



**SODYUM NİTRİT İLE OKSİDATİF STRES
OLUŞTURULAN RATLARDA HESPERİDİNİN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Barış KAÇMAZ
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ
Tez No: 2022-041
Afyonkarahisar

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

**SODYUM NİTRİT İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN
RATLARDA HESPERİDİNİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Barış KAÇMAZ**

**Danışman
Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ**

Afyonkarahisar

2022

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:
“20.SAĞ.BİL.27”**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda** Barış Kaçmaz tarafından hazırlanan “Sodyum Nitrit ile Oksidatif Stres Oluşturulan Ratlarda Hesperidinin Etkisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Zeki GÜRLER

İmza

Üye

Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

İmza

Üye

Doç. Dr. Halil YALÇIN

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

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

İmza

Barış Kaçmaz

ÖZET

SODYUM NİTRİT İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA HESPERİDİNİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Sodyum nitrit genellikle et ve et ürünlerinde kullanılmaktadır. Nitrite maruziyet toksisitenin yanı sıra oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna da sebep olabilmektedir. Bu nedenle istenmeyen etkilerin önüne geçilmesinde, antioksidan özellik gösteren farklı maddeler tercih edilmektedir. Hesperidin serbest radikalleri temizleme yeteneğine katkıda bulunan yapıya sahiptir. Bu çalışmada, sodyum nitrit ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda hesperidin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, toplam 35 Wistar albino rat 5 gruba ayrıldı. I. Grup negatif kontrol olarak belirlendi. II. Grup 15 günün sonunda tek doz 60 mg/kg sodyum nitrit subkutan olarak verildi. III., IV. ve V. gruplara sırasıyla hesperidin 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında 15 gün gastrik gavaj yoluyla verildi ve 15 günün sonunda tek doz 60 mg/kg sodyum nitrit subkutan olarak verildi. Çalışma sonunda da hayvanlardan alınan kan ve doku örneklerinden süperoksitdismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve katalaz (CAT) değerleri incelendi ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi. Karaciğer ve böbrek doku örneklerinde IFN- γ , TNF- α ve NFkB ekspresyon düzeyleri belirlendi. Sodyum nitrit uygulaması antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD ve CAT) ve GSH düzeylerinde azalmaya neden oldu. Bununla birlikte lipid peroksidasyonu arttırdı. Dokularda histopatolojik değişiklere neden oldu ve yangısal genlerin ekspresyon düzeylerinde artışa neden oldu. Bununla birlikte artan dozlarda hesperidin uygulaması sodyum nitrit tarafından indüklenen hasarı azalttı ve dokularda rejeneratif etki gösterdi. Sonuç olarak, sodyum nitritin neden olduğu oksidatif strese bağlı doku ve organ hasarlarının önlenmesinde doğal antioksidan olan hesperidin koruyucu etki gösterdiği ve olumsuz etkileri düzelttiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hesperidin, Oksidatif Stres, Sodyum Nitrit

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF HESPERIDIN AGAINST SODIUM NITRITE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RATS

Sodium nitrite is generally used in meat and meat products. Exposure to nitrite can cause oxidative stress and formation of reactive oxygen species as well as toxicity. For this reason, different substances with antioxidant properties are preferred to prevent undesirable effects. Hesperidin has a structure that contributes to its ability to scavenge free radicals. In this study, it was aimed to determine the effect of hesperidin in rats under oxidative stress induced by sodium nitrite. In the study, a total of 35 Wistar albino rats were divided into 5 groups. Group I was determined as the negative control. II. Group received a single dose of 60 mg/kg sodium nitrite subcutaneously at the end of 15 days. Hesperidin was given to the III, IV and V groups at doses of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively, for 15 days by gastric gavage, and at the end of 15 days, a single dose of 60 mg/kg sodium nitrite was given subcutaneously. At the end of the study, superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) values in blood and tissue samples taken from animals were examined and histopathological examinations were performed. IFN- γ , TNF- α and NFkB expression levels were determined in liver and kidney tissue samples. Sodium nitrite administration caused a decrease in antioxidant enzyme activities (SOD and CAT) and GSH levels. Also, it increased lipid peroxidation. It caused histopathological changes in tissues and increased expression levels of inflammatory genes. However, increasing doses of hesperidin reduced the damage induced by sodium nitrite and showed a regenerative effect in tissues. As a result, it was determined that hesperidin, a natural antioxidant, has a protective effect and reversed the negative effects in the prevention of tissue and organ damage due to oxidative stress caused by sodium nitrite.

Keywords: Hesperidin, Oxidative Stress, Sodium Nitrite

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında ve yüksek lisans programının tüm aşamalarında bilgi, birikim ve desteklerini tüm mütavaziliyle aktarmaktan hiç çekinmeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneylerin labaratuvar çalışmalarında her zaman destek olan Dr. Öğretim Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL'e ve Dr. Fahriye Zemheri NAVRUZ'a teşekkürlerimi sunarım. Bu yola başlamamda ve devam etmemde emeklerini esirgemeyen sonucu göremese de başta sevgili babam olmak üzere aileme tüm içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi BAP koordinatörlüğü tarafından AKÜ-BAP "20.SAĞ.BİL.27" kodlu proje kapsamında desteklenmiştir. Verilen desteklerden dolayı teşekkürlerimi iletirim.

Barış KAÇMAZ

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ SAYFASI	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	VIII
RESİMLER	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri	3
2.1.1. Koruyucular	4
2.1.2. Duyusal Özellikleri Geliştiriciler	4
2.1.3 Aroma ve Renk Geliştiriciler	4
2.1.4 Besin Değeri Koruyucular	4
2.2. Sodyum Nitrit	5
2.3. Oksidatif Stres	5
2.4. Antioksidan	7
2.4.1. Endojen Antioksidanlar	8
2.4.1.1. Süperoksid Dismutaz(SOD)	9
2.4.1.2. Glutasyon	10
2.5. Hesperidin	12
2.5.1. Hesperidin İle Yapılan Çalışmalar	14
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Anestezi ve Sakrifikasyon Aşaması	17
3.2. Doku Homojenizasyonu	18
3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	18
3.4. Malondialdehit (MDA) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	19
3.5. Histopatolojik Değerlendirme	19
3.5.1. Doku Takibi	20
3.6. Moleküler Analizler	20
4. BULGULAR	23

4.1. Biyokimyasal Bulgular	23
4.1.1. MDA Düzeyleri	23
4.1.2. GSH Düzeyleri	24
4.1.3. SOD Aktivite Düzeyleri	25
4.1.4. CAT Aktivite Düzeyleri	26
4.1.5. Karaciğer ve Böbrekte Değişen Biyokimyasal Gen Parametreleri	27
4.2. Histolojik Bulgular	31
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47
8. EKLER	54
8.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	54
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA: Analysis of Variance (ANOVA)

Bkz.: Bakınız

CAT: Katalaz

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

f: Frekans.

F: Varyans analizine (ANOVA) ilişkin parametre

GLA: Gama Linoleik Asit

GSH: Redükte Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSG: Yükseltgenmiş Glutasyon

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HES: Hesperidin

LPA: Lipid Peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

N: Evren büyüklüğü

n: Örneklem büyüklüğü

OS: Oksidatif Stres

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri

ROO: Peroksil radikali

ROS: Reaktif Oksijen Türler

SOD: Süperoksit Dismutaz

T.C. : Türkiye Cumhuriyeti

TDK: Türk Dil Kurumu

TGK: Türk Gıda Kodeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 4.1. Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	27
Şekil 4.2 Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	28
Şekil 4.3. Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	29
Şekil 4.4. Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	29
Şekil 4.5. Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	30
Şekil 4.6. Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	31

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 3.1. Deney ve kontrol grupları	17
Çizelge 3.2. Yangısal genlerin ekspresyon düzeyleri	22
Çizelge 4.1. Gruplara ve dokulara göre MDA düzeyleri	23
Çizelge 4.2. Gruplara ve dokulara göre GSH	24
Çizelge 4.3. Gruplara ve dokulara göre SOD enzim aktivite düzeyleri	25
Çizelge 4.4. Gruplara ve dokulara göre CAT enzim aktivite düzeyleri	26



RESİMLER

	SAYFA
Resim 4.1. Beyin dokusu histopatolojik incelemesi	32
Resim 4.2. Akciğer dokusu histopatolojik incelemesi	32
Resim 4.3. Kalp dokusu histopatolojik incelemesi	32
Resim 4.4. Karaciğer dokusu histopatolojik incelemesi	32
Resim 4.5. Böbrek dokusu histopatolojik incelemesi	32
Resim 4.6. Testis dokusu histopatolojik incelemesi	33



1. GİRİŞ

Dış yörüngelerinde bir ya da birden çok eşleşmemiş elektrona sahip olan stabil olmayan, yüksek enerjili bileşikler serbest radikaller olarak ifade edilir. Serbest radikallerin reaktifliği sahip oldukları eşlenmemiş elektron aracılığıyla gerçekleşir ve serbest radikaller DNA, nükleotid koenzimler, protein, lipid gibi birçok biyolojik materyali zarara uğrattırlar. Bu zarar ise kalp ve damar hastalıkları, çeşitli kanser çeşitleri, immün sisteminde azalma, dejeneratif sinir sistemi hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır. Antioksidanlar ise serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarları engelleyerek ya da en aza indirerek, üretilen radikalleri temizleyerek, hücre veya dokularda oluşan hasarı tamir ederek, radikal oluşum mekanizmalarını önleyerek, hücre, doku ve vücut savunmasında rol oynarlar. Nitrit başta Clostridium botulinum ve pek çok patojen mikroorganizmaya karşı antimikriyal etkiye sahip olmasının yanı sıra et ürünlerinde istenilen tat ve rengin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Et ürünlerinin üretiminde yaygın kullanıma sahiptir. Nitritin alım sıklığı, tüketilen üründen ne kadar alındığı ve ürünün tüketim sıklığına göre kronik ve akut zehirlenmelere yol açarak sağlık açısından büyük bir risk oluşturmaktadır. Nitrit tek başına kanserojen etki göstermemekte ancak vücuttaki başka maddelerle tepkimeye girerek kanserojen etki gösteren yapılara dönüşebilmektedir (Gökalp vd., 2015; Turp ve Sucu, 2016). En yaygın kullanılan nitrit formu sodyum nitrittir. Nitrit, et ve et ürünleri için çok gerekli katkı maddelerindendir. Ancak standart dozdan daha yüksek oranlarda gıda maddelerine ilave edildiğinde beklenir zararlı etkiler meydana getirebilmektedir. Bu zararlı etkilerden korunmak için Norveç gibi bazı ülkelerde nitrit ve nitrat kullanımı tamamen yasaklanmıştır. Diğer ülkelerde de kullanımına belirli (kodeks ve yasalarda belirtilen) ölçüde olmak kaydı izin verilmiştir (Dönderici, 2005). Nitrit hem yükseltgen hem de indirgen bir maddedir. Bununla birlikte, nitrit ısıya karşı dayanıklı değildir ve organik maddelere karşı oldukça reaktiftir. Nitrat kanserojenik nitrozaminlerin oluşumuna neden olmaktadır. Mide pH'sı 5.5'in üzerine ulaştığında nitrat, nitrite dönüşmektedir. Oluşan nitrit aracılığıyla nitrozaminlerin oluşumaktadır (Prasad ve Chetty, 2008; Özdestan ve Üren, 2010). Akut nitrit toksisitesi yaygın olarak görülmekte olup çok sayıda ölüm rapor edilmiştir. Sodyum nitritin yanlışlıkla tüketilmesi veya gıdalarla kontrolsüz kullanımı ölümlere neden olmaktadır. Nitritin ortalama olarak diyetle günlük tüketim miktarı Norveç, Almanya, Hollanda'da sırasıyla 1.8 2.6 ve 0.6 mg düzeyindedir. Nitritin

baş kaynağı kürlenmiş etler olup alınan toplam nitritin %39'udur. Nitrit insan sağlığını olumsuz etkilemektedir bu nedenle gıdalarda bulunması istenmez. Hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde gıdalarda bulunabilecek maksimum nitrat ve nitrit düzeyleri ile ilgili yasal düzenlemeler mevcuttur (Hsu vd., 2009; Özdestan ve Üren, 2010).

Flavonoidler, bitkilerde (meyvelerde, yapraklı sebzelerde, bitki köklerinde, baharatlarda, tohumlarda) oldukça geniş yayılıma sahiptir (Garg vd., 2001). Hesperidin turuncgillerde özellikle limon ve portakalda daha yaygın bulunan bir flavanon glikozit olup biflavonoid grubunun bir üyesidir. Hesperidin, vitamin E'ye benzer etkileri olan bir antioksidandır. Hesperidin aynı zamanda askorbik asit sentezinde de rol oynamaktadır (Nones ve Gomes, 2011). Bazı çalışmalar, bu bileşiğin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerine sahip olduğu göstermiştir (Nones ve Gomes, 2011; Garg vd., 2001). Hesperidinin sahip olduğu biyolojik aktiviteler antikanser, antibakteriyel ve nöroprotektiftir (Amado vd., 2009). Ayrıca Youdim vd. (2003) hesperidinin kan beyin bariyerini geçebildiğini göstermiştir. Hesperidinin diyabet, iskemik reperfüzyon, katarakt ve sinir rejenerasyonu gibi oksidatif hasar modellerinde etkinli olduğu bildirilmiştir (Shagirtha vd., 2018; Öztanır vd., 2014). Ayrıca in vitro ve in vivo çalışmalarda antimikrobiyal, antihipertansif, antiviral, hipolipidemik, antiinflamatuvar, antioksidan, antihepatotoksik etkileri gösterilmiştir (Guardia vd., 2001; Garg vd., 2001). Hesperidinin oksidatif metabolizmada serbest oksijen radikallerini yok etme özelliğine sahip olduğu ayrıca proinflamatuvar mediatörlerin etkilerini inhibe ettiği belirlenmiştir (Shagirtha vd., 2018). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada portakal ve mandalina suyunda bulunan hesperidinin kolon ve akciğer kanserini azalttığı belirlenmiş bunun yanı sıra kolesterol ve trigliserid seviyesini de azalttığı gösterilmiştir (Guardia vd., 2001; Etcheverry vd., 2008). Garg vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada hesperidinin kuvvetli antiinflamatuvar ve analjezik etkilere sahip olduğunu saptamıştır. Prostaglandin E2 ve Prostaglandin F2 α 'nın sentezini inhibe ettiğini ve kolon hasarını azalttığını ifade etmişlerdir. Flavonoidler, polifenolik bileşiklerinden ötürü antioksidan özelliklere sahiptir. Hesperidinin elektron transfer ve proton transfer reaksiyonundaki süperoksit radikalini azalttığı tespit edilmiştir. Metal iyonlarının şelatörleri olduğundan, serbest radikal süpürücü özelliklerinden dolayı etkili antioksidanlardır. Hesperidin serbest

oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyondan korunmayı sağlamaktadır (Chen vd., 2003; Labib vd., 2004; Balakrishnan vd., 2007).

Antioksidanların düzeyi düştüğü zaman oksidatif stres gelişir. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminin engellenmesinden sorumlu olan antioksidan savunma sistemleri savunmayı enzimatik ve non enzimatik olarak yapmaktadır. Hücresel savunma mekanizmalarından birisi olan süperoksid dismutaz, süpeoksid anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir (Peng vd., 2000; Kumagai vd., 1994). GSH ise nonenzimatik olarak serbest oksijen türleri ya da hidroperoksidlerin yıkımını sağlayan GSH peroksidaz ögesi olarak antioksidan savunmada rol almakta ve özellikle karaciğerde GSH miktarında azalmalara sebep olmaktadır. Bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivitesi hücre savunmasında önemlidir (Ince vd., 2010). Birçok çalışmada oksidatif strese karşı antioksidan ajanların etkisi araştırılmıştır (Ince vd., 2010; Toker vd., 2008; Toker vd., 2009). Bu araştırmada oksidan özelliğe sahip nitrit maruziyetine karşı hesperidinin oluşabilecek oksidatif strese karşı olası koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Türk Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre, gıda katkı maddeleri: “Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeleri.” şeklinde tanımlanmıştır.

Hayvan türlerinin ilk evcilleştirilmesinden itibaren gıda güvenliği M.Ö. 8000’lerde karşılaşılan bir sorun olmaya başlamıştır. Tuzlama, tütsüleme, kurutma, bal mumu ile sıvama gibi tekniklerle besinlerin uzun süre korunmasını amaçlamışlardır ve günümüze kadar gıda katkı koruma yöntemleri ve gıda katkı maddeleri gelişerek devam etmiştir (Ayper ve Binokay, 2010)

Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları en başta besinlerin raf ömrünü uzatmak, kalite ve karakteristik özelliklerini sağlamak, besleyici değerin korunması için kullanılmaya başlanmıştır. (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017)

Gıda katkı maddeleri genel olarak 4 grupta sınıflandırılmıştır (Ayper ve Binokay, 2010).

2.1.1. Koruyucular

Antimikrobiyaller ve antioksidanlar sayesinde besinlerde istenmeyen kötü koku, tat değişiklikleri, renk kaybı, bakteri, küf ve maya kaynaklı bozulmaları korumak, oksidatif asiditenin meydana getirdiği acımanın önlenmesi veya geciktirilmesi için kullanılan gıda katkı maddeleridir. Sodyum Nitrit gıda katkı maddelerinin antimikrobiyaller kaynaklı koruyucular sınıflandırılmasında E250 kodu ile yer almaktadır. (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017; Ayper ve Binokay, 2010).

2.1.2. Duyusal Özellikleri Geliştiriciler

Asitliği regüle ederek besinin Ph'ını dengeleyenler; baharatlar, şekerler, hazır çorba gibi ürünlerin topaklanmasını önlemek için kullanılanlar; su ve yağın birbirine karışmasını ve homojenliği sağlamak için kullanılan emülsifiyerler, stabilizatörler, kıvam arttırıcılar ve yapay tatlandırıcılar olarak kullanılan alüminyum silkat, lesitin, aspartam, sorbitol gibi gıda katkı maddeleridir (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017; Ayper ve Binokay, 2010).

2.1.3. Aroma ve Renk Geliştiriciler

En çok Monosodyum Glutamat gıda katkı maddesi kullanılarak umami olarak adlandırılan aroma verici ve tat pekiştirici şeklinde kullanılan maddelerdir (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017; Ayper ve Binokay, 2010).

2.1.4. Besin Değeri Koruyucular

B1, B2, A ve D vitaminleri gibi günlük diyetle eksik alınabilecek besin öğelerinin eklenmesidir (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017; Ayper ve Binokay, 2010).

Avrupa Birliğinde kullanımına izin verilen gıda katkı maddelerine “European” kelimesinin ilk harfi “-E” kodu ile başlar. Tüm gıda katkı maddelerinin uygun göülen

uluslararası bir kodu vardır. Renklendiriciler E100 - E180, koruyucular E200 - E285, E330, antioksidanlar E300 - E321 Jelleştirici ve kalınlaştırıcılar E400 - E495, tatlandırıcılar, E950 - E959 şeklinde kodlanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde de bu gıda katkı maddeleri yer almaktadır (Ekerbiçer ve Karatepe, 2017).

2.2. Sodyum Nitrit

Son ürün olan Nitrat, azotun biyokimyasal oksitlenmesi ile oluşmaktadır. Toksik etkiye sahip olmayan Nitrat, bakteriyel enzimlerle toksik bir madde olan Nitrit'e dönüşmektedir. Nitrit, sekonder aminlerle tepkimeye girip Nitrozaminlere dönüşerek mutajen, kanserojen etkiye sebep olmaktadır. Nitrit, özellikle kürlenmiş ete kendine has aroma, renk ve lezzet vermek için aynı zamanda yüksek patojen aktiviteye sahip olan Clostridium Botulinum'un oluşumunu önlemek amacıyla Türk Gıda Kodeksinde belirtilen ölçülerde et ürünlerine katılmaktadır. Vücut içerisindeki Nitrat'ın büyük bir kısmı dışkılama olarak uzaklaştırılmaktadır. Bir kısmı ise Tükürük bezlerine taşınarak ağız boşluğunda salgılanıp buradaki bakteriler tarafından Nitrit'e indirgenerek mideye taşınabilir. Nitrit hem indirgen hem de yükseltgen inorganik bir bileşik olduğu için kompleks reaksiyonlar oluşmaktadır. Özellikle organik maddelere yüksek reaktif tutum sergiler. Çok seyrek olarak gözlemlenen Nitrat akut toksisitesine karşın meydana gelen zehirlenmeler Nitrat'ın Nitrit'e indirgenmesi sonucunda gerçekleşmektedir bu durumda pek çok ölüm bildirilmiştir. Bunun sebebi çoğunlukla Sodyum Nitrit'in yanlışlıkla alımı veya kontrolsüz kullanımına maruz kalan besinlerin tüketimi ile ortaya çıkmaktadır. Nitrit kullanımına izin verilmiş olan ve besinlerin içeriğine girmiş tek toksik maddedir. Mavi Bebek Sendromu adı verilen hastalığın, Nitrit'in hemoglobin ile reaksiyonu sonucu kanın oksijen taşıma işlevini bozan bir hastalığa neden olabilmektedir. Günlük tüketilen besinlerle ortalama olarak alınan Nitrit Hollanda, Almanya ve Norveç'te sırasıyla 0.6, 2.6 ve 1.8 mg'dır (Özdestan vd.,2010; Özdemir vd., 2012; Yılmaz Alhan, 2019; Mamur vd., 2018; Boran, 2016). Yapılan bir çalışmada uygun şartlar sağlanan laboratuvar ortamında Nitrit uygulamasının 30 Clostridium bakterisini etkisiz hale getirdiği gözlemlenmiştir (Cammack vd., 1999). Yapılan bir çalışmada, sodyum nitritin 1,10,100 mg/ml'lik konsantrasyonlarının uygulanmasıyla genotoksik etki yaptığı gösterilmiştir (Özdemir vd., 2012).

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, proteinlere, nükleik asitlere ve hücre zarlarına tahribat verebilecek süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikal ($HO\cdot$) gibi reaktif oksijen ara ürünlerine maruz kalmaktan kaynaklanır. Artan kanıtlar, reaktif oksijen çeşitlerinin sebep olduğu kümülatif hasarın pek çok hastalığa neden olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Yapılan çalışmalar ayrıca, bu oksidanların etkilerinin hipokloröz asidin (HOC) neden olduğu hasarla entegre olarak bağlantılı olduğunu ve reaktif azotun nitrik oksit (NO), peroksinitrit ($HOONO$) ve nitrosotiollerin ($RSNO$) ara ürünleri olduğunu göstermektedir (Storz ve Imlay, 1999).

Oksidatif stres aynı zamanda, vücutta reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi arasında, reaktif ara ürünleri detoksifiye etme yeteneğini bozan veya ROS 'un neden olabileceği organ ve hücresel sistemlere verilen hasarı onaran bir dengesizlik olarak tanımlanabilir. Hücre içi redoks dengesi (hücreler içindeki oksitleyici ve indirgeyici türler arasındaki dinamik denge), antioksidan peptit glutatyon ile yakından ilişkilidir; Bu bileşiğin hücre içi seviyeleri, indirgeyici bir ortamı korumak için enzimler tarafından yüksek oranda düzenlenir. Bu reaktif oksijen türlerinin bazıları, normal metabolik reaksiyonların yan ürünleri olarak sürekli olarak düşük seviyelerde üretilir ve hücre içi redoks dengesini koruyan enzimler tarafından kontrol altında tutulur. Redoks dengesi bozulduğunda, bu orta derecede reaktif türler, hücre zarları lipitlerine, proteinlere, DNA'ya ve hücresel cihazlara büyük zarar verebilecek yüksek oranda reaktif oksijen türleri üretmek için geçiş metalleri veya redoks döngüsünün diğer bileşenleri ile etkileşime girebilir (Sies vd., 2017).

Oksidatif stresin sonuçları arsında olan enflamasyon, canlı sistemlerde ROS 'un iki ucu keskin doğasını örnekleyen bir hastalık durumudur. Kronik enflamatuvar durumlar kanser, ateroskleroz, Alzheimer ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Enflamasyon, etkilenen organların kızarıklığı, şişmesi, ağrısı ve işlev bozukluğu ile karakterize enfeksiyon veya tahrişe karşı bağışıklık aracılı bir yanıttır. Hücresel enflamatuvar yanıt, çeşitli beyaz kan hücrelerinin (lökositler) yaralı veya enfekte dokulara hareketini içerir. Serbest radikallerin ve diğer ROS 'ların inflamatuvar yanıtta rol oynadığı düşünülmektedir. Süperoksit Dismutaz (SOD) veya

katalaz (CAT) gibi spesifik antioksidan enzimler, iskemi / reperfüzyon, artrit, kronik bağırsak iltihabı ve immün kompleks kaynaklı pulmoner hasarın hayvan modellerinde yaralanma ve inflamasyonu azaltır. Bu, ROS'un bu koşullarla ilişkili inflamasyonu ve doku disfonksiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu ROS'un muhtemel kaynakları fagositik lökositlerdir. Fagositlerin aktivasyonu, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi reaktif ve radikal türlerin bir kaskadına yol açar, doğrudan yaralanma veya enfeksiyon bölgesinde hücrelere ve dokulara zarar verir. Ayrıca, çeşitli proinflamatuvar sitokinleri düzenleyerek enflamatuvar yanıtı yükselten NFkB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla dolaylı olarak inflamasyonu başlatabilir veya yükseltebilirler. Bir dizi antioksidan, NFkB aktivasyonunu inhibe edebilir ve bu, oksidanların onu aktive edebileceği gerçeğiyle birleştiğinde, reaktif oksijen türleri için ortak bir sinyal yolu önermektedir. Oksidatif stres ile birlikte kronik, sistemik inflamatuvar durumlar, ateroskleroz, obezite, insülin direnci ve diyabet gibi birçok hastalığın patogenezinde bu süreçleri etkileyen ortak bağ olabilir (Conner vd., 1996; Sies vd., 2017).

Oksidatif stres, hücre içi redoks durumunun indirgeme ortamını koruyan düzenleyici sinyal süreçlerinin bozulmasından kaynaklanır. Bu homeostazın kaybı ve bunun sonucunda redoks dengesindeki pro-oksidatif kayma, yukarıda tartışıldığı gibi birçok hastalığın etiyolojisinde rol oynamıştır. Sonuçta bu hastalık durumları, kronik oksidatif stres durumlarının sonucudur. Doğa, antioksidatif redoks durumlarını korumak için zarif düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir. Bunlar öncelikle, bazıları vücudun redoks düzenleme mekanizmasının bir parçası olan antioksidanları içerirken, diğerleri diyet kaynaklarından türetilir. Hesperidin, oksidatif stresten korunmada önemli etki gösterebilecek bir potansiyele sahip olarak ön plana çıkmaktadır. (Sies vd., 2017).

Aynı zamanda oksidatif strese karşı koymak için, hücreler reaktif oksijen türlerini detoksifiye eden ve bunların neden olduğu hasarı onaran enzimleri yapısal olarak eksprese eder. Ek olarak, bakteriyel, maya ve memeli hücrelerinin hepsi, yüksek oksidatif stres seviyelerine adaptif tepkilere sahiptir, bu da bu hücrelerin artan reaktif oksijen türleri seviyelerini algıladığını ve sinyali savunma faaliyetlerinin artan ekspresyonuna dönüştürdüğünü gösterir (Storz ve Imlayt., 1999).

2.4. Antioksidan

Antioksidanlar, insan vücudunda doğal olarak üretilenler gibi dışarıdan ek besin ile de alınabilirler. Antioksidanlar oksidatif stres oluşturan serbest radikallerin insan vücudunda ki büyük öneme sahip olan silahlarıdır. Serbest radikaller tarafından meydana gelen hücre hasarını engellemekten ve oksidatif stresi kaldırmada etkili olan maddelerin başında antioksidanlar gelir (Kasapçopur ve Birdane, 2014; Karabulut ve Gülay, 2016).

Antioksidanlar, reaksiyonun ara ürünleriyle etkileşime girerek veya oksitleyici ajanla reaksiyona girerek ve reaksiyonu önleyerek oksidasyon reaksiyonlarını doğrudan yavaşlatabilen veya durdurabilen indirgeyici ajanlardır (Sies vd., 2017).

Reaktif oksijen çeşitlerinin ortaya çıkarabileceği hasara önlemler almak, detoksifikasyon sağlamak ve varoluşunu önlemek için insan vücudunda bulunan savunmaya 'Antioksidan savunma sistemleri' veya antioksidanlar denir. Otoksidasyon / peroksidasyonu önüne geçen antioksidanlar serbest radikalleri etkisizleştirerek ve aynı zamanda toksik etkilerine karşı koruyucu dolayısıyla hastalıklara karşı önlemede destek sağlayıcılar olarak sayılabilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Endojen ve eksojen olarak iki grupta incelenen antioksidanlar oksidan/antioksidan dengesini koruyarak serbest radikalleri bertaraf etmede en önemli ajanlardır (Kasapçopur ve Birdane, 2014).

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidan enzimler Vücudun koruyucu antioksidan sistemleri esas olarak redoks aracılı sinyal süreçlerine katılan ve redoks dengesinin korunmasına yardımcı olan enzimlerdir (10). Hücrel antioksidan enzimlerin beş ana ailesi vardır:

- Tioredoksin sistemi tioredoksin ve tioredoksin redüktazdan oluşur. Tiyoredoksin, reaktif oksijen türlerini temizleyen ve diğer proteinleri azaltılmış bir durumda tutan etkili bir indirgeyici ajan olarak işlev görür.

- Glutasyon sistemi glutasyon, glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidazdan oluşur. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksite suya parçalanmasını katalize eder ve lipid peroksitlerini azaltır. Oksitlenmiş glutasyon (glutasyon disülfid) glutasyon redüktaz ile indirgenir.
- Süperoksit Dismutazlar (SOD'ler), süperoksit anyonun oksijene ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden yakından ilişkili enzimlerin bir ailesidir.
- Katalaz, hidrojen peroksite suya ve oksijene dönüşümünü katalize eder, ancak aynı zamanda formaldehit, formik asit ve alkoller gibi toksinleri oksitler. Katalaz, glutasyon peroksit yolu doygunluğa yaklaştığında aktive olur.
- Peroksiredoksinler, peroksitlerin indirgenmesini katalize eder (Valko vd., 2007; Sies vd., 2017).

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksidin, hidrojenperoksid ve moleküler oksijene değişimini katalizleyen enzim süperoksit dismutazdır. SOD iki tip izomer olarak karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri de bulunan tetramik manganez içeren ve sitozolde bulunan dimerik bakır ve çinko içeren izomerlerdir. Oksijenin metabolize olmasını sağlayan hücrelerde süperoksif seviyesinin düşük tutulması ve lipid peroksidasyonunun aktivitesini düşürerek çalışma mekanizmasını sağlamaktadır (Valko vd., 2006).

Süperoksit dismutazları (SOD'ler), prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde yaygın olarak dağılmış metaloenzimlerdir. Süperoksit anyonun hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşümünü katalize eden bir enzim ailesi oluştururlar. Süperoksit anyonun SOD'nin protez grubu ile iki aşamalı kimyasal reaksiyonu, enzimin oksitlenmiş formu (sırasıyla Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Mn^{3+}) ile başlar ve süperoksit anyonu bağlar, bir proton elde eder ve moleküler oksijen salgılar. Enzimin indirgenmiş formu (Fe^{2+} , Cu^{+} ve Mn^{2+}) daha sonra H_2O_2 'yi serbest bırakmak ve oksitlenmiş durumuna geri dönmek için ikinci bir süperoksit anyon ve protonu bağlar. Metal iyon merkezinin daha negatif yüklü hale

gelmesine rağmen, ikinci süperoksit anyonun bağlanması, nötr pH ortamında, aktif alanın toplam yükünün aynı kalmasıyla mümkündür (Johnson ve Giulivi, 2005).

Tüm memeli SOD'leri nükleer kodludur ve başlangıçta inaktif apo-enzimler olarak oluşturulmuştur. Tamamen fonksiyonel mitokondriyal MnSOD (SOD2) için, maya hücreleri, yeni ortaya çıkan polipeptitin katlandığı ve manganez protez grubunu doğru bir şekilde aldığı mitokondriyal membrana hedeflenmesini gerektirir. Önceden katlanmış peptitler veya sitozolde birikmiş olanlar, verimli bir şekilde taşınmaz, katlanamaz ve manganez ile yüklenemez. Manganez kaçakçılık faktörü (MTM1), polipeptitin aktif bir holoenzime dönüştürülmesini sağlayan mitokondriyal matriste kilit oyuncudur. MTM1 mayada inaktive edildiğinde, SOD2 aktivitesi ancak hücreler yüksek dozda manganez ile desteklenirse geri yüklenebilir. Bol miktarda sitozolik SOD1'in küçük bir kısmının mitokondriyal membranlar arası boşlukta (IMS) bulunduğu gösterilmiştir. SOD2'de olduğu gibi, bu az miktarda SOD1 mitokondriye sadece bir apo-enzim olarak girebilir. SOD1 (reaktif oksijen türleri) için bakır bir şaperon, apo-SOD1'i tamamen işlevsel holoenzimine dönüştürür. IMS'nin içine girdikten sonra, CCS (reaktif oksijen türleri) yüksek miktarlarda bulunur, SOD1 ve CCS arasındaki fiziksel bir etkileşim yoluyla meydana gelen enzimin bakır yüklenmesinden sorumludur. Her iki protein de SOD1'in başarılı etkileşimi ve bakır yüklenmesi için gerekli olan homolog bir merkezi protein alanı II içerir. İlginç bir şekilde, CCS'nin kendisi SOD1'de bulunan hemen hemen her metal bağlama ligandımına sahiptir, ancak ROS-süpürme aktivitesini göstermez (Luk vd., 2005; Johnson ve Giulivi, 2005; Field vd., 2003).

2.4.1.2. Glutatyon

Ökaryot hücrelin çoğunluğunda sentezlenen glutatyon yüksek yoğunlukta bulunmaktadır. Antioksidan olan glutatyon hareket sağlayarak hücrenin redoks dengesini sağlamada, detoksifikasyon düzeninin çalışmasında, eikosonoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal kanallarında düzen sağlamada, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan şekilde çalışır. Glutatyonun yaklaşık olarak %85-90'ı sitoplazmada bulunur. Ancak bazı zamanlarda GSH stoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda da yer alabilir. Glutatyon, GPx'in katalitik yardımıyla lipid peroksitleri ve H₂O₂'yi detoksifiye eder ya

da singlet oksijen ($1O_2$) ve OH'yi temizler. Bununla birlikte GSH plazma membranından aminoasit transportunu destekleyerek bazı önemli antioksidanları tekrar oluşturur. E ve C vitaminleri de GSH tarafından dengelenir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Tiol tripeptit, glutatyon (GSH; γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin), çoğu organizmada bulunur. γ -karboksil glutamat grubunun sistein amino grubuna bağlanması, bu bağ proteinlerdeki peptit bağlarından ayırır. Bunun moleküle stabilite kazandırdığı düşünülmektedir, çünkü spesifik amino asit transferazları yoluyla bozunmaya izin verir. Halobakteriler gibi bazı organizmalarda, glutatyon tiyosülfat gibi diğer kükürt bileşikleriyle değiştirilebilir. Bitkilerde, glutatyon tipik olarak hücrelerde milimolar konsantrasyonlara birikir ve doku içeriği serbest sisteinin 10 ila 50 kat artar. Bazı bitki taksonlarında, GSH'nin yanı sıra homolog glutatyon formları da bulunur. Glisin yerine, bu bileşikler serin, β -alanin veya glutamat gibi diğer C-terminal amino asitleri içerir. GSH ile birlikte homoglutatyonun (γ Glu-Cys- β -Ala) bulunabildiği baklagillerde, iki homolog farklı genler tarafından kodlanan farklı enzimler tarafından sentezlenir. Buğday gibi tahıllarda bulunan hidroksimetil GSH'ye (γ -Glu-Cys-Ser) giden yol daha az açıktır. Saflaştırılmış bir buğday glutatyon sentetazı (GSH-S), L-serin veya D-serine karşı hiçbir aktivite göstermedi, ancak diğer bazı L ve D-amino asitlere ve glisine karşı düşük aktivite bildirildi. HidroksimetilGSH, karboksipeptidaz Y gibi transpeptidaz aktivitesine sahip enzimler tarafından katalize edilen GSH'nin modifikasyonlarından kaynaklanabilir. Homoglutatyon ve γ -Glu-Cys-Ser'in disülfid formları glutatyon redüktaz. Bildiğimiz kadarıyla, Arabidopsis'te önemli miktarda GSH homologu bildirilmemiştir, ancak saflaştırılmış GSH-S'nin analizi, yeni homologların bazı türlerde keşfedilmeyi bekleyebileceğini düşündürmektedir (Noctor vd., 2011; Skipsey vd., 2005a).

GSH'yi yüksek oranlarda oksitleyebilen ompoundlar, süperoksit veya hidroksil radikali gibi ROS'ları içerir. Bu nedenle, nispeten yüksek hücresel konsantrasyonu nedeniyle, glutatyon bir çöpçü veya kurban nükleofil görevi görür. Bu nedenle, glutatyon, hassas hücresel bileşenlerin aşırı oksidasyonunu önleyen oldukça azaltıcı bir kimyasal bariyerdir. Birçok birincil ve ikincil metabolit, kurban antioksidanları olarak benzer şekilde hareket edebilir. Bununla birlikte, glutatyonun aksine, bu bileşiklerin oksitlenmiş formları ya kararlı değildir ve / veya yüksek oranlarda indirgenmiş forma

geri dönüştürülmez. Buna karşılık, glutatyon, GSSG ve özellikle NADPH için yüksek afiniteye sahip sitozol, plastitler, mitokondri ve peroksizomlarda bulunan spesifik GR'ler tarafından ağırlıklı olarak indirgenmiş bir durumda tutulur (Noctor vd., 2011; Kataya ve Reumann, 2010).

2.5. Hesperidin

Portakal, mandalina, limon ve limon gibi narenciye meyveleri, sağlığı teşvik edici ve kemopreventif özellikleri ile iyi bilinir. Umut verici anti-kanser potansiyelini ortaya çıkaran en önemli biyoaktif bileşenlerden biri, hesperetin 7-rutinosid olarak da bilinen flavonoid hesperidin (Hesp) 'dir. Hesp ilk olarak 1828'de portakal kabuklarından izole edildi ve daha önce yanlışlıkla "P vitamini" olarak adlandırılan iki bileşikten biriydi (Berreca vd., 2017; Aggarwal vd., 2020).

Bu polifenolik glikozit, çeşitli narenciye meyvelerinde bol miktarda bulunabilir. Örneğin, tatlı portakallar yaklaşık 200-600 mg / l Hesp içerirken, bu molekülün toplam miktarı klementinlerde (Cezayir'de yetişen bir narenciye) 50-850mg / l, mandalinalarda 8.1-460 mg / l, limon ve limon suyunda 38-410mg / l ve greyluft suyunda 20-170 mg / l arasında değişmektedir. Narenciyedeki hesperidin'in içeriği türlere, meyvenin kendisinin bir kısmına, coğrafi ekim alanlarına ve işleme prosedürlerine göre büyük farklılıklar gösterir. Örneğin, taze Satsuma posasındaki hesperidin içeriği kilogram başına 73 mg ve taze kabukta kilogram başına 157 mg'dır. Genel olarak, narenciye kabuğunda hesperidin içeriği, narenciye meyvelerinin diğer kısımlarına göre daha yüksektir. Ancak limon tohumları, metanol ekstraksiyonu ile soyulmasından daha fazla hesperidin içerir. Elle sıkılmış Florida portakal suyu, çöp başına 335-351 mg hesperidin içerirken, İsrail Ortanique narenciye suyu çöp başına 273-287 mg içerir. Pigmentli narenciye suyu, pigmente olmayan narenciyeden daha fazla hesperidin içerir. Olgunlaşmamış narenciyelerin, olgunlaşmış narenciyeden daha fazla hesperidin içermesi muhtemeldir. Isı ile pastörizasyon, en az 12 güne kadar 4 ° C'de saklanan narenciye suyundaki hesperidin içeriğini azaltmamıştır. Bunun yerine, narenciye suyunun pastörizasyonundan sonra hesperidin içeriği 90 ° C'de 20 saniye boyunca artar. Hesperidin içeriği, tek mukavemetli meyve suyunda çöp başına 555 ila 761 mg ve konsantre meyve suyunda çöp başına 470 ila 614 mg arasında değişmektedir,

bu da işleme prosedürünün narenciye suyundaki hesperidin içeriğini etkilediğini düşündürmektedir. Narenciyeye ek olarak, nane (*Mentha x piperita* L.) ayrıca UVB ışınlamasını takiben içeriği artan hesperidin içerir. Kırmızı yenilebilir bir deniz yosunu olan *Porphyra dentata*'nın metanol özü,% 5 hesperidin içerir (Man vd., 2019; Aggarwal vd., 2020).

Diyet flavonoidlerinin biyoyararlanımının sınırlı olduğu bilinmesine rağmen, Hesp'in düşük mikromolar seviyeleri (yaklaşık 1 mM aralığı), narenciye suyu alımından sonra 5-7 saat boyunca kan serumunda tespit edilmiştir, muhtemelen insan vücudunda sağlıklı teşvik edici faaliyetlerini yerine getirecek kadar yüksektir (Aggarwal vd., 2020).

Hesperidin (3,5,7 trihidroksiflavanon 7-rhamnoglucoside, $C_{28}H_{34}O_{15}$) ayrıca 610.57 molekül ağırlığı ile hesperetin 7-rutinosid veya 7-O-glikozit hesperitin olarak da adlandırılır. Hesperidin'in erime ve kaynama noktaları sırasıyla 250-255 ° C ve 576.16 ° C'dir. -20°C'de depolandığında en az 2 yıl stabildir. Hesperidin tek başına sulu çözelti içinde zar zor çözünmesine rağmen, hem propilen glikol hem de poli (etilen glikol) -400 içinde iyi çözünür. Hesperidin'in kitooligosakkarit ile reaksiyonu, hesperidin-chitooligosakkarid kompleksi verir, bu da onu suda çözünür hale getirir ve ayrıca sadece hesperidin'e göre üstün antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca, hesperidin ve theaflavin-3 3'-digallate gibi diğer flavonoidlerin karışımı, hesperidin'in% 10 dimetil sülfoksit içindeki çözünürlüğünü artırabilir. Ek olarak, alfa glukozil hesperidin de suda çözünür ve bu nedenle hem topikal hem de sistemik preparatlarda yaygın olarak kullanılır (Man vd., 2019).

Kimyasal perspektifte, hesperidin yapısı, rutinoza bağlı metil eriodictyol (hesperetin) olarak bilinen bir aglison barındırır. Hesp, iki izomerik formda, yani neohesperidoz ve rutinozda bulunan bir disakkarit (glikoz ve ramnoz) olan bir glikozit moiety içerir. Moiety organik kimyada, bir kısım, diğer moleküllerin bir parçası olarak tanımlandığı için bir isim verilen bir molekülün parçasıdır. Neohesperidoz, kimyasal olarak 2-O-alfal-Rhamnopyranosyl-d-glucopyranose olarak bilinir. Narenciye meyvelerinde hesperetin 7-O-neohesperidosid formunda bulunduğu bildirilmektedir. Öte yandan, genellikle bitkisel kaynaklardan elde edilen bir disakkarit, kimyasal olarak 6-O-(-l-Rhamnosil)-d-glukoz veya 6-O-(-l-Rhamnopyrano sil)-d-glukopiranozdur. Bu disakkarit

moieties narenciye biyoflavonoidlerinin acılığından sorumludur. Disakkaritlerden, narenciye meyvelerinin tadı, rutinosid moiety'nin varlığı nedeniyle tatsızdır, neohesperidosides moiety ise acı tattan sorumludur. Hesp yaygın olarak greyfurt (acı) şeklinde neohesperidositlerde ve portakal (acı olmayan) şeklinde rutinositte bulunur. Kimyasal Hesp iskeletinde, hesperetin (aglikon yapısı) glikoza bağlanır ve ramnoz bu yapıya glikoz moiety yoluyla daha fazla bağlanır. Hesperetin'de, bir biyoflavonoid, aglikon yapısı (S)-2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifif enil)-4H-1-benzopiran-4-1. Hesperidin, Asit hidrolizi sırasında hesperetin, l-ramnoz ve d-glukoza dönüştürülen hesperetenik asit ve phloroglucinol.12,16 Hesp'in biyolojik aktivitesi, hem heterosiklik hem de aromatik halkalarda hidroksil moieties varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hesperidin'in potansiyel antioksidan kapasitesi ile hidroksil moieties varlığı ve sayısı arasında yakın bir ilişki vardır. Ek olarak, Hesperidin ayrıca nöro-koruyucu etkiler barındırır ve kan-beyin bariyerine nüfuz etme yeteneğine sahiptir (Garg vd., 2001; Mitsunaga vd., 2000; Aggarwal vd., 2020).

2.5.1. Hesperidin ile Yapılan Çalışmalar

Bir antiepileptik ilaç olan valproik asidin hesperidin ile kombine kullanımının hem beyin hem de karaciğer dokusu örneklerinde oksidan-antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanarak yapılan bir çalışmada, toplam 48, 3 aylık ve 200-250 gram erkek Wistar-Albino sıçanları 6 gruba ayrıldı. Grup 1 Kontrol idi. Grup 2: pentilenetetrazol (60 mg / kg intraperitoneal), Grup 3: hesperidin (100 mg / kg oral), Grup 4: pentilenetetrazol + hesperidin, Grup 5: pentilenetetrazol + valproik asit (400 mg / kg ip), Grup 6: pentilenetetrazol + valproik asit + hesperidin. Sonuçlar SPSS yazılımı kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuş ve $p \leq 0.05$ anlamlı değer olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplara 1-7-14-28 günde kimyasal ajanlar verildi. Deney sonunda elde edilen beyin ve karaciğer dokusu homojenatlarında glutatyon, malondialdehit düzeyleri ve süperoksit dismutaz aktivitesi belirlendi. Sonuçlar, glutatyon düzeyleri ve süperoksit dismutaz aktivitesi azalırken, pentilenetetrazol grubunda malondialdehit düzeylerinin anlamlı olarak arttığını göstermiştir. Valproik asit ve hesperidin kombinasyonunda, pentilenetetrazol tarafından üretilen epilepsi modelinde beyin ve karaciğer glutatyon seviyeleri önemli ölçüde artmış ve malondialdehit seviyeleri azaldı. Ayrıca hesperidin tek başına veya valproik asit ile

birlikte verildiğinde pentilenetetrazol ve pentilenetetrazol + valproik asit gruplarına kıyasla beyin dokusu örneklerinde süperoksit dismutaz aktivitesini anlamlı derecede arttırdığı gözlemlendi. Karaciğer dokusunda hesperidin, süperoksit dismutaz aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdı ve süperoksit dismutaz aktivitesi beyin ve karaciğer örneklerinde hem pentilenetetrazol grubuna hem de hesperidin grubuna göre anlamlı olarak arttı. Sonuçlarımız, hesperidin antiepileptik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığında antioksidan aktiviteyi artırabileceğini gösterdi (Serdaroğlu Kaşıkçı vd., 2019).

Dekabromodifenil eter (BDE-209) ve Sodyum nitrit (SN), et ve balık gıdalarının işlenmesinde bir arada bulunur, ancak bunları birlikte ele alan bir araştırmada, ikili karışımın BDE-209 ve SN toksisitesini araştırmak ve hesperidin (Hsp) kombine toksite üzerindeki koruyucu etkisini araştırmak amaçlandı. Sonuçlar, tek başına BDE-209 veya SN'nin etkisiyle karşılaştırıldığında, ikili karışımın, oksidatif stres, Ca²⁺ + birikimi, mitokondriyal disfonksiyon eşliğinde HepG2 hücrelerinin yaşayabilirliğini bozmada sinerjik bir toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. γ -H2AX floresan odaklarının ve mikronüklei sayısının artması da genotoksitesini göstermiştir. Hsp'nin ön muamelesi, ikili kombinasyonun neden olduğu yukarıdaki hasarı önemli ölçüde hafifletebilir. Bu bulgular, BDE-209 ve SN'nin toksikolojik etkileşimini ortaya koydu ve hesperidin gibi bol miktarda doğal flavonoid içeren gıdaların bu toksikolojik riski azaltabileceğini vurguladı (Che vd., 2021).

Sıçanlarda çekal ligasyon ve delme (CLP) ile tetiklenen akciğer ve böbrek hasarlarına karşı hesperidin (Hes) potansiyel yararlarını inceleyen bir çalışmada, Toplam oksidan durum (TOS), malondialdehit (MDA) ve oksidatif stres indeksi (OSI) düzeyleri, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi anlamlı olarak artarken, süperoksit dismutaz (SOD) ve toplam antioksidan durum (TAS) değerleri CLP grubunda akciğer ve böbrek dokularındaki sahte gruba göre azalmıştır. Aksine, SOD ve TAS düzeyleri artarken, Hes tedavileri nedeniyle MPO aktivitesi, TOS, OSI ve MDA düzeyleri azalmıştır. Kaspaz-3 ve LC3B immün pozitifliği CLP grubunda akciğer ve böbrek dokularında sahte gruba göre anlamlı olarak artarken, Hes tedavi gruplarında azalma gözlenmiştir (Erdoğan vd., Akdeniz Tıp Dergisi, 8(1), 1-8).

Peroral hesperidinin iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu karaciğer dokusunda oksidatif stresi azaltmadaki koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 yetişkin erkek sıçan rastgele dört gruba ayrıldı. Grup kontrolüne sadece fizyolojik salin, Grup HES'e 15 gün boyunca 50 mg/kg vücut ağırlığında (BW) hesperidin, Grup RAD'a sadece ışınlama ve Grup HES+RAD günde 50 mg/kg BW'de hesperidin verildi ve daha sonra ışınladı. 15 hesperidinin gününün sonunda, RAD ve HES + RAD Gruplarındaki hayvanlar abdominopelvik bölgeye 10 Gy'lik bir doza maruz bırakıldı. Total antioksidan durum (TAS) ve malondialdehit (MDA) tayininde karaciğer ve kan örnekleri kullanıldı ve histopatolojik inceleme yapıldı. Grup RAD ile karşılaştırıldığında Grup HES+RAD'de plazma ve doku MAD düzeyi anlamlı olarak azaldı ($p=0.002$). TAS'ın hem plazma hem de doku düzeyleri HES+RAD grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.002, p=0.004$). Grup RAD'ın histolojik incelemesi, portal ödem, belirgin intrasitoplazmik vakuolizasyon, hepatositlerde şişlik, nekroz, belirgin sinüzoidal ve santral ven dilatasyonu ve tıkanıklığı gözlemlendi. Grup HES+RAD periportal ödemde, santral ven dilatasyonu ve tıkanıklığı Grup RAD ile karşılaştırıldığında histolojik olarak belirgin değildi. Sonuç olarak radyoterapinin lipid peroksidasyonunda artışa ve anti-oksidan kapasitesinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur; Sıçanlarda karaciğer hasarının ve oksidatif stresin histolojik değişikliklerini azaltmak için art arda 15 gün boyunca 50 mg / kg / gün hesperidin uygulamasının etkili olduğu görülmüştür (Aydın vd., 2019).

Bu araştırmada, oksidan özellik gösteren nitrit maruziyetine karşı antioksidan etkinliği bilinen hesperidinin etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan Hesperidin (Abdelaziz vd., 2020; Turk vd., 2019) ve Sodyum nitrit (Hakkı Cigerci vd., 2009) verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak belirlendi. Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi Erkek ratlar her grupta 7’şer adet olacak şekilde; I. Grup: negatif kontrol, II. Grup: 60 mg/kg dozunda tek sefer subkutan olarak sodyum nitrit (NaNO_2) verildi, III., IV. ve V. gruplara 60 mg/kg dozunda tek sefer subkutan enjeksiyon sodyum nitrit (NaNO_2) verilmesine ilave olarak 50; 100 ve 200 mg/kg dozlarda hesperidin gastrik gavaj yoluyla 15 gün boyunca her gün uygulandı. Son uygulamalardan 24 saat sonrasında deney hayvanlarından ketamin ve ksilazin anestezisi altında intrakardiyak olarak kan ve ayrıca karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokuları alındı, hızlı bir şekilde laboratuvarında ön işlemleri gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1: Deney ve kontrol grupları

Deney ve Kontrol Grupları	Grup Başına Hayvan Adet
Grup I- Kontrol	7
Grup II-Sodyum Nitrit (60 mg/kg)	7
Grup III- Sodyum Nitrit (60 mg/kg) + Hesperidin (50 mg/kg)	7
Grup IV- Sodyum Nitrit (60 mg/kg) + Hesperidin (100 mg/kg)	7
Grup V- Sodyum Nitrit (60 mg/kg) + Hesperidin (200 mg/kg)	7

3.1. Anestezi ve Sakrifikasyon Aşaması

Ratlara son uygulamalardan 24 saat sonrasında deney hayvanlarından ketamin ve ksilazin anestezisi altında intrakardiyak olarak kan ile birlikte karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokuları alınacak, hızlı bir şekilde laboratuvarında ön işlemleri gerçekleştirildi. Göğüs kafesi açılan ratlara anestezi sonrası EDTA’lı enjektörle 3-5 cc kan alma işlemi yapıldı. Ardından zaman kaybetmeden servikal dislokasyon yapıldı ve böylelikle sakrifikasyon işlemi de tamamlandı. 10 dakikada 3000 devir/dk’da santrifüj

edilen kan numune plazmaları ayrıldı, 1,5'lik ependorf tüplere ayrılan plazmalar -80 °C 'de analizleri tamamlanıncaya kadar muhafaza edildi. Ratların sakrifiye işleminden sonra önceden açılmış olan göğüs kafesinin yanındaki karın bölgesi de cerrahi metotlarla açıldı ve ratların karaciğerleri alındı. Dokulardan histopatolojik analizler içinde dahil olmak üzere parçalar alınarak biyokimyasal ve moleküler incelemeler için -80 °C de saklandı.

3.2. Doku Homojenizasyonu

Winterbourn ve ark. (1975) tarafından geliştirilen method Eritrositlerin hazırlanmasında kullanıldı. Bu amaçla eritrositler, kan örneklerinin santrifüjlenmesi (3500 rpm, 15 dakika, 4 °C) sonrasında 3 kez eş yoğunluktaki tuzlu su tampon solüsyonu (pH 7.4) ile yıkanarak erişildi. Ardından eritrositler eşit hacimde eş yoğunluktaki salin tampon çözeltisi ile Eppendorf tüplerine iletildi ve -20 °C'de flakonlarda saklandı. Analiz için, iyonların uzaklaştırıldığı soğuk su kullanılarak eritrosit süspansiyonunun ölçümü hazır hale getirildi. İnce vd. (2014)'ne göre doku örneklerinin hazırlanması gerçekleştirildi. Özetle sakrifiye edilen hayvanlar beyin, böbrek, akciğer, karaciğer, kalp ve testis dokuları alındıktan sonra soğuk eş yoğunlukta tuzlu su tamponu kullanılarak yıkandı. Dış dokudan arındırılan doku numuneleri soğutulmuş Tris-HCl tamponu (0.15 M, pH 7.4) içinde yıkandı ve örenklerin homojenatları (%10, w/v) hazır hale getirildi. Sonrasında 3500 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilen homojenize dokular analize kadar -20 °C'de muhafaza edildi. CAT, SOD, GSH ve MDA değerleri ve lipid peroksidasyon antioksidan parametrelerinin analizi için dokuların homojenatları ve alyuvarlar değerlendirildi.

3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Hücrelerin oksidatif strese karşı savunmasında CAT ile SOD etkili olur (Guerin vd., 2001). Sun vd. (1988) aracılığıyla ifade edildiği üzere eritrosit lizatı ve doku homojenatındaki SOD aktivitesi yapıldı. Bu metotun ilkesi, ksantin oksidaz ve ksantin arasındaki reaksiyon ile süper oksit akışı oluşturarak nitroblue tetrazolyumu (NBT) mavi formazon'a indirgeyen temel bir süperoksit belirtecinden gelmektedir. SOD aktivitesi, eritrositte U/gHb ve dokuda g protein başına U şeklinde gösterildi ve 560 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Sırasıyla Aebi (1974) ve Luck (1963)

aracılığıyla anlatılan metotlara göre doku homojenatı ve eritrosit lizatında CAT aktivitesi belirlendi, Bu metotlar, H_2O_2 'nin katalaz yoluyla su ve oksijene ayrışan H_2O_2 ile işlenir. 240 nm'de oda sıcaklığında 45 saniye indirgenme hızı hesaplandı. 240 nm'de ultraviyole spektrumda maksimum soğurmasını H_2O_2 gerçekleştirir. Eritrositte k/gHb ve dokuda k/ μ g protein (k; nmol/dk) olarak ifade edildi. Sırasıyla Lowry vd. (1951) ve Drabkin ve Austin (1935) aracılığıyla dokulardaki protein ve eritrositlerdeki hemoglobin içeriği sırasıyla spektrofotometrik olarak tespit edildi.

3.4. Malondialdehit (MDA) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Lipid peroksidasyonunun (LPO) güvenilir bir biyolojik göstergesi olarak Malondialdehit (MDA) seviyesi değerlendirildi. Tam kan örnekleri ve doku homojenatlarında MDA Draper ve Hardley (1990) ve Ohkawa vd (1979) aracılığıyla tayin edildi. Ve bu metotlar, tiyobarbitürik asit ve MDA reaksiyonunun erişilen rengini trofotometrik olarak ölçer. MDA derişimi, tiyobarbitürik asit-MDA karışımının (kanda nmol/ml ve dokuda nmol/g) absorbans katsayısı ile ve 532 nm bir çift ışınli UV-Görünür spektrofotometre (Shimadzu 1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak tayin edildi.

GSH, reaktif oksijen çeşitlerine karşı enzimatik olmayan bir koruma sisteminin baş üyesidir ve harcanması oksidatif stres aracılığıyla indüklenebilir (Guerin vd., 2001). Beutler vd., (1963) aracılığıyla ifade edildiği gibi doku ve kan örneklerindeki GSH konsantrasyonu tayin edildi. Özetle, örnek (0,2 ml) ve damıtılmış su (1,8 ml) birlikte karıştırılır, ardından örneğe 3 ml çökeltme çözeltisi (1,67 g HPO_3 , 30 g NaCl, 0,2 g EDTA, 100 ml distile suda) ilave edildi. Bu bileşim, ortalama 5 dakika bekletilip süzöldü (Whatman No. 42). Ardından süzöntü (2 mi) farklı tüpte 0.3 M Na_2HPO_4 (8 mi) ve 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (1 mi) ile birleştirildi. 412 nm'de Optik yoğunluğun spektrofotometrik olarak (Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometre, Tokyo, Japonya) tayin edildi. Sonuçlar ıslak doku nmol/ml kan ve nmol/g olarak belirlendi.

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Beyin, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer ve kalp dokuları disseke ratlardan alındı ve formaldehitin %10'luk çözeltisi içinde bekletildi. Ardından kesitleri alının dokular

histolojik doku takip usullerine doğrultusunda incelendi ardından parafin bloklara gömüldü. Parafin kesitleri 5-6 µm kalınlığında kesildikten sonra hematoksilin-eozin boyaması yapıldı. Eclipse Ci ve Nikon mikroskobunda incelendi. Histolojik doku takip yöntemi aşağıda özetlenmiştir.

3.5.1. Doku Takibi

Histopatolojik ölçümlemlerin yapılması için % 10'luk tamponlu formalin çözeltisinde böbrek, kalp, karaciğer, beyin, testis ve akciğerlerden alınan doku numuneleri değerlendirildi. Sonrasında doku numuneleri 2-3 mm kalınlığında ve doğru boyutlarda küçültülerek doku takip kasetlerine alındı. Akan şebeke suyu altındada yarım gün yıkandıktan sonra 50, 70, 80, 96'lık ve 1 ve ksilol, absolüt alkol, ksilollü parafin takiben 58°C'de erimiş parafinde 2'şer saat bekletildi ve tekrardan parafinle bloklandı. Mikrotom (Leica, RM 2245) ile parafin blokları 5 mikron kalınlığında kesilerek alınan numuneler su banyosu (Leica, HI 1210) üstünden lamellere alındı. On dakika süreyle etüvde kurutulmasının ardından histopatolojik metotlarda analiz verisi elde etmek için değerlendirildi. hematoksilin-eosin boyama yöntemi (HE) ile tüm kesitler 50, 70, 80 ve 96'lık alkol serileri ile ksilolden geçirilerek makul şekilde boyandı (Luna, 1968). Boyamaları yapılan numuneler, binokuler başlıklı ışık mikroskobunda (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japan) analiz edildi lüzümlü numunelerden mikroskobik fotoğraflar çekildi (Nikon DS Fİ3, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan).

3.6. Moleküler Analizler

Alınan numunelerde doku hasarı ile ilişkili olan yangısal genlerin (IFN- γ , TNF- α ve NFkB) ekspresyon düzeyleri incelendi. RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi aşamalar boyunca takip edildi. Ratlardan alınan karaciğer ve böbrek doku numuneleri RNAlater çözeltisine (Thermo Fisher Scientific, USA) alındı ve daha sonra -80°C'de işleme kadar muhafaza edildi. GeneJet RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak RNA ayrıştırması uygulandı. Karaciğer ve böbrek dokularından ayrıştırılan RNA'ların kalitesi ve miktarı MultiskanTM FC Mikroplate Fotometre (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek, gruplara ve dokulara ayrıştırılarak RNA miktarları cDNA eldesinde toplamda 1µg RNA olması biçimde hesaplanarak değerlendirildi. Elde edilen RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak için 1 µg kalıp RNA, 1

µl 10X Reaksiyon çözeltisi, 1 µl RNaz içermeyen DNaz I (Thermo Fisher Scientific, USA) eklenip ve DEPC (dietil pirokarbonat) miktarıyla toplam 10 µl'ye tamamlanarak 30 dk 37°C-10 dk 65°C'de inkübasyon yapıldı. cDNA, DNaz I uygulaması yapılan RNA'dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) desteğiyle elde edildi. Deneyde kullanılan primerler NCBI web sitesinden *Rattus norvegicus*'a özgü β-aktin, NFκB, TNF-α, ve IFN- γ genlerine ait mRNA dizileri kullanılarak ve FastPCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar programıyla primer tasarımı yapıldı. Primer dizileri ve gen bankası numaraları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Deney grupları arasındaki gen ekspresyon seviyelerindeki ayrımları tespit etmek maksatıyla real-time PCR ve gene özgü primerlerden faydalanıldı. Housekeeping gen (β-Aktin) ekspresyonu, karaciğer dokularındaki numuneler Bio RAD real-time PCR cihazında analiz edildi. Ardından Real-time PCR sonuçlarının analizi Bio RAD CFX Manager 3.1 programı değerlendirilerek yapıldı. PCR karışımı, 1 µl revers primer (10 pmol), 1µl forward primer (10 pmol), 10 µl SybrGreen karışımı (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX çözeltisi, (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 µl cDNA ve 7 µl su ilave edilerek, miktarı 20 µl olarak belirlendi. Üç adımlı amplifikasyon sürecinde sırasıyla; primer yapışması, denatürasyon ve zincir uzatma olarak değerlendirildi. Sonrasında erişilen amplifikasyon eğrilerine ait olan döngü eşiği (Ct) parametrelerinden yola çıkarak, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Sonuç her gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde işleme alınarak mRNA ekspresyon düzeyi üzerine ilave edilecek bir biçimde artış ya da azalma olarak tespit edildi. Endojen kontrol geni β-aktin olarak belirlendi ve diğer genlerin ekspresyon düzeyleri her numunenin β-aktin düzeyine göre normalizasyon yapıldı.

Çizelge 3.2: Yangısal genlerin ekspresyon düzeyleri

Gen		Oligonükleotit Dizisi	Gen Bankası No
β -Aktin	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACA	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	
NF κ B	F	TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC	NM_199267.2
	R	GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC	
TNF- α (Takahashi vd., 2018)	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	NM_012675.3
	R	GGATGAACACGCCAGTCGCC	
IFN- γ	F	AAGACAACCAGGCCATCAGC	NM_138880.3
	R	TTCACCTCGAACTTGGCGATG	

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1 MDA Düzeyleri

Sadece sodyum nitrat uygulanan grupların kan ve doku örneklerinde MDA düzeyleri hesperidin verilen gruplara göre anlamlı seviyede artışa neden oldu. Farklı dozlarda hesperidin uyguaması MDA düzeylerinin sodyum nitrit grubuna kıyasla anlamlı derecede kontrole yaklaştırdığı belirlendi.

Kan ve doku örneklerine ait MDA seviyeleri Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1: MDA düzeyleri

MDA	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	31,55±6,48c	8,2±2,58d	11,91±1,55c	4,4±1,65d	2,93±0,49c	5,52±2c	1,97±0,51d
Sodyum nitrit	49,61±10,53a	21,99±3,51a	22,08±4,31a	8,86±1,23a	5,28±0,89a	16,4±5,61a	5,25±1,15a
Sodyum nitrit+ Hes 50 mg/kg	43,36±6,09bc	18,22±6,27ab	18,8±4,31ab	6,79±1,09b	4,16±1,45b	13,97±3,04b	3,78±1,13b
Sodyum nitrit+ Hes 100 mg/kg	42,11±10,52ab	14,17±3,5bc	15,1±3,94bc	6,19±1,2bc	3,12±0,65c	9,25±3,05c	3,16±0,86bc
Sodyum nitrit+ Hes 200 mg/kg	36,35±7,51ab	11,77±4,2cd	12,14±1,53c	5,27±0,75cd	2,96±0,55c	7,58±2,21c	2,38±0,53cd

4.1.2. GSH Düzeyleri

Hesperidin uygulanan grupların kan ve doku örneklerinde GSH değerlerinin pozitif kontrol grubunun değerlerine kıyasla yükseldiği gözlemlendi. Bununla birlikte, sadece sodyum nitrit uygulanan grubun GSH seviyesi negatif kontrol ve hesperidin uygulanan gruplara kıyasla azaldığı belirlendi. Kan ve doku örneklerindeki GSH düzeylerinin değişimi Çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2: GSH düzeyleri

GSH	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	91,51±7,22a	42,14±12,31a	37,51±8,87a	16,14±1,55a	18,72±6,61a	11,75±1,66a	5,64±2,05a
Sodyum nitrit	49,63±15,93c	25,2±4,06c	18,77±2,2d	9,85±3,08b	10,87±0,83b	6,79±2,42c	1,67±0,53c
Sodyum nitrit+ Hes 50 mg/kg	58,47±16,81bc	28,09±7,46c	21,84±3,23cd	10,51±2,18b	12,17±2,37b	7,06±2,53c	3,32±0,86b
Sodyum nitrit+ Hes 100 mg/kg	67,8±23,95bc	32,25±6,74bc	27,03±4,12bc	14,38±1,57a	13,23±3,05b	8,99±2,41bc	3,5±0,9b
Sodyum nitrit+ Hes 200 mg/kg	76,58±12,3ab	37,55±6,16ab	28,47±2,78b	15,23±2,98a	15,58±4,48ab	9,64±0,9ab	5,42±1,36a

4.1.3. SOD Aktivite Düzeyleri

Sodyum nitrit uygulaması eritrosit ve diğer dokularda SOD enzim aktivitesinin negatif kontrol ve hesperidin gruplarına kıyasla azalmasına neden oldu. Bununla birlikte, farklı dozlarda hesperidin uygulaması SOD aktivitesinde pozitif kontrole göre artışlar saptandı. Eritrosit ve diğer dokulardaki SOD düzeylerinin değişimi Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3: SOD Aktivite düzeyleri

SOD	Eritrosit (U/gHb)	Böbrek (U/ μ g protein)	Karaciğer (U/ μ g protein)	Kalp (U/ μ g protein)	Beyin (U/ μ g protein)	Akciğer (U/ μ g protein)	Testis (U/ μ g protein)
Kontrol	321,9 $\pm$ 129,24a	20,2 $\pm$ 4,99a	22,56 $\pm$ 6,72a	7,57 $\pm$ 3,03a	6,99 $\pm$ 2,4a	8,04 $\pm$ 3,04a	4,45 $\pm$ 1,27a
Sodyum nitrit	92,69 $\pm$ 20,51d	10,31 $\pm$ 3,76c	7,42 $\pm$ 2,85c	2,98 $\pm$ 0,93c	3,28 $\pm$ 1,22b	4,86 $\pm$ 1,19b	2,25 $\pm$ 0,88c
Sodyum nitrit+ Hes 50 mg/kg	173,47 $\pm$ 22,02cd	12,25 $\pm$ 2,8bc	9,7 $\pm$ 3,15c	3,8 $\pm$ 1,3bc	4,4 $\pm$ 1,86b	5,6 $\pm$ 0,78b	2,67 $\pm$ 0,71bc
Sodyum nitrit+ Hes 100 mg/kg	209,61 $\pm$ 58,6bc	14,27 $\pm$ 3,39bc	10,87 $\pm$ 4,48bc	4,37 $\pm$ 1,59bc	4,48 $\pm$ 1,25b	6,72 $\pm$ 1,64ab	2,9 $\pm$ 1,08bc
Sodyum nitrit+ Hes 200 mg/kg	278,46 $\pm$ 110,64ab	16,43 $\pm$ 4,18ab	15,67 $\pm$ 5,16b	5,18 $\pm$ 1,65b	5,39 $\pm$ 2,02ab	6,95 $\pm$ 1,8ab	3,57 $\pm$ 0,64ab

4.1.4. CAT Aktivite Düzeyleri

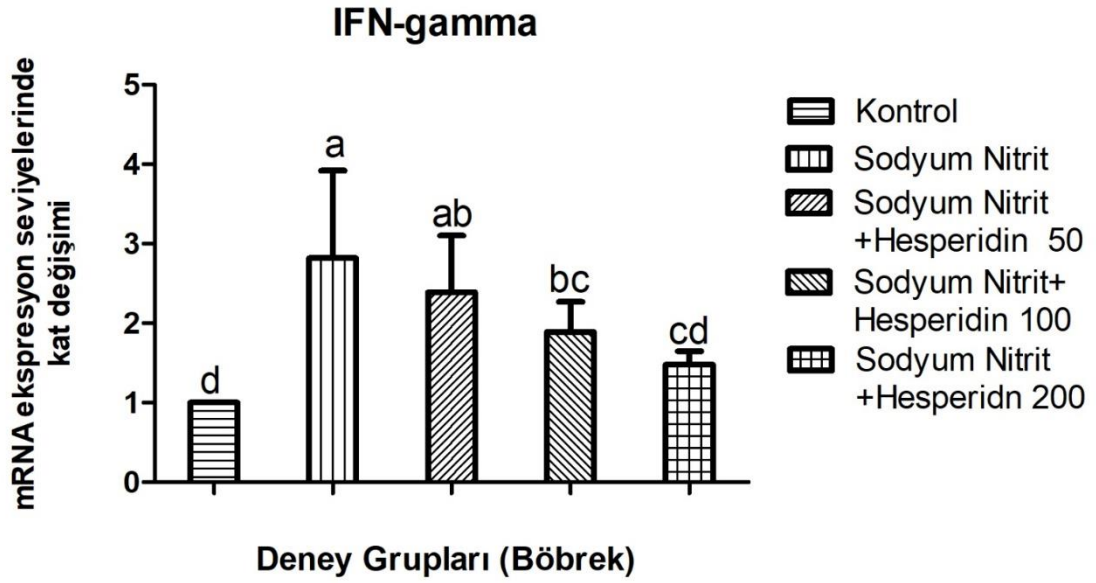
Sodyum nitrit uygulaması eritrosit ve dokularda CAT enzim aktivitesinde belirgin düşüslere neden olurken hesperidin eklenmesinden sonra enzim aktivitesinin olumlu yönde artış gösterdiği ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir. CAT aktivite düzeyleri değişimi Çizelge 4.4' gösterilmiştir.

Çizelge 4.4: CAT aktivite düzeyleri

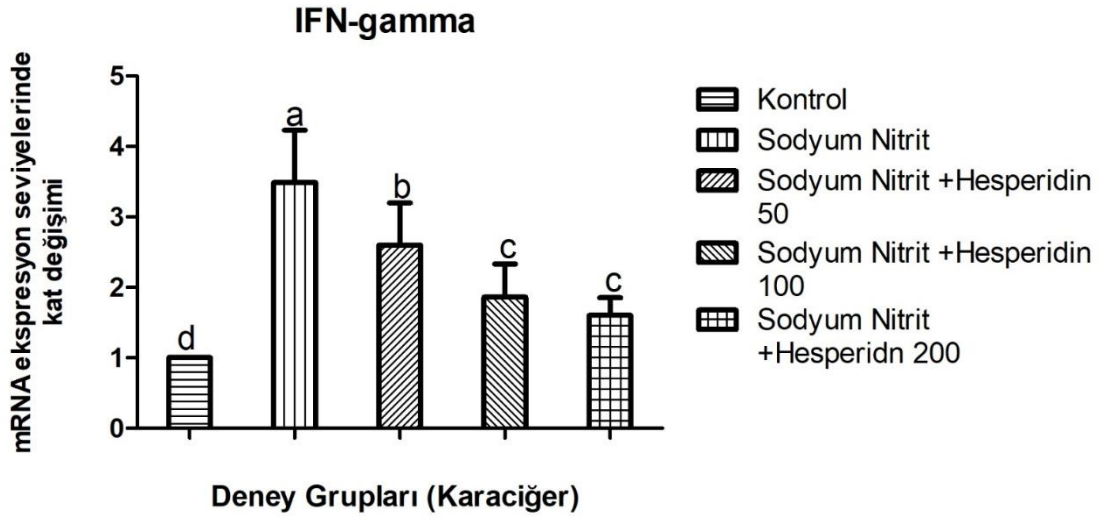
Katalaz	Eritrosit (k/gHb)	Böbrek (k/μg protein)	Karaciğer (k/μg protein)	Kalp (k/μg protein)	Beyin (k/μg protein)	Akciğer (k/μg protein)	Testis (k/μg protein)
Kontrol	231,94±59,23a	11,86±4,76a	10,02±3,18a	2,82±0,91a	3,08±1,3a	4,23±1,64a	2,08±0,66a
Sodyum nitrit	97,25±23,6d	3,05±0,47c	3,16±1,22c	1,56±0,37c	1,44±0,4b	1,86±0,76c	0,95±0,16c
Sodyum nitrit+ Hes 50 mg/kg	128,61±37,3cd	5,65±1,96bc	5,35±1,54bc	1,9±0,6bc	1,78±0,68b	2,07±0,68c	1,35±0,47bc
Sodyum nitrit+ Hes 100 mg/kg	167,29±62,6bc	7,68±3,25b	6,31±1,48b	2,33±0,55ab	2,04±0,58b	2,55±0,99bc	1,52±0,48b
Sodyum nitrit+ Hes 200 mg/kg	192,06±70,1ab	8,82±3,43ab	8,73±2,06a	2,44±0,78ab	2,33±0,85ab	3,73±1,3ab	1,79±0,54ab

4.1.5. Karaciğer ve Böbrekte Değişen Biyokimyasal Gen Parametreleri

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında sodyum nitrit (tek doz 60 mg/kg), 50, 100 ve 200 mg/kg hesperidinin IFN- γ gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Şekil 4.1. ve şekil 4.2.' de gösterildi. Her iki dokudaki gen üzerine sodyum nitrite etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki hesperidin anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır.

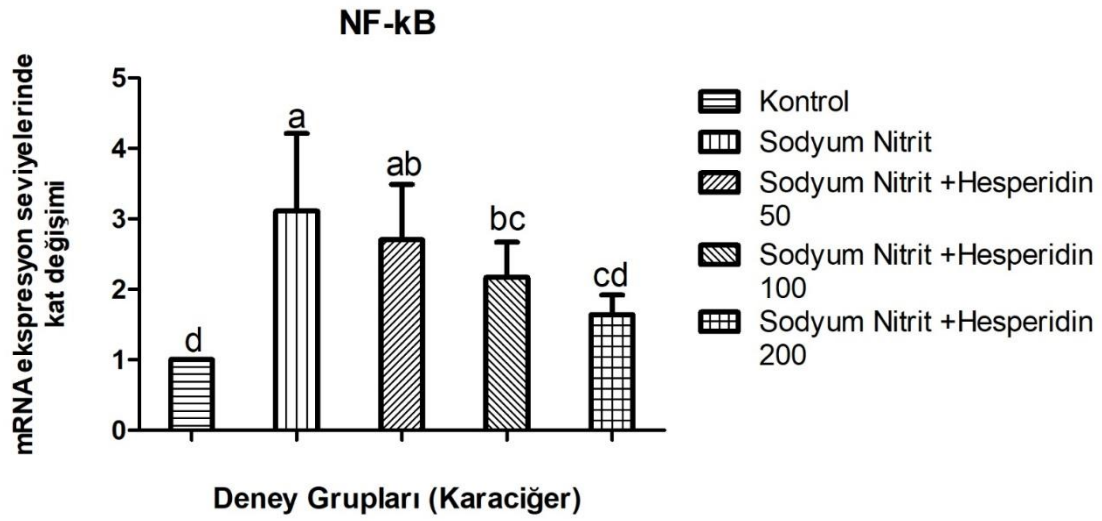


Şekil 4.1: Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a,b,c,d) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

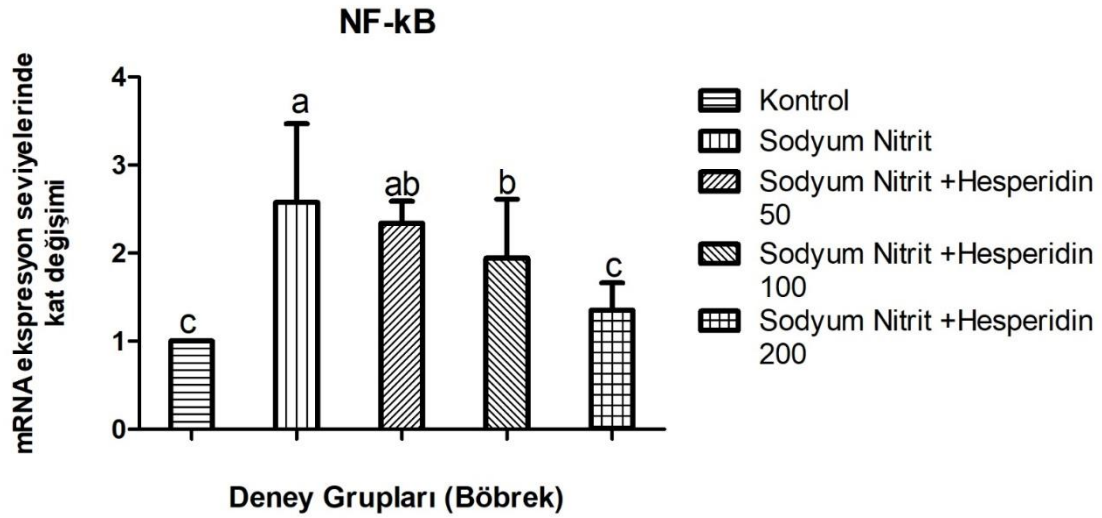


Şekil 4.2: Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında sodyum nitrit (tek doz 60 mg/kg), 50, 100 ve 200 mg/kg hesperidin NF- κ B gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Şekil 4.3. ve şekil 4.4.'de gösterildi. Her iki dokudaki gen üzerine sodyum nitrite etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki hesperidin anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır.

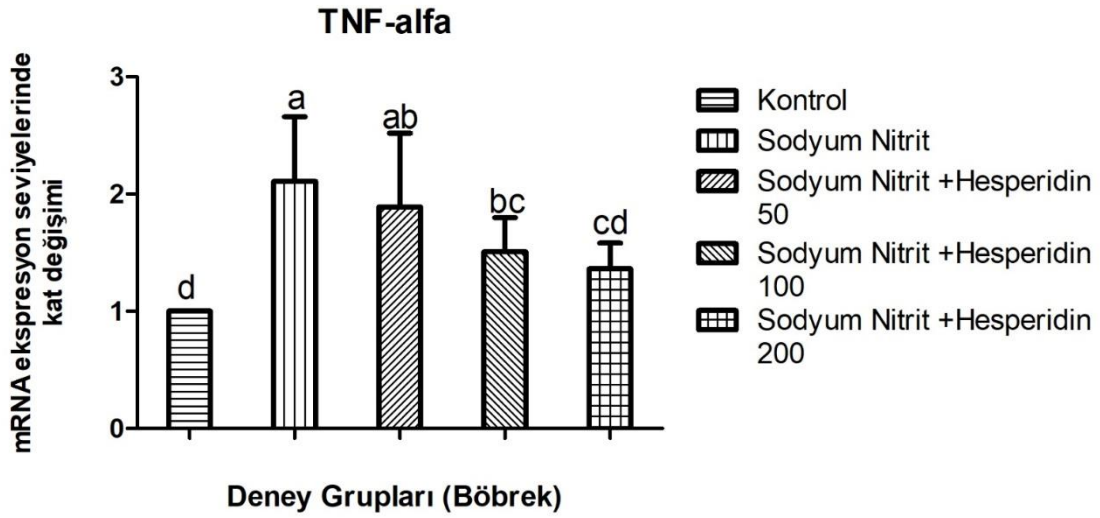


Şekil 4.3: Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

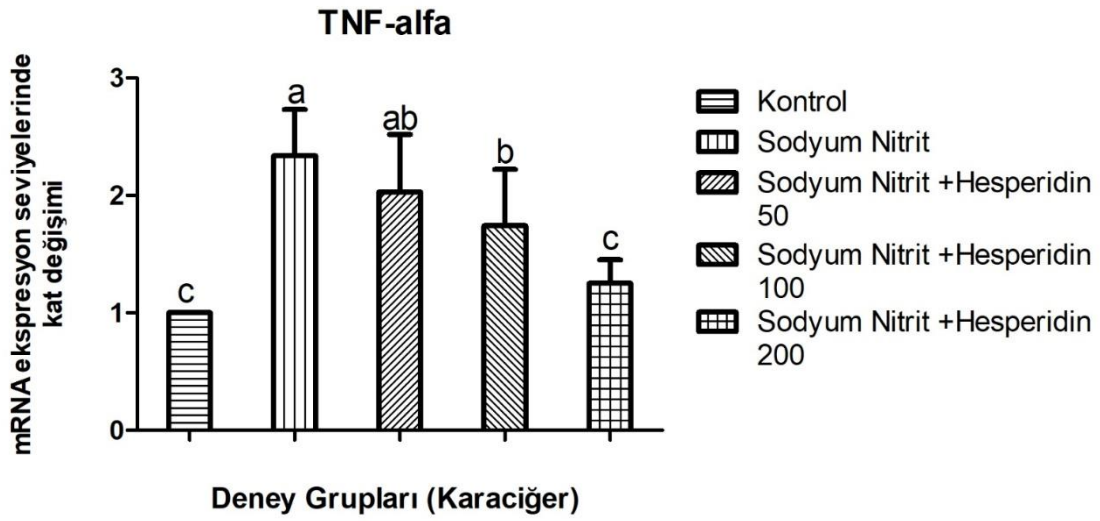


Şekil 4.4: Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında sodyum nitrit (tek doz 60 mg/kg), 50, 100 ve 200 mg/kg hesperidinin TNF- α gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Şekil 4.5. ve şekil 4.6.’da gösterildiği gibi Ortalama değerler $\pm$ standart sapmalardır (n=7). Her iki dokudaki gen üzerine sodyum nitrite etkisi olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki hesperidin anlamlı derecede kontrole yaklaştırmıştır (Resim 4.4, Resim 4.5).



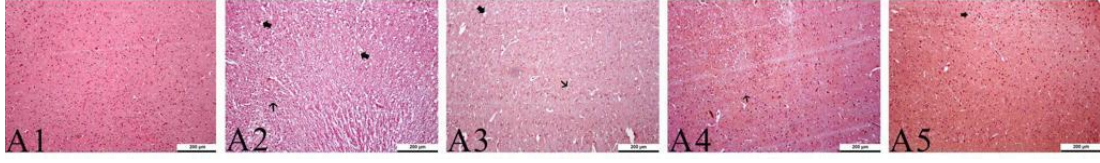
Şekil 4.5: Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).



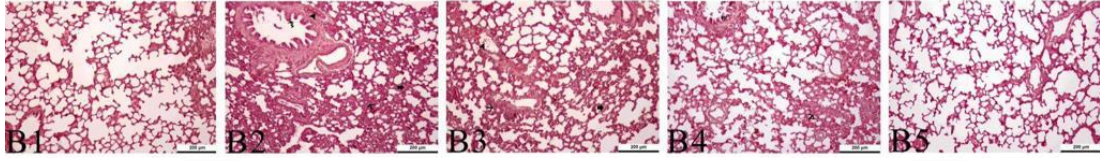
Şekil 4.6: Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c) Aynı sütunda, farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir. ($p < 0.05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

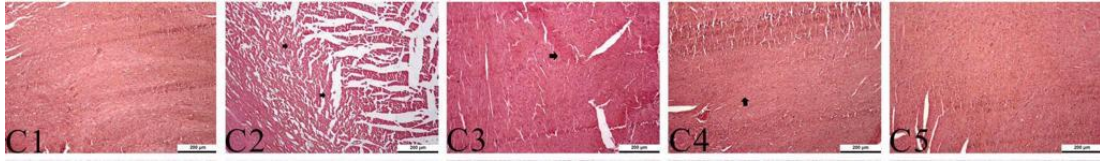
Hematoksilen eozin ile boyanan örnekler ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Beyin Dokusunda nöronlarda vakuolizasyon oluşumları, fokal glia hücre infiltrasyonu alanları görüldü. Akciğer dokusunda alveollerde ödem oluşumu, intersitisyel bölgede kalınlaşma, bronşiyal epitel hücrelerinde hiperplazik görünüm, damarlarda hiperemi görüldü. Kalp Dokusunda myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyon ve nekroz alanları görüldü. Karaciğer Dokusunda vena sentralislerde hiperemi, kupffer hücre sayısında artış, sinuzoidal dilatasyon ve hiperemi, çift çekirdekli hepatosit oluşumları görüldü. Böbrek Dokusunda glomerulus bowman boşluğunda daralma, glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları, tubulus epitel hücrelerinde nekroz görüldü. Testis Dokusunda tek katlı prizmatik epitelde dejenerasyon, endometriyal bezlerde hiperplazi görüldü. Histopatolojik bulgular resim 4.1., resim 4.2., resim 4.3., resim 4.4., resim 4.5., resim 4.6.'da gösterildi.



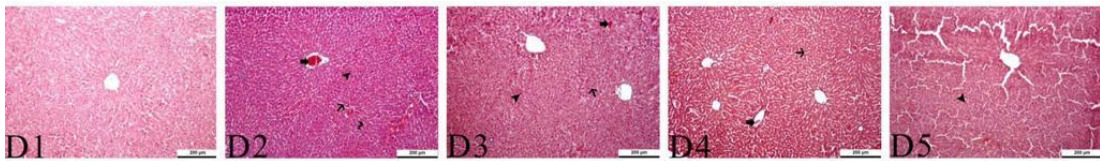
Resim 4.1: Beyin Dokusu Histopatolojik İncelemesi, kalın ok (nöronlarda vakuolizasyon oluşumları), ince ok (fokal glia hücre infiltrasyonu alanları) göstermektedir.



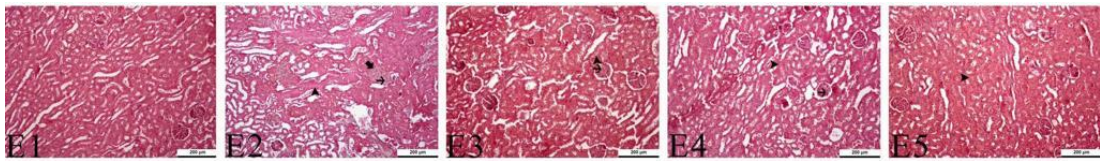
Resim 4.2: Akciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi, kalın ok (alveollerde ödem oluşumu), ince ok (intersitisyel bölgede kalınlaşma), kıvrımlı ok (bronşiyal epitel hücrelerinde hiperplazik görünüm), okbaşı (damarlarda hiperemi) göstermektedir.



Resim 4.3: Kalp Dokusu Histopatolojik İncelemesi, kalın ok (Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyon ve nekroz alanları) gösterir.



Resim 4.4: Karaciğer Dokusu Histopatolojik İncelemesi, kalın ok (vena sentralislerde hiperemi), ince ok (kupffer hücre sayısında artış), kıvrımlı ok (sinuzoidal dilatasyon ve hiperemi), okbaşı (çift çekirdekli hepatosit oluşumları) gösterir



Resim 4.5: Böbrek Dokusu Histopatolojik İncelemesi, kalın ok (glomerulus bowman boşluğunda daralma), ince ok (glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları), okbaşı (tubulus epitel hücrelerinde nekroz) gösterir.



Resim 4.6: Testis Dokusu Histopatolojik İncelemesi, Kalın ok (tek katlı prizmatik epitelde dejenerasyon), İnce ok (endometriyal bezlerde hiperplazi) göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Hassan vd. (2010), yaptıkları çalışmada 3 ay boyunca NaNO₂ (80 mg / kg vücut ağırlığı) alan sıçanların serum ve beyin homojenatları, asetilkolin esteraz (AChE) aktivitesinde ve ayrıca fosfolipid, toplam protein ve endojen antioksidan sistem (glutasyon; GSH ve süperoksit dismutaz; SOD) seviyelerinde önemli bir azalma sergiledi. Tersine, laktik dehidrojenaz (LDH) aktivitesi, beyin tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Öte yandan, sarımsak yağının (5 ml / kg vücut ağırlığı) 3 ay boyuncagünlük olarak oral yoldan verilmesi, nörobiyokimyasal bozuklukları önemli ölçüde iyileştirdi ve NaNO₂ alımının neden olduğu oksidatif stresi inhibe etti.

El-Sheikh vd. (2011), yaptıkları çalışmada erkek sıçanlarda NaNO₂'nin neden olduğu oksidatif stres ve toksisitenin modülasyonu için potansiyel olarak yeni ve faydalı bir strateji olarak l-arginin ve l- glutamin desteğinin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladı. Sıçanlar, her biri 10 sıçandan oluşan altı gruba ayrıldı ve 6 hafta süreyle tedavi edildi: Grup I normal kontrol olarak; Grup II NaNO₂ %0.2 içeren standart diyetle beslenen; Grup III ve IV sırasıyla %1 ve %2 arginin ile desteklenen önceki diyetle beslendi; Grup V ve VI, sırasıyla %1 ve %2 l-glutamin ile desteklenen NaNO₂ diyetiyle beslendi. NaNO₂ etkisi, serum malondialdehit, nitrik oksit, arginaz, glutasyon-S-transferaz aktiviteleri, üre ve kreatinin yanı sıra diferansiyel lökositlerde önemli bir artışa neden oldu. Bununla birlikte, azalmış glutasyon, katalaz aktivitesi, toplam protein, albümin ve bazı hematolojik parametrelerde ve ayrıca immünoglobulin G'de önemli bir düşüş kaydedildi. Öte yandan, arginin veya glutamin desteğiyle, malondialdehitin azalması ve araştırılan antioksidan ve hematolojik parametrelerin iyileştirilmesi. Arginin veya glutamin desteğinin oksidatif stresi azaltabileceği ve NaNO₂ 'nin zararlı etkilerini iyileştirebileceği sonucuna varılabilir.

Bir çalışmada sodyum nitrit sonucunda meydana gelebilecek oksidatif hasar sonucunda E vitaminin bu hasarın önlenmesinde önemli bir rolünün bulunduğu, GSH ve MDA'nın oksidatif hasar göstergesi olduğu, tek başına kan total protein ve glukoz düzeylerinin parametre olarak kullanılamayacağı sonucuna varıldı (Atakişi, 2001).

Hassan vd. (2018), yaptığı çalışmada albino sıçanlarda sodyum nitritin oluşturduğu oksidatif stres üzerine C vitamini etkisi araştırılmıştır. 60 albino sıçan 4 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu olarak değerlendirildi, 2. Grup 30 mg/kg.bw sodyum nitrit verildi, 3. grup 30 mg/kg.bw sodyum nitrit ve 200 mg/kg C vitamini verildi, 4. Grup 30 mg/kg.bw sodyum ve 0,5 mg/kg.bw zerdeçal verildi. Sodyum nitrit verilen 2. Grup sıçanlarında mikrositik hipokromik anemi görülürken, kontrol grubu ile kıyaslandığında toplam lökositlerde (WBC), toplam bilirubinde, lipid peroksidazda, süperoksidedismutazda (SOD) önemli bir artış ($p \leq 0.05$) gösterirken glutatyon redüktazda (GR), globülin (β , γ globülin) ve C vitamini değerinde önemli azalma görüldü. C vitaminiyle Sodyum nitrit verilen 3. Grup sıçanlarında 2. Grup sıçanlarına kıyasla RBC sayıları, HB değeri, globulin (β , α) ve C vitamini değerinde önemli bir artış; toplam bilirubin, (LPO) ve (SOD)'da önemli azalma görüldü. Sodyum nitrit ile zerdeçal verilen 4. Grup sıçanlarda hafif iyileştirici etkiyle beraber 2. Grup ile karşılaştırıldığında eritrosit sayısında önemli artış fakat hemoglobin değerinde düşüş görüldü, total bilirubin, (LPO) ve (SOD) değerlerinde önemli azalma görülürken, globülin (γ globülin) ve (GR) değerlerinde önemli artış görüldü. Histopatolojik sonuçlarda ise 5 haftanın sonrasında sodyum nitrit verilen sıçanlarda hepatositlerin sitoplazmik vakuolizasyonu, genişlemiş tıkanmış damarlar ve mononükleer hücre infiltrasyonu sergilendi. Sonuçlar sodyum nitritin sıçanlar üzerindeki toksik etkisini iyileştirmede C vitaminin zerdeçaldan önce geldiğini açıkladı.

Abdel-Baky ve E.S. (2019), yaptıkları bir çalışmada erkek sıçanlarda nefrotoksisiteyi başlatan sodyum nitrite (SN) Lipidium sativum (LS) tohumlarının sulu ekstrat verilerek düzenleyici etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 4 gruba ayrılan sıçanlarda 1. Grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. 2. Grup sıçanlara dekapitasyondan 1 gün önce intraperitoneal (ip) tek doz olarak 50mg/kg sodyum nitrit enjekte edilmiştir. 3. Grup sıçanlarına dört hafta 300 mg/kg Lipidium sativum oral olarak verilmiştir. 4. Grup sıçanlarına dört hafta Lipidium sativum verilirken dekapitasyondan 1 gün önce sodyum nitrit tek doz olarak verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında sodyum nitrit verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre sodyum, toplam kalsiyum, üre, ürik asit, kreatinin, iyonize kalsiyum, klorür değerlerinde önemli bir artış görülmüştür. Ayrı olarak böbrek dokusu tiobarbitürik asit reaktif maddeler

(TBARS) önemli artış göstermiştir. Fakat süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT) enzimleri önemli şekilde azalma göstermiştir. 4. Grup 2. Grup ile kıyaslandığında böbrek dokusundaki GSH, SOD, CAT ve TBARS değerlerinde sodyum nitrit toksitesini iyileştirilmiştir. *Lipidium sativum* tohumlarının serum elektrolitlerindeki değişiklikleri, böbrek fonksiyonunu ve böbrek dokusunda sodyum nitritin sebep olduğu oksidatif hasarı iyileştirmek için doğal bir madde olarak davrandığı sonucuna varılabileceğini düşünmüşlerdir.

Ibegbu vd. (2015), yaptıkları çalışmada “*Ocimum gratissimum*” un etanolik yaprak özütünün wistar ratlarda yapılan sodyum nitrit kaynaklı serabral korteks toksitesini üzerine etkilerini araştıran ağırlığı 150 g ile 250 g arasında olan 24 Wistar ratı 6 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu olarak değerlendirilirken 2 ml/kg distile su verildi. 2. Grup ratlarına 54mg/kg sodyum nitrit verildi. 3. Grup ratlarına 750 mg/kg özüt verilirken aynı zamanda 54 mg/kg sodyum nitrit verildi. 4. Grup ratlarına 375 mg/kg özüt verilirken aynı zamanda 54 mg/kg sodyum nitrit verildi. 5. Grup ratlarına 54 mg/kg sodyum nitrit verilirken 2 ml/kg zeytin yağı verildi. 6. Grup ratlarına ise sadece 2 ml/kg zeytin yağı verildi. Sonuçlarda 3. Grup ve 4. Grupta ratların ortalama vücut ağırlığında doza bağlı bir azalma ve 2. Grupta serum MDA seviyeleri ve SOD, GPX, ve CAT’da önemli azalma görüldü ($p < 0.05$). Histolojik çalışmalarda 4. Grupta daha az dejenerasyon ile beraber 2. Grupta dejeneratif değişiklikler gösterdi. serbest radikal üretimini içeren O. *Gratissimum*’un doza bağlı olarak nörodejeneratif durumların yönetiminde kullanılmış olabileceğini gösterdi.

Hamdan vd. (2019), yaptığı bir çalışmada gıda koruyucusu olarak kullanılan sodyum nitritin neden olduğu yüksek beyin dokusu inflamatuvarının timokinon tedavisiyle etkileri araştırılmıştır. 40 yetişkin erkek sıçan kullanılan bu çalışmada oral gavaj ile 50 mg/kg timokinon veya sadece 80 mg/kg sodyum nitrit verildi. Timokinon, oksidatif stresin azaltılmasını, azaltılmış glutatyon konsantrasyonunun alınmasını, yüksek proinflamatuvar sitokin seviyelerinin bloke edilmesini, sitokrom c oksidaz aktivitesinin geri kazanılmasını ve beyindeki apoptoz belirteçlerin azaltılmasını türlü mekanizmalar yoluyla sıçanlardaki sodyum nitrit kaynaklı beyin dokusu inflamatuvarını düzelttiğini belirtmişlerdir.

Ansari vd. (2016), yaptıkları bir çalışmada sıçan bağırsağında sodyum nitrit kaynaklı toksiteyi, doğal olarak oluşan bir dipeptid olan karnosinin önleyip önleyemeyeceğini görmek için yapılmıştır. Erkek Wistar ratlar üzerinde yapılan bu çalışmada kontrol grubu, sadece sodyum nitrit verilen grup, sadece karnosinin verilen grup ve sodyum nitrit ile beraber karnosin verilen grup olarak 4 gruba ayrılmıştır. Sadece sodyum nitrit uygulaması bağırsak fırça sınır zarının ve metabolik enzimlerin aktivitelerini azalttı ve antioksidan savunma sistemini önemli ölçüde zayıflattı. Artan DNA-protein çapraz bağlama ve parçalanmadan dolayı DNA hasarı belirgin olarak gözlemlendi. Karnosin uygulaması sodyum nitritin gösterdiği toksik etkilere karşı belirgin olarak artan bir direnç göstermiştir. Histolojik çalışmalarda bunu destekleyici sonuçlar göstermiştir, sodyum nitrit verilen ratlarda oluşan bağırsak hasarı, karnosin ve sodyum nitrit birlikte verilen ratlara kıyasla karnosin verilen grupta azalmış doku hasarı görülmüştür. Karnosin muhtemelen içsel biyokimyasal antioksidan özelliklerinden dolayı nitritin neden olduğu metabolik değişiklikleri ve oksidatif hasarı iyileştirdiğini göstermektedir. Karnosin bu nedenle potansiyel olarak sodyum nitrit toksisitesine karşı terapötik/koruyucu bir ajan olarak kullanılabilir.

Wahyuningsih vd. (2020), yaptıkları çalışmada toplam fenolik ve flavonoid testi, süperoksitdismutaz (SOD) aktivitesi, katalaz (CAT) aktivitesi, kan üre azotu (BUN) ve kreatinin (Cre) düzeyleri ve böbrek histolojisine dayanarak sodyum nitrit ile indüklenen farelerde bamyı baklası metanol ekstratından (OPM) elde edilen antioksidan etkisini belirlemeyi amaçladılar. Sonuçlarına bakıldığında sodyum nitrit toksisitesinin BUN, Cre seviyelerinde önemli bir artışa sebep olduğunu, ayrıca SOD ve CAT aktivitesinde önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. Sodyum nitrit ayrıca negatif kontrole kıyasla böbrek histopatolojisini (tübüllerin nekrozu) değiştirdi. Bununla birlikte OPM uygulaması böbrek nekrozunu önemli ölçüde azalttı, BUN ve Cre seviyelerini düşürdü ayrıca SOD ve CAT aktivitesini normal olarak önemli ölçüde artırdı. OPM'nin farelerde sodyum nitrite bağlı nefrotoksositeye karşı nefroprotektif etki gösterebileceği sonucuna varıldı.

Radwan vd, (2020) yılında yaptıkları çalışmada erkek albino ratlarda gıda üretiminde kullanılan sodyum nitrit ve sodyum benzoat karışımlarının etkilerini araştırmışlardır. 40 ratı 4 gruba ayırmışlar ve 8 haftalık uygulama yapmışlardır; 1. grup kontrol grubu

olarak kullanılmış, 2. ve 3. grup oral yoldan sodyum nitrit NaNO_2 (80 mg/kg VA) ve sodyum benzoat (SB) (200 mg/kg VA) uygulamışlardır, 4. gruba ise sodyum nitrit ve sodyum benzoat karışımını oral yoldan vermişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, sodyum nitrit ve sodyum benzoat karışımının etkisiyle başlayan SOD, CAT ve GSH enzimlerinin böbrekteki aktivitelerinde azalma olduğu ve MDA'nın yükseldiğini kaydetmişlerdir. Böbrekte ödem, mononükleer lökosit hücre infiltrasyonu ve glomerüllerin bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, gıda katkı maddelerinin böbrekte nefrotoksisiteye neden olduğu ve gıda katkı maddelerinin kullanımının azaltılması gerektiği anlaşılmıştır.

Akhzari vd, (2019) yılında yaptıkları çalışmada Berberin'in hepatoprotektif özelliklerini araştırmayı ve sodyum nitrit toksisitesine karşı olası mekanizmalarını incelemişlerdir. 40 hayvanı, grup 1: kontrol, grup 2: Berberin uygulanan (100 mg/kg), grup 3: Sodyum nitrit uygulanan (80 mg/kg), grup 4: 50 mg/kg Berberin ve Sodyum Nitrit uygulanan, grup 5: 100 mg/kg Berberin ve Sodyum Nitrit uygulanan şeklinde 60 gün boyunca takip edilecek beş eşit gruba ayırmışlardır. Araştırma sonucunda ratlara Sodyum Nitrit, MDA içeriğini önemli ölçüde artırdığını, GSH'da ise azalma görmüşlerdir. Berberi'nin, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve antifibrotik kapasitelerinden dolayı sodyum nitritin neden olduğu karaciğer hasarını doza bağlı bir şekilde azaltılabileceğini göstermiştir.

Elshehbiny vd, (2017) yılında gerçekleştirilen çalışmada sodyum nitritin neden olduğu böbrek toksisitesine karşı timokinonun koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. Erkek Sprague-Dawley ratlarına TQ (25 ve 50 mg/kg, günlük), sodyum nitrit (80 mg/kg, günlük) uygulandı. Uygulama sonunda Sodyum nitrit uygulaması, böbrek fonksiyon bozukluğuna, oksidatif strese, inflamasyona ve apoptoz belirteçlerine neden olmuştur. Bu etkiler TQ ile belirgin şekilde hafifletilmiştir. TQ, sodyum nitritin neden olduğu böbrek toksisitesine karşı potansiyel bir koruyucu etkiye sahip olduğunu görmüşlerdir.

Hassan vd, (2010) yılında yaptıkları araştırmada gıda koruyucularının neden olduğu nörobiyokimyasal değişiklikleri ve oksidatif stresi araştırmışlardır. Sodyum nitrit (NaNO_2) ve sarımsak yağının erkek albino ratlarda nörotoksisitenin iyileştirilmesindeki rolü üzerine olan bu çalışmada 3 ay süresince verilen sodyum nitritin (80 /mg/kg vücut

ağırlığı) ratlarda oksidatif stresi önemli ölçüde engellediğini gördüler. Bununla birlikte, sarımsak yağı, ratlarda SOD aktivitesinin korunması ve nitritin neden olduğu nörotoksisiteye karşı birincil mitokondriyal rolü ile ilişkili olabilen yüksek antioksidan özellikleri ile sodyum nitritin elde edilen tehlike etkilerini azaltmada umut verici bir role sahip olduğunu keşfetmişlerdir.

El-Nabarawy vd. (2020), yılında yaptıkları çalışmada ratları farklı dozlarda nitritlere maruz bırakmanın tehlikeli etkilerini araştırmışlardır. Hayvanlar beş gruba ayrılmış; bir kontrol grubu ve dört sodyum nitrit (NaNO_2) uygulanan grup (grup başına 8 rat). NaNO_2 distile su içinde çözölmüş ve tek akut doz gavaj yoluyla sırasıyla 20, 40, 60 ve 75 mg/kg vücut ağırlığı olarak oral yoldan verilmiştir. Alınan sonuçlar, hepatik ve renal oksidatif stres sonuçları, doz olarak nitrit artırımında malondialdehit (MDA) seviyelerinde önemli artış ve indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan parametrelerde önemli düşüş görmüşlerdir. Sonuç olarak, sodyum nitritin doza bağımlı bir şekilde uygulanması, hücresel ve genetik toksisiteyi indükleyebilir ve biyokimyasal analizde, oksidatif ve anti oksidatif dengede bozulmaya neden olabileceğini tespit etmişlerdir.

Adedosu vd, (2017) yılında gerçekleştirdikleri uygulamada sodyum nitrite maruz kalan ratlarda flavonoidler açısından zengin olan *Cymbopogon citratus* ekstraktlarının oksidatif ve inflamatuvar verilerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışma için 175 g ağırlığında 24 erkek Wistar ratı kullanılmış ve dört gruba ayrılmışlardır. Bir haftalık uygulamanın (Grup A (Kontrol), Grup B (yalnızca sodyum nitrit, 80 mg/kg.bw), Grup C (100 mg/kg.bw'de işlenen ekstrakt, 80 mg/kg.bw sodyum nitrit) ve Grup D (saf ekstrakt, 100 mg/kg.bw) ardından sonuçlar incelendiğinde sodyum nitritin karaciğer total protein konsantrasyonlarını, GSH düzeylerini, CAT ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını ve serum total proteinlerinde, WBC sayısında, TNF-a, MDA seviyelerinde, CRP'de anlamlı ($P=.05$) bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Abdel-Rahman vd., (2018) yılında uyguladıkları çalışmada, alfa lipoik asidin (ALA) karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri üzerindeki koruyucu etkinliğini ve erkek albino ratlarda NaNO_2 'nin neden olduğu oksidatif stres değişikliğini araştırmışlardır. 60 erkek albino rat, rastgele bir şekilde 6 gruba bölünmüş, her bir gruba; grup (1) kontrol grubu

bazal diyetle beslenmiş, grup (2) bazal diyetle beslenmiş ve NaNO₂ (100mg/kg diyet/gün), grup (3,4,5 & 6) bazal diyetle beslenmiş ve (sırasıyla 100,200,300 ve 400 mg/kg diyet/gün) uygulaması yapılmıştır. NaNO₂ uygulaması gören ratlar, albümin seviyelerinde azalma ile birlikte karaciğer enzimleri, bilirubin, üre ve kreatinin değerleri önemli ölçüde yükselmiştir. Ek olarak, GPx ve CAT değerleri azalmış, MDA ve NO konsantrasyonları ise artmıştır. Ancak, tüm bu elde edilen veriler ALA uygulamasından sonra tersine dönmüş ve normale yakın bir hale gelmiştir. Son olarak, nitritin vücut organları üzerinde zararlı etkileri olduğu kanıtlanmış ve ALA bu kötü etkileri hafifletmeyi başarmıştır.

Ismaeil vd. (2017), yaptıkları çalışmada, erkek ratların testislerinde sodyum nitrit (NaNO₂) toksisitesinin neden olduğu hipoksinin biyokimyasal belirteçleri ve histopatolojik değişiklikleri üzerindeki olası rolünü incelemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada, 96 yetişkin erkek albino rat 6 gruba (her biri 16 sıçan) ayrılmıştır. Sonuçlarda, NaNO₂'nin rat testislerinde oksidatif hasara ve histopatolojik değişikliklere neden olduğunu, ayrıca testis malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve DNA parçalanma yüzdesini (DNA F %) artırdığını göstermiştir. Ayrıca NaNO₂, kontrol grubuna kıyasla katalaz (CAT) ve toplam antioksidan aktivitenin (TAA) yüksek aktivitelerini azaltmıştır. Cıva klorür (HgCl₂) intraperitoneal olarak (haftada bir kez 2.5 mg/kg'da) uygulanmış ve *P. atlantica*, 32 gün boyunca ratlara 150 mg/kg vücut ağırlığı günlük dozunda gavaj yoluyla oral yoldan verilmiştir. Bu sonuçlar, HgCl₂'nin glutatyon seviyesinde önemli bir azalmaya ve antioksidan sistem katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutatyon S transferazın (GST) enzimatik aktivitesine böbrek seviyesinde neden olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler, yüksek düzeyde renal Malondialdehit (MDA) ve hidroperoksitler (LOOH) tarafından artırılan lipid peroksidasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, bu bitkinin ekstraktının civanın zararlı etkisine karşı bir antioksidan ve koruyucu etkisi olabileceğini göstermiştir.

Radwan vd, (2020) senesinde gerçekleştirdikleri çalışmada gıda katkı maddelerinin üretiminde kullanılan sodyum nitrit, sodyum benzoat ve bunların karışımının erkek ratlarda birkaç biyokimyasal parametre ve histopatolojik inceleme üzerindeki tehlikeli etkilerini incelemişlerdir. Elde ettikleri verilerde; kontrol grubunda farklı hepatik hücreler, sinüzoidal boşluklar ve merkezi bir ven ile normal hücresel yapıyı

göstermiştir. NaNO₂ uygulanan grupta, hepatosit sayısında artış, konjesyonlu santral ven, lökositlerle infiltre portal alan fibrozu, apoptotik hepatositler, çift çekirdekli hepatositlerin sayısında artış, santral vende dilatasyon ve normal kan sinüzoidinin kaybolmasını görmüşlerdir. Sodyum benzoat uygulanan grupta köpüklü alan, hepatositlerde vakuolasyon, nekroz, merkezi damarın kaybolması ve çift çekirdekli hepatositlerin sayısında artış görmüşlerdir. NaNO₂ ve sodyum benzoat (SB) karışımı uygulanan karaciğer dokularının normal yapısının, vakuolasyonun, piknotik çekirdekli dejenere hepatositlerin tamamen ortadan kalktığını, karyoliz, portal vende kanama ve lenfosit agregasyonuna rastlamışlardır.

Ansari vd, (2017) yılında yaptıkları çalışmada, tek bir akut oral sodyum nitrit dozunun rat bağırsağına uygulanmasının etkisi incelemişlerdir. Hayvanlar rastgele dört gruba ayrılmış ve tek doz 20, 40, 60 ve 75 mg NaNO₂/kg vücut ağırlığı verilmiştir. Uygulanan tüm gruplarda fırça kenarlı membran enzimlerinin aktivitelerinde sodyum nitrit dozuna bağlı düşüş, lipid peroksidasyonunda artış, protein oksidasyonu, hidrojen peroksit seviyeleri ve tiyol içeriğinde azalma gözlenmiştir. Yaklaşık 3 cm uzunluğundaki oniki parmak bağırsağı kesilmiş ve hemen Karnovsky fiksatifinde sabitlenmiştir. Parafin blok kullanılarak 5 µm'lik ince mikroskopik kesitler kesilmiştir. Hücreler hematoksilen ve eozin ile boyanmış ve mikroskop altında (Olympus BX40, Japonya) 100x büyütmede incelenmiştir. Histopatolojik incelemeler, bağırsak hücrelerinde belirgin morfolojik hasar göstermiştir. Bağırsak hasarı, nitritin neden olduğu oksidatif strese, nitrit anyonunun doğrudan etkisine veya reaksiyon ara ürünleri ile kimyasal modifikasyona bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir.

Akhzari vd, (2019) yılında yaptıkları çalışmada, berberinin hepatoprotektif özelliklerini araştırmayı ve sodyum nitrit toksisitesine karşı olası mekanizmalarını açıklamayı amaçlamışlardır. Kırk hayvan, grup 1: kontrol, grup 2: Berberin uygulanan (100 mg/kg), grup 3: Sodyum nitrit uygulanan (80 mg/kg), grup 4: 50 mg/kg berberin ile birlikte sodyum nitrit uygulanan ve grup 5: 100 mg/kg berberin ile birlikte sodyum nitrit uygulanan olmak üzere 60 gün boyunca sürecek çalışma için beş eşit gruba rastgele ayırmışlardır. Alınan sonuçlarda, Berberinin TNF- α üzerindeki etkisi incelenmiştir; normal farelere kıyasla sodyum nitrit uygulanan ratlarda önemli bir proinflamatuvar sitokin olarak TNF-a ekspresyonunda artış görülmüştür (4.7 kat) (P < 0.05). Sodyum

nitrit uygulanan ratlarda 100 mg/kg berberin verilmesi TNF- α ekspresyonunu azaltmış, ancak tam olarak normal seviyelere ulaşamamıştır. Ratlardaki TNF- α ekspresyon seviyeleri, normal değerlerin 1.9 katıydı ($P > 0.05$). 100 mg/kg berberin ile tedavi kontrol grubunu etkilememiştir ($P > 0.05$).

Elsherbini vd. (2021) gerçekleştirdikleri çalışmada, glisirizik asidin akciğerde ve submandibular tükürük bezinde sodyum nitrit kaynaklı toksisiteyi iyileştirip iyileştiremeyeceğini test etmişlerdir. 30 yetişkin erkek albino ratı rastgele 3 gruba ayrılmıştır. Grup 1 kontrol grubu olarak görev yapmış, grup 2'de oral yola 80 mg/kg sodyum nitrit ve grup 3'te sodyum nitrit ile birlikte (15 mg/kg) glisirizik asidin uygulanmıştır. glisirizik asidin uygulanması, MDA seviyelerinin azalmasıyla antioksidan savunma mekanizmalarını geri yükleyerek pulmoner ve tükürük sodyum nitrit kaynaklı toksisiteyi azaltmıştır. Glisirizik asit, fibroz TGF- β ve α -SMA ve kollajen birikimini azaltmıştır. Enflamatuar sitokin (TNF- α , IL-1 β) ve makrofaj alımlarının azaltılmasına ek olarak, glisirizik asit hem pulmoner hem de tükürük bezleride morfolojik değişiklikleri gerçekleştirmiştir. Sodyum nitrit uygulaması, kontrol grubuna kıyasla hem akciğer hem de tükürük bezi homojenatlarında TNF- α ve IL-1 β düzeylerini önemli ölçüde artırmıştır ($p < 0.001$). Bununla birlikte, glisirizik asit uygulaması, hem pulmoner ($p = 0.032$, $p < 0.001$) hem de tükürük bezinde ($p = 0.011$, $p < 0.001$) homojenatlarında sodyum nitrit kaynaklı TNF-a ve IL-1 β yukarı yönlü regülasyonunu bastırmıştır.

Ashrafy, E., ve Seyed, H. (2018) yaptıkları bir çalışmada tarçın hidro-alkolik özütünün yetişkin erkek sıçanlarda alkolsüz yağlı karaciğer hastalığına ve sodyum nitrit zehirlenmesine neden olan karaciğer lezyonları üzerindeki koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Tarçın oksidatif stres seviyesini azaltarak antioksidan özelliklerinin gelişmesine neden olur. Yağlı karaciğer bozukluğu ve sodyum nitrit gibi gıda koruyucularının yanı sıra yağlı karaciğer hastalığı kullanımı tüm dünyada karaciğer rahatsızlıklarına ve ilgili hastalıklara neden olmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada yetişkin erkek sıçanlarda tarçın ekstraktının yüksek yağlı diyet ve sodyum nitritin neden olduğu histolojik değişiklikler üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu deneysel çalışmada 80 yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Erişkin sıçanlar kontrol grubuna ayrılarak (işlenmemiş), sahte (çözücü ile muamele edilmiş), yüksek yağlı diyet

(10ml/kg), tarçın ekstresi (60mg/kg), sodyum nitrit (45mg/kg), sodyum nitritli tarçın, yüksek yağlı diyetli tarçın, yüksek yağlı diyetle sodyum nitrit, sodyum nitrit ve tarçın içeren yüksek yağlı diyetler uygulanmıştır. Reçeteler 60 gün içinde gavage yoluyla yapıldı. Sonunda, anestezi sıçanlarından sonra, karaciğerleri ayrıldı ve doku bölümleri hazırlandıktan sonra karaciğer hücreleri sayıldı. Doku çalışmaları ve hücre sayımından elde edilen sonuçlar ANOVA ve Duncan testleri ile SPSS yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada veri farkı anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Sonuçlar, yüksek yağlı diyet ve sodyum nitrit alan gruplarda, Kupffer hücre sayılarında ve Hepatositlerde ($P<0.01$) anlamlı bir artış ve azalma gösterdi. Ayrıca karaciğer doku yapısında hiperemi, koagülasyon nekrozu, hücre şişmesi, vakuol erozyonu, lenfositik infiltrasyon, apoptozis, hiperemi, balonlaşan hepatositler gibi değişiklikler gözlemlendi. Böylece, yüksek yağlı diyet ve sodyum nitrit ile tarçın alan gruplardaki değişiklikler değiştirildi. Yüksek yağlı diyetler ve sodyum nitrit muhtemelen oksidatif stres nedeniyle karaciğer dokusu hasarına neden olur. Tarçın özü ayrıca güçlü antioksidan özelliklere sahip olabilir, sodyum nitrit yıkıcı etkilerini ve karaciğer dokusu üzerinde yüksek yağlı diyeti önleyebilir.

Ghasemi vd. (2022) yaptıkları bir çalışmada tip 2 diyabetik Wistar sıçanlarında izole pankreas adacıklarından insülin sekresyonunda rol oynayan SNARE proteinlerinin nitritin gen ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemektir. Üç grup sıçan incelendi ($n = 10$ / grup): 8 hafta boyunca sodyum nitrit (50 mg / L) ile tedavi edilen kontrol, diyabet ve diyabet + nitrit. Tip 2 diyabet, yüksek yağlı diyetle birlikte düşük dozda streptozotosin (25 mg / kg) kullanılarak indüklendi. Çalışma sonunda pankreas adacıkları izole edildi ve ilgili genlerin mRNA ekspresyonları ölçüldü; Ek olarak, pankreas dokusunda proinsülin ve C-peptidin protein ekspresyonu, immünofloresan boyama kullanılarak değerlendirildi. Kontrollerle karşılaştırıldığında, Tip 2 diyabetik sıçanların izole pankreas adacıklarında, glukokinaz (% 59), sözdizimin1A (% 49), SNAP25 (% 70), Munc18b (% 48), insülin1 (% 56) ve insülin2'nin (% 52) mRNA ekspresyonunun yanı sıra proinsülin ve C-peptidin protein ekspresyonu daha düşüktü. Diyabetik sıçanlarda, nitrit uygulaması glukokinaz, sinaptotagmin III, sözdizimin1A, SNAP25, Munc18b ve insülin genlerinin gen ekspresyonunu ve ayrıca proinsülin ve C-peptidin protein ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. Nitritin Tip 2 diyabetik

sıçanlarda insülin sekresyonu üzerindeki uyarıcı etkisi, en azından kısmen, glikoz algılamasında (glukokinaz), kalsiyum algılamasında (sinaptotagmin III) ve insülin veziküllerinin ekzositozunda (syntaxin1A, SNAP25 ve Munc18b) yer alan moleküllerin gen ekspresyonunun artmasından ve insülin genlerinin ekspresyonunun artmasından kaynaklanmaktadır.

Satajeva vd. (2018) yaptıkları bir çalışmada sodyum nitritin neden olduğu kronik hemik hipoksiye maruz kalan gebe sıçanlarda ve yenidoğan yavrularında miyokardın morfolojik özelliklerini incelemektedir. Kardiyomiyositlerin kontraktıl aparatındaki değişiklikler, en çok kardiyomiyositlerin çevresinde, kılcal damarların yakınında belirgin olan miyofibrillerin atrofisi ve lizisiydi. Mikrodolaşım damarlarının benzer bir durumu, hastalığın oluşumundan bağımsız olarak, kesinlikle her türlü kardiyomiyopatiye eşlik eder. Kronik miyokard iskemisinin arka planındaki hücre-stromal ilişkiler, miyokard yeniden şekillenmesinin yıkıcı süreçlerine neden olur. Uzun süreli hipoksik kalp hasarının nihai morfolojik sonucu, kronik kalp yetmezliğinin gelişmesine ve hayatı tehdit eden aritmilerin ortaya çıkmasına yol açan miyokardın fokal distrofisi olabilir.

Pinheiro vd. (2022) yaptıkları bir çalışmada oral nitrit uygulamasından sonra doku nitrik oksit metabolit konsantrasyonlarına ilişkin kapsamlı bir zaman süreci çalışması işlenmiştir. Nitrit, nitrat ve nitrosillenmiş türlerin (RXNO) doku konsantrasyonları farklı dokular arasında karşılaştırıldığında, özellikle nitrit oral yoldan uygulandığında, nitrit midede çeşitli NO ile ilgili türler ürettiğinden, önemli farklılıkların var olduğunu varsaydık. Nitrit uygulamasından 15, 30, 60, 120, 240, 480 veya 1440 dakika sonra ötenazi yapılan oral nitrit 15 mg / kg sıçanlara uygulandıktan sonra nitrit, nitrat ve RXNO'nun plazma ve doku konsantrasyonlarındaki zamana bağlı farklı değişiklikleri inceledik. Bir kontrol grubu su aldı. Arteriyel kan örnekleri toplandı ve sıçanlar, RXNO'nun tahrip olmasını önlemek için NEM / DTPA içeren bir PBS çözeltisi ile perfüze edildi. Perfüzyondan sonra, kalp, aort, mezenterik arter, beyin, mide, karaciğer ve femur kası toplandı ve ozon bazlı bir indirgeyici kemilüminesans testi kullanılarak nitrit, nitrat ve RXNO içerikleri için analiz edilene kadar hemen -70 ° C'de saklandı. Nitrit uygulaması en az 60 dakika boyunca aort nitrit veya nitrat konsantrasyonlarını arttırmazken, hem aort hem de mezenterik damarlar, uygulanmasından 8 ila 24 saat

sonra nitrit depoladı ve doku konsantrasyonları plazmada bulunanların 10 ila 40 katı arasında arttı. Buna karşılık, çalışılan diğer dokular, RXNO da dahil olmak üzere bu NO metabolitlerinin konsantrasyonlarında sadece geçici artışlar göstermiştir. Dokular arasındaki farklılıklar, nitritin hücresel akışını düzenleyen mekanizmalardaki farklılıkları yansıtabilir. Bu bulguların önemli farmakolojik ve klinik etkileri vardır.

Mbana sovd. (2021) yaptıkları bir çalışmada sodyum nitrat ile tedavi edilen erkek sıçanlarda *J. carnae*'nin etanol ve sulu yaprak ekstraktlarının hematoprotektif etkileri değerlendirilmiştir. Ekstraktların akut toksisite değerleri, fitokimyasal, B12 vitamini, C vitamini ve demir içerikleri analitik olarak belirlendi. Her biri 10 sıçandan oluşan yedi gruba bölünmüş yetmiş (70) yetişkin sıçana spesifik tedaviler verildi. Grup I normal kontrol olarak görev yaparken, grup II sadece indüksiyon ajanı (sodyum nitrat (NaNO_3), 300 mg / kg vücut ağırlığı) ile tedavi edildi. Grup III, NaNO_3 indüksiyonundan önce fesolat ile ön işlem görürken, grup IV ila VII, indüksiyona ek olarak yaprak ekstraktları aldı. Günlük ağız tedavileri 28 gün sürdü ve sonunda hayvanlar kurban edildi ve hematolojik çalışmalar için kan örnekleri toplandı. Elde edilen sonuçlar, her iki ekstraktta da flavonoidler, fenolik bileşikler, tanenler, terpenler, saponinler, alkaloidler, C, B₁₂ vitaminleri ve demirin varlığını ortaya koymuştur. Her ekstrakt için LD₅₀ değeri >5.000 mg / kg vücut ağırlığı idi. Kırmızı kan hücresi, paketlenmiş hücre hacmi, hemoglobin, beyaz kan hücreleri ve trombosit sayımlarında ekstre ve fesolat ile tedavi edilen gruplarda negatif kontrole göre anlamlı birlikte uygulama etkileri ($p < 0.05$) artmıştır. Kanama süresi değerleri tüm test gruplarında anlamlı olarak değişmedi ($p > 0.05$), ancak ekstraktlarla tedaviyi takiben artan pıhtılaşma süresi değerleri yaklaşık normal değerlere düşürüldü. *J. carnae* ekstraktının hematoprotektif potansiyele sahip olduğunu ve hematopoez için iyi bir aday olabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada sodyum nitritin neden olduğu oksidatif stres oluşturulan ratların beyin, kalp, karaciğer, akciğer, testis ve böbrek dokuları ve kan parametrelerinde hesperidinin koruyucu etkilerini histopatolojik analizler, moleküler analizler ve biyokimyasal testlerle tespit edildi. Çalışmamız doğrultusunda, sodyum nitrit tek doz subkutan olarak (60 mg/kg) pozitif kontrol grubuna ve 15 gün boyunca sırasıyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında hesperidin uygulanan ratlara verildi. Sodyum nitrit uygulanmasıyla SOD ve CAT enzim aktivitelerinde, azalma tespit edildi. Bu çalışmada sodyum nitrit uygulaması dokularda MDA seviyelerinin belirgin şekilde artmasına sebep oldu. Bununla birlikte yüksek dozda sodyum nitrit uygulaması dokularda histopatolojik değişikliklere ve yangısal genlerin ekspresyon düzeylerinin artışına neden oldu. Hesperidin uygulaması tek doz sodyum nitrit tarafından indüklenen oksidatif hasarı azaltıcı yönde etki gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak sodyum nitrit, karaciğer ve böbreklerdeki gen ekspresyonlarını olumsuz etkilemiş ve dokularda oksidatif stresin neden olduğu hasara sebebiyet vermiştir. Artan dozlarda hesperidinin kullanılması histolojik ve biyokimyasal sonuçlarla bu tahribatları azaltılabildiği görülmüştür. Doğal bir antioksidan olan hesperidinin alımı sodyum nitritin oluşturduğu toksik etkilere karşı anlamlı derecede iyileştirme sağlamıştır. Dolayısıyla yeterli, dengeli ve sağlıklı beslenme ile elzem mikro ve makro besin öğelerinin tam alınmasıyla birlikte antioksidan kaynaklardan zengin mevsimsel sebze ve meyve çeşitliliğine önem verilmelidir. Gıda katkı maddelerinin toksitesinin farkındılığı toplum tarafından ön planda tutulmalı ve besinlere eklenen tüm gıda katkı maddelerinin doz oranı takip edilmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Abdelaziz, R. M., Abdelazem, A. Z., Hashem, K. S., & Attia, Y. A. (2020). Protective effects of hesperidin against MTX-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(8), 1405-1417.
- Abdel-Baky, E. S. (2019). Effects of Lipidium sativum seeds extract (Garden cress) on the kidney in sodium nitrite receiving rats. *Scientific Journal of Agricultural Sciences*, 1(1), 38-45.
- Adedosu, O. T., Adeleke, G. E., Badmus, J. A., Ojeleye, I. A., & Fatoberu, A. H. (2017). Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of flavonoids-rich extract of Cymbopogon citratus in sodium nitrite (NaNO₂) induced oxidative stress in wistar rats. *Annual Research & Review in Biology*, 1-11.
- Aebi H (1974). Catalase in vitro, in: U. Bergmeyer (Ed.), Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York and London. 673-677.
- Aebi H. (1974). "Catalase, Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)", 2: 673-684.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., ... & Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 486-497.
- Akhzari, M., Shafiee, S. M., Rashno, S., & Akmal, M. (2019). Berberine attenuated oxidative stress induced by sodium nitrite in rat liver. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14(1).
- Amado, N. G., Cerqueira, D. M., Menezes, F. S., da Silva, J. F. M., Neto, V. M., & Abreu, J. G. (2009). Isoquercitrin isolated from Hyptis fasciculata reduces glioblastoma cell proliferation and changes β -catenin cellular localization. *Anti-cancer drugs*, 20(7), 543-552.
- Ansari, F. A., Ali, S. N., & Mahmood, R. (2016). Protective effect of carnosine on sodium nitrite-induced oxidative stress and DNA damage in rat intestine. *Free Radical Biology and Medicine*, 1(96), S44.
- Ansari, F. A., Ali, S. N., Arif, H., Khan, A. A., & Mahmood, R. (2017). Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance, DNA damage, metabolic and histological changes in rat intestine. *PLoS One*, 12(4), e0175196.
- Ashrafy, E., & Seyed, H. (2018). Protective effects of Cinnamon hydro-alcoholic extract on liver lesions induced non-alcoholic fatty liver disease and sodium nitrite poisoning in adult male rats. *jkums.*, 19(6).
- AYDIN, B. G., Pişkin, Ö., Yılmaz, B. A. Ş., Karakaya, K., Elmas, Ö., Murat, C. A. N., & Büyükuysal, Ç. (2019). Protective effects of hesperidin on ionizing radiation-induced liver damage. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 10(4), 498-504.
- Ayper, B. O. Ğ. A., & Binokay, S. (2010). Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(3), 141-154.

- Balakrishnan A, Menon VP. (2007). Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Toxicology*. 238(2-3): 90-8.
- Barreca, D., Gattuso, G., Bellocco, E., Calderaro, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., ... & Nabavi, S. M. (2017). Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*, 43(4), 495-506.
- Beutler, E. (1963). Kan glutatyon tayini için geliştirilmiş yöntem. *J. lab. clin. Med.*, 61, 882-888.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1993). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratoty and Clinical Medicine*, 61: 882-888.
- BORAN, M. (2016). GIDA KATKI MADDELERİNDE HELÂLLİK VE HARAMLIK ÖLÇÜLERİ. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 9 (42).
- Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X-Y., Martinez, C.T., Maraj, A.R. and Hughes, M.N., 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411 (1999), 475-488.
- Che, S., Yuan, J., Chen, S., Li, S., Zhang, L., Ruan, Z., & Yao, Y. (2021). Hesperidin prevents the combined toxicity of decabromodiphenyl ether and sodium nitrite in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 156, 112410.
- Chen YC, Shen SC, Lin HY. (2003). Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*. 66(7):1139-50.
- Conner, E. M., & Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12(4), 274-277
- Diplock A. (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
- Dönderici, Z. S. (2005). Penicillium cinsine ait bazı küflerin Türk tipi fermente sucuk üretiminde koruyucu kültür olarak kullanım olanaklarının araştırılması. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- Drabkin DL, Austin JH. (1935). Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 112: 51-65.
- Draper HH, Hardley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186: 421-431
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.
- EKERBİÇER, H. Ç., & KARATEPE, T. U. (2017). Gıda Katkı Maddeleri. *Sakarya Tıp Dergisi*, 7(4), 164-167.
- El-Nabarawy, N. A., Gouda, A. S., Khattab, M. A., & Rashed, L. A. (2020). Effects of nitrite graded doses on hepatotoxicity and nephrotoxicity, histopathological alterations, and

- activation of apoptosis in adult rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 14019-14032.
- El-Sheikh, N. M., & Khalil, F. A. (2011). L-Arginine and L-glutamine as immunonutrients and modulating agents for oxidative stress and toxicity induced by sodium nitrite in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 758-762.
- Elsherbiny, N. M., Maysarah, N. M., El-Sherbiny, M., & Al-Gayyar, M. M. (2017). Renal protective effects of thymoquinone against sodium nitrite-induced chronic toxicity in rats: Impact on inflammation and apoptosis. *Life sciences*, 180, 1-8.
- Elsherbini, A. M., Maysarah, N. M., El-Sherbiny, M., Al-Gayyar, M. M., & Elsherbiny, N. M. (2021). Glycyrrhizic acid ameliorates sodium nitrite-induced lung and salivary gland toxicity: Impact on oxidative stress, inflammation and fibrosis. *Human & Experimental Toxicology*, 40(4), 707-721.
- Erdoğan, D. G., Tanyeli, A., Akdemir, F. N. E., Güler, M. C., Eraslan, E., ÇOMAKLI, S., & Polat, E. Hesperidin Alleviates Cecal Ligation and Puncture-Induced Lung and Kidney Injuries. *Akdeniz Tıp Dergisi*, 8(1), 1-8.
- Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PAM. (2008). Antioxidant effects of the VO (IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 13(3): 435.
- Field, L. S., Furukawa, Y., O'Halloran, T. V., & Culotta, V. C. (2003). Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28052-28059.
- Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 15(8): 655-69.
- Ghasemi, A., Afzali, H., & Jeddi, S. (2022). Effect of oral nitrite administration on gene expression of SNARE proteins involved in insulin secretion from pancreatic islets of male type 2 diabetic rats. *biomedical journal*, 45(2), 387-395.
- Gökalp, H. Y., Kaya, M., Tülek, T. ve Zorba, Ö. (2015). Et ve Et Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, Erzurum, *Atatürk Üniversitesi Yayınları* No:318: 77-177
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*. 56(9): 683-7.
- Guerin P., El Mouatassim S., Menezo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, 7(2), 175-189.
- Gutteridge JM. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41: 1819-1828.
- Hakkı Cigerci, I., Fidan, A.F., Konuk, M., Yuksel, H., Kucukkurt, I., Eryavuz, A., Baysu Sozbilir, N. (2009). The protective potential of *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30 ®)

against nitrite-induced oxidative stress in rats. *J. Nat. Med.* 63, 311–317.
<https://doi.org/10.1007/s11418-009-0338-4>.

- Hamdan, A. M., Al-Gayyar, M. M., Shams, M. E., Alshaman, U. S., Prabahar, K., Bagalagel, A., ... & Almasri, D. (2019). Thymoquinone therapy remediates elevated brain tissue inflammatory mediators induced by chronic administration of food preservatives. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Hassan, H. A., Hafez, H. S., & Zeghebar, F. E. (2010). Garlic oil as a modulating agent for oxidative stress and neurotoxicity induced by sodium nitrite in male albino rats. *Food and chemical Toxicology*, 48(7), 1980-1985.
- Hassan, S. M., Zagloul, N. F., & El-shamy, S. A. (2018). Comparative Studies on Turmeric and Vitamin C on Sodium Nitrite treated Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 56(1).
- Hsu J, Arcot J, Lee NA.(2009). Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry* 115: 334.
- Ibegbu, A. O., Eze, S. M., Livinus, P. P., Adamu, S. A., Hamman, O. W., Umana, U. E., & Musa, S. A. (2015). Effect of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* on sodium nitrite-induced cerebellar cortex toxicity in adult Wistar rats. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 14(2), 120-120.
- Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3): 161-164.
- Ince S., Kucukkurt I., Demirel H.H., Acaroz D.A., Akbel E., Cigerci I.H. (2014a). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, 108, 197-204.
- Ismaeil, N. H., Osman, A. A., Ali, E. H., Rashed, L. A., & Saleh, M. A. (2017). The potential role of mesenchymal stem cells in a hypoxia model induced by sodium nitrite in testes of male albino rats. *Biomedical Research and Therapy*, 4(02), 1128-1146.
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular aspects of medicine*, 26(4-5), 340-352.
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1), 1-14.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg.* Kasapçopur Özel, G. S., & Birdane, Y. O. (2014). Antioksidanlar.
- Kumagai Y, Shinyashiki M, Sun GF, Shimojo N, Sagai M. (1994). An efficient method for purification of cuprozinc superoxide dismutase from bovine erythrocytes. *Experientia* 50: 673-676.

- Labib S, Erb A, Kraus M, Wickert T, Richling E. (2004). The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research*. 48(4): 326-32.
- Lee, JW, Lee, DH, Park, JK ve Han, JS (2019). Sodyum nitrit türevi nitrik oksit, sıçan testislerini iskemi/reperfüzyon hasarına karşı korur. *Asya Androloji Dergisi* , 21 (1), 92.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-75.
- Luck H. (1955). Catalase. in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods in Analysis*. *Academy Press*, London.
- Luck, H. A. (1963). Spectrophotometric method for the estimation of catalase. *Methods of enzymatic analysis*.
- Luk, E., Yang, M., Jensen, L. T., Bourbonnais, Y., & Culotta, V. C. (2005). Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22715-22720.
- Luna L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology*. 3rd Ed, *McGraw-Hill Book Company*, New York;1-253.
- Mamur, S., Ataseven, N., Fatma, Ü. N. A. L., & YÜZBAŞIOĞLU, 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.
- Man, M. Q., Yang, B., & Elias, P. M. (2019). Benefits of hesperidin for cutaneous functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Mbanaso, E., Nwankwo, A., Ijioma, S. N., Emmanuel, O., Ugbogu, E. A., Nwagbara, N., & Ugwuanyi, K. (2021). Haematoprotective and red blood cell membrane stabilizing effects of *Justicia carnae* leaf extracts in sodium nitrate-treated rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(1).
- Pinheiro, L. C., Ferreira, G. C., de Angelis, C. D., Toledo Jr, J. C., & Tanus-Santos, J. E. (2020). A comprehensive time course study of tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 43-51.
- Mitsunaga, Y., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., Ohtani, H., & Sawada, Y. (2000). Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood–brain barrier. *European journal of pharmacology*, 395(3), 193-201.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Nones J, Gomes FCA. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. *Neurochemical research*. 2011;36(10):1776-84.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.

- Özdemir, H., Turhan, A. B., & Arıkoğlu, H. (2012). Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması. *European Journal of Basic Medical Science*, 2, 34-40.
- Özdekan Ö, Üren A. (2010). Gıdalarda nitrat ve nitrit. *Akademik Gıda*, 8(6): 35-43.
- Öztanır MN, Çiftçi O, Çetin A, Aladağ MA. (2014). Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurological Sciences*. 35(9): 1393-1399.
- Peng J, Jones GL, Watson K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Rad Biol Med* 28: 1598-1606.
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 9.
- Pinheiro, L. C., Ferreira, G. C., de Angelis, C. D., Toledo Jr, J. C., & Tanus-Santos, J. E. (2020). A comprehensive time course study of tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 43-51.
- Prasad S, Chetty AA. (2008). Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry* 106: 772-780.
- Radwan, E. H., Elghazaly, M. M., Aziz, K. A., Barakat, A. I., & Hussein, H. K. (2020). The possible effects of sodium nitrite and sodium benzoate as food additives on the liver in male rats. *J. Adv. Biol*, 13, 14-30.
- Serdaroğlu Kaşıkçı, E., Çevreli, B., Cengiz, K., Coşkun, U., Gözler, T., Tanhan, B., & Konuk, M. (2019). Pentilentetrazol ile Uyarılmış Epilepsi Modelinde Hesperidin Ve Valproik Asit Kombine Uygulamasının Oksidan-Antioksidan Savunma Üzerine Etkisi. *Anadolu University of Sciences & Technology-C: Life Sciences & Biotechnology*, 8(1).
- Shagirtha K, Pari L. (2011). Hesperetin, a citrus flavonone, protects potentially cadmium induced oxidative testicular dysfunction in rats. *Ecotoxicology environmental safety*. 74(7): 2105-2111.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 188-194.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34: 497-500.
- Takahashi, Y., Watanabe, R., Sato, Y., Ozawa, N., Kojima, M., Watanabe-Kominato, K., ... & Watanabe, T. (2018). Novel phytopeptide osmotin mimics preventive effects of adiponectin on vascular inflammation and atherosclerosis. *Metabolism*, 83, 128-138.
- Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler HA.(2008). Morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 79: 1089–1094.

- Toker, H., Ozdemir, H., Eren, K., Ozer, H., Sahin, G. (2009). N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*, 80(4), 672-678.
- Turk, E., Kandemir, FM., Yildirim, S., Caglayan, C., Kucukler, S., Kuzu, M. (2019). Protective Effect of Hesperidin on Sodium Arsenite-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 189, 95–108. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1443-6>
- Turp, G.Y. ve Sucu, Ç. (2016), Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler, *CBÜ Fen Bil. Dergi*, 12 (2): 231-242.
- 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. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Wahyuningsih, S. P. A., Atika, B. N. D., Sajidah, E. S., & Winarni, D. (2020). Nephroprotective activity of okra pods extract (*Abelmoschus esculentus* L.) in sodium nitrite-induced mice. *Research J. Pharm. and Tech*, 13(8), 3648-3652.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW (1975). The estimation of red cell superoxide activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 55: 337-341.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. *Journal of neurochemistry*. 85(1): 180-92.
- Yılmaz Alhan, B. (2019). *Mangan dioksit destekli indirgenmiş grafen oksit elektrotla gıdalarda voltametrik nitrit tayini* (Master's thesis, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü).