemler ile işleyip lezzetli, tüketilebilir ve bozulmadan daha uzun süre kullanılabilir hale getirerek açlığın üstesinden gelmişlerdir. (Abdelghany, 2015). Öyle ki, insanlar 5000 yıl önce, sebze turşusu için sirke, et ve balığın korunması için tuzlama ve tütsüleme, gıdaların görünümünü iyileştirmek için bitkisel renklendirme kullanmışlardır (Tomaska ve Brooke-Taylor, 2014). Bozulabilir, tatsız ve zorlukla tüketilebilen ham besinler karmaşık bir işleme süreci sonrası lezzetli, besin değeri yüksek ve uzun ömürlü besinlere dönüştürülmüştür (Floros, 2004). Ayrıca, günümüzde antimikrobiyal etkisi gösterilmiş olan baharatlar, eski zamanlarda hem besini daha lezzetli hale getirmek hem de daha uzun süreli tüketim imkanı sağlamak için kullanılmışlardır (Škrinjar ve Nemet, 2009).

Günlük hayat akışının daha yoğun olduğu ve nüfus artışı nedeniyle gıdaya erişimin zorlaştığı günümüzde, kolay hazırlanabilir, enerji düzeyi yüksek, lezzetli ve ekonomik

gıdaların tercih edilmesiyle birlikte, endüstriyel gıdalar insanların normal diyetlerinin %75'ini kapsamaya başlamış ve yıllık ortalama gıda katkı maddesi tüketimi 3.6-4.5 kg düzeyine ulaşmıştır (Van Loco ve ark., 2015). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi verilerine göre, Amerika'da 3000'in üzerinde gıda katkı maddesinin kullanımına izin verilmiştir (Abdelghany, 2015). Gıda katkı maddeleri; renklendiriciler, koruyucular, antioksidanlar, yoğunlaştırıcılar-stabilizatörler-emülgatörler, asidik düzenleyiciler-topaklanmayı önleyici maddeler ve tatlandırıcılar olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır (Abdelghany, 2015). Avrupa Birliği tarafından kullanımı onaylanmış gıda katkı maddeleri, E ile başlayan numaralar ile ayrı ayrı kodlanmaktadır (Tablo 2.1.) (Abdelghany, 2015).

Tablo 2.1. Bazı gıda katkı maddeleri ve bu maddelerin numerik kodları (Abdelghany, 2015).

Renklendiriciler	E100-E199
Koruyucular	E200-E299
Antioksidanlar	E300-E399
Yoğunlaştırıcılar, stabilizatörler, emülgatörler	E400-E499
Asitlik düzenleyiciler, topaklanmayı önleyici maddeler	E500-E599
Tatlandırıcılar	E600-E699

Tüketimi onaylı olanlar dahil olmak üzere, belirli bir miktardan fazla gıda katkı maddesi kullanıldığında toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, gıda katkı maddeleri kullanımında, insan güvenliği standardının belirlenmesi amacıyla en duyarlı hayvan türlerinde herhangi bir yan etkinin görülmediği en yüksek doz (mg/kg/gün), diğer bir deyişle yan etki görülmeyen düzey (No Observed Adverse Effect Level = NOAEL) belirlenmektedir (Carocho ve ark., 2014). Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization = FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization = WHO) Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint Expert Committee on Food Additive = JECFA) tarafından 1961 yılında günlük kabul edilebilir alım (Acceptable Daily Intake = ADI) düzeyi şeklinde yeni bir tanımlama yapılmıştır (Carocho ve ark., 2014). Her bir gıda katkı maddesi için ayrı olarak belirlenen ADI değerleri, insanların sağlık açısından bir risk oluşturmadan hayatları boyunca günlük olarak tüketebileceği miktardır. ADI, deney

hayvanlarında belirlenmiş olan değerler insanlara uyarlanarak ve insanlar arasındaki bireysel farklılıklar göz önünde bulundurularak NOAEL değerlerine yaklaşık olarak 100 katlık bir güvenlik faktörü uygulanmasıyla hesaplanmakta ve mg/kg/gün olarak verilmektedir (Lu, 1988; Nair ve Elmore, 2003). Uygun olmayan miktarda gıda katkı maddesi tüketiminin, kısa vadede baş ağrısı, mental konsantrasyon düşüşü, enerji seviyesinde azalma, davranış ve bağışıklık sisteminde değişime yol açabileceği görülmüştür (El-Samragy, 2012). Uzun vadede ise kanser, kardiyovasküler hastalıklar, solunum problemleri, dikkat eksikliği vb. rahatsızlıklara yol açtığı tespit edilmiştir (El-Samragy, 2012).

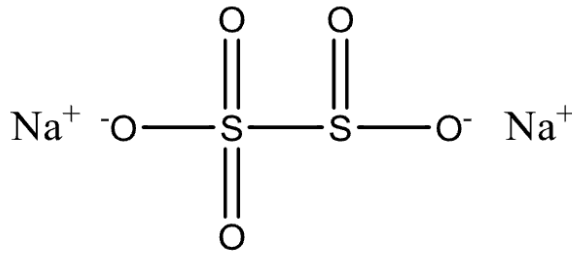
2.1.2. Sülfıt

Günümüzde şarap, bira, meyve suları, kuru meyveler, kuru sebzeler, reçeller, şekerler, deniz ürünleri, et vb. ürünlerde sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinden biri sülfıt ajanlarıdır (Vally ve ark., 2009). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sülfıt bileşikleri, sülfür dioksit, sodyum sülfıt, sodyum hidrojen sülfıt, sodyum metabisülfıt, potasyum metabisülfıt, kalsiyum sülfıt, kalsiyum hidrojen sülfıt ve potasyum hidrojen sülfıttır (Garcia-Fuentes ve ark., 2015). Sülfıt bileşikleri, oksijen tutma, indirgeme ve enzim inhibisyonu gibi etkilerinin yanı sıra farmakolojik ve kozmetik ürünlerde aktif bileşeni stabilize etme, gıdaların renklerinin canlı kalmasını sağlama ve antimikrobiyal etkiler de göstermektedirler. (Fazio ve Warner, 1990; Quattrucci ve Masci, 1992; Garcia-Fuentes ve ark., 2015). Sülfıt ajanları, Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin gıda katkı maddelerine ilişkin 1333/2008 sayılı yönetmeliğin ek ikinci maddesine göre gıda katkı maddeleri olarak kabul edilmektedir. En sık kullanılan sülfıt bileşikleri ve E-numarası Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Gıda endüstrisi tarafından en sık kullanılan sülfıt çeşitleri.

Sülfıt bileşiminin adı	E-sayısı	Kimyasal Formül
Sülfür dioksit	E-220	SO ₂
Sodyum sülfıt	E-221	Na ₂ SO ₃
Sodyum hidrojen sülfıt (Sodyum bisülfıt)	E-222	NaHSO ₃
Sodyum metabisülfıt	E-223	Na ₂ S ₂ O ₅
Potasyum metabisülfıt	E-224	K ₂ O ₅ S ₂
Kalsiyum sülfıt	E-226	CaSO ₃
Kalsiyum hidrojen sülfıt	E-227	Ca(HSO ₃) ₂
Potasyum hidrojen sülfıt	E-228	KHSO ₃

Sülfitin gıdalar üzerindeki koruyuculuk düzeyi, gıdalardaki serbest sülfıt konsantrasyonu ile ilişkilidir (Vally ve ark., 2009). Gıda ve içeceklerdeki serbest sülfıt seviyeleri genel olarak “SO₂ eşdeğerleri” veya “teorik verimler” kavramları ile tanımlanmaktadır (Vally ve ark., 2009). Sülfıt, su içerisinde çözünmüş halde veya tuz halinde katı iken hava ile temas ettiğinde ortama SO₂ gazı salmaktadır (Fan ve Book, 1987). Gıda endüstrisinde en sık kullanılan sülfıt bileşiklerinden biri, sodyum metabisülfittir. Sodyum metabisülfıt, 190.11 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir, yapısal formülü Şekil 2.1.’de görülmektedir (Aguilar ve ark., 2016).



Şekil 2.1. Sodyum metabisülfitin yapısal formülü (Aguilar ve ark., 2016).

Sülfıt Maruzıyeti

Vücudumuzda sülfıt endojen olarak üreılmekte veya ekzojen yolla sülfıte maruz kalmaktayız. İnsan vücudunda metionin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin katabolizmasıyla endojen olarak sülfıt oluşmaktadır. Vücut içerisinde, 8-sülfınil pirüvik asit enzimatik olmayan yollarla, sisteini düzenli olarak SO₂ ve pirüvik asite ayrıştırmakta ve bu reaksiyon sonucu düşük miktarda sülfıt üreılmektedir (Aguilar ve ark., 2016). Sistein dioksijenaz enzimi, sitoplazma içerisinde sisteini, sistein sülfınata çevirmekte ve üretilen sistein sülfınatın bir kısmı, sitoplazmada kalırken bir kısmı mitokondriye taşınmaktadır (Schwarz, 2016). Sitoplazmada kalan sistein sülfınat, sitoplazmik aspartat aminotransferaz enzimi ile reaksiyona girer ve sülfıt oluşumu gerçekleşir (Schwarz, 2016). Mitokondriye taşınan sistein sülfınat, mitokondrial aspartat aminotransferaz enzimi ile reaksiyona girer, β-sülfınilpiruvat oluşur ve β-sülfınilpiruvat zamanla sülfıt açığa çıkmasına neden olur (Schwarz, 2016). Bununla birlikte, insanlarda nötrofiller, bakteriyel endotoksinin ana bileşeni olan lipopolisakkarite yanıt olarak önemli miktarlarda sülfıt (1.0 nmol/saat/107 hücre) üreirler (Mitsuhashi ve ark., 1998). Ancak, endojen olarak üretilen sülfıt miktarının ekzojen olarak alınan sülfıte kıyasla oldukça düşük miktarda olduğu rapor edilmektedir (Aguilar ve ark., 2016). İlaç kullanımı, kozmetik ürünlerin kullanımı ve solunum yoluyla vücuda alınan SO₂ gazı ekzojen sülfıt kaynakları arasında yer almaktadır (Vally ve Misso, 2012). Ancak, ekzojen sülfıtın ana kaynağı tüketilen gıdaların içerdiği sülfıttir. Avrupa Birliği Gıda Güvenlik İdaresi, bazı gıdaları ve bu gıdalarda bulunan sülfıt miktarını içeren bir rapor yayınlamıştır (Aguilar ve ark., 2016). Bu raporda bazı gıda ve içeceklerde bulunan sülfıt miktarı belirtilmiştir (Aguilar ve ark., 2016) (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Gıda ve içeceklerdeki sülfite miktarı (Aguilar ve ark., 2016).

Ürün	Sülfite miktarı
Kuru kayısı	2000 mg/kg
Kuru domates	200 mg/kg
Tarçın	150 mg/kg
İşlenmiş patates dilimleri	100 mg/kg
Reçel	100 mg/kg
Bisküvi	50 mg/kg
Nişasta	50 mg/kg
Şarap	260 mg/L
Sirke	170 mg/L
Bira	20 mg/L

Sülfidler, proteinlerin özellikle de sistein amino asidinin disülfide bağlarıyla reaksiyona girmekte ve tiyol, S-sulfonat (R-SSO₃), serbest sistin oluşturmaktadır (Güneş, 2014). Sülfidler gıdalarda bulunan tiaminleri etkisiz hale getirmekte, askorbid asit, B12 vitamini, K vitamini, A vitamini, organik bileşikler, şekerler ve karbonil ara ürünleriyle reaksiyona girmektedirler (Güneş, 2014). Söz konusu reaksiyonların dinamikleri, ortam sıcaklığına, pH'a, gıdanın yapısına ve sülfite konsantrasyonuna bağlı olarak şekillenmektedir (Wedzicha, 1992). Sülfite toksisitesinin oksidatif strese neden olduğu ve sülfidin deoksiribonükleik asit (DNA) bileşenleriyle de reaksiyona girdiği rapor edilmiştir (Gunnison, 1981; Kencebay ve ark., 2013).

Sülfite Metabolizması

Sülfite içeren gıdalar, oldukça asidik bir ortam olan mideye ulaştığında, SO₂ salınımına sebep olmaktadır. Açığa çıkan SO₂ gazı, gastrointestinal kanaldan sistemik dolaşıma geçerek organ ve dokulara dağılmaktadır (Simon, 1989). Endojen olarak üretilen veya ekzojen yolla alınan sülfite, mitokondri membranı içerisinde bulunan SOX enzimi tarafından in vivo olarak sülfata oksitlenmektedir (Johnson ve ark., 1980). SOX, başta

karaciğer, kalp ve böbrek olmak üzere bazı organlarda bol miktarda; dalak, beyin, iskelet kası ve kanda ise düşük miktarlarda bulunmaktadır (Cohen ve Fridovich, 1971; Gunnison ve ark., 1981). Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 115-120 kDa arasında olan SOX, molibdenyum içeren C-terminali ve hem grubu bulunan N-terminalinden oluşan homodimer yapıdır (Morikawa ve ark., 1997). Sülfite, SOX'un C-terminalinde bulunan molibdenyum kofaktörüne bağlanmakta ve iki elektron alarak sülfata dönüşmektedir (Bailey ve ark., 2009; Wyse ve ark., 2019). Sağlıklı sülfite metabolizmasının göstergesi olan sülfat, idrar yoluyla hızlı bir şekilde vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Gunnison ve ark., 1987). Mitokondride sülfite sülfata oksidasyonu sırasında, üretilen elektronlar sitokrom-c tarafından elektron taşıma zincirine aktarılmakta ve oksidatif fosforilasyon ile ATP oluşumuna aracılık etmektedir (Pundir ve Rawal, 2013). Tüm memeli türlerinde SOX enzimi bulunmaktadır ancak, sıçanların SOX aktivitesi insanlarda görülen SOX aktivitesinin yaklaşık olarak 10-20 katı daha yüksektir (Johnson ve Rajagopalan, 1976). İnsanların SOX aktivitesi, genel olarak diğer memelilere kıyasla düşük olmakla birlikte, insanlar arasında da bazı bireylerde de normal aralığın çok altında SOX aktivitesi görülmektedir (Quattrucci ve Masci, 1992). SOX tarafından sülfite hızlıca metabolize edilmekte, bu nedenle kronik maruziyette sülfite dokularda birikmemektedir (Garcia-Fuentes ve ark., 2015). Sülfite maruz bırakılan bazı türlerde, uygulanan dozun %10'unundan azının idrarda sülfite olarak görüldüğü belirlenmiştir (Gunnison ve Palmes, 1978). Emilen sülfite bir kısmı tiyosülfata dönüşmekte olup, vücut sıvılarında yüksek miktarda tiyosülfat görülmesi SOX enziminin eksikliğine işaret etmektedir (Garcia-Fuentes ve ark., 2015). Mutasyon sonucu SOX enziminde işlevsel bozukluk ortaya çıkması durumunda, hücrelerde biriken sülfite, proteinleri etkilemekte, oksidatif strese ve DNA hasarlanmasına yol açabilmektedir (Harraan, 1955).

Sülfite Toksisitesi

Sülfite zararlı olduğu, ilk olarak bir restoranda tüketilen salatada bulunan sodyum metabisülfite kaynaklı bir anafilaksi vakası ile ortaya çıkmıştır (Prenner ve Stevens., 1976). Serbest sülfitlerin akut toksik dozu 1000-2000 mg/kg iken bağlı sülfitlerin akut toksik dozu 5000 mg/kg'nin üzerindedir (Til ve Feron, 1992). Sülfite alımı sonucu ürtiker, karın ağrısı, ishal ve astımın ortaya çıktığı, bu sistemik rahatsızlıkların ise sülfite ile DNA, vitaminler ve proteinler arasındaki etkileşimler nedeniyle meydana geldiği belirlenmiştir

(Gunnison ve ark., 1981; Meng ve ark., 2003). Sülfitin kalp, mide, akciğer, beyin, böbrek, dalak üzerinde olumsuz etkileri rapor edilmiştir (Bailey ve ark., 2009; Basaranlar ve ark., 2019; Danışman ve ark., 2022; Derin ve ark., 2015; Ercan ve ark., 2013). Sülfite toksisitesi üzerine yapılmış en önemli çalışmalardan biri Til ve arkadaşları (Til ve ark., 1972a) tarafından 1972 yılında iki seri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın kronik sülfite maruziyetinin araştırıldığı ilk kısmında, sütten yeni kesilmiş Wistar sıçanlar, hem erkek hem de dişiler için her grupta 20 sıçan olacak şekilde altı gruba ayrılmışlardır (Til ve ark., 1972a). Her bir grup; iki yıl süreyle ve üç jenerasyon boyunca 0.0 (Kontrol), 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 veya 2,0 (%) oranında sodyum metabisülfite içeren diyetlerle beslenmiştir (Til ve ark., 1972a). Diyeti %2 sülfite içeren grupta bulunan sıçanların büyümelerinde gecikme görülmüştür (Til ve ark., 1972a). Sülfite oranı %1 ve üzeri olan gruplardaki sıçanların dışkılarında kan görülmüş ve midelerinde hiperplastik değişimler saptanmıştır (Til ve ark., 1972a). Bununla birlikte, sülfite maruziyetinin daha yüksek tutulduğu (0–%8) ve her grupta 10’ar sıçanın olduğu kısa süreli çalışmalarda ise, %6 oranında sülfite maruziyetinin sıçanın gelişiminde önemli ölçüde gerilemeye ve gıda alımında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Til ve ark., 1972a). Yüzde 2 ve üzeri sülfite maruziyetinde anemi, %4 ve üzerinde ise dalak hacminde artış görülmüştür (Til ve ark., 1972a). Gruplar arasından %0,25 sülfite içeren diyet ile beslenen grupta herhangi bir yan etki görülmediği, bu oranın 72 mg SO₂/kg’a (vücut ağırlığı) tekabül ettiği rapor edilmiştir (Til ve ark., 1972a). Aynı çalışma ekibi, bu kez her grupta 20 adet domuzun olduğu 6 grup oluşturmuş ve bu grupları 0,0 (Kontrol), 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 veya 2,0 oranında (%) sodyum metabisülfite içeren diyetlerle beslemişlerdir. Sülfite verilmeye başlandıktan on beş hafta sonra, kısa süreli maruziyet değerlendirmesi yapılması için her gruptan 14 domuz alınmış, kalan 6 domuz 48 hafta boyunca aynı diyet ile beslenmeye devam edilmiştir (Til ve ark., 1972b). Bu çalışmada da herhangi bir etkinin görülmediği sülfite düzeyi belirlenmiş ve elde edilen sonuç sıçanlar üzerinde yapılan bir önceki çalışmanın bulgularıyla paralel çıkmıştır (Til ve ark., 1972b). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular FAO/WHO JECFA tarafından dikkate alınmış, yapılan ortak bir değerlendirme sonucunda 72 mg/kg maruziyet değerine 100 katlık bir güvenlik faktörü eklenmiş ve günlük sülfite alımı için ADI değeri 0,7 mg/kg olarak belirlenmiştir (JECFA, 2000). Bunu takiben, 2022 yılında yayınlanan bir raporda Öztürk ve ark. (Öztürk ve ark., 2011) tarafından sülfitin nörotoksik etkilerinin

belirlenmesine yönelik bir çalışmada elde edilen bulgular referans çalışma olarak kabul edilmiş ve günlük sülfite alımı için 38 mg SO₂ eşdeğeri/kg (vücut ağırlığı) MOE belirlenmiştir (Younes ve ark., 2022). Ayrıca, bu değere 80 katlık bir güvenlik faktörü uygulanmıştır (Younes ve ark., 2022).

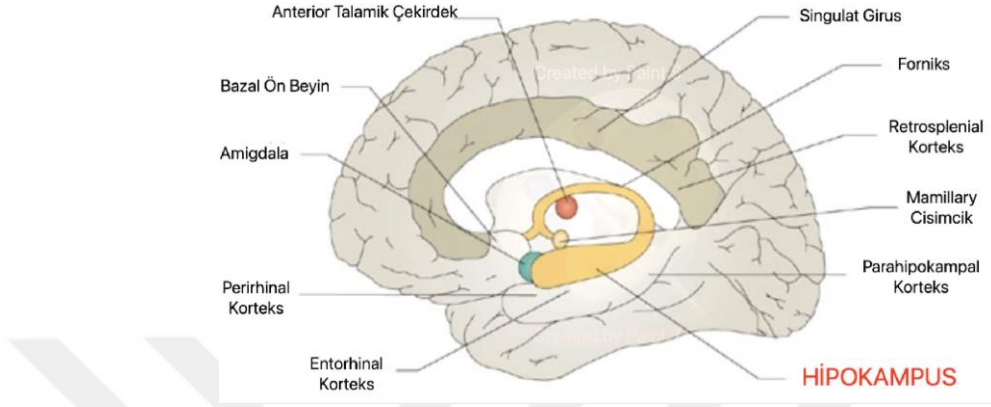
Sülfite Nörotoksik Etkisi

Sülfite toksisitesinin MSS üzerinde bir takım etkilerinin olduğu bilinmektedir (Derin ve ark., 2006; Derin ve ark., 2015; Basaranlar ve ark., 2019). Sülfite oksidatif stres ve apoptozise neden olarak nörotoksositeye yol açmaktadır (Kencebay ve ark., 2013). Biyolojik sistemlerde Fe³⁺ sitokrom c'nin peroksidaz aktivitesinin, sülfite, sülfite radikaline oksitleyerek sülfite toksisitesine neden olduğu gösterilmiştir (Velayutham ve ark., 2016). SOX enziminin veya kofaktörü olan mobildenyumun eksikliği ile doğan bireylerde sülfite radikalinde artış ve bununla ilişkili bazı rahatsızlıkların olduğu rapor edilmiştir (Velayutham ve ark., 2016). Ayrıca, sülfite, kreatin kinaz aktivitesini düşürdüğü, kreatin kinazın mitokondriyal ve sitozolik izoformlarını azalttığı, böylelikle beyindeki hücresel enerji tamponlama ve transferini bozarak nörolojik semptomlara neden olduğu saptanmıştır (Grings ve ark., 2013). Dahası, sülfite toksisitesi, hipokampusta glutatyon peroksidaz enziminde azalmaya, enerji metabolizması ve redoks durumunda hasarlanmaya, böylelikle nörotoksosite ve apoptozise yol açmaktadır (de Moura-Alvorcem ve ark., 2017; Kencebay ve ark., 2013). Bu bağlamda, sülfite toksisitesinin hipokampus fonksiyonlarını etkilediği görülmektedir.

2.2. Hipokampus

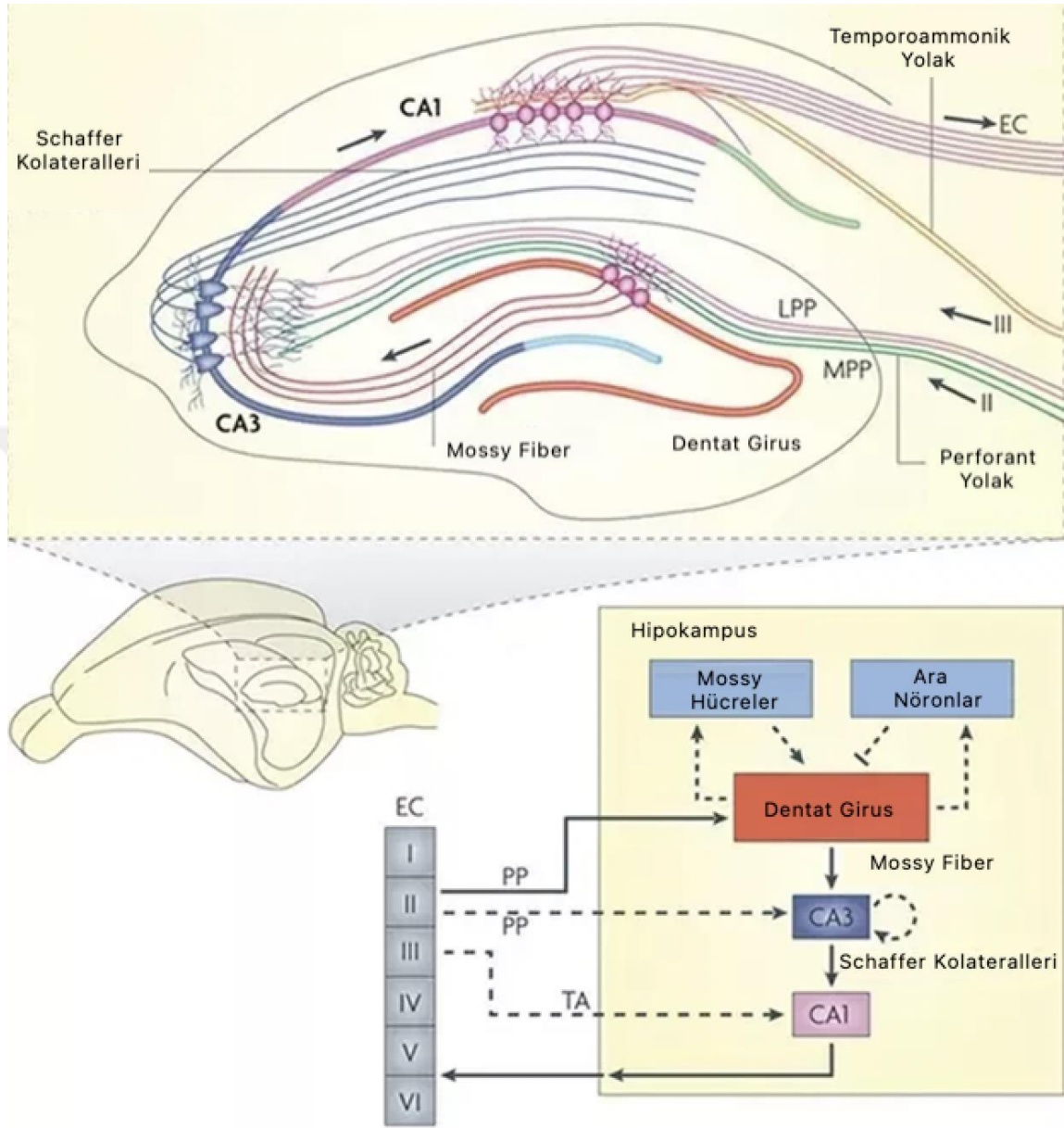
Hipokampus, entorhinal, parahipokampal ve perirhinal korteks ile çevrili medial temporal loblarda yer alır (Bird ve Burgess, 2008) (Şekil 2.2.). Cornu ammonis, dentat girus, subikulum ve entorhinal alan olmak üzere alt yapılardan oluşur (Anand ve Dhikav, 2012). Cornu ammonis ise CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört farklı bölgeye ayrılır (Anand ve Dhikav, 2012). Hipokampus, S şeklinde kıvrılan yoğun şekilde paketlenmiş nöronlardan oluşan katman şeklinde bir yapıya sahip olduğu için kolayca ayırt edilebilir (Anand ve Dhikav, 2012). Hipokampus, anterior talamik çekirdek, mamillary cisimcik, bazal ön beyin septal çekirdekleri, retrosplenial korteks ve parahipokampal korteks gibi

birkaç subkortikal ve kortikal yapıyla bağlantılı olup, limbik sistemin bir parçasıdır (Bird ve Burgess, 2008) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Hipokampusun beyin içerisindeki konumu (Bird ve Burgess., 2008).

Hipokampusun neokortikal girdilerinin büyük bir bölümü, entorhinal korteks aracılığıyla perirhinal ve parahipokampal kortekslerden gelir (Şekil 2.3.). Çıktılarının çoğu ise entorhinal kortekse tekrar projekte olan subikulum aracılığıyla oluşur. Bununla birlikte, 'hatırlamanın' hipokampus ve onun anterior talamik nükleus ile olan bağlantılarına bağlı olduğunu, 'aşinalığın' ise perirhinal korteks ve medial dorsal talamik çekirdekler arasındaki doğrudan bağlantılarla kontrol edildiği bilinmektedir (Aggleton ve Brown., 1999). Hipokampusta perforant yolak, yosunsu lifler (mossy fiberleri) ve schaffer kollateralleri olmak üzere üç adet yolak bulunmaktadır. Perforant yolak, entorhinal korteksten dentat girusa; yosunsu lifler dentat girusun granüler hücre tabakasından CA3'e; schaffer kollateralleri ise CA3'ten CA1'e projekte olmaktadır.



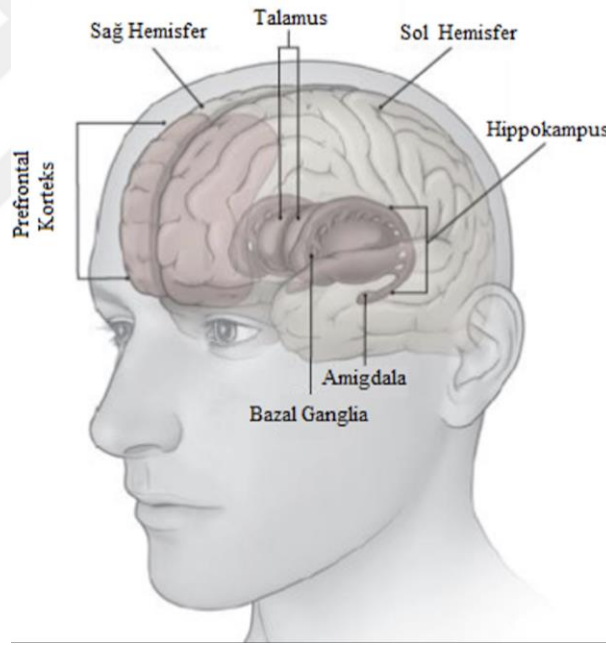
Şekil 2.3. Hipokampusun alt bölgeleri ve bağlantıları. Entorinal korteks (entorhinal cortex = EC), lateral perforant yolak (lateral perforant pathway = LPP), medial perforant yolak (medial perforant pathway = MPP) (Zentner, 2020).

Bir hastada medial temporal lob rezeksiyonunu takiben derin amnezinin ortaya çıktığı günden beri, hipokampusun öğrenme ve hafızada rol oynadığı düşünülmekte ve bu ilişki üzerine birçok araştırma yapılmaktadır (Scoville ve Milner, 1957). Hipokampal formasyon ve bağlantılı olduğu temporal lob yapılarının, açık, episodik ve uzaysal bellek için oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Xiong ve ark., 2017). Öğrenme ve hafızadaki

rolünün yanı sıra, hipokampusun ventral striatal yapının bir parçası olduğu ve motor davranışı da etkileyebileceği bildirilmiştir (Molnár, 2011). Hipokampus ile hipotalamus arasında projeksiyonlar bulunduğundan, hipokampus adrenokortikotropik hormonların salınımını etkileyebilir (Anand ve Dhikav, 2012). Bunlara ek olarak, hipokampus ve depresyon fizyopatolojisi arasında da ilişki olduğu bilinmektedir (Sapolsky, 2001).

2.2.1. Hipokampus ve Depresyon

Hipokampus limbik sistemin bir parçasıdır ve depresyon patolojisinde rol aldığı birçok literatür çalışması ile ortaya koyulmuştur (Sapolsky, 2001; Campbell ve MacQueen, 2004; Roddy ve ark., 2019). Şekil 2.4.'te depresyon ile ilgili beyin bölgeleri gösterilmektedir (HHP, 2009).



Şekil 2.4. Depresyon ile ilişkili beyin bölgeleri (HHP, 2009).

Bir köpeğin havlamasını işittiğimizde, amigdalanın etkisiyle korku hissi duyarız. Bu korku hissinin nedeni amigdala ile hipokampus arasındaki bağlantılar nedeniyle geçmişte yaşadığımız tehlikeli olayların hatırlanmasıdır (HHP, 2009). Psikososyal stres durumunda, hipokampal fonksiyonlarda değişim görülmektedir (Fan ve ark., 2015). Hipokampus, erişkin dönemde beyinde nöroenezin görüldüğü nadir bölgelerden biri olup (Bonfanti ve Peretto, 2011), hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, major depresif

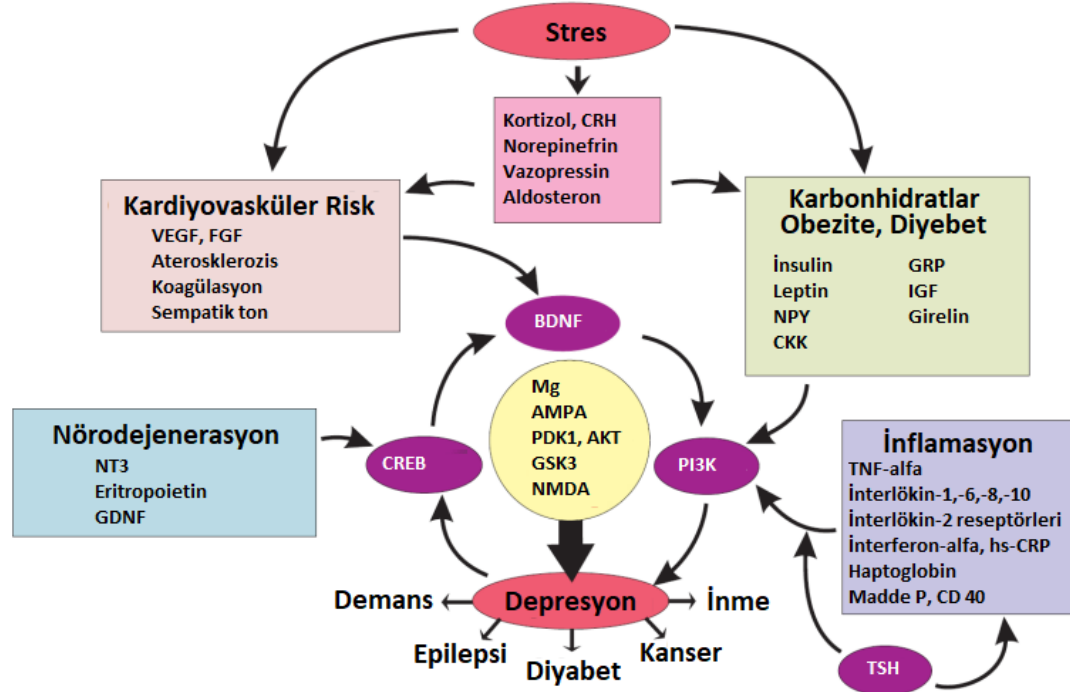
bozukluk (MDB) görülen bireylerde, glukokortikoid düzeylerinde artış olduğu, bu artışın nörojenezi baskıladığı ve toksik hasara neden olduğu belirtilmiştir (Campbell ve MacQueen, 2004). Antidepresan tedavisiyle, hipokampusta nöroenez ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör düzeyinde artış olduğu görülmüştür (Campbell ve MacQueen, 2004). Dahası, tedavi edildikten sonra bile, MDB hastalarının geçmiş olayları hatırlama kabiliyetlerinde eksiklikler görüldüğü rapor edilmiştir (Campbell ve MacQueen, 2004). Depresyon tanısı konulan hastaların, hipokampus hacimlerinde azalma, tedavi sonrasında ise artış görülmüştür (Schweitzer ve ark., 2001). Bununla birlikte, hipokampusu küçük olan bireylerde depresyonun tekrar nüksetme ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Kronmüller ve ark., 2008).

2.3. Anksiyete ve Depresyon

Anksiyete, olası zararlı etkilerin temelinde gelişen tehlike algısı, fizyolojik alarm ve aktivasyon mekanizmalarını içeren, tehdit ve tehlikelere verilen tepkisel bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Moss, 2002). Günümüzde oldukça yaygın görülen bu rahatsızlık, endişe, sosyalleşme ve iletişim korkusu, beklenmedik ve/veya tetiklenen panik ataklar, beklenti kaygısı vb. davranışları içeren semptomlarla karakterizedir (Thibaut, 2022). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmada anksiyete görülme sıklığının %18, yıllık tedavi maliyetinin ise 42.3 milyar dolar olduğu hesaplanmıştır (Remes ve ark., 2016). En sık görülen psikiyatrik hastalıklar arasında yer alan anksiyete ve depresyon, birbirlerine eşlik eden iki rahatsızlık olarak kabul edilmektedir (Ned ve Kalin, 2020).

Üzüntü, ilgi kaybı, anhedoni, iştahsızlık, suçluluk, çaresizlik, umutsuzluk, uykusuzluk ve konsantrasyonda azalma gibi spesifik semptomlarla karakterize edilen depresyon özellikle orta ve geç ergenlik döneminde sıklıkla rastlanan ruh sağlığı hastalığıdır (WHO, 2021). Depresif dönem, en az iki hafta boyunca, her gün, günün önemli bir kısmında, yukarıda bahsedilen duyguların yaşandığı zaman dilimi olarak tanımlanmaktadır (WHO, 2021). MDB, ilgi ve zevkte belirgin değişiklikler, bilişsel ve davranışsal değişiklikleri içeren en az iki ayrı depresif dönemle karakterizedir (Otte ve ark., 2016). MDB, dünya çapında 350 milyon kişiyi etkileyen yaygın rahatsızlıklarından biri olup, önemli ölçüde genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Sullivan ve ark., 2000; WHO, 2017). Sirkadiyen ritm düzensizlikleri, duygu durum bozuklukları, psikomotor aktivitede

düzensizlikler, olumlu ve olumsuz hatıraları içeren hafızalara erişim anormallikleri, depresyonda görülen semptomlar arasında bulunmaktadır (Bunney ve Bunney, 2000). Depresyonun insan vücudunda birçok fizyolojik mekanizmayla ilişkili olması nedeniyle, depresyon rahatsızlığı bulunan bireylerde kardiyovasküler rahatsızlıklar, Alzheimer, epilepsi, diyabet ve kanser görülme sıklığı artmaktadır (Green ve ark., 2003; Van der Kooy ve ark., 2007; Mezuk ve Eaton, 2008). MDB'nin HPA ekseninde görülen bir bozulmaya bağlı olarak gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Dean ve Keshavan, 2017). Depresyon durumunda beyin hacminde düşüş görülmekte olup, bu düşüşün nedenleri arasında glukokortikoid ve glutamat nörotoksitesi, nörogenesis ve nörotropik faktörlerdeki azalma yer almaktadır (Hasler, 2010). Bunun yanı sıra, beynin büyük bölümüne projekte olan monoaminerjik sistem, duygu-durum, dikkat, ödül, uyku, iştah ve bilinç işlevleri dahil olmak üzere çoğu MSS fonksiyonunda etkilidir. Antidepresanlar, söz konusu monoaminlerin alımının inhibisyonu ile sinaptik boşluktaki monoamin konsantrasyonunun artışı sağlayarak etkilerini göstermektedirler (Belmaker ve Agam, 2008). Depresyonu tetikleyen ve depresyondan etkilenen mekanizmaların bir kısmı Şekil 2.5.'te gösterilmiştir (Lang ve Borgwardt., 2013).



Şekil 2.5. Depresyonu tetikleyen ve depresyondan etkilenen mekanizmalar. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor = VEGF), Nörotrofin 3 (Neurotrophin-3 = NT3), Gliyal Türevi Büyüme Faktörü (Glial Derived Growth Factor = GDNF), 2-amino-3-hidroksi-5-metil-okzalo-propionik asit (2-amino-3-hydroxy-5-methyl-oxalo-propionic Acid = AMPA), N-metil-d-aspartat (N-methyl-D-aspartate = NMDA), Fosfoinositid-bağımlı kinaz-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1 = PDK1), Protein Kinaz B (Protein Kinase B = AKT), Glikojen Sentaz Kinaz 3 (Glycogen Synthase Kinase 3 = GSK3), BDNF, cAMP Yanıt Elementi Bağlayan Protein (Cyclic AMP Response Element Binding Protein = CREB), Fosfotidilinozitol 3-Kinaz (Phosphatidylinositol 3-Kinase = PI3K)) (Lang ve Borgwardt, 2013).

2.4. Sinaptik Plastisite

Sinapsların iletim etkinliklerinin aktiviteye bağlı olarak değiştirilebilme kabiliyeti sinaptik plastisite olarak adlandırılmaktadır. Nöral ağlarda aksonal dallanma miktarı ve yönü, membran üzerinde bulunan reseptör sayısı ve etkinliği değişebilir. Bu değişiklikler, değişimi tetikleyen aktivitenin sürdürülmesi veya durdurulmasına bağlı olarak kalıcı veya geçici olabilir. Hipokampus, sinaptik plastisitenin en yoğun görüldüğü bölgelerden biridir. Sinaptik plastisitenin olası bir nöral mekanizma olduğuna dair hipotezlerin ileri sürüldüğü bir dönemde, Bliss ve arkadaşları (Bliss ve Lomo, 1973) tavşanlar üzerinde yaptıkları deneylerde perforant yolağı yüksek frekansta ve tekrarlı bir şekilde uyarılmış, dentat girus granül hücrelerinden bazal aktiviteye kıyasla daha yüksek genlikli cevaplar alarak ilk UDG'yi kaydetmeyi başarmışlardır. UDG, kimyasal sinapsların yüksek frekanslarda uyarılmasıyla, uyarılan bölge ve çevresinde sinaptik kuvvette uzun süreli artışla gerçekleşen aktivite bağımlı plastisite olarak adlandırılmaktadır. UDG yeni bilgilerin

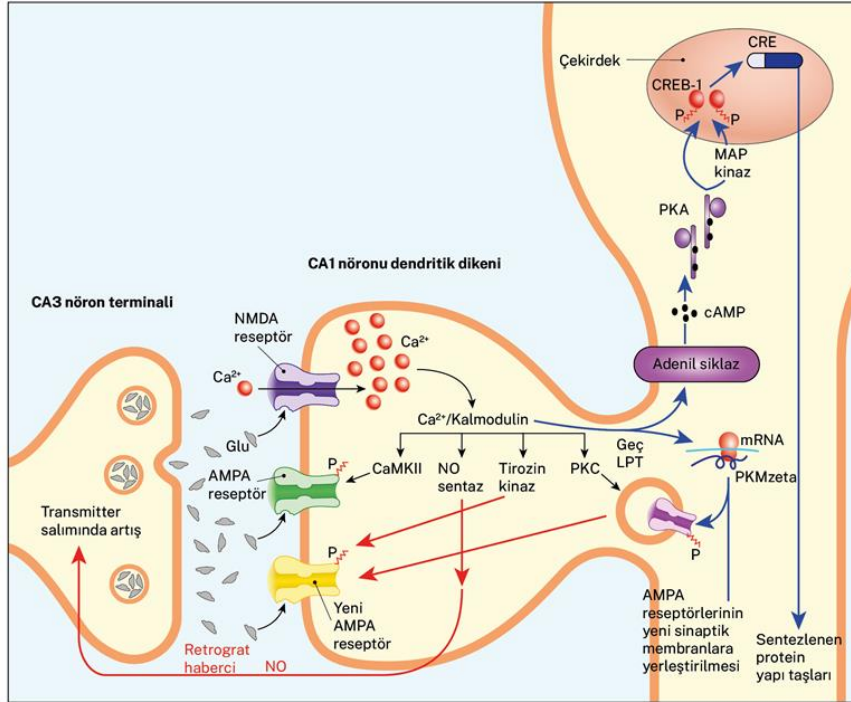
kaydedilip depolanmasını sağlayan mekanizma olarak kabul edilmektedir. Protein sentezi gerçekleşmeden 30 dakikaya kadar süren UDG'ler erken faz, protein sentezi içeren ve daha uzun süren UDG'ler ise geç faz olarak tanımlanmaktadır (Bliss ve Cooke, 2011). Uzun süreli ve düşük frekanslı uyarılar sonucu, cevap genliğinde bazal aktiviteye kıyasla düşüş gerçekleşmesine ise UDB adı verilmektedir (Bliss ve Cooke, 2011). UDB, UDG gibi bir sinaptik plastisite mekanizmasıdır ve UDG'nin etkisinin dengelenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Bliss ve Cooke, 2011). UDB, özellikle bilgilerin depolanmasını sağlayan UDG mekanizmasının etkinliğinin doyuma ulaşılması durumunda, eski bilgilerin silinerek yeni bilgilere yer açılması açısından önemli bir dengeleyici mekanizmadır (Bliss ve Cooke, 2011; Nabavi ve ark., 2014). Nörolojik rahatsızlıkların önemli bir kısmının, çocukluk döneminde, beyin hasarı veya hastalık durumunda, duyuşal yoksunluğa bağlı olarak eksik veya fazla sayıda sinaptik dallanma sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Bliss ve Cooke, 2011). Benzer şekilde, depresyonu tetikleyen önemli etkenlerden biri olan stresin, hipokampal sinaptik plastisiteyi değiştirdiği gösterilmiştir (Bliss ve Lomo, 1973). Literatürde yer alan araştırmaların önemli bir kısmı stresin UDG'yi baskıladığını ve UDB'yi kolaylaştırdığını rapor etmektedir (Richter-Levin ve Xu, 2018; Xu ve ark., 1997; Donohue ve ark., 2006; Foy ve ark., 1987; Shors ve ark., 1989; Kim ve Diamond, 2002).

2.4.1. Uzun Dönemli Güçlenme ve Uzun Dönemli Baskılanmanın Moleküler Mekanizması

UDG'nin moleküler sinyal yolları Şekil 2.6.'da gösterilmektedir. Aksiyon potansiyelinin presinaptik nörona ulaşmasının ardından, salınan glutamat postsinaptik membranda bulunan AMPA ve kainik asit reseptörlerine bağlanır ve postsinaptik membranın sodyum (Na^+) iyonuna geçirgenliğinde artış gerçekleşir (Şekil 2.6.). Na^+ iyonu girişine bağlı olarak gerçekleşen depolarizasyon ile NMDA reseptörünün magnezyum (Mg^{2+}) blokajı kalkar ve glutamatın NMDA reseptörüne bağlanmasıyla kanal açılır ve hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) ve Na^+ iyonları girmeye başlar. Hücre içine giren Ca^{+2} iyonu, Ca^{+2} /kalmodulin'e bağlanır (Şekil 2.6.). UDG veya UDB'nin tetiklenmesi, geçici postsinaptik Ca^{+2} iyonu konsantrasyonuna (hücre içi depolardan salınan Ca^{+2} dahil) ve Ca^{+2} iyonunun zamansal profiline bağlıdır. Ca^{+2} akımı ortamda uzun süreli ve düşük konsantrasyonda mevcut ise UDB'yi, yüksek konsantrasyonda ve kısa süreliyse UDG'yi

tetikler. Ca^{+2} /kalmmodulin kompleksi, Ca^{+2} /kalmmodulin kinaz II (CaMKII), protein kinaz C (PKC), tirozin kinaz ve NO sentazı aktive eder (Şekil 2.6.). UDG'nin oluşumunun bir yolu ise MSS'deki uyarıcı sinapslarda bazal kimyasal iletme aracılık eden bir iyonotropik glutamat reseptörü olan AMPA reseptörünün fosforilasyonudur (Şekil 2.6.). CaMKII ile fosforilasyon ise bu kanalların iletkenliğini artırmaktadır (Kandel ve ark., 2013). Ayrıca, PKC endozomal AMPA reseptörlerinin sitoplazmik kuyruğunu fosforile ederek bu veziküllerin plazma membranına füzyonunu tetikler. UDG'nin farklı zamansal aşamaları farklı hücresel mekanizmaları tetikler. Örneğin, UDG'nin erken fazında yeni protein sentezi olmaz ve 30 dakika sürer. Kalıcı sinaptik plastisitenin gerçekleştiği UDG'nin geç fazında ise protein sentezi gerçekleşir ve bu faz uzun süreli bellek olarak tanımlanır (Bliss ve Collingridge, 1993). UDG'nin geç fazında presinaptik alan genişlemesi, postsinaptik yeni dendritik spinlerin oluşumu ve AMPA reseptör sayısında artış görülür (Kandel ve ark., 2013). UDG'nin birkaç saatten fazla devam eden daha uzun süreli 'geç' formları için ya yeni gen transkripsiyonu ya da mevcut transkriptlerin yerel translasyonunun başlatılması yoluyla yeni proteinlerin sentezi gerçekleşmektedir. Yeni güçlendirilmiş sinapslardan çekirdeğe sinyal gönderilmesi yeni gen ekspresyonuna neden olur. Yeni gen ekspresyonunda en önemli yolaklardan biri, Ca^{+2} akımı ile aktifleşen ve aynı zamanda UDG indüksiyonu sırasında doğrudan AMPA reseptörü üzerinde etkili olan adenilat siklaz ve siklik adenosin monofosfata (cAMP) bağlı protein kinaz A (PKA) içeren sinyal kaskadıdır. PKA aktivasyonu, sinaptik plastisitenin uzun süreli tetiklenmesine yol açan proteinlere dönüştürülen yeni transkriptlerin üretimini sağlayan bir sinyaller zincirini harekete geçirir. PKA, CREB1'i, CREB1 ise mitojenle aktive olan protein kinazı aktive ederek, yeni protein sentezini sağlayan sinyal yollarını tetikler. PKA aktivasyon düzeyi, UDG'nin ne kadar süreceğinin belirlenmesinde önemli rol oynar. UDB, kısmen AMPA reseptörünün fosfatazlar tarafından defosforilasyonu aracılığıyla meydana gelir. UDG ve UDB'nin tetiklenmesinde AMPA reseptörlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi önemlidir, çünkü postsinaptik membrandaki reseptör sayısının artırılması veya azaltılması sinaptik plastisitede önemli rol oynar. Diğer taraftan, nörotransmitter salınımında artışa yol açan presinaptik mekanizmalar da UDG'nin tetiklenmesine katkıda bulunur (Şekil 2.6.). Presinaptik ve postsinaptik mekanizmaların katkıları, indüklemekten sonraki zaman dilimine ve sinaps sınıflarına bağlı olarak değişebilir (Şekil 2.6.). Sinaptik plastisitenin

herhangi bir presinaptik bileşenin ekspresyonu, presinaptik terminale sinyal gönderebilen NO gibi retrograd haberci gerektirir (Şekil 2.6.) NO presinaptik nörondan nörotransmitter salınımını artırarak UDG'yi kolaylaştırabilir. UDB'nin en çok araştırılan formlarından biri, grup 1 metabotropik glutamat reseptörlerine bağlı olan UDB çeşididir. Glutamatın reseptörüne bağlanmasıyla, fosfolipaz C tarafından membranda bulunan fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat, diaçilgliserol ve inozitol 1,4,5 trifosfata (IP₃) hidrolize edilir. IP₃ endoplazmik retikulum veya sarkoplazmik retikulum gibi hücre içi depolardan Ca⁺² iyonlarının salınmasını sağlarken, hücre içinde artan diaçilgliserol ve Ca⁺², Ca⁺² bağımlı protein PKC'yi aktive eder. Metabotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla aktive olan PKC, daha sonra fosforilasyon yoluyla AMPA reseptörlerinin iletkenliğini azaltır.



Şekil 2.6. UDG'nin moleküler mekanizmaları (Agar, 2021)

2.5. Depresyon ve Nitrik Oksit Arasındaki İlişki

Nitrik oksit, beyinde nörotransmisyon, nöromorfojenez, sinaptik plastisite, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, cinsel ve agresif davranışların kontrolü, öğrenme, ağrı algısı, saldırganlık ve depresyon üzerinde etkilere sahiptir (Esplugues, 2002). NO ile depresyon arasındaki ilişki, genel olarak norepinefrin, serotonin, dopamin ve glutamat

gibi depresyon fizyopatolojisinde rol alan nörotransmitterlerin NO tarafından modüle edilmesi şeklinde açıklanmaktadır (Dhir ve Kulkarni, 2007). NOS inhibitörlerinin antidepresan benzeri etkisi, NO'nun depresyonu tetiklediği hipotezinin ileri sürülmesine neden olmuştur (Joca ve Guimarães, 2006; Dhir ve Kulkarni, 2007). Hipokampusta bulunan NO'nun serotonin ve dopamin düzeylerini baskıladığı (Wegener ve ark., 2000) ve NOS inhibitörü verilen sıçanların hipokampuslarında serotonin ve dopamin miktarında artış olduğu rapor edilmiştir (Dhir ve Kulkarni, 2007). Ayrıca, antidepresanların NOS inhibitörleri ile birlikte kullanıldığı durumlarda daha etkili oldukları belirlenmiştir. (Harkin ve ark., 2004). NOS inhibitörünün kısa süreli uygulanması sonucunda kortikal beta adrenoreseptörlerde azalma olduğu, aynı etkinin antidepresan kullanımıyla gerçekleştirilen kronik tedavilerde de görüldüğü, bu nedenle NO'nun major depresyonla ilgili reseptör sistemlerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Karolewicz ve ark., 1999). NOS inhibitörlerinin ventral hipokampusa enjeksiyonu sonucu hücre dışı dopamin düzeyinde çok yüksek miktarda, serotoninde ise düşük miktarda artış saptanmıştır (Wegener ve ark., 2000). Serotonin geri alım inhibitörleri aynı zamanda NOS inhibitörleridir (Finkel ve ark., 1996). Bu inhibitörlerin, NO miktarını düşürdüğü ve insanlarda stresi azaltarak rahatlatıcı bir etki meydana getirdiği belirtilmiştir (Umathe ve ark., 2009).

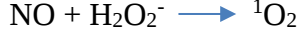
Major depresyon ve bipolar bozukluk tanısı konulmuş hastaların hipokampuslarının subikulum ve CA1 bölgelerinde nNOS için oldukça yüksek bir immunoreaktivite (Oliveira ve ark., 2008) ve NO üretiminde de artış olduğu görülmüştür (Suzuki ve ark., 2001). Ayrıca, beyinde hipokampus, hipotalamus, dorsal rafe nükleus ve lokus seruleus gibi stres ve depresyonla ilişkili bölgelerde nNOS tespit edilmiştir (McLeod ve ark., 2001). Diğer taraftan, MDB hastalığı durumunda, lokus seruleus bölgesinde normal bireylere kıyasla anlamlı derecede düşük miktarda nNOS bulunduğu rapor edilmiştir (Karolewicz ve ark., 2004). NO üretiminde düzenleyici rol oynayan magnezyum iyonu eksikliğinde NO üretiminde artış olduğu, bu artışın ise major depresyonun tetiklenmesine neden olabileceği vurgulanmıştır (Eby ve Eby, 2006). Bu bilgiler ışığında, MDB hastalarında magnezyum tedavisinin hızlı bir şekilde antidepresif etkiler oluşturduğu belirlenmiştir (Eby ve Eby, 2006).

2.6. Nitrik Oksit

Bir grup araştırmacı tarafından 1987-1988 yılları arasında vasküler endotelial hücrelerin NO gazını ürettiği belirlenmiş ve söz konusu buluştan yaklaşık yedi yıl önce ileri sürülmüş olan endotelium kaynaklı gevşetici faktörün NO olduğu anlaşılmıştır (Palmer ve ark., 1987). NO, kısa ömürlü, suda çözülebilen kararlı ve renksiz bir gazdır. Yapısal olarak, bir nitrojen atomu ve bir oksijen atomundan oluştuğu için eşleşmemiş bir elektrona sahiptir ve bu elektron NO'nun oldukça reaktif olmasını sağlar (Ramesh ve ark., 2014). NO, üretildiği hücreye etki edebilir veya hücre zarından difüze olarak komşu hücreleri etkileyebilir. NO'nun fizyolojik aktiviteleri, siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı ve cGMP bağımsız olmak üzere ikiye ayrılır. NO, cGMP varlığında guanilat siklaz enzimindeki hem grubu ile etkileşime girer. NO kaynaklı guanilat siklaz aktivasyonu ile vasküler tonus düzenlenir ve MSS'de nöromodülasyon gerçekleşir (Ramesh ve ark., 2014). Öte yandan, NO'nun cGMP'ye bağımlı olmayan yollarla gerçekleştirdiği birçok aktivitesi bulunmaktadır. Anjiyogenez sürecinde rol oynayan, güçlü anjiyojenik faktör VEGF dahil olmak üzere, birçok anahtar molekülün aktivitesi NO'ya bağlıdır (Ziche ve ark., 1994). NO, VEGF için hem aşağı hem de yukarı yönlü düzenlemede efektör molekül olarak işlev görür (Veikkola ve ark., 2000).

Nitrik oksit biyolojik haberci olarak keşfinden bu yana, ağırlıklı olarak geçiş metalleri ve tiyol kalıntıları ile reaksiyonu nedeniyle, proteinler, enzimler ve DNA'da konsantrasyona bağlı konformasyonel değişikliklere sebep olduğundan septik şoktan kansere kadar birçok hastalık süreciyle ilişkilendirilmiştir (Ramesh ve ark., 2014). Yüksek NO konsantrasyonları, sitotoksik olarak değerlendirilmekte ve NO üretimindeki artışın birçok kanser türünde tümör büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Lala ve Chakraborty., 2001). Aynı zamanda, nöronlar ve bağışıklık sistemi için önemli bir sinyal molekülüdür (Zhang ve ark., 2006). Süperoksit ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit (ONOO^-) ortaya çıkar, ONOO^- ayrışarak hidroksil radikali oluşturabilmektedir (Ali ve ark., 2012). NO ve suyun reaksiyonu moleküler oksijeni ($^1\text{O}_2$) oluşturur. Ayrıca NO'nun $^1\text{O}_2$ ile reaksiyonu sonucu nitrojen dioksit (NO_2) ve dinitrojen trioksit (N_2O_3) açığa çıkar.





Bu reaktif türler, etkilerini genelde hücreleri hasarlama şeklinde gösterirler (Rosen ve ark., 2002).

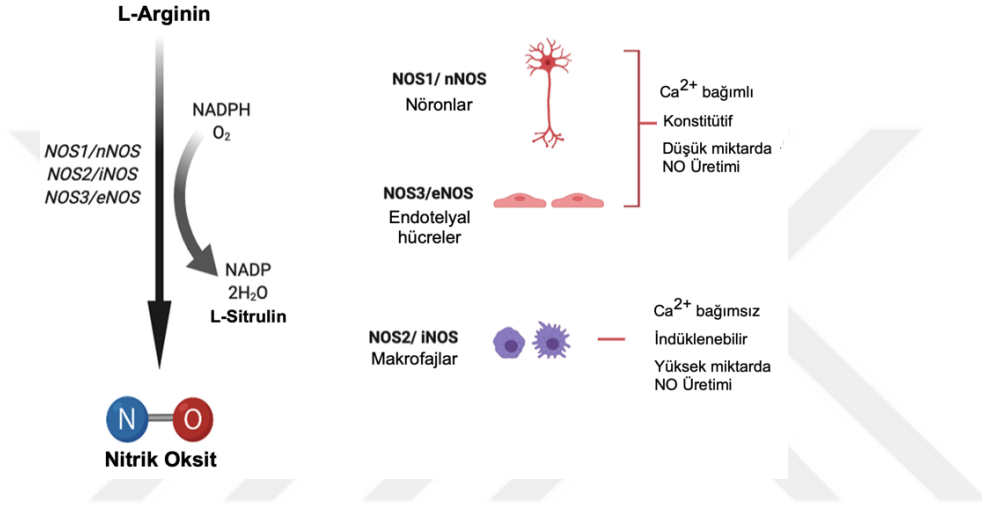
2.6.1. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit, NOS enzimi tarafından oksijen ve NADPH'nin aracılık ettiği bir reaksiyon ile L-arginin'in L-sitrüline oksidasyonu yoluyla meydana gelir. NOS, iki özdeş alt birimden oluşan homodimer yapıda bir proteindir. NOS'ta redüktaz, kalmodulin (CAM) bağlama ve oksijenaz olmak üzere üç ayrı domain bulunmaktadır (Li ve Poulos, 2005). Redüktaz domaini, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotidi içerir ve elektronları NADPH'den dimerin karşıt alt birimine oksijenaz alanına aktarır. CAM bağlama birimi, NO ve Ca^{+2} homeostazı arasındaki bağlantılara aracılık eder, tüm NOS izoformlarının aktivitesi için kritik öneme sahiptir. Oksijenaz domaini ise tetrahidrobiopterin (BH_4), hem ve arginin için bağlanma bölgeleri bulundurur, argininin sitrülin ve NO'ya dönüşümünde rol alır.

NOS'un nNOS, iNOS ve eNOS olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. nNOS ve eNOS yapısal olarak konstitutif NOS (cNOS) şeklinde de ifade edilmektedir (Ramesh ve ark., 2014) (Şekil 2.7). Endotel hücreleri ve nöronlardaki cNOS'un aktive edilmesi, lökosit-endotel etkileşimi, nöronlar arasındaki haberleşme, kan basıncı ve kan akımının düzenlenmesinde görev alır (Ali ve ark., 2012). cNOS, her zaman aktif olmasa da sürekli olarak endotelial hücre zarlarının iç yüzeyinde hazır şekilde bulunur ve kısa bir süre için (saniye ile dakika arası) NO üretir. iNOS, endotoksin ve sitokinler gibi spesifik uyaranlara yanıt olarak üretilir ve ek uyarı olmaksızın uzun süre (saatler ile günler) NO üretimine neden olur. cNOS'a nazaran iNOS aracılığıyla 100-1000 kat daha fazla NO üretimi gerçekleşir (Ali ve ark., 2012). cNOS aktivite için Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyarken, iNOS Ca^{+2} 'ya ihtiyaç duymaz (Alderton ve Cooper, 2001).

Nöronal NOS, nöron ve astrosit gibi sinir hücrelerinde olmak üzere birçok dokuda bulunmaktadır (Zhou ve Zhu, 2009). eNOS genel olarak endotelde bol miktarda bulunur ve düz kasların gevşemesini kontrol ederek kan basıncını düzenler ve trombosit agregasyonunu kontrol eder. Bununla birlikte, eNOS düz kas hücrelerinde ve endotelde

antiproliferatif etkiye yol açar. iNOS makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve hepatositler dahil olmak üzere birçok hücre tipinde eksprese edilir (Alderton ve Cooper, 2001). iNOS ekspresyonu, vücut savunması veya bağışıklık tepkisini düzenlemede etkilidir (Alderton ve Cooper, 2001). Enfeksiyonlar sırasında makrofajlarda iNOS tarafından yoğun bir şekilde NO üretimi gerçekleşir, bu üretim birçok patojenin büyümesini engeller (Alderton ve Cooper, 2001; Madar ve ark., 2005).



Şekil 2.7. NOS çeşitleri ve bulundukları bölgeler (Mishra ve ark., 2020).

2.6.2. Nitrik Oksitin Etkileri

NO'nun etkileri, direkt ve indirekt olmak üzere iki alt başlıkta incelenir (Wink ve ark., 1996). NO'nun direkt etkileri düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkarken, indirekt etkileri yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşir (Forstermann ve Ishii, 1996).

Nitrik Oksitin Direkt Etkileri

Nitrik oksit, guanilat siklaz ve sitokrom p450 gibi hem bölgeleri içeren metalloproteinlerle reaksiyona girerek, sitokrom p450, yağ asitleri, steroidler ve prostaglandinler gibi çok sayıda biyomolekülün sentezi ve katabolizmasında rol alır. Sitokrom p450 aktivitesi, NO tarafından tersinir olarak veya tersinir olmayan bir şekilde inhibe edilir. Tersinir inhibisyonda, NO oksijen bağlanmasını önlemek için heme bağlanır ve böylece katalizini inhibe eder. Tersinir olmayan inhibisyon, NO'nun otooksidasyonu ile oluşan süperoksit tarafından gerçekleştirilir (Ramesh ve ark., 2014). Süperoksit, sitokrom p450 enziminde bulunan heme ait sistein ligandına bağlanır ve heme sisteinin yeniden bağlanmasını önler (Forstermann ve Ishii, 1996). Ayrıca, NO dokuyu hasarlayabilen yüksek değerlikli

metalleri indirgeme yoluyla düşük değerklikli metallere dönüştürür (Ramesh ve ark., 2014). NO, hücreleri hidrojen peroksitten koruyan ve hidrojen peroksinin etkisini ortadan kaldıran katalaz ile reaksiyona girerek toksisiteye neden olur (Ramesh ve ark., 2014).

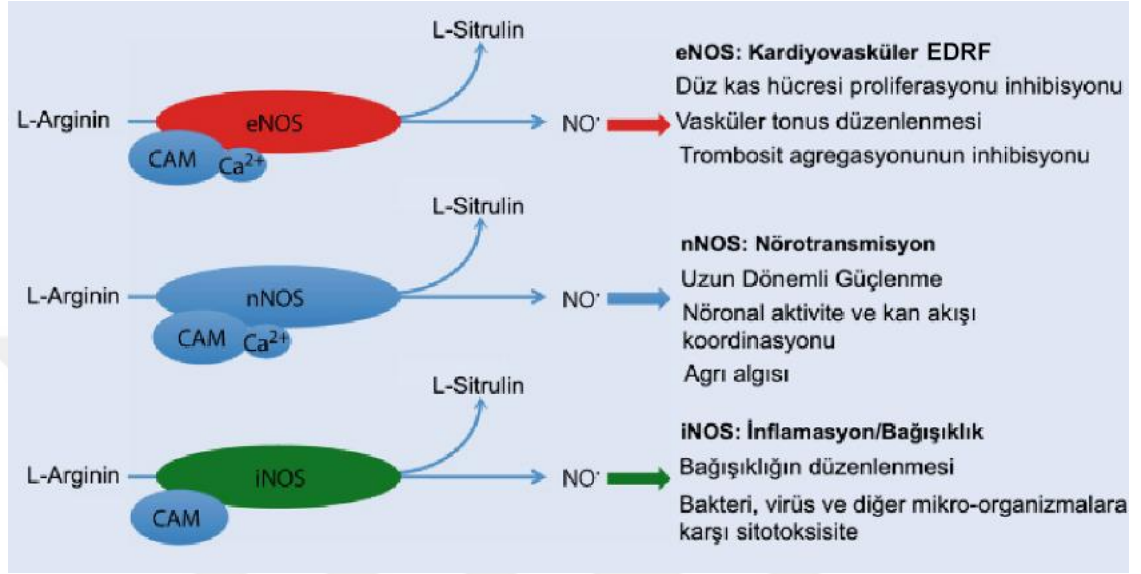
Nitrik Oksitin İndirekt Etkileri

Nitrik oksitin indirekt etkileri arasında, biyolojik dokulara zarar veren peroksinitritin oluşturulması, lipid peroksidasyonu, oksidasyon yoluyla glutatyon miktarının azalması, nitrozilasyon, deaminasyon ve oksidasyon ile DNA hasarı, hücresel nekroz (yüksek konsantrasyon), apoptozis (düşük konsantrasyon) ve mutasyon oluşumu yer almaktadır (Ramesh ve ark., 2014). NO, üç kimyasal mekanizma ile DNA'ya zarar verebilir. Bunlardan ilki, peroksinitritin DNA ile doğrudan reaksiyona girmesidir. İkincisi, NO'nun dolaylı olarak DNA onarım sürecini engellemesidir. Üçüncüsü ise genotoksik türlerin miktarının arttırılmasıdır (Ramesh ve ark., 2014). DNA ile NO etkileşime girdiğinde DNA'da bulunan sitozin, adenin ve guanin birimleri deaminasyona uğrar. Deaminasyon ile sitozin, guanin ve adenin sırasıyla urasil, ksantin ve hipoksantine dönüşür (Ramesh ve ark., 2014). Bunu takiben, ksantin oksidazın aktivasyonu ile serbest radikaller oluşarak oksidatif stres meydana gelir.

Nitrik Oksitin Koruyucu Mekanizmaları

Nitrik oksit hücreleri hidrojen peroksit aracılı toksisiteden korur. Hidrojen peroksit hücre içine girdiğinde, hücrede bulunan hem proteinleri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna yol açan hipervalent kompleksler oluşturur. Bu hipervalent kompleksler DNA'ya zarar verebilir. NO, bu hipervalent komplekslerle reaksiyona girerek söz konusu oksitlenmiş türleri ferrik forma geri döndürür ve böylece hücre içi hasarı sınırlar. Bununla birlikte, NO birçok koruyucu genin düzenlenmesi için hücresel sinyaller üretir ve proteinleri oksidatif strese karşı korur. (Pacelli ve ark., 1995; Musial ve Eissa, 2001). Birçok durumda NO, P53 ekspresyonunu arttırarak hücreleri apoptozise karşı korur. Ancak ortamda NO konsantrasyonu yüksek olduğunda, artan süper oksit oluşumu nedeniyle P53 inaktif hale gelir (Ramesh ve ark., 2014). iNOS kaynağı ile apoptozise uğrayan hücre arasındaki mesafe önemlidir, örneğin iNOS kaynağına yakın hücrede, hücreyi apoptozisten koruyan p53 degrade olur. Bu durum, NO'nun apoptozis ile

spesifik bir ilişkisinin olduğunu düşündürmektedir (Ramesh ve ark., 2014). NO'nun rol oynadığı bazı mekanizmalar Şekil 2.8.'de gösterilmektedir (Leiper, 2019).



Şekil 2.8. NOS çeşitleri ve görevleri (Leiper, 2019).

2.7. Nitrik Oksit ile Sülfid Arasındaki İlişki

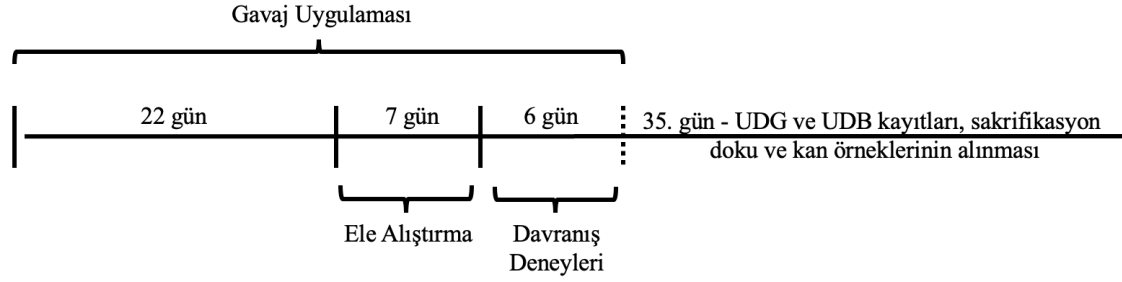
Sülfidin insan vücudunda NO tarafından düzenlenen mekanizmalar üzerinde etkileri görülmektedir. NO'nun trombosit agregasyonunu önleme etkisini gerçekleştirebilmesi için ortamda sülfidin olması gerektiği rapor edilmiştir (Harvey ve Nelsestuen, 1995). Diğer taraftan, sülfid, NO ile kimyasal reaksiyona girerek ortamın fizyolojik düzenini bozacak yan ürünler oluşturabilmektedir (Harvey ve Nelsestuen, 1995). Sülfid midede, mide sıvısıyla karışan ve tükürükte bulunan nitrit ile kimyasal reaksiyona girerek NO üretimine yol açar (Takahama ve Hirota, 2012). Eğer ortam asidikse, 0 ile 0.1 mM sülfid konsantrasyonlarında sülfid artışına bağlı olarak NO üretimi artar, ancak sülfid konsantrasyonunun 0.2 mM'den yüksek olduğu durumlarda, sülfid miktarı arttıkça NO üretiminin azaldığı görülmüştür (Takahama ve Hirota, 2012). Sülfid konsantrasyonunda ki değişime bağlı olarak NO miktarındaki artışın, nitroz asit ve hidrojen sülfidin kimyasal reaksiyonu sonucu meydana gelen nitrozosülfonat ile nitroz asit arasında gerçekleşen kimyasal etkileşimde görülen artışa bağlı olarak gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Takahama ve Hirota, 2012). Bununla birlikte, sülfid, albümin ve S-nitrozoglutatyon ile de kimyasal reaksiyona girerek, NO'nun hücresel sinyal iletim yollarında düzenleyici etkisini bozduğu düşünülmektedir (Harvey ve Nelsestuen, 1995).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli etik kurul belgesi Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan (Etik Kurul Onay Tarihi ve Numarası: 05.10.2020 / 163) alınmıştır.

3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü

Çalışmada, 100 adet, 3 aylık, 250-300 g ağırlığında, erkek *Wistar* sıçanlar her grupta 25 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba (K, S25, S100 ve S260) ayrılmıştır. 35 gün boyunca K grubuna distile su, sülfat gruplarına ise distile su içerisinde çözündürülerek her gün taze olarak hazırlanan sodyummetabisülfat gavaj yoluyla verilmiştir. S25 grubuna 25 mg/kg/gün, S100 grubuna 100 mg/kg/gün ve S260 grubuna ise 260 mg/kg/gün dozunda sodyummetabisülfat uygulanmıştır. Sıçanlar 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunda, bir kafeste 5 sıçan olacak şekilde kısıtlama olmaksızın musluk suyu ve ticari sıçan yemi ile beslenmiştir. Gavaj uygulamasının 30. gününde her gruptan 15 sıçana açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi yapılmıştır. Bir sonraki gün (31. gün) zorunlu yüzme testinin ilk gün alıştırmaları yapılmıştır. Otuz ikinci gün saat 11:00'da zorunlu yüzme testi tamamlanmış ve sükröz tercih testi başlatılmıştır. Sükröz tercih testinin protokolü 35. gün saat 12:00'da tamamlanmıştır. Gavaj uygulamasının 35. gününde her gruptan 5 sıçanda UDG, 5 sıçanda ise UDB kayıtları alınmıştır. Sonrasında, sıçanlar üretan (1.5 g/kg) ile anestezi edilmiş ve abdominal aortalarına girilerek heparinize tüplere kan örnekleri alınmıştır. Bununla birlikte, sıçanların sol ventriküllerine girilerek aorta içerisine kanül yerleştirilmiş, heparinli serum fizyolojik kullanılarak beyin perfüzyonu gerçekleştirilmiştir. Perfüzyonun tamamlanmasıyla beyin dokuları çıkarılmış, hipokampusları ayrılarak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Alınan heparinize kan örnekleri 1400g, 6 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edilmiş ve plazma-S-Sülfonat düzeylerinin tayini için -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1.'de tüm gruplar için uygulanan deney protokolünün şeması verilmektedir.



Şekil 3.1. Deney protokolünün akış şeması

3.2. Davranış Deneyleri

Çalışmamızda, davranış deneyi olarak açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi, zorunlu yüzme testi ve sükroz tercih testi yapılmıştır. Tüm sıçanlara, davranış testlerine başlamadan bir hafta önce her gün 5 dakika süreyle ele alıştırma (handling) uygulanmıştır. Sirkadiyen ritmin sıçanlar üzerindeki etkisinin elemine edilebilmesi için, davranış testleri 09:00-17:00 saatleri arasında yapılmıştır. Deneyler çift-kör prensibiyle gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar, davranış testlerinin yapılacağı odalara test başlamadan yarım saat önce getirilmiştir. Davranış deneylerinde sıçanların hareketleri Noldus Ethovision XT video izleme sistemi kullanılarak kaydedilmiş ve analiz edilmiştir.

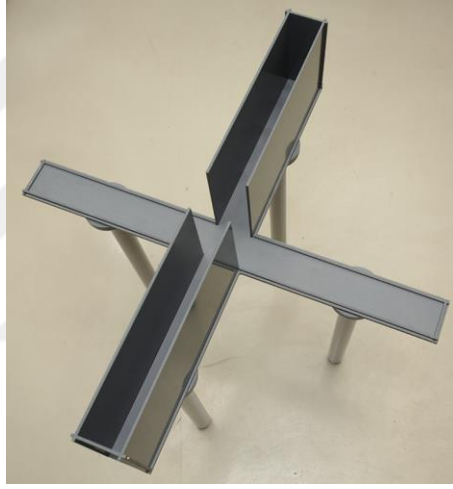
3.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi, tabanı 80x80 cm ebatlarında, 40 cm duvar yüksekliği olan mat siyah renkli kare bir düzeneğe kullanılarak yapılmıştır. Test düzeneği, 400 cm² büyüklüğünde birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüştür. Testin ilk aşamasında, sıçanlar bu düzeneğin merkezine bırakılmış ve hareketleri 5 dakika boyunca video izleme sistemiyle kaydedilmiştir. Açık alan testi düzeneği, koku duyusuna göre hareketleri engellemek amacıyla her sıçanın deneyi tamamlandıktan sonra %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Her bir sıçan için iç kadranda geçirilen süre, dış kadranda geçirilen süre, iç/dış kadranda geçirdiği süre oranı ve dışkı sayısı anksiyete göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Navarro ve ark., 2014).

3.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi, kol genişliği 10 cm, kol uzunluğu 50 cm olan 4 kolu labirent kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ari ve ark., 2019) (Şekil 3.2.). Bu kollardan

karşılıklı olan iki tanesi açık, diğer ikisi ise 30 cm yüksekliğinde plakalar ile kapatılmıştır. Labirent taban seviyesinden 40 cm yüksekte olacak şekilde konumlandırılmış ve dört kolun her biri eşit şiddette aydınlatılmıştır. Test sırasında sıçanların düzenekte 5 dakika boyunca serbest bir şekilde dolaşmalarına izin verilmiş ve bu süreç kayıt altına alınmıştır (Walf ve Frye., 2007). Test sonunda, sıçanların açık ve kapalı kolları geçtikleri süre, açık kola giriş sayısı ve açık kolda geçirilen süre indeksi hesaplanmıştır (Ari ve ark., 2019). Açık kolda geçirilen süre indeksi, açık kolları geçirilen sürenin tüm kolları geçirilen süreye bölünmesiyle elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi düzeniği

3.2.3. Zorunlu Yüzme Testi

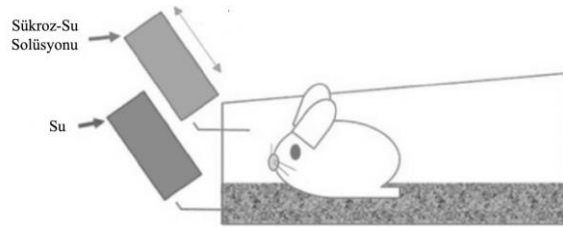
Zorunlu yüzme testi, sıçanların kaçmasının mümkün olamayacağı şekilde tasarlanmış Şekil 3.3.'de gösterilen silindirik şekilde içi su dolu ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) düzenekte gerçekleştirilmiştir (Yankelevitch-Yahav ve ark., 2015). Suyun derinliği, yüzme sırasında sıçanların ayaklarının yere değmeyeceği şekilde ayarlanmıştır. Toplamda iki gün süren testin ilk günü, sıçanlar su dolu ortamda 15 dakika yüzdürülmüşlerdir. İkinci gün ise 5 dakika süreyle suya bırakılmışlar ve hareketleri kayıt altına alınmıştır. Suya bırakılan sıçanlar, bir süre sonra sadece baş kısımlarını su üzerinde tutacak şekilde, kaçmak için çaba harcamadıkları bir pozisyon almaktadırlar. Hareketsiz pozisyon aldıkları zamana kadar geçen süre (latans) ve toplamda hareketsiz geçen süre değerlendirilerek sıçanların depresyon düzeyleri belirlenmiştir (Yankelevitch-Yahav ve ark., 2015).



Şekil 3.3. Zorunlu yüzme testinden alınmış bir kayıt örneği.

3.2.4. Sükroz Tercih Testi

Toplamda üç gün süren testin ilk gününde, içerisinde %1 oranında sükroz içeren 2 adet 200 ml'lik su dolu şişe kafeslere yerleştirilmiştir. Sonraki gün sükroz içeren iki şişeden biri yalnızca su içeren bir şişe ile değiştirilmiştir. Üçüncü gün, iki şişe de alınmış, sıçanlar 24 saat boyunca susuz ve aç bırakılmıştır. Üç günlük protokolün tamamlanmasıyla birlikte, sıçanlara sükroz solüsyonu içeren ve içinde yalnızca su olan birer şişe verilmiştir. Bir saat boyunca sıçanların sıvı tüketmelerine izin verilmiştir (Cheng ve ark., 2017). Bir saatin sonunda, toplamda tüketilen sükroz solüsyonu hacmi/tüketilen toplam sıvı hacmi hesaplanmış ve sükroz tercih skoru olarak belirlenmiştir (Liu ve ark., 2018). Sükroz tercih testinin şematik gösterimi Şekil 3.4.'te verilmiştir.

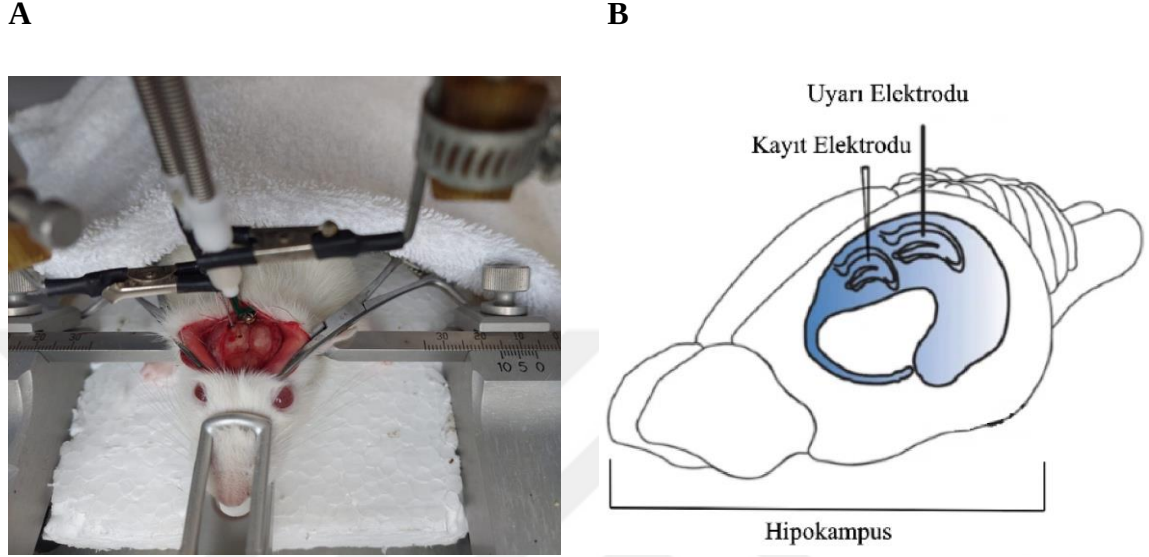


Şekil 3.4. Sükroz tercih testinin şematik gösterimi (Dogan ve ark., 2017).

3.3. Elektrofizyolojik Kayıt Alınması

Elektrofizyolojik kayıtlar, Faraday kafesi içerisinde Labchart yazılımı (Powerlab, ADInstruments) kullanılarak alınmıştır. Elektrofizyolojik kayıtların alınmasında

kullanılan stereotaksik düzenek (A) ve elektrotların hipokampus içerisindeki konumlarının şematik gösterimi (B) Şekil 3.5.'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Elektrot yerleşimi sırasında sıçan ve stereotaksik düzenek (A), elektrotların hipokampus içerisindeki konumlarının şematik gösterimi (B) (Sun ve ark., 2018).

3.3.1. Cerrahi Prosedür ve Elektrotların Yerleştirilmesi

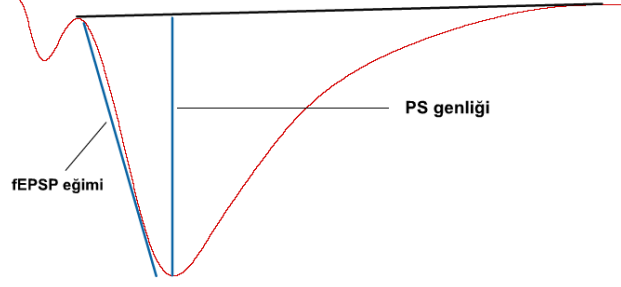
Sıçanlar 1.5 g/kg üretanın intraperitoneal enjeksiyonuyla anestezi edilmiştir. Anestezi sırasında sıçanların vücut sıcaklığı ısıtıcı ped kullanılarak $37\pm0.2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Ağız ve kulak aparatları kullanılarak sıçanların kafaları stereotaksik sisteme sabitlenmiştir (Kopf Instruments, Tjunga, CA, ABD). Sonrasında, orta hat insizyonuyla, deri ve deri altı dokuları açılarak kafatasına erişilmiş, pamuk kullanılarak fasya temizlenmiş ve kafatası kemiği açıkça görülecek şekilde ortaya çıkarılmıştır. Stereotaksik eksenler hareket ettirilmiş, bregma ve lambda noktaları aynı dikey dorsoventral düzlemde ve hayvan kafatası yüzeyi düz (zemin ile paralel) olacak şekilde konumlandırılmıştır. Bunu takiben, anterior-posterior, dorsoventral ve mediolateral koordinatların belirlenmesi amacıyla stereotaksik kollardan birinin ucuna iğne tutturulmuştur. Bu iğne, bregma noktası referans alınarak kafatası üzerinde yüzeye paralel olacak şekilde hareket ettirilerek uyarı elektrodunun (platin kaplı, 0,010 inch bipolar twisted, Plastic One, paslanmaz çelik, ucu dışında izole edilmiş) yerleştirileceği ipsilateral Schaffer kolateralleri (bregmanın 4.00 mm posterior ve 3.00 mm laterali) ve kayıt elektrodunun (0,005 inch, paslanmaz çelik, Plastic One) yerleştirileceği hipokampus CA1 bölgesinin piramidal hücre tabakasının

(bregmanın 3.00 mm posterior ve 2.00 mm laterali) konumları işaretlenmiştir (Hölscher ve ark., 1997). Konumlar işaretlendikten sonra, stereotaksik kola iğne yerine elektrikli matkap (High Speed Stereotaxic Drill, Kopf Instruments) yerleştirilmiş ve kafatasında işaretlenmiş noktalar üzerinde 0.5 mm çapında delikler açılmıştır. Delme işlemi sırasında, kortikal yüzeyde kanamaya neden olmadan yukarı aşağı tekrarlı hareketler yapılarak kafatasının tamamen delindiğinden emin olunmuştur. Uyarı ve kayıt elektrotlarının yerleştirileceği yerler delindikten sonra, lambdanın 3 mm arkasında bir delik açılmış, buraya referans vida elektrot (#0-80 1/8 paslanmaz çelik) kortikal yüzey ile hafifçe temas edecek şekilde sabitlenmiştir. Toprak elektrot (AgCl disk) sıçanın kuyruğunun üst kısmına konulmuştur. Stereotaksin sol ve sağ kollarında bulunan tutuculardan birine uyarı elektrodu, diğerine kayıt elektrodu dikey şekilde yerleştirilmiştir. Uyarı elektrotu düşük dirençli kablolar ile stimülatöre (MASTER 9, A.M.P.I, ISO Flex), kayıt elektrotu elektrofizyolojik diferansiyel amplifikatöre (Bio Amps, ADInstruments) bağlanmıştır. Buna ek olarak, diferansiyel amplifikatöre toprak ve referans elektrot terminalleri de bağlanmıştır. Elektrot yerleşimi tamamlandıktan sonra, her 10 saniyede bir 0.1 ms süreli kare dalga pulslarının uygulanması sonucu oluşan cevaplar elde edilmiştir. Elde edilen veriler 40 kHz örneklem hızında (1 Hz-3 kHz bant geçiren filtre), Labchart yazılımı (Powerlab, ADInstruments) ile izlenmiş ve kaydedilmiştir. Bu noktada, uyarı ve kayıt elektrotları, presinaptik aktivasyon göstergesi olan fiber volley tamamlandıktan sonra, negatif yönlü eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) ve popülasyon spike (PS) elde edilinceye kadar yaklaşık olarak 0.2 mm/dak hızında aşağıya indirilmiştir (Byrne, 2017; Ahnaou ve ark, 2020). Hipokampusun CA1 bölgesinin stratum radiatum tabakasının tipik yanıtı elde edildiğinde elektrotların konumu sabit tutulmuş ve optimal uyarı şiddetinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir.

3.3.2. Uzun Dönemli Güçlenme ve Uzun Dönemli Baskılanma Ölçüm Parametreleri

UDG, sinaptik iletimin kalıcı bir şekilde artmasıyla sonuçlanan, aktiviteye bağlı bir plastisite şeklidir (Bliss ve Cooke, 2011). UDB, sinaptik iletimin etkinliğinde uzun süreli bir baskılanma olarak ifade edilmektedir (Collingridge ve ark., 2010). UDG ve UDB kayıtlarında sinaptik plastisite göstergesi olarak PS ve fEPSP kullanılmaktadır (Maines, 1996). PS genliği eş zamanlı olarak aktive olan nöronların miktarını temsil etmektedir (Andersen ve ark., 1971). fEPSP eğimi ise CA1 piramidal nöronlarında meydana sinaptik

aktivasyonun (depolarizasyon) göstergesidir (Byrne, 2017). UDG ve UDB'nin değerlendirilmesi için EPSP'nin başlangıcı ile negatif çukur bölgesi arasındaki eğim (fEPSP), ilk pozitif tepe ile EPSP negatif çukuru arasındaki genlik ve ikinci pozitif tepe ile EPSP negatif çukuru arasındaki PS genliğinin ortalaması hesaplanmıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. UDG ve UDB plastisitesi değerlendirme parametreleri

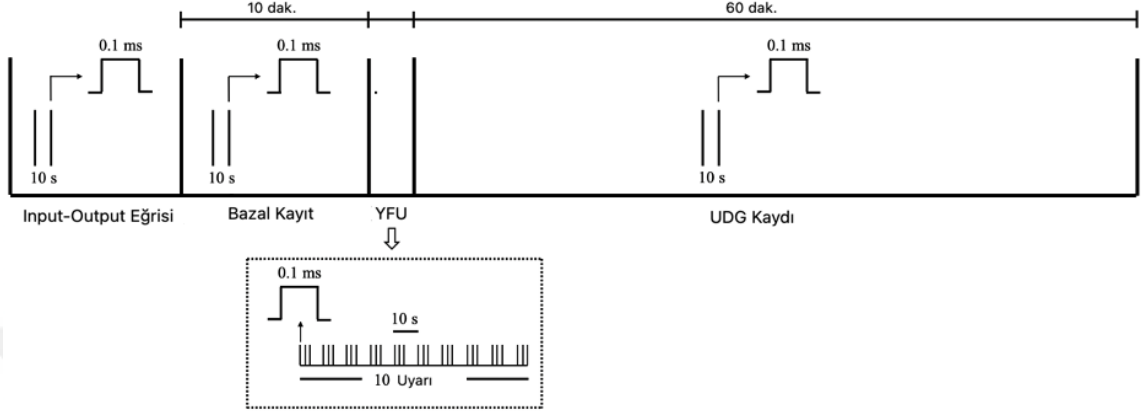
3.3.3. Input-Output (I/O) Eğrisinin Elde Edilmesi ve Bazal Kayıtlarının Alınması

Input-output eğrisinin belirlenmesi amacıyla, 0.1 ile 1 mA arasında 0.1 mA'lık adımlarla artırılan akım şiddetine sahip uyarılara (10 saniyede bir, 0,1 ms süreli kare dalga pulsları) verilen cevaplar izlenmiştir (Manahan-Vaughan ve ark., 1999). Her uyarın şiddeti için üç adet fEPSP'nin ortalaması alınmış, fEPSP değerinin en yüksek olduğu cevap belirlenmiştir. Bu cevabın uyarın şiddetinin %50'si optimal uyarın şiddeti ve bu uyarı test uyarı şiddeti olarak belirlenmiştir (Dastgerdi ve ark., 2020). Test uyarı şiddeti kullanılarak on dakika süreyle bazal kayıt alınmıştır (Salmani ve ark., 2011).

3.3.4. Yüksek Frekanslı Uyarı ve Uzun Dönemli Güçlenme

Bazal kaydın alınmasının ardından, 100 Hz (3 burst, 10 uyarım, 0.1 ms uyarı süresi, kare dalga, 10 saniye uyarım aralığı) yüksek frekanslı uyarı (YFU) ile UDG tetiklenmiştir. YFU sonrası CA1'in stratum radiatum tabakasındaki nöronlarda görülen sinaptik plastisite değişimlerinin belirlenmesi için 60 dakika boyunca 10 saniyede bir 0.1 ms süreli pulslu kare dalga uyarılarına verilen cevaplar kaydedilmiştir (Saleewong ve ark., 2013). UDG protokolü Şekil 3.7.'de gösterilmiştir. Sıçanların her biri için bir tane UDG kaydı alınmıştır. Bazal kayıt ve UDG kaydı sırasında elde edilen 6 ardışık cevabın (1 dakika) ortalaması alınmıştır (Saleewong ve ark., 2013). YFU sonrası alınan 60 dakikalık

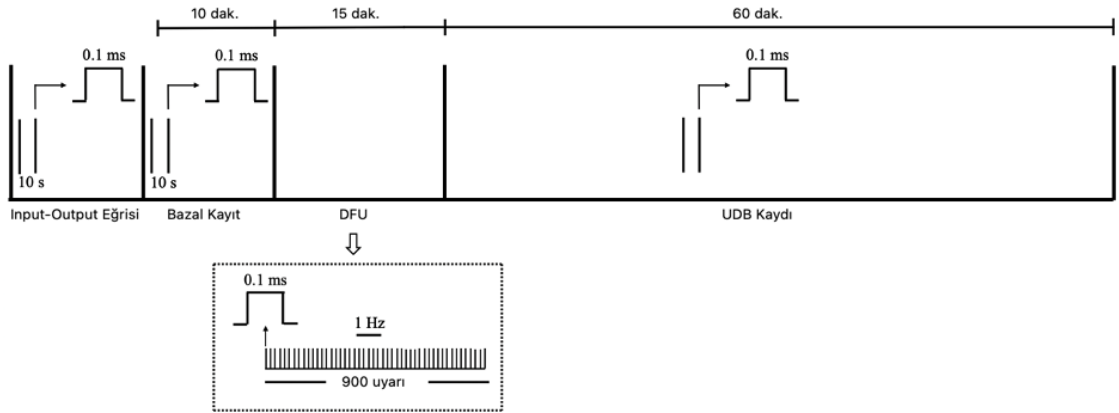
ortalamanın, bazal kaydın ortalamasına kıyasla zamana bağlı olarak değişim miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. UDG protokolü

3.3.5. Düşük Frekanslı Uyarı ve Uzun Dönemli Baskılanma

Bazal kaydın tamamlanmasıyla birlikte, 20 Hz (1 burst, 900 uyarım, 0.1 ms uyarı süresi, 1 saniye uyarım aralığı) düşük frekanslı uyarı (DFU) ile UDB tetiklenmiştir (Bitiktaş ve ark., 2016). DFU ile birlikte stratum radiatum tabakasında meydana gelen sinaptik plastisite değişimlerinin saptanması amacıyla 60 dakika süreyle 10 saniyede bir 0.1 ms süreli uyarılara verilen cevaplar kaydedilmiştir. Şekil 3.8.'de UDB protokolü gösterilmiştir. Test boyunca (bazal kayıt ve UDB kaydı) elde edilen cevaplardan 6 tanesinin (1 dakika) ortalaması alınmıştır. DFU sonrası alınan 60 dakikalık ortalamaların, bazal kayıtların ortalamasına kıyasla zamana bağlı olarak değişim miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. UDB protokolü

3.4. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

3.4.1. Plazma-S-Sülfonat Düzeyi Tayini

Plazma-S-Sülfonat düzeyleri, Gunnison ve Palmes'in yöntemi modifiye edilerek ölçülmüştür (Gunnison ve Palmes, 1978). Plazma-S-Sülfonat tayini, alkali ortamda bulunan potasyum siyanürün S-sülfonattan SO_3^{-2} molekülünü koparması, serbest kalan SO_3^{-2} 'nin parorasanil reaktifi ile birleşmesi sonucu 560 nm dalgaboyunda absorbands değişiminin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm sıçanlardan alınan 1'er ml plazma ile 200 µl potasyum siyanür karıştırılmış ve 1 saat süreyle 36°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Söz konusu karışımdan 1 ml diyalizat torbasına aktarılmış ve 5 ml glisin-NaOH tamponu içerisinde oda sıcaklığında 4 saat boyunca bekletilmiştir. Bunu takiben, diyalizat torbasının dışındaki solüsyondan 1.4 ml alınarak bir tüpe aktarılmış ve tüpe sırasıyla 0.15 N HCl (200 µl), sodyum tetrakloromercurat solüsyonu (200 µl), dH_2O (200 µl), formaldehit reaktifi (200 µl) ve parorasanil reaktifi (200 µl) eklenmiştir. Elde edilen karışım vortekslenerek oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, karışımın absorbandsı spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Plazma-S-Sülfonat düzeyleri µmol/ml olarak hesaplanmıştır.

3.4.2. Nitrit/Nitrat Düzeyi Tayini

Nitrit/Nitrat düzeyinin belirlenmesinde, sıçan dokusu için uygun kolorimetrik ölçüm kiti (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman) kullanılmıştır (Green ve Wagner, 1982). 10 mg hipokampus dokusuna 200 µl fosfat tamponu eklenmiş ve homojenizasyon yapılmıştır. Bunu takiben, homojenatlar 10000 g, +4°C, 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 100000 g, +4°C, 30 dakika santrifüj edilmiş ve içerisinde 30 kD'luk filtreler bulunan ependorf tüplere aktarılarak tekrar 30 dakika boyunca santrifüj (1500 g, +4°C) yapılmıştır. Süpernatantların absorbandsı spektrofotometrede 540-550 nm dalga boyunda ölçülmüş ve nitrit/nitrat seviyesi µM/g protein olarak hesaplanmıştır.

Protein miktarının tayini:

Protein tayini, modifiye Bradford yöntemine (Bradford, 1976) dayanan kit ile yapılmıştır (Shimadzu RF-5500, Kyoto, Japonya). Bu işlem sırasında 2 µg/µl bovin serum albümin standart solüsyonu (Albümin Bovina, Sigma, A-8022) ve CPPA reaktifi (Coomassie Plus

Protein Assay Reagent, Pierce-1856210) kullanılmıştır. 1 µl süpernatanta, ilk aşamada 49 µl (1:50) ve 499 µl (1:500) distile su eklenmiş, bir sonraki aşamada ise sırasıyla 50 µl ve 500 µl CPPA reaktifi eklenmiştir. Elde edilen karışımın absorbansı 595 nm dalgaboyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Standart grafiği, numune kullanmaksızın farklı konsantrasyonlara sahip bovin serum albumin (1:1000) kullanılarak elde edilmiştir. Dokulardaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.3. nNOS ve iNOS ekspresyon Düzeylerinin Tayini

Çıkarılan hipokampuslar 800 µl triton liziz homojenizasyon tamponu (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, 5 mM EGTA, 10 mM EDTA, %10 glycerol, 20 mM HEPES ve protein inhibitör kokteyl) içerisinde homojenize edilmiştir. Daha sonra her biri 5 saniye olan 3 ayrı ultrasonikasyon işlemi yapılmıştır. Sonikasyon işleminden sonra numunelere 30 dakika 20000xg'de santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatantlar ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlardaki protein miktarı Coomassie Plus protein ölçüm kiti ile tespit edilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat varlığında ayırma ve sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları konsantrasyonları, kullanılacak protein miktarı optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenmiştir. Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez işlemi Biorad elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Optimizasyon işlemleri sonucunda belirlenen protein miktarları jel içerisinde oluşturulacak kuyucuklara yüklenmiş ve kuyucuklardan birine de yol gösterici boya konulmuştur. Yol gösterici boya tabana ulaştığı zaman güç kaynağı kapatılmıştır. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınmış ve jel sandviçten çıkarılmıştır. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden dört adımda gerçekleştirilmiştir: Bunlar jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Elektroforezi takiben jel sandviçten çıkarılan jeller transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %20 metanol) içerisinde 15 dakika süreyle çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Transfer sandviçin hazırlanmasından sonra, sandviç sistemi güç kaynağına bağlanmış, voltaj ve maksimum akım limiti ayarlanmış ve 90 dk süreyle proteinler elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Süre sonunda üzerinde

transfer edilmiş proteinleri barındıran membran (Blot) elde edilmiştir. Proteinlerin tespiti aşamasında, membran 10 dakika süreyle TBST solüsyonu (Tris Buffered Saline + Tween 20: 20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.5 M NaCl ve %0,05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Daha sonra membran bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmamış fazla bloke çözeltisi uzaklaştırılarak membran 2 saat primer antikörler ile (anti nNOS (Invitrogen #37-2800) ve anti iNOS (SantaCruz #7271)), 1 saat de ikincil antikör ile (goat anti-rat IgG-ALP conjugate, ab6846) inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikörlerin uzaklaştırılması için aralarda 5'er dakika 3'er tekrar olmak üzere TBST ile inkübe edilmiştir. Primer antikör bağlanan proteinlerin tespiti, membran üzerindeki protein-primer antikör kompleksinin, alkalın fosfataz (ALP) bağlı ikincil antikör ve ALP tespit kiti ile inkübe edilmesine dayanmaktadır. Protein ekspresyon seviyelerini normalize etmek için β -aktin kontrol olarak kullanılmıştır. Bu nedenle protein bant görüntüsü elde edilen membran daha sonra 2 saat monoklonal mouse anti β -aktin primer antikörü (SC-47778) ile inkübe edilmiştir. Buna ek olarak, bağlanmamış antikörlerin uzaklaştırılması için membran aralarda 5'er dakika 3'er tekrar olmak üzere TBST ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 saat işaretleyici ALP bağlı olan ikincil antikör ile inkübe edilmiş ve uygulanan ALP tespit kiti ile elde edilen spesifik bant görüntüleri elde edilip fotoğraflanmış ve Image J yazılım programı kullanılarak elde edilen protein bantlarının dansitometrik tarama metodu ile ölçümü yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterdiği durumlarda çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (Analysis of Variance = ANOVA), ikili karşılaştırmalarda posthoc Tukey testi uygulanmıştır. Normal dağılımın görülmeyeceği durumlarda, çoklu karşılaştırmalar için Kruskal Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ koşulu istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

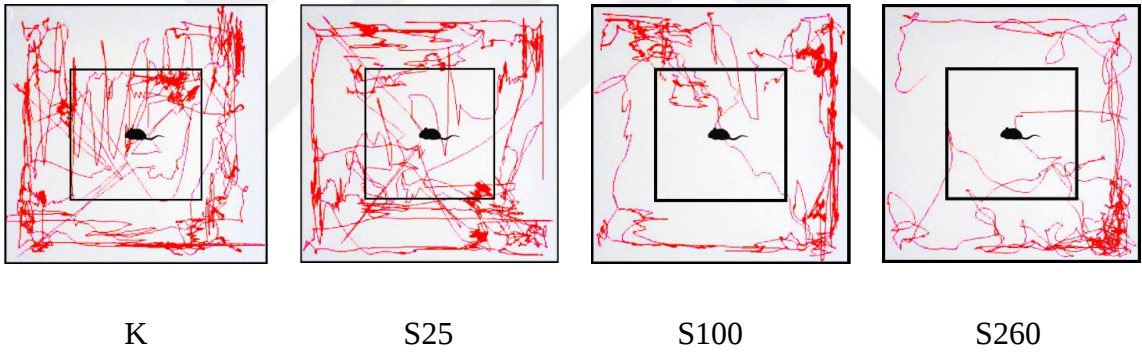
4.1. Genel Görünüm

Sıçanlar, fizyolojik açıdan genel olarak değerlendirildiğinde gruplar arası göze çarpan önemli bir fark görülmemiştir. Ancak, sülfite alan grupların K grubuna göre daha agresif olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. Davranış Deneyleri Bulguları

4.2.1. Açık Alan Testi

Açık alan testinde arena içerisinde sıçanlar tarafından takip edilen yol örnekleri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Açık alan testinde her gruptan bir sıçana ait temsili takip edilen yola ait örnekler.

Açık alan testinde iç kadranda geçirilen süre, dış kadranda geçirilen süre, iç/dış kadranda geçirilen süre oranı ve dışkı sayısı değerleri Tablo 4.1.'de görülmektedir. İç kadranda geçirilen süreye bakıldığında, S260 grubunun geçirdiği sürenin K grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, S260 grubunun dış kadranda geçirdiği süre K grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,05$). S260 grubunun iç kadranda/dış kadranda geçirilen süreye oranının tüm deney gruplarına göre düşük olduğu tespit edilmiştir. S100 grubunun iç kadranda/dış kadranda geçirilen süreye oranının ise hem K hem de S25 grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Öte yandan, S100 ($p<0,05$) ve S260 ($p<0,01$) grubundaki sıçanlar hem K hem de S25 grubuna göre anlamlı derecede daha fazla sayıda dışkılama gerçekleştirmiştir.

Tablo 4.1. Açık alan testinde iç kadranda geçirilen süre, dış kadranda geçirilen süre, iç/dış kadranda geçirilen süre oranı ve dışkı sayısı sonuçları. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ K grubuna göre fark; # $p<0,05$, ## $p<0,01$ S25 grubuna göre fark; + $p<0,05$ S100 grubuna göre fark.

	K	S25	S100	S260
İç Kadranda Geçirilen Süre (sn)	62,18±19,91	58,36±37,16	32,13±6,01	14,86±1,35*
Dış Kadranda Geçirilen Süre (sn)	237,83±19,92	238,89±36,83	267,87±6,00	285,11±1,35*
İç/Dış Kadranda Geçirilen Süre Oranı	0,12±0,02	0,11±0,02	0,05±0,01**, #	0,03±0,01**, ##, +
Dışkı Sayısı (n)	3,47±0,36	3,33±0,29	5,14±0,54*, #	5,86±0,66**, ##

4.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

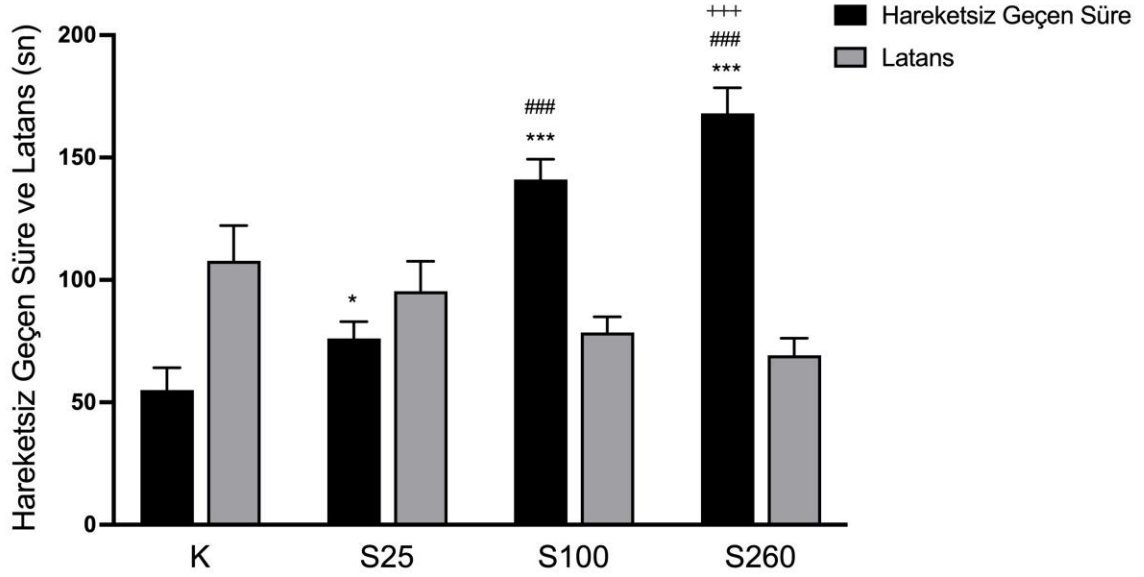
Yükseltilmiş artı labirent testinde, S100 ($p<0,05$) ve S260 ($p<0,01$) gruplarının açık kolda geçirdikleri süre K grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş, ayrıca S260 grubunun S25 grubuna kıyasla da açık kolda daha kısa süre geçirdiği saptanmıştır ($p<0,05$). S100 ve S260 gruplarının açık kolda geçirilen süre indeksi K grubuna göre anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$) (Tablo 4.2). Açık kola giriş sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir. Kapalı kolda geçirilen süreye bakıldığında, S100 ($p<0,05$) ve S260 ($p<0,001$) gruplarının kapalı kolda geçirdiği süre K grubundan anlamlı derecede daha yüksektir. Tüm bunlara ek olarak, S260 grubunun kapalı kolda geçirdiği sürenin, hem S25 ($p<0,01$) hem de S100 ($p<0,05$) grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süre, açık kolda geçirilen süre indeksi, açık kola giriş sayısı ve kapalı kolda geçirilen süre sonuçları. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 K grubuna göre fark; # p<0,05, ## p<0,01 S25 grubuna göre fark; + p<0,05 S100 grubuna göre fark.

	K	S25	S100	S260
Açık Kolda Geçirilen Süre (sn)	27,03±3,73	29,68±6,68	15,00±2,74 *	11,62±3,47 **, #
Açık Kolda Geçirilen Süre İndeksi (%)	9,01±1,24	9,89±2,22	5,08±1,01 *	4,19±1,21 *
Açık Kola Giriş Sayısı	7,10±0,45	5,20±1,05	6,40±1,07	4,50±1,08
Kapalı Kolda Geçirilen Süre (sn)	248,18±2,16	255,48±7,27	261,92±4,76 *	279,25±3,97 ***, ##, +

4.2.3. Zorunlu Yüzme Testi

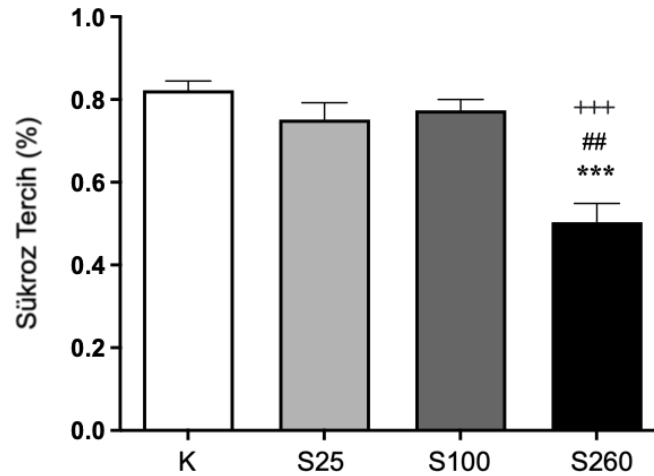
Zorunlu yüzme testinde, K grubuna (55,01±9,17 sn) göre sülfite verilen S25 (76,09±6,83 sn), S100 (141,05±8,26 sn) ve S260 (168,03±10,44 sn) gruplarında, hareketsiz olarak geçirdikleri sürelerin uzadığı görülmüştür (Şekil 4.2). Ayrıca, sülfite verilen gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında, sıçanların maruz kaldığı sülfite dozundaki artışla hareketsiz geçen sürelerin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Latans değerlerine bakıldığında, sülfite verilen grupların [S25 (95,38±12,27 sn), S100 (78,53±6,39 sn) ve S260 (69,23±6,99 sn)] sonuçlarının K grubuna (107,76±14,41 sn) göre düşük olduğu, bu düşüşün doza bağlı olarak arttığı, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Zorunlu yüzme testinde hareketsiz geçen süre ve latans değerleri. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ K grubuna göre fark; ### $p<0,001$ S25 grubuna göre fark; +++ $p<0,001$ S100 grubuna göre fark.

4.2.4. Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercihleri açısından K ($0,82\pm0,022$), S25 ($0,75\pm0,04$) ve S100 ($0,77\pm0,03$) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. S260 grubunun sükroz tercih yüzdesinin ($0,50\pm0,46$) diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

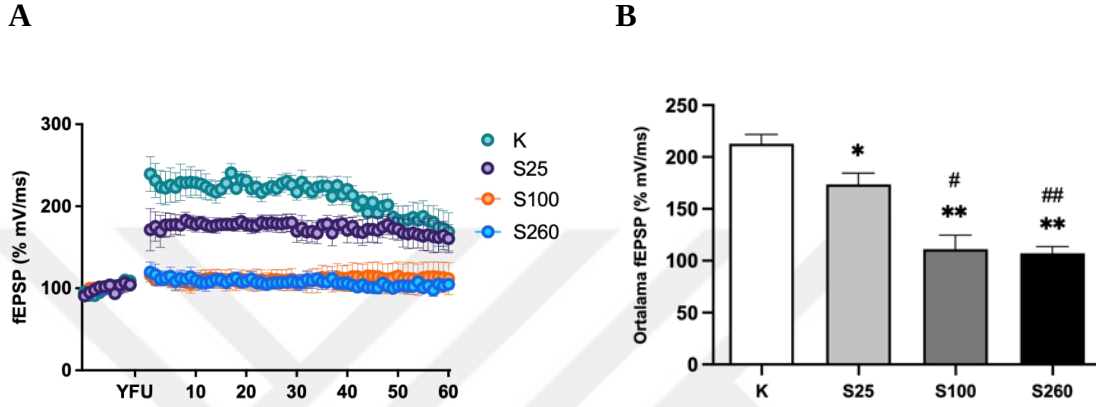


Şekil 4.3. Deney gruplarının sükroz tercih yüzdesi. *** $p<0,001$ K grubuna göre fark; ## $p<0,01$ S25 grubuna göre fark; +++ $p<0,001$ S100 grubuna göre fark.

4.3. Elektrofizyolojik Bulgular

4.3.1. Uzun Dönemli Güçlenme

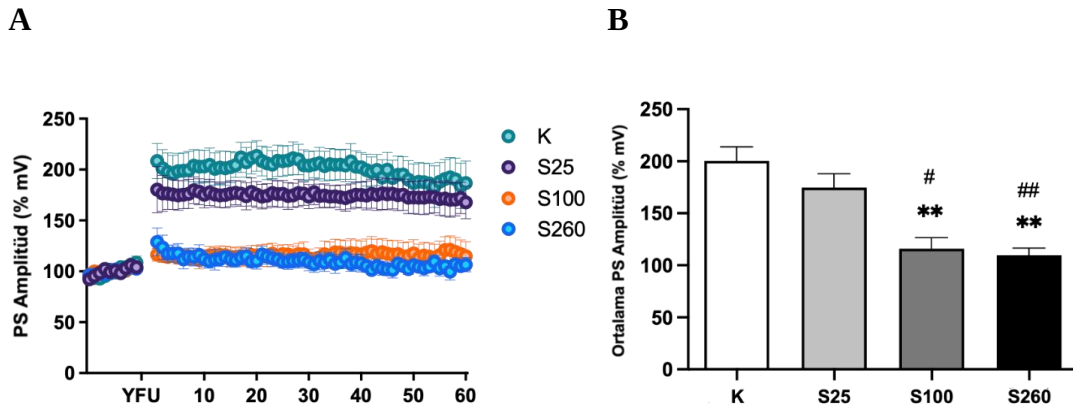
fEPSP Eğimi Değişim Yüzdeleri



Şekil 4.4. Tüm grupların zamana bağlı olarak fEPSP eğim değişim yüzdeleri (A) ve fEPSP eğim yüzde değişim ortalama değerleri (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ S25 grubuna göre fark.

S25 ($173,73 \pm 10,80$), S100 ($111,16 \pm 13,60$) ve S260 ($107,20 \pm 6,46$) gruplarının fEPSP değişim yüzdelерinin K grubuna ($212,86 \pm 8,95$) göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.4 B). Sülfid grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, S100 ve S260 gruplarının değişim yüzdelерinin S25 grubu değerine göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.4 B).

Popülasyon Spike Genliği Değişim Yüzdeleri

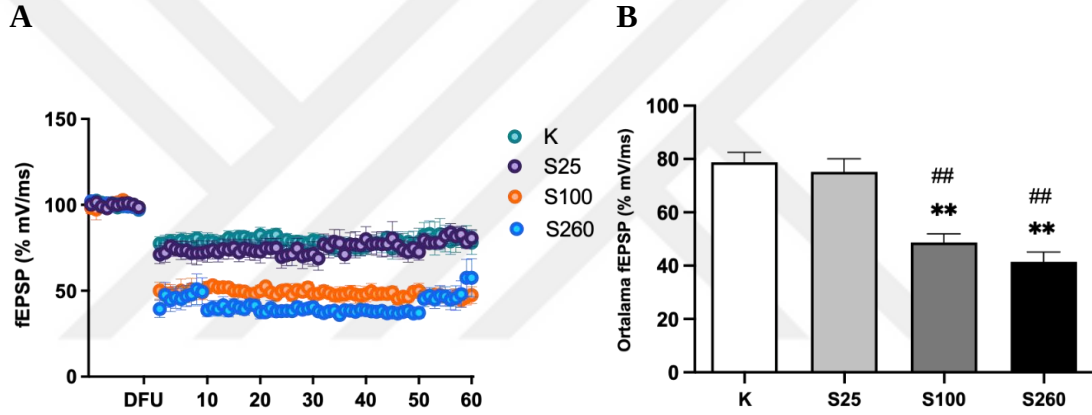


Şekil 4.5. Tüm grupların zamana bağlı olarak PS genliği yüzde değişim yüzdeleri (A) ve PS genlik yüzde değişim ortalamaları (B). ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ S25 grubuna göre fark.

PS genliği yüzdeleri değişimlerine bakıldığında, S100 ($115,91 \pm 10,59$) ve S260 ($109,78 \pm 6,75$) gruplarının genlik artış yüzdesi ortalamasının K grubuna ($200,26 \pm 13,49$) göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5 B). Bununla birlikte, S25 grubu ($174,78 \pm 13,20$) ile K grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, S100 ($p < 0,05$) ve S260 ($p < 0,01$) gruplarının genlik artış yüzdesinin S25 grubuna göre de anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5 B).

4.3.2. Uzun Dönemli Baskılanma

fEPSP Eğimi Değişim Yüzdeleri

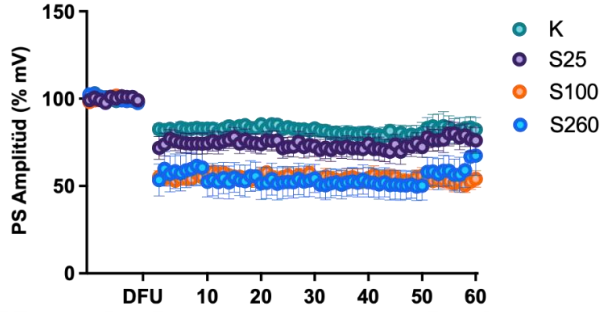


Şekil 4.6. Deney gruplarının zamana bağlı olarak fEPSP eğim değişim yüzdeleri (A) ve fEPSP eğim yüzde değişim ortalama değerleri (B). ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark; ## $p < 0,01$ S25 grubuna göre fark.

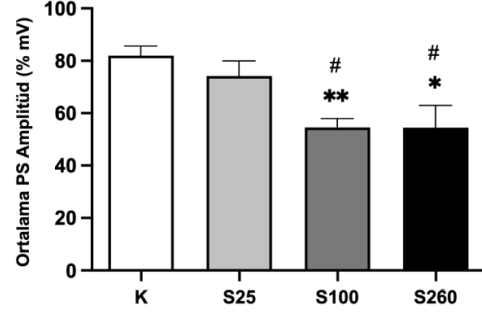
UDB fEPSP eğim yüzde değişim ortalamaları analiz edildiğinde S100 ($48,74 \pm 3,21$) ve S260 ($41,49 \pm 3,65$) gruplarının verilerinin hem K ($78,79 \pm 3,77$) hem de S25 ($75,19 \pm 4,96$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğunu saptanmıştır (Şekil 4.6 B).

Popülasyon Spike Genliği Değişim Yüzdeleri

A



B



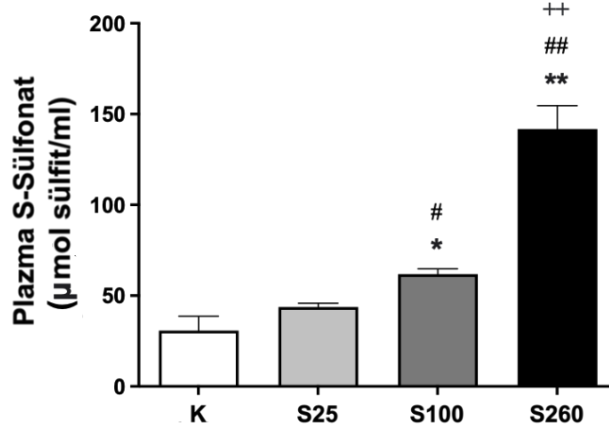
Şekil 4.7. Deney gruplarının zamana bağlı olarak PS genliği değişim yüzdeleri (A) ve PS genliği yüzde değişim ortalama değerleri (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark; # $p < 0,05$ S25 grubuna göre fark.

S100 ($54,56 \pm 3,39$) ve S260 ($54,43 \pm 8,53$) gruplarının PS genlik yüzde değişim ortalama değerlerinin hem K ($81,98 \pm 3,68$) hem de S 25 ($74,20 \pm 5,76$) grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.7. B).

4.4. Biyokimyasal Bulgular

4.4.1. Plazma-S-Sülfonat Düzeyi

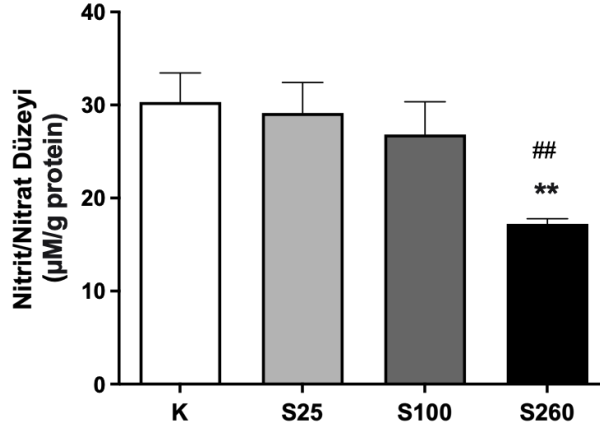
K ($30,79 \pm 7,89$ μmol sülfite/ml) grubu ile S25 ($43,74 \pm 2,11$ μmol sülfite/ml) grubunun plazma-S-Sülfonat düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.8). S100 ($61,84 \pm 2,95$ μmol sülfite/ml) ve S260 ($141,84 \pm 12,88$ μmol sülfite/ml) gruplarının plazma-S-Sülfonat seviyelerinin hem K hem de S25 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.8). Buna ilaveten S260 grubunun plazma-S-Sülfonat düzeyinin S100 grubuna göre de anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Deney gruplarının plazma-S-Sülfonat düzeyleri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ K grubuna göre fark; # $p<0,05$, ## $p<0,01$ S25 grubuna göre fark; ++ $p<0,01$ S100 grubuna göre fark.

4.4.2. Nitrit/Nitrat Düzeyi

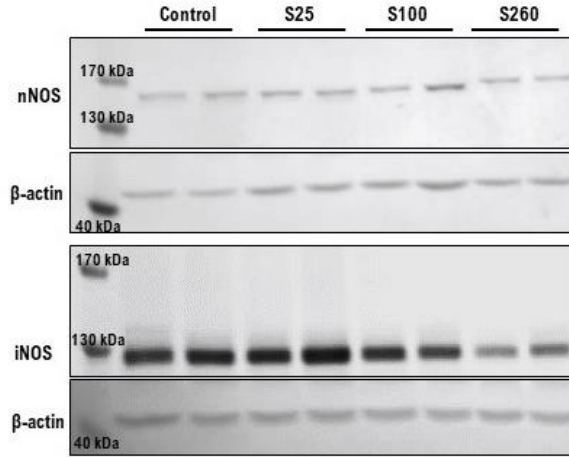
Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi K ($30,33\pm3,11$ $\mu\text{M/g}$ protein), S25 ($29,14\pm3,29$ $\mu\text{M/g}$ protein) ve S100 ($26,84\pm3,50$ $\mu\text{M/g}$ protein) gruplarının nitrit/nitrat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Yalnızca S260 ($17,23\pm0,55$ $\mu\text{M/g}$ protein) grubunun nitrit/nitrat düzeyinin K ve S25 gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Deney gruplarının Nitrit/Nitrat düzeyi. ** $p<0,01$ K grubuna göre fark; ## $p<0,01$ S25 grubuna göre fark.

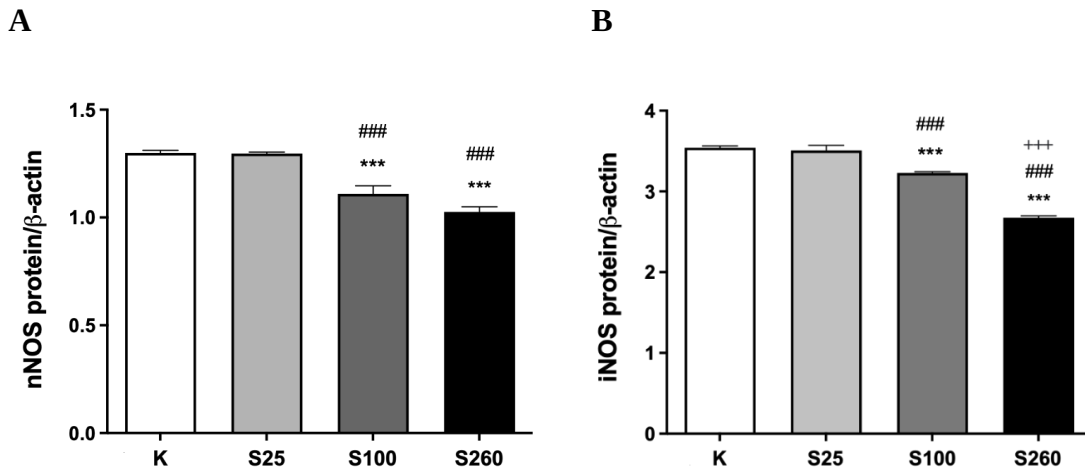
4.4.3. nNOS ve iNOS Ekspresyon Düzeyi

K, S25, S100 ve S260 gruplarının hipokampus dokularına ait nNOS ve iNOS ekspresyon düzeyi bantları Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Deney gruplarının hipokampus dokularına ait nNOS ve iNOS ekspresyon düzeyi bantları.

Elde edilen veriler incelendiğinde S100 ($1,11 \pm 0,04$) ve S260 ($1,03 \pm 0,02$) gruplarının nNOS ekspresyon düzeyi hem K ($1,30 \pm 0,01$) hem de S25 ($1,30 \pm 0,01$) grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (Şekil 4.11 A). Hipokampus dokusundaki iNOS ekspresyonları karşılaştırıldığında ise S100 ($3,23 \pm 0,02$) ve S260 ($2,68 \pm 0,02$) gruplarının iNOS düzeylerinin de hem K ($3,54 \pm 0,02$) hem de S25 ($3,51 \pm 0,06$) grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11 B). Buna ilaveten, S260 grubunun iNOS ekspresyonunun S100 grubuna göre de düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$). Hem iNOS hem de nNOS ekspresyonları açısından K ile S25 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.11. Deney gruplarının hipokampus dokularına ait nNOS ekspresyon düzeyleri (A) ve hipokampus dokularına ait iNOS ekspresyon düzeyleri (B). *** $p < 0,001$ K grubuna göre fark; ### $p < 0,001$ S25 grubuna göre fark; +++ $p < 0,001$ S100 grubuna göre fark.

5. TARTIŞMA

Sülfite ajanları, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle Avrupa Birliği tarafından gıda katkı maddesi olarak kabul edilmekte ve kullanımı ile ilgili kriterler Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin gıda katkı maddelerine ilişkin 1333/2008 sayılı yönetmeliği ile düzenlenmektedir (Vandevijvere ve ark., 2010; Aguilar ve ark., 2016). Antik çağlardan itibaren gıdaların işlenmesi amacıyla kullanılan sülfite, hazır gıda tüketiminin oldukça yaygın olduğu günümüzde, gıdaların raf ömürlerini önemli ölçüde uzatması nedeniyle yüksek miktarda kullanılmakta ve kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Abdelghany, 2015; Van Loco ve ark., 2015). Sodyum metabisülfite, antioksidan özelliği nedeniyle hem ilaç hem de gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. (Noorafshan ve ark., 2014). Tüketilen besinlerin içerikleriyle ilgili raporlar yayınlayan Mintel'in Global Yeni Ürün Veritabanı'na göre 2018 ile 2022 yılları arasında listelenen sülfite içerikli 3303 gıdanın 2227'ü sodyum metabisülfite içermektedir (Younes ve ark., 2022). Bu nedenle, bu çalışmada sülfite ajanı olarak sodyum metabisülfite kullanılmıştır. Sodyum metabisülfite kimyasal olarak %67 oranda SO₂ içermektedir (Feiner, 2006). Günümüzde, sülfite alımına bağlı toksik etkilerin tanımlanması, maruziyet düzeyinin belirlenmesi ve söz konusu etkilerin altında yatan mekanizmaların açıklığa kavuşturulması amacıyla birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır (Til ve ark., 1972b; Aguilar ve ark., 2016). Bu çalışmalardan elde edilen verilerle, Avrupa Birliği Gıda Güvenliği İdaresi tarafından yayınlanmış rapora göre, sülfite için günlük ADI, 100 katlık bir güvenlik faktörü ile 0.7 mg SO₂ eşdeğeri/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Aguilar ve ark., 2016). Ancak, 2022 yılında hazırlanan yeni bir raporda, MOE şeklinde yeni bir tanımlama yapılmış, nörotoksik etkiler dikkate alınarak önceki miktar revize edilmiş, günlük sülfite tüketimi için 38 mg SO₂ eşdeğeri/kg vücut ağırlığı şeklinde BMDL değeri belirlenmiştir (Younes ve ark., 2022). Türler ve bireyler arası farklılıklar, kronik-subkronik maruziyetteki farklılıklar göz önünde bulundurularak bu değere 80 katlık bir güvenlik faktörü uygulanmıştır (Younes ve ark., 2022). Belçika'da yaşayan insanların günlük sülfite tüketiminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, günlük alım miktarının 0.34 mg/kg düzeyinde olduğu rapor edilmiştir (Vandevijvere ve ark., 2010). Bununla birlikte, literatür çalışmalarının bir kısmı sülfite tüketiminin belirlenen

BMDL düzeyini aştığına işaret etmektedir (Leclercq ve ark., 2000; Younes ve ark., 2022). Söz gelimi, İtalya’da yaşayan bireylerin sıklıkla tükettiği 211 gıda örneğinde sülfite miktarı hesaplanmış ve soru-cevap yoluyla nüfusun bu ürünleri tüketim miktarı belirlenerek ortalama bir yetişkinin günlük sülfite alımının 0.83 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Leclercq ve ark., 2000). Ayrıca, bu çalışmada, insanlar tarafından tüketilen tüm besinlerin içerdiği sülfite miktarının dikkate alınmamış olması nedeniyle, sülfite alımının bu değerden daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. Literatür taramaları sonucu, ülkemizde günlük sülfite alımının belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmaya rastlanamamıştır. Ancak, ülkemiz kuru kayısı, kuru incir, kuru üzüm ve son yollarda kuru domates gibi yüksek düzeyde sülfite içeren kuru meyvelerin üretiminde dünyada önemli bir paya sahiptir (Arısoy ve ark., 2014; Aguilar ve ark., 2016; Tatar ve Pirinç, 2017). Bu durum, diğer ülkelere kıyasla bu ürünlerin ülkemizde tüketim miktarının daha yüksek olabileceğine ve ülkemizde sülfite toksik etkilerine ayrıca dikkat edilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Zira, Belçika ve İtalya’da, binlerce kişi üzerinde gerçekleştirilmiş araştırmalarda, sülfite alımının en önemli kaynakları arasında kuru meyvelerin yer aldığı altı çizilmiştir (Leclercq ve ark., 2000; Vandevijvere ve ark., 2010; Aguilar ve ark., 2016). Genel olarak, Türkiye’de olduğu gibi, birçok ülkede insanların günlük sülfite tüketimin BMDL düzeyini aşp aşmadığı bilinmemekte ve sülfite alım düzeyi denetlenmemektedir (Vandevijvere ve ark., 2010; FSAN, 2011; Aguilar ve ark., 2016). Diğer taraftan, yüksek miktarda sülfite alımına bağlı olarak, gastrointestinal, kardiyovasküler, hepatik, renal, sinir ve solunum sistemlerinde rahatsızlıkların ortaya çıktığı görülmektedir (Bai ve ark., 2013; Ercan ve ark., 2013; Derin ve ark., 2015; Xing ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015). Öztürk ve ark. (Öztürk ve ark., 2011) tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanlara 260 mg/kg sodyum metabisülfite verilmiş ve bu dozun uygulandığı sıçanların genel sağlık ve vücut yapılarında anormal farklılıklar görülmemiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, azami maruziyet dozu olarak 260 mg/kg seçilmiştir. Etkilerin doza bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin ve bir pencere etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için 25 ve 100 mg/kg sodyum metabisülfite dozları uygulanmıştır.

Sülfite doku bileşenleri ile enzimatik olmayan yollarla etkileşimi sonucu, plazma proteinlerinde ve sistein amino asitinde bulunan reaktif disülfite bağları in vivo olarak parçalanır ve fizyolojik pH’de oldukça kararlı olan plazma S-Sülfonat oluşur (Gunnison

ve Palmes, 1978). Plazma S-Sülfonat sıçanlarda 4 günlük bir yarı ömre sahiptir (Gunnison ve Palmes, 1978). Plazma S-Sülfonatların oluşumunun sülfid konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği hem in vivo hem de in vitro deneylerle gösterilmiştir (Gunnison ve Palmes, 1978). Gunnison ve Palmes (Gunnison ve Palmes, 1974) 120 saat boyunca 0.3, 1.0, 3.0, 4.2 ve 6.0 ppm atmosferik SO₂ konsantrasyonlarına maruz kalan insanlarda plazma S-Sülfonat seviyelerinin, her 1 ppm SO₂ artışı için 1.1 ± 0.16 nmol/ml düzeyinde arttığını bildirmişlerdir. Danışman ve ark. (Danışman ve ark., 2022) 100 ve 260 mg/kg dozunda sülfid uygulanmış sıçanların plazma S-Sülfonat düzeylerinin uygulanan doza bağlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır. Literatür çalışmalarında elde edilen bulguları destekler şekilde, çalışmamızda, plazma S-Sülfonat düzeyleri uygulanan sülfid dozuna bağlı olarak artmıştır. Bu durum, sıçanların belirlenen dozlardaki sülfite maruz bırakılabildiklerini göstermektedir.

Açık alan testi, keşif eğilimi ve anksiyete düzeyinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Conn, 2017). Anksiyete, insan hayatının birçok aşamasında yaygın olarak görülen negatif bir duygu-durum hali olarak kabul edilmekte ve stresli yaşam deneyimlerinden sonra ortaya çıkan karmaşık bir psikolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Leuner ve Shors, 2013). Benzer duygusal profillere sahip olmaları nedeniyle anksiyete ile depresyon arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Brady ve Kendall, 1992). Anksiyete bozukluğu taşıyan bireylerin %39'unun depresyon kriterlerini taşıdığı gösterilmiştir (Hunt ve ark., 2002). Benzer şekilde, komorbid depresyon tanısı konulmuş bireylerin %90'ının anksiyetik olduğu belirlenmiştir (Gorman, 1996). Bu durum, anksiyete testlerinin depresyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Brothevitskaya ve ark. (Broshevitskaya ve ark., 2021), lipopolisakkarit enjekte edilerek depresyon oluşturulan dişi ve erkek sıçanlarda, açık alan testinde iç kadranslara giriş sayısının azaldığını ve bu durumun anksiyete göstergesi olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, hafif öngörülemez kronik strese maruz bırakılan hayvanların depresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla birçok davranış testi kullanılmıştır (Hu ve ark., 2017). Bu çalışmada belirleyiciliği en yüksek olan iki testten birinin açık alan testi olduğu belirlenmiştir (Hu ve ark., 2017). Çalışmamızda sülfid gruplarının özellikle 100 mg/kg dozundan sonra iç kadranda geçirdikleri sürede ve iç/dış kadranda geçirilen süre oranında azalma; dış kadranda geçirilen sürede artış görülmüş ve bu değişimlerin yaklaşık olarak

doz bağımlı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. K grubu ile S25 grubu arasında ise dikkate değer bir fark olmadığı 25 mg/kg dozunun etki ortaya koymadığı anlaşılmıştır. S100 ve S260 grupları, çoğunlukla açık alan testi düzeneğinin duvarlarına daha yakın olan güvenli yerlerde bulunmayı tercih ederek anksiyetik bir davranış sergilemişlerdir. Bununla birlikte, S100 ve S260 gruplarının genel olarak dış kadranda kaldıkları ve keşif eğilimlerinde düşüş olduğu görülmüştür. Nitekim, keşif eğilimindeki düşüşün, anksiyetik duygu-durumda artış ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Heinz ve ark., 2021). Bu bulguyu destekler şekilde, S100 ve S260 gruplarının açık alan testi boyunca daha fazla sayıda dışkı yaptıkları ve anksiyetik duygu-durum taşıdıkları anlaşılmıştır.

Yükseltilmiş artı labirent testi, sıçanların açık alanları keşfetmeye yönelik doğal eğilimlerini belirleyen klasik bir anksiyete benzeri davranış testidir (Pellow ve ark., 1985). Iniguez ve ark. (Iniguez ve ark., 2014), sosyal yenilgi stresine maruz kalan farelerin kapalı kolları geçirdikleri sürenin kontrol grubuna göre daha uzun, açık kolda geçirdikleri zamanın ise daha kısa olduğunu tespit etmişlerdir. Yükseltilmiş artı labirent testinin kullanıldığı bir başka çalışmada, anksiyete ve depresyon tetiklenen sıçanların açık kollara giriş indekslerinin kontrole göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Aynı çalışmada, depresyon modeli uygulanan sıçanların açık kolda geçirdikleri sürede azalma ve antidepresan olan amitriptilin kullanıldığı taktirde sıçanların açık kola giriş indekslerinde düzelme olduğu saptanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Bulgularımız, açık alan testinde de görüldüğü gibi 100 mg/kg ve 260 mg/kg dozunda sülfid verilen grupların açık kollarda geçirdikleri sürede azalma; kapalı kolda geçirilen sürede ise artış olduğunu göstermektedir. Ancak bu etki 25 mg/kg dozunda görülmemektedir. Sülfid verilen sıçanların açık kola giriş sayısında da bir azalma olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, sülfid verilen grupların genel olarak kapalı kolda bulunmayı tercih etmeleri anksiyetik davranış gösterdiklerini ortaya koymaktadır.

Son zamanlarda, bazı araştırmacılar tarafından, depresyon düzeyinden ziyade stresle baş edebilme kabiliyetinin ölçüldüğü ve anti depresif etkilerin belirlenmesinde zayıf olduğu ileri sürülse de zorunlu yüzme testi, öğrenilmiş çaresizlik temelli depresif davranışların incelenmesi için sıklıkla başvurulan testler arasında yer almaktadır (Yankelevitch-Yahav ve ark., 2015; Commons ve ark., 2017; Kraeuter ve ark., 2019; Trunnell ve Carvalho,

2021). Walker ve ark. (Walker ve ark., 2019) lösinin antidepresif etkisini, zorunlu yüzme testinde hareketsiz geçen sürenin azaldığını göstererek doğrulamışlardır. Benzer şekilde, bir başka çalışmada, kolesterol düşürücü bir sitokin olan atorvastatinin antidepresif etkiler oluşturduğu, zorunlu yüzme testinde hareketsizlik süresini düşürmesiyle kanıtlamışlardır (Taniguti ve ark., 2019). Bu nedenle, çalışmamızda farklı dozlarda uygulanan sülfitin depresyona yol açıp açmadığının belirlenmesi amacıyla sıçanlar zorunlu yüzme testine tabi tutulmuş, sülfıt maruziyetinin sıçanlarda hareketsiz geçen süreyi arttırdığı ve bu etkinin doz bağımlı olarak gerçekleştiği saptanmıştır. Öte yandan, zorunlu yüzme testinde depresyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer parametre latansdır. Sosyal yenilgi stresi modeli ile depresyon tetiklenen farelere zorunlu yüzme testi yapılmış ve farelerin hareketsiz kaldıkları zamana kadar geçen süre belirlenmiştir (İñiguez ve ark., 2014). Depresyon oluşturulan gruplarda bu sürenin kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür (İñiguez ve ark., 2014). Çalışmamızda sülfıt uygulanan gruplarda sıçanların latans sürelerinin doz bağımlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Böylelikle, sülfıt maruziyetinin depresyonu tetiklediği, zorunlu yüzme testi bulgularıyla da teyit edilmiştir.

Sükroz tercih testi, deneklerin tatlı tüketim miktarının genel hoşnutluk eğilimiyle orantılı olduğu varsayımına dayalı bir testtir (Hoffman, 2015). Bu test, depresyonun temel semptomlarından biri olarak kabul edilen ve ödüle duyulan ilgide azalma veya eğlenceli aktivitelerden zevk alamama durumu olarak kabul edilen anhedoni skorlarının değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir (Eltokhi ve ark., 2021). Antidepresan tedavi uygulanan depresif farelerde, hem sükroz tercih yüzdelерinin arttığı hem de hipokampusta norepinefrin ve serotonin salınımının arttığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2018). Benzer şekilde, Tang ve ark. (Tang ve ark., 2021) kronik kısıtlama stresi modeli ile depresyon oluşturdukları farelere, antidepresif etkileri olan bir madde uyguladıklarında, sükroz tercih yüzdesinin arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, 25 ve 100 mg/kg dozunda sülfıt uygulanan gruplarının sükroz tercih yüzdelерinin K grubuna kıyasla önemli miktarda azalmadığı ancak 260 mg/kg dozu uygulandığında sükroz tercih yüzdesinin anlamlı derecede düştüğünü belirlenmiştir. Sükroz tercih testi ile belirlenen anhedoni duyudurumunun depresyonun son aşamalarından biri olduğu ve tedavisinin oldukça zor olduğu rapor edilmiştir (Craske ve ark., 2016). Bu bulguya paralel olarak, çalışmamızda, sülfitin

depresyon tetikleyici etkisini zorunlu yüzme testinde düşük dozlarda görülürken aynı etki sükröz tercih testinde 260 mg/kg gibi yüksek dozlarda tespit edilmiştir.

Hipokampus, MSS’de depresyon fizyopatolojisinde rol oynayan temel subkortikal limbik bölgeler arasında yer almaktadır (Pandya ve ark., 2012). Amigdala ve prefrontal korteks ile karşılıklı bağlantılara sahip olması nedeniyle stres ve kaygıyla ilgili davranışların kontrolünde kilit öneme sahiptir (Leuner ve Shors., 2013). Hipokampal afferentler, prefrontal korteksin yanı sıra nükleus akübenslerin ve ventral tegmental alanın kritik düzenleyicileridir. Hipokampustan ventral tegmental alana dolaylı olarak gerçekleşen uyarıcı projeksiyonun, yenilik içeren bir durum ile karşılaşıldığında ventral tegmental alan hücrelerinin ateşlenmesinin koordine edilmesinde kritik rol oynadığı ileri sürülmektedir (Lisman ve Grace, 2005). Ayrıca, bu projeksiyonun bozulması sonucu, dopaminerjik yolda bozulmalar gerçekleşebilir ve anhedoniye katkıda bulunabilir (Warner-Schmidt ve Duman, 2006). Bununla birlikte, CA1 plastisitesinin depresyon fizyopatolojisi ile ilişkili olan dopamin yollarında rol oynaması, anksiyete ve depresyon ile ilişkili fonksiyonlarda etkili olabileceğine işaret etmektedir (Yang ve ark., 2005; Kim ve ark., 2011; Rosen ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2019). Öte yandan, hipokampus, hipotalamusa olan projeksiyonları aracılığıyla HPA stres hormonu eksenini negatif yönden modüle ettiğinden stres yanıtının önemli bir bileşenidir (Nestler ve ark., 2002; McEwen, 2007). Günümüzde, stres ile depresyon arasında güçlü ve nedensel ilişkilerin olduğu belirlenmiştir (Hammen, 2005). Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada sülfat maruziyetinin hipokampal dokularda lipid peroksidasyonuna neden olduğu, oksidatif stresi indüklediği ve hücre ölümüne yol açtığı belirlenmiştir (Basaranlar ve ark., 2019). Sürekli olarak ve yüksek dozda glukokortikoid salgılanmasının hipokampusta morfolojik nöroplastisitede hasar ve piramidal hücrelerde ölümle sonuçlandığı belirlenmiştir (Sapolsky ve ark., 1985; Sapolsky, 2000). Ayrıca, Stockmeier ve ark. (Stockmeier ve ark., 2004) glukokortikoid salınımı ve ağır stres halinin, hipokampusta primidal hücrelerin apikal dentritlerinde çekilme ve atrofiye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Hipokampusta bol miktarda glukokortikoid reseptörlerinin olması, hipokampusu stres hormonu için bir hedef haline getirmektedir (Ulrich-Lai ve Herman, 2009).

MDB hastalarının post-mortem dokularında yapılan çalışmalarda, hipokampuslarda belirgin hücre kaybı olmaksızın, nöron ve nöropillerin boyutlarında küçülmeler olduğu, bu durumun hipokampal atrofiye yol açtığı görülmüştür (Stockmeier ve ark., 2004). Yapısal görüntülemelere bakıldığında da, özellikle ağır MDB hastalarının hipokampus hacimlerinde normal bireylere kıyasla düşüş olduğu belirlenmiştir (MacQueen ve ark., 2003). MDB hastalarında sıklıkla rastlanılan bulgular arasında olan hipokampus hacminde küçülmenin, tedavi sonrası normalleşmesi, hipokampusun depresyon patolojisinde dikkat çekici bir rolü olduğuna işaret etmektedir (Schweitzer ve ark., 2001; MacQueen ve ark., 2008). Ayrıca, hipokampus hacminde görülen azalmanın, MDB rahatsızlığına bağlı olarak mı ortaya çıktığı yoksa bu azalmanın mı MDB'yi tetiklediği tam olarak belirlenememiş olsa da, insan beyninde nöroplastisitenin sıklıkla görüldüğü ve çalışıldığı bölgelerden birinin hipokampus olması, MDB fizyopatolojisi ile hipokampal nöroplastisite arasındaki ilişkiyi incelemeye değer kılmaktadır (Purves ve ark., 2001).

MDB'de oldukça sık bir şekilde görülen stres düzensizliğinin hipokampal fonksiyonların bozulmasıyla ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Pittenger ve Duman, 2008). Stres, nöroplastisite mekanizmaları üzerindeki etkileri vasıtasıyla depresyon gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Pittenger ve Duman, 2008). Literatür çalışmaları, ağır geçen stres döneminin hipokampusta UDG'yi bozabildiğini ortaya koymaktadır (Foy ve ark., 1987; Shors ve ark., 1989; Kim ve Diamond, 2002). Stres durumunda, UDG'nin bozulmasının postsinaptik nöron membranında NMDA blokajı sonucu ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Kim ve Foy, 1996). NMDA reseptörlerinin sayılarının ve iletkenliklerinin artması, UDG'nin tetiklenmesi sırasında kritik önem arz eden aşamalar arasında yer almaktadır (Lüscher ve Malenka, 2012). Strese karşı endokrin bir tepki olan ve stres etkilerinin taklit edilebilmesi için kullanılan glukokortikoid düzeyinin artmasıyla UDG genliklerinde azalma olduğu görülmüştür (De Kloet, 2004). Hipokampus gibi yapılarda bulunan nöronlar arasındaki sinaptik güçte belirleyici role sahip olan UDG'nin hücresel ve moleküler mekanizmalarının, dekleratif bellek oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Koob, 2010). Dikkat çekici bir şekilde, MDB hastalarında hipokampus ve medial temporal lobun işlevine bağlı bilişsel kapasite olan dekleratif bellek eksiklikleri saptanmıştır (Zakzanis ve ark., 1998). Depresyon tanısı konulmuş bireylerde görülen temel semptomlar arasında, hafıza bozuklukları görülmektedir (Campbell ve MacQueen,

2004). Bu durum, hipokampal fonksiyonlarda bozulmaların depresyona eşlik ettiğini göstermektedir. Hipokampal UDB'nin anksiyetede düzenleyici rolü olduğu öne sürülmüştür (Martinowich ve ark., 2012). Stres, hipokampusta spin kaybı gibi sinaptik değişimlere neden olmakta ve yetişkinlerde UDB'yi güçlendirmektedir (Xu ve ark., 1997; Donohue ve ark., 2006). Stres halinin ortadan kalktığı durumlarda ise tekrar spin oluşumu gözlenmektedir (Conrad ve ark., 1999). Bu nedenle, hem UDG hem de UDB depresyon fizyopatolojisinde etkili mekanizmalar arasında yer almaktadır (Bliss ve Cooke, 2011; Liu ve ark., 2017).

Hipokampal fonksiyonlarda ve nöronal plastisitede kritik rol oynaması nedeniyle, çalışmamızda UDG ve UDB kayıtları alınmıştır. Literatür çalışmalarında, sinaptik plastisite elektrofizyolojik kayıtlarının sıklıkla alındığı yerlerden biri CA1 bölgesinin stratum radiatum tabakası olduğundan çalışmamızda CA1'in bu katmanı seçilmiştir (Maines, 1996; Tao-Cheng, 2014). Çalışmamızda, davranış deneylerinde elde edilen bulgulara paralel bir şekilde, S100 ve S260 gruplarından elde edilen UDG kayıtlarının hem fEPSP eğimlerinde hem de PS genliklerinde önemli düşüş görülmüştür. Ayrıca, S100 ve S260 gruplarında görüldüğü kadar yüksek olmasa da S25 grubunun fEPSP eğimleri ve PS genliklerinde düşüş belirlenmiştir. Sülfite verilen grupların UDG mekanizmasında doz bağımlı olmayan bir azalma olduğu ve bu azalmanın genel olarak 100 mg/kg dozundan sonra görüldüğü, 100 ile 260 mg/kg dozları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir. Danışman ve ark. (Danışman ve ark., 2022) tarafından yapılan çalışmada 100 ve 260 mg/kg dozunda sülfite uygulanmış ve sülfite kaynaklı öğrenme ve hafıza bozulmaları rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, sülfite maruziyetinin fEPSP ve PS değerlerinde düşüş neden olduğu yani UDG'yi bozduğu belirlenmiştir (Danışman ve ark., 2022). Bu bulgu bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. UDB kayıtlarına bakıldığında, 100 ve 260 mg/kg sülfite dozlarının uygulandığı sıçanlarda hem PS genliğinde hem de fEPSP eğiminde düşüş olduğu, 25 mg/kg dozunda anlamlı bir düşüşün olmadığı, yüksek doz sülfite maruziyetinin UDB'yi kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, sülfite gruplarından elde edilen UDG ve UDB kayıtları, sülfite maruziyetinin depresyona yol açabileceğini ortaya koymaktadır.

NO'nun depresyon fizyopatolojisinde rol aldığı ve norepinefrin, serotonin, dopamin, glutamat gibi depresyonda etkili olan nörotransmitterlerin NO tarafından modüle edildiği bilinmektedir (Dhir ve Kulkarni, 2011). Literatür çalışmalarının önemli bir bölümü, NO seviyesindeki artışın depresyonu arttırıcı etkisinin olduğunu ileri sürmektedir (Finkel ve ark., 1996; Yıldız ve ark., 2000; Joca ve Guimarães., 2006; Lee ve Lee, 2006; Ikenouchi-Sugita ve ark., 2009; Umathe ve ark., 2009). Örneğin, hem serotonin gerialım inhibitörü hem de NOS inhibitörü olan paroteksinin, insanlar üzerindeki rahatlatıcı etkisini NO üretimini baskılayarak gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Finkel ve ark., 1996; Umathe ve ark., 2009). L-NAME veya 7-nitroindazol gibi birçok NOS inhibitörlerinin, sıçanlar üzerinde yapılan zorunlu yüzme testlerinde hareketsizliği azaltarak yüzme aktivitesinde artışa neden olduğu, antidepresan benzeri etkiler oluşturduğu anlaşılmıştır (Yıldız ve ark., 2000; Joca ve Guimarães, 2006). Depresyon durumunda NO metabolitlerinde artış olduğu, antidepresan kullanımı sonucu ise bu metabolitlerin azaldığı bildirilmiştir (Ikenouchi-Sugita ve ark., 2009). Ayrıca, intihara meyilli kişilerde plazmada NO metabolitleri düzeyinin normal bireylere kıyasla yüksek olduğu görülmüştür (Lee ve Lee, 2006). Diğer taraftan, literatür çalışmalarının bir kısmında ise, depresyonda NO üretiminde düşüş olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin, Chrapko ve ark. (Chrapko ve ark., 2004) MDB hastalarında plazma nitrit/nitrat ve eNOS düzeyinin sağlıklı bireylere göre düşük olduğunu belirlemişlerdir (Chrapko ve ark., 2004). MDB hastalarında saptanan plazma nitrit/nitrat seviyelerinde ki düşüşün, NO sentezi için gerekli bir kofaktör olan BH4 düzeyinin azalmasından kaynaklanıyor olabileceği ifade edilmiştir (Jaffrey ve Snyder, 1995). Benzer şekilde, Hashimoto ve ark. (Hashimoto ve ark., 1990) depresif bireylerin BH4 miktarının sağlıklı bireylere göre oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, sülfite maruziyetine bağlı olarak plazma nitrit/nitrat düzeylerinde düşüş görülmüştür. En yüksek düşüş miktarının 260 mg/kg dozda sülfite maruz kalan grupta olması, sülfite maruziyetinin plazma nitrit/nitrat metabolitlerini düşürdüğünü ancak bu etkinin en çok yüksek dozda görüldüğünü göstermektedir. Sülfite maruziyetine bağlı olarak NO miktarında ki düşüşün ve NO ilişkili mekanizmaların depresyon fizyopatolojisinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

NO sentezinde görev alan NOS izoformlarının üçünün de beyinde hücresel sinyal yollarını etkileyebileceği rapor edilmiştir (Garthwaite, 2008). Ancak, NMDA

reseptörlerine yakın konumda olan nNOS, NO sentezi için ana kaynak olarak görev almaktadır (Garthwaite, 2008). Ayrıca, nNOS miktarının, duygusal biliş için önemli beyin bölgelerinden biri olan limbik sistemde oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Bredt ve ark., 1991). Buna ilaveten, nNOS'un beyinde hipokampus, hipotalamus, dorsal rafe nükleusu ve lokus seruleus gibi stres ve depresyonla ilişkili bölgelerde bulunması, depresyonla ilişkili olabileceğini işaret etmektedir (McLeod ve ark., 2001). Depresyon fizyopatolojisini araştırmak için yapılan çalışmalarda, nNOS ekspresyonunda artış (Zhou ve ark., 2018) veya azalış (Karolewicz ve ark., 2004) olduğu rapor edilmiştir. Karolewicz ve ark. (Karolewicz ve ark., 2004) depresyon tanısı konulmuş bireylerin lokus seruleus bölgelerinde normal bireylere göre nNOS immünoreaktivitesinin %44 oranda daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada, depresyon ve şizofreni hastalarında immünoreaktif paraventriküler nNOS nöronlarının sayısının sağlıklı kişilere göre düşük olduğu gösterilmiştir (Bernstein ve ark., 1998). Buna ek olarak, depresyon tanısı almış bireylerin beyin omurilik sıvılarında nNOS düzeyinin normal bireylere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Gao ve ark., 2013). Çalışmamızda 100 ve 260 mg/kg sülfid dozunun uygulandığı sıçanlarda nNOS ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Böylelikle, sülfid maruziyetinin nNOS ekspresyon düzeyini 100 mg/kg dozundan sonra doz bağımlı olarak azalttığı görülmüştür. Bilindiği üzere, yüksek düzeyde glukokortikoid sekresyonuna yol açan kortikotropin salgılatıcı hormonun (Corticotropin Releasing Hormone = CRH) dolaşım sisteminde yüksek miktarda bulunması, anksiyete ve depresyon göstergesi olarak kabul edilmektedir (Schulkin, 2011). Bu durum, depresyon ve psikoz halinde aşırı miktarda eksprese edilen CRH, arginin-vazopresin ve/veya oksitosin salınımında NO'nun düzenleyici rolü ile açıklanmaktadır (Bernstein ve ark., 1998). Glukokortikoid düzeylerinin yükselmesi, iNOS ekspresyonunda azalmaya ve iNOS indüksiyonunda bozulmaya neden olmaktadır (Szabo ve ark., 1994; Szabo, 1998). Bulgularımız değerlendirildiğinde, 25 mg/kg sülfid dozunda iNOS ekspresyon düzeyinde bir farklılık olmadığı ancak, 100 mg/kg ve üzeri dozlarda doz bağımlı bir şekilde düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, nNOS ekspresyonunda olduğu gibi, iNOS ekspresyonunun da belli bir dozun üzerinde sülfid alımından sonra düştüğünü ve bu durumun anksiyete-depresyon benzeri davranışların gelişiminde rol oynayabileceğini

ortaya göstermiştir. Hipokampusta nNOS ve iNOS düzeylerindeki düşüş doğal olarak NO düzeylerinde de düşüşe neden olmuştur.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmamızda, yüksek dozda sülfite maruz kalan sıçanların anksiyete-depresyon benzeri davranış sergiledikleri görülmüştür.
- Hipokampusta UDG'nin bozulması ve UDB'nin kolaylaşmasının tespiti ile de sülfitin anksiyete-depresyonu tetikleyici etkisi olabileceği doğrulanmış ve bu etkide nöronal plastisite değişiminin rolü gösterilmiştir.
- Sinaptik plastisitenin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinen NO'nun sülfite maruziyeti sonucu hipokampusta azaldığı tespit edilmiştir.
- Sülfite maruziyeti sonucunda NO düzeyindeki azalmanın, NO sentezinden sorumlu iNOS ve nNOS düzeylerindeki düşüş ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur.
- Bu çalışmayla, sülfite maruziyetine bağlı olarak anksiyete-depresyon görülme sıklığında artış olabileceği saptanmıştır. Sülfitin bu etkisinde NO'nun rolü ortaya konulmuş ancak hipokampusta düşüş saptanan iNOS ve nNOS aktivitelerinin de saptanması gerekmektedir.
- Bunun yanı sıra sinaptik plastisitede rol oynayan dopamin, serotonin gibi nörotransmitterlerin sülfite toksisitesine bağlı olarak nasıl bir değişim gösterdiği, bu değişimin anksiyete-depresyona eğilime katkısı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abdelghany TM. Safe food additives. A review. Journal of Biological Chemistry. 2015; 32: 402-437.

Agar E. İnsan Fizyolojisi. İstanbul; 2021, p:619-620.

Aguilar F, Crebelli R, Domenico A, Dusemund B, Frutos MJ, Galtier P, ve ark. Scientific opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. Efsa Journal. 2016; 14: 4438.

Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal–anterior thalamic axis. Behavioral and Brain Sciences. 1999; 22: 425-444.

Ahnaou A, White E, Biermans R, Manyakov N, Drinkenburg W. In vivo plasticity at hippocampal schaffer collateral-CA1 synapses: Replicability of the LTP response and pharmacology in the long-evans rat. Neural Plasticity. 2020; 2020:1-24.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. Biochemical Journal. 2001; 357: 593-615.

Ali EM, Soha H, Mohamed TM. Nitric oxide synthase and oxidative stress: Regulation of nitric oxide synthase. Oxidative stress-molecular mechanisms and biological effects. InTech. 2012: 61-72.

Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. Annals of Indian Academy of Neurology. 2012; 15: 239-246.

Andersen P, Bliss T, Skrede K. Unit analysis of hippocampal population spikes. Experimental Brain Research. 1971; 13: 208-221.

Ari C, D'Agostino DP, Diamond DM, Kindy M, Park C, Kovács Z. Elevated plus maze test combined with video tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2019: e58396.

Arısoy H, Bayramoğlu Z, Çelik Y, Özer OO. Regional concentration of turkish dried fruits exports. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*. 2014; 1: 269-280.

Bai J, Lei P, Zhang J, Zhao C, Liang R. Sulfite exposure-induced hepatocyte death is not associated with alterations in p53 protein expression. *Toxicology*. 2013; 312: 142-148.

Bailey S, Rapson T, Johnson-Winters K, Astashkin AV, Enemark JH, Kappler U. Molecular basis for enzymatic sulfite oxidation: How three conserved active site residues shape enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 2053-2063.

Basaranlar G, Derin N, Manas CK, Tanrioer G, Aslan M. The effects of sulfite on cPLA2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2019; 123: 453-458.

Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358: 55-68.

Bernstein H-G, Stanarius A, Baumann B, Henning H, Krell D, Danos P, ve ark. Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: Reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics. *Neuroscience*. 1998; 83: 867-875.

Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008; 9: 182-194.

Bitiktaş S, Tan B, Kavraal Ş, Yousef M, Bayar, Y, Dursun N, ve ark. The effects of intra-hippocampal L-thyroxine infusion on long-term potentiation and long-term depression: A possible role for the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin receptor. *Journal of Neuroscience Research*. 2016; 8: 1621-1632.

Bliss TV, Cooke SF. Long-term potentiation and long-term depression: A clinical perspective. *Clinics*. 2011; 66: 3-17.

Bliss TV, Collingridge GLA. synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361 (6407): 31-39.

Bliss TV, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*. 1973; 232: 331-356.

- Bonfanti L, Peretto P. Adult neurogenesis in mammals—a theme with many variations. *European Journal of Neuroscience*. 2011; 34: 930-950.
- Brady EU, Kendall PC. Comorbidity of anxiety and depression in children and adolescents. *Psychological Bulletin*. 1992; 111: 244.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mrna are discretely localized in neuronal populations of the mammalian cns together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 1991; 7: 615-624.
- Broshevitskaya N, Pavlova I, Zaichenko M, Gruzdeva V, Grigoryan G. Effects of early proinflammatory stress on anxiety and depression-like behavior in rats of different ages. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2021; 51: 390-401.
- Bunney WE, Bunney BG. Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 22: 335-345.
- Byrne J. *Learning and memory: A comprehensive reference*. Academic Press; 2017.
- Campbell S, MacQueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2004; 29: 417-426.
- Carocho M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira IC. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014; 13: 377-399.
- Cheng F, Ma C, Wang X, Zhai C, Wang G, Xu X, et al. Effect of traditional chinese medicine formula sinisan on chronic restraint stress-induced nonalcoholic fatty liver disease: A rat study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17: 1-10.
- Chrapko WE, Jurasz P, Radomski MW, Lara N, Archer SL, Le Mellédo J-M. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2004; 56: 129-134.
- Cohen HJ, Fridovich I. Hepatic sulfite oxidase: The nature and function of the heme prosthetic groups. *Journal of Biological Chemistry*. 1971; 246: 367-373.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*. 2010; 11: 459-473.

Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chemical Neuroscience*. 2017; 8: 955-960.

Conn PM. Animal models for the study of human disease. Academic Press; 2017.

Conrad CD, Magariños AM, LeDoux JE, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*. 1999;5: 113: 902.

Craske MG, Meuret AE, Ritz T, Treanor M, Dour HJ. Treatment for anhedonia: A neuroscience driven approach. *Depression and Anxiety*. 2016; 33: 927-938.

Danışman B, Akçay G, Gökçek Saraç Ç, Kantar D, Aslan M, Derin N. The role of acetylcholine on the effects of different doses of sulfite in learning and memory. *Neurochemical Research*. 2022; 47: 3331-3343.

Dastgerdi HH, Radahmadi M, Reisi P. Comparative study of the protective effects of crocin and exercise on long-term potentiation of ca1 in rats under chronic unpredictable stress. *Life Sciences*. 2020; 256: 118018.

De Kloet ER. Hormones and the stressed brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1018: 1-15.

de Moura Alvorcem L, da Rosa MS, Glänzel NM, Parmeggiani B, Grings M, Schmitz F, ve ark. Disruption of energy transfer and redox status by sulfite in hippocampus, striatum, and cerebellum of developing rats. *Neurotoxicity Research*. 2017; 32: 264-275.

Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*. 2017; 27: 101-111.

Derin N, Kencebay C, Bulbul M, Korgun DK, Ocak AG, Aslan M. Effects of ingested sulfite on glutamate synthesis and release in the hippocampus. Paper presented at the *Acta Physiologica*. 2015;215:67-67.

Derin N, Yargıçoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Alıcıgüzel Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicology and Industrial Health*. 2006; 22: 233-240.

Dhir A, Kulkarni S. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 568: 177-185.

Dhir A, Kulkarni S. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*. 2011; 24: 125-131.

Dogan H, Oztop D, Eker OO, Ozsoy SD. Effects of presence of maternal psychiatric disorders on attachment to parents and peers in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*. 2017; 27: 181.

Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, Rodriguez JJ, Cordero MI, Sandi C, ve ark. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: A stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience*. 2006; 140: 597-606.

Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: Regulation by stress and antidepressants. *Biological psychiatry*. 2006; 59: 1136-1143.

Eby GA, Eby KL. Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Medical Hypotheses*. 2006; 67: 362-370.

El-Samragy Y. Food additive. *InTech*. 2012.

Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Baseline depression-like behaviors in wild-type adolescent mice are strain and age but not sex dependent. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2021; 15: 759574.

Ercan S, Basaranlar G, Gungor NE, Kencebay C, Sahin P, Celik-Ozenci C, ve ark. Ghrelin inhibits sodium metabisulfite induced oxidative stress and apoptosis in rat gastric mucosa. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 56: 154-161.

Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology*. 2002; 135: 1079-1095.

Fan A, Book S. Sulfite hypersensitivity: A review of current issues. *Journal of Application of Nutrition*. 1987; 39: 71-78.

Fan Y, Pestke K, Feeser M, Aust S, Pruessner JC, Böker H, ve ark. Amygdala–hippocampal connectivity changes during acute psychosocial stress: Joint effect of early life stress and oxytocin. *Neuropsychopharmacology*. 2015; 40: 2736-2744.

Fazio T, Warner C. A review of sulphites in foods: Analytical methodology and reported findings. *Food Additives & Contaminants*. 1990; 7: 433-454.

Feiner G. Additives: Proteins, carbohydrates, fillers and other additives. *Meat Products Handbook*. 2006: 89-141.

Finkel MS, Laghrissi-Thode F, Pollock BG, Rong J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacology Bulletin*. 1996;32:653-658.

Floros J. Food and diet in greece from ancient to present times. *Proceedings of the Indigenous Knowledge Conference*. 2004.

Forstermann U, Ishii K. Measurement of cyclic GMP as an indicator of nitric oxide production. *Methods in Nitric Oxide Research*. New York: Wiley. 1996, p:555-566.

Foy MR, Stanton ME, Levine S, Thompson RF. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*. 1987; 48: 138-149.

FSAN Food Standarts Australlia New Zealand. National coordinated survey of sulphite levels in sausages, cordial and dried fruit. 2011.

Gao SF, Qi XR, Zhao J, Balesar R, Bao AM, Swaab DF. Decreased NOS1 expression in the anterior cingulate cortex in depression. *Cerebral Cortex*. 2013; 23: 2956-2964.

Garcia-Fuentes AR, Wirtz S, Vos E, Verhagen H. Short review of sulphites as food additives. *European Journal of Nutrition & Food Safety*. 2015; 5: 113-120.

Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27: 2783-2802.

Gorman JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depression and Anxiety*. 1996; 4: 160-168.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126: 131-138.

Green RC, Cupples LA, Kurz A, Auerbach S, Go R, Sadovnick D, ve ark. Depression as a risk factor for alzheimer disease: The mirage study. *Archives of Neurology*. 2003; 60: 753-759.

Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Marcowich GF, Amaral AU, de Souza Wyse AT, ve ark. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: Potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene*. 2013; 531: 191-198.

Güneş FE. Sülfidler ve aşırı duyarlılık reaksiyonları. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2014; 4: 173-181.

Gunnison A. Sulphite toxicity: A critical review of in vitro and in vivo data. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1981; 19: 667-682.

Gunnison A, Dulak L, Chiang G, Zaccardi J, Farruggella T. A sulphite-oxidase-deficient rat model: Subchronic toxicology. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1981; 19: 221-232.

Gunnison AF, Palmes E. S-sulfonates in human plasma following inhalation of sulfur dioxide. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 1974; 35: 288-291.

Gunnison AF, Jacobsen DW, Schwartz HJ. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 1987; 17: 185-214.

Gunnison AF, Palmes E. Species variability in plasma s-sulfonate levels during and following sulfite administration. *Chemico-Biological Interactions*. 1978; 21: 315-329.

Hammen C. Stress and depression. *Annual Review of Clinical Psychology*. 2005; 1: 293-319.

Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *European Neuropsychopharmacology*. 2004; 14: 274-281.

Harraan D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journals of Gerontology*. 1956;11:298-300.

Harvey SB, Nelsestuen GL. Reaction of nitric oxide and its derivatives with sulfites: A possible role in sulfite toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1995; 1267: 41-44.

Hashimoto R, Ozaki N, Ohta T, Kasahara Y, Kaneda N, Nagatsu T. Plasma tetrahydrobiopterin levels in patients with psychiatric disorders. *Neuropsychobiology*. 1990; 23: 140-143.

Hasler G. Pathophysiology of depression: Do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry*. 2010; 9: 155-161.

Heinz DE, Schöttle VA, Nemcova P, Binder FP, Ebert T, Domschke K, ve ark. Exploratory drive, fear, and anxiety are dissociable and independent components in foraging mice. *Translational Psychiatry*. 2021; 11: 318.

HHP Harvard Health Publishing. What causes depression? 2009. Retrieved from <https://www.health.harvard.edu/mind-and-mood/what-causes-depression>

Hoffman KL. Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals. Woodhead Publishing; 2015.

Hölscher C, McGlinchey L, Anwyl R, Rowan MJ. HFS-induced long-term potentiation and LFS-induced depotentiation in area CA1 of the hippocampus are not good models for learning. *Psychopharmacology*. 1997; 130: 174-182.

Hu C, Luo Y, Wang H, Kuang S, Liang G, Yang Y, ve ark. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PloS One*. 2017; 12: e0185129.

Hunt C, Issakidis C, Andrews G. Dsm-iv generalized anxiety disorder in the australian national survey of mental health and well-being. *Psychological Medicine*. 2002; 32: 649-659.

Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive

disorder: Comparison between milnacipran and paroxetine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2009; 33: 1451-1453.

Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, ve ark. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*. 2014; 17: 247-255.

Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: A neural messenger. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1995; 11: 417-440.

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series. 2000.

Joca SRL, Guimarães FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology*. 2006; 185: 298-305.

Johnson JL, Rajagopalan K. Purification and properties of sulfite oxidase from human liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 1976; 58: 543-550.

Johnson JL, Waud WR, Rajagopalan K, Duran M, Beemer FA, Wadman SK. Inborn errors of molybdenum metabolism: Combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980; 77: 3715-3719.

Kandel E, Schwartz J, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*, 5th ed. McGraw-Hill Companies, New York, 2013.

Karolewicz B, Bruce KH, Lee B, Paul IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice: 2. Chronic treatment results in downregulation of cortical β -adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*. 1999; 372: 215-220.

Karolewicz B, Szebeni K, Stockmeier C, Konick L, Overholser J, Jurjus G, ve ark. Low nnos protein in the locus coeruleus in major depression. *Journal of Neurochemistry*. 2004; 91: 1057-1066.

Kencebay C, Derin N, Ozsoy O, Kipmen-Korgun D, Tanrioer G, Öztürk N, ve ark. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 52: 129-136.

Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002; 3: 453-462.

Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through n-methyl-d-aspartate receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93: 4750-4753.

Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, ve ark. The structural and functional connectivity of the amygdala: From normal emotion to pathological anxiety. *Behavioural Brain Research*. 2011; 223: 403-410.

Koob GF. *Encyclopedia of behavioral neuroscience*. Elsevier; 2010.

Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The forced swim test for depression-like behavior in rodents. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*. 2019: 75-80.

Kronmüller K-T, Pantel J, Köhler S, Victor D, Giesel F, Magnotta VA, ve ark. Hippocampal volume and 2-year outcome in depression. *The British Journal of Psychiatry*. 2008; 192: 472-473.

Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet Oncology*. 2001; 2: 149-156.

Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: Perspectives on new treatment strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013; 31: 761-777.

Leclercq C, Molinaro M, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy-analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Additives & Contaminants*. 2000; 17: 979-989.

Lee BH, Lee SW, Yoon D, Lee HJ, Yang JC, Shim SH, ve ark. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology*. 2006; 53: 127-132.

Leiper J. Nitric oxide. *Textbook of Vascular Medicine*. 2019: 117-126.

Leuner B, Shors T. Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience*. 2013; 251: 108-119.

Li H, Poulos TL. Structure–function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99: 293-305.

Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*. 2005; 46: 703-713.

Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, ve ark. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*. 2018; 13: 1686-1698.

Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, ve ark. The role of neural plasticity in depression: From hippocampus to prefrontal cortex. *Neural Plasticity*. 2017; 2017: 6871089.

Lu FC. Acceptable daily intake: Inception, evolution, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1988; 8: 45-60.

Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4: a005710.

MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT , ve ark. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100: 1387-1392.

MacQueen GM, Yucel K, Taylor VH, Macdonald K, Joffe R. Posterior hippocampal volumes are associated with remission rates in patients with major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2008; 64: 880-883.

Madar Z, Kalet-Litman S, Stark AH. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology*. 2005; 73: 106-112.

Maines MD. Nitric oxide synthase: Characterization and functional analysis. Academic Press; 1996.

Manahan-Vaughan D, Herrero I, Reymann K, Sanchez-Prieto J. Presynaptic group 1 metabotropic glutamate receptors may contribute to the expression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience*. 1999; 94: 71-82.

Martinowich K, Schloesser RJ, Lu Y, Jimenez DV, Paredes D, Greene JS, et al. Roles of p75NTR, long-term depression, and cholinergic transmission in anxiety and acute stress coping. *Biological Psychiatry*. 2012; 71: 75-83.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiological Reviews*. 2007; 87: 873-904.

McLeod T, Lopez-Figueroa A, Lopez-Figueroa M. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacology Bulletin*. 2001; 35: 24-41.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Geng H, Bai Q, Bai W, et al. Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice. *Environmental Research*. 2003; 93: 285-292.

Mezuk B, Eaton WW, Albrecht S, Golden SH. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: A meta-analysis. *Diabetes Care*. 2008; 31: 2383-2390.

Mishra D, Patel V, Banerjee D. Nitric oxide and s-nitrosylation in cancers: Emphasis on breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2020; 14: 1178223419882688.

Mitsumashi H, Nojima Y, Tanaka T, Ueki K, Maezawa A, Yano S, et al. Sulfite is released by human neutrophils in response to stimulation with lipopolysaccharide. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998; 64: 595-599.

Molnár E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2011.

Morikawa Y, Yamamoto T, Higashino K. Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes. *Histology and Histopathology*. 1997;12:513-524.

Moss D. Psychological perspectives: Anxiety disorders: Identification and intervention. *Performance Anxiety: Origins and Management*. 2002; 1: 1-49.

Musial A, Eissa NT. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 24268-24273.

Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 2014; 511: 348-352.

Nair B, Elmore AR. Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite. *International Journal of Toxicology*. 2003; 22: 63-88.

Navarro AAL, Sikoglu EM, Heinze CR, Rogan RC, Russell VA, King JA, ve ark. Effect of diet on brain metabolites and behavior in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Brain Research*. 2014; 270: 240-247.

Ned H, Kalin MD. The critical relationship between anxiety and depression. *The American Journal of Psychiatry*. 2020;177:365-367

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002; 34: 13-25.

Noorafshan A, Asadi-Golshan R, Monjezi S, Karbalay-Doust S. Sodium metabisulphite, a preservative agent, decreases the heart capillary volume and length, and curcumin, the main component of curcuma longa, cannot protect it. *Folia Biologica*. 2014; 60: 275-280.

Noorafshan A, Vafabin M, Karbalay-Doust S, Asadi-Goishan R. Efficacy of Curcumin in the Modulation of Anxiety Provoked by Sulfite, a Food Preservative, in Rats. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2017;22:144-148.

Oliveira R, Guimarães F, Deakin J. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41: 333-341.

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, ve ark. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016; 2: 1-20.

Öztürk N, Yargicoglu P, Derin N, Akpinar D, Agar A, Aslan M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011; 33: 244-254.

Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, Degraff W, Friedman N, ve ark. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine*. 1995; 182: 1469-1479.

Palmer RM, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.

Pandya M, Altinay M, Malone DA, Anand A. Where in the brain is depression? *Current Psychiatry Reports*. 2012; 14: 634-642.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985; 14: 149-167.

PEU Parliament of the European Union Union, Regulation (EC) No 1333/2008 of the european parliament and of the council of 16 december 2008 on food additives. *The Official Journal of the European Union*. 2008; 354: 16-33.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33: 88-109.

Prenner B, Stevens JJ. Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulphite. *Annals of Allergy*. 1976;37:180-182.

Pundir CS, Rawal R. Determination of sulfite with emphasis on biosensing methods: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013; 405: 3049-3062.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, Lamantia A, McNamara J, ve ark. Long-term synaptic potentiation. *Neuroscience (2nd Edition)*. 2001.

Quattrucci E, Masci V. Nutritional aspects of food preservatives. *Food Additives & Contaminants*. 1992; 9: 515-525.

Ramesh KSV, Swetha P, Nirnmal M, Alla RK. Nitrous oxide – “Double edged sword”. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 28(1), 37-43 (2014).

Remes O, Brayne C, Van Der Linde R, Lafortune L. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain and Behavior*. 2016; 6: e00497.

Richter-Levin G, Xu L. How could stress lead to major depressive disorder? International Brain Research Organization Reports. 2018; 4: 38-43.

Roddy DW, Farrell C, Doolin K, Roman E, Tozzi L, Frodl T, et al. The hippocampus in depression: More than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression. Biological Psychiatry. 2019; 85: 487-497.

Rosen GM, Tsai P, Pou S. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. Chemical Reviews. 2002; 102: 1191-1200.

Rosen ZB, Cheung S, Siegelbaum SA. Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. Nature Neuroscience. 2015; 18: 1763-1771.

Saleewong T, Srikiatkachorn A, Maneepark M, Chonwerayuth A, Bongsebandhu-phubhakdi S. Computational approach to long-term potentiation in hippocampal CA1 area describes the efficacy of stimulation patterns. Asian Biomedicine. 2013; 7: 347-356.

Salmani ME, Fathollahi Y, Mirnajafizadeh J, Semnanian S. Epileptogenic insult alters endogenous adenosine control on long-term changes in synaptic strength by theta pattern stimulation in hippocampus area ca1. Synapse. 2011; 65: 189-197.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Archives of General Psychiatry. 2000; 57: 925-935.

Sapolsky RM. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001; 98: 12320-12322.

Sapolsky RM, Krey LC, McEWEN BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. Journal of Neuroscience. 1985; 5: 1222-1227.

Schulkin J. Evolutionary conservation of glucocorticoids and corticotropin releasing hormone: Behavioral and physiological adaptations. Brain Research. 2011; 1392: 27-46.

Schwarz G. Molybdenum cofactor and human disease. Current Opinion in Chemical Biology. 2016; 31: 179-187.

Schweitzer I, Tuckwell V, Ames D, O'Brien J. Structural neuroimaging studies in late-life depression: A review. The World Journal of Biological Psychiatry. 2001; 2: 83-88.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1957; 20: 11.

Shors TJ, Seib TB, Levine S, Thompson RF. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science*. 1989; 244: 224-226.

Simon RA. Sulfite challenge for the diagnosis of sensitivity. *Allergy and Asthma Proceedings*. 1989.

Škrinjar MM, Nemet NT. Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta Periodica Technologica*. 2009: 195-209.

Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biological Psychiatry*. 2004; 56: 640-650.

Street L. Guidance on food additives. In: Food Safety Authority of Ireland. 2010.

Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*. 2000; 157: 1552-1562.

Sun DG, Kang H, Tetteh H, Su J, Lee J, Park SW, et al. Long term potentiation, but not depression, in interlamellar hippocampus CA1. *Scientific Reports*. 2018; 8: 1-9.

Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Affective Disorders*. 2001; 63: 221-224.

Szabo C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase by glucocorticoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 851: 336-341.

Szabo C, Thiemermann C, Wu C-C, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91: 271-275.

Takahama U, Hirota S. Effects of the food additive sulfite on nitrite-dependent nitric oxide production under conditions simulating the mixture of saliva and gastric juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60: 1102-1112.

- Tang M, Chen M, Li Q. Paeoniflorin ameliorates chronic stress-induced depression-like behavior in mice model by affecting ERK1/2 pathway. *Bioengineered*. 2021; 12: 11329-11341.
- Taniguti E, Ferreira Y, Stupp I, Fraga-Junior E, Doneda D, Lopes L, et al. Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. *Brain Research Bulletin*. 2019; 146: 279-286.
- Tao-Cheng JH. Activity-induced fine structural changes of synapses in mammalian central nervous system. In *The synapse*. Elsevier; 2014, p. 343-376.
- Tatar M, Piriñ V. Potential of industrial tomato production of southeast anatolian region in turkey. *Journal of the Institute of Science and Technology*. 2017; 7: 11-20.
- Taylor SL, Higley NA, Bush RK. Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*. 1986; 30: 1-76.
- Thibaut F. Anxiety disorders: A review of current literature. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2022;19:87-88.
- Til H, Feron V. Toxicology of sulphiting agents i: Animal studies. *Food Additives & Contaminants*. 1992; 9: 587-595.
- Til H, Feron V, De Groot A. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1972a; 10: 291-310.
- Til H, Feron V, De Groot A, Van der Wal P. The toxicity of sulphite. Ii. Short-and long-term feeding studies in pigs. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1972b; 10: 463-473.
- Tomaska L, Brooke-Taylor S. Food additives: Food additives–General. In *the Encyclopedia of Food Safety*. 2014, p. 449-454.
- Trunnell ER, Carvalho C. The forced swim test has poor accuracy for identifying novel antidepressants. *Drug Discovery Today*. 2021; 26: 2898-2904.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009; 10: 397-409.

- Umathe S, Bhutada P, Jain N, Mundhada Y, Borkar S, Dhumal B. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. *Nitric Oxide*. 2009; 21: 140-147.
- Vally H, Misso NL. Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2012; 5: 16-23.
- Vally H, Misso NL, Madan V. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009; 39: 1643-1651.
- Van der Kooy K, Van Hout H, Marwijk H, Marten H, Stehouwer C, Beekman A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: Systematic review and meta analysis. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A Journal of The Psychiatry of Late Life and Allied Sciences*. 2007; 22: 613-626.
- Van Loco J, Vandevijvere S, Cimenci O, Vinkx C, Goscinnny S. Dietary exposure of the belgian adult population to 70 food additives with numerical adi. *Food Control*. 2015; 54: 86-94.
- Vandevijvere S, Temme E, Andjelkovic M, De Wil M, Vinkx C, Goeyens L, ve ark. Estimate of intake of sulfites in the belgian adult population. *Food Additives and Contaminants*. 2010; 27: 1072-1083.
- Vasile M. Sulfites and foods, toxicity and hypersensitivity. *Journal of EcoAgriTourism*. 2010; 6: 63-66.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*. 2000; 60: 203-212.
- Velayutham M, Hemann CF, Cardounel AJ, Zweier JL. Sulfite oxidase activity of cytochrome c: Role of hydrogen peroxide. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; 5: 96-104.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007; 2: 322-328.

Walker AK, Wing EE, Banks WA, Dantzer R. Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. *Molecular Psychiatry*. 2019; 24: 1523-1532.

Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: Opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*. 2006; 16: 239-249.

Wedzicha B. Chemistry of sulphiting agents in food. *Food Additives & Contaminants*. 1992; 9: 449-459.

Wegener G, Volke V, Rosenberg R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 130: 575-580.

WHO World Health Organization. Depression and other common mental disorders: Global health estimates. 2017.

WHO World Health Organization. Depression. 2021. Retrieved from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>

Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, et al. Chemical biology of nitric oxide: Regulation and protective and toxic mechanisms. *Current Topics in Cellular Regulation*. 1996; 34: 159-187.

Wyse AT, Grings M, Wajner M, Leipnitz G. The role of oxidative stress and bioenergetic dysfunction in sulfite oxidase deficiency: Insights from animal models. *Neurotoxicity Research*. 2019; 35: 484-494.

Xing WM, Yuan TJ, Xu JD, Gu LL, Liang P, Lu H. Proteomic identification of mitochondrial targets involved in andrographolide sodium bisulfite-induced nephrotoxicity in a rat model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015; 40: 592-599.

Xiong H, Zhang J, Liu J. Hippocampus, spatial memory and neuroimmunomodulation. In *Neuroimmune pharmacology*. Springer; 2017, p. 69-79.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature*. 1997; 387: 497-500.

Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4288-4293.

Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2015;97:e52587.

Yıldız F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*. 2000; 149: 41-44.

Younes M, Aquilina G, Castle L, Degen G, Engel KH, ve ark. Follow-up of the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228). *EFSA Journal*. 2022; 20: e07594.

Zakzanis KK, Leach L, Kaplan E. On the nature and pattern of neurocognitive function in major depressive disorder. *Neuropsychiatry, Neuropsychology, & Behavioral Neurology*. 1998;11:111-119.

Zentner J. *Surgical Treatment of Epilepsies*. 2020, p: 87-128.

Zhang M, Liu Y, Zhao M, Tang W, Wang X, Dong Z, ve ark. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *The Journal of Headache and Pain*. 2017; 18: 1-10.

Zhang Q, Bai Y, Yang Z, Tian J, Meng Z. The molecular mechanisms of sodium metabisulfite on the expression of K ATP and L-Ca₂⁺ channels in rat hearts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015; 72: 440-446.

Zhang Q, Hu DX, He F, Li CY, Qi GJ, Cai HW, ve ark. Locus coeruleus-CA1 projections are involved in chronic depressive stress-induced hippocampal vulnerability to transient global ischaemia. *Nature Communications*. 2019; 10: 2942.

Zhang X, Li D. Peroxynitrite mediated oxidation damage and cytotoxicity in biological systems. *Life Science Journal*. 2006; 3: 41-44.

Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009; 20: 223-230.

Zhou QG, Zhu XH, Nemes AD, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. *IBRO Reports*. 2018; 5: 116-132.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger H, Maggi C, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance p. *The Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94: 2036-2044.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa	Uyruğu	T.C.
Soyadı	MUNZUROĞLU	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Baskil Lisesi	2003
Lisans	Fırat Üniversitesi-Fizik Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi-Biyofizik ABD	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Arş. Gör.	Ege Üniversitesi	2014-2017
Arş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2017-2023

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	97.5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların Otonom Sinir Sistemi Regülasyonu ve Duygu Durumu Üzerine Etkilerinin Araştırılması	Ege Üniversitesi	2015-2017
Prenatal, postnatal sülfid maruziyetinin davranış ve öğrenme üzerine etkilerinin ve moleküler	TÜBİTAK	2017-2020

mekanizmasının araştırılması		
Olifenolik Ekstrakt Yenidoğan Sıçanlarda Sevofluranla Oluşan Nörotoksisiteyi Azaltabilir Mi?	Akdeniz Üniversitesi	2019-2021
Sıçanlarda Erken ve Geç Yenidoğan Dönemlerinde Farklı Sevoflurane Uygulamalarının Preadölesan Dönemde Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkileri	Akdeniz Üniversitesi	2021-2022

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2017-2021

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar

1. Binboğa E, Tok S, Munzuroğlu M, Canüzmez AE, Dal N. The effects of red versus blue lights and neuroticism on voluntary biceps brachii muscle contraction. *Perceptual and Motor Skills*. 2019; 126: 253-266.
2. Binboğa E, Tok S, Munzuroğlu M. The short-term effect of occupational levels of 50 hz electromagnetic field on human heart rate variability. *Bioelectromagnetics*. 2021; 42: 60-75.
3. Ozkan A, Aslan MA, Sinen O, Munzuroglu M, Derin N, Parlak H, ve ark. Effects of adropin on learning and memory in rats tested in the morris water maze. *Hippocampus*. 2022; 32: 253-263.
4. Sümer-Coşkun A, Bedel HA, Munzuroğlu M, Derin N, Usta C. Does resveratrol prevent sevoflurane toxicity in newborn rats? *Journal of Medicinal Food*. 2022; 25: 557-563.
5. Munzuroğlu M, Danışman B, Akçay G, Yelli İ, Aslan M, Derin N. Effects of biotin deficiency on short term memory: The role of glutamate, glutamic acid, dopamine and protein kinase a. *Brain Research*. 2022; 1792: 148031.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Posterler

1. Jafaribarani E, Pehlivan M, Abdijodaghieh S, Munzuroglu M. Mekanik Tansiyon Ölçüm Aletleri için Bilgisayar Kontrollü Kalibrasyon Sistemi. 26.Ulusal Biyofizik Kongresi. Tokat, 2014.
2. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z, Tok S. Çok Düşük Frekanslı Manyetik Alanların İnsan Kalbi Üzerindeki Akut Etkisi. 27. Ulusal Biyofizik Kongresi. Malatya, 2015.
3. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z. Çok Düşük Frekanslı Manyetik Alanların İnsan Otonom Sinir Sistemi Üzerindeki Etkisi. 27. Ulusal Biyofizik Kongresi. Malatya, 2015.
4. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z. İnsanlarda Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların 6° Baş Aşağı Yatış Pozisyonunda Kalp Atım Hızına Etkisi. 27. Ulusal Biyofizik Kongresi. Malatya, 2015.
5. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z, Tok S. Dolaşım Sistemi Fizyolojisinin Mikrogravite Modellemesinde Çok Düşük Frekanslı Manyetik Alanların Kalp Atım Hızı Üzerindeki Etkisi. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumu. Mersin, 2015.
6. Binboga E, Munzuroglu M, Tok S. Kırmızı ve mavi ışığın elektrodermal aktivite ve duygu durum üzerindeki etkileri. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi. Sakarya, 2017.
7. Binboga E, Munzuroglu M, Tok S. Renkli ışıkların otonom sinir sistemi üzerindeki etkisi ve bu etkilerin kişilik özelliklerine göre değişimi. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi. Sakarya, 2017.
8. Binboga E, Munzuroglu M. Kırmızı ve mavi ışıklarla aydınlatılan ortamlarda zaman ve mekân genişliği algısındaki değişim ve bu değişimin kişilik özellikleri ile ilişkisi. 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi. İstanbul, 2017.
9. Akçay G, Kantar D, Danışman B, Munzuroğlu M, Kencebay Manas C, Denizaltı T, Duman Ö, Derin N. Sülfid Maruziyetinin EEG Üzerine Etkilerinin Araştırılması. 44. Fizyoloji Kongresi. Antalya, 2018.

Sözlü Sunumlar

1. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z. Çok Düşük Frekanslı Manyetik Alanların İnsan Otonom Sinir Sistemi Üzerindeki Etkisi. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumu. Mersin, 2015.
2. Binboga E, Munzuroglu M, Akan Z, Tok S. Çok Düşük Frekanslı Manyetik Alanların İnsanlarda Kalp Atım Hızı Değişkenliği Üzerine Etkisi. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumu. Mersin, 2015.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Posterler

1. Binboga E, Tok S, Munzuroglu M, Canüzmez AE. Kırmızı ve Mavi Işığa Maruziyetin Sporcularda Biceps Brachi Kasının Maksimal İstemli Kas Kasılma Düzeylerine Olan Etkisinin Araştırılması. 14. Uluslararası Spor Bilimleri Kongresi. Antalya, 2016.

Sözlü Sunumlar

1. Tok S, Binboga E, Munzuroglu M, Canüzmez AE, Dal N. Kırmızı ve Mavi Renkli Işıkların İzometrik Maksimal İstemli Kasılma Seviyesine Etkisi: Duygusal Tutarsızlığın Rolü. 16. Uluslararası Spor Bilimleri Kongresi. Antalya, 2018.