



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İN VİTRO ŞARTLARDA ASPARTAM VE D VİTAMİNİ'NE MARUZ
BIRAKILAN İNSAN KAN HÜCRELERİNİN BİYOKİMYASAL VE
TİTREŞİM SPEKTROSKOPİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe BÜYÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Hatice BAŞ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice ARI

HAZİRAN – 2024

YOZGAT

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO ŞARTLARDA ASPARTAM VE D VİTAMİNİ'NE MARUZ
BIRAKILAN İNSAN KAN HÜCRELERİNİN BİYOKİMYASAL VE
TİTREŞİM SPEKTROSKOPİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe BÜYÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Hatice BAŞ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice ARI

HAZİRAN– 2024

YOZGAT



YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ONAY FORMU

T.C.

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayşe BÜYÜK'ün hazırladığı “**In vitro Şartlarda Aspartam ve D vitamini’ne Maruz Bırakılan İnsan Kan Hücrelerinin Biyokimyasal ve Titreşim Spektroskopik Yönden Araştırılması**” başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri gereğince 11/06/2024 Salı günü saat 11:00’da yapılmış, tezin onayına oy birliği ile karar verilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Halil Erhan EROĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hatice BAŞ

(Danışman)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fahriye ERCAN

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hatice KARABODUK

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hatice ARI

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../..... tarih vesayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Ümit BUDAK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan eder, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğini beyan ederim.

Ayşe BÜYÜK

11/06/2024

ÖN SÖZ

Çalışmalarım boyunca bana destek olup her daim yol gösterip, ışık tutan, yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Hatice BAŞ'a ve Raman spektroskopisi çalışmalarında yardımcı olan ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hatice ARI'ya, tüm bu süreçte maddi ve manevi desteğini sürekli hissettiren annem, babam, ablam ve ağabeyime, tez yazımı süresince her şekilde desteğini esirgemeyen Zeynep YÜREKLİ'ye ve Duygu SOYLU'ya, öğretmen arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ediyorum.

Ayşe BÜYÜK

11/06/2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VİTRO ŞARTLARDA ASPARTAM VE D VİTAMİNİ'NE MARUZ BIRAKILAN İNSAN KAN HÜCRELERİNİN BİYOKİMYASAL VE TİTREŞİM SPEKTROSKOPİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI

Ayşe BÜYÜK

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Hatice BAŞ

İKİNCİ DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Hatice ARI

Gıda katkı maddeleri; gıdaların üretimleri, hazırlanmaları, ambalajlanmaları ve depolanmaları esnasında gıdaya dayanıklılık, yoğunluk ve renk vermek amacı ile kullanılmaktadırlar. Aspartam sükrozdan 200 kat daha tatlı olmasından ve gıdaya verdiği tatlılık; kalori içeriğinin sadece %5'i ile sağladığından dolayı bu özellik onu daha eşsiz ve tutulan bir tatlandırıcı haline getirmiştir. Aspartam vücuda girdiğinde kanserojene ve nörotoksine dönüşebilmektedir. D vitamini; vücutta uzun süre depolanan ve yağ içerisinde çözünen bir vitamindir. Ayrıca endojen kaynaklı olarak elverişli biyolojik ortamlarda sentezi yapılabilen hormon ve hormon öncülü bir sterol yapıdır. Bu çalışmada, insan kan hücreleri üzerine in vitro koşullarda aspartamın ve D vitamininin antioksidan enzim aktiviteleri [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx)], glutatyon redüktaz (GR), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) seviyesi ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri üzerindeki etkileri, ayrıca osmotik fragilite, DNA fragmentasyonu, canlılık tayini, titreşim spektroskopik yöntemlerden biri olan Raman spektroskopisi ile aspartamın ve D vitamininin eritrosit ve lökosit hücreleri üzerine etkileri de araştırılmıştır. Aspartam muameleli grupta AChE ve antioksidan enzim aktivitelerinin, GSH seviyesi ile canlılık yüzdesinin istatistiksel olarak azaldığı; DNA fragmentasyonu, MDA seviyesi ve osmotik fragilite değerlerinde ise arttığı görülmüştür. Bunun yanında aspartam ile beraber D vitamini uygulanan grupta aspartama karşı koruyucu bir etkinin olduğu görülmüştür. Sonuç olarak aspartamın insan kan hücreleri üzerinde toksik etki oluşturduğu, D vitamininin ise koruyucu etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Kan hücrelerine ait Raman şiddetlerinde aspartam ilavesi ile azalma, D vitamini ilavesiyle ise artış gözlenmektedir.

2024, xiv + 95 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitotoksisite, Aspartam, D vitamini, Oksidatif stres, Raman

ABSTRACT

MASTER THESIS

BIOCHEMICAL AND VIBRATIONAL SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF HUMAN BLOOD CELLS EXPOSED TO ASPARTAM AND VITAMIN D IN VITRO CONDITIONS

Ayşe BÜYÜK

**YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
SCHOOL of GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

SUPERVISOR: Prof.Dr. Hatice BAŞ

CO-SUPERVISOR: Asst. Prof. Dr. Hatice ARI

Food additives; They are used to give food durability, density and color during the production, preparation, packaging and storage of foods. Aspartame is 200 times sweeter than sucrose and the sweetness it imparts to food; Since it provides only 5% of the calorie content, this feature has made it a more unique and popular sweetener. Aspartame can turn into a carcinogen and neurotoxin when it enters the body. Vitamin D; It is a fat-soluble vitamin that is stored in the body for a long time. In addition, it is a hormone and hormone precursor sterol structure that can be synthesized endogenously in favorable biological environments. In this study, antioxidant enzyme activities of aspartame and vitamin D [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx)], glutathione reductase (GR), malondialdehyde on human blood cells in vitro conditions were investigated. (MDA), glutathione (GSH) level and acetylcholinesterase (AChE) activities, as well as osmotic fragility, DNA fragmentation, viability determination, Raman spectroscopy, one of the vibration spectroscopic methods, and the effects of aspartame and vitamin D on erythrocyte and leukocyte cells were also investigated. In the aspartame-treated group, AChE and antioxidant enzyme activities, GSH level and vitality percentage decreased statistically; It was observed that DNA fragmentation, MDA level and osmotic fragility values increased. In addition, it was observed that there was a protective effect against aspartame in the group administered vitamin D together with aspartame. As a result, it has been revealed that aspartame has a toxic effect on human blood cells, while vitamin D has protective effects. A decrease in the Raman intensities of blood cells is observed with the addition of aspartame, and an increase is observed with the addition of vitamin D.

2024, xiv + 95 Sayfa

Keywords: Cytotoxicity, Aspartame, Vitamin D, Oxidative stress, Raman

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAY SAYFASI	ii
TEZ BEYANI	iii
ÖN SÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Kullanımı	3
2.2. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar	5
2.3. Gıda Tatlandırıcıları ve Sınıflandırılması	6
2.4. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	8
2.5. Aspartam İle İlgili Yapılan Çalışmalar	11
2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)	13
2.7. Serbest Radikaller	14
2.8. Lipit Peroksidasyonu	16
2.9. Oksidatif Stres	17
2.10. Antioksidanlar	17
2.10.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar	19
2.10.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	19
2.10.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	21

2.10.2. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar	21
2.11. D Vitamini ve Yapısı	22
2.11.1. D Vitamininin Metabolizması	24
2.11.2. D Vitamini Düzeyleri ve Fonksiyonları	27
2.11.3. D Vitamini İle Yapılan Çalışmalar	28
2.12. Spektroskopik Yöntemler	31
2.12.1. Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge (VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	31
2.12.2. Titreşim Spektroskopisi	34
2.12.3. Raman Spektroskopisi	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Kimyasallar	36
3.2. Eritrositlerin Hazırlanması	36
3.3. Lökositlerin Hazırlanması	36
3.4. Hücrelere Uygulama Planı	36
3.5. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi	37
3.6. Glutatyon-S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.7. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.8. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.9. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.10. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.11. Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.12. Glutatyon Seviyesinin Belirlenmesi	39
3.13. Canlılık (Viabilite) Tayini	39
3.14. Osmotik Frajlite (Osmotik Kırılganlık)	39
3.15. DNA Fragmantasyonu	40

3.16. UV-Vis Spektroskopisi	40
3.17. Raman Spektroskopisi	41
3.18. İstatistiki Analizler	41
4. BULGULAR	42
4.1. Lökosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	42
4.2. Lökosit DNA Fragmentasyonu Değerlendirilmesi	42
4.3. Lökosit MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi	43
4.4. Lökosit Canlılık Tayini Değerlendirilmesi	44
4.5. Lökosit GSH Düzeyi Değerlendirilmesi	45
4.6. Lökosit Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi	46
4.7. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	48
4.8. Eritrosit Osmotik Frajlite Değerlendirilmesi	49
4.9. Eritrosit MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi	50
4.10. Eritrosit GSH Seviyesinin Değerlendirilmesi	51
4.11. Eritrosit AChE Aktivitesinin Değerlendirilmesi	52
4.12. Eritrosit Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi	53
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	55
6. KAYNAKLAR	60

TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Gıda Katkı maddelerinin sınıflandırılması	4
Tablo 2.2. Katkı maddeleri ve E kodları	5
Tablo 2.3. Endojen kaynaklı antioksidanlar	19
Tablo 2.4. Eksojen kaynaklı antioksidanlar	22
Tablo 4.1. Lökosit antioksidan enzim aktiviteleri	42
Tablo 4.2. Eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Aspartamın yapısal formülü	8
Şekil 2.2. Aspartamın sudaki çözünürlüğü	9
Şekil 2.3. Aspartamın parçalanma mekanizması	10
Şekil 2.4. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi	13
Şekil 2.5. Lipit peroksidasyonu yan ürünleri	16
Şekil 2.6. D vitamininin kimyasal yapısı	23
Şekil 2.7. Vitamin D ₂ ve D ₃ formları arasındaki yapısal fark	24
Şekil 2.8. D vitamininin metabolizması	25
Şekil 2.9. D vitamini eksikliğinde oluşan rahatsızlıklar	28
Şekil 2.10. Elektromanyetik spektrum bölgeleri	32
Şekil 3.1. UV-Vis Spektrometresi	40
Şekil 3.2. Renishaw Invia Raman Mikroskop Spektrometresi	41
Şekil 4.1. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının DNA fragmentasyonu seviyeleri	43
Şekil 4.2. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının lökosit MDA seviyeleri	44
Şekil 4.3. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının canlılık yüzdeleri	45
Şekil 4.4. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının lökosit GSH seviyeleri	46
Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarının lökosit Raman spektrumlarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.6. Saf etanol ile L-etanol grubunun Raman spektrumlarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.7. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının osmotik fragilite yüzdeleri.....	50
Şekil 4.8. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit MDA seviyeleri.....	51
Şekil 4.9. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit GSH seviyeleri.....	52
Şekil 4.10. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit AChE aktiviteleri	53
Şekil 4.11. Kontrol ve uygulama gruplarının eritrosit Raman spektrumlarının karşılaştırılması.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	: Santigrat Derece
Ca	: Kalsiyum
Cl	: Klor
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NO	: Nitrik Oksit
25(OH)D	: Ergokalsiferol
25-OH- D ₃	: 25-hidroksikolekalsiferol
1,25(OH) ₂ D	: Kolekalsiferol
24,25(OH) ₂ D	: 24,25 dihidroksikolekalsiferol
7DHC	: 7-dehidrokolesterol

Kısaltmalar	Açıklamalar
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ABD	: Amerikan Birleşik Devletleri
ADI	: Kabul Edilen Günlük Tüketim Miktarı
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
ASP	: Aspartam

AST	: Aspartat Aminotransferaz
AP	: Aspartil Fenilalanin
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTNB	: 5,5'-Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit)
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GGT	: Gama Glutamil Transpeptidaz
GKM	: Gıda katkı maddesi
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
G6PD	: Glikoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon Disülfid
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
IR	: Infrared Spektroskopisi
LCA	: Litokolik Asit
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NOX	: NADPH Oksidaz
NRF2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör
PKU	: Fenilketonüri
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyoarbitürik Asit
TCA	: Trikloroasetik Asit
UV	: Ultraviyole Işınları
UVB	: Ultraviyole B Işınları
VDBP	: Vitamin D Bağlayıcı Protein
VDR	: Vitamin D reseptörü
VDRE	: Vitamin D Cevap Elemanı
XO	: Ksantin Oksidaz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

20. yüzyılda her alanda olduğu gibi gıda sanayisi alanında da çok önemli gelişmeler yaşanmıştır. Dünya nüfusundaki hızlı artış, insanların hayat standartlarını daha da yükseltme isteği ve kentleşme hazır yiyeceklere olan isteği arttırmıştır. Bu olay gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli atılımlara sebep olmuştur. Endüstri alanındaki hızlı gelişmelere paralel olarak, gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımı her geçen gün artmaya devam etmektedir (Taşlı vd., 2018). Böylelikle, işleme tabi tutulmuş ürünler daha da çeşitlenmiş olup üretilmeleri sırasında kullanılan gıda katkı maddelerinin sayısını da hızlı bir şekilde arttırmıştır (Çakmakçı & Çelik, 1994).

GKM; gıdaların üretimleri, hazırlanmaları, ambalajlanmaları ve depolanmaları esnasında gıdaya dayanıklılık, yoğunluk, renk vermek ve doğal rengi korumak amacıyla kullanılan maddelerdir (Taşlı vd., 2018). Günümüze bakıldığında 2000'den fazla katkı maddesi kullanıldığı görülmektedir (Çakmakçı & Çelik, 1994).

İnsanlık tarihinde gıda katkı maddelerinin kullanılmaya başlanmasının tarihsel gelişiminde iki etkinin olduğu anlaşılmıştır. Bunlardan birincisi, teknolojinin gelişmesine paralel olarak gıdaların saklanma yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç; ikincisi ise, gıdanın insanların gözündeki mevcut kalitesinin daha da iyi olarak algılanmasını sağlamaktır (Altuğ, 2001).

Günümüzde GKM'lerin besin maddeleri içerisinde kullanımı ve bunun sonucunda insanların bunları tüketmesiyle alınımları zaman içerisinde artmıştır. Yakın zamana kadar, yapay tatlandırıcı maddelerin yüksek enerji vermeden hoş bir tat sunmalarıyla sağlıklı beslenmeyi destekleyebileceği savunuluyordu. Fakat bu görüşün aksine yapılan hayvan modellerindeki beslenme çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre yapay tatlandırıcı maddelerin kullanımı enerji dengesinde oluşturduğu düzensizlikler sonucunda bazı sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına sebep olduğu görülmüştür (Pehlivan & Köksal, 2020).

Şeker ve şekerli gıdaların fazla tüketilmesi bazı sağlık sorunlarını ortaya çıkarmıştır. Bu gıdaların, diş çürümelerinde artışa, obeziteye, kan şekerinde ve serum trigliseritlerinde artmaya ve şeker hastalarında zararlı etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Bütün bu gelişmeler sonucunda yapay tatlandırıcılara olan yönelim artmıştır (Yakıcı, 2006).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi uluslararası kuruluşlar bu konuya ağırlık vererek ülkelerdeki GKM kullanımını denetim

altına alarak konuyla ilgili yasal çözümlerler getirmişlerdir. Laboratuvarlarda yapılan deneyler ve toksikolojik testler ile GKM'lerin ADI (Kabul Edilen Günlük Tüketim Miktarı) değerleri belirlenmektedir (Yurttagül & Ayaz, 2008). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), gıdalarda kullanılan yapay tatlandırıcılar ile ilgili sağlık örgütlerinden gelen uyarılara dikkat etmekte ve yapılan çalışmaları takibe alarak tüm bu aşamalar sonucunda kullanımları hakkında karara varmaktadır.

Bir GKM'nin yasal olarak kullanılmasına izin verilmiş olsa da bazı şartlara uyarak kullanılabilir. Kullanılmasına izin verilmiş olan gıda katkı maddesi; sadece izin verilen gıda içerisinde, belirlenmiş olan en uygun doz aralığında ve belirlenen en yüksek doz miktarı aşılmadan kullanılması gerekmektedir. Gıdada bulunan herhangi bir hatayı örtmeden veya tüketiciyi kandırmadan kullanılmalı ve kullanıldığı gıda üzerindeki etiketine kullanım dozu yazılmış olmalıdır (Yılmaz, 1999; Erdoğan, 2007). Fakat yapılan tüm düzenlemelere ve sınırlamalara rağmen, günümüzde kullanımı çok fazla olan ve tam olarak netleşmemiş metabolik etkileri olan tatlandırıcılar hakkında daha fazla deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuştur (Pehlivan & Köksal, 2020).

Bu tez çalışmasının amacı, GKM'lerden biri olan aspartamın (ASP) insan lökosit ve eritrositleri üzerine olan etkisinin in vitro koşullarda incelenmesidir. Bir diğer amacı ise, ASP'nin olası zararlı etkilerine karşı antioksidan özelliği olan D vitamininin insan kan dokusu üzerindeki muhtemel etkilerinin titreşim spektroskopik yöntemi ile araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı ve Kullanımı

Katkı maddesi terimi latince “katmak” anlamına gelen “addere” kelimesinden türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (Arslan, 2011). Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde, gıda katkı maddeleri “Tek başına besin olarak kullanılmayan veya gıdanın özgün bileşeni olarak faydalanılmayan, tek başına besleyiciliği olan veya olmayan, teknolojik bir hedef doğrultusunda gıdanın üretimi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması veya depolanması gibi aşamalarda gıdaya eklenmesi sonucu kendisi ya da yan ürünleri, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olan maddeler” olarak tanımlanmıştır (Erden Çalışır & Çalışkan, 2003).

GKM’lerin kullanım amacı gıdaların raf ömrünü uzatmak, besin maddesinin doğal rengini, aromasını, görüntüsünü korumak, gıda kalitesinin yükselmesini sağlamak, tüketici için besini daha çekici hale getirmek, hazırlama esnasında gıdanın niteliğini korumak, istenmeyen değişikliklere engel olmak ve besleyici değerini korumaktır (Boğa & Binokay, 2010).

GKM’lerinin kullanılmalarında dikkat edilmesi gereken hususlar bulunmaktadır:

- GKM’lerin hiçbirisi, hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın insan sağlığı üzerine zarar verici olmamalıdır.
- GKM’leri katıldığı besinlerin besleyiciliğine zarar vermemeli, besin değerini düşürmemeli ve değiştirmemelidir.
- Kullanılacak GKM’nin analiz sonuçları ve kullanılma oranı bilinmelidir.
- Gıdanın içindeki vitaminlerin doğal yapısını bozmamalı ve besinlerin emiliminde azalmaya neden olmamalıdır.
- GKM, katıldığı gıdaların içerisinde eşit bir şekilde yayılmış olmalı ve ürünün mali değerini artırmamalıdır.
- Kullanılacak GKM’leri hakkında in vitro ve in vivo deneyler yapılmış olmalı ve özellikleri bilinmelidir.
- Gıdaya ne miktarda katılabileceğini belirtmiş olmalı, belirtilmiş miktardan fazlası konulmamalı ve üretimleri esnasında, katkı maddesi katılan gıdaların denetimi devamlı yapılmalıdır.
- Kullanılan GKM’nin ismi ve miktarı gıdanın etiketinde belirtilmelidir.

- Kullanılan GKM'nin, gıdanın bozukluğunun gözükmesini engelleyici ve tüketiciyi aldatıcı olmamalıdır.
- Katkı maddelerinin hangi gıdalar içerisinde, ne oranda ve hangi hedefler doğrultusunda katılabileceği GKM kodeksinde açıklanmış olmalıdır.
- Diyet gıdalara ve özellikle çocuk mamalarına ilave edilmesi düşünülen katkı maddesinin, katılma şartları ve kullanılma oranları hususi olarak izne tabi olmalıdır (Bağcı, 1997; Erden Çalışır & Çalışkan, 2003).

Günümüzde 8000'in üstünde katkı maddesi bulunmakta olup, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bu gıda katkı maddelerinden 2800 tanesinin kullanımına izin vermiştir. Avrupa Birliği'nin kullanımını onayladığı katkı maddelerinin sayısı ise yaklaşık 297 tanedir (Gültekin, 2011).

Çok fazla GKM bulunduğu için; içerik, amaç ve kullanım şekline göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadırlar. Tablo 2.1'de GKM'ler sınıflandırılmıştır.

Tablo 2.1. Gıda Katkı maddelerinin sınıflandırılması

1.Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular)
1.1. Antioksidanlar (BHA, BHT, propilgallat...)
1.2. Antimikrobiyaller (nitrit, benzoik asit, sorbik asit, kükürt dioksit...)
2.Hazırlama ve pişirme özelliğini geliştirenler
2.1. Topaklanmayı önleyenler (magnezyum oksit, magnezyum karbonat, silikon dioksit...)
2.2. pH ayarlayıcılar (asetik asit, propionik asit, kalsiyum karbonat...)
2.3. Stabilizörler, kıvam arttırıcılar (kalsiyum asetat, kalsiyum karbonat...)
2.4. Emülsiyon yapıcılar (lesitin, mono ve digliseritler...)
3. Aroma, lezzet, tad ve renk geliştiriciler
3.1. Lezzet arttırıcılar (MSG, inisitol)
3.2. Lezzet vericiler (aroma maddeleri)
3.3. Yapay tatlandırıcılar (aspartam, sakarin, asesulfam K, neoherperidin DC...)
3.4. Renklendiriciler (tartarazin, kurkumin, annotto, b-karoten...)
4. Besin Değerini Koruyucu, Geliştiriciler (besin öğeleri)
4.1. Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A, D vitaminleri)
4.2. İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2, niasin)

(Kaynak: Boğa & Binokay, 2010)

Avrupa Birliğinde kullanılması kabul edilen GKM için “Europe” kelimesinin ilk harfi olan E harfinden yararlanılarak numaralandırma yapılmaktadır. E kodu, toksikolojik yönden incelemeleri tamamlanmış ve kullanılabilir miktar aralığı belirlenmiş GKM’ye göre verilen uluslararası pratik bir kodlama yöntemidir (Yörük & Danyer, 2016). "E" numara sistemi ile GKM'nin temel işlevlerine göre sınıflandırması Tablo 2.2 ‘deki gibidir:

Tablo 2.2. Katkı maddeleri ve E kodları

Gıda Katkı Maddesi	E Kodu
Renklendiriciler	E100-199
Koruyucular, Antimikrobiyaller	E200-299
Antioksidanlar, Fosfatlar	E300-399
Emülsifiyer ve Stabilizatörler	E400-499
Asit - baz sağlayıcılar, Topaklanmayı Engelleyici Ajanlar	E500-599
Lezzet Arttırıcılar	E600-699
Tatlandırıcılar, Yüzey Kaplama Ajanları, Gazlar	E900-999
Değişik Katkılar	E1000-1399
Modifiye Nişastalar	E1400-1499
Yapay Lezzetler ve Lezzet Çözücüler	E1500-1525

(Kaynak: Erden Çalışır & Çalışkan, 2003; Küçüköner, 2011)

2.2. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda katkı maddeleriyle yapılan bir çalışmada katkı maddelerinin kullanılmasına bağlı olarak insan sağlığına etki edecek bazı yan etkilerin olabileceği tespit edilmiştir. Bunlar; mide bulantısı, kusma, ishal, migren, anafilaksi, egzama, ürtiker, irritabl bağırsak sendromu, rinit, anjioödem, ekzfoliyatif dermatit, hiperaktivite ve diğer davranış bozukluklarıdır (Tuormaa, 1994).

Olney ve Ho’ nun (1970) lezzet arttırıcı olarak kullanılan glutamik asit ile yaptığı bir çalışmada glutamik asitin beyin hücrelerinde hasara sebep olabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle glutamik asiti nörotoksik madde olarak değerlendirmişlerdir. Glutamik asitin yetişkin kişilerde göğüste ağrı, uyuşukluk ve yanma gibi belirtileriyle seyreden Çin Lokantası Sendromuna neden olduğu tespit edilmiştir (Schaumburg vd., 1969).

Ward ve arkadaşlarının (1990) hazır jöle karışımlarının, içecek tozlarının, şekerlemelerin, hazır keklerin, kurabiyelerinve alkolsüz içeceklerin içerisinde renklendirici olarak kullanılan Tartrazin ile yaptıkları çalışmada, tartrazinin kullanılmasıyla çocukluk hiperaktivitesi arasında ilişki görülebileceği ortaya konulmuştur.

Sodyum benzoat ve potasyum benzoat sucukta, salamda, cipslerde, hazır köfte harçlarında, hazır soslarda, meyve sularında ve şekerlemeler de koruyucu olarak kullanılmaktadır. Sodyum benzoat ve potasyum benzoat ile yapılan çalışmalar sonucunda bu koruyucu maddelerin genotoksik etkilerinin olabileceği ortaya konmuştur (Zengin vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada kalsiyum propiyonatın, *Allium cepa*'nın kromozomal anormallik frekansını kontrole kıyasla önemli miktarda arttırdığı ve mitotik indeksi önemli oranda azalttığı gözlemlenmiştir (Türkoğlu, 2008).

Yapılan başka bir çalışmada McCann ve arkadaşlarının (2007), gıda boyası olarak kullanılan allura red'in içerisinde bulunduğubir azo boya karışımının çocuklarda görülen hiperaktiviye etkisini araştırmışlardır. Çalışma verileri, üç, sekiz ve dokuz yaş çocuklarda yapay renklendirici olarak kullanılan gıda boyalarının hiperaktiviteyi artırdığını ortaya koymuştur.

Benzoik asit ve tuzları ile yapılan bir çalışmada ise bu tuzların genotoksik etkileri farelerde sekiz farklı organda komet testi yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırmacılar uygulanan dozlardaki benzoik asit ve tuzlarının DNA hasarına neden olmadığını belirtmişlerdir (Sasaki vd., 2002).

Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, 20-30 mg/kg sunset yellow uygulamasının ishale ve kör bağırsakta genişlemeye neden olurken; kan, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında herhangi bir zarara yol açmadığı görülmüştür (Atlı, 2010).

2.3. Gıda Tatlandırıcıları ve Sınıflandırılması

Tatlandırıcılar, üretilme şekillerine göre doğal ve yapay tatlandırıcılar olarak gruplandırılırken, kalori verme özelliğine göre ise besleyici (yüksek kalorili) ve besleyici olmayan (düşük kalorili) tatlandırıcılar olarak gruplandırılmaktadırlar (Carocho vd., 2017). Bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler (glukoz, fruktoz, sakkaroz vb.) doğal tatlandırıcı, sentezlenerek elde edilen ve doğal maddelerle benzerliği olmayanlar yapay tatlandırıcı olarak sınıflandırılmaktadır (Altuğ & Elmacı, 2009). Kalori vermeyen veya kan

şekerini yükseltmeyen, ancak şeker tadında olan maddelere “yapay tatlandırıcılar” denilmektedir (Best & Nelson, 1993). Çok küçük miktarda kalori almadan istenilen tadın sağlanabilmesiyle, şekere alternatif gıda katkı maddesi olarak çok yaygın kullanıldığından, diyabet hastaları ve kilo almak istemeyenler tarafından çokça ilgi görmektedirler. Yapay tatlandırıcıların kilo kontrolünü sağlama ve obezite konusunda faydalı oldukları kabul edilirken, tatlı gıda yeme isteğini artırarak aşırı beslenme ve kilo alımında neden olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Bellisle & Drewnowski, 2007; Fowler, 2016).

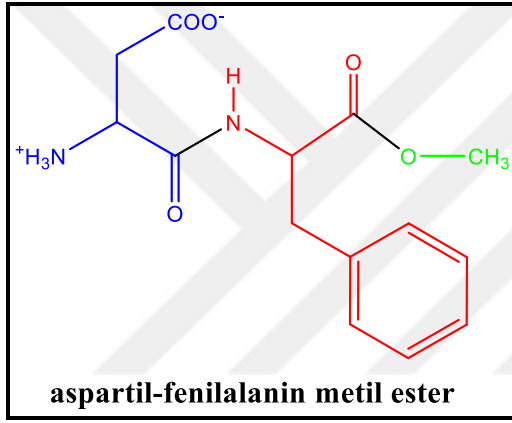
Günümüzde, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yapay, düşük enerjili veya enerji vermeyen, gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmak üzere altı tatlandırıcıya onay verilmiştir. Bu tatlandırıcılar sakarin, aspartam, asesülfam potasyum, sukraloz, neotamin ve advantam’dır (Pehlivan & Köksal, 2020).

Ülkemizde ticari amaçla fazlaca kullanılan yapay tatlandırıcılar sakarin, siklamat, asesülfam potasyum, aspartam ve neohesperidin dihidrokalkondur. Yoğun tatlandırıcı özelliğinden dolayı yıllar öncesinden beri kullanılan sakarin ve siklamatın yapılan toksikolojik çalışmalarda yüksek dozlarda kullanılması durumunda bazı sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmesinin sonucunda bu iki tatlandırıcının öneminin azalmasına sebep olmuştur. Bu iki tatlandırıcıya alternatif olarak aspartam ve asesülfam potasyum geliştirilmiş olup diyabetik bireylerin günlük ihtiyaçlarının yanı sıra, diyet ürünlerinin üretiminde de gereksinimi karşılamak üzere gıda sanayisinde kullanılmaya başlanmıştır (Yakıcı, 2006).

Yıllar öncesinde sentezlenmesine karşın Aspartamın (Asp) tat verici özelliği 1965 yılında tesadüfen Schlatter tarafından anlaşılmıştır (Başer, 1995). Dünya çapında 200 milyondan fazla insan aspartamı yapay tatlandırıcı olarak tüketmektedir. Kuru içecek karışımları, çiğnenebilen çoklu vitaminler, kahvaltılık tahıllar, pudingler ve dolgular, karbonatlı içecekler gibi yaklaşık 6000 gıda ürününün içerisinde besleyici olmayan tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Choudhary vd., 2016). FDA aspartamın 1981’de kuru gıda ürünleri içerisinde kullanılmasına onay vermiştir (Kızılaslan, 2017). Avrupa Birliği tarafından gıda katkı maddesi olarak E951 kodu verilmiştir (Altun, 2014). Dipeptit olan aspartamın piyasaya sürülmesiyle o yıllarda dünyadaki tüm karbonhidrat olmayan tatlandırıcılar satış dışı kalmıştır (Baydar & Şahin, 1997).

2.4. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Aspartam; aspartat ve fenilalanin aminoasitlerinden oluşan dipeptidin metil esteri olup, beyaz ve kokusuz kristal bir yapı gösterir (Şekil 2.1.). Asp kuru halde kararlıdır, ancak ısıya çok dayanıklı değildir. Isıtma işlemine tabii tutulduğunda tadı kaybolur. Bu yüzden pişirmeye uygun değildir (Magnuson vd., 2007). Gram başına 4 kkal veren Asp'nin glisemik indeksi sıfırdır (İşgören & Sungur, 2019). Tatlı bir lezzete sahip olmasından dolayı günümüzde yaygın olarak kullanılan ticari sentetik bir tatlandırıcıdır. Sükrozdan 200 kat daha tatlıdır buna karşın gıdaya verdiği tatlılık kalori içeriğinin sadece %5'i ile sağlandığından aspartamı diğer tatlandırıcılara göre daha üstün ve popüler kılmıştır (Baydar & Şahin, 1997).



Şekil 2.1. Aspartamın yapısal formülü

Kimyasal adı: Aspartil fenilalanin metil ester

Kimyasal formülü: $C_{14}H_{18}N_2O_5$

Molekül ağırlığı: 294,31

İzoelektrik noktası: pH 5,2 'dir.

Dalton ve rotasyon derecesi: 1 M HCl içinde $(\alpha)_{D^{22}} = 2,3^{\circ}$ 'dir.

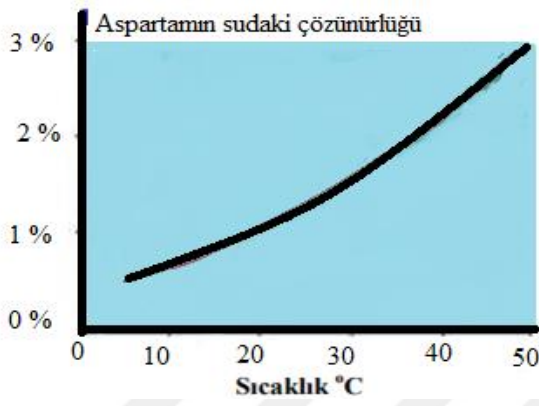
Yoğunluk: 0,15-0,40 g/mL

Erime noktası: 196 °C

Bozulma sıcaklığı: 215 °C 'dir (Yakıcı, 2006).

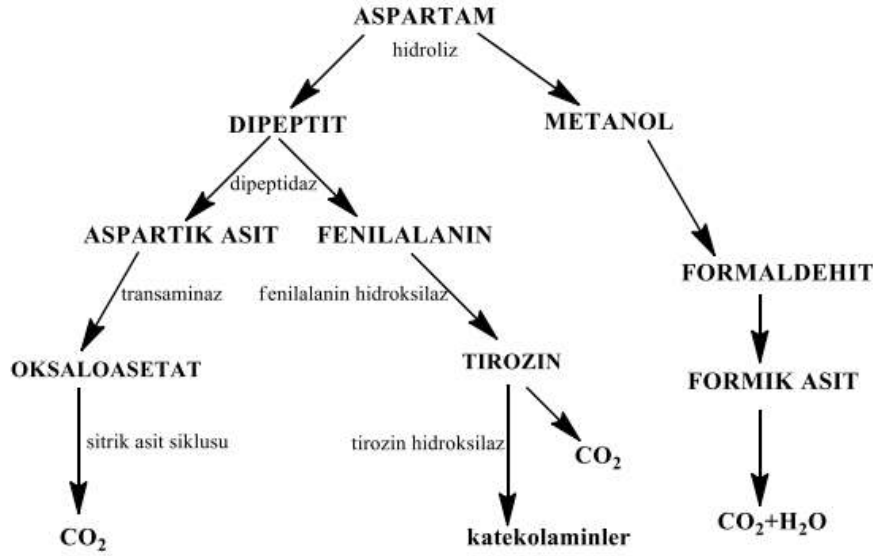
Aspartam suda neredeyse tamamen, alkolde ise kısmen çözünebilir. Asp 25 °C'de su içerisinde kolaylıkla çözünür (Şekil 2.2.) (Altun, 2014). Ayrıca yüksek sıcaklıkta (>30 °C) ve asidik ortamlarda ester bağı hidroliz olarak aspartil fenilalanin ve metanolün oluştuğu

görülmektedir (Baydar & Şahin, 1997). Asp, metanol içinde çok az çözünür ancak etanol, kloroform ve heptan içinde çözünmez. Ayrıca yağda içerisinde de çözünmez. Asp'nin nötr pH'daki çözünürlüğüne bakılacak olursa pH 3-4 arasındaki çözünürlüğünün yarısı kadar olduğu görülür. Farklı pH derecelerinde çözünürlük değişkenlik göstermiş olup, pH 2,2'de (20 mg/mL, 25°C'de) maksimum çözünürlük ve pH 5,2'de (13,5 mg/mL, 25°C'de) minimum çözünürlük olduğu gözlenmiştir (Yakıcı, 2006). Asp, düşük pH'lı meyve suları gibi içeceklerin içerisinde kullanılması uygun değildir ve uzun süreli ısıya maruz bırakılacak pastörizasyon işlemlerine karşı dayanıksız bir yapıdadır (Budak & Tezcan, 2019).



Şekil 2.2. Aspartamın sudaki çözünürlüğü (Kaynak: Yakıcı, 2006)

Ester bağları, nem, pH ve sıcaklık gibi bazı koşullar altında hidrolize uğramaktadır ve aspartamın hidroliz edilmesi sonucunda aspartil fenilalanin (AP) ya da diketopiperazin gibi siklohidrolize ürünler oluşmaktadır. Diketopiperazin halkasının açılması sonucunda oluşan aspartil fenilalanin daha sonra hidrolize uğrayarak kendisini oluşturan aminoasitlere ayrışır (Şekil 2.3.). Asp'nin hidroliz edilmesiyle oluşan bu ürünlerin hiçbirinin tatlı olmadığı ve asp'nin stabilesini kaybetmesinin sonucunda ürünlerde tatlılık kaybının olduğu ifade edilmiştir (Homler, 1984; Ripper vd. 1986). Kısacası aspartamın dayanıklılığı sıcaklık, pH ve nem gibi etkenlerden etkilenmektedir (Baydar & Şahin, 1997).



Şekil 2.3. Aspartamın parçalanma mekanizması (Kaynak: Sevindik, 2017)

Aspartamın ticari olarak kullanılan üç farklı şekilde formları bulunmaktadır. Bunlar toz formu, granül formu ve ince granül formudur. Bu formların hepsi aynı çözünürlük özelliğine sahip olmalarına karşın, toz formunda olan aspartam granül formda olanına göre daha hızlı çözünmektedir. Ortam koşullarına bağlı olarak çözünme süresi 5-30 dakika arasında değişim göstermektedir.

Aspartam diğer yapay tatlandırıcılara göre daha avantajlıdır. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- Şeker tadındadır.
- Ağızda sonradan gelen bitter gibi acı bir tat bırakmamaktadır.
- Proteinlerin en küçük birimi olan amino asitlerin birleşmesiyle oluşmaktadır.
- Vücut içerisinde doğal yolla metabolize edilmektedir.
- 100 ‘ün üzerinde ülkede kullanımına onay verilmiştir.
- Bütün düşük kalorili tatlandırıcılar düşünüldüğünde içlerindeki en güvenilir olanıdır.
- Sükrozdan 200 kat daha tatlı yapıdadır (Baydar & Şahin, 1997).
- Düşük kaloriye sahiptir.
- Doğal ve yapay tatlandırıcılar ile toplu bir şekilde kullanılabilir. Diğer tatlandırıcılarla sinerjik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Homler, 1984).

- İçecekler, şekerlemeler, tablet tatlandırıcılar ve süt ürünleri gibi birçok gıdanın hazırlanmasında kullanılmaktadır.
- Gıda içerisindeki bileşenleriyle reaksiyon vermemektedir.
- Diş çürümmesine yol açmamaktadır.

Yukarıda aspartamın belirtilen tüm bu avantajlarının yanında en önemli avantajı tat kalitesinin kusursuzluğu, duyuşal açıdan şükrozun tadına çok benzer bir tada sahip olması, ağza alındığında ağızda bitter gibi acı, metalik veya kimyasal bir tat bırakmaması ve kuruluk hissi oluşturmamasıdır (Altun, 2014; Arslan, 2011).

Aspartamın karbonatlı gazlı içecekler, süt, yoğurt, milkshake, içecek tozları, naneli nefes açıcılar, çerezler, kurutulmuş ürünler, sert ve yumuşak şekerler, sakız, çikolata, önceden tatlandırılmış çay ve kahveler, dondurma, puding, çiğnenebilen vitaminler ve tablet tipi tatlandırıcılar içerisinde FDA tarafından belirlenen çok geniş alanlarda kullanımına izin verilmiştir (Yakıcı, 2006).

ABD'de aspartamın 1974'te kullanılmasına onay vermesinden sonra güvenilirliği uzun süre boyunca tartışma konusu olmuştur. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda aspartamın bir zararının olduğuna dair kanıt bulunmamıştır. FDA tarafından 1981'de kuru gıda mamüllerinde kullanılmasının ilk onayından şimdiye kadar, aspartamın güvenliği, çeşitli siyasi ve tıbbi münakaşalara, Birleşik Devletler kongre duruşmalarında ve internet sahtekârlıkları gibi durumlara konu olmuştur (Rowe, 2009). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinin, 2013 yılında tekrardan değerlendirmesi sonucunda aspartam ve ürünlerinin belirli düzeylerde maruz kalınması durumunda insan tüketimi için güvenli olduğunu tıbbi değerlendirmelerde doğrulamaktadır (Kızılaslan, 2017). FDA'nın belirlediği ADI değeri 50 mg/kg/gün'dür (Shankar vd., 2013). Belirtilen miktarda kullanılması durumunda kanser yapıcı, nörotoksik veya herhangi başka bir karşıt etkiye neden olduğuna ait kanıt bulunmadığı beyan edilmiştir (Magnuson vd., 2007).

2.5. Aspartam İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Aspartam son zamanlarda yapılan çalışmalarda ilgi duyulan bir konu olmuştur. Genel anlamda güvenli kabul edilmesine karşın murin modeller üzerinde yapılan araştırmalarda kanser, tip II diyabet ve sinir hücrelerinde hasara yol açtığı görülmüştür (Ashok vd., 2013; Fagherazzi vd., 2013). Aspartamın hidrolizi sonucunda açığa çıkan metanolün beyin

hücrelerinde, lokomotor fonksiyonlarda değişikliğe, doku ve hücreler üzerinde oksidatif strese sebep olabileceği bildirilmiştir (Ashok vd., 2017). Aspartam vücuda alındığında kanserojen ve nörotoksik etkiler gösterebilmektedir. Amerikan Sağlık Bakanlığı'na bağlı FDA'ya bildirilen gıda katkı maddelerine ait yan etkilerin %75'ini aspartamın oluşturduğu belirlenmiştir. Aspartamın neden olduğu ve yapılan araştırmalar sonucunda belgelenen belirtilerden bazıları; baş ağrısı ve dönmesi, migren atakları, nöbet geçirme, vücutta uyuşma, mide bulantısı, kasların ani ve beklenmedik şekilde kasılması, deride döküntü, kilo alımı, uykusuzluk, görmede bozukluk, işitme kayıpları, yorgunluk, nefes darlığı, konuşma bozukluğu, vertigo, tat kayıpları, hafıza sorunları ve değişik eklem ağrılarıdır (Bereket, 2012). Aspartam kullanıldığında sindirim sistemi içerisinde aspartat, fenilalanin ve metanole kadar ayrıştırılır. Fenilalanin meydana gelmesi fenilketonüri hastaları için zararlı etki ortaya çıkarır (Mackey & Berlin, 1992). Fenilketonüri (PKU) hastaları fenilalanin amino asitini metabolize edemediklerinden dolayı fenilalanini fazla miktarda almamaları gerekmektedir. Aspartam vücutta fenilalanin amino asidine dönüşmesinden dolayı fenilketonüri hastalarının günlük fenilalanin tüketimleri ile aspartam tüketimlerini beraber değerlendirerek fazla miktarda almamaya dikkat etmelidirler (Magnuson vd., 2007). Bu durum göz önünde bulundurularak aspartam içeren besin maddelerinin üzerinde fenilketonüri hastalarına özgü bir uyarı yazısı bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, ülkemiz ve dünya genelinde çokça kullanılan aspartam ve asesülfam K'nın, sıçanların testis dokusu üzerine etkilerinin ışık ve elektron mikroskobu ile araştırılması hedeflenmiştir. Bir grup hayvana 200 mg/kg günlük doz aspartam; diğer gruptaki hayvanlara ise 300 mg/kg günlük doz aspartam 8 hafta süreyle veriliyor. 200 mg/kg günlük doz aspartam verilen sıçanların testis dokularının ışık mikroskobik sonuçlarına bakıldığında, seminifer tübüllerde dejenere olmuş kısımların olduğu ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerin sayısında ise azalma olduğu görülmüştür. 300 mg/kg günlük doz aspartam verilen diğer gruptaki sıçanların testis dokularının ışık mikroskobik sonuçlarında seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve dökülmelerin mevcut olduğu, kimi tübüllerin ise vakuoliz bir görünüş aldığı görülmüştür. Üstelik birçok tübülün lümen kısmında immatur spermatojenik hücre yığına rastlanmıştır. Membrana propriada kalınlaşmanın olduğu ve düzensizlik dikkatleri çekerken, interstisyel alanda genişlemenin ve ödemin belirginliği tespit edilmiştir (Sencar & Kuyucu, 2020).

Aspartamın deney hayvanları üzerine zararlı etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada; 250 mg/kg, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg günlük doz aspartam tüketilmesinin karaciğer

enzimlerinden olan alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerini etkileyici derecede arttırdığı belirlenmiştir (Abhilash vd., 2011; AbdElwahab vd., 2017; Alkafay vd., 2015).

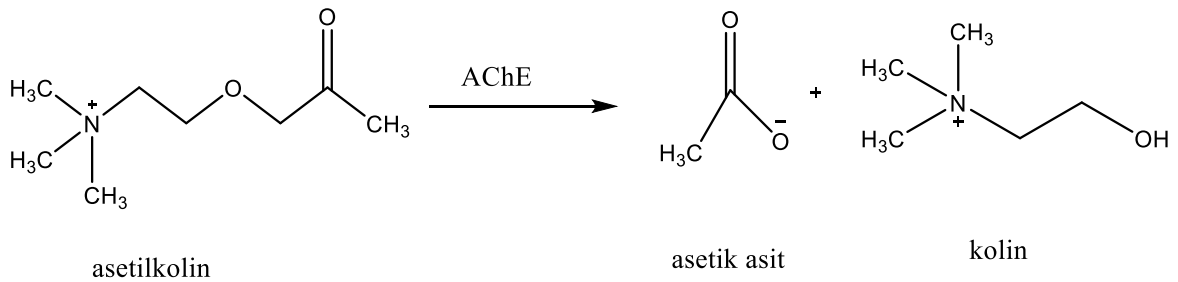
Bir başka çalışma ise sıçanların serebral korteksi üzerine yapılmıştır. Çalışma ile sıçanlarda serebral kortekste 2, 4 ve 6 haftalık sürelerle 40 mg/kg günlük doz aspartam oral yolla verilerek oksidatif stres üzerine etkisine bakılmıştır. Azalan lipid peroksidasyonu, glutatyon ile nitrik oksit seviyeleri ve süperoksit dismutaz, glutatyon-s-transferaz, katalaz enzimlerinin aktiviteleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aspartamın alınımı ile oksidatif stresin azalması tedavi süresine bağlı olabileceği ifade edilmiştir. Kısa süre aspartam alınımı oksidan bir etkiye sahip olmazken, sıçanlardaki serebral kortekste 4 ve 6 haftalık aspartam alınımı oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (Iman & Neveen, 2011).

Schwartz, yaptığı bir çalışma ile aspartamın kullanılmasının meme ve prostat kanseri görülme sıklığı arasında ilişki bulunduğunu saptamıştır (Schwartz, 1999).

2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)

Dokularda fosfolipidlerle bileşik halinde ya da serbest halde bulunan asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolini hidrolizleyebilen nonspesifik bir enzimdir. 1938 yılında ilk defa elektrik balığının elektrik organından ekstraksiyon yöntemiyle saflaştırılmıştır. AChE karaciğerde, eritrositlerde, sinir uçlarında, beyin gri cevherinde ve dalakta varlığı tespit edilmiştir. Büyük bir ester olan asetilkolin sinir hücreleri arasında nörotransmitter madde olarak görev yapmaktadır (Güven, 2000).

AChE'nin birincil biyolojik rolü; asetilkolinin sinaptik boşluğa salıverildiğinde oluşturduğu sinirsel impulsu hızlı bir şekilde sonlandırmasıdır. AChE, asetilkolinin (ACh) asetat ve kolin molekülüne hidrolizini sağlayarak sinaptik boşlukta oluşan ACh'yi ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2.4.) (Schumacher vd., 1986).



Şekil 2.4. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi (Kaynak: Schumacher vd., 1986)

AChE, her biri 80 kDa moleküler ağırlığı olan ve etki noktaları ayrı dört alt birimden oluşmuş bir proteindir. Asetilkolinin hidroliziyle lokal reseptörlerin devamlı uyarılması ve kas ya da sinirlerin paralizi engellenmektedir (Vale, 1998).

Asetilkolin (ACh), sinir ve nöromusküler sistemlerdeki esas nörotransmitter maddedir (Kirby vd., 2000). Ksenobiyotikler, canlılarda toksisite mekanizmalarını, asetilkolinesterazı (AChE) inhibisyona uğratarak da gerçekleştirebilirler. İnhibisyon sonucunda sinapslarda fazlaca ACh birikmesiyle nikotinik ve muskarinik reseptörlerinin aktiviteleri artar ve kolinerjik sistem devamlı olarak uyarılır (Hazarika vd., 2003). AChE aktivasyonundaki inhibitör etki, ksenobiyotiklerin aynı zamanda, sinir hücrelerinde olan enerji metabolizması gibi önemli hayati süreçleri etkilediği de görülmüştür (Nath & Kumar, 1999). AChE'nin inhibisyonunun ölçülmesi, ksenobiyotiklerle etkilenmenin ortaya konulmasında kullanılan faydalı bir biyobelirteçtir (Adams, 2002).

2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran kimyasal maddelere verilen isimdir. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapıli organik bir molekül olabilmektedir. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimelerin hepsi atomların dış yörüngelerinde bulunan elektronların seviyesinden başlayarak gerçekleşmektedir (Kılınç & Kılınç, 2002). Bu maddeler yüksek enerjili, kararsız ve eşleşmemiş elektron bulundurmalarından dolayı, başka maddeler ile reaksiyona girerek kararlı olma eğilimi içerisindedirler. Bu radikaller eksik olan elektronlarını tamamlamak için genellikle hücre içerisinde bulunan birçok moleküle (DNA, Protein, Lipid vb.) saldırı yaparak elektronlarını tamamlayıp kararlı bir yapıya ulaşabilmek amacıyla bu yapıların zarar görmesine yol açarlar (Akkuş, 1995).

Serbest radikallerin metabolizma içerisindeki yoğunluğu azaldığında bazı yararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Bunlar savunma sistemine katkı sağlama, hücreli sinyalleri aktive etme, bazı maddelerin biyosentez reaksiyonlarına katılarak gelişimlerini uyarma gibi etkilerdir. Serbest radikallerin canlı organizmada yoğunluğu arttığında zararlı etkileride ortaya çıkmaya başlar. Hücre içerisindeki organellerin zarlarında bulunan lipid, karbonhidrat ve proteinlerle ayrıca DNA ile etkileşime girerek oksidatif zararlara sebep olurlar. Bu yüzden metabolizmada oluşan oksidan düzeyindeki artış birçok hastalık ortaya çıkarabilir (Mangan, 2019). Serbest radikallerin sebep oldukları zararın, bağışıklık

sisteminde zayıflamaya, kalp damar hastalıklarına, katarakta, çeşitli kanser türlerine, sinir sisteminde dejeneratif hastalıklara neden olduğu bilinmekle beraber yaşlanmayı teşvik ettiğine dair bilgiler de bulunmaktadır (Diplock, 1998). Bu sebeplerden dolayı canlıda oksidan ve antioksidan düzeyinin dengeli bir şekilde bulunması gerekir (Mangan, 2019).

Serbest radikaller oksijen kaynaklı olabildikleri gibi nitrojen kaynaklı da olabilmektedirler. Bu serbest radikallerden oksijen kaynaklı olanlarına reaktif oksijen türleri (ROT) ismi verilirken, nitrojen kaynaklı olanlarına ise reaktif nitrojen türleri (RNT) ismi verilmiştir (Valko vd., 2007). İnsanda meydana gelen solunum reaksiyon zincirinde oksijenden dolayı süperoksit, singlet oksijen, hidroksil gibi bazı reaktif oksijen türleri (ROT) açığa çıkmaktadır. Metabolik reaksiyonlar sonucunda açığa çıkan süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($\bullet OH$), alkoksil ($RO\bullet$), peroksil ($ROO\bullet$) ve nitrik oksit ($NO\bullet$) gibi oksijen merkezli serbest radikallerin yanı sıra singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorit ($HOCl$) gibi radikal olmayan türlerde ROT olarak bilinen bileşiklerdendir (Stahl & Sies, 1993). Serbest radikaller metabolizma içerisine dışarıdan alınabileceği gibi endojen olarakta üretilmektedirler. Mitokondri organelinde enerji üretimi esnasında oluşabildiği gibi bazı hormonların neden olduğu stres reaksiyonlarının sonucunda da oluşabilmektedirler (Sakihama vd., 2002).

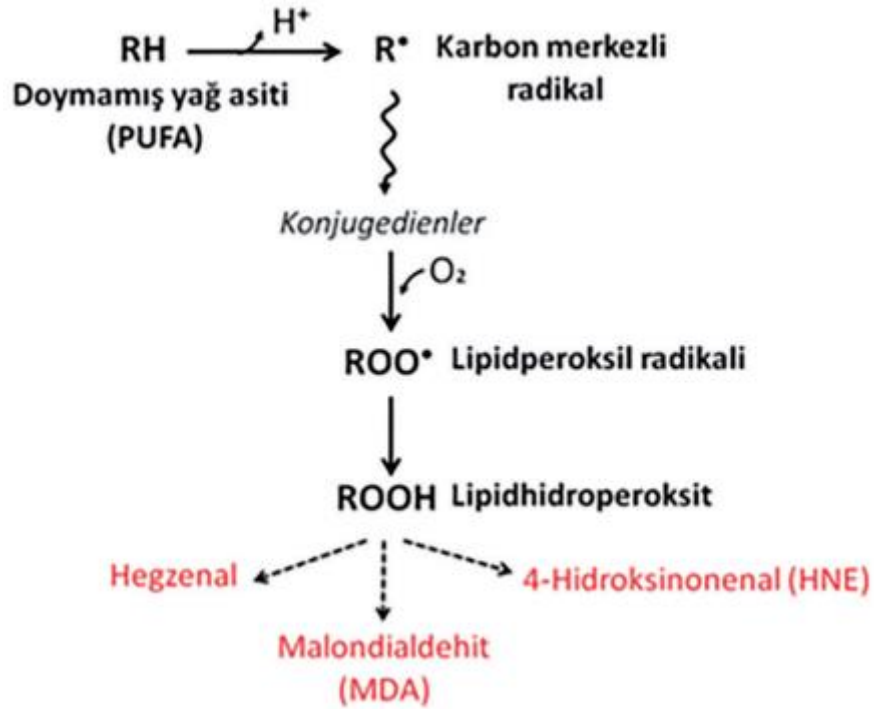
Endojen kaynaklı olarak, elektron transport sistemiyle aerobik solunum esnasında katalizlenen oksijenler yan ürün olarak, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal sitokrom oksidaz ve ksantin oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan, yangı durumunda serbest bırakılan sitokinler sayesinde makrofajların ve nötrofillerin üretmesiyle, immün sistemin patojenlere yanıt olarak ve otooksidasyon reaksiyonları gerçekleşirken nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve ksantin oksidaz (XO) gibi enzimler ile sitokrom P450 sisteminde açığa çıkan elektron kaçakları sebebiyle serbest radikaller üretilir. Ayrıca eksojen kaynaklı olarakta UV ışınlar, X-ray, mikrodalga ve gama ışınları, sigara ve alkol tüketimi, kloroform gibi su kirleticiler, böcek ilaçları ve parfümler vb. gibi etkenlerde serbest radikal oluşturur (Karabulut & Gülay, 2016).

2.8. Lipit Peroksidasyonu

Ksenobiyotiklerin sebep olduğu oksidatif stresin asıl hedefi hücre zarlarıdır. Hücre zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonu doku hasarına neden olan kaçınılmaz süreçlerden biridir (Possamai vd., 2007). Ksenobiyotiklerin zardaki fosfolipidlerde bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinde değişikliklere sebep oldukları bu olaya lipid

peroksidasyonu (LPO) denir. LPO, enzimler ve reseptörler gibi proteinlerin fonksiyonları üzerinde zarar verici etkiler gösterirler. Hücre zarlarında meydana gelen LPO, zarların yapısal bütünlüklerinde bozulmalara ve zarda fonksiyon kayıplarının olmasına neden olmaktadır (El-Gendy vd., 2010). Ksenobiyotik toksisitesinde rol oynayan önemli olay lipid peroksidasyonudur (Ognjanovic vd., 2010).

Serbest radikaller, hücre zarlarının fosfolipit tabakalarındaki çoklu doymamış yağ asitlerine saldırı yaparak LPO'nun son ürünü olan malondialdehiti (MDA) oluştururlar (Şekil 2.5.) (Mansour & Mossa, 2009). Oluşan MDA, zarda bulunan bileşiklerde çapraz bağlanmalara ve bu bileşiklerde polimerizasyona sebep olarak bunun sonucunda zar yapısında, iyon geçişlerinde ve enzim aktivitelerinde birçok değişikliğe yol açmaktadır (Akkuş, 1995). Ortaya çıkan bu durumlardan dolayı MDA'nın genotoksik, mutajenik ve karsinojenik olduğu ortaya sürülmektedir (Mercan, 2004). Ayrıca aldehit türevleri içerisinde yer alan MDA'nın fosfolipitler, nükleik asitler ve proteinlerdeki amino grup ile reaksiyona girmesi sonucunda bu moleküllerin yapısında bozulmalar olmaktadır (Krishnan & Kodrik, 2006). MDA, LPO'nun son ürünü olduğundan artan MDA, LPO'nun önemli bir indikatörü olup yüksek derecede toksik aldehit molekülüdür (Baş vd., 2013; Del Rio vd., 2005).



Şekil 2.5. Lipit peroksidasyonu yan ürünleri (Kyanka: Özcan vd., 2015)

2.9. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan sistemler arasında bulunan dengenin oksidanlar yönünde bozulması sonucunda lipid peroksidasyonunun ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla canlıda hücrel hasarlara yol açması olarak tanımlanmaktadır (Fearon & Faux, 2009). Başka bir ifadeyle ROT'un fazla miktarda üretilmesi de oksidatif stres olarak adlandırılabilir (Başkol vd., 2007). Oksidatif stres, fazla miktarda reaktif oksijen radikalının veya nitrojen radikallerinin oluşumuyla ya da antioksidan tampon sisteminin yetersiz olması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Reaktif oksijen ve nitrojen türevleri seviyelerinin artması hücrelerde toksik etkiye yol açarak hücrenin protein, lipid ve DNA gibi moleküllerine zarar vermektedir. Bundan dolayıda birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir yere sahip olmuştur (Erel, 2005; Işık & Selek, 2007). Oksidatif stres, yaşlanma, artrit, diyabet, astım, hipertansiyon, katarakt, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz, kanser, demens, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli patolojik durumlara yol açan bir dizi hücrel işlevi bozmaktadır (Gupta & Sharma, 2006; Jose & Janardhanan, 2000).

2.10. Antioksidanlar

Antioksidan, hücrede metabolizma reaksiyonları sonucunda ortaya çıkan toksik maddeler olan serbest radikallerle savaşarak onların oluşturacakları hasarı engelleyen maddelere denir (Granato vd., 2018). Antioksidanlar, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarları engelleyerek ve bu radikallerin fazlalıklarını deaktif ederek savunma sistemi olarak görev yaparlar. Metabolik reaksiyonlar sonucunda metabolizmada oluşan oksidan düzeyini ayarlayarak oksidan/antioksidan dengesini kurmaktadır (Lobo vd., 2010). Oksidan ve antioksidan dengesi bozulduğunda ise kanser başta olmak üzere birçok hastalık ortaya çıkabilir (Gupta vd., 2012). İnsanın metabolizması oluşan bu ROT'lara karşı kendi savunma sistemleriyle oluşturduğu ya da dışarıdan aldığı antioksidanlar aracılığıyla immün savunma sağlayarak kanser gibi ortaya çıkabilecek birçok hastalığı azaltabilir. Antioksidanların yapısında, serbest radikallerde olduğu gibi eşlenmemiş elektron bulundurmamak yerine tam tersi fazla elektron bulundurmaktadırlar ve bu elektronları serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için onlara aktarırlar (Valko vd., 2006). Bu sayede antioksidan maddeler, hücrelerde zarara yol açan prooksidanları (reaktif oksijen ve nitrojen türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek toksisitesi

düşük veya toksik olmayan ürünlere dönüştürmüş olurlar (Cao & Prior, 1999). Ayrıca antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunlarını engelleyerek ve reaktif oksijen türevlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedirler (Reiter, 2000).

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde göstermektedir. Bunlar;

1. Serbest radikallerin oluşmasının önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türlerini uzaklaştırma etkisi.
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etkisi.
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkisi.

2. Meydana gelen serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- SOD, GPx, katalaz gibi bazı antioksidanlar serbest oksijen radikallerine etki ederek onları tutar veya daha az reaktif özellikte olan başka bir moleküle çevirerek “**toplayıcı (scavenging)**” etki gösterirler.
- E vitamini (α - tokoferol), C vitamini (askorbik asit), flavonoid (kuersetin, kateşin vb.) gibi maddeler serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip onlara bir hidrojen atomu vererek aktivitelerini azaltıp veya inaktif hale dönüştüren “**bastırıcı (quencher)**” etkiye sahip özelliktedirler.
- Hemoglobin, albumin ve seruloplazmin ise serbest oksijen radikalleri bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp işlevlerini engelleyici “**zincir kırıcı (chainbreaking)**” etki gösterirler.
- Bu etki tipinde diğer etki şekillerinden farklı olarak serbest radikaller ile etkileşime girilmez. Serbest radikallerin meydana getirdikleri hasarların onarılması etkisi ise “**onarıcı (repair)**” etkidir (Mickle & Weisel, 1993; Temür, 2006).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki grup üzerinden değerlendirilirler. Endojen kaynaklı olan antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak iki gruba ayrılırken, eksojen kaynaklı antioksidanlar vitamin ve ilaçlar olarak iki gruba ayrılırlar. Endojen kaynaklı antioksidanlardan enzimatik grupta olanlara süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-tranferaz örnek verilirken, nonenzimatik grupta olanlara ise albümin, bilirubin, melatonin, koenzim Q10, seruloplazmin, ürik asit, glutatyon, transferrin, selenyum ve α -lipoik asit örnek olarak verilebilir (Tablo 2.3.) (Mangan, 2019).

Tablo 2.3. Endojen kaynaklı antioksidanlar

ENDOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	
Glutasyon redüktaz (GR)	Albümin	Glutasyon
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Koenzim Q 10	Transferrin
Katalaz (CAT)	Ürik asit	Seruloplazmin
Süperoksit dismutaz (SOD)	Bilirubin	Selenyum
Glutasyon-S- Transferaz (GST)	Melatonin	α -lipoik asit

(Kaynak: Karabulut & Gülay, 2016)

2.10.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

Ksenobiyotikler, antioksidan enzimlerin gösterdikleri aktivitelerde değişikliklere sebep olurlar (Ognjanovic vd., 2010). Antioksidan sistemler kimyasal stres altında indüklenirler veya inhibe olabilmektedirler. İndüklenme uyum olarak yorumlanmakta olup organizmanın güvensiz kirli ortamda kısmen veya tamamen stresle başa çıkabilir anlamı taşımaktadır. Diğer durumlarda organizma toksik ajana karşı daha hassas hale gelerek böylelikle toksisite başlamış olur. Bu yüzden antioksidan sistemler sadece kontaminant etkisine neden olmazlar, toksisitede de biyomarkır olmaktadır (Cossu vd., 1997).

2.10.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.10.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

ROT'lara karşılık savunmada ilk hattı oluştururlar (Karabulut & Gülay, 2016). SOD enzimi endojen olarak üretilen, prostetik gruplar içeren metalloenzimlerin grubundan olup hücreler için esansiyel özelliktedir. SOD, süperoksit radikale bir elektron vererek hidrojen peroksite (H_2O_2) indirgemektedir (Çaylak, 2011). Reaksiyon sonucu ortaya çıkan H_2O_2 daha sonra, katalaz ya da glutasyon peroksidazla ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Young & Woodside, 2001). İnsanda bu antioksidanın, bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) formu sitozol içerisinde, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) formu mitokondri organelinde ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) formu ise hücre dışı sıvılarda bulunmak üzere üç farklı formu vardır (Sen vd., 2010; Young & Woodside, 2001).

2.10.1.1.2. Katalaz (CAT)

CAT esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuş, yapılarında 4 tane “hem” grubu bulunduran hemoproteinlerdir (Ardağ, 2005). Bu enzim özellikle hayvanların karaciğerinin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca peroksizom, kemik iliği, böbrek ve çeşitli dokularda da bulunur (Çaylak, 2011; Çimen vd., 2005). CAT H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene dönüşmesini sağlayan enzimdir (Derviş, 2011).

2.10.1.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, dört protein alt biriminden oluşmuş olup, her bir alt birimde ise bir selenyum atomu bulundurur. Hücrelerin sitoplazmasında bulunan glutasyon peroksidazın görevi, H_2O_2 'den meydana gelen oksidatif hasara karşı hücreleri korumak ve lipid peroksitlerini etkisizleştirmektir. Bu sayede H_2O_2 'den $OH\cdot$ 'nin oluşumunu engellemektedir (Sen vd., 2010). Glutasyonu (GSH) substrat olarak kullanan GPx'in esas görevi H_2O_2 ve alkil peroksitleri indirgemektir (Ajiboye, 2010). GSH bu sırada oksitlenmiş glutatyonla yükseltgenmiş olur ve GPx, H_2O_2 'nin suya çevrilmesini sağlayarak H_2O_2 seviyesini azaltmaktadır (Aly vd., 2012; Chaudiere & Ferrari Iliou, 1999).

2.10.1.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

Flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunduran glutasyon redüktaz (GR), flavoprotein bir enzimdir. GR, GPx tarafından ortaya çıkarılan okside glutatyonu tekrar redükte glutasyon haline indirger. GR indirgenme reaksiyonu sırasında NADPH'yi elektron vericisi olarak kullanmaktadır (Reiter vd., 1995). GR, NADPH'nin elektronlarından birini GSSG'nin disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH oluşmasını sağlar (Özkan & Fışkın, 2004; Sen vd., 2010).

2.10.1.1.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-transferaz (GST) enzimi, araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri gibi lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesi göstererek oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemi oluşturmaktadırlar. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda

fonksiyona sahip olmalarının yanı sıra hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı özellikleri ile detoksifiye edici rolleride bulunur (Pektaş, 2009). GST, farklı elektrofilik maddelerin GSH'ın tiyol grubuna konjugasyonundan sorumlu olan bir enzim olduğundan dolayı daha az zehirli formlar ortaya çıkarmaktadır (Mansour & Mossa, 2010).

2.10.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

2.10.1.2.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), karaciğerde sentezlenen bir tripeptittir. Glutasyon disülfid ise (GSSG) oksidasyona uğramış halidir. Hücrelerde sitozol, çekirdek ve mitokondri organelinde bulunmaktadır (Büyükokuroğlu vd., 2008). GSH, peroksitler ve serbest radikaller ile tepkimeye girerek hücrelerde meydana gelen oksidatif hasarlara karşı hücreleri koruyan nonenzimatik antioksidanlardandır. GSH, GPx'in katalitik etkisi ile lipid peroksitlerinin ve H₂O₂'yi detoksifikasyonunu ya da singlet oksijen, O₂•⁻ ve OH• 'yi temizleme gibi görevleri yapmaktadır. Glutasyon serbest radikale kendinden bir elektron vererek etkisini ortadan kaldırmaktadır (Sen vd., 2010; Townsend vd., 2003).

2.10.2. Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar

Vitamin olan eksojen kaynaklı antioksidanlara D vitamini, α-tokoferol (E vitamini), β-karoten (A vitamini), askorbik asit (C vitamini) ve folik asitler örnek verilirken, ilaç olarak kullanılan olanlarına ise oksipürinol, tungsten, pterin aldehit, kalsiyum kanal blokerleri, trolox-C, rekombinant süperoksit dismutaz, asetilsistein, albümin, lokal anestezikler, demir redoks döngüsü inhibitörleri, barbitüratlar ve demir şelatörleri örnek olarak verilmektedir (Tablo 2.4.) (Mangan, 2019).

Ksenobiyotiklerin sebep oldukları oksidatif stresi azaltmak veya ortadan tamamen kaldırmak için farklı birçok antioksidan madde uygulanmaktadır. D vitamini, doğal olarak bulunan enzimatik olmayan antioksidanlardandır. Enzimatik olmayan antioksidan uygulamaların hücrelerin sahip olduğu antioksidan kapasiteyi arttırdıkları bilinmektedir (Ognjanovic vd., 2010).

Tablo 2.4. Eksojen kaynaklı antioksidanlar

EKSOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR	
VİTAMİN OLAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR
D Vitamini	Rekombinant SOD
Askorbik asit (C Vitamini)	Trolox-C
α -Tokoferol (E Vitamini)	Ksantinoksidaz inhibitörleri (oksipürinol, allopürinol, pterin aldehit, tungsten)
β -karoten (A Vitamini)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, lokal anestezikler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
Folik asit (B9 Vitamini)	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (albümin, mannitol)
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (Glutasyon peroksidaz aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Barbitüratlar
	Sitokinler
	Demir şelatörleri

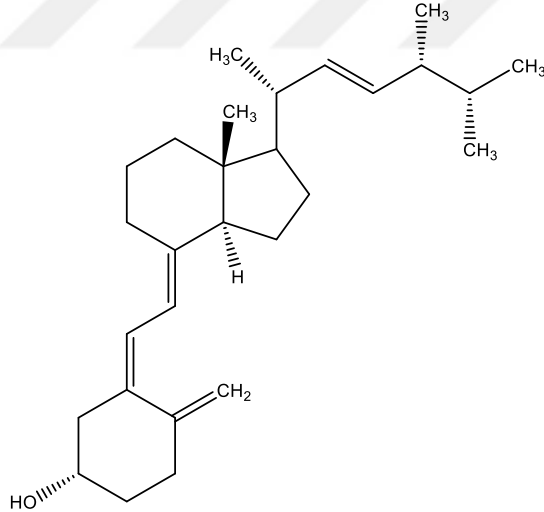
(Kaynak: Karabulut & Gülay, 2016)

2.11. D Vitamini ve Yapısı

Mc Callum adlı bilim insanı D vitaminini ilk kez 1992 yılında morina balığının karaciğerinden izole etmiştir (Barnard & Colon Emeric, 2010). Daha sonra Goldblatt ve Soames'in 1923'te yaptıkları çalışma ile de D vitaminin öncülünün deride bulunduğu ve güneş ışığı vasıtasıyla yağ içerisinde eriyen vitaminlerden birisi olan D vitamininin üretildiğini saptamışlardır (Goldblatt & Soames, 1923). Ayrıca D vitamini, vücutta uzun süre depolanabilen ve yağda çözünen vitaminlerden biridir (Çobanoğlu Özyiğitoğlu, 2020). D vitamininin yağ hücreleri içerisinde depo edilmesi, vücut içerisinde kolesterolden sentez edilebiliyor olması, üretildiği dokudan başka vücut alanlarında görev yapması, gerektiği zamanlarda kan dolaşımına verilebilir olması ve mineral dengesinin korunmasında düzenleyici görevlerinin olmasından dolayı hormon olarak kabul edilmektedir (Sözen, 2011). Ayrıca D vitamini endojen olarak uygun biyolojik ortamlarda sentez edilebilen hormon ve hormon öncülü bir steroldür (Çakıcı, 2016). D vitamini, güneş vitamini olarakta

ifade edilmektedir. Çünkü D vitamininin büyük bir oranı (%90-95) güneş ışınlarının etkisiyle sentezlenir (Çobanoğlu Özyiğitoğlu, 2020). Doğada bulunan besinlerin çok azında D vitamini bulunmaktadır. Bunlara yumurta, süt, tereyağı, birçok balık türü, bazı mantarlar ve karaciğer örnek olarak verilebilir (Emekli, 2006). D vitamininin ısıya ve pişirilmeye dayanıklı olmasından dolayı besinler D vitamini bakımından zenginleştirilebilmektedir (Holick, 2007). Zenginleştirme yapılırken genellikle D vitamininin D₃ formu kullanılmaktadır. D vitamini bakımından zenginleştirilen ilk gıda süttür (Pilz vd., 2018). Daha sonra zenginleştirmeler tam tahıllı ürünlerde, yoğurtlarda, peynirlerde, mamalarda, pasta ve margarinlerde yapılarak yaygın hale getirilmiştir. Son yıllarda ise özellikle portakal suyu gibi meyve sularıda D vitamini bakımından zenginleştirilen besinler içerisinde (Garcia vd., 2019; Pilz vd., 2018).

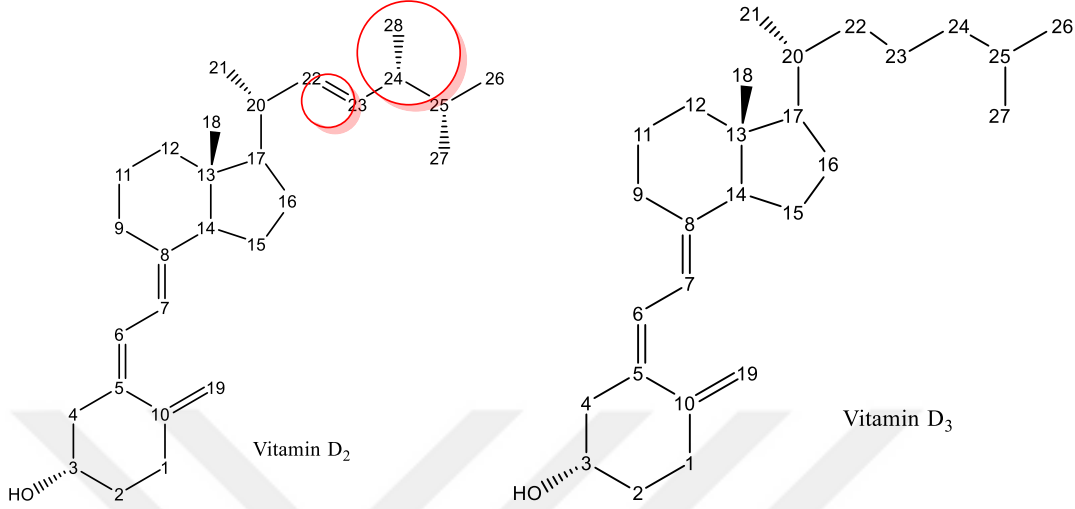
D vitamini, beyaz ve kristal yapıdadır (Holick, 2005). D vitamini; dört halkasal yapıdan oluşmuş yağda çözünen sterol özellik taşıyan, kalsiyum ve fosfor metabolizmasının en önemli hormonudur (Şekil 2.6.) (De Luca, 2004; Shihadeh, 1998). D vitamini su içerisinde çözünmezken, kloroform, benzen, etanol ve aseton gibi organik çözücüler içerisinde çözünmektedir (Zempleni vd., 2008).



Şekil 2.6. D vitamininin kimyasal yapısı

D vitamininin doğada, vitamin D₂, vitamin D₃, vitamin D₄, vitamin D₅, vitamin D₆ ve vitamin D₇ olarak adlandırılan 6 ana formu bulunmaktadır. Bu formların içerisinde Vitamin D₂ (25(OH)D, ergokalsiferol) ve Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D, kolekalsiferol) en önemli olanlarıdır (Chen, 2013).

D₂ vitamin formunun D₃ vitamin formundan farkı, 22. ve 23. karbon atomları arasında çift bağ ve 24. karbon atomuna bağlı metil grubunun bulunmasıdır (Şekil 2.7.) (De Luca & Zierold, 1998).



Şekil 2.7. Vitamin D₂ ve D₃ formları arasındaki yapısal fark

Vitamin D₂ fotokimyasal yolla bitkilerde üretilirken, vitamin D₃ güneş ışığından yararlanılarak derinin dermis ve epidermis tabakalarında sentezlenmektedir (Çobanoğlu Özyiğitoğlu, 2020). Bitkisel kaynaklı olan vitamin D₂ (ergokalsiferol) en çok maya ve mantarlarda bulunmaktadır. Vitamin D₃ (kolekalsiferol) ise karaciğer, sardalya, morina karaciğeri, somon, balık yağı, ton balığı, süt, tereyağı, margarin ve yumurta sarısında doğal olarak bulunmaktadır (De Luca & Zierold, 1998; Holick & Chen, 2008).

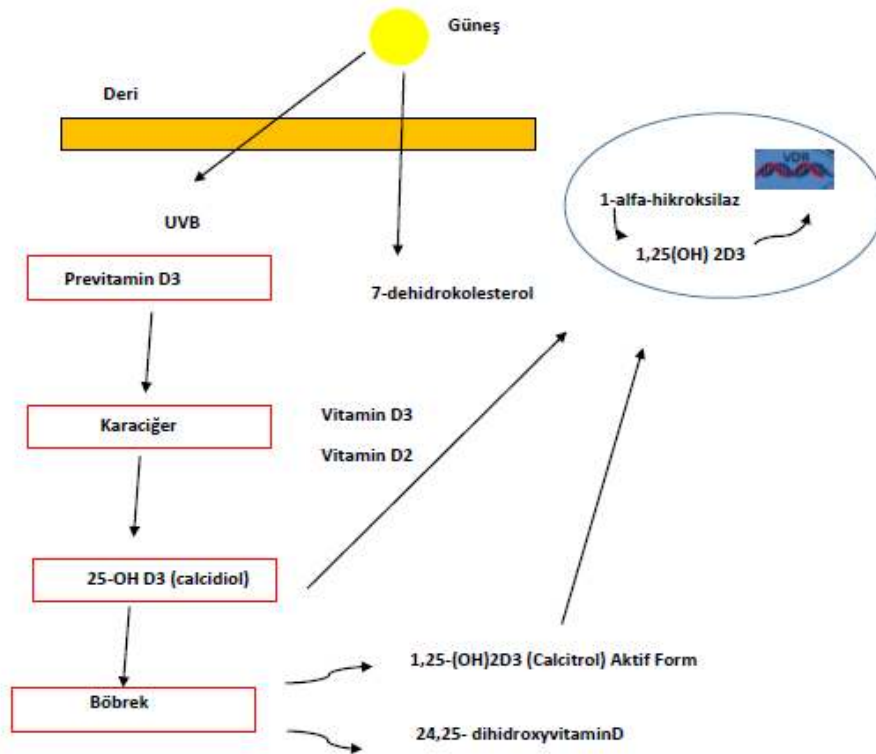
2.11.1. D Vitamininin Metabolizması

D vitamininin formları içerisinde sadece D₃ vitamini insan vücudunda sentezlenmektedir. Bitkisel kaynaklı olan D₂ vitamini (ergokalsiferol) ise mor ötesi ışınlar vasıtasıyla bitkilerin yapraklarında sentezlenmektedir. Her iki formda hem diyetle alınabilirken hem de sentetik olarak üretilebilirler (Holick, 2005). Vitamin D₂ ve D₃ formları yağda çözünebildiklerinden dolayı yağ dokusu içerisinde, deri, karaciğer, bağırsak gibi birçok dokunun lipid bileşenlerinde bulunmaktadır (Gürdöl & Ademoğlu, 2010).

Ultraviyole B (UVB) ışınlarının (290-315 nm) epidermis tabakasını geçerek fotokimyasal olarak D vitamininin aktif formu oluşturmak için 7-dehidrokolesterolden (7DHC) vitamin D₃'ün (kolekalsiferol) oluşmasıyla insanın derisinde başlayan bu süreç, karaciğer ve böbreklerde devam eder. D₂ ve D₃ formları biyolojik açıdan aktif değildir ancak peş peşe

gerçekleşen iki hidroksilasyon basamağı ile aktif D vitaminine çevrilirler. Deride üretilen kolekalsiferol D vitamini bağlayıcı protein (VDBP; Vitamin D Binding Protein) aracılığıyla karaciğere taşınır (Fidan vd., 2014; Holick, 2005).

Hayvansal besin kaynaklarından alınan D₃ vitamininin ve bitkisel besin kaynaklarından alınan D₂ vitamininin bağırsaklardan emilimi olduktan sonra, VDBP aracılığıyla dolaşıma katılarak karaciğere taşınırlar (Gürdöl & Ademoğlu, 2010). İlk hidroksilasyon karaciğerde kolekalsiferol'ün 25. karbonunda gerçekleşir ve kolekalsiferol-25-hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksikolekalsiferole (25-OH D₃) dönüşür. İkinci hidroksilasyon ise böbreklerde gerçekleşir. Böbreklere geçen 25-OH D₃'ün bir kısmı burada 25-hidroksikolekalsiferol-1- α -hidroksilaz enzimi ile aktif form olan 1,25-dihidroksikolekalsiferole (1,25(OH)₂D) dönüşürken bir kısımda 24,25 dihidroksikolekalsiferole (24,25(OH)₂D) dönüşmektedir. Oluşan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25(OH)₂D), D₃ vitamininin en aktif formu olup, D vitamininin tüm etkilerinden sorumludur (Şekil. 2.8.) (Dittmer & Thompson, 2011).



Şekil 2.8. D vitamininin metabolizması (Kaynak: Özkan & Döneray, 2011)

D vitamininin hücredeki etkilerini gösterebilmesi için önemli bir yapı olan D vitamini reseptörünün (VDR) aktifleşmesi gerekmektedir ve bu reseptör D vitamini, hedef hücreye gittiği zaman aktif hale gelmektedir (Alptekin, 2017). VDR, steroidler, tiroid hormonları

ve retinoik asit reseptörlerini içeren nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Özkan & Döneray, 2011). VDR proteini, 48,3 kD ağırlığına sahip olan bir moleküler yapıda ve 427 aminoasit uzunluğundadır (Dayangaç vd. 2002). İnsanda VDR geni 12q 13-14 kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca D vitamininin VDR'ye bağlanması D vitamini tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Valdivielso & Fernandez, 2006). VDR renal hücrelerin dışında 30'dan fazla dokuda (beyin, endotel, monosit, miyokard, akciğer, deri, meme, prostat, düz kas, kolon ve makrofajlar vb.) aktif olarak saptanan intraselüler nükleer reseptör olarak gösterilmiştir (De Luca & Cantorna, 2001; Nemere & Carson Farach, 1998; Vuolo vd., 2012).

D vitamini etkisini ya diğer steroid hormonlar gibi direkt olarak VDR üzerinden gen transkripsiyonunu sağlayarak genomik etki şeklinde ya da hücre zarı üzerinde bulunan VDR üzerinden kalsiyum (Ca), klorür (Cl) gibi iyonların zar geçişlerini değiştirerek veya hücre içi sinyal iletim molekülleri olan cAMP, fosfolipaz C, fosfatidil inositol-3 kinaz, protein kinaz A ve mitojen aktive protein kinaz miktarlarını aktivite ederek non-genomik etki ile reseptör düzeyindeki etkisini göstermektedir (Özkan & Döneray, 2011). D vitamini nükleer reseptörü ligandındaki genomik ve non-genomik aktiviteler birbirini bütünleyici niteliktedir. D vitamini reseptör ile uyarıldığında genomik aktivitesi günlerce devam etmektedir ve bu süreçte kaç geni regüle ettiği ise hala bilinmemektedir (Hamilton, 2011). Daha sonra yapılan çalışmalar ile aktif olan D vitamininin genomik yol aracılığıyla 300'den fazla genin ifadesini doğrudan aktive ya da inhibe ettiği belirtilmiştir (Hosseinezhad vd., 2013). D vitamini ile yapılan gen ekspresyon çalışmalarıyla aktif formda olan D vitamininin genomik ve nongenomik yollarla toplam genomun % 0,8- 5'ini regüle ettiği vurgulanmıştır. Yapılan birçok çalışma sonucunda D vitamininin aktif formunun, hücresel büyümenin düzenlenmesi, DNA onarımı, zar geçişleri, apoptozis, oksidatif stres ve hücresel metabolizma gibi birçok olayda görev aldığı ortaya konulmuştur (Holick & Chen, 2008). Aynı şekilde bağlanan D vitamini osteoporoz, depresyon, otoimmün ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser vb. gibi hastalıkların oluşum mekanizmasına da etki etmektedir (Çakıcı, 2016).

D vitamini ile VDR' nin bağlanması ile başlayan süreç, VDR'nin antioksidan enzimleri kodlayan gen bölgelerinde bulunan Vitamin D cevap elemanına (VDRE) bağlanmasıyla antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırması ve oksidatif stresin indirgenmesi ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Jain & Micinski, 2013). Vitamin D₂ veya Vitamin D₃'ün toplam miktarının sadece %1'inin serbest bir şekilde dolaşımda bulunması D vitamininin

zehirlenme tehlikesine karşı koruyucu bir mekanizma olduğu belirtilmiştir (Barnett & Klein, 2006).

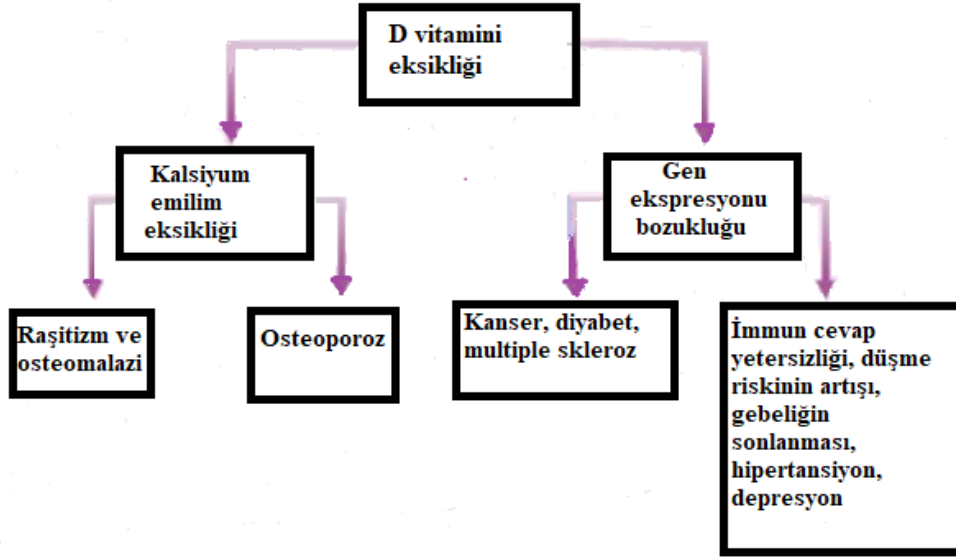
2.11.2. D Vitamini Düzeyleri ve Fonksiyonları

1,25(OH)₂ D biyolojik açıdan aktif form olmasına karşın yarı ömrünün 4-6 saat gibi kısa bir zaman oluşundan ve dolaşımdaki düzeyleri 25(OH)D'den 1000 kat daha düşük olduğundan dolayı ideal ölçüme uygun değildir. Kişideki D vitamini düzeyini değerlendirmek için yarı ömrü 2-3 hafta olan 25(OH)D düzeyine bakılmalıdır. D vitamini eksikliğinin ve yetersizliğinin tanımlanması ve 25(OH)D düzeyinin normal aralığının saptanması için birden fazla çalışma yapılarak bunun sonucunda; 25(OH)D düzeyi 20 ng/mL'den düşük ise D vitamini eksikliği, 21 ile 29 ng/mL arasında ise D vitamini yetersizliği, 30 ng/mL'den yüksek ise yeterli düzey (tercih edilen aralık 40-60 ng/mL) ve 150 ng/mL'den yüksek ise D vitamini intoksikasyonu (zehirlenme) olarak kabul edilmiştir (Holick vd., 2011; Wacker & Holick, 2013).

D vitamininin metabolizmadaki önemli görevleri şu şekilde sıralanabilir;

- Bağışıklığı güçlendirerek destek sağlar,
- Antiinflamatuvar özellikler gösterir,
- Kalsiyum mineralinin ince bağırsaktan emilimini uyarır,
- Parathormonla beraber canlının kalsiyum ve fosfor iyonlarının dengesini düzenler,
- Kandaki yeterli düzeyde kalsiyumun ve fosfatın bulunmasını sağlayarak kemik oluşumu, kemiğin mineral dengesi, kemiğin büyümesi ve kemikteki hasarlı kısımların tamir edilmesini sağlar (Akkoyun vd., 2014; Holick, 2009; Kennel vd., 2010).

Vitamin D sinyalizasyonunda meydana gelen aksaklıklar ve D vitamininin yetersizliği, diyabet, osteoartrit, kanser, tüberküloz, kardiyovasküler, MS, rikets, osteomalazi, osteoporoz ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir (Şekil 2.9.) (Akbel, 2010; Uitterlinden vd., 2004).



Şekil 2.9. D vitamini eksikliğinde oluşan rahatsızlıklar (Kaynak: Tezcan, 2012)

Vitamin D'nin sinir sisteminde hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, nörotransmisyonu ve nöroplastisite de çeşitli değişken rollerinin bulunduğu ve nörotrofik, nöroprotektif etki sağladığı görülmüştür (Yılmaz & Yılmaz, 2013). D vitamini nöron gelişimini teşvik ettiği gibi beyin gelişiminde ve fonksiyonlarında pozitif etkilerinin olduğu eksikliğinde ise olumsuz etkilerin olduğu ortaya konulmuştur (Brown vd., 2003; Kesby vd., 2011). D vitamininin eksikliği giderek daha fazla sayıda psikiyatrik durumla ilişkilendirilmektedir. D vitaminin bir nörosteroid olarak sınıflandırıldığı ve beyinle alakalı Parkinson, Alzheimer, Multiple skleroz (MS) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi birtakım hastalıkların gelişimiyle bağlantılı olduğu gösterilmektedir. Nörogelişimsel bozukluklar ve zihinsel yetersizliklerde, epilepsi, demans ve Alzheimer, şizofreni gibi hastalıklar için D vitamininin olumlu katkılarının olduğu vurgulanmaktadır (Çobanoğlu Özyiğitoğlu, 2020).

İmmün sistem üzerinde D vitamininin etkilerinin yanında oksidatif strese karşıda koruyucu etkisi bulunmaktadır ve bu etkisini ise nükleer reseptör olan VDR'ye bağlanarak başlattığı düşünülmektedir (Berridge, 2015; Dong vd., 2012).

2.11.3. D Vitamini İle Yapılan Çalışmalar

D vitamininin immün sisteme olan etkisinin yanı sıra oksidatif strese karşıda koruyuculuğunun olduğu ortaya konulmuştur (Berridge, 2015; Dong vd., 2012). D vitamini plazma zarlarının stabilizasyonunu sağlamasıyla lipid peroksidasyonunu azaltır. Bir diğer şekliyle GSH, GPx ve SOD gibi antioksidan sistemde görevli enzimlerin nükleer

reseptörleri üzerinden upregülasyonunu sağlayarakta antioksidan özellik gösterir (Salum vd., 2013). D vitamini, yaşlanma karşıtı bir hormon olan Klotho ve Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) gibi transkripsiyon faktörlerinin yoluyla, ROT'ları ortadan kaldırıp ya da normal ROT sinyalizasyonunda oluşan oksidatif değişikliklerini geri dönüştürmesiyle oksidatif stresi engelleyen aktioksidan genleri ekspresyon ederek regüle etmektedir (Berridge, 2015). Gama glutamil transpeptidaz (GGT), GSH'ın sentezini artırır ve D vitamini GGT'nin ekspresyonunu arttırmaktadır. GGT'den dolayı artan GSH ise ROT üretiminin başlıca kaynağı olan NADPH oksidaz'ın (NOX) ekspresyonunu azaltıcı etki yapmaktadır (Dong vd., 2012). Ayrıca D vitamini, glikoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD), glutamat sistein ligaz, GR gibi antioksidan enzimlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bir diğer görevi ise majör redoks tamponu GSH'ın üretimini arttırmaktadır ve GPx ekspresyonunuda arttırarak H_2O_2 'in su molekülüne dönüşmesini sağlamaktadır (Jain & Micinski, 2013). Oksidatif stresin kontrolünü ve indirgenmesini sağlayan diğer bir mekanizma ise D vitamininin hücre içi Ca^{2+} homeostazisinin sağlanmasındaki rolüdür. Sürekli bir şekilde hücre içinde artan Ca^{2+} konsantrasyonunun sonucunda mitokondride Ca^{2+} birikmeye başlar. Bu durum ise mitokondriyal metabolizmayı artırır ve böylelikle O_2^- ve H_2O_2 üretiminde artışlar meydana gelir. Mitokondrinin içinde artmış olan O_2^- üretimi ise Ca^{2+} 'a sinerjik bir etki yapmaktadır. Buda mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının açılarak mitokondri içerisine daha fazla Ca^{2+} girmesine neden olmaktadır (Berridge, 2015). Hücre içindeki Ca^{2+} miktarının artması ROT üretilmesinin yanında hücre içinde RNT üretilmesini de arttırmakta olup ayrıca peroksinitrit ($ONOO^-$) üretimiyle sonuçlanabilen nitrik oksit (NO) miktarında da artışa sebep olduğu görülmektedir. D vitamini bu süreçte, hücre içerisine Ca^{2+} girmesini sağlayıcı L tipi Ca^{2+} kanallarının ekspresyonunu azaltır (Brewer vd., 2001).

Yapılan çalışmalar glikoz intoleransı ve Tip 2 diyabetin gelişmesinde, D vitamininin pankreatik β -hücre fonksiyonunu iyileştirdiği, insülin direncini düşürdüğü ve sistemik inflamasyon üzerinde pozitif etkisi olduğunu ortaya koymaktadır (Hu vd., 2004).

D vitamini düzeylerinin kanser olmuş kişilerde düşük olduğunu göstermeyi amaçlayan Liang Shi ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada, kanser tanısı konulan 1940 kişinin %71'inde serum 25(OH)D düzeylerinin yetersiz ve eksik olduğu ortaya konulmuştur.

Ji Riyang Kim arkadaşları ile birlikte yaptığı bir çalışmada, düşük 25(OH)D seviyesinin kanser hastası olan bireylerde kötü patolojik sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda tümör hücrenin iriliği ve lenf nodlarının

yayılma alanındaki fazlalık gibi ortaya çıkan kötü patolojik sonuçların D vitamini düzeyi daha düşük olan bireylerde daha kötü sonuçların olduğunu anlamlı olarakta farklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Kim vd., 2014).

Pludowski ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada ise D vitamini düzeyinin yeterli olması, bazı kanser (meme kanseri, kolorektal kanser ve kolorektal adenomlar) risklerini azaltmada önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir.

Marquardt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ile Almanya’da bulunan hemodiyaliz hastalarının D vitamini eksikliği ve yetersizliğinin %79,7 oranında olduğu yine bu bireylerde kanser görülme sıklığının yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak böbrek rahatsızlıkları olan hastalarda görülen kanser riski için D vitamininin kanseri etkileyici özelliklerini vurgulayarak daha fazla çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulduğunu belirtmişlerdir (Marquardt vd., 2015).

Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, D vitamininin seviyesi azaldığında Parkinson hastalığının riskinde artışın olduğu, fakat D vitamini eksik olan Parkinson hastalarına D vitamini takviye edilerek D vitamini seviyeleri arttırılırsa motor fonksiyonların üzerinde bir etkisinin olmayacağını belirtmişlerdir (Zhou vd., 2019).

Birçok yapılan çalışmalar ile vitamin D bileşiklerinin Th1 ve Th2 hücrelerinin proliferasyonunu uyarıcı veya inhibe edici etkisinin varlığı gösterilmiştir fakat bu bileşiklerin otoimmün hastalıklar açısından ifadesinin zor olduğu belirtilmiştir (Adorini & Penna, 2008).

D vitamini düzeyi yeterli olan fareler ile D vitamini eksik olan fareler üzerinde yapılan bir çalışmada bu farelere kolon kanseri olan hücreler enjekte edilmiştir. Bunun sonucunda D vitamini eksik olan farelerde tümör büyümesinde anlamlı olarak bir fazlalık görülmüştür (Tangpricha vd., 2005).

Genç ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile korneal epitelyal ve endotelyal hücrelerde, skleral fibroblastlarda, siliyer cismin pigmentsiz epitelinde ve erişkin retinal pigment epitel hücre kültürlerinde 1- α hidroksilaz aktivitesinin gösterildiğini, bundan dolayı D vitamininin oküler sağlığın korunmasında önemli olduğunu belirtmişlerdir (Genç vd., 2015).

MS teşhisi konan hastalarda yapılan bir çalışma sonucunda, bu hastalara D vitamini verildiğinde hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı yönünde pozitif sonuçlar ortaya konulmuştur (Minen & Karceski,2011).

Yapılan bir başka çalışma ile D vitamini düzeyinin yeterli olması otizm için koruyucu olduğu üstelik daha yüksek dozlarda D vitamini verilmesi potansiyel bir tedavi olabileceği gösterilmiştir (Cannell & Grant, 2013).

Yapılan çalışmalarla aktive olmuş D vitamini; hücre döngüsü inhibitörleri p21, p27 ve hücre adezyon molekülü e-kaderin ekspresyonunu uyarmaktadır. Ayrıca keratinositlerde UV ışınlarının neden olduğu DNA hasarlarının tamirini arttırdığı, apoptozu azalttığı görülmüştür (Bikle, 2009).

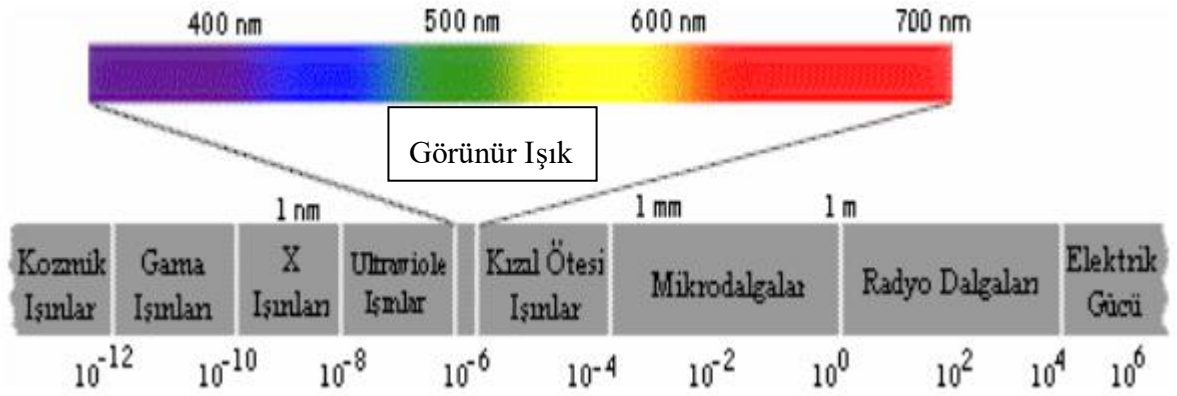
2.12. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi; bir numunedeki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğer enerji düzeyine geçmeleri esnasında absorblanan (soğurulan) veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesini ve yorumlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Şuan günümüzde geliştirilmiş olan spektrofotometreler 200-2500 nm dalga boyları arasındaki hem ultraviyole (UV) hem görünür bölge (VIS) hem de infrared (IR) bölgelerinde ölçüm yapabilen cihazlardır (Milli Eğitim Bakanlığı [MEB], 2012).

2.12.1. Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge (VIS) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Gıdaların nitel ve nicel analizlerinde, UV ve görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler en çok yararlanılan yöntemlerden birisidir (Altun, 2014).

Şekil 2.10' da spektroskopide yaygın olarak kullanılmakta olan spektrum bölgelerinin dalga boyları ve frekans aralıkları gösterilmiştir. Görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerin elektronik geçişlerinde verdikleri spektrumları konu aldığından dolayı bu ikiliye **elektronik spektroskopi** denilmektedir ve 100-700 nm aralığını kapsamaktadır. N₂ ve O₂ gazlarının absorpsiyonu 100-200 nm aralığında olduğundan bu bölgede yapılacak çalışmaların vakum altında yapılması gerekir bu yüzden bu aralığa vakum UV bölgesi, 200-400 nm aralığa yakın UV veya UV bölgesi ve 400-700 nm aralığa ise **görünür bölge** denir (Altun, 2014).



Şekil 2.10. Elektromanyetik spektrum bölgeleri (Kaynak: Altun, 2014)

Spektrofotometrelerin çalışma prensipleri, hazırlanmış çözeltiden belirli dalga boyunda ışık geçirilmesi ve bu ışının çözelti tarafından ne kadar miktarının tutulduğunun bulunmasına dayanmaktadır. Çözelti içerisinde bulunan madde miktarı ne kadar çok olursa çözelti tarafından tutulan ışın miktarıda o kadar fazla olur. Çünkü çözelti içerisindeki maddelerin tamamı verilen ışınların bir dalga boyunu tutarken geriye kalanlarını yansıtır veya geçirir. Çözelti içerisindeki madde ile verilen ışının etkileşmesi sonucu oluşacak olaylardan en önemlisi ışının absorbe edilmesidir. Çeşitli dalga boyları içeren bir ışın demeti saydam bir ortamdan geçirildiğinde içindeki bazı dalga boyları kaybolur. Bu olaya ışının absorblanması denir. Belirli dalga boyundaki ışınlar absorbe edildiğinde ışının enerjisi maddenin moleküllerine, atomlarına ya da elektronlarına geçerek onları daha yüksek enerjili hale getirmektedir. Bu duruma ise atom veya moleküllerin uyarılması denir. 10⁸ sn kadar sürede uyarılmış halde kalan atom veya moleküller, tekrar enerji seviyelerine dönerek uyarılma sırasında aldıkları enerjiyi ısı veya ışık olarak geri verirler (MEB, 2012).

Bir çözeltinin geçirgenliğini ve absorbansını etkileyen şeyler; ışığın geçtiği yolun kalınlığı (küvetin kalınlığı), çözeltinin yoğunluğu ve her bileşik için sabit olan molar absorpsiyon katsayısıdır (Altun, 2014).

Bütün spektroskopik yöntemlerde (emisyon spektroskopisi hariç) numune kaplarına ihtiyaç vardır. Numune kaplarına **hücre** veya **küvet** denilmektedir. Küvetler çalışmakta olan dalga boyu aralığı için geçirgen yapıda olan, soft veya borosilikat cam, kuvars veya plastikten yapılmaktadır. Görünür bölgedeki ölçümlerde cam küvetler kullanılmaktadır. Asidik solüsyonlarda soft cam kuvetler kullanılırken, bazik solüsyonlarda borosilikat cam küvetler kullanılır. 350 nm altındaki ışığı cam küvetler absorplayacağından UV bölgede yapılan çalışmalarda kuvars veya erimiş silis küvet kullanışlı iken hem UV hem de görünür

bölgede yapılan çalışmalarda ise kuvars küvetler daha kullanışlıdır. 200-700 nm dalga boyu arasında yapılan çalışmalarda özel olarak üretilen kalitesi yüksek plastik küvetler kullanılmaktadır. Ayrıca sodyum klorür kristalleri ise IR bölgede kullanılan uygun hücre penceresidir (MEB, 2012).

Plastik küvetler ekonomik olarak daha uygun fiyatlıdır ancak kullanımları esnasında kolayca çizilebildiklerinden dolayı uzun ömürlü değildirler. Kuvars küvetler çalışmalar için ideal bir küvet olmasına rağmen çok pahalıdır. Cam küvetler ise hem ucuz hemde dayanıklı olmalarından dolayı en fazla tercih edilen küvetlerdir (MEB, 2012).

Spektrofotometre cihazlarının çoğunda (özellikle UV, FTIR) maddelerin absorpsiyon ölçümleri yapılırken ışık sadece hedef molekül ile etkileşime girmeyip çözeltiyle de girmektedir. Bundan dolayı cihazın verdiği spektrum sadece hedef moleküllerin absorpsiyonu değil tüm çözeltinin absorpsiyon spektrumudur. Bu durumu engellemek için kör (blank) alınarak sadece hedef molekül türünün absorpsiyonu ortaya çıkarılmış olur. Kısaca bu işleme kara almakta denir. Kör çözeltisi, spektrofotometrik cihazda okuma yapılmadan önce absorbansı 0 veya % transmittansı 100'e ayarlama amacıyla kullanılır. Üç çeşit kör çözeltisi bulunur. Bunlar:

Optik kör; küvetten ve çözeltilerden geçebilecek absorbansları ortadan kaldırmak amacıyla hazırlanan, stok standart çözelti hariç diğer kimyasalların konulmasıyla hazırlanan ve 0,0 konsantrasyona sahip çözeltidir. Bu kör analiz öncesi mutlaka yapılması gerekirken, analiz esnasında yapılmasında gerekebilir.

Reaktif körü; bulanık veya renkli reaktiflerin olduğu numune ile çalışıldığında sadece o reaktifin bulunduğu kör olan ve o reaktiften gelebilecek absorbansı ölçmek için kullanılmaktadır.

Numune körü; bulanık veya renkli numunelerle yapılan çalışmalarda içerisinde sadece numunenin bulunduğu ve numunenin renginden gelebilecek olan absorbansı ölçmek için kullanılan kör çözeltilerdir.

Spektrofotometre cihazı optik köre karşı sıfıra ayarlandıktan sonra reaktif körünün absorbans değeri, numune ve standartların absorbansından çıkarılarak hesaplama yapılır. Numune körünün absorbansının hesaplanması ise sadece numunenin absorbansından çıkarılarak yapılmaktadır (Altun, 2014).

2.12.2. Titreşim Spektroskopisi

Bir molekül veya moleküllerin titreşim frekansları İnfrared ve Raman spektroskopisi olmak üzere temelde iki farklı spektroskopik teknik ile incelenebilir. Bu nedenle bu iki spektroskopi çeşidine **titreşim spektroskopisi** denir. Titreşim spektroskopisi, maddenin ışınları absorblaması (IR) veya saçması (Raman) üzerine kurulu bir yöntemdir. Titreşim spektroskopisinde ışınlar dalga boyları ile belirlenmez, dalga sayıları ile belirlenmektedir. Bu spektroskopi ile molekülde bulunan kimyasal bağların titreşim enerjileri uyarılarak kimyasal bağ ve fonksiyonlu gruplar belirlenmiş olur. Daha çok yapı analizinde kullanılırken çoğu durumda elektronik ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile beraber kullanılmaktadır. Optik izomerlerin titreşim spektrumları birbirinin eşdeğeri olabilirken diğer hiçbir bileşiğin spektrumu birbirinin eşdeğeri değildir (Arı, 2015).

2.12.3. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi 1928 yılında Hintli fizikçi C. V. Raman ve Kirishnan tarafından geliştirilen yapısal analizler için kullanılan etkili bir araçtır (Diem, 1993). Bir maddenin üstüne absorbe edemeyeceği oranda yüksek enerjiye sahip bir ışık gönderildiğinde gelen ışığın az bir miktarı her yöne saçılmaktadır (Arı, 2015). Raman etkisi, saçılan malzeme ve ışık arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Li, 2017).

Malzeme içerisindeki moleküllerin şiddetli monokromatik ışın demetiyle etkileşmesi esnasında ışığı absorbe etme olayı gerçekleşmiyorsa ışık saçılması olayı gerçekleşir. Raman olayı ışığın saçılım sürecine dayanmaktadır. Saçılmış olan ışık Rayleigh ve Raman saçılması olarak iki tiptedir. Elastik bir saçılma olan Rayleigh saçılmasında gelen ışığın dalga boyu ile saçılan ışığın dalga boyu aynı olurken, elastik bir saçılma olmayan Ramanda ise saçılan ışığın dalga boyu gelen ışığın dalga boyundan daha büyük olmaktadır. Rayleigh saçılması Raman saçılmasına göre daha şiddetli saçılmış ışık oluşturmaya rağmen bir adet pik verirken, titreşim geçişleri hakkında bilgi vermez. Raman saçılımının diğer saçılma çeşitlerinden farkı, saçılan ışının bir kısmının moleküllerdeki titreşim enerji geçişleriyle frekans değişimlerine uğramasıdır. Raman spektroskopisi yönteminde molekülle etkileşen ışığın dalgaboyuna göre saçılan ışığın dalgaboyunda oluşmuş olan farka Raman kayması denir. Raman spektroskopisi yöntemi ile katı, sıvı ve gaz numuneler incelenebilir (Yadav & Singh, 2015). Raman spektroskopisinde, numuneye lazer kaynağıyla ışın göndererek aydınlatma yapılır, elektromanyetik radyasyon toplanarak

elastik saçılan radyasyonu filtrelemek için bir monokromatör aracılığı ile gönderilmektedir. Raman spektrumu elde etmek için toplanan ışığın geri kalanı ise bir dedektöre dağıtılır (Li, 2017).

Raman spektroskopisi, diğer spektroskopik teknikler arasında, özellikle su gibi polar çözücüler içeren kimyasal sistemlerde öne çıkan bir seçimdir (Ferraro vd., 2003). Suyun zayıf Raman saçılımı, sulu kimyasal sistemlerde yerinde analize, insan ve hassas biyolojik sistemlerde in vitro ve in vivo analize olanak sağlar (Wathsala vd., 2021). Kan bileşenlerinin ve tam kanın Raman spektroskopik incelemesi kırk yılı aşkın bir süredir devam etmektedir. Raman spektroskopisinin, hemoglobin oksijenlenmesinin anlaşılmasından kanserli hücrelerin sağlıklı lenfositlerden ayrılmasına ve suç mahallindeki adli soruşturmaya kadar çeşitli uygulamalarda yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Atkins vd., 2017).

AChE ve antioksidan enzim aktiviteleri, GSH ve MDA düzeyleri önemli oksidatif stres biyomarkırları olarak kullanılmaktadırlar (Yılmaz, 2010). Bu nedenle bu çalışmada gıda katkı maddesi olan aspartam ve antioksidan özelliği olan D vitamininin in vitro şartlarda insan kan hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasında DNA fragmentasyonu, osmotik fragilite, canlılık tayininin yanı sıra AChE ve antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri de belirlenmiştir, ayrıca titreşim spektroskopik yöntem ile de kan grupları karşılaştırılmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

Çalışma için Yozgat Bozok Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (2017-KAEK-189_2022.10.27_03).

3.1. Kimyasallar

Analizlerde kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'ten temin edilmiştir.

3.2. Eritrositlerin Hazırlanması

Yapılacak bu çalışmada sigara ve alkol kullanmayan, çalıştıkları yerde hiçbir kimyasal maddeye maruz kalmamış sağlıklı 16 erkek bireyden heparinli tüplere 20 mL kan örneği alınmıştır. Heparinleşmiş tam kan 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pH değeri 7,4 olan fosfat tamponu ile üç kez yıkanarak eritrositler hazırlanmıştır. Hemogloblin konsantrasyonu Drabkin metodu (1946) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3. Lökositlerin Hazırlanması

Yapılacak bu çalışmada sigara ve alkol kullanmayan, çalıştıkları yerde hiçbir kimyasal maddeye maruz kalmamış sağlıklı 16 erkek bireyden alınan kan örnekleri üzerine izotonik salin içinde hazırlanan %6 dekstran eklenerek 30 dakika beklenmiştir. Üstte oluşan tabaka içerisinde 2,25 mL EDTA bulunan bir başka tüpün içine alınarak 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra lökositler Tris buffer ile yıkama yapılarak hazırlanmıştır.

3.4. Hücrelere Uygulama Planı

Eritrositler ve lökositler aşağıda belirtilen gruplara ayrılmıştır.

1. Grup: Kontrol grubu (n=16),
2. Grup: Etanol ile muamele edilen grup (n=16),
3. Grup: Aspartam ile muamele edilen grup (n=16), (50 mg/L) (Çadırcı vd., 2020),
4. Grup: D Vitamini ile muamele edilen grup (n=16), (50 ng/mL) (Holick, 2009; Norman, 2011),

5. Grup: Aspartam + D Vitamini ile muamele edilen grup (n=16).

Aspartam izotonik suda (Choudhary vd., 2016), D vitamini ise etanolde (Li vd., 2014) çözüldüğünden etanolün olası etkilerinin belirlenebilmesi için bu grup çalışmaya ilave edilmiştir.

Uygulama maddeleri hücrelere eklendikten sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20 °C’de bekleyen hücrelerden pH değeri 7,4 olan hipotonik sodyum fosfat tamponu ile hemolizat elde edilmiştir. Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden SOD, CAT, GPx, GST, GR enzim aktiviteleri, malondialdehit (MDA) seviyesi, GSH seviyesi, asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, DNA fragmantasyonu, canlılık yüzdesi, osmotik fragilite kontrol grubu ile karşılaştırmalı olacak şekilde spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir.

3.5. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

MDA’nın TBA ile 90 °C’de inkübe edilmesi sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşmaktadır. Oluşan bu kompleksin absorbans değeri spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunmaktadır. Ohkawa vd., (1979)’nın metodunu kullanarak TBA ile reaksiyona giren LPO’nun son ürünü olan MDA miktarı ölçülmüştür.

3.6. Glutatyon-S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Habig vd., (1974)’nın metodu kullanılarak GST aktivitesi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi tayini 340 nm dalga boyunda, GST enzimi tarafından 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), indirgenmiş GSH ile konjuge edilerek GSH’in oksidasyonuna bağlı olarak yapılmıştır.

3.7. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivitesinin saptanmasında Marklund ve Marklund (1974) metodu kullanılarak pyragallol’un 440 nm dalga boyunda alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbans ölçülmüştür. İlk olarak plastik küvetler içerisine Tris-EDTA tamponu ve farklı hacimlerde süpernatant konularak üstlerine enzim kaynağı eklenmiştir. Daha sonra bu karışımlara pyragallol eklenerek spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.8. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enziminin aktivitesinin saptanması Aebi (1984) tarafından ortaya çıkarılan metot kullanılarak yapılmıştır. Spektrofotometre cihazında absorbans okunmadan önce ilk olarak süpernatanta Triton X-100 ilave edilmiştir. Daha sonra üzerine fosfat tamponu eklenip seyreltme işlemi yapılmıştır. Son olarak quartz küvet içerisindeki karışım üzerine H_2O_2 eklenerek enzimatik reaksiyon başlatılmıştır. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür.

3.9. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GPx aktivitesinin belirlenmesi Paglia ve Valentine (1987)'in metodu ile yapılmıştır. Bu metod, GR'nin 340 nm dalga boyunda nikotinamid-adenin-dinükleotid hidrojen fosfatı (NADPH) okside etmesi ile oluşan absorbansın ölçülmesi esasına dayanır. NADPH'ın nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına neden olmaktadır, böylelikle dolaylı olarak GPx aktivitesinin tespit edilmesinde kullanılmıştır. Cam küvet içerisindeki bu karışımın üstüne H_2O_2 ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatılmıştır ve 3 dakika boyunca 340 nm'de azalan absorbanslar okunmuştur.

3.10. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Kolinesterazlar, asetiltiyokolinin tiyokolin ve asetata parçalanmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen enzimlerdir. Reaksiyon sonucunda oluşan ürün olan tiyokolin oranı ve DTNB'nin reaksiyona girmesiyle sarı renk oluşturan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşmaktadır. Bu aktivitenin belirlenmesinde Ellman vd., (1961) metodu kullanılarak oluşan rengin şiddeti 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür. İlk olarak pH değeri 8,0 olan Na-K fosfat tamponu, örnek, Etopropazin ve DTNB plastik spektrofotometre küvetlerine konulmuştur. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine asetilkolinilyodür eklenmiştir ve absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.11. Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Foyer ve Halliwell (1976) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak GR enzim aktivitesi belirlenmiştir. Tüplere, pH değeri 7,8 olan 25 mM sodyum fosfat tamponu eklenmiş olup,

daha sonra her tüpe okside GSSG ve NADPH eklenmiştir. Tüplere örnek eklendikten sonra, NADPH'nin oksidasyonu 340 nm'de 180 saniye süre ile absorbans değeri okunarak kaydedilmiştir.

3.12. Glutasyon Seviyesinin Belirlenmesi

GSH miktar tayini Beutler ve arkadaşlarının (1963) metodu kullanılarak yapılmıştır. Sülfirid grupları (-SH) DTNB reaktifi ile kromojen bir bileşik oluşturmuştur. Oluşan sarı renk 412 nm'de reaktif körüne karşı okunmuştur. Stok GSH çözeltisinden (2000 µmol/L) hazırlanmış 125, 250, 500, 1000 ve 1500 µmol/L GSH çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Miktar tayini kalibrasyon eğrisinin yardımı ile örnekleri absorbans değerleri konsantrasyona çevrilerek yapılmıştır.

3.13. Canlılık (Viabilite) Tayini

Canlılığın tayini için Tripan Mavisi (Piccinini vd., 2017) testi kullanılmıştır. Distile su kullanılarak %2'lik Tripan Mavisi solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon 1/7 oranında serum fizyolojik ile seyreltilmiştir. 1:1 oranında Tripan Mavisi hücre süspansiyonu karışımı hazırlanıp oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen karışımlardan preperatlar hazırlanarak boyanan ve boya almayan hücreler sayılmıştır. Boyanan lökositler canlılığını kaybetmiş olarak kabul edilmiştir.

3.14. Osmotik Frajilite (Osmotik Kırılabilirlik)

Aldrich ve Saunders'in (2001) modifiye ettiği metot kullanılarak osmotik frajilite belirlenmiştir. Farklı oranlarda tuz ihtiva eden (%0, %0,1, %0,2, %0,3, %0,4, %0,5, %0,6, %0,7, %0,8, %0,9) solüsyonlar kullanılmıştır. Tüm örnekler için ilk olarak %0 ve %0,9 arasında NaCl içeren solüsyonlardan 1 mL alınıp tüplere konulmuştur. Daha sonra her solüsyonun içine örnekler eklenerek tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Tüpler hafifçe çalkalanarak 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Liziz olmayan kan hücrelerini ve liziz olan eritrositleri içeren pelet atılarak süpernatantlarda sadece liziz olmuş eritrositlerin hemoglobini ve NaCl solüsyonunun kalması sağlanmıştır. Süpernatantların 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülerek süpernatanttaki hemoglobinin oransal değeri ve % liziz değeri hesaplanmıştır.

3.15. DNA Fragmantasyonu

DNA fragmantasyonu Burton metodu (1956) kullanılarak belirlenmiştir. Santrifüj tüplerine hücre süspansiyonları eklenerek üzerlerine 0,7 mL soğuk liziz tamponu ilave edilmiştir. Tüpler 4°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 15 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant etiketlenmiş cam tüplere transfer edilmiştir. Etiketli cam tüp içindeki örneğe 1,5 mL %10 TCA; santrifüj tüpü içindeki pelete ise yaklaşık 0,65 mL %5 TCA eklenerek numuneler 4°C’de tüm gece bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 10 dakika boyunca 2500 rpm’de santrifüj edilmiştir ve pelete 0,65 mL %5 TCA eklenmiştir. Örnekler 100°C’ de 15 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulup 5 dakika boyunca 2500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hem santrifüj tüplerinde hem de cam tüplerde bulunan süpernatantlardan yaklaşık 0,5 mL etiketli cam tüplere aktarılmıştır. Tüplere yaklaşık 1 mL difenilamin reaktifi eklenerek 37°C’de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.16. UV-Vis Spektroskopisi

Numunelerin UV- VİS spektrumları Biotech Engineering Management co. LTD.(UK) marka cihazın SpectraScan 60 DV modeli ile alınmıştır (Şekil 3.1.). Çift ışınlı özelliğe sahip olan bu cihaz çözeltinin üzerine monokromatik ışın göndererek 100-700 nm aralığında istenilen herhangi bir dalga boyunda ölçüm yaparak numunelerin absorbans değerlerini USB portu ile bilgisayara aktarabilmektedir.



Şekil 3.1. UV-Vis Spektrometresi

3.17. Raman Spektroskopisi

Raman spektrumları, bir Leica mikroskobuna (Leica DMLM, Leica Mikrosistemler, Buffalo Grove, IL, ABD) bağı RenishawinVia Raman Spektrometresi ile alınmıştır. Renishawin Via Raman mikroskopları, uyarım dalga boyunu otomatik olarak değiştiren yazılımı ile çoklu lazerleri desteklerler (Şekil 3.2.). Raman spektrumları $0,5 \text{ cm}^{-1}$ çözünürlükte, $4000\text{-}100 \text{ cm}^{-1}$ arası bölgede, oda sıcaklığında, 10 numune üzerine 10 saniye süreyle %100 lazer gücü (230 mWatt) gönderilerek ve 5X, 20X ve 50X objektifleri kullanılarak alınmıştır. Cihazda peltiyer soğutmalı ($-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$) yük eşleşmiş dedektör (charge-coupled device, CCD) bulunmaktadır ve 785 nm diyod lazer uyarım kaynağı olarak kullanılmıştır. Sistem, WiRE 3.3 yazılımı (Renishaw, Birleşik Krallık) ile desteklenmektedir. Frekans kalibrasyonu için silikon levhanın 520 cm^{-1} 'deki bandı referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Renishaw Invia Raman Mikroskop Spektrometresi

3.18. İstatistiki Analizler

Çalışmada elde edilen veriler Tukey testi ve Windows SPSS 26.0 bilgisayar programında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Lökosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Lökosit GR, GPx, GST, CAT ve SOD aktivitesi bakımından gruplar karşılaştırıldıklarında kontrol ile etanol ve D vitamini uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Aspartam uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında incelenen enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. CAT ve SOD aktivitesi bakımından Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($P<0,05$) (Tablo 4.1.).

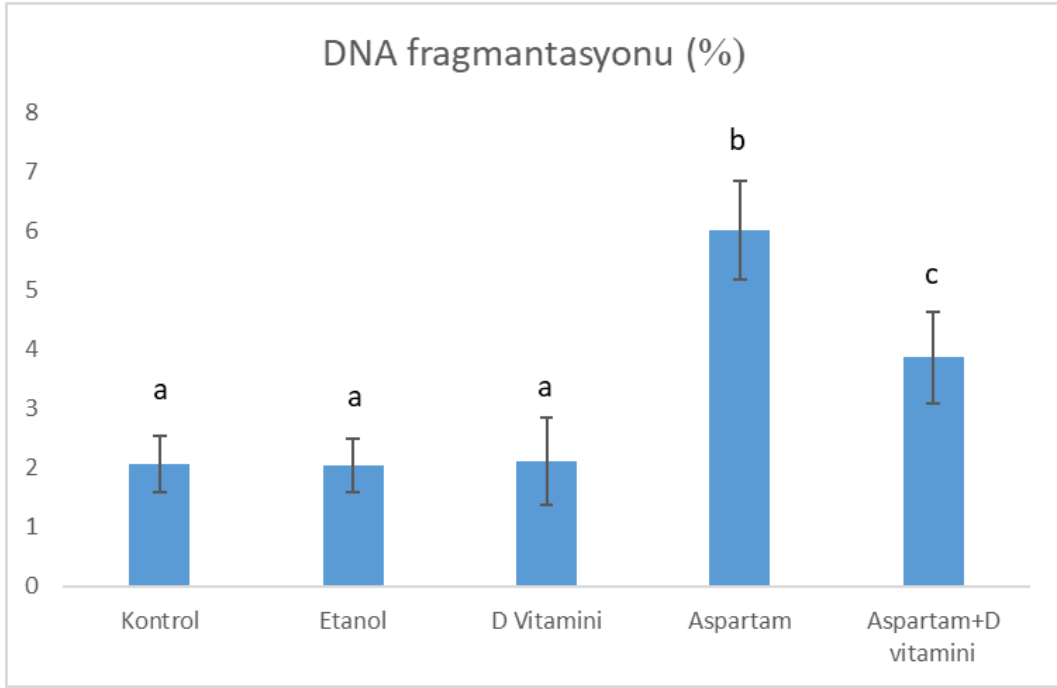
Tablo 4.1. Lökosit antioksidan enzim aktiviteleri

	GR(U/mg protein)	SOD(U/mg protein)	CAT(U/mg protein)	GPx(U/mg protein)	GST(U/mg protein)
Kontrol	78,11 ±5,14 a	503,91 ±20,15 a	411,52 ±18,96 a	81,71 ±5,82 a	62,26 ±4,6 a
Etanol	74,04 ±6,32 a	490,26 ±16,08 a	420,01 ±20,79 a	79,11 ±5,28 a	58,11 ±5,02 a
D Vitamini	80,15 ±6,17 a	508,09 ±21,77 a	418,61 ±17,62 a	85,79 ±9,58 a	66,24 ±7,99 a
Aspartam	38,18 ±4,78b	204,28 ±19,74b	148,98 ±23,32b	27,26 ±8,16b	28,15 ±7,27b
Aspartam+ D vitamini	46,94 ±3,97b	366,79 ±14,03c	263,77 ±14,24c	33,82 ±6,73 b	36,03 ±3,25 b

Sütun sonlarında bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir, aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır. Her grupta 16 örnek yer almaktadır ve değerler bu örneklerin ortalaması ± Standart sapma'dır. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.2. Lökosit DNA Fragmentasyonu Değerlendirilmesi

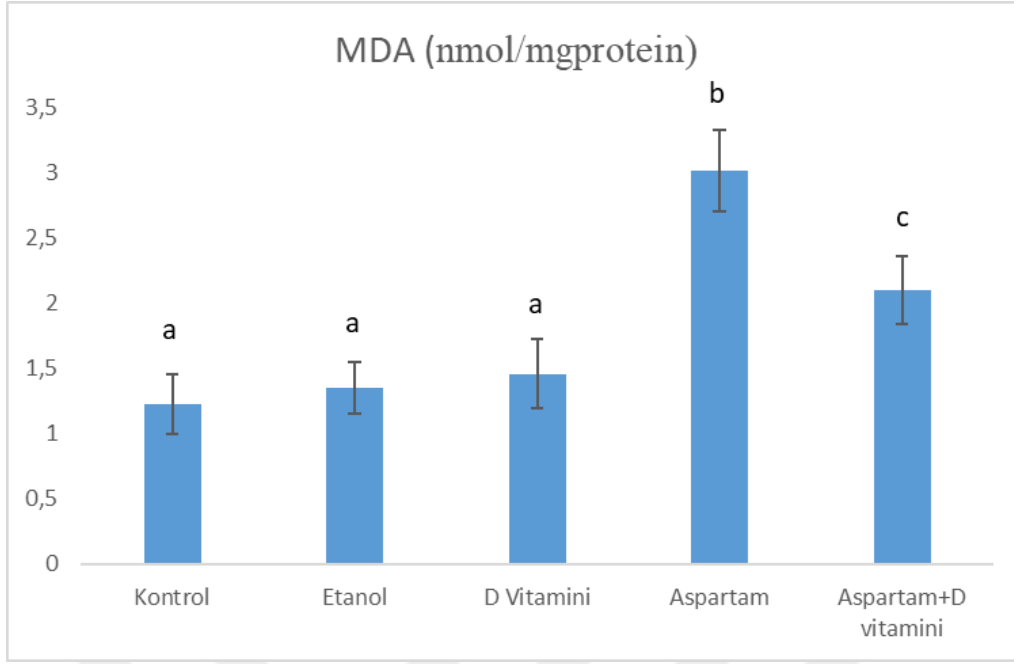
DNA fragmentasyonu değerlendirmesinde gruplar karşılaştırıldıklarında kontrol ile etanol ve D vitamini uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Aspartam uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında artış meydana geldiği gözlenmiştir. Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görülmüştür ($P<0,05$).



Şekil 4.1. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının DNA fragmentasyonu seviyeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.3. Lökosit MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi

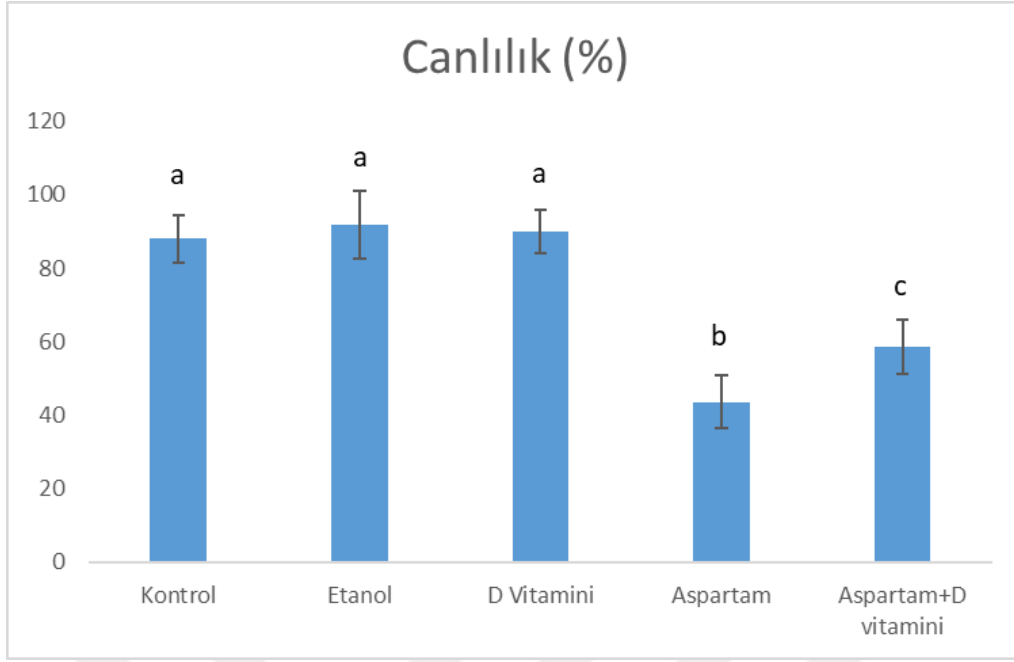
Lökosit MDA düzeyi değerlendirmesinde gruplar birbiri ile kıyaslandığında kontrol, etanol ve D vitamini grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık olmadığı görülmüştür. Aspartam grubu ile kontrol karşılaştırıldığında MDA düzeyinde anlamlı bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görülmüştür ($P<0,05$).



Şekil 4.2. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının lökosit MDA seviyeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.4. Lökosit Canlılık Tayini Değerlendirilmesi

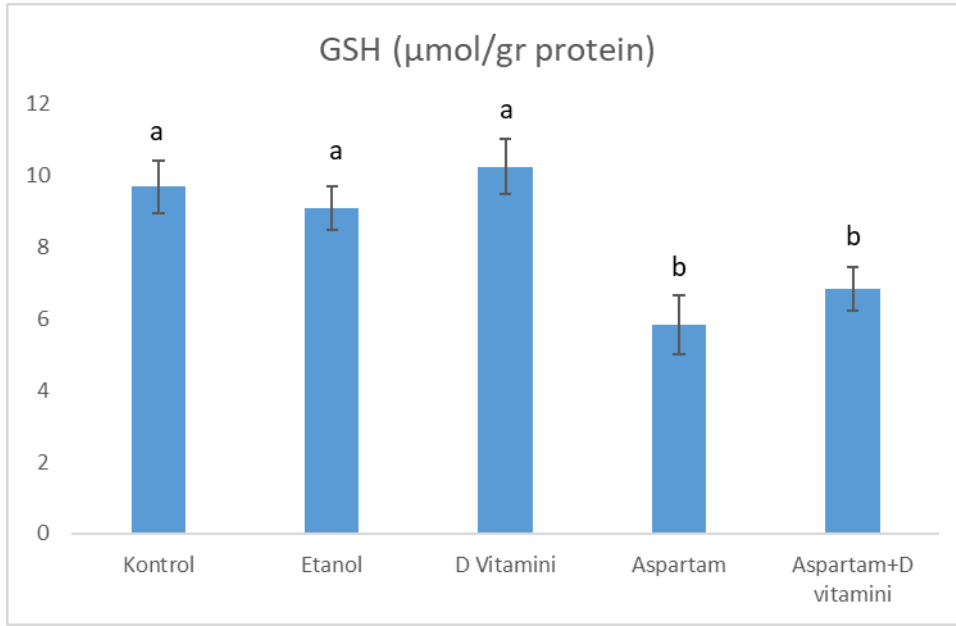
Lökosit canlılık yüzdesi bakımından bir değerlendirme yapıldığında kontrol ile etanol ve D vitamini uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Aspartam uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında canlılık yüzdesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($P<0,05$).



Şekil 4.3. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının canlılık yüzdeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.5. Lökosit GSH Düzeyi Değerlendirilmesi

Lökosit GSH düzeyi değerlendirmesinde gruplar birbiri ile kıyaslandığında kontrol, etanol ve D vitamini grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık olmadığı görülmüştür. Aspartam grubu ile kontrol karşılaştırıldığında GSH düzeyinde anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir ($P < 0,05$). Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grup kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

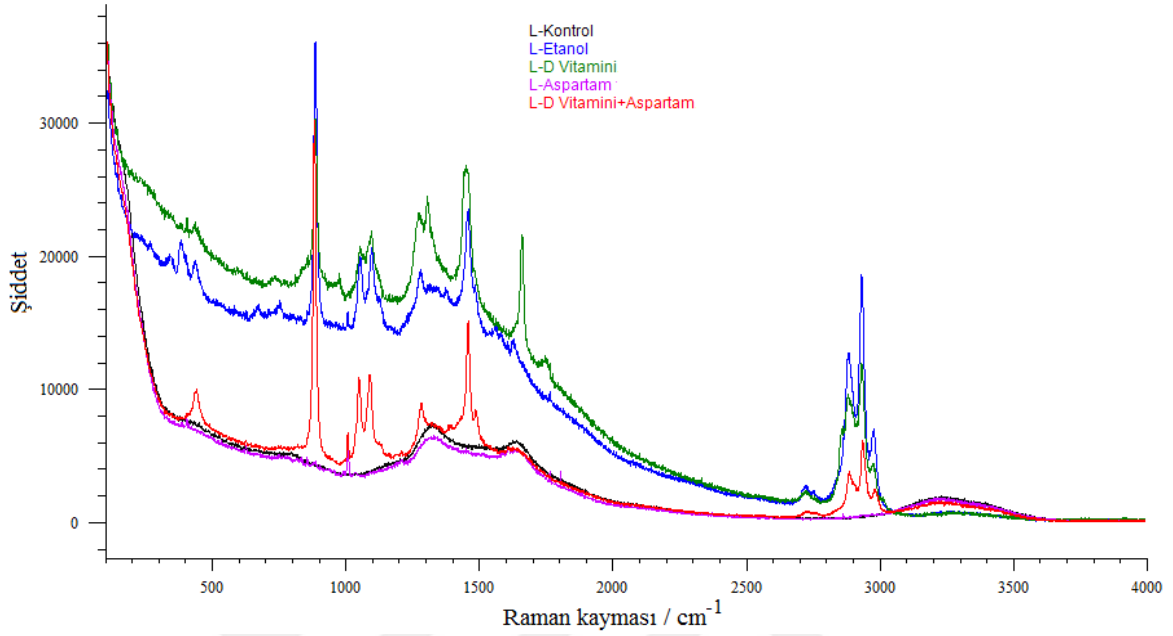


Şekil 4.4. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının lökosit GSH seviyeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

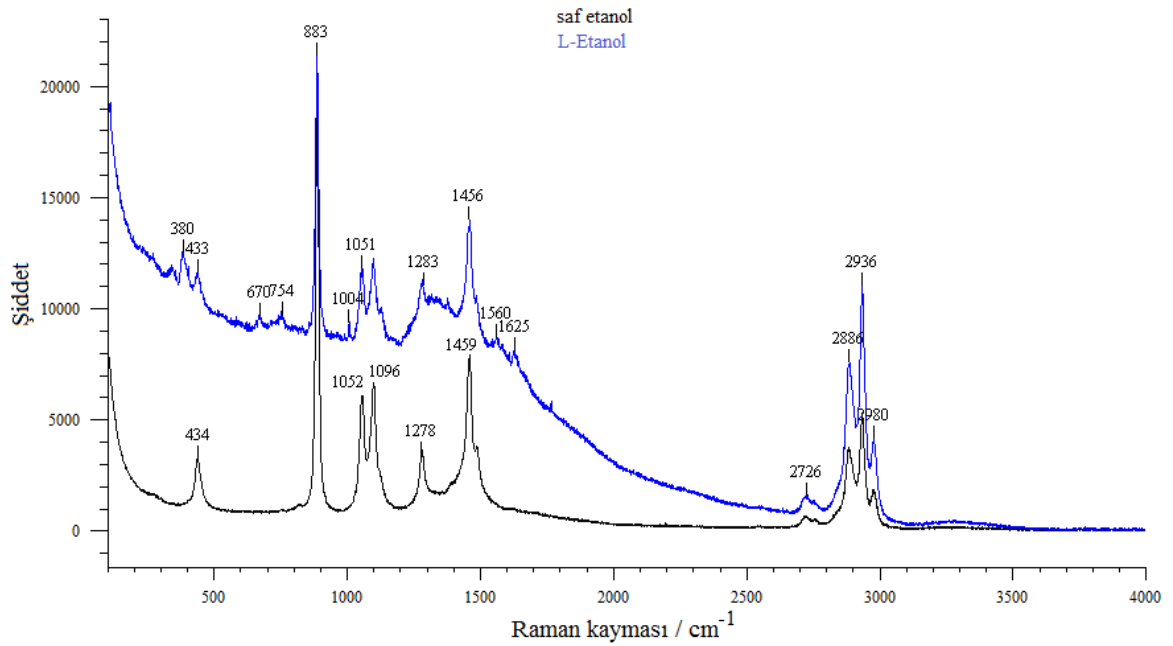
4.6. Lökosit Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarına ve uygulama gruplarına ait Raman spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 4.5'te verilmiştir. Lökosit kontrol grubunda (lökosit+su) için 1290 cm^{-1} ve 1627 cm^{-1} dalga sayılarında çok da belirgin olmayan pikler elde edilmiştir, her ikisi de literatürde sırasıyla CCH düzlemiği bükülmelerine ($\delta(\text{CCH})$) ve C=C gerilmelerine ($\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{vinil}}$) atfedilmiştir (Managò vd., 2018). L-etanol grubunda (lökosit+su+etanol) ise kontrol grubundan farklı olarak etanole ait ek pikler ve kontrol grubuna göre daha belirgin olarak elde edilen lökosite ait bazı pikler gözlenmiştir (Şekil 4.6). Saf etanolün Raman spektrumunda, $2980\text{-}2726\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler alifatik C-H gerilmelerine ($\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$), 1459 cm^{-1} 'deki pik C-H bükülmelerine ($\delta(\text{CCH})$), 1278 cm^{-1} 'deki pik $-\text{OH}$ grubuna ait bükülme deformasyonuna ($\delta(\text{COH})$), 1096 cm^{-1} 'deki pik $-\text{CH}_3$ grubuna ait yalpalama ($\delta(\text{CCH})_{\text{yalpalama}}$) ve C-O gerilmesine ($\nu(\text{C-O})$), 1052 cm^{-1} 'deki pik asimetrik C-C gerilmesine ($\nu(\text{C-C})_{\text{as}}$), 884 cm^{-1} 'deki pik simetrik C-C gerilmelerine ($\nu(\text{C-C})_{\text{s}}$) ve 434 cm^{-1} 'deki pik CCO bükülme titreşimine ($\delta(\text{CCO})$) aittir (Berryman vd., 2007). L-Etanole ait Raman spektrumunda etanolün pikleri haricinde lökosit+suya ait elde edilen ek pikler şu şekilde etiketlenmiştir; 380 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\delta)$), 670 cm^{-1} (δCCH pirol simetrik deformasyonu), 754 cm^{-1} (ν_{15} : pirol nefes alma, $\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$), 1004 cm^{-1} ($(\delta\text{CCH})_{\text{fenilalanin}}$),

1379 cm^{-1} (ν_4 :pirol yarım halka simetrik gerilme), 1560 cm^{-1} (ν_{19} : ($\text{C}_\beta\text{C}_\beta$)) ve 1625 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{vinil}}$) pikler elde edilmiştir (Hu vd., 1996; Wood vd., 2007).



Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarının lökosit Raman spektrumlarının karşılaştırılması



Şekil 4.6. Saf etanol ile L-etanol grubunun Raman spektrumlarının karşılaştırılması

~880 cm^{-1} civarındaki pik, literatürde (Nordon vd., 2005) etanolün sulu çözeltilerdeki alkol içeriğinin doğrudan analizine olanak sağlayan en şiddetli piki olarak bilinir. D vitamini etanolde çözündüğünden içeriğinde D vitamini olan diğer iki grupta da (L-D Vitamini ve L-D Vitamini + Aspartam) simetrik C-C gerilmelerine atfedilen 883 cm^{-1} 'deki en şiddetli

pikler ve etanole ait diğer pikler (432 cm^{-1} : $\delta(\text{CCO})$, 1050 cm^{-1} : $\nu(\text{C-C})_{\text{as}}$, 1096 cm^{-1} : $\nu(\text{C-O}) + \delta(\text{CCH})_{\text{yalpalama}}$, 1283 cm^{-1} : ($\delta(\text{COH})$, 1451 cm^{-1} : $\delta(\text{CCH})$, $2981\text{-}2724\text{ cm}^{-1}$: $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$) gözlenmektedir. Bu pike ilave olarak D vitamini içeren lökosit grubunda (L-D Vitamini: lökosit + su + D vitamini + etanol) D vitamininden dolayı ortaya çıkan yeni pikler 1660 cm^{-1} (sikloheksenC=C gerilmesi) ve 1746 cm^{-1} 'de (yağ asidi esterinde C=O gerilmesi (Molaveisi vd., 2020)) ve lökosite ait olan 1305 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_a\text{H}=\text{)}_2$) piki (Hu vd., 1996) gözlenmiştir. Aspartam içeren lökosit grubunda (L-Aspartam: lökosit + su + aspartam) ise kontrol grubundan farklı olarak oldukça küçük şiddetli olan ve aspartama ait olan 402 ve 1006 cm^{-1} 'deki ek pikler dışında farklılık gözlenmemektedir. Aspartam ve D vitamini içeren lökosit grubunda (L-D Vitamini + Aspartam: lökosit + su + D vitamini + etanol + aspartam) etanolden ileri gelen 436 , 880 , 1048 ve 1087 , 1281 , 1457 cm^{-1} piklerinde, lökositten ileri gelen 1005 cm^{-1} pikinde ve D vitamininden ileri gelen 1660 cm^{-1} pikinde diğer gruplara göre belirgin farklar gözlenmektedir.

L-Aspartam grubunun Raman spektrumu diğer gruplarınkine göre en düşük şiddete sahipken L-D Vitamini grubunun Raman spektrumu ise en yüksek şiddete sahiptir. L-D Vitamini grubu ile L-D Vitamini + Aspartam grubunun Raman spektrumları kıyaslandığında aspartam ilavesi ile şiddette çok belirgin bir azalma olduğu görülmektedir.

4.7. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Eritrosit hücrelerinde antioksidan enzim aktiviteleri bakımından gruplar kıyas edildiğinde kontrol, etanol ve D vitamini grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık meydana gelmediği görülmüştür. Kontrol ile aspartam uygulanan grup karşılaştırıldığında araştırılan parametrelerde azalma gözlenmiştir. GR, GST ve GPx aktiviteleri, Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam uygulanan grupta farklılık göstermezken; CAT ve SOD aktivitesi bakımından kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($P<0,05$) (Tablo 4.2).

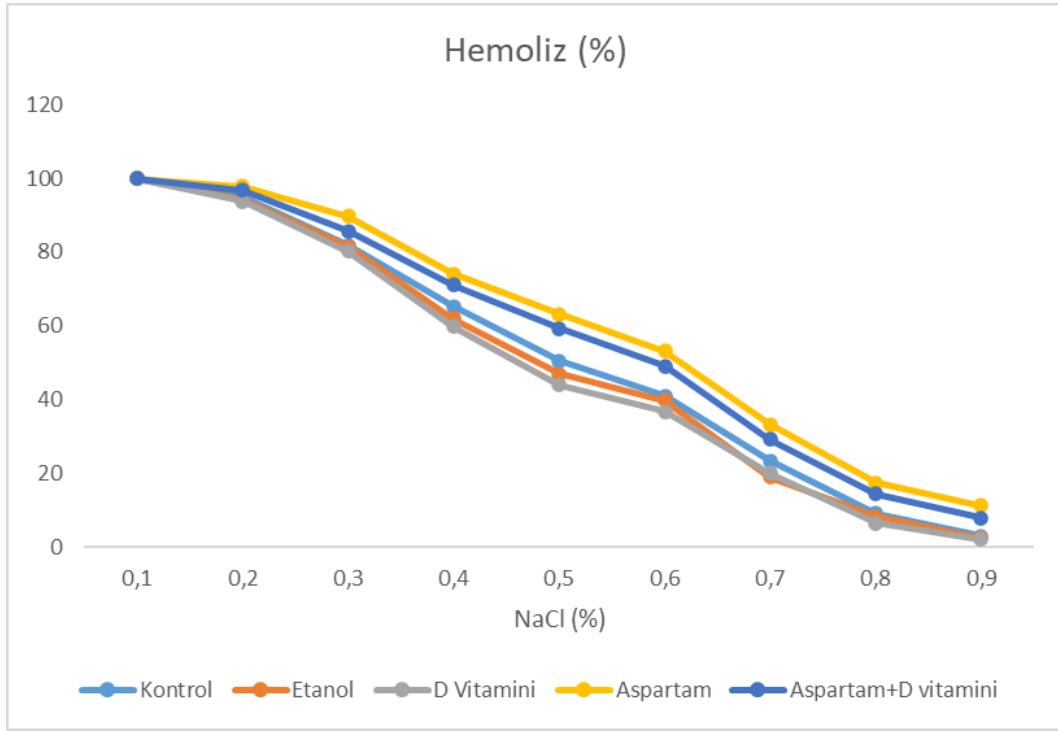
Tablo 4.2. Eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri

	GR (U/mgHb)	SOD (U/mgHb)	CAT (U/mgHb)	GPx (U/mgHb)	GST (U/mgHb)
Kontrol	58,12 ±3,11 a	722,1 ±22,23 a	588,22 ±23,12a	60,24 ±4,99 a	51,46 ±3,17 a
Etanol	65,43 ±6,03 a	697,12 ±14,37 a	580,13 ±10,95 a	68,74 ±7,26 a	54,02 ±6,22 a
D Vitamini	60,17 ±5,22 a	738,45 ±32,28 a	602,26 ±28,45 a	65,38 ±4,69 a	56,92 ±9,04 a
Aspartam	35,04 ±7,83 b	433,16 ±17,43 b	271,86 ±19,55 b	32,77 ±7,35 b	39,36 ±6,8 b
Aspartam+D vitamini	44,13 ±4,36 b	58108 ±20,09 c	385,07 ±26,37 c	38,47 ±8,01 b	42,91 ±4,26 b

Sütun sonlarında bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir, aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır. Her grupta 16 örnek yer almaktadır ve değerler bu örneklerin ortalaması ± Standart sapma'dır. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.8. Eritrosit Osmotik Frajlite Değerlendirilmesi

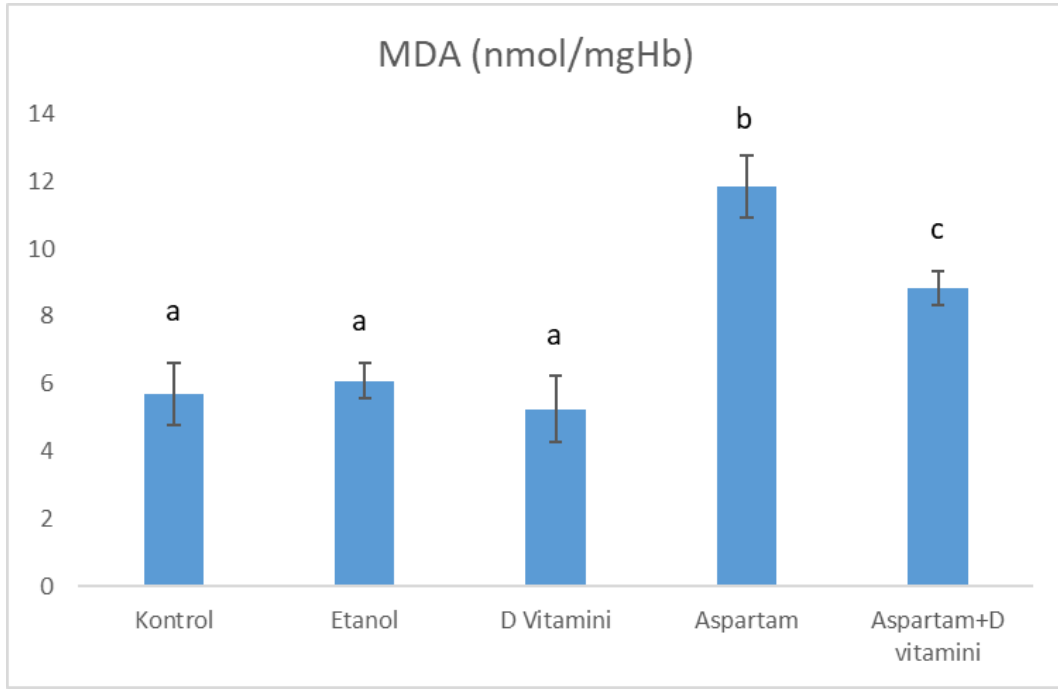
Kontrol ile etanol ve D vitaminigrupları arasında %0,1 ile %0,9 NaCl konsantrasyonu arasındaki değerlerde bir fark gözlenmemiştir. %0,9'dan %0,1 NaCl konsantrasyonuna doğru ise hemoliz olayının arttığı görülmektedir. Aspartam grubunda %0,7-%0,4 NaCl arasındaki değerlerde diğer gruplarla kıyaslandığında önemli bir artış gözlenmiştir. Aspartam ile beraber uygulanan D vitamini hemolizde önemli bir azalma meydana getirmiş olmasına rağmen kontrol grubundan hemoliz değerlerinin daha yüksek çıktığı görülmüştür (P<0,05).



Şekil 4.7. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının osmotik fragilite yüzdeleri

4.9. Eritrosit MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi

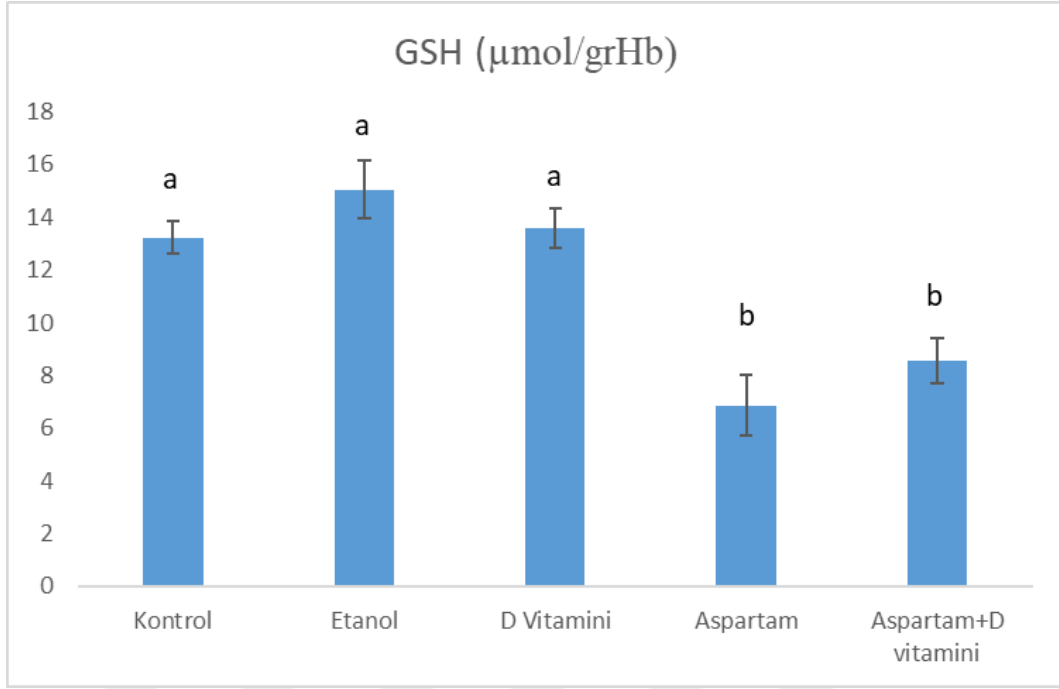
Eritrosit MDA düzeyi değerlendirildiğine kontrol, etanol ve D vitamini uygulanan gruplar arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Aspartam muamele grubuyla kontrol karşılaştırıldığında MDA seviyesinde bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam grubu kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görülmüştür ($P<0,05$).



Şekil 4.8. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit MDA seviyeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.10. Eritrosit GSH Seviyesinin Değerlendirilmesi

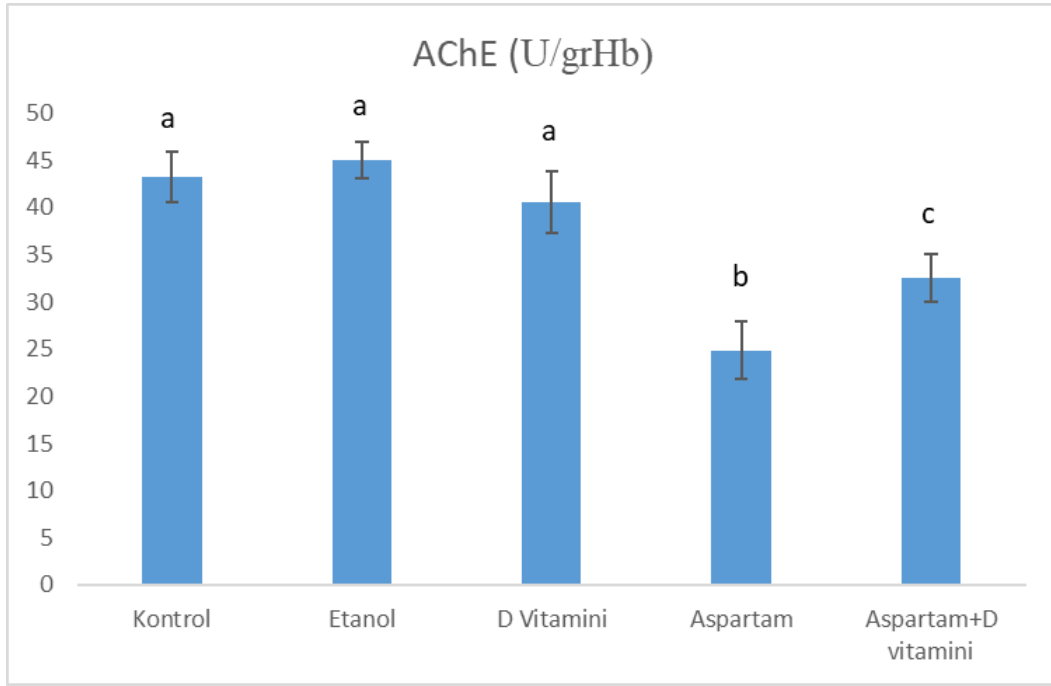
Eritrosit GSH seviyesi açısından kontrol ile etanol ve D vitamini grupları karşılaştırıldığında istatistiksel bakımından bir farklılık olmadığı görülmüştür. Aspartam uygulanan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında GSH düzeyinde anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir ($P < 0,05$). Aspartam+D vitamini uygulanan grupla Aspartam grubu kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.9. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit GSH seviyeleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.11. Eritrosit AChE Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Eritrosit hücrelerinde AChE enzim aktivitesi bakımından karşılaştırma yapıldığında kontrol, etanol ve D vitamini grupları arasında istatistiksel açıdan farklılık olmadığı görülmüştür. Kontrol grubuyla aspartam grubu kıyaslandığında enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Aspartam+D vitamini grubu ile Aspartam grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($P<0,05$).

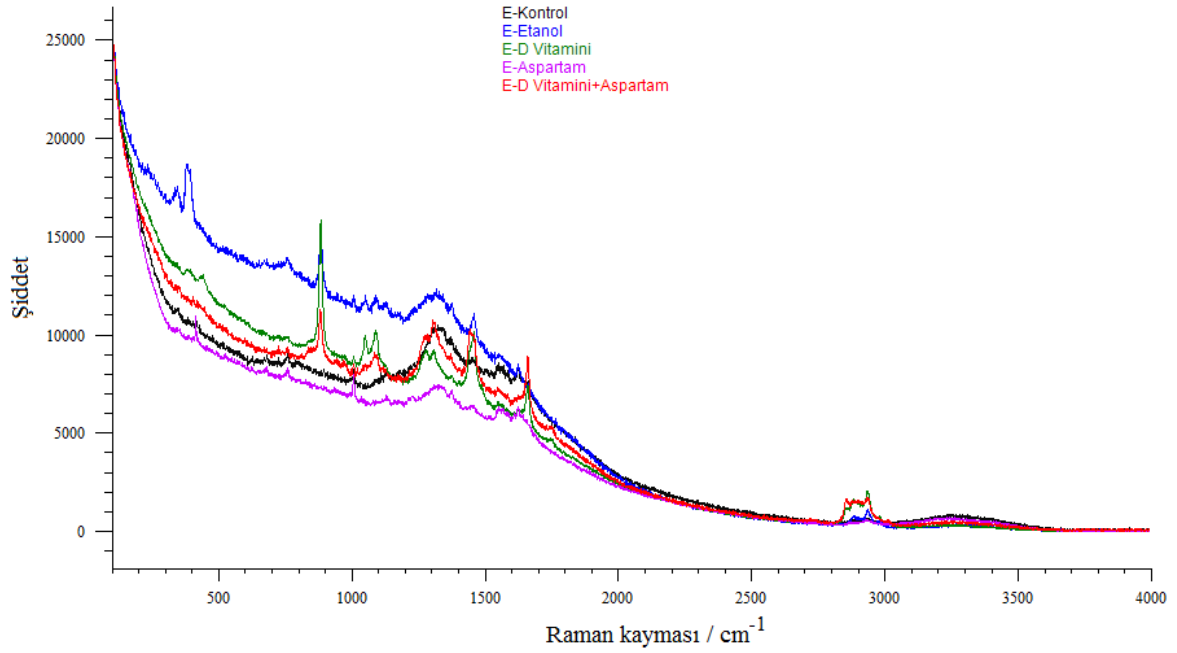


Şekil 4.10. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının eritrosit AChE aktiviteleri. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ve aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

4.12. Eritrosit Raman Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Şekil 4.11’de eritrositin kontrol ve uygulama gruplarına ait Raman spektrumlarının karşılaştırılması verilmiştir. Eritrosit kontrol numunesi için 380 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\alpha)$), 413 cm^{-1} (ν_{21} : $\delta(\text{Fe-O-O})$), 671 cm^{-1} (δCCH pirol simetrik deformasyonu), 755 cm^{-1} (ν_{15} : pirol nefes alma, $\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$), 1004 cm^{-1} ($(\delta\text{CCH})_{\text{fenilalanin}}$), 1125 cm^{-1} (ν_5 : $\nu(\text{C}_\beta\text{-metil gerilmesi})$), 1175 cm^{-1} (ν_{30} : pirol yarım halka asimetrik gerilme), 1305 cm^{-1} (ν_{21} : $\delta(\text{C}_m\text{H})$), 1339 cm^{-1} (ν_{41} : pirol yarım halka simetrik gerilme), 1450 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$), 1549 cm^{-1} (ν_{11} : $\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\beta)$) ve 1625 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{vinil}}$) dalga sayılarında elde edilen pikleri literatüre (Hu vd., 1996; Wood vd., 2007) uygun olarak etiketlenmiştir. Kontrol numunesinden farklı olarak etanol varlığında (E-Etanol: eritrosit + su + etanol) eritrosite ait olan 344 , 381 ve 753 cm^{-1} ’deki pikin şiddeti oldukça artarken ilaveten etanolün varlığını gösteren 881 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})_s$), 1456 cm^{-1} ($\delta(\text{CCH})$), 2888 cm^{-1} ($\nu(\text{CH}_3)_s$) ve 2940 cm^{-1} ’de $\nu(\text{CH}_3)_{as}$ ek pikler de elde edilmiştir (Berryman vd., 2007). D vitamini etanolde çözündüğünden içeriğinde D vitamini olan diğer iki grupta da (E-D vitamini ve E-D vitamini + aspartam) simetrik C-C gerilmelerine atfedilen 881 cm^{-1} ’deki en şiddetli pikler ve etanole ait diğer pikler (438 cm^{-1} : $\delta(\text{CCO})$, 1050 cm^{-1} : $\nu(\text{C-C})_{as}$, 1088 cm^{-1} : $\nu(\text{C-O}) + \delta(\text{CCH})_{\text{yalpalama}}$, 1275 cm^{-1} : $\delta(\text{COH})$,

1450 cm^{-1} : $\delta(\text{CCH})$, 2980-2861 cm^{-1} : $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ gözlenmektedir. Bu pike ilave olarak D vitamini içeren eritrosit grubunda (E-D vitamini: eritrosit + su + D vitamini + etanol) D vitamininden dolayı ortaya çıkan yeni pikler 1659 cm^{-1} (sikloheksen C=C gerilmesi) ve 1744 cm^{-1} 'de (yağ asidi esterinde C=O gerilmesi (Molaveisi vd., 2020)) ve lökositte ait olan 1304 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_a\text{H}=\text{O})$) piki (Hu vd., 1996) gözlenmiştir.



Şekil 4.11. Kontrol ve uygulama gruplarının eritrosit Raman spektrumlarının karşılaştırılması

Aspartam içeren eritrosit grubunda (E-Aspartam: eritrosit + su + aspartam) ise kontrol grubundan ((E-Kontrol: eritrosit + su) farklı olarak aspartama ait olan ve 415 ile 1006 cm^{-1} 'de elde edilen çok küçük şiddetli iki adet pik dışında farklılık gözlenmemektedir. Aspartam ve D vitamini içeren eritrosit grubunda ise (E-D vitamini + Aspartam: eritrosit + su + D vitamini + etanol + aspartam) 879, 1047 ve 1085 cm^{-1} 'deki piklerin şiddetinde azalma gözlenirken 1283, 1309, 1450 ve 1659 cm^{-1} piklerin şiddetinde artış gözlenmiştir.

E-Aspartam grubunun Raman spektrumu diğer gruplarınkine göre en düşük şiddete sahiptir. E-D vitamini grubunun Raman spektrumu E-D vitamini + Aspartam grubunun Raman spektrumlarına göre daha yüksek şiddete sahiptir.

5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Gıda katkı maddeleri gıdalara bazı özellikler kazandırmak için eklenen maddelerdir (Erdem, 2014). İnsan nüfusunun hızla artışına bağlı olarak artan besin ihtiyacının karşılanması, üretim maliyetinin azaltılması, gıdaların raf ömrünün uzatılması için gıda katkı maddelerinin kullanımı da sürekli olarak artış göstermektedir (Yörük & Danyer, 2016). Ancak tavsiye edilen miktardan daha fazla kullanıldıklarında toksik etki meydana getirdikleri görülmüştür. Zararsız miktarlarda kullanıldıklarında dahi bir zaman sonra vücutta birikim gösterdiği ve bu nedenle zararlı dozlara ulaşabileceklerinden dolayı sağlık için doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit meydana getirebilecekleri gözlemlenmiştir (Lino & Pena, 2010).

Aspartam, yaygın olarak kullanılan sentetik bir tatlandırıcıdır. Sukrozdan daha tatlı olması ve kalorisinin daha düşük olması ile de kullanılabilirliği günden güne artış göstermiştir (Baydar & Şahin, 1997). Yapılan çalışmalarda aspartamın baş ağrısı, nöbet, kas spazmları, deri döküntüleri, yorgunluk, çarpıntı, görme bozukluğu, işitme kaybı, nefes darlığı gibi çeşitli rahatsızlıklara neden olabileceği belirlenmiştir (Bereket, 2012). Sencar ve Kuyucu, ratlar üzerinde yaptıkları araştırmada 8 hafta süreyle aspartam uygulamasının testis dokularında seminifer tübüllerde dejenerasyona, Leydig hücre sayısında azalmaya, tübüllerde vakuolizasyona neden olduğu belirtilmiştir (Sencar & Kuyucu, 2020). Aspartamın bahsedilen bu etkileri nedeni ile aspartam etkinliği ile ilgili daha çok veri elde edebilmek için bu tez çalışmasında insan kan hücrelerine (eritrosit ve lökosit) aspartam uygulanmış ve antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPx, GST, GR), AChE aktivitesi, GSH ve MDA seviyelerinin analizi yapılmıştır. Bu parametrelere ek olarak canlılık, osmotik fragilité ve DNA fragmentasyonu da araştırılmıştır.

SOD enzimi, süperoksitin H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu kataliz eden antioksidanlardandır (Young ve Woodside, 2001). CAT enzimi, H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü kataliz eden enzimatik antioksidanlardan birisidir (Limon-Paechecho & Gonsebatt, 2009). GPx enzimi H_2O_2 'den hidroksil radikali oluşumuna engellemek için GSH'dan yardım alan ve sonuçta H_2O ve GSSG oluşumuna neden olan enzimatik antioksidanlardandır (Sen & Chakraborty, 2011). GST, özellikle lipid peroksitlere karşı GPx aktivitesi gösteren, ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alan bir enzimdir (Reszka vd., 2006). GR, GPx'in oluşumuna neden olduğu okside glutatyonun yeniden redükte haline indirgenmesini sağlayan bir enzimdir (Reiter vd., 1995).

Antioksidan enzimlerin oksidan maddelere karşı bu etkinliklerinden dolayı, enzim aktiviteleri oksidan hasarının belirlenmesinde araştırılması gereken parametrelerin başında gelmektedir. Bu tez çalışmasında eritrosit ve lökosit hücrelerinde araştırılan SOD, CAT, GST, GPx ve GR aktiviteleri aspartam muameleli grupta kontrol grubuna göre enzim aktivitelerinde anlamlı bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki benzer sonuçlar Ashok ve arkadaşlarının (2017) aspartam ile sperm hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada da gözlenmiştir. GSH, oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı hücreleri koruyan non-enzimatik bir antioksidandır (Towsend vd., 2003). Sıçanlara yüksek dozda uygulanan gıda katkı maddelerinin GSH seviyelerinde azalmaya neden olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Ercan, 2018). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir, aspartam uygulaması GSH düzeyinde kontrol grubuna kıyasla azalma meydana getirmiştir. Aspartam uygulanan gruplardaki antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH düzeyindeki azalmanın antioksidan savunma sisteminin baskılanmış olabileceğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

MDA, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu neticesinde meydana gelen LPO'nun belirteci olarak kabul edilen toksik etkilere sahip moleküllerden birisidir. MDA, hücre zarının yapısındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olarak membran geçirgenliğinin değişimine neden olabilmektedir (Mercan, 2004). Gıda katkı maddelerinin farklı dokularda MDA seviyesinde artışa neden olduğuna dair yapılan çalışmalar mevcuttur (Ercan, 2018). Bu tez çalışmasında aspartam muameleli grubun insan kan hücrelerinde MDA düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Antioksidan savunma sistemi ve serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak isimlendirilmektedir (Akkuş, 1995). Bu tez çalışmasında elde edilen antioksidan enzim aktiviteleri ile MDA seviyeleri sonuçları birlikte değerlendirildiğinde aspartam muamelesinin eritrosit ve lökositlerde oksidatif stres meydana getirdiğini söylemek mümkündür. Aspartam kullanımının neden olduğu metanol üretiminin, doku ve hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturduğu, bu durumun da hücre fonksiyonu üzerine zararlı etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (Ashok vd., 2017).

Asetilkolin esterase, asetilkolinin kolin ve asetata parçalanmasını sağlayarak sinaptik boşluktan uzaklaştıran bir enzimdir. Bazı maddeler bu enzimin inhibisyonuna neden olarak sinapslarda asetilkolin birikimine neden olmaktadır. Bunun neticesinde kolinerjik sistemde sürekli uyarı oluşmaktadır (Hazarika vd., 2003). Yapılan bir araştırmada gıda katkı maddelerinden birisi olan monosodyum glutamat'ın AChE aktivitesini azalttığı

görülmüştür (Aktoprak, 2015). Bu çalışmada da benzer şekilde aspartam uygulamasının AChE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir. AChE aktivitesinde gözlenen bu azalmanın, aspartamın neden olduğu MDA artışı ve antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüş ile ilişkilendirilen oksidatif stres hasarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Osmotik kırılabilirliğin belirlenmesi, eritrosit hücrelerinde su alımı nedeniyle oluşan şişme ve bu şişmeye karşı zar direncinin analiz edilmesini sağlayan bir metottur. Artan kırılabilirlik değeri zar proteinlerdeki kalitatif veya kantitatif hasar neticesinde oluşmaktadır (Doğan, 2020). Ayrıca zarda bulunan lipidlerde meydana gelen hasar da bu sürecin tetiklenmesine neden olmaktadır. Oksidatif stres, hücre ve organel zarlarına hasar vererek eritrosit hücrelerinde osmotik kırılabilirlik değerlerinde artışa sebep olmaktadır (Kung vd., 2009). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürünler membran akışkanlığında azalmaya, neticesinde de zar geçirgenliğinde artmaya neden olarak zarların yapılarında bozulmaya ve bunun sonucunda da fonksiyonel değişimlere sebebiyet verebilmektedirler (Atmaca vd., 2014). Bu çalışmada aspartam muamelesi sonucunda artış gösteren MDA düzeyiyle ilişkili şekilde osmotik kırılabilirlik düzeylerinde kontrole kıyasla artış olduğu tespit edilmiştir. Osmotik kırılabilirlik analizi sonuçları ile birlikte MDA seviyesi beraber değerlendirildiğinde MDA üretiminin eritrosit hücre zarlarında hasar oluşturabilecek seviyeye ulaşmış olabileceği düşünülmektedir (Atmaca vd., 2014). Başka bir deyişle aspartam uygulanan grupta eritrosit hücre zarı dayanıklılığının tam olarak muhafaza edilemediği anlaşılmaktadır (Hisar vd., 2003).

Oluşan oksidatif stres hücredeki diğer yapılara hasar verdiği gibi genetik materyale de zarar vermektedir. Bundan dolayı ksenobiyotiklerin DNA üzerinde oluşturduğu etkilerin açığa çıkartılması önem arz etmektedir (Yüzbaşıoğlu vd., 2014). Yapılan bir çalışmada gıda katkı maddelerinden olan benzoik asit ve sitrik asitin insan lenfosit hücrelerinde DNA'da genotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Yılmaz vd., 2014). Yine gıda katkı maddeleri arasında bulunan potasyum sorbat ve sodyum benzoat muamelesinin de genotoksik etkileri yapılan mikronükleus testi ile belirlenmiştir (Mamur vd., 2018). Yapılan bu çalışmada da benzer şekilde aspartam uygulamasının lökositlerde DNA fragmentasyonuna neden olarak genotoksik etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Hücrelerin sahip olduğu antioksidan enzimler hücresel komponentleri serbest radikal hasarına karşı korumaktadırlar. Bu çalışmada elde edilen DNA hasarı; aspartam uygulamasının GST, SOD, CAT, GPx ve GR enzim aktivitelerinde neden olduğu

azalmayla yani aspartam nedeni ile oluşan serbest radikallere karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin azalmasıyla bağdaştırılabilir.

Hücre canlılık oranı ksenebiyotiklerin etki düzeylerinin ölçülebilmesi için araştırılan önemli parametrelerdendir. Gıda katkı maddelerinden birisi olan benzil benzoat'ın fare fibroblast hücre canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir (Kartal, 2015). Bu çalışmada da aspartamın hücre canlılığında istatistiksel olarak bir azalma meydana getirdiği belirlenmiştir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüşün, meydana gelen oksidatif stresin ve oluşan DNA hasarının hücre canlılığında belirlenen bu azalma ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Hücrelerde oksidatif stresin neden olduğu zararlı etkilere karşı korunmayı sağlayan savunma mekanizmaları mevcuttur (Baş & Kalender, 2011). Bu mekanizmaların etkinlikleri, D vitamini gibi antioksidan potansiyele sahip kimyasalların vücuda beslenme yolu gibi farklı yollardan alınmasıyla desteklenebildiği bilinmektedir (Brenneisen vd., 2005). D vitamini non-enzimatik antioksidanlardan birisidir. Bu nedenle, ksenebiyotiklerin toksik etkilerine karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır (Berridge, 2015). Bu tez çalışmasında D vitamini uygulanan grup ile kontrol grubu arasında araştırılan parametrelerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Aspartam ile beraber uygulandığında ise eritrosit ve lökositlerde aspartamın neden olduğu değişikliklere karşı koruyucu etkisinin olduğu belirlenmiştir. D vitamini hücre zarının stabilizasyonunu sağlayarak LPO düzeyini azaltabilir veya GST, GPx, SOD gibi antioksidan enzimlerin nükleer reseptörleri üzerinden upregülasyonunu gerçekleştirerek antioksidan özellik gösterdiği düşünülmektedir (Salum vd., 2013).

Raman spektroskopisi, kan hücrelerinin incelenmesinde, bazı dış faktörlerin kan hücrelerinin biyolojisi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında giderek önemli bir teknik haline gelmektedir (Rao vd., 2009; Atkins vd., 2017). Eritrosit ve lökosit içeren kontrol gruplarına aspartam ilavesi ile Raman şiddetlerinde azalma gözlenmiştir. D vitamini içeren gruplar yüksek Raman şiddetlerine sahipken aspartam ilavesiyle şiddetlerde belirgin bir azalma gözlenmekle birlikte Raman kaymalarında ve spektrumlarda farklanmalar da oluşmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada 16 erkek bireyden alınan eritrosit ve lökosit hücrelerine aspartam ve D vitamini uygulaması yapılmıştır. Aspartamın bu hücrelerde toksik etki meydana getirerek, antioksidan enzim aktivitesini azaldığı ve MDA düzeyinde artış

oluşturduğu belirlenmiştir. Ek olarak aspartamın eritrositlerde AChE aktivitesi azalttığı, DNA fragmentasyon düzeyini arttırırken canlılık oranını azalttığı gözlenmiştir. D vitamini ise aspartamın zararlı etkilerini tam olarak gideremese de araştırılan parametreler üzerinde koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüş eritrosit ve lökositlerde serbest radikallerle olan dengenin bozulmasına neden olduğu için oksidatif stres oluşmaktadır. Bunun sonucu olarak da lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA ile ve artan serbest radikallerden dolayı hücrelerde DNA kırıkları meydana gelmiştir. Tüm bu nedenlerle gıda katkı maddelerinden birisi olan aspartam tüketiminden kaçınılmalı, tüketiliyorsa da günlük belirlenen dozların dışına çıkılmamalıdır. Aspartam kullanımı asgari seviyede tutulmalı ve gıdaların tatlandırılmasında daha doğal yollara başvurulmaya çalışılmalıdır. Bunlara ek olarak, aspartama karşı gösterdiği koruyucu etkilerden dolayı D vitamini içeren besinlere diyetle yer verilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelwahab, A.H., Yousuf, A.F., Ramadan, B.K., & Elimam, H. (2017). Comparative effects of stevia rebaudiana and aspartame on hepatorenal function of diabetic rats: Biochemical and Histological Approaches. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(8), 34-42. **doi: 10.7324/JAPS.2017.70806**
- Abhilash, M., Paul, M.S., Varghese, M.V., & Nair, R.H. (2011). Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1203-1207. **doi: 10.1016/j.fct.2011.02.019**
- Adams, M.S.(Eds.). (2002). *Biological indicators of aquatic ecosystem stres*. American Fisheries Society. Bethesda. Maryland.
- Adorini, L., & Penna, G. (2008). Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4(8), 404-412. **doi:10.1038/ncprheum0855**
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Ajiboye, T.O. (2010). Redox status of the liver and kidney of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) treated rats. *Chemico-Biological Interactions*, 185(3), 202-207. **doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.022**
- Akbel, E. (2010). *Yüksek protein içeren diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin kemik ve kalsiyum metabolizmasına etkileri* (260734) [Doktora Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Akkoyun, H.T., Bayramoğlu, M., Ekin, S., & Çelebi, F. (2014). D vitamini ve metabolizma için önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 9(3), 213-219. **<https://doi.org/10.17094/avbd.05043>**
- Akkuş, İ. (1995). *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Yayınları.
- Aktoprak, M. (2015). *Monosodyum glutamat (MSG) Kaynaklı oksidatif strese eritrosit asetilkolin esterase ve nitrik oksit değişikliklerinin önemi; melatoninin rolü* (420027) [Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Aldrich, K., & Saunders, D.K. (2001). Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 26(3), 179-182. **doi: 10.1016/s0306-4565(00)00040-1**

- Alkafafy, M.E.S., Ibrahim, Z.S., Ahmed, M.M., & El-Shazly, S.A. (2015). Impact of aspartame and saccharin on the rat liver: Biochemical, molecular, and histological approach. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 28(2), 247-255. **doi: 10.1177/0394632015586134**
- Alptekin, İ.M. (2017). Anti-Kanser etkiler ışığında D vitamini ve kanser. *ACU Sağlık Bil Derg*, (2), 70-74.
- Altuğ, T. (2001). *Gıda Katkı Maddeleri*. Meta Basım.
- Altuğ, T., & Elmacı, Y. (2009). Tatlandırıcılar. Altuğ T. (Editör). *Gıda katkı maddeleri*. Kan Yılmaz Matbaacılık.
- Altun, H. (2014). *Gıda materyallerinde spektrofotometrik yöntemlerle çok bileşenli yapay tatlandırıcıların bir arada tayinleri* (364199) [Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Aly, H.A.A., Domènech, O., & Banjar, Z.M. (2012). Effect of nonylphenol on male reproduction: analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(2), 134-141. **doi:10.1016/j.taap.2012.02.015**
- Ardağ, A., (2005). *Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması* (216896) [Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Arı, H., (2015). *Örümcek ipeği yapısında bulunan bileşenlerin kuramsal ve titreşim spektroskopik incelenmesi* (406104) [Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Arslan, G. (2011). *Gıda katkı maddeleri ve yeni yapılan dioksimlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin araştırılması* (286384) [Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Ashok, I., Sheeladevi, R., & Wankhar, D. (2013). Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behaviour in wistar albino rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(1), 39-43. **doi:10.1016/j.bionut.2013.04.002**

- Ashok, I., Poornima, P.S., Wankhar, D., Ravindran, R., & Sheeladevi, R. (2017). Oxidative stres evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. *International Journal of Impotence Research*, 29(4), 164–170. **doi: 10.1038/ijir.2017.17**
- Atkins, C.G., Buckley, K., Blades, M.W., & Turner, R.F.B. (2017). Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Applied Spectroscopy*, 71(5), 767-793. **doi: 10.1177/0003702816686593**
- Atlı, B. (2010). *Gıda Boyaları* (283215) [Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Atmaca, N., Ekici, H., Yıldırım, E., Çınar, M., & Güner, B. (2014). Sığırlarda Trafik Kirliliğinin Bazı Hematolojik Parametreler, Lipid Peroksidasyonu ve Ozmotik Zar Direnci Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 9(2), 97-103.
- Bağcı, T. (1997). Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımız Üzerine Etkileri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 28(1), 18-23.
- Barnard K, & Colon-Emeric C. (2010). Extraskkeletal effects of vitamin D in older adults: cardiovascular disease, mortality, mood, and cognition. *Am J Geriatr Pharmacother*, 8(1), 4-33. **doi: 10.1016/j.amjopharm.2010.02.004**
- Barnett, E.D., & Klein, J.O. (2006). Bacterial infections of the respiratory tract. In: Remington, J.S., Klein, J.O., Wilson, C.B., & Baker, C.J. (Eds.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 297- 316.
- Baş, H., & Kalender, Y. (2011). Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *Gazi University Journal of Science*, 24(3), 387-395.
- Baş, H., Kara, Ö., Kara, M., & Pandır, D. (2013). Protective effect of vardenafil on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43, 684-689.
- Başer, N. (1995). *Türev spektrofotometrik yöntemle aspartam miktar tayini* (47050) [Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

- Başkol, M., Başkol, G., Koçer, D., Artış, T., & Yılmaz, Z. (2007). Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5, 83- 89.
- Baydar, T., & Şahin, G. (1997). Aspartam metabolizması ve toksisitesi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 17, 141-152.
- Bellisile, F., & Drewnowski, A. (2007). Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *Eur J Clin Nutr.*, 61, 691-700. **doi: 10.1038/sj.ejcn.1602649**
- Bereket, A. (2012). <https://aysebereket.wordpress.com/2012/12/26/en-sik-kullanilan-zehiraspartam-e951/>
- Berridge, M.J. (2015). Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 460(1), 53–71. **doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.008**
- Berryman, J.P., Faux, D.A., & Dunstan, D.J. (2007). Solvation pressure in ethanol by molecular dynamics simulations. *Physical Review B.*, 76(10), 104303.
- Best D., & Nelson, L.(1993). Low-Calori foods and sweeteners. *Prepared Foods*, 162(7), 47-48.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B.K. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Bikle, D. (2009). Nonclassic Actions of Vitamin D. *Journal Clinical Endocrinol Metabolism.*, 94(1), 26-34. **doi: 10.1210/jc.2008-1454**
- Boğa, A., & Binokay, S. (2010). Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. *Archives Medical Review Journal*, 19 (3), 141-154.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., & Sies, H. (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5), 256-267. **doi: 10.1016/j.mam.2005.07.004**
- Brewer, L.D., Thibault, V., Chen, K.C., Langub, M.C., Landfield, P.W., & Porter, N.M. (2001). Vitamin D hormone confers neuroprotection in paralel with downregulation of L-type calcium channele xpression in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 21(1), 98–108. **doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-01-00098.2001.**
- Brown, J., Bianco, J.I., McGrath, J.J., & Eyles, D.W. (2003). 1,25- Dihydroxyvitamin D3 induces nevre growth factor, promotes neurite out growth and inhibits mitosis in

- embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.*, 343(2), 139–143. **doi: 10.1016/s0304-3940(03)00303-3**
- Budak, G., & Tezcan, E. (2019). Gıdalarda sıklıkla kullanılan doğal ve yapay tatlandırıcıların sağlık üzerine etkileri. *Journal of Health and Sport Sciences (JHSS)*, 2(3), 74-78.
- Burton, K.A. (1956). Study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, 62(2), 315–323. **doi: 10.1042/bj0620315**
- Büyükokuroğlu, M.E., Çemek, M., Yürümez, Y., Yavuz, Y., & Aslan, A. (2008). Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biology and Toxicology*, 24(2), 151-158. **doi: 10.1007/s10565-007-9024-z**
- Cannell J.J., & Grant, W.B. (2013). What is the role of vitamin D in autism?. *Dermato Endocrinology*, 5(1), 199-204. **doi: 10.4161/derm.24356**
- Cao, G., & Prior, R. L. (1999). In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1173-1181. **doi: 10.1016/s0891-5849(99)00203-8**
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known and what is to come. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 302-317. **doi: 10.1016/j.fct.2017.06.046**
- Chaudiere, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 949- 962. **doi: 10.1016/s0278-6915(99)00090-3**
- Chen, T.C. (2013). *Vitamin D autocrine system and prostate cancer prevention and treatment*. R.R. Watson (Eds.), Handbook of vitamin D in human health: Prevention, treatment and toxicity, Human Health Handbooks no. 4, Wageningen Academic Publishers.
- Choudhary, A., Sundareswaran L., & Devi R.S. (2016). Effects of aspartame on the evaluation of electrophysiological responses in Wistar albino rats. *Journal of Taibah Universty for Science*, 10, 505-512. **https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.07.006**

- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., & Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in fresh water bivalves, *Unio Tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(2), 122-131. **doi: 10.1006/eesa.1997.1582**
- Çadırcı, K., Özdemir Tozlu, Ö., Türkez, H., & Mardinoğlu, A. (2020). The in vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human bloodcells. *Turk J Med Sci.*, 50, 448-454. **doi: 10.3906/sag-2001-113**
- Çakıcı, Ç. (2016). *1,25(OH)₂ D₃ Vitaminin apoptoz ve oksidatif stres üzerine doza bağlı etkileri* (437669) [Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Medipol Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Çakmakçı, S., & Çelik, İ. (1994). *Gıda Katkı Maddeleri*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çimen, Ç., Öter, Ç., Demir, H., & Savran, A. (2005). Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *Yüüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 15-20.
- Çobanoğlu Özyiğitoğlu. G. (2020). D vitamininin biyolojisi ve doğal kaynakları. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 380-391. **<https://doi.org/10.29048/makufebed.778498>**
- Dayangaç, D., Özaydın, E., Özbaş Gerçekler, F., Çoşkun, T., & Erdem Yurter, H. (2002). Sağlıklı Türk popülasyonunda vitamin D reseptör (VDR) gen polimorfizm analizi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 27, 11-16.
- De Luca, H.F., & Zierold C. (1998). Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutrition reviews*, 56, 4-10. **doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01686.x**
- De Luca, H.F., & Cantorna, M.T. (2001). Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*, 15(14), 2579-2585. **doi: 10.1096/fj.01-0433rev**

- De Luca, H.F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1689- 1696. **doi: 10.1093/ajcn/80.6.1689S**
- Del-Rio, D., Stewart, A.J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328. **doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003**
- Derviş, E. (2011). Oral antioksidanlar. *Dermatoz*, 2(1), 263-267.
- Diem, M. (1993). *Introduction to Modern Vibrational Spectroscopy*. Wiley-Interscience. New York.
- Diplock, A. (1998). Healthy life styles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*. Belgium.
- Dittmer, K.E., & Thompson, K.G. (2011). Vitamin D Metabolism and Rickets in Domestic Animals. *Veterinary Pathology*, 48(2), 389-407. **doi: 10.1177/0300985810375240**
- Doğan, A. (2020). Diyabetik ratlarda Zakkum (*Neriumoleander L.*) çiçeği etanolik liyofilize ekstresinin eritrosit fragilite, hematolojik ve antioksidan etkilerinin araştırılması. *KSU J. Agric Nat.*, 23(6), 1495-1502. **doi:10.18016/ksutarimdog.vi.712369**
- Dong, J., Wong, S.L., Lau, C.W., Lee, H.K., Ng, C.F., Zhang, L., Yao, X., Chen, Z.Y., Vanhoutte, P.M., & Huang, Y. (2012). Calcitriol protects renovascular function in hypertension by downregulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *European Heart Journal*, 33(23), 2980–2990. **doi: 10.1093/eurheartj/ehr459**
- Drabkin, D.I. (1946). Spectrophotometric studies. XIV, the crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *Journal of Biological Chemistry*, 164(2), 703–723.
- El-Gendy, K.S., Aly, N.M, Mahmoud, F.H., Kenawy, A., & El-Sebae, A.K.H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stres induced byimidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 215-221. **doi: 10.1016/j.fct.2009.10.003**

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., & Feather-Stone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95. **doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9**
- Emekli, N. (2006). *Temel ve Uygulamalı Biyokimya*. Marmara Yayınları.
- Ercan, Ç. (2018). *Ratlarda tartrazin ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine krosinin koruyucu etkisi* (506643) [Yüksek Lisans Tezi, Karabük Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Erden Çalışır, & Z., Çalışkan, D. (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3), 193-206.
- Erdoğan, Ş. (2007). *Ankara piyasasında satışa sunulan bazı gıdalarda sentetik boya miktarlarının araştırılması* (194240) [Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Erdem, N. (2014). *Tüketicilerin hazır ve yarı hazır gıdalarda kullanılan gıda katkı maddelerine yönelik görüşlerinin incelenmesi (Konya ili örneği)* (386009) [Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, 38(12), 1103-1111. **doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008**
- Fagherazzi, G., Vilier, A., Saes Sartorelli, D., Lajous, M., Balkau, B., & Clavel-Chapelon, F. (2013). Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the etude epidemiologique aupres des femmes de la mutuelle generale de l'education nationale- european prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(3), 517- 523. **doi: 10.3945/ajcn.112.050997**
- Fearon, I.M., & Faux, S.P. (2009). Oxidative stres and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol*, 47(3), 372-381. **doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.05.013**
- Ferraro, J.R., Nakamoto, K., & Brown, C.W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy* (Ferraro J.R., Nakamoto K., Brown C.W., Ed.) Academic Press: San Diego.
- Fidan, F., Alkan, B.M., & Tosun, A. (2014). Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi*, 20(2), 71-74. **doi:10.4274/tod.94830**

- Foyer, C.H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21–25. **doi: 10.1007/BF00386001**
- Fowler, S.P.G. (2016). Low-calorie sweetener use and energy balance: Results from experimental studies in animals, and large-scale prospective studies in humans. *Physiol Behav*, 164, 517-523. **doi: 10.1016/j.physbeh.2016.04.047**
- Garcia, M., Seelaender, M., Sotiropoulos, A., Coletti, D., Lancha, & J.A.H. (2019). Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition*, 60, 66-69. **doi: 10.1016/j.nut.2018.09.031**
- Genç, A., Gülmez Sevim, D., Tok Özen, A., & Yılmaz, G. (2015). D vitamininin çeşitli hastalıklardaki nadir kullanım alanları. *J Ankara Univ Fac Med.*, 68(2), 55-63. **doi:10.1501/Tıpfak_0000000890**
- Goldblatt, H., & Soames, K.M. (1923). A study of rats on a normal diet irradiated daily by the mercury vapor quartz lamp or kept in darkness. *Biochemical Journal*, 17(2), 294-297. **doi: 10.1042/bj0170294**
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L., Hidalgo, F., Hidalgo, F.J., Miyashita, K., Camp, J., Alasalvar, C., İsmail, A.B., Elmore, S., Birch, G.G., Charalampopoulos, D., Astley, S.B., Pegg, R., Zhou, P., & Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food Chemistry*, 264, 471-475. **doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.012**
- Gupta, V. K., & Sharma, S. K. (2006). Plants as natural antioxidants. *Indian Journal of Natural Product Radiance*, 5 (4), 326-334.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Kumari, R., Chugh, S., Shrivastav, C., Mehra, S., & Sharma, A.N. (2012). Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a casecontrol study. *Asian Pacifics Journal of Cancer Prevention*, 13(12), 6295-6298. **doi: 10.7314/apjcp.2012.13.12.6295**
- Gültekin, F. (2011). Gıda katkı maddeleri ve hastalıklar. *I. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi Sözel Bildiri Kitabı*, 157-161.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E. (2010). *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.

- Güven, A. (2000). Asetilkolinesteraz'ın önemi ve inhibitörleri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, 6(1-2), 145-151.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hamilton, B. (2011). Vitamin D and Athletic Performance. The Potential Role of Muscle. *Asian J Sports Medicine*, 2(4), 211-219. [doi: 10.5812/asjms.34736](https://doi.org/10.5812/asjms.34736)
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., & Malik, J.K. (2003). Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185(1-2), 1-8. [doi: 10.1016/s0300-483x\(02\)00574-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00574-7)
- Hisar, O., Hisar, Ş.A., Kaya, M., & Yanık, T. (2003). Farklı su sıcaklıklarında tutulan aynalı sazanlarda (*Cyprinus carpio*) eritrosit hücrelerinin ozmotik kırılganlıkları ile yağ asidi kompozisyonları. *Turk J Vet Anim Sci.*, 27(6), 1277-1281.
- Holick, M.F. (2005). The vitamin D epidemic and its health consequences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 11, 2739-2748. [doi: 10.1093/jn/135.11.2739S](https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2739S)
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.*, 357(3), 266-281. [doi: 10.1056/NEJMra070553](https://doi.org/10.1056/NEJMra070553)
- Holick, M.F., & Chen, T.C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American Journal Clinical Nutrition*, 87(4): 1080-1086. [doi: 10.1093/ajcn/87.4.1080S](https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.1080S)
- Holick, M.F. (2009). Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol.*, 19(2), 73–78. [doi: 10.1016/j.annepidem.2007.12.001](https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001)
- Holick, M.F., Binkley, N.C., Bischoff-Ferrari, H.A., Gordon, C.M., Hanley, D.A., Heaney, R.P., Murad, M.H., & Weaver, C.M. (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.*, 96(7), 1911-1930. [doi: 10.1210/jc.2011-0385](https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385)
- Homler, B.E. (1984). The properties and stability of aspartame. *Food Technology*, 38(7): 50–55.
- Hosseini-nezhad, A., Spira, A., & Holick, M.F. (2013). Influence of vitamin D status and vitamin D₃ supplementation on genome wide expression of white bloodcells: a

- randomized double-blind clinical trial. *PLoS One*, 8(3), e58725. **doi: 10.1371/journal.pone.0058725**
- Hu, S., Smith, K.M., & Spiro T.G. (1996). Assignment of protoheme Resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 12638-12646.
- Hu, F.B., Meigs, J.B., Li, T.Y., Rifai, N., & Manson, J.E. (2004). Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes*, 53(3), 693–700. **doi: 10.2337/diabetes.53.3.693**
- Iman M. M., & Neveen, A.N. (2011). Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. *Int J Pharm Biomed Sci.*, 2(1), 4-10.
- Işık, A., & Selek, Ş. (2007). Total antioxidant response and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *F. Ü. Sağ. Bil. Derg.*, 21(2), 67-73.
- İşgören, A., & Sungur, S. (2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific Journal of Health and Natural Sciences*, 3(1), 19-32.
- Jain, S.K., & Micinski, D. (2013). Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(1), 7–11. **doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.004**
- Jose, N., & Janardhanan, K.K. (2000). Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. *Current Science*, 79 (7), 941-943.
- Karabulut, H., & Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, H., & Gülay, Ş.G. (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Kartal, A. (2015). *Benzil benzoatın sitotoksitesinin in vitro koşullar altında araştırılması* (379643) [Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Kennel, K.A., Drake, M.T., & Hurley, D.L. (2010). Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(8), 752-758. **doi: 10.4065/mcp.2010.0138**

- Kesby, J.P., Eyles, D.W., Burne, T.H.J., & McGrath, J.J. (2011). The effects of vitamin D on brain development and adult brain function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 347(1-2), 121–127. **doi: 10.1016/j.mce.2011.05.014**
- Kılınç, K., & Kılınç, A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118.
- Kızılaslan, N. (2017). Tatlandırıcılar ve metabolizma hastalıklarıyla ilişkisi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 191-198. **doi:10.24925/turjaf.v5i2.191-198.1033**
- Kim, J.R., Kim, B.H., Kim, S.M., Oh, M.Y., Kim, W.J., Jeon, Y.K., Kim, S.S., Lee, B.J., Kim, Y.K., & Kim, I.J. (2014). Low serum 25 hydroxyvitamin D is associated with poor clinicopathologic characteristics in female patients with papillary thyroid cancer. *Thyroid*, 24(11), 1618-1624. **doi: 10.1089/thy.2014.0090**
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., & Fagg, A. (2000). The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 40(9), 780-791.
- Krishnan, N., & Kodrik, D. (2006). Antioxidant enzymes in *spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stres. *Journal of Insect Physiology*, 52(1), 11-20. **doi: 10.1016/j.jinsphys.2005.08.009**
- Kung, C.M., Tseng, Z.L., & Wang, H.L. (2009). Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 43(4), 345-351. **doi: 10.3233/CH-2009-1245**
- Küçüköner, E. (2011). Helal gıda sertifikasyonunda gıda katkı maddelerinin yeri. *1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri Kongre Kitabı*, 12-17.
- Li, Y. (2017). *Novel sustainable anode materials and interfacial chemistry for improved rechargeable batteries* [Doctoral dissertation]. University of Tennessee, Knoxville.
- Li, R., Lou, Y., Zhang, W., Dong, Q., & Han, B. (2014). Vitamin D inhibition of lung adenocarcinoma cell proliferation in vitro. *Tumour Biology*, 35(11), 10953-10958. **doi: 10.1007/s13277-014-1994-x**

- Limon-Pacheco, J., & Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.*, 674(1-2), 137-147. **doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015**
- Lino, C.M., & Pena, A. (2010). Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, 121(2), 503-508. **doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.073**
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118- 126. **doi: 10.4103/0973-7847.70902**
- Mackey, S., Berlin, C.M.J. (1992). Effect of dietary aspartame on plasma concentrations of phenylalanine and tyrosine in normal and homozygous phenylketonuric patients. *Clin Pediatr*, 31: 394-399.
- Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R., & Williams, G.M. (2007). Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(8), 629–727. **doi: 10.1080/10408440701516184**
- Mamur, S., Ataseven, N., Ünal, F., & Yüzbaşıoğlu, D. (2018). Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 235-245. **https://doi.org/10.25092/baunfbed.428958**
- Managò, S., Mirabelli, P., Napolitano, M., Zito, G., & De Luca, A.C. (2018). Raman detection and identification of normal and leukemic hematopoietic cells. *J. Biophotonics*, 11(5), e201700265. **doi: 10.1002/jbio.201700265**
- Mangan, B. (2019). *Karadut meyve ve yapraklarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi* (575026) [Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Mansour, S.A., & Mossa, A.H. (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 34-39. **doi:10.1016/j.pestbp.2008.09.004**

- Mansour, S.A., & Mossa, A.H. (2010). Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats. *Human and Experimental Toxicology*, 29(2), 77-92. **doi: 10.1177/0960327109357276**
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474. **doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x**
- Marquardt, P., Krause, R., Schaller, M., Bach, D., & Von-Gersdorff, G. (2015). Vitamin D status and cancer prevalence of hemodialysis patients in Germany. *Anticancer Research*, 35(2), 1181-1187.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J.O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3 year old and 8-9 year old children in the community: a randomised, double –blinded, placebo-controlled trial. *Randomized Controlled Trial*, 370(9598), 1560-1567. **doi: 10.1016/S0140-6736(07)61306-3**
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.
- Mickle, D.A., & Weisel, R.D. (1993). Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*, 9, 89-93.
- Milli Eğitim Bakanlığı (Meb). (2012). *Kimya teknolojileri*. Ankara.http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Spektrofotometre.pdf.
- Minen, M.T., & Karceski, S. (2011). Multiple sclerosis and disease-modifying therapies. *Neurology*, 77(4), 26-30. **doi: 10.1212/WNL.0b013e318229e6ca**
- Molaveisi, M., Shahidi- Noghabi, M., & Naji- Tabasi, S. (2020). Vitamin D3-loaded nanophytosomes for enrichment purposes: Formulation, structure optimization, and controlled release. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), e13560. **doi:10.1111/jfpe.13560**

- Nath, B.S., & Kumar, P.S. (1999). Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(2), 157-162. **doi: 10.1006/eesa.1998.1735**
- Nemere, I., & Carson-Farach, M.C. (1998). Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248(3), 442-449. **doi: 10.1006/bbrc.1998.8492**
- Nordon, A., Mills, A., Burn, R.T., Cusick, F.M., & Littlejohn, D. (2005). Comparison of non-invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits. *Anal. Chim. Acta.*, 548(1-2), 148-158. **doi:10.1016/j.aca.2005.05.067**
- Norman, W.A. (2011). Vitamin D nutrition is at a crossroads. *Public Health Nutr.*, 14(4), 744-745. **doi: 10.1017/S1368980011000280**
- Ognjanovic, B.I., Markovic, S.D., Ethordevic, N.Z., Trbojevic, I.S., Stajn, A.S., & Saicic, Z.S. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 191-197. **doi: 10.1016/j.reprotox.2009.11.009**
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. **doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3**
- Olney, J.W., & Ho, O.L. (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*, 227(5258), 609-611. **doi: 10.1038/227609b0**
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336. **doi: 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545**
- Özkan, B., & Döneray, H. (2011). D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 54(2), 99-119.
- Özkan, A., & Fışkın, K. (2004). Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14(1), 52-60.

- Paglia, D.E., & Valentine, W.N. (1987). Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158-165.
- Pehlivan, M., & Köksal, E. (2020). Doğal ve yapay tatlandırıcıların glukoz intoleransı, karaciğer enzimleri ve oksidatif stres üzerine etkisi. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg.*, 13(1), 140-154. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.624135>
- Pektaş, İ. (2009). *Bitki gelişim düzenleyicilerinin antioksidan enzimler üzerindeki Etkisinin araştırılması* (245516) [Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., & Bevilacqua, A. (2017). Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures: Expected reliability of the trypan blue assay. *Biological Procedures Online*, 19, 8. [doi: 10.1186/s12575-017-0056-3](https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3).
- Pilz, S., März, W., Cashman, K.D., Kiely, M.E., Whiting, S.J., Holick, M.F., Grant, W.B., Pludowski, P., Hiligsmann, M., Trummer, C., Schwetz, V., Lerchbaum, E., Pandis, M., Tomaschitz, A., Grubler, M.R., Gaksch, M., Verheyen, N., Hollis, B.W., Rejnmark, L., ..., & Zittermann, A. (2018). Rationale and plan for vitamin D food fortification: a review and guidance paper. *Front Endocrinol*, 9, 373. [doi: 10.3389/fendo.2018.00373](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00373)
- Pludowski, P., Holick, M.F., Grant, W.B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M.R., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A.P., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Lukaszkiwicz, J., Marcinowska-Suchowierska, E., Laszcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H.P., & Wimalawansa, S.J. (2018). Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 175, 125-135. [doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.01.021](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.021)
- Possamai, F.P., Fortunato, J.J., Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Filho, D.W., & Dal-Pizzol, F. (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(2), 198-204. [doi: 10.1016/j.etap.2006.09.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.09.003)
- Rao, S., Bařint, S., Carmen Frias, L., & Petrov, D. (2009). Polarization raman study of protein ordering by controllable RBC deformation. *J. Raman Spectrosc.*, 40(9), 1257–1261. [doi:10.1002/jrs.2275](https://doi.org/10.1002/jrs.2275)

- Reiter, R.J. (2000). Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News in Physiology Sciences*, 15, 246- 250. **doi: 10.1152/physiologyonline.2000.15.5.246**
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., & Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1-11. **doi: 10.1111/j.1600-079x.1995.tb00133.x**
- Reszka, E., Wasowicz, W., & Gromadzinska, J. (2006). Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr.*, 96(4), 609-619.
- Ripper, A., Homler, B.E., & Miller, G.A. (1986). *Aspartame'in Alternative Sweeteners*. (Gelardi, R.C., Nabors L.O., Ed.). Marcel Dekker Inc. New York.
- Rowe, R.C. (2009). *Aspartame*. Handbook of Pharmaceutical Excipients. pp. 11–12.
- Salum, E., Kals, J., Kampus, P., Salum, T., Zilmer, K., Aunapuu, M., Arend, A., Eha, J., & Zilmer, M. (2013). Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 100(2), 243-249. **doi: 10.1016/j.diabres.2013.03.008**
- Sakihama, Y., Cohen, M., Stephen, C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80. **doi: 10.1016/s0300-483x(02)00196-8**
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., & Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119. **doi: 10.1016/s1383-5718(02)00128-6**
- Schaumburg, H.H., Byck, R., Gerstl, R., & Mashman, J.H. (1969). Monosodium L-glutamate: its pharmacology and role in the chinese restaurant syndrome. *Science*, 163(3869), 826-828. **doi: 10.1126/science.163.3869.826**
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S.S., Friedmann, T., & Taylor, P. (1986). Primary structure of Torpedo californica

- acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052), 407-409.
doi: 10.1038/319407a0
- Schwartz, G.R. (1999). Aspartame and Breast and Other Cancers. *West J Med.*, 171(5-6), 300 -301.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 91-100.
- Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, 1, 1-37.
doi: 10.1021/bk-2011-1083.ch001
- Sencar, L., & Kuyucu, Y. (2020). Aspartam ve asesülfam K kullanımının testis yapısına etkilerinin ince yapı düzeyinde incelenmesi. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(3), 320-331. <https://doi.org/10.30569/adiyamansaglik.789927>
- Sevindik, Y. (2017). *Aspartamın yapay reseptörlere dayalı moleküler baskılı polimerleri ve moleküler modellenmesi* (495048) [Yüksek Lisans Tezi Namık Kemal Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, 29, 1293– 1299. **doi: 10.1016/j.nut.2013.03.024**
- Shi, L., Nechuta, S., Gao, Y.T., Zheng, Y., Dorjgochoo, T., Wu, J., Cai, Q., Zheng, W., Lu, W., & Shu, X.O. (2014). Correlates of 25-hydroxyvitamin D among chinese breast cancer patients. *PLoS ONE*, 9(1), e86467. **doi: 10.1371/journal.pone.0086467**
- Shihadeh Y. (1998). *Güneşe maruz kalma şekillerinin D vitamini üretimindeki rolü*, [Basılmamış Tıpta Uzmanlık Tezi]. İstanbul Üniversitesi.
- Sözen, T. (2011). D hormonu: Güncel gelişmeler. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 42, 14-27.
- Stahl, W., & Sies, H. (1993). Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of New York Academy of Sciences*, 691, 10–19.
doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb26153.x
- Tangpricha, V., Spina, C., Yao, M., Chen, T.C., Wolfe, M.M., & Holick, M.F. (2005). Vitamin D deficiency enhances the growth of MC-26 colon cancer xenografts in

- Balb/c mice. *The Journal of Nutrition*, 135(10), 2350-2354. **doi: 10.1093/jn/135.10.2350**
- Taşlı, B., Çavuşoğlu, K., & Yalçın, E. (2018). *Alliumcepa (Amaryllidaceae) L.'da tartrazin uygulaması sonucu oluşan fizyolojik, sitogenetik ve anatomik değişimlerin araştırılması. Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 7(2), 1-6.
- Temür, N. (2006). *Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (Viscum album L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi* (182462) [Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi].
- Tezcan, I. (2012). D Vitamini ve İmmün Sistem. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci.*, 8(2), 66-68.
- Towsend, D.M., Tew, K.D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57(3-4), 145-155. **doi: 10.1016/s0753-3322(03)00043-x**
- Tuormaa, T.E. (1994). The adverse effects of food additives on health. *Journal Of Orthomolecular Medicine*, 9(4), 225-243.
- Türkoğlu, Ş. (2008). Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food Chem. Toxicol.*, 46(6), 2035-2041. **doi: 10.1016/j.fct.2008.01.043**
- Uitterlinden, A.G., Fang, Y., Van Meurs, J.B.J., Pols, H.A.P., & Van Leeuwen, J.P.T.M. (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 338(2), 143–156. **doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014**
- Valdivielso, J.M., & Fernandez, E. (2006). Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.*, 371(1-2), 1-12. **doi: 10.1016/j.cca.2006.02.016**
- Vale, J.A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus(OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102-103, 649-652. **doi: 10.1016/s0378-4274(98)00277-x**
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions*, 160(1), 1- 40. **doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009**

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1), 44-84. **doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001**
- Vuolo, L., Somma, D.C., Faggiano, A., & Colao, A. (2012). Vitamin D and cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 58. **doi: 10.3389/fendo.2012.00058**
- Wacker, M., & Holick, M.F. (2013). Vitamin D-effects on skeletal and extraskkeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*, 5(1), 111-148. **doi: 10.3390/nu5010111**
- Ward, N.I., Soulsbury, K.A., Zettel, V.H., Colquhoun, I.D., Bunday, S., & Barnes B. (1990). The influence of the chemical additive Tartazine on the zinc status of hyperactive children -A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Nutritional Medicine*, 1(1), 51-57. **https://doi.org/10.3109/13590849009003134**
- Wathsala, J., Amila, K., Maths, H., Nils-Olav S., & Klaus-Joachim J. (2021). *Recent developments in atomic force microscopy and raman spectroscopy for materials characterization: Deep learning approach for raman spectroscopy* (Pathak, C.S., & Kumar, S. Ed.). Published in London, United Kingdom. **http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.94185**
- Wood, B.R., Caspers, P Puppels,. G.J., Pandiancherri, S., & McNaughton, D. (2007). Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387(5), 1691-1703. **doi: 10.1007/s00216-006-0881-8**
- Yadav, A.K., & Singh, P. (2015a). A review of the structures of oxide glasses by raman spectroscopy. *RSC Advances*, 5(83), 67583-67609. **doi:10.1039/C5RA13043C**
- Yakıcı, T. (2006). *Portakal aromalı içeceklerde sıcaklık, pH ve depolama süresinin aspartam stabilitesi üzerine etkisi* (183518) [Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.
- Yılmaz, E. (1999). Etiketlerde “E” leri Görmeye Alıştık. *Bilim Teknik*, s. 94-97.
- Yılmaz, M. (2010). *Bazı pestisitlerin sıçan dokularındaki asetilkolinesteraz ve antioksidan enzim aktiviteleri ile malondialdehit düzeyine etkileri* (270627) [Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi.

- Yılmaz, M., & Yılmaz, N. (2013). D Vitaminin beyindeki rolü ve ilişkili nörolojik hastalıklar. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4(3), 411-415. **doi: 10.5799/ahinjs.01.2013.03.0316**
- Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., & Çelik, M. (2014). DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. *Toxicol Ind Health*, 30(10), 926-937. **doi: 10.1177/0748233712466132**
- Young, I.S., & Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186. **doi: 10.1136/jcp.54.3.176**
- Yörük, N.G., & Danyer, E. (2016). Gıda katkı maddeleri genel bilgiler ve tanımlar. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(2), 1-10.
- Yurttagül, M., & Ayaz, A. (2008). *Katkı maddeleri: yanlışlar ve doğrular*. Klasmat Matbaacılık.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., & Ünal, F. (2014). Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186. **doi: 10.5505/gida.24861**
- Zempleni J., Rucker, R.B., Suttie, J.W. & McCormick, D.B. (Eds.). (2008). *Handbook of vitamins: D vitamini*. CRC Press.
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., & Aksoy, H. (2011). The evaluation of genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 763-769. **doi: 10.1016/j.fct.2010.11.040**
- Zhou, Z., Zhou, R., Zhang, Z., & Li, K. (2019). The association between vitamin D status, vitamin D supplementation, sunlight exposure, and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Med Sci Mon Int Med J Exp Clin Res.*, 25, 666-674. **doi: 10.12659/MSM.912840**

Ayşe BÜYÜK

Yüksek Lisans Tezi

YOZGAT 2024



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

