



ACIBADEM MEHMET ALI AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINDA APOSİNİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

BEGÜM ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap Arbak

İkinci Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Merve Açikel Elmas

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALI AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINDA APOSİNİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

BEGÜM ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap Arbak

İkinci Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Merve Açikel Elmas

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06/01/2022

Begüm ŞAHİN

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tezim süresince benimle değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, düşünce ve önerileriyle beni yönlendirerek yetiştiren çok kıymetli tez danışman hocam Prof. Dr. Serap ARBAK'a ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Merve AÇIKEL ELMAS' a ve Dr. Öğr. Üyesi Deniz YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisansın bana kazandırdığı, arkadaşlığının ötesinde her konuda anlayabildiğim kıymetli dostum Salva Asma ALGİLANİ'ye, laboratuvar çalışmalarımda yol gösterici olan değerli büyüğüm Doktora öğrencisi Gökçen ÖZGÜN'e, tez çalışmamın elektron mikroskopik takip yöntemlerinde destek olan Dr. Selçuk BİRDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman maddi ve manevi destek olarak motive eden, varlıklarıyla güven veren, bu günlere gelmemi sağlayan canım annem Seval ŞAHİN ve canım babam Hüseyin ŞAHİN' e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi ABAPKO (Proje karar numarası: 2021/01/07) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Karaciğer	5
2.1.1 Karaciğer anatomisi.....	5
2.1.2 Karaciğer histolojisi.....	6
2.1.2.1 Karaciğer lobülünün yapısı.....	8
2.1.2.2 Karaciğerin damar desteği ve safra kanalı yapısı.....	11
2.1.2.3 Karaciğer hücreleri.....	12
2.2 Lezzet Arttırıcılar.....	17
2.2.1 Umami	18
2.2.2 Monosodyum glutamat	18
2.3 MSG ve Oksidatif Stres	19
2.4 MSG ve Apoptoz	20
2.5 Aposinin	21

2.6 APO ve Apoptoz	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Gereç.....	25
3.1.1 Deney grupları.....	25
3.2 Yöntem	26
3.2.1 Doku takibi	26
3.2.2 Işık mikroskobu düzeyinde histokimyasal incelemeye yönelik doku preparasyonu	27
3.2.3 Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması	27
3.2.4 Masson'un trikrom boyası	28
3.2.5 Periyodik asit- Schiff (PAS) reaksiyonu.....	28
3.2.6 Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme (TUNEL) yöntemi	29
3.2.7 NOX-2 immünfloresan boyaması	29
3.2.8 Biyokimyasal incelemeler	30
3.2.8.1 Serum biyokimyasal analizleri.....	30
3.2.8.1.1 Serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesinin ölçülmesi	31
3.2.8.1.2 Serum alkali fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçülmesi.....	31
3.2.8.1.3 Serum albümin konsantrasyonunun ölçülmesi	31
3.2.8.1.4 Serum total bilirubin seviyelerinin ölçülmesi.....	32
3.2.8.2 Karaciğer dokusu biyokimyasal analizleri	32
3.2.8.2.1 Doku malondialdehid (MDA) seviyelerinin ölçülmesi.....	33
3.2.8.2.2 Doku glutatyon (GSH) seviyelerinin ölçülmesi	34
3.2.8.2.3 Doku süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü	35
3.2.8.2.4 Doku miyeloperoksidaz (MPO) seviyelerinin ölçülmesi.....	35
3.2.9 Geçirimli elektron mikroskopik düzeyde inceleme.....	36

3.2.10 İstatistiksel analizler	36
4 BULGULAR	37
4.1 Vücut Ağırlığı Değerlendirmesi	37
4.2 Morfolojik Bulgular	37
4.3 TUNEL İmmünohistokimyası Bulguları	47
4.4 NOX-2 İmmünfloresan Boyaması Bulguları	51
4.5 Biyokimya Bulguları	54
4.5.1 Serum ALT, AST ve ALP seviyeleri.....	54
4.5.2 Serum albümin konsantrasyon seviyeleri	57
4.5.3 Serum total bilirubin konsantrasyon seviyeleri	58
4.5.4 Doku MDA ve GSH, SOD ve MPO seviyeleri	59
4.6 Geçirimli Elektron Mikroskopik Düzeyde Bulgular	62
5 TARTIŞMA	74
6 SONUÇ.....	82
7 KAYNAKLAR	83
8 EKLER.....	89
EK 1 Etik Kurul Onayı.....	89
9 ÖZGEÇMİŞ.....	93

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ALP	Alkali fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
APO	Aposinin
AST	Aspartat aminotransferaz
CAT	Katalaz
Cr	Kreatin
DAPI	4'6- Diamidino-2-fenilidol
DER	Düzgün yüzeyli endoplazmik retikulum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOX	Dokсорubin
DTNB	5,5'-ditiyobis 2- nitrobenzoik asit
ER	Endoplazmik retikulum
G6P	Glukoz-6-fosfataz
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
GES	Guanidinoethan sülfonik asit
GGT	γ -glutamil transferaz
GMP	Guanilat-5'-monofosfat
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
H&E	Hematoksilen-eozin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HRP	Horseradish peroksidaz

IMP	İnosin-5'-monofosfat
iGlu	İyonotropik glutamat
JNK	c-Jun N-termina kinaz
MAPK	Mitojenle etkileşen protein kinaz
MDA	Malondialdehit
mGlu	Metabotropik glutamat
mGluR	Metabotropik glutamat reseptörü
MPO	Miyeloperoksidaz
MSG	Monosodyum glutamat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
O₂⁻	Süperoksit
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PFA	Paraformaldehit
SAP	Şiddetli akut pankreatit
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme
WST	Suda çözünür tetrazolium tuzu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Karaciğerin loblarının, yüzeylelerinin ve ligamentlerinin önden (solda) ve postero-inferior perspektiften (sağda) görüntüsü (11)	6
Şekil 2. Klasik karaciğer lobülünün şekli (20).....	9
Şekil 3. Karaciğer asinüsünün şematik görüntüsü (13).....	10
Şekil 4. Sinüzoid ve ilişkili hücrelerin diyagramı. (E) Endotel hücre, (K) Kupffer hücresi, (İ) İto hücresi, (Mø) Makrofaj, (H) Hepatosit, (Nø) Nötrofil, (KKH) Kırmızı kan hücresi (26).....	13
Şekil 5. Hepatositin ince yapısı. ZO (zonula okludens), L (lateral yüzey), KH (Kupffer hücresi), İ (İto hücresi), SK (Safra kanalikülü) (17)	14
Şekil 6. Büyük büyütmede subendotelyal boşluktaki İto hücresinin çizimi (29)	16
Şekil 7. Monosodyum glutamatın kimyasal formülü (30)	19
Şekil 8. APO'nun formül bazındaki yapısı (47).....	21
Şekil 9. NOX aktivasyonu ve APO'nun etki mekanizması (51).....	22
Şekil 10. APO'nun NOX inhibisyon mekanizması. APO miyeloperoksidaz (MPO) ve hidrojen peroksidaz (H ₂ O ₂) tarafından dimerize edilir (48).....	23
Şekil 11. Deney gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarının haftalık değişimi.	37
Şekil 12. Karaciğer dokusunun histopatolojik skor grafiği.....	46
Şekil 13. PAS reaksiyonu yoğunluğu grafiği.....	46
Şekil 14. Deney gruplarına ait apoptotik indeks grafiği.	50
Şekil 15. Deney gruplarına ait NOX-2 floresan yoğunluğu grafiği.	53
Şekil 16. Deney gruplarına ait ALT konsantrasyon seviyeleri.	55

Şekil 17. Deney gruplarına ait AST konsantrasyon seviyeleri.	55
Şekil 18. Deney gruplarına ait ALP konsantrasyon seviyeleri.	56
Şekil 19. Deney gruplarına ait albümin konsantrasyon seviyeleri.	57
Şekil 20. Deney gruplarına ait total bilirubin seviyeleri.	58
Şekil 21. Deney gruplarına ait MDA seviyeleri.	60
Şekil 22. Deney gruplarına ait GSH seviyeleri.	60
Şekil 23. Deney gruplarına ait SOD seviyeleri.	61
Şekil 24. Deney gruplarına ait MPO seviyeleri.	61

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait migrograf.	39
Resim 2. APO grubuna ait mikrograf.	40
Resim 3. MSG grubuna ait mikrograf.	40
Resim 4. MSG grubuna ait mikrograf.	41
Resim 5. MSG+APO grubuna ait mikrograf.	41
Resim 6. Kontrol grubuna ait mikrograf.	42
Resim 7. APO grubuna ait mikrograf.	42
Resim 8. MSG grubuna ait mikrograf.	43
Resim 9. MSG+APO grubuna ait mikrograf.	43
Resim 10. Kontrol grubuna ait mikrograf.	44
Resim 11. APO grubuna ait mikrograf.	44
Resim 12. MSG grubuna ait mikrograf.	45
Resim 13. MSG+APO grubuna ait mikrograf.	45
Resim 14. Kontrol grubuna ait mikrograf.	48
Resim 15. APO grubuna ait mikrograf.	48
Resim 16. MSG grubuna ait mikrograf.	49
Resim 17. MSG+APO grubuna ait mikrograf.	49
Resim 18. Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerinde NOX-2-immünfloresan boyanması.	52
Resim 19. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikroskopi.	63

Resim 20. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	64
Resim 21. APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	65
Resim 22. APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	66
Resim 23. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	67
Resim 24. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	68
Resim 25. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	69
Resim 26. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	70
Resim 27. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	71
Resim 28. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	72
Resim 29. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	73

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Deney hayvanlarına uygulanan gavaj uygulaması.....	26
Tablo 2. Karaciğer dokusuna uygulanan histolojik takip basamakları	26
Tablo 3. Serum albümin konsantrasyonu ölçümü için örnek hazırlama tablosu	32
Tablo 4. Serum total bilirubin ölçümü için örnek hazırlama tablosu.....	32
Tablo 5. MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.....	33
Tablo 6. GSH seviyesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler	34

ÖZET

Monosodyum Glutamat ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Aposininin İyileştirici Etkisi

Bu çalışmada monosodyum glutamatın (MSG) karaciğer dokusu üzerindeki harabiyet oluşturuıcı etkisi ve aposininin (APO) karaciğer dokusu üzerindeki iyileştirici etkisinin histokimyasal, immünohistokimyasal, geçirimli elektron mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde incelenmesi amaçlandı. Bu çalışmada, Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar 4 farklı gruba (Kontrol, APO, MSG, MSG+APO) ayrıldı. Sıçanlara 28 gün boyunca 120 mg/kg MSG ve deneyin son 5 günü 25 mg/kg APO gavaj ile uygulandı. Deney sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinin morfolojisi, histokimyasal, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlerle, doku MDA, GSH, SOD ve MPO kriterleri ve serum ALT, AST, ALP, albümin ve total bilirubin seviyeleri biyokimyasal yöntemlerle belirlendi. Kontrol ve APO grubunda normal karaciğer morfolojisi ve biyokimyasal parametreler normal düzeyde izlendi. MSG grubunda, hepatositlerde steatosisi yansıtır vakuolizasyon, piknotik nükleus, parenkimada lökosit infiltrasyonu ve bağ dokusunda artış görülürken hepatosit sitoplazmasında glikojen içeriğinde azalma görüldü. Bu grupta TUNEL-pozitif hücre sayısının ve NOX-2 immünreaksiyonunun arttığı gözlemlendi. MSG grubunda ALT, AST, ALP, total bilirubin, MDA ve MPO seviyeleri artarken, albümin, GSH ve SOD seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. MSG+APO grubunda APO'nun iyileştirici etkisi karaciğer dokusunda mikroskopik ve biyokimyasal parametrelerde Kontrol grubundakine yakın değerler eşliğinde gözlemlendi. Bu çalışmada, MSG'nin etkisi ile oluşan karaciğer hasarına karşı APO'nun oksidatif hasarı ve apoptozu inhibe ederek, karaciğer dokusunu iyileştirici etki gösterdiği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Mikroskopi, Monosodyum glutamat, Aposinin, NOX-2, Oksidatif hasar

ABSTRACT

The Healing Effect Of Apocynin In Monosodium Glutamate- Induced Liver Damage

The aim of this study was to assess the degenerative effect of monosodium glutamate (MSG) and healing effect of apocynin (APO) in the liver tissue at histochemical, immunohistochemical, transmission electron microscopical and biochemical levels. In this study, Sprague Dawley male rats were divided into 4 groups (Control, APO, MSG and MSG+APO). The rats were administered 120 mg/kg MSG for 28 days and 25 mg/kg APO at the last 5 days of the experiment by gavage. At the end of the experiment, morphology of liver tissue samples taken from sacrificed rats were determined by histochemical, immunohistochemical and ultrastructural methods, tissue MDA, GSH, SOD and MPO criteria and serum ALT, AST, ALP, albumin and total bilirubin levels were determined by biochemical methods. Liver morphology and biochemical parameters were normal in Control and APO groups. Hepatocytic vacuolization, reflecting the steatosis, and pyknotic nucleus, leukocyte infiltration and mild degree of fibrosis in the parenchyma were detected in MSG groups with a decreased glycogen content in hepatocytes. The number of TUNEL-positive cells and NOX-2 immunoreaction were increased in this group. ALT, AST, ALP, total bilirubin, MDA, MPO levels were increased and albumin, GSH and SOD were decreased in MSG group. Based on the microscopical and biochemical data of MSG+APO group, APO exerted a healing effect against harmful effect of MSG. In this study, we conclude that APO has a healing effect on liver tissue by inhibiting oxidative damage and apoptosis against MSG-induced liver damage.

Keywords: Microscopy, Monosodium glutamate, Apocynin, NOX-2, Oxidative damage

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Monosodyum glutamat (MSG), eşsiz bir lezzet arttırıcı niteliğe sahip, esansiyel olmayan glutamik asidin tuz formlarından birisidir (1). Yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddesi olan MSG, 1908 yılında Japonya’da Kikunae Ikeda tarafından bulunmuştur. İçeriğinde %78 glutamik asit, %21 sodyum ve %1 oranında kontaminant ve su bulunmaktadır. Glutamat, yaygın olarak insan vücudunda üretilen doğal bir aminoasit olup, çeşitli dokularda protein ve peptitlerin ana bileşenini oluşturmakta ve insan metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak gıdalarda bulunan doğal glutamik asit herhangi bir soruna neden olmazken endüstriyel olarak sentetik üretilen glutamik asit toksin yapısındadır (2). MSG kullanımı vücudun farklı hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin apoptozu nedeniyle hücre ölümü kaynaklı DNA hasarının artmasına, hücre zarındaki lipid ve proteinlerde hasarlanmaya ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. MSG’nin neden olduğu hasar mekanizmalarının temelinde mitokondriyal aktiviteyi ve genetik bilgiyi değiştiren serbest radikallerin üretimi yer almaktadır. Bu radikaller karaciğerde metabolize olmakta ve böbrekten atılmaktadır (3).

MSG uygulaması gerçekleştirilen Wistar erkek sıçanlarda doza bağlı olarak anormal sperm morfolojisinin arttığı ve önemli ölçüde oligospermiye neden olduğu gözlenmiştir. MSG aynı zamanda testiste kanamaya, dejenerasyona ve sperm hücresi popülasyonunda ve morfolojisinde değişimlere neden olarak erkek infertilitesine neden olmaktadır. Yapılan diğer çalışmalarda MSG’nin nörotoksik etkileri sonucu beyinde nöron hasarı, retinal dejenerasyon, endokrin hastalıklar ve felç, epilepsi, beyin travması, şizofreni, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi patolojik durumların olduğu bildirilmiştir (4). Özellikle hamilelik sırasında MSG kullanımı obezite ve tip II diyabet sıklığını önemli ölçüde etkilemektedir. Kullanıma bağlı olarak hamilelik sırasında hamilelerdeki yağ ve kolesterol seviyelerinde ve maternal obezitede keskin bir artışın olduğu gösterilmiştir (5). Ayrıca birçok çalışmada MSG kullanımının karaciğer ve böbrek dokusunu ciddi bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. MSG uygulaması sonucunda karaciğer fonksiyonunda bozulma, fibrosis ve hepatositlerde hipertrofi gözlenmiştir (6). MSG kullanımının karaciğerin hücresel bütünlüğünü

etkilediği, membran geçirgenliđi ve hücre hacmi homeostazında bozulmalara neden olduğu bildirilmektedir (7).

ROS, mitokondriyonlar, peroksizomlar, sitokrom P-450 ve diğer hücresel kaynaklar tarafından metabolizmanın yan ürünü olarak üretilmektedir. ROS aynı zamanda hücre büyümesi, hücrenin hayatta kalması ve ölümü gibi çeşitli sinyal olaylarında rol oynayan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz tarafından da üretilmektedir (8). NADPH oksidaz (NOX) enzimleri hepatositlerde ve hepatosit olmayan hücrelerde oksidatif stresin ana kaynağıdır. Bu enzimlerin ana işlevi NADPH'dan O₂'ye elektron transfer ederek süperoksit ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturmaadır ve yedi transmembran proteinden (NOX1-5 ve Duox 1 ve 2) oluşmaktadır. NOX aracılı ROS üretiminin hepatik fibrogenezde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır (9).

Aposinin (4-hidroksi-3-metoksiasetofenon) (APO), *Apocynum cannabinum* bitkisinin köklerinden elde edilen bir NADPH inhibitörüdür. APO en etkin NOX inhibitrlerinden birisi olup, süperoksit inhibitrlerinin üretiminde rol oynamaktadır (10). APO, gp91phox'un (bir NOX alt birimi) ekspresyonunu azaltarak hücresel NADPH'ı yenileme mekanizması ile hepatik oksidatif hasarı azaltmaktadır (9).

Bu çalışmanın amacı belirli bir dozda uygulanan (120 mg/kg) MSG'nin karaciğer dokusunda olası olumsuz etkisini değerlendirmek ve bu olumsuz etkinin nlenmesine yönelik antioksidan özelliğe sahip olan APO uygulamasının karaciğer dokusu üzerindeki iyileştirici etkilerini histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemler ile incelemektir.

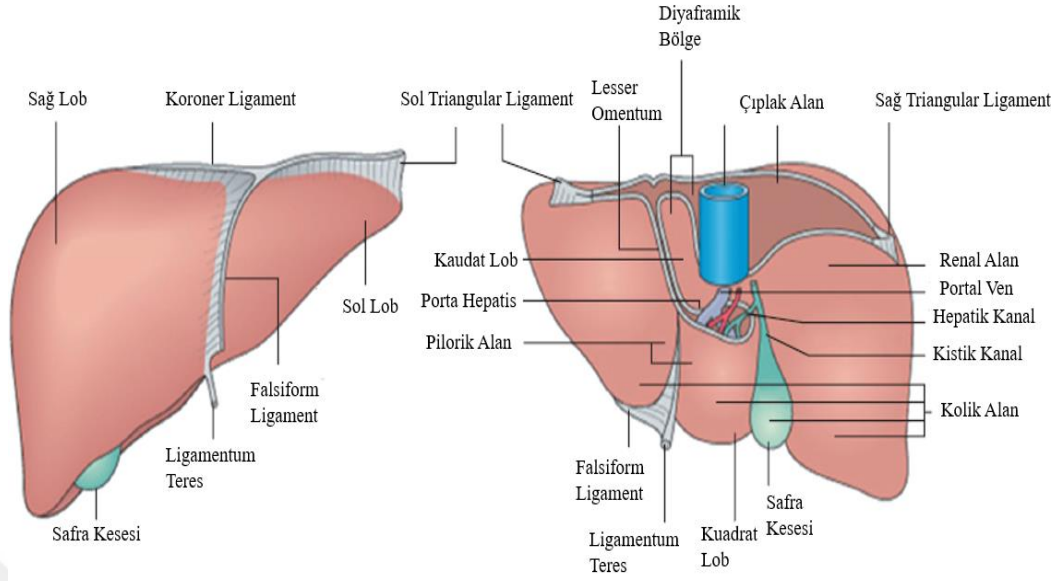
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer

2.1.1 Karaciğer anatomisi

Yetişkinlerde, sağlıklı bir karaciğerin ağırlığı yaklaşık olarak 1400 ile 1600 gram arasındadır (11). Çocuklarda vücut ağırlığının yaklaşık %5'ini, yetişkinlerde ise vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (12). Oluşumunu tamamlamış olan karaciğer, esas olarak abdominal (karın) boşluğun sağ hipokondriyak ve epigastrik bölgelerinde, diyaframın altında bulunur. Karaciğer diyaframa bağlıdır ve kaburgalar tarafından korunmaktadır (11). Karaciğerin hafif iç bükey inferior bölgesi mide, duodenum, kolon, sağ böbrek ve sağ adrenal bez ile temas halindedir (12).

Karaciğer, ince bir bağ dokusu kapsülü tarafından dış yüzeyinden sarılarak tamamen ayrılmamış loblardan oluşmaktadır. Dış yüzey temel özelliklerine göre, abdominal ön duvara ve diyaframa karaciğeri bağlayan peritoneal katlantı olan falsiform ligament tarafından karaciğerin sağ ve sol loblarına ayrılır. Falsiform ligament, embriyonik gelişim sırasında umbilikal veni içerir. Doğumdan sonra bu ven atrofiye uğrayarak karaciğerin inferior sınırından falsiform ligamentin serbest inferior sınırına uzanarak ligamentum teresi oluşturur (12). Sağ lob inferior ve posterior olarak iki küçük lob- kaudat ve kuadrat olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 1) (11).



Şekil 1. Karaciğerin loblarının, yüzeylelerinin ve ligamentlerinin önden (solda) ve postero-inferior perspektiften (sağda) görüntüsü (11)

2.1.2 Karaciğer histolojisi

Karaciğer, insan vücudunun en büyük parenkimal organı ve aynı zamanda en büyük bezidir. Karaciğer endojen bileşenlerin metabolizmasında, ekzojen maddelerin degradasyonunda ve eliminasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu organ, parenkimal ve bağ dokusu hücreleri, safra kanalı sistemi, kan ve lenf damarları, sinirler ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır (12).

Yetişkinlerdeki karaciğer dokusunun yaklaşık %80'i hepatositlerden meydana gelen parenkimadır. Kalan %20'si ise çoğunlukla düzenli dizilmiş tip I kollajen lifleri, dağınık tip III kollajen lifleri, fibroblastlar, mast hücreleri, kan damarları ve sinirleri içeren ince bir bağ dokusu tabakası (Glisson kapsülü) tarafından sarılmaktadır (11, 13). Abdominal boşluğa bakan karaciğerin dışbükey yüzeyindeki bu bağ dokusu peritoneal serozanın basit yassı mezotelyal hücreleri ile kaplıdır (11). Mezotelyum, patojen bakteriler ve diğer zararlı bileşenlere karşı koruma sağlamaktadır (13).

Karaciğerin kanlanması, hepatic arter ve portal ven tarafından sağlanmaktadır. Portal ven (%75-80 afferent kan hacmi) sindirim sistemi, dalak ve pankreastan gelen kanı taşımaktadır. Çölyak ana damarından dallanan hepatic arter ise periportal alana ulaşmadan önce interlobüler arter ve interlobüler arter yolağını kullanarak karaciğere %20-25 oranında oksijenli kan desteği sağlamaktadır. Portal ven ve hepatic arter dallarındaki kan, karaciğer lobüllerindeki sinüzoidlerde karışmaktadır (14).

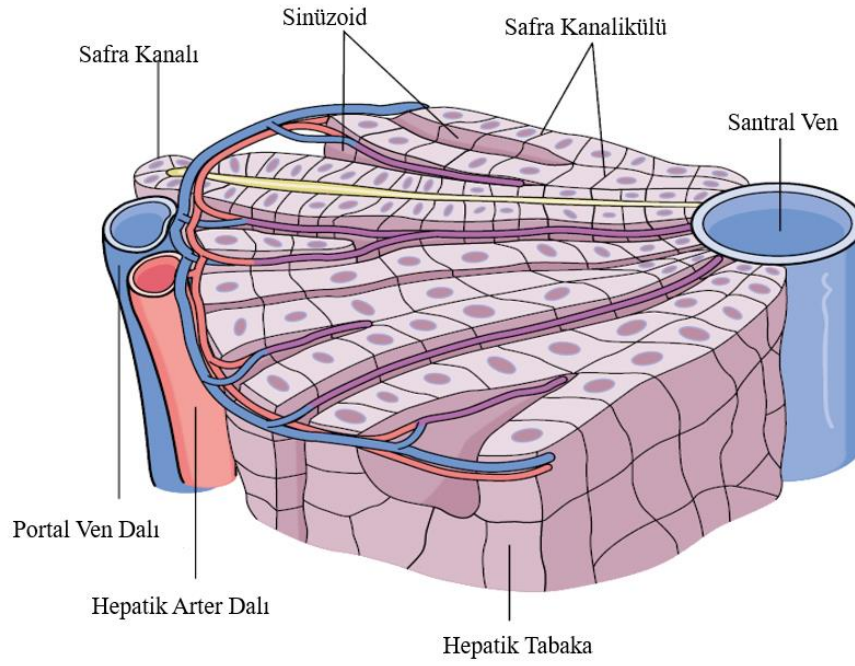
Disse aralığı (perisinüzoidal aralık), kan ile karaciğer hücreleri arasında madde alışverişinin gerçekleştiği yerdir. Bu alan, hepatositlerin ve sinüzoid duvarındaki endotel hücrelerinin bazal yüzeyleri ve sinüzoidlerde bulunan Kupffer hücreleri arasında uzanmaktadır. Hepatositlerin bazal yüzeyinden bu boşluğa küçük, düzensiz mikrovilluslar uzantı yapmaktadır. Bu mikrovilluslar yaptıkları uzantılar sayesinde hepatositler ile plazma arasında gerçekleşen madde alışverişi için yüzey alanını yaklaşık 6 kat arttırmaktadır (15). Bu aralık kan plazmasından, bağ dokusundan (tip III kollajen) ve İto hücrelerinden oluşmaktadır (16).

Sinüzoid duvarında yer alan fenestratalı endotel hücrelerinde ve hepatositlerde bazal lamina süreklilik göstermemektedir. Bu nedenle Disse aralığı hepatosit membranına bağımlı bir alan değildir. Sinüzoidlerden Disse aralığına geçen kandaki maddelerin transferi endotel hücrelerindeki fenestrasyonların boyutuna bağlı olarak düzenlenmektedir (17). Hepatositler tarafından sentezlenen protein ve lipoproteinler Disse aralığındaki kana bu yolla taşınmaktadırlar. Ancak bu yolla taşınan safra haricindeki karaciğer salgıları içindir (15).

2.1.2.1 Karaciğer lobülünün yapısı

İnsan karaciğerinde yaklaşık 1 milyona yakın lobül bulunmaktadır (18). Karaciğerin bu yapısı fonksiyonel birim bakımından klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü olarak tanımlanmaktadır (15).

Klasik lobül poligonal bir yapıya sahiptir. Genellikle enine kesitlerde hegzagonal yapıda olup yaklaşık olarak 0.7x2 mm boyutundadır (12). Her bir lobülün merkezinde sinüzoidler tarafından drene edilen santral ven (terminal hepatik venül) bulunmaktadır. Hepatositlerden oluşan hücre plakları, santral venden lobül periferine doğru ışınal olarak uzanmaktadır (15). Her bir lobülün köşesinde ağırlıklı olarak tip I kollajen içeren bağ dokusu ile çevrili periportal alanlar (kanallar) bulunmaktadır. Bu periportal alanlarda portal triad (hepatik arter, safra kanalı ve portal ven), sinir lifleri ve lenfatik damarlar bulunmaktadır (Şekil 2) (16). Periportal alanlardaki hepatik arterler ve portal venler kendi duvarlarına ve vasküler düz kas hücrelerine sahipken, safra kanalları zayıf miyofibroblastlardan ve bazal membrandan meydana gelmektedir (19). Safra kanalı iltihabı ve/veya tıkanıklığı durumunda fibroblastlar aktive olmakta ve safra kanalı etrafındaki hepatositleri yıkıma uğratmaktadır (11, 19). Portal kanalda yer alan bağ dokusu yapısındaki stroma ile hepatosit hücreleri arasındaki alana periportal aralık (Mall aralığı) denmektedir. Karaciğerdeki lenfin kaynakladığı yerlerden birisinin bu aralık olduğu düşünülmektedir (15).

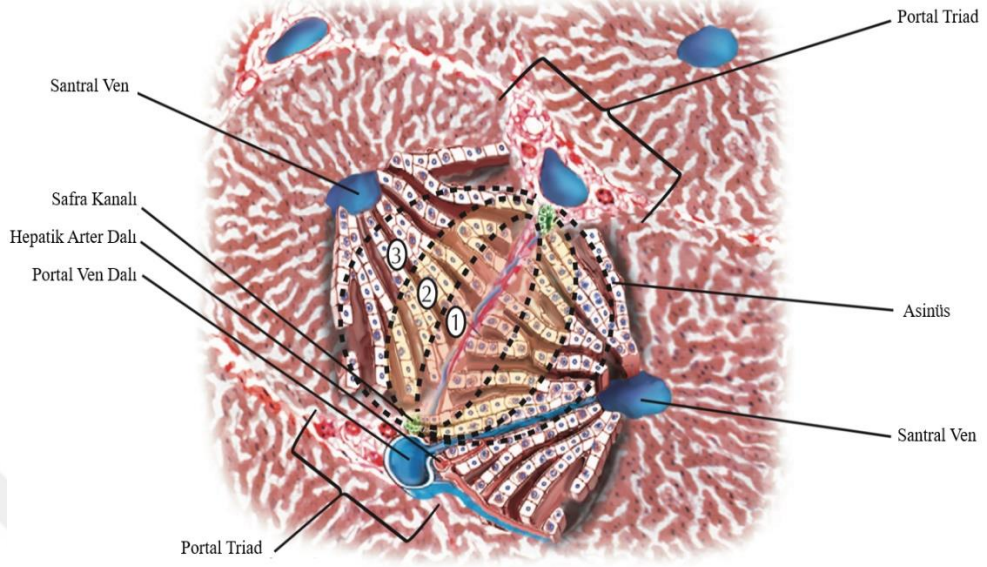


Şekil 2. Klasik karaciğer lobülünün şekli (20)

Karaciğer lobül kavramlarından bir diğeri olan **portal lobül**, karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu gösteren lobül yapısıdır. Lobülün dış kenarları, periportal alana en yakın üç santral ven arasında çizilen hayali çizgilerdir. Bu hayali çizgiler kabaca üç klasik lobülün safra üreten kısımlarını içeren üçgen şeklindeki doku blokları olarak tanımlamaktadır (15).

Bir diğeri lobül kavramı olan **karaciğer asinüsü** eşkenar dörtgen şeklindeki en küçük fonksiyonel birimdir (15). Klasik lobüle göre görüntülenmesi oldukça zor olmasına rağmen, birçok hastalığa bağlı metabolik ve patolojik değişimleri tanımlamak için klinik ve işlevsel yönden oldukça yararlıdır (13). Bir asinüs yapısında, kanda tüketilen oksijen miktarına ve ekzojen maddelere bağlı olarak üç farklı bölge gözlenir. Portal triaddan santral vene doğru bu bölgeler sırasıyla: periportal bölge (zon 1), ara bölge (zon 2), perisantral bölgedir (zon 3) (12). Zon 1, portal ven ve hepatic arterden gelen kan desteğine en yakın bölgedir. Bu bölge klasik lobülün periferine karşılık gelmektedir. Zon 2, zon 1 ve zon 3 arasında yer almaktadır ve ayırt edici keskin

bir sınırı bulunmamaktadır. Zon 3, santral vene en yakın bölgedir. Bu zon, klasik lobülün santral veni çevreleyen merkezi kısmına karşılık gelmektedir (Şekil 3) (15).



Şekil 3. Karaciğer asinüsünün şematik görüntüsü (13)

Histolojik olarak neredeyse homojen bir görünüme sahip olmasına rağmen karaciğer asinüsü biyokimyasal, fizyolojik ve hücre içi işlevleri bakımından muazzam bir heterojeniteye sahiptir. Bu heterojeniteye bağlı olarak görülen bölgelenme karaciğer ve tüm vücut homeostazı için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Birçok gen anlatımı modeli, besinler, ilaçlar ve hormonlara bağlı olarak değişen enzimlerin dağılımı bu bölgelenmeyi dinamik hale getirmektedir (21). Bu metabolik adaptasyon çoğunlukla glikoz ve yağ asidi metabolizması ile ilgili gradiyan benzeri dağılım gösteren enzimlerde görülmektedir (22).

Hepatik arterlerden gelen besin açısından zengin oksijenli kan, karaciğer lobülüne akmadan önce portal venden gelen kan ile karışmaktadır. Bu durum lobüle giren kan ile çıkan kan arasında farklılıklara neden olmaktadır. Kan lobül boyunca ilerlerken hücreler oksijeni kullanıp besinleri işlerken, metabolitleri ve atık ürünleri üretmektedir. Bunun sonucunda kan oksijensiz hale gelmekte ve metabolik yan ürünler

sinüzoid boyunca hücrelerden salgılanmaktadır. Sinüzoid boyunca oluşan bu gradyan karaciğer asinüsünün üç farklı bölgeye ayrılmasına neden olmaktadır (23).

Karaciğer glikoz homeostazında ana rol oynamaktadır. Beslenme durumunda fazla miktarda tüketilen glikoz karaciğer tarafından alınarak CO₂'ye oksitlenirken glikojen ve yağ asidine dönüştürülür. Açlık durumunda karaciğer normoglisemiye sürdürmek için glikojenoliz ve glikoneogenez ile kan dolaşımına glikoz salgılamaktadır. Metabolik bölgelenmeye göre glikoneojenez temel olarak periportal alanda gerçekleşirken, glikoliz olayı ağırlıklı olarak perisantral alandaki hepatositler tarafından gerçekleştirilmektedir (22).

Yağ asidi β-oksidasyonu periportal bölgedeki hepatositlerde daha yüksek oranda gerçekleşirken perisantral alandaki hepatositlerde lipogenez ve ketogenez gerçekleşmektedir (24). Perisantral bölgelerdeki hepatositler tarafından yağ asitlerinin esterleşmesi ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) sentezi bu alanda daha yüksek olarak gerçekleşmektedir (22).

2.1.2.2 Karaciğerin damar desteği ve safra kanalı yapısı

Hepatik kan akışı erkeklerde yaklaşık 1,800 ml/dk iken kadınlarda 1,500 ml/dk'dır (12). Karaciğer eşsiz bir kan desteğine sahiptir. Bu kan desteği hepatic venlerden gelen venöz (portal) destek ve hepatic arterlerden gelen arteriyel destek olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu damarlar karaciğere hilustan ya da porta hepaticten girmektedir. Aynı bölgeden salgılanan safrayı taşıyan duktus communis ve lenf damarları da karaciğeri terk etmektedir. Bu nedenle, klasik karaciğer lobülünde kan ile safra akışının yönü terstir (15).

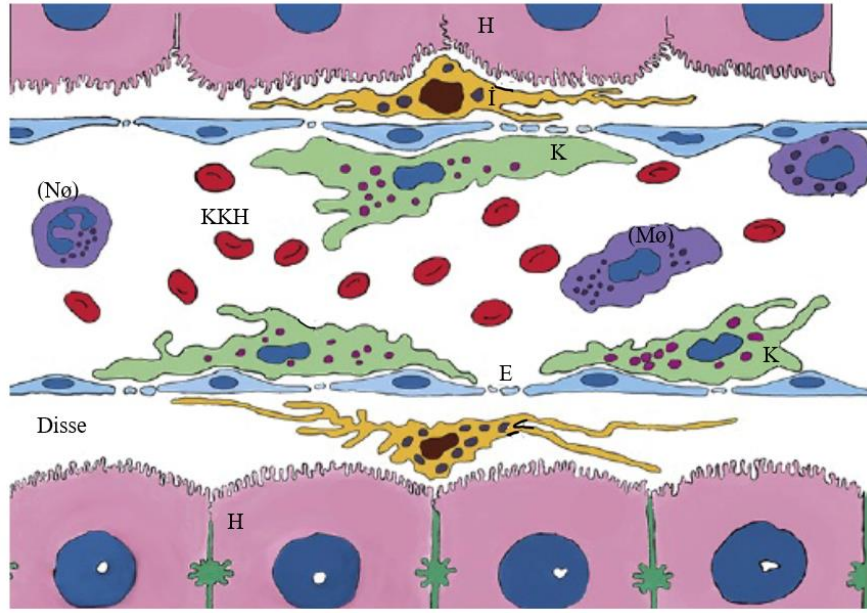
Karaciğere kan akışının %20-25'i hepatic arterlerden, %70-75'i ise portal ven'den gelmektedir. Karaciğere portal ven tarafından gelen kanın %25'i pankreas ve dalaktan, %75'i mide ve bağırsaklardan gelmektedir (12, 15). Gelen bu kan bağırsakta absorbe edilen besinleri ve toksik maddeleri, kan hücreleri ve kan hücrelerinin dalaktan gelen parçalanmış ürünlerini, pankreasın ve gastrointestinal sistemin enteroendokrin hücrelerinin endokrin salgılarını içermektedir. Hepatic arter ve portal venden gelen kan, hepatositlere dağılmadan hemen önce karışmaktadır ve sinüzoidler tarafından

dağıtılmaktadır. Bu nedenle karaciğer hücreleri asla tam oksijenli kana maruz kalmamaktadır. Sinüzoidler santral vene açılmaktadır. Bu ven de sublobüler venlere boşalmaktadır. Kan, karaciğerden hepatik venlerle drene olmakta ve hepatik venlerden de vena kava inferior'a boşalmaktadır (15).

Biliyer ağaç, safrayı hepatositlerden safra kesesine oradan ise bağırsağa aktaran kolanjiyositler ile döşeli kanal sistemidir. Biliyer ağacın en küçük dalı safra kanalikülleri komşu iki hepatositin oluklarının karşı karşıya gelmeleri sonucunda oluşan küçük kanallardır. Safra kanalikülü periportal alana doğru ilerledikçe Herring kanalına dönüşür. Bu kanal hepatositler ve kolanjiyositler ile döşenmiştir. Kolanjiyositler apikal bölgesindeki mikrovillus yapıları ile hepatositlere benzer kübik hücreler olup buna ek olarak primer silyum içermektedir. Bu hücreler sitoplazmalarında az sayıda organelle sahiptirler. Safra kanalının çapının artması sonucu bu kübik hücreler prizmatik hücrelere dönüşürler (25).

2.1.2.3 Karaciğer hücreleri

Karaciğer genel olarak parenkimal (hepatositler) ve parenkimal olmayan hücreler olarak sınıflandırılan farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Hepatositler, karaciğerin esas yapısını ve kütesinin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Parenkimal olmayan hücreler Kupffer hücreleri, sinüzoid duvarında yer alan endotel hücreleri, İto hücreleri (yıldız hücreleri), periportal fibroblastları ve hepatik dendritik hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre çeşidini içermektedir (Şekil 4) (26).



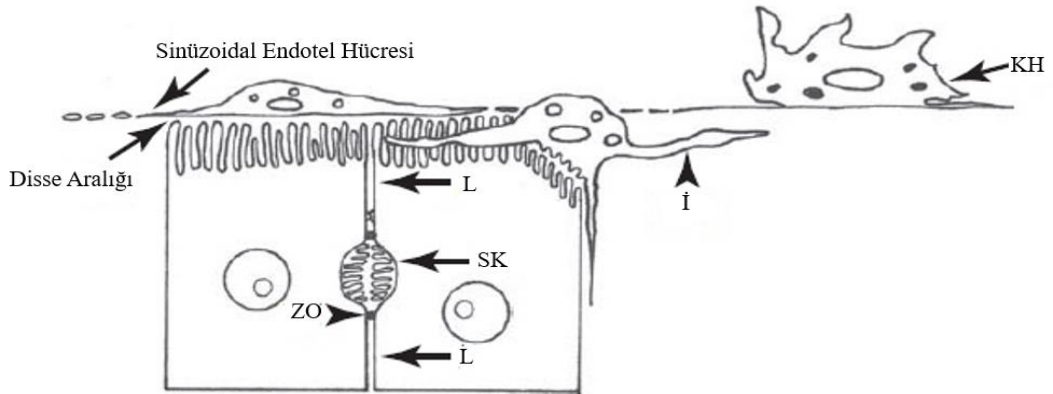
Şekil 4. Sinüzoid ve ilişkili hücrelerin diyagramı. (E) Endotel hücre, (K) Kupffer hücresi, (İ) İto hücresi, (Mø) Makrofaj, (H) Hepatosit, (Nø) Nötrofil, (KKH) Kırmızı kan hücresi (27)

Hepatositler, parenkimal hacmin yaklaşık %80'nini oluştururken karaciğerdeki tüm hücre sayısının %60-70'ini oluşturmaktadır (12). Hepatositler yaklaşık olarak 20-30 μm çapında, 5000 μm^3 hacminde çok yüzeyli hücrelerdir (11). Yuvarlak ve merkezde konumlanmış nükleuslara ve bol miktarda sitoplazmaya sahiptirler (20). Hepatosit çekirdeği, hücre hacminin %5-10'unu oluşturmaktadır (12). Nükleus sayısı bir veya iki tane olabilir. Yetişkin insanların %40'ında bu nükleuslar tetraploiddir. Kromozom sayısı hücre yaşlanması veya oksidatif stres ve metabolik olarak aşırı yüklenme durumlarında uyarılan karaciğerin yenilenmesi sonucu artmaktadır (11).

Hepatositin plazma membranı, seçici bir bariyer görevi görerek hücre içi kompozisyonun korunmasını sağlayan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Morfolojik ve fonksiyonel olarak sinüzoidal (bazolateral), hücre içi (lateral) ve kanaliküler bölge (alan) olmak üzere üçe ayrılır. Bu membran kısımları akışkanlık, enzim ve reseptör yapısı ve birleşmiş transport sistemindeki çeşitlilikler nedeniyle biyokimyasal olarak farklılık göstermektedir (12).

Sinüzoid membranı, Disse aralığına uzanan 0.5 μm uzunluğunda çok sayıda mikrovillus yapısı sergilemektedir. Tek bir mikrovillus, fenestrasyonlu sinüzoidal endotel hücrelerinin sinüzoid lümenlerine uzantı yaparak hepatositler ile sinüzoidal

kan arasında doğrudan temas sağlamaktadır. Kanaliküler membran, hepatositlerin apikal (safra) kutbunda bulunmaktadır. Bu bölge, hepatosit membran yüzeyinin yaklaşık %15'ine karşılık gelmektedir. İki ila üç komşu hepatositin apikal kutbunda bulunan hücre membranı katlantıları oldukça özelleşmiş bir alan olan safra kanalikülünü sınırlamaktadır (12). Apikal yüzey, safra oluşturmaya yönelik elektrolitlerin ve organik çözülmüş maddelerin salgılanma yeridir (11). Lateral membran, safra kanalikülünden sinüzoidal yüzeye kadar uzanmaktadır. Komşu hepatositlerin birbiri ile temas ettiği bu alanda hücrelerarası iletişim gerçekleşmektedir (Şekil 5). Bu bölgede çeşitli yan yüzey bağlantı kompleksleri (sıkı bağlantılar, desmozomlar, neksus) bulunmaktadır. Sıkı bağlantılar (zonula okludens), safra kanalı etrafında banta benzer bir yapıda uzanmaktadır. Fiziksel bir bariyer olarak görev görmektedir ve makromoleküllerin karşılıklı olarak safra kanalikülünden hücrelerarası boşluğa geçmesini önlemektedirler. Ancak, su ve elektrolitler bu bariyeri geçebilmektedirler. Desmozomlar, komşu hepatositler arasındaki hücre iskeleti bazlı bağlantıdır. Bu yapılar hepatosit yan yüzeyinde düzensiz olarak dağılmakta olup, karaciğer dokusunun mekanik sabitleyicisi olarak görev almaktadır. Neksuslar, iki komşu hepatosit sitoplazması arasında iletişim sağlamaktadır (12). Bu bağlantılar iyonların ve küçük moleküllerin geçişine izin vermektedir (11).



Şekil 5. Hepatositin ince yapısı. ZO (zonula okludens), L (lateral yüzey), KH (Kupffer hücresi), İ (İto hücresi), SK (Safra kanalikülü) (17)

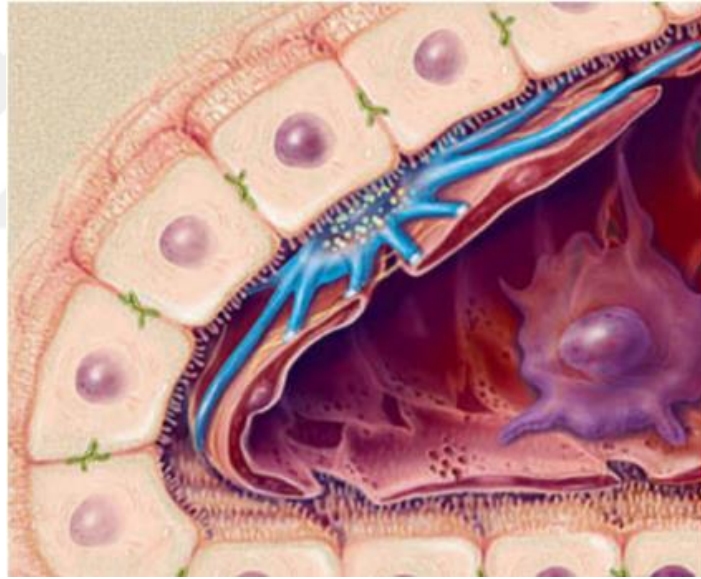
Endoplazmik retikulum (ER) birbiri ile bağlı yassı sisterna ve vezikülleri bulunan membran yapısında tübüler bir sistemdir. Hepatosit hacminin %15-20'sini oluşturmaktadır. Hepatositlerde bulunan ER'nin temel olarak %40'ını çeşitli yoğunluklara ve farklı lümenlere sahip küçük veziküller içeren düzgün yüzeyli ER'ler

(DER) oluşturmaktadır. Karaciğer lobül ve asinüslerindeki ER dağılımları farklılık göstermektedir (12). DER'ler sentrilobüler hepatositlerde periportal hepatositlere göre daha fazla bulunurken, granüllü ER'ler (GER) perinükleer, perikanaliküler bölgelerde daha sık dağılım göstermektedir (11). ER'ler karaciğerde degradesyonda, vitamin C sentezinde, yağ asidi, fosfolipid ve trigliserit metabolizmasında, protein sentezinde, kolesterol ve safra asidinin sentezinde ve metabolizmasında ve ksenobiyotiklerin (örneğin ilaçlar ve endojen maddelerin) biyotransformasyonunda görev almaktadır. Golgi aparatı, hepatosit hacminin %4'ünü oluşturmakta olup, genellikle hepatositlerde 4-6 paralel yassı sisternadan ve uçtan tomurcuklanan küçük veziküllerden oluşmaktadır. Golgi aparatı her bir hepatositte genellikle nükleusun yakınında dağılmış halde bulunur (11, 12). Bu organel, lipoproteinlerin, safra asidinin, membran reseptörlerinin sentezlerinde ve yeniden oluşturulmasında görev almaktadır (12). Hepatositlerde bulunan lizozomlar morfolojik ve fonksiyonel olarak birbiri ile ilişkili hidrolitik enzimleri içeren heterojen bir organel popülasyonudur. Bu organeller tek bir membran ile sarılmıştır ve elektron yoğundur. Her bir hepatosit 300'e yakın lizozom içermektedir (11, 12). Mitokondriyonların hepatositlerdeki sayıları 1-2000 arasında değişmekte olup, hepatosit hacminin yaklaşık %18-20'sini oluşturmaktadır (11). Şekilleri değişkendir (yuvarlak ya da uzun) ve hücre içerisinde hareket edebilir. Sayı ve büyüklükleri bölgesel yerleşimine göre değişkenlik göstermektedir. Perisantral bölgedeki mitokondriyonlar periportal bölgedekilere göre sayıca çok fazla ve küçük boyuttadırlar (12). Hepatositler aynı zamanda peroksizom, mikrotübül ve mikrofilament içermektedirler (27).

Kupffer hücreleri, sinüzoidal aralıkta bulunan (Disse aralığına ulaşabilirler) makrofajlardır (28). Karaciğer hacim/kütlesinin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (27). Kupffer hücreleri, patojenleri ortadan kaldırmak için sitokinleri ve diğer inflamatuvar aracılı salgılamaktadırlar. Enfeksiyon ajanlarına, toksik bileşiklere ve ksenobiyotiklere akut ve kronik cevapların oluşturulmasında önemli rol oynayan Kupffer hücreleri aynı zamanda yağ depolayan hücreler ve endotelial hücreler ile etkileşime girmektedir (28, 29). Kupffer hücreleri ultrastrüktürel olarak bol lizozom, mikrovillus, filopodya ve piktonik veziküller ile karakterizedir (27). Bu hücrelerin karaciğer asinüsünde dağılımları ve boyutları farklılık göstermektedir. Zon 1'de büyük bir yapı sergileyen bu hücrelerin sayısı çoğunluktadır. Bununla birlikte zon 3'teki

aktive olmuş Kupffer hücreleri tümör hücreleri, parazitik ve mikrobiyal mikroorganizmalara karşı daha sitotoksik etki gösterirler (28).

İto hücreleri, Disse aralığı içerisinde yer alan, sinüzoidleri çevreleyen uzun sitoplazmik yıldız şeklindeki (stellat) hücrelerdir. Toplam karaciğer hücrelerinin %10'undan daha azını oluşturmaktadır (11). Oval ya da uzun nükleuslara ve iğ şeklinde bir hücre gövdesine sahiptir. Kısmen gelişmiş GER, küçük Golgi aparatına ve belirgin dendrit benzeri sitoplazma çıkıntılarına sahiptir. Tek bir yıldız hücresi genellikle ikiden fazla sinüzoidin etrafını sarmaktadır ve komşu hepatositlerle iletişimin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Şekil 6). Bu yakın temas, sitokinlerin ve çözünen diğer araçların hücreler arasında taşınmasına olanak sağlamaktadır. İto hücreleri vitamin A depolanması, ekstrasellüler matriks proteini üretimi, mikrovasküler tonusun kontrolü ve rejenerasyon gibi görevlere sahiptir (30).



Şekil 6. Büyük büyütmede subendotelyal boşluktaki İto hücresinin çizimi (30)

Vitamin A'nın %50-80'i karaciğerde depolanmaktadır. Depolanan vitamin A'nın %80-90'ı yağ depozitleri olarak İto hücrelerinin sitoplazmalarında damlacık halinde bulunmaktadır. Elektron mikroskopik incelemelerde İto hücrelerinin sitoplazmalarında iki tip vitamin A yağ damlacığı gözlenmiştir. Bunlar tip I ve tip II damlacıklarıdır. Tip I yağ damlacıklarının çeşitli boyutları mevcut olup çapları 2µm'yi geçmemektedir. Periferik bir membranı olmayan tip II damlacıkları daha büyük boyuttadır ve çapları 8 µm'ye kadar ulaşmaktadır. İki tip A vitamini damlası arasındaki

ilişki kısmen bilinmektedir. Bazı görüşlere göre tip II damlacıklarının birçoğunun tip I damlacıklarının füzyonu sonucu oluştuğu belirtilirken bazı görüşlere göre de tip II damlacıkların tip I vitamin damlacıklarının öncülleri olduğu belirtilmektedir (30).

Hem normal karaciğerde hem de karaciğer fibrojenezi sürecinde İto hücreleri ekstrasellüler matriks üretmektedirler. Bu hücreler aktif durumdayken fibril oluşturmayan kollajenlerden (Tip IV ve VI) oluşan bir matriks oluşturmaktadırlar. Bazı karaciğer hasar türlerinde ise (örn. siroz) bazal membran materyali ve kollajen lifleri (tip I ve III) Disse aralığında birikmektedir (11).

2.2 Lezzet Arttırıcılar

Gıda katkı maddeleri, gıda endüstrisinde gıdaların lezzetlerini, renklerini, tatlarını, görüntülerini ve dokularını iyileştirmek için küçük miktarlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Gıda endüstrisinde, yaklaşık 230 farklı bileşeni içeren 25 gıda aroma maddesi sınıfı bulunmaktadır (31). Lezzet arttırıcılar, umami veya iştah açıcı tatların (diğer dört tat olan tatlı, tuzlu, ekşi ve acı) reseptörlerini aktive eder ve böylece ürünlere yeni birer tat katarlar. Bu nedenle tat arttırıcılar bir çeşit aroma görevi görmektedirler.

Aroma maddeleri büyük ve farklı malzeme gruplarını içermektedirler. Bunlar:

- Gıdalarda doğal olarak bulunmayan yapay maddeler,
- Normalde gıda olarak tüketilmeyen doğal maddeler, bu maddelerden türevlenen ürünler ve bunlara eşdeğer doğaya özdeş tatlandırıcılar,
- Otlar ve baharatlar, bunlardan türevlenen ürünler ve bunlara eşdeğer doğaya özdeş tatlandırıcılar,
- Normalde gıda olarak tüketilebilen sebze ve hayvansal ürünlerden elde edilebilen işlenmiş veya işlenmemiş doğal tatlandırıcı maddeler ve bunların sentetik eşdeğerleridir (32).

2.2.1 Umami

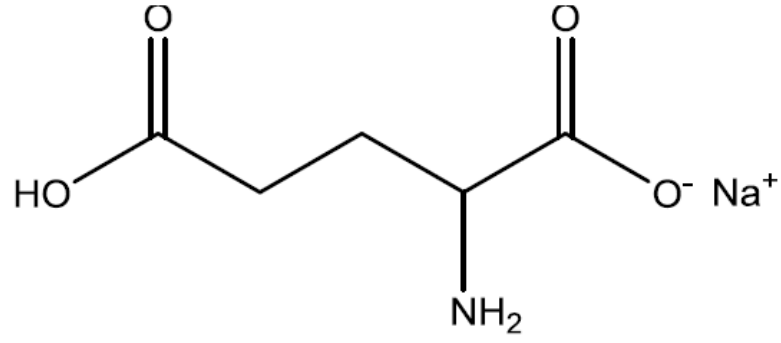
20. yüzyılın başlarında Profesör Ikeda tarafından lezzetli, iştah açıcı eşsiz bir tat olan umami tanımlanmıştır (33). Serbest amino asitlerde, nükleotidlerde, peptidlerde, organik asitlerde ve bunların türevlerini içeren geniş çaptaki gıdalarda bulunmaktadır. Genellikle tatlı tadı düzenleyerek, tuzlu tadı arttırarak, ekşiliği ve acılığı bastırarak yiyeceklerin tadını iyileştirirler (34).

1908 yılında Ikeda tarafından tanımlanan ilk tanımlanan umami ajanı MSG'dir (34). Diğer umami ajanı 1913'te tanımlanmıştır. Ikeda'nın öğrencisi Shintaro Kodama kurutulmuş palamut balığına inosin-5'-monofosfatı (IMP) keşfetmiştir. Bundan birkaç yıl sonra bir başka bilim insanı olan Kuninaka şitaki mantarının guanilat-5'-monofosfatı (GMP) içerdiğini keşfetmiştir (33, 35).

2.2.2 Monosodyum glutamat

MSG, L-glutamik asitten türetilen çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılan doğal bir lezzet arttırıcısıdır. MSG, et ve balık gibi yüksek proteinli gıdalarda, parmesan ve rokfor gibi belirli peynir ürünlerinde ve domates, mantar, brokoli gibi sebzelerde bulunmaktadır (36). MSG, işlenmiş gıdalarda sıklıkla kullanılan bir lezzet arttırıcı ve stabilizör olarak bilinmektedir (31). Son yıllarda lezzetleri geliştirmek amacıyla tüm dünyada işlenmiş gıdalarda ve ev yemeklerinde bir tuz olarak kullanılan MSG'nin kullanımı giderek daha çok artmaktadır (37).

MSG, genellikle beyaz bir toz yapısındadır (38). %78'i glutamik asitten ve %22'si sodyumdan ve sudan oluşmaktadır (39). Su, beş karbon atomundan oluşan glutamik asit ve serbest sodyum iyonlarını iyonize etmektedir. Bir karboksilik (-COOH) grubuna ve bir "alfa" karbon atomuna (doğrudan -COOH grubuna bağlı bir karbon atomu) bağlı bir amino (-NH₂) grubuna sahiptir (Şekil 7). Moleküler formülü C₃H₈NNaO₄ ve ağırlığı 169,11 g/mol'dür (38). Erime noktası 232 °C'dir (31).



Şekil 7. Monosodyum glutamatın kimyasal formülü (31)

Günlük olarak MSG tüketimi bölgesel olarak değişkenlik göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde günlük MSG alımı ortalama 0.3-1,0 g/gün olduğu tahmin edilirken İngiltere’de ortalama 0,58 g/gün Almanya’da ise 10,0 g/gün olduğu bildirilmiştir. FDA’nın (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) MSG’nin güvenli bir madde olduğunu bildirmesine rağmen, çeşitli deneysel hayvan çalışmalarında MSG’nin tüketiminin kronik dönemde olumsuz sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir. Bu olumsuz etkiler timus, beyin, pankreas, testis, karaciğer ve böbrek gibi farklı organlarda gösterilmiş ve obezite, hipertansiyon, baş ağrısı, nörotoksisite gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (31).

2.3 MSG ve Oksidatif Stres

Karaciğer, beyin, testis ve böbrek gibi farklı organlarda MSG’nin etkisi ile meydana gelen doku hasarlarının oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bilindiği üzere oksidatif stres, hücrel metabolizmanın bozulmasına, lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asitlerin hasar görmesine neden olan hücre içi ROS seviyesinin arttığı durumdur (31).

ROS, oksijen radikallerini içeren (süperoksit, hidroksil, preoksil, alkoksil) ve oksidan maddeleri olan ve/veya kolayca radikallere dönüşebilen küçük oksijen türevi moleküllerdir. ROS üretimi genellikle süperoksit üretimi ile başlayan reaksiyon dizisidir. Süperoksit (O₂⁻) hızlı bir şekilde (özellikle düşük pH’ta) süperoksit dismutaz enzimi tarafından H₂O₂’ye parçalanır (40). H₂O₂ iyonik yükten yoksundur. Bu nedenle serbestçe yayılarak hücre içi makro moleküllere zarar verebilir. H₂O₂, Fenton reaksiyonu yoluyla geçiş-metal iyonlarıyla (özellikle demir) etkileşerek oldukça

reaktif hidroksil radikallerini ($\bullet\text{OH}$) oluşturur. Bu hidroksil radikalleri DNA baz hasarına ve iplik kırılmalarına, lipid peroksidasyonuna ve birçok amino asit kalıntısının modifikasyonuna neden olmaktadır. Eğer ROS türevli hasarlar kontrol edilmezse ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patofizyolojik duruma neden olabilir (41).

ROS (temel olarak O_2^- ve H_2O_2) birçok karaciğere özgü hücreleri fonksiyonel olarak etkileyerek fibrosisin gelişmesine neden olabilir. Hepatositlerde yüksek miktarda ROS üretimi bu hücrelerin ölümüne neden olur. Bunun sonrasında Kupffer hücreleri ve İto hücrelerinde inflamatuvar ve fibrotik yanıtı güçlendirmek için tümör nekrozis faktör alfa ($\text{TNF-}\alpha$), dönüştürücü büyüme faktörü beta ($\text{TGF-}\beta$) gibi birçok aracı salınır. Alkol ve endotoksin gibi pro-fibrojenik uyarılar, Kupffer hücrelerinden biyolojik aktif araçların (kemokinler, sitokinler, adezyon molekülleri ve ROS) salınmasını/ ekspre edilmesini sağlar (41).

2.4 MSG ve Apoptoz

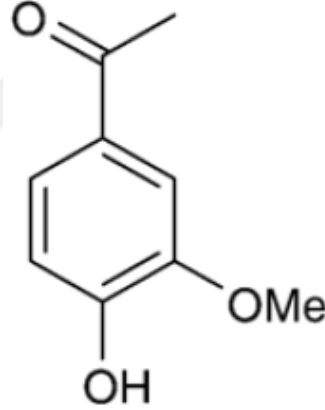
MSG'nin esansiyel olmayan bir bileşeni olan glutamat, genellikle lezzet artırıcı gıdalarda kullanılmaktadır (42). Glutamat memeli merkezi sinir sisteminde iyonotropik glutamat (iGlu) ve metabotropik glutamat (mGlu) reseptörlerini (mGluR) aracılığıyla etki eden nörotransmitter olup hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (42, 43). mGluR sekans homolojisine göre üç ayrı gruba [Grup I (mGlu1 ve mGlu5 reseptörleri), Grup II (mGlu2 ve mGlu3 reseptörleri) ve Grup III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 mGlu8 reseptörleri)] ayrılmaktadır (43). Tüm mGluR merkezi sinir sisteminde eksprese olmakla birlikte yapılan son çalışmalar tat tomurcukları (mGlu4), sıçan hepatositleri (mGlu5), insan melanositleri gibi periferik organlarda da eksprese olduklarını göstermiştir (44).

Aktive olan mGluR5, hücrelerde hücre içi Ca^{+2} değişimlerine neden olabilmektedir. Bu değişimler hücre devamlılığı, farklılaşması ve büyümesinde temel rol oynayan birçok reaksiyonu aktive etmektedir. Bu nedenle MSG tüketimine bağlı olarak fazla glutamatın varlığı glutamat reseptörlerinin şiddetli aktivasyonuna neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, hücrede içinde Ca^{+2} arttığında ya da ER, nükleus ve mitokondriyon gibi organellere yüksek miktarda Ca^{+2} girdiğinde, proteazlar ve

endonükleazlar (kaspazlar) gibi kalsiyuma bağılı enzimler aktif hale gelmekte ve bu durum hücrede apoptoza neden olmaktadır (45).

2.5 Aposinin

Schmiedeberg tarafından 1883 yılında *Apocynum cannabinum* (Kanada keneviri) köklerinden ekstre edilen APO (4-hidroksi-3-metoksiasetofenon) ödem ve kalp sorunlarında tedavi olarak kullanılmıştır (46). 1971 yılında APO, geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) iyi bilinen ve Hint, Nepal, Tibet ve Pakistan dağlarında yetişen doğal bir bitki olan *Picrorhiza kurroa*'nın köklerinden izole edilerek tanımlanmıştır (46, 47). APO, moleküler ağırlığı 166,17 g/mol olan bir asetofenondur (Şekil 8) (46, 48). Hafif vanilya kokusuna sahiptir ve erime noktası 155 °C'dir. Fagositik ve fagositik olmayan hücreleri içeren birçok deney modelinde NOX aktivitesini bloke etmek için kullanılan yaygın bir antioksidan ve anti-inflamatuardır (49).

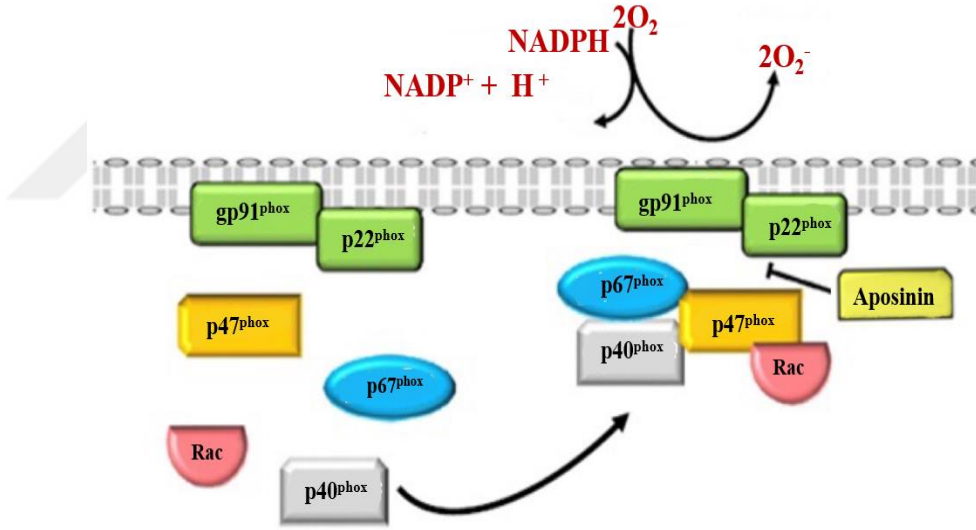


Şekil 8. APO'nun formül bazındaki yapısı (48)

Tüm NOX ailesi üyeleri (NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX-5) O₂'yi O₂'e indirgemek için biyolojik membranlar boyunca elektron taşıyan transmembran proteinlerdir.(40). Karaciğerde NOX-1, NOX-2 ve NOX-4 eksprese olmaktadır (50). NOX-2 bilinen diğer adı ile gp91^{phox} ilk keşfedilen NOX ailesi üyesi olup inflamasyonda ve immün korumada önemli rol oynayan fagositlerde bulunmaktadır (50, 51). NOX-1, NOX-2 ile %60 amino asit benzerliğine sahip olup vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, astrositler ve mikroglialar gibi birçok hücrede eksprese olmaktadır. İlk olarak böbrekte keşfedilen NOX-4, NOX-2 ile %39 aminoasit

benzerliğine sahip olup osteoklastlarda, endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, hematopoetik kök hücrelerinde, fibroblastlardan ve nöronlarda eksprese olmaktadır(40, 50).

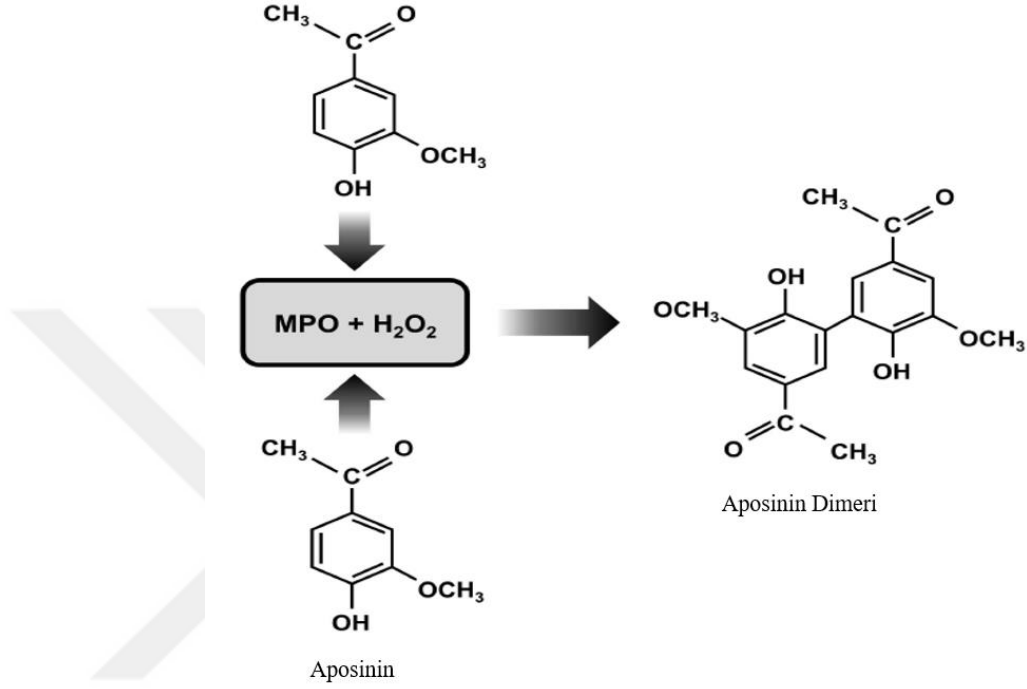
NOX kompleksi çoklu alt birimden oluşan membranla ilişkili enzimatik bir sistem olup moleküler O_2 'yi azaltmak ve O_2^- üretmek için elektron verici olarak NADH/NADPH'tan yararlanmaktadır (52, 53). NOX kompleksi sitozolik ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$) ve membrana bağlı ($gp91^{phox}$ /NOX-1/NOX-4 ve $p22^{phox}$) birimlerden ve düşük molekül ağırlıklı G proteini (rac 2 ya da rac 1) oluşmaktadır (46). Bu alt birimlerin birleşimi ile bir enzim kompleksi oluşmaktadır (52, 53). APO $p47^{phox}$ 'un membrana geçişini engelleyerek NOX aracılı O_2^- salınımını engellemektedir. Böylece NOX kompleksinin birleşmesinin engellenmesinde kritik rol oynamaktadır (Şekil 9) (52).



Şekil 9. NOX aktivasyonu ve APO'nun etki mekanizması (52)

APO, NOX kompleksinin birleşmesini önleyerek NOX yoluyla süperoksiti inhibe etmektedir. Bununla birlikte, bu kompleksin inhibe edici etkisi yalnızca gecikme süresinden sonra meydana gelmektedir. Bunun nedeninin NOX bileşenlerinin kovalent olarak modifiye edilerek ve/veya aktive edilerek aposinin dimerlerini oluşturduğu düşünülmektedir (54). Miyeloperoksidaz (MPO), H_2O_2 ile birlikte APO'yu dimerize etmekte ve bu dimerizasyon enzim kompleksinin aktivasyonunu önlemektedir (Şekil

10). Ayrıca MPO seviyesini arttıran zimosan ajanlar da APO'nun etkinliğini arttırmaktadır. MPO'nun yanında horseradish peroksidaz (HRP) gibi peroksidazlar APO'nun dimer oluşumunu indükleyebilmektedir (49).



Şekil 10. APO'nun NOX inhibisyon mekanizması. APO miyeloperoksidaz (MPO) ve hidrojen peroksidaz (H₂O₂) tarafından dimerize edilir (49).

2.6 APO ve Apoptoz

Hayatta kalabilmemiz için vücudumuzda bazı hücrelerin ölmesi gerekmektedir. Normal fizyoloji ve doku fonksiyonunun korunması için hasar görmüş ve işlevsiz hücreler programlı hücre ölümü yoluyla sürekli olarak temizlenmekte ve sağlıklı yeni hücreler ile değiştirilmektedir. Hücre ölümü farklı patofizyolojik durumlarda ortaya çıkabilmektedir(55). Hücreler hipoksik ve toksik hasarlar sonucunda temel homeostatik fonksiyonlarını sürdürme kabiliyetlerini kaybetmekte olup hücrel stres ve enerji kaybına uğrayabilmektedir(56).

Mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK) 'ın bir alt ailesi olan-c-Jun N-terminal kinaz (JNK) hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere birçok önemli hücrel aktiviteyi düzenlemektedir (57). İnflamatuvar karaciğer

bozukluklarında JNK'nin aktivasyonu hepatositlerde apoptozun indüklenmesinde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır (58). Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda APO'nun yalnızca NADPH oksidazları inhibe ederek oksidatif stresi baskılamadığını aynı zamanda hasar sonucu JNK'nin aşırı fosforile olmasını engelleyerek hücreyi apoptozdan kurtardığı sonucuna ulaşılmıştır (59, 60).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

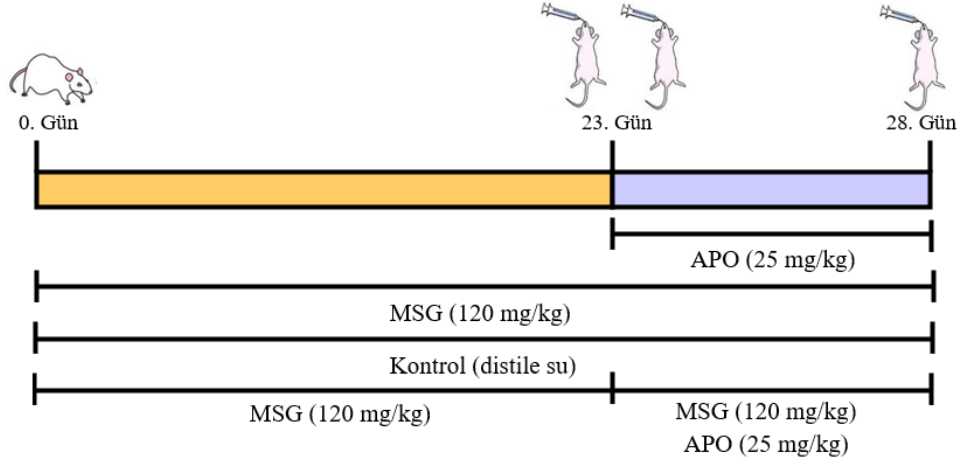
3.1 Gereç

Bu çalışmada, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi (ACU-DEHAM)'nden temin edilen genç yetişkin (8 haftalık) 200-250 g ağırlığında 32 adet Sprague Dawley albino erkek sıçan kullanıldı. Deneysel çalışma öncesi Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı (HDK-2020/45).

3.1.1 Deney grupları

Kullanılan sıçanlar deney süresince $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, standart aydınlık/karanlık (12/12 saat) siklusu olan Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında tutuldu. Deney grubundaki tüm sıçanlara standart sıçan yemi ve çeşme suyu ad libitum olarak verildi. Deney gruplarındaki sıçanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele ayrıldı ve çalışmanın başlangıcından sakrifiye edilene kadar hayvan ağırlıkları haftalık olarak tartılarak kayıt edildi. Kontrol grubundaki sıçanlara, 28 gün boyunca gavaj yöntemiyle distile su verildi. MSG grubundaki sıçanlara distile su ile hazırlanan MSG solüsyonu (120 mg/kg) (Katalog No: G1626, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) gavaj yöntemiyle 28 gün boyunca verildi. Aposinin (APO) grubundaki sıçanlara, %8'lik dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan APO solüsyonu (25 mg/kg) (Katalog No: sc-203321, Santa Cruz, California, U.S.A.) deneyin son 5 günü gavaj yöntemiyle verildi. Tedavi grubundaki sıçanlara (MSG + APO) ise MSG solüsyonu (120 mg/kg) gavaj ile uygulanırken, 25. Günden itibaren APO solüsyonu (25 mg/kg) gavaj yöntemiyle 5 gün boyunca uygulandı (Tablo 1)

Tablo 1. Deney hayvanlarına uygulanan gavaj uygulaması



28. Günde ketamin (9 cc/kg) ve ksilazin (7 cc/kg) derin anestezisi altında sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örnekleri histokimyasal, immünohistokimyasal ve geçirimli elektron mikroskopik düzeyde incelenmek üzere hazırlandı. Karaciğer doku örnekleri ve kalpten alınan kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için kullanıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Doku takibi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokuları %10'luk tamponlu formalin (Katalog No: HT501128, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) solüsyonunda fikse edildi. 72 saat fiksasyon sonrası dokular bir gece çeşme suyunda bekletildikten sonra aşağıda belirtilen basamaklara göre doku takip işlemi gerçekleştirildi (Thermo Citadel 2000, Massachusetts, U.S.A.) (Tablo 2).

Tablo 2. Karaciğer dokusuna uygulanan histolojik takip basamakları

Basamak	Süre
%70 etil alkol	1 saat 30 dakika
%80 etil alkol	1 saat 30 dakika
%90 etil alkol	1 saat 30 dakika
%96 etil alkol	1 saat 30 dakika
%100 etil alkol	1 saat 30 dakika
%100 etil alkol	1 saat 30 dakika

Tablo 2. Karaciğer dokusuna uygulanan histolojik takip basamakları (devam)

Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Parafin	12 saat
Parafin	3 saat

3.2.2 Işık mikroskobu düzeyinde histokimyasal incelemeye yönelik doku preparasyonu

Doku takip aşaması sonrası karaciğer doku örnekleri parafin bloklar elde edilmek üzere gömüldü (Thermo Histostar, Massachusetts, U.S.A.). Ardından parafin bloklar rotary mikrotom (Thermo- Shandon™ Finesse™ ME+, Massachusetts, U.S.A.) aracılığıyla 5 µm kalınlığında kesildi. Kesitler sıcak su banyosuna aktarıldıktan sonra histolojik incelemeler için lamlara alındı. Kesitlere, histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin boyası ve kollajen lif dağılımını değerlendirmeye yönelik Masson'un trikrom boyası uygulandı. Ayrıca doku kesitlerinde glikojeni göstermek amacıyla Periyodik asit-Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı. Boyanmış olan kesitler doku hasar derecesini belirlemeye yönelik olarak "hepatositlerde vakuolizasyon, parenkimada iltihabi hücre infiltrasyonu ve bağ dokusu yapılanması" bazında her bir parametre 0 ile 3 arasında [0:hasar yok, 1:hafif derecede hasar, 2:orta derecede hasar, 3:şiddetli hasar] maksimum skor 9 olacak şekilde skorlandı (61). Hepatositlerdeki glikojen içeriği kantitatif olarak Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.3 Hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması

Histolojik değerlendirme için lamlara alınan karaciğer doku kesitleri 40 dakika boyunca ksilende bekletilerek parafinden arındırıldı. Ardından azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %70) 10'ar dakika bekletilerek dokuların su alması sağlandı. %70 etil alkol solüsyonunu takiben karaciğer dokuları 10 dakika boyunca hematoksilin solüsyonunda (J.T Baker, Pensilvanya, U.S.A.) bekletildi. Ardından 7 dakika boyunca akarsu (çeşme suyu) altında tutuldu. Daha sonra 1 dakika %70 etil alkol uygulaması sonrası kesitler eozinde (Histoplus™) 5 dakika bekletilerek boyandı.

Ardından kesitler sırasıyla birer dakika süreyle %70, %90, ve %100 etil alkolde bekletilerek sudan arındırıldı. 2 kere 1'er dakika ksilende tutulan doku kesitleri şeffaflandırılma sonrası entellan ile kapatıldı.

3.2.4 Masson'un trikrom boyası

Kollajen lif dağılımını değerlendirmeye yönelik lamlara alınan karaciğer doku kesitleri 40 dakika boyunca ksilende bekletilerek kesitlerden parafin uzaklaştırıldı. Ardından kesitler azalan konsantrasyonda etil alkol serilerinde (%100, %90, %70) 5'er dakika bekletildikten sonra distile suda çalkalandı. Kesitler daha sonra Weighert demirli hematoksilen (Merck, New York, U.S.A.) solüsyonunda 10 dakika tutuldu. Akarsuda 10 dakika yıkanan ve distile suda çalkalanan kesitler Beibrich Scarlet-asit fuksin solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra fosfomolibdik asit-fosfotungistik asit (Katalog No: 79560, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) solüsyonunda 10 dakika tutulmayı takiben yıkamadan direkt olarak anilin mavisi (Katalog No: B8563, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletildi. Doku kesitleri distile su ile çalkalandıktan sonra 2 dakika %1'lik asetik asit (Katalog No: 33209, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) solüsyonuna konuldu. Bu basamaktan sonra kesitler distile suda yıkanmayı takiben hızlıca %90, %100 etil alkol ve ksilenden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

3.2.5 Periyodik asit- Schiff (PAS) reaksiyonu

Hepatositlerdeki glikojen içeriğini değerlendirmek amacıyla lamlara alınan karaciğer dokusu kesitleri 40 dakika boyunca ksilende bekletilerek parafinden arındırıldı. Ardından azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %70) 10'ar dakika bekletilerek kesitlerin su alması sağlandı. Kesitler distile suda çalkalandıktan sonra periyodik asitte (Katalog No:8222880100, Merck, New York, U.S.A.) 20 dakika bekletildi. Ardından 5 dakika boyunca kesitler akarsu altında tutuldu. Distile suda tekrar çalkalanan kesitler Schiff reaktifinde 20 dakika, sülfüroz asit solüsyonunda (Merck, New York, U.S.A.) ise 12 dakika bekletildi. Doku kesitleri 5 dakika akarsu altında tutulup, distile suda çalkalandıktan sonra dehidratasyon için yükselen etil alkol serisine (%70, %90, %100) alındı. 2 kez 3 dakika ksilende tutulan doku kesitlerinin şeffaflaşması sağlandı. Hemen ardından kesitler entellan ile kapatıldı.

Fotoğraflanan kesitlerdeki glikojen içeriği kantitatif olarak Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.6 Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme (TUNEL) yöntemi

Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere TUNEL metodu, üretici firmanın (TACS 2 TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit, Katalog No:4810-30-K Trevigen, Maryland, U.S.A.) verdiği kullanım kılavuzundaki yöntemeye göre uygulandı. Bu yöntemeye göre kesitler 57°C'lik etüvde 5 dakika bekletildi. Ardından kesitler sırasıyla 2 kez 5 dakika ksilende, 5 dakika %100 etil alkol, 5 dakika %95 etil alkol ve 5 dakika %70 etil alkolde bekletildi. Akabinde kesitler 2 kez 5 dakika PBS'te cam şale içerisinde yıkandı. Proteinlerin sindirilmesi için kesitler Proteinaz K (1:50) ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 2x2 dakika distile su yardımıyla yıkandı. Ardından kesitler Quenching solüsyonunda 5 dakika bekletildi. 1 dakika PBS ile tekrar yıkandıktan sonra kesitler 1xTdT Labeling tamponuna daldırıldı. Ardından dikkatlice kurutulan dokuların üzerine 50 µm Labeling reaksiyon karışımı konuldu ve nemli odada 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler durducu tampona daldırılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler 2 kez 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra Strep-HRP solüsyonu dokuların üzerine konularak 10 dakika 37°C'de bekletildi. Kesitler 2 kez 2 dakika PBS ile yıkandı ve hazırlanan DAB solüsyonu içerisinde 7 dakika daldırılarak bekletildi. Kesitler daha sonra 2 dakika distile su ile yıkandı ve 3 dakika metil yeşili ile zıt boyama yapıldı. Doku kesitleri sırasıyla distile su, %70 alkol, %95 alkol, %100 alkol ve ksilen içerisine 10 kere batırılıp çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı. Ardından entellan yardımıyla kesitler kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenen her bir kesitteki apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına oranlanması ile apoptotik indeks hesaplandı.

3.2.7 NOX-2 immünfloresan boyaması

%4'lük paraformaldehit (PFA) (Katalog No: 1040051000, Merck, New York, U.S.A.) ile 1 gün fikse edilen karaciğer dokuları sırası ile bir gece PBS, %15 sükröz ve %30 sükröz solüsyonlarının (0.1 M PBS, pH 7.3 ile hazırlanmış) içerisine konuldu. Her bir sükröz solüsyonundan sonra dokuların dibe çökmesi beklendi ve dokular

ardından gömme medyumu içerisinde -80°C 'de saklandı. Doku bloklarından kriyomikrotom (Thermo Shandon™, FSE, Massachusetts, U.S.A.) ile 8 μm kalınlığında kesitler lizinli lamlara alındı. Alınan doku kesitleri 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bir sonraki basamakta kesitler 2 kez 5 dakika boyunca cam şale içerisinde PBS ile yıkandı. Plastik şale içerisine konulan sitrat tamponu mikrodalga ile ısıtıldı ve kesitler 20 dakika boyunca tamponun buharında bekletilerek 15 dakika boyunca soğumaya bırakıldı. PBS ile yıkama işlemi sonrası spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için kesitler %10 tamponlu keçi serumunda (Life Technologies, U.S.A.) 10 dakika inkübe edildi. Blokajın ardından kesitlere tavşan anti-NOX-2 primer antikoru (%1'lik BSA-PBS-Triton-X-100 solüsyonu ile 1:100 oranında seyreltilmiş) (Katalog No: NBP2-41291, Novus, Bio-Techne, Minnesota, U.S.A.) uygulandı ve nemli odada 1 gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Daha sonra kesitler PBS yardımıyla 2 kere yıkandı ve floresan işaretli keçi anti-tavşan sekonder antikorida (1:1000) (Katalog No: A32740, Invitrogen, U.S.A.) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda kesitler 2 defa PBS yardımıyla tekrar yıkandı. 4'6- Diamidino-2-fenilidol (DAPI) içeren gliserollü kapatma solüsyonu (Katalog No:188804, Abcam, Cambridge, UK) kullanılarak kapatılan kesitler floresan mikroskobu (Zeiss Axio Scope, Oberkochen, Germany) ile incelendi. Fotoğraflanan kesitlerdeki ışımaya yoğunluğu, bütünleşik ışımaya (integrated density) değeri Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.8 Biyokimyasal incelemeler

3.2.8.1 Serum biyokimyasal analizleri

Dekapitasyon öncesi kalpten alınan kan örnekleri, içerisinde antikoagülan madde bulunmayan kuru vakumlu tüplere alınarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 4000 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri çalışma gerçekleştirilene kadar -20°C ' de saklandı. İlgili analizler, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.2.8.1.1 Serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesinin ölçülmesi

Serum örnekleri derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında çözümleri beklendi. Serum ALT ve AST aktivitesi, ticari kit (Biolabo- AST/ALT, Maizy, Hauts De France) kullanılarak spektrofotometre yardımıyla (BioTek, Vermont, U.S.A.) belirlendi. Kit içerisinde yer alan reaktiften 1 ml küvete konuldu. 37°C'ye kadar ısıtıldı ve üzerine örnekten 100 µL eklendi. Reaksiyonun başlamasının ardından 1 dakika sonra absorbansı 340 nm'de okundu. Bu değer başlangıç absorbansı olarak kaydedildi. Daha sonra 3 dakikalık bir süre boyunca 1'er dakika arayla 3 farklı ölçüm alındı. Dakika başına absorbans değişimi belirlendi (Δ Abs/min).

Serum ALT ve AST aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı ve sonuçlar IU/L olarak verildi.

$$\text{Serum ALT/AST aktivitesi (IU/L)} = (\Delta\text{Abs/min}) * 1746$$

3.2.8.1.2 Serum alkali fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçülmesi

Serum ALP aktivitesi, ticari kit (Biolabo-AST/ALT, Maizy, Hauts De France) kullanılarak spektrofotometre yardımıyla (BioTek, Vermont, U.S.A.) belirlendi. Kit içerisinde yer alan reaktiften 1 mL küvete konuldu. 37°C'ye kadar ısıtıldı ve üzerine örnekten 10 µL eklendi. Reaksiyonun başlamasının ardından 1 dakika sonra absorbansı 405 nm'de okundu. Bu değer başlangıç absorbansı olarak kaydedildi. Daha sonra 3 dakikalık bir süre boyunca 1'er dakika arayla 3 farklı ölçüm alındı. Dakika başına absorbans değişimi belirlendi (Δ Abs/min).

$$\text{Serum ALP aktivitesi (IU/L)} = (\Delta\text{Abs/min}) * 5450$$

3.2.8.1.3 Serum albümin konsantrasyonunun ölçülmesi

Albümin seviyeleri ticari kit (Teco Diagnostics- Albumin Reagent Set, Katalog No: A502-480, Anaheim, CA, U.S.A.) kullanılarak ölçüldü. Aşağıda verilen tabloda hazırlanan tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Bekleme süresinin ardından tüplerin absorbans değeri 630 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar g/dl olarak verildi.

Tablo 3. Serum albümin konsantrasyonu ölçümü için örnek hazırlama tablosu

	Örnek	Standart	Kör
Reaktif	1 ml	1 ml	1 ml
Örnek	10 µl	-	-
Standart	-	10 µl	-
Distile su	-	-	10 µl

$$\text{Serum albümin miktarı} = \frac{\text{Absorbans (örnek)}}{\text{Absorbans (standart)}} \times \text{Standart konsantrasyon (5 g/dl)}$$

3.2.8.1.4 Serum total bilirubin seviyelerinin ölçülmesi

Total bilirubin konsantrasyonu, ticari kit (Katalog No: 80443, Biolabo-Total Bilirubine, Maizy, Hauts De France) kullanılarak spektrofotometre yardımıyla (BioTek, Vermont, U.S.A.) belirlendi. Aşağıda verilen tabloda hazırlanan tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Bekleme süresinin ardından tüplerin absorbans değeri 550 nm’de köre karşı okundu.

Tablo 4. Serum total bilirubin ölçümü için örnek hazırlama tablosu

	Örnek	Standart	Kör
Reaktif 1	1 ml	1 ml	1 ml
Reaktif 2	50 µl	50 µl	-
Örnek	100 µl	-	100 µl
Distile su	-	-	50 µl

$$\text{Serum total bilirubin konsantrasyonu (mg/dl)} = [\text{Abs. Örnek} - \text{Abs. Kör}] \times 11.4^*$$

3.2.8.2 Karaciğer dokusu biyokimyasal analizleri

Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan karaciğer dokusu, PBS tamponu (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) ile yıkanarak tartıldı. Ependorf tüplere konulan karaciğer dokuları ölçümler gerçekleştirilene kadar -80° C’de saklandı. Biyokimyasal ölçümlerin yapılacağı gün -80° C’den çıkarılan dokular

soğutulmuş 150 mM KCl çözeltisiyle homojenize edilerek %10'luk doku homojenatı hazırlandı.

3.2.8.2.1 Doku malondialdehid (MDA) seviyelerinin ölçülmesi

Lipit peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyelerinin tayini için Ohkawa ve diğerleri tarafından geliştirilen metot kullanıldı (62). Metodun prensibi, lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin renk şiddetinin 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır (63).

Kullanılan reaktifler:

-R1, R2 ve R3

-50 µmol/L 1,1',3,3' tetraetoksipropan (standart stok solüsyonu)

Kit (Katalog No: E-EL-0060, Elabscience, U.S.A) prosedürüne göre hazırlanan çözeltiler aşağıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde deney tüplerine eklendikten sonra çözeltilerin karışması için iyice vortekslendi. Tüpler kaynar suda (en az 95 °C) 1 saat bekletilerek, akan çeşme suyunda soğutuldu ve sonrasında 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pembe renkli süpernatantların absorbansları 532 nm'de okundu ve 1.1',3,3' tetraetoksipropanla hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak nmol/g doku cinsinden MDA düzeyleri bulundu.

Tablo 5. MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

	Numune	Standart	Kör
Homojenat	20 µl	20 µl	20 µl
R1	20 µl	20 µl	200 µl
R2	600 µl	600 µl	600 µl
R3	200 µl	200 µl	-
%50 Glasiyel asetik asit	-	-	200 µl

3.2.8.2.2 Doku glutatyon (GSH) seviyelerinin ölçülmesi

GSH hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında antioksidan bir molekül olarak rol almaktadır. Bu çalışmada karaciğer dokularında GSH analizi, Beutler metoduna göre yapıldı (64). Metodun prensibi, analiz tüpünde bulunan GSH'nin 5,5'-ditiyobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarımsı renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmasına dayanmaktadır.

Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta %10'luk TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar 3000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant numuneleri GSH analizinde kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler:

- %10'luk triklor asetik asit
- %1'lik trisodyum sitrat
- %0,4'lük 5,5'-DTNB
- 0.3 molar disodyum hidrojen fosfat

Aşağıdaki tabloda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlanarak, çözeltilerin iyice karışması için tüpler vortekslendi. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutatyon standard grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{mol/g}$ doku cinsinden GSH düzeyleri bulundu.

Tablo 6. GSH seviyesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
%10'luk Homojenat	500 μl	-
Na₂HPO₄ (0,3M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 μl	500 μl

Tablo 6. GSH seviyesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler (devam)

Distile su	-	500 µl
------------	---	--------

3.2.8.2.3 Doku süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü

SOD aktivitesi, WST (suda çözünür tetrazolium tuzu) reaksiyonuna dayanan Sigma SOD Determination Kit (Katalog No:19160, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) ile belirlendi. Alınan 4 tüp sırasıyla Örnek, Kör 1, Kör 2 ve Kör 3 olarak etiketlendi. Tüm Örnek ve Kör 2 kuyucuklarına 20 µl Örnek eklendi ve 20 µl ddH₂O Kör 1 ve Kör 3 kuyucuklarına eklendi. 200 µl WST solüsyonu tüm kuyucuklara eklenerek karıştırıldı. 20 µl dilüsyon tamponu tüm Kör 2 ve Kör 3'lere eklendi. 20 µl enzim çalışma solüsyonu tüm Kör 1'lere eklendi ve karıştırıldı. 37 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 450nm'de absorbans değerleri okundu. SOD aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$(\% \text{ İnhibisyon Oranı}) = \frac{[(A \text{ Kör 1} - A \text{ Kör 3}) - (A \text{ örnek} - A \text{ Kör 2})]}{(A \text{ Kör 1} - A \text{ kör 3})}$$

3.2.8.2.4 Doku miyeloperoksidaz (MPO) seviyelerinin ölçülmesi

Doku MPO aktivitesi ticari olarak satın alınan kit (Katalog No: E-BC-K074-M, Elabscience, U.S.A.) ile gerçekleştirildi. Kit prosedüründe belirtilen şekilde hazırlanan standart çözeltiler, antikör kaplı 96 kuyucuklu plakaya 50 µl olarak eklendi. Yine kit içerisinde hazır halde bulunan örnek dilüent çözeltilerinden kuyucuklara 40 µl eklendi. Doku örneklerinden 10 µl alınarak örnek kuyucukların hacmi 50 µl'ye tamamlandı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaka, yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa HRP-Konjugat reaktifinden 50µl eklendi ve yeniden 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından yeniden yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Kromojen çözeltilerinden eşit konsantrasyonlarda kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 15 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda durdurma solüsyonu eklenerek plaka 450 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü.

3.2.9 Geçirimli elektron mikroskopik düzeyde inceleme

Karaciğer dokusu örnekleri %2,5'lük 0,1 M PBS tamponlu (pH: 7.2) gluteraldehit fiksatifi (Katalog No: A0589, PanReach AppliChem, Chicago, IL, U.S.A.) içerisinde 4 °C'de 4 saat süre ile fikse edildi. PBS tamponu ile yıkama sonrası %1'lik osmium tetroksit (Katalog No:19134, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, U.S.A.) ile 1 saat postfiksasyon yapıldı. Yükselen konsantrasyonda etil alkol serilerinden (sırasıyla %50, %70, %90, %100) geçirilen doku örnekleri saf propilen oksitten (Katalog No:82320, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) geçirilmeyi takiben Epon 812'ye gömülerek 60 °C'deki etüvde polimerizasyon gerçekleştirildi. Ultramikrotomda doku bloklarından yarı ince (1 µm) kesitler alındı ve toluidin mavi boyası (Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) ile boyandı. Yarı ince kesitlerde yapılan yer tayini sonrasında 60 nm kalınlığındaki ince kesitler bakır gridler üzerine alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Kontrastlama sonrası kesitler, geçirimli elektron mikroskopunda (Thermo Scientific TALOS L 120 C, The Netherlands) incelendi.

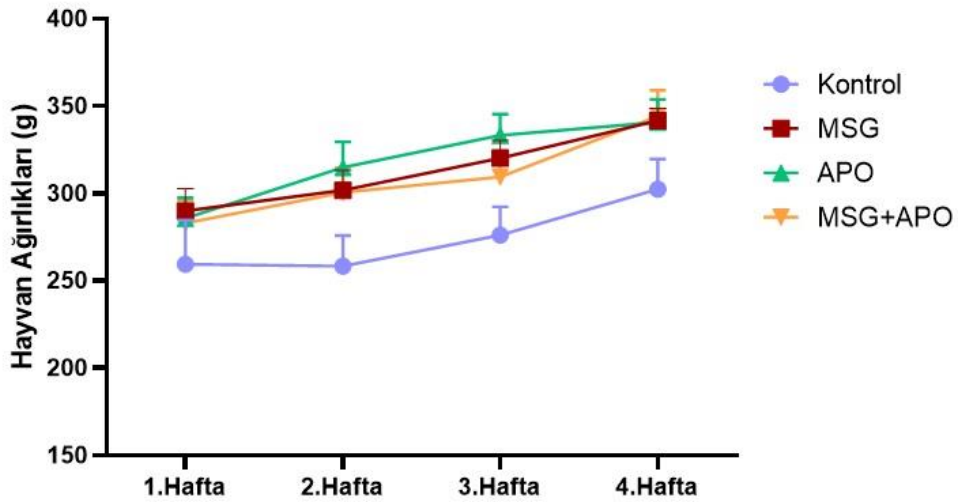
3.2.10 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için Graph Pad Prism 8.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Tüm verilerin analizi için one-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlığı Değerlendirmesi

Kontrol grubundaki sıçanların ortalama ağırlığı $302,343 \pm 17,36$ g olarak belirlenirken sıçan ağırlıkları MSG grubunda $341,65 \pm 7,036$ g, APO grubunda $340,76 \pm 13,10$ g, MSG+APO grubunda ise $344,231 \pm 14,68$ g olarak ölçüldü. MSG, APO ve MSG+APO gruplarındaki deney hayvanlarının ağırlıkları Kontrol grubundaki hayvanların ağırlıkları ile karşılaştırıldığında deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarının haftalık değişimi.

(Deney grupları arasında hayvan ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.)

4.2 Morfolojik Bulgular

Işık mikroskopik düzeyde gerçekleştirilen incelemelerde H&E ile boyalı Kontrol grubu karaciğer kesitlerinde normal parenkima yapısı gözlemlendi. Her bir lobülde hepatositler santral venden ışınal olarak sinüzoidlerin komşuluğunda uzanmakta olup, hepatositlerin nükleusları, hücrenin merkezinde ve yuvarlak yapıda izlendi (Resim 1). APO grubuna ait kesitlerde Kontrol grubuna benzer şekilde normal morfolojik yapı gözlemlendi (Resim 2). MSG grubuna ait karaciğer kesitlerinde parenkimada hepatositlerde dejenerasyonu yansıtır nitelikte vakuolizasyonun arttığı izlendi.

Genişlemiş olan sinüzoidlerde vazokonjesyon ve periportal alanda lökosit infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 3 ve 4). MSG+APO grubuna ait kesitlerde MSG grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer parenkimasında hepatositlerde daha az derecede vakuolizasyon gözlemlendi. Periportal alanda lökosit infiltrasyonu bazındaki bulgular minimal düzeyde idi (Resim 5).

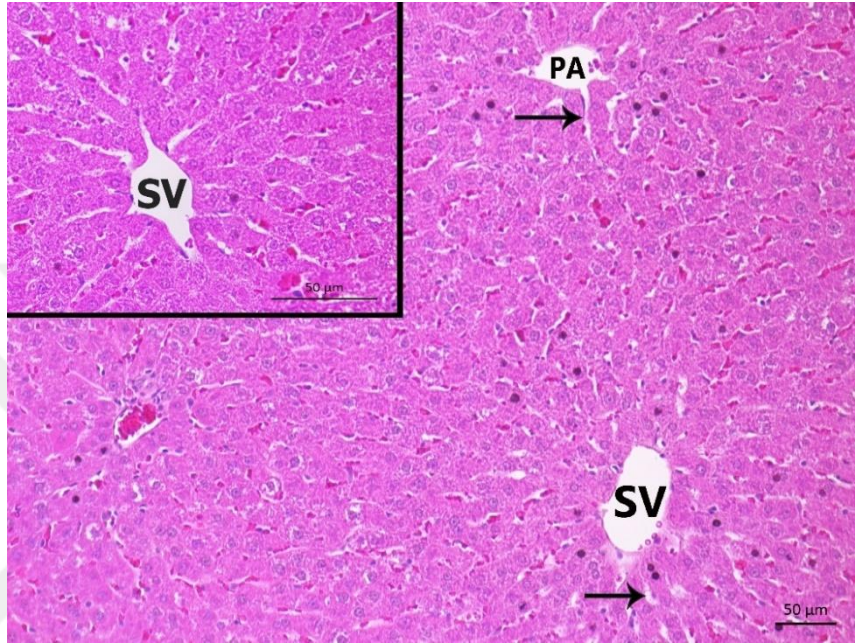
Karaciğer parenkimasındaki kollajen lif ve bağ dokusu yapılanmasının değerlendirilmesine yönelik olarak Masson'un trikrom boyası uygulanan Kontrol grubu kesitlerinde periportal alanda kollajen lif düzeyi normal düzeyde izlendi (Resim 6). APO grubunda da kollajen lif yapılanması periportal alanda normal seviyede gözlemlendi (Resim 7). MSG grubu kesitlerinde periportal alanda kollajen liflerde ve bağ dokusunda belirgin artış izlendi (Resim 8). MSG+APO grubunda aynı bölgede MSG grubuna kıyasla kollajen lif ve bağ dokusu normale yakın yapıda izlendi (Resim 9).

PAS reaksiyonu uygulanan kesitler incelendiğinde Kontrol grubuna ait kesitlerde hepatosit sitoplazmalarında glikojen varlığının belirteci olan belirgin PAS-pozitif (+) reaksiyon gözlemlendi (Resim 10). APO grubu kesitlerinde de Kontrol grubuna benzer şekilde hepatosit sitoplazmalarında belirgin PAS+ reaksiyon mevcuttu (Resim 11). MSG grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde hepatosit sitoplazmalarında PAS+ reaksiyonda düşüş gözlemlendi (Resim 12). MSG+APO grubuna ait kesitlerde ise hepatosit sitoplazmalarında belirgin PAS+ reaksiyon gözlemlendi (Resim 13).

Karaciğer dokusunun histopatolojik skora değerleri Kontrol grubunda $0,37 \pm 0,18$, APO grubunda $1,12 \pm 0,22$, MSG grubunda $4,25 \pm 0,31$ ve MSG+APO grubunda $1,75 \pm 0,31$ olarak belirlendi. MSG ve MSG+APO grupları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histopatolojik hasarın anlamlı olarak arttığı (sırasıyla *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$) gözlemlendi. APO grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubunda histopatolojik skorda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($^{aaa}p < 0,001$). MSG+APO grubunun histopatolojik skoru MSG grubu ile karşılaştırıldığında histopatolojik hasarın anlamlı derecede azaldığı ($^{+++}p < 0,001$) görüldü (Şekil 12).

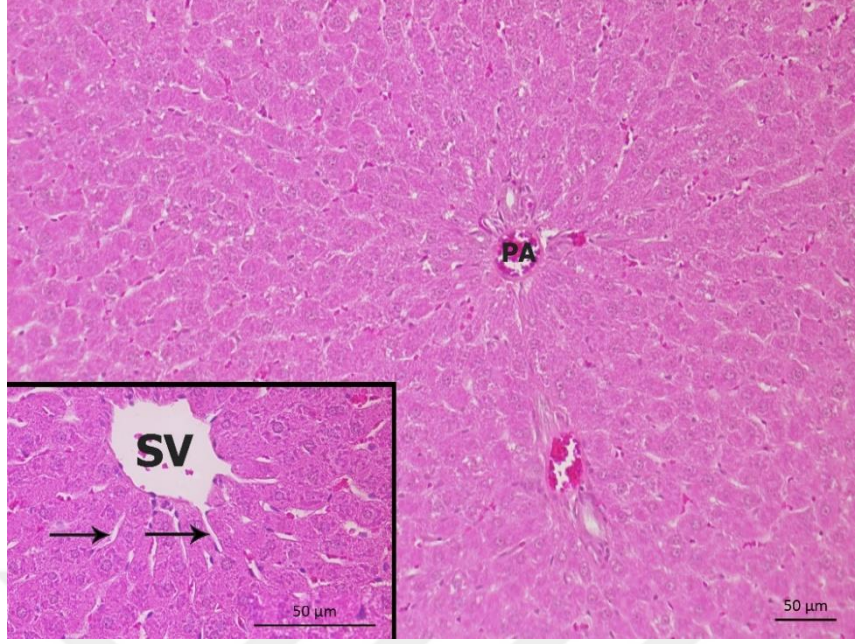
Tüm deney gruplarında hepatositlerde glikojen içeriği yoğunluğu PAS reaksiyonu eşliğinde belirlendi. PAS-pozitif reaksiyon yoğunluğu değerleri Kontrol grubunda 58822 ± 4651 , APO grubunda 54814 ± 1785 , MSG grubunda 39763 ± 2258 ,

MSG+APO grubunda 50689 ± 2192 olarak saptandı. Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubunda PAS-pozitif reaksiyonu yoğunluğunda anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla $***p < 0,001$, $^{aa}p < 0,001$). MSG+APO grubunun PAS-pozitif reaksiyonu yoğunluğu MSG grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($^{++}p < 0,01$) (Şekil 13).



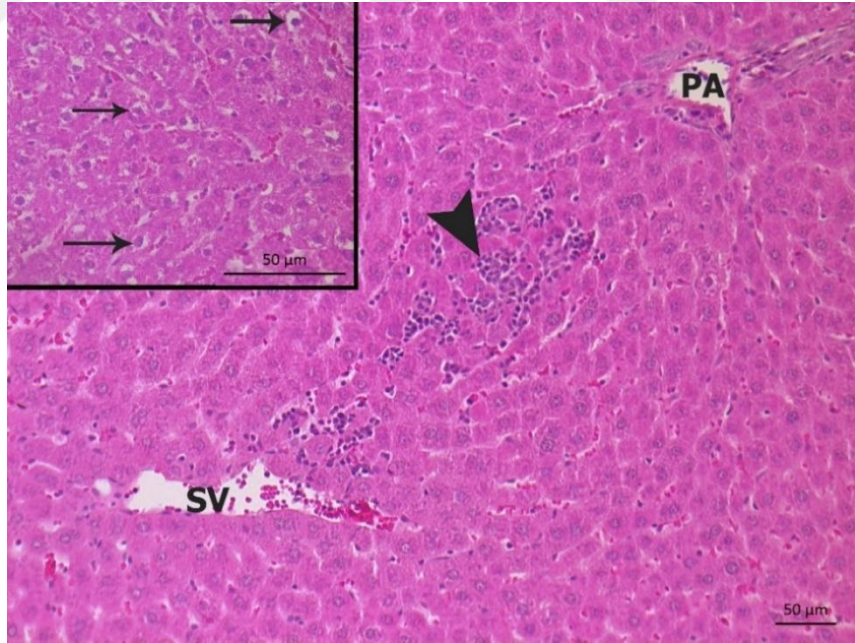
Resim 1. Kontrol grubuna ait mikrograf.

(Hepatositlerin santral venden ışınal olarak plaklar şeklinde dizildiği ve aralarında sinüzoidlerin (→) yer aldığı normal karaciğer parenkiması görülmektedir. İnet: Normal karaciğer lobül yapısı.SV: Santral ven, PA: Periportal alan, H&E boyaması.)



Resim 2. APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında normal yapıyı yansıtır morfoloji görülmektedir. İnet: Santral venden ışınal plaklar şeklinde dizilen hepatositler ve aralarında yer alan sinüzoidler (→) karaciğer parenkiması. SV Santral ven, PA: Periportal alan, H&E boyaması.)



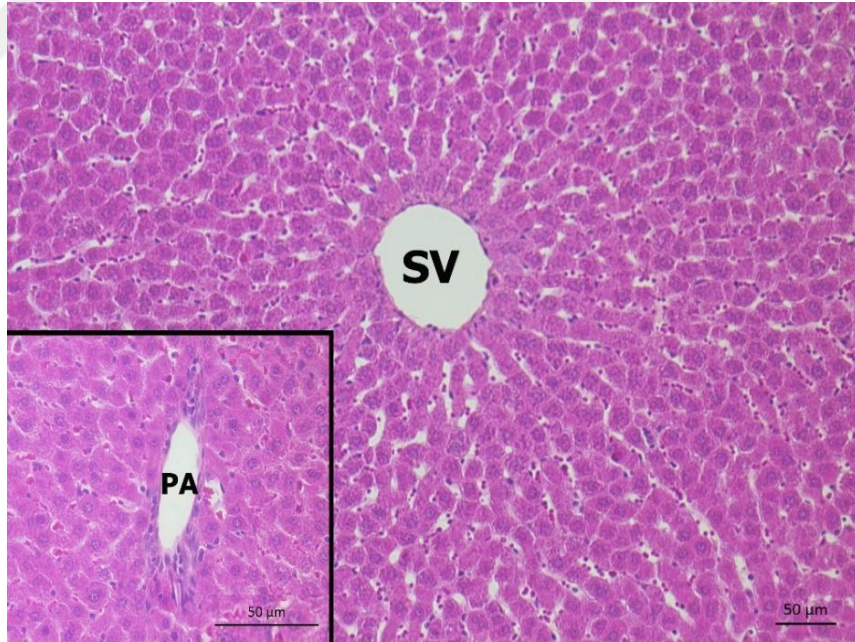
Resim 3. MSG grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkiması ve periportal alanda lökosit infiltrasyonu (►) görülmektedir. İnet: Hepatositlerde dejenerasyonu yansıtan vakuolizasyon (→). SV: Santral ven, PA: Periportal alan. H&E boyaması.)



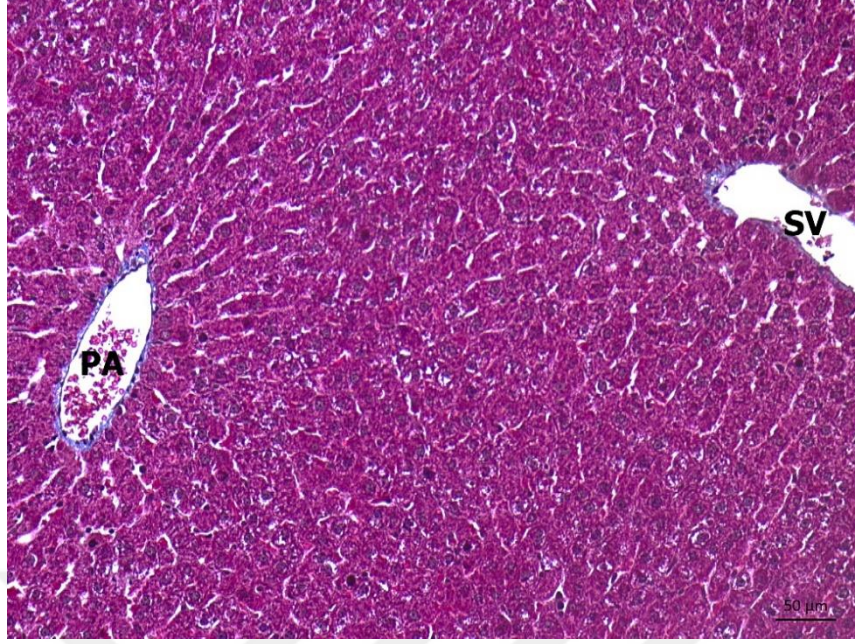
Resim 4. MSG grubuna ait mikrograf.

(Hepatositlerde dejenerasyonu yansıtan vakuolizasyon (→), sinüzoidlerde genişleme ve vazokonjesyon ve santral ven çevresinde lökosit infiltrasyonu (►) görülmektedir. SV: Santral ven. H&E boyaması.)



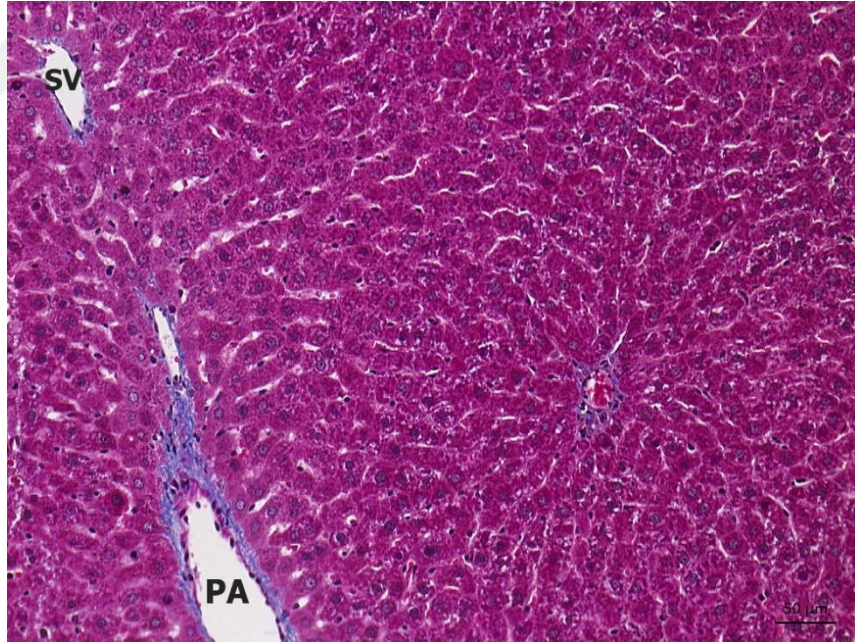
Resim 5. MSG+APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında normale yakın karaciğer morfolojisi izlenmektedir. İnet: Periportal alan. SV: Santral ven, PA: Periportal alan. H&E boyaması.)



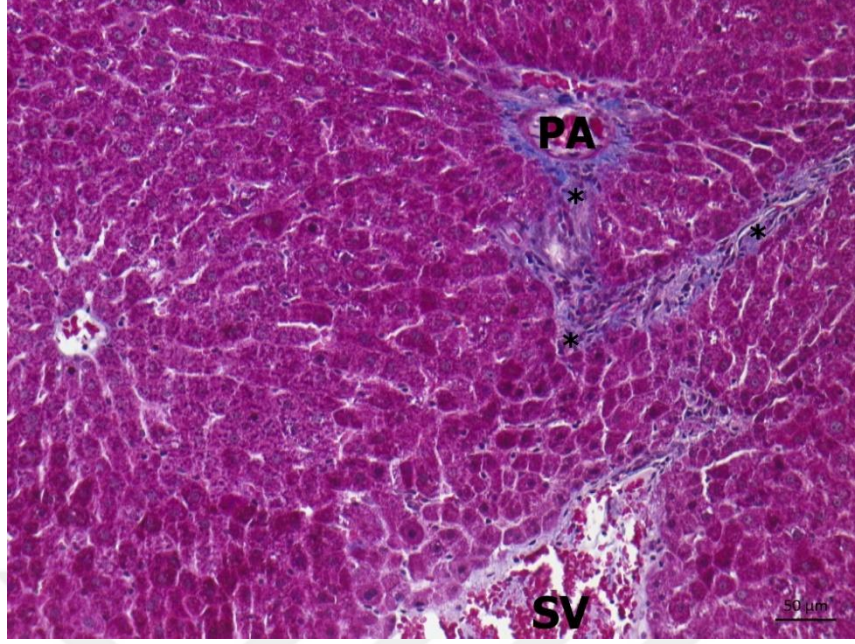
Resim 6. Kontrol grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında bağ dokusu yapısı normal yapılanmada izlenmektedir.SV: Santral ven, PA: Periportal alan. Masson'un Trikrom boyası.)



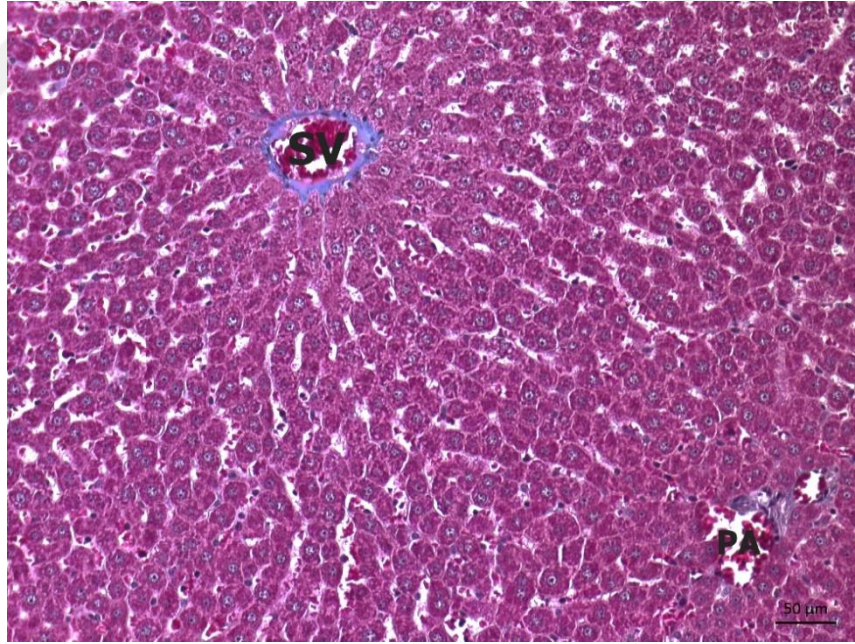
Resim 7. APO grubuna ait mikrograf.

(Bağ dokusu açısından karaciğer parenkimasında normal yapılanma gözlenmektedir. SV: Santral ven, PA: Periportal alan, Masson'un Trikrom boyası.)



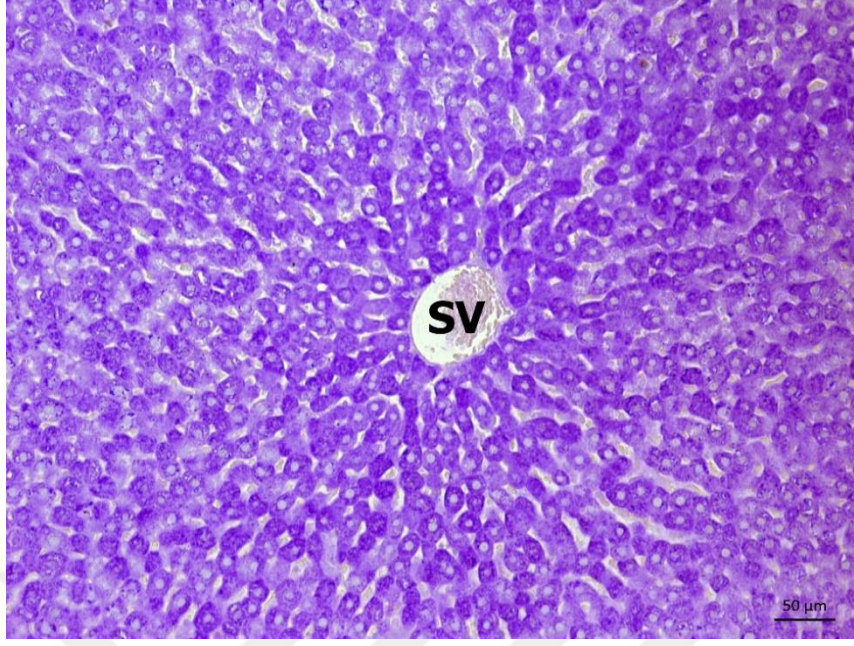
Resim 8. MSG grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında ve periportal alanda bağ dokusunda artış (*) izlenmektedir. SV: Santral ven, PA: Periportal alan. Masson'un Trikrom boyaması.)



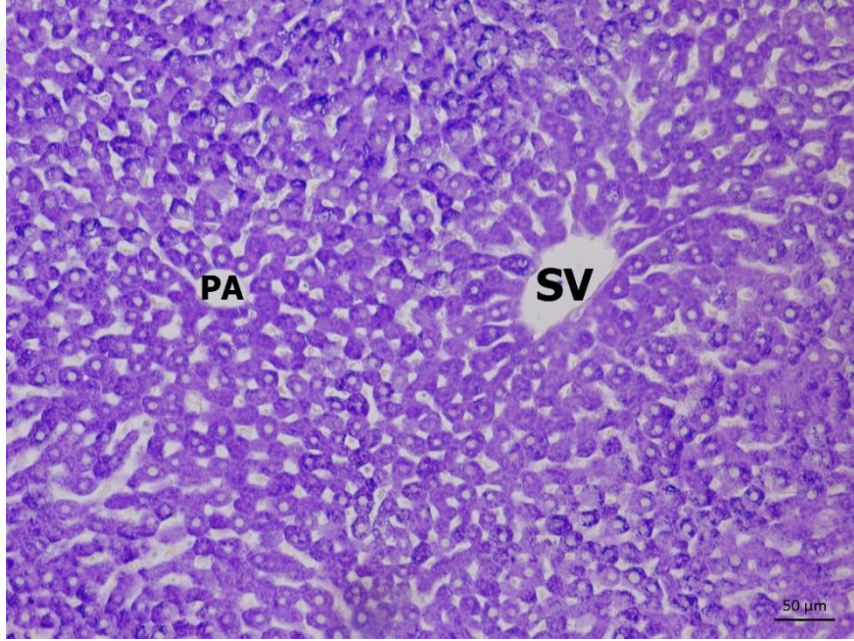
Resim 9. MSG+APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer lobülünde bağ dokusunda normale yakın yapılanma izlenmektedir. SV: Santral ven, PA: Periportal alan. Masson'un Trikrom boyaması.)



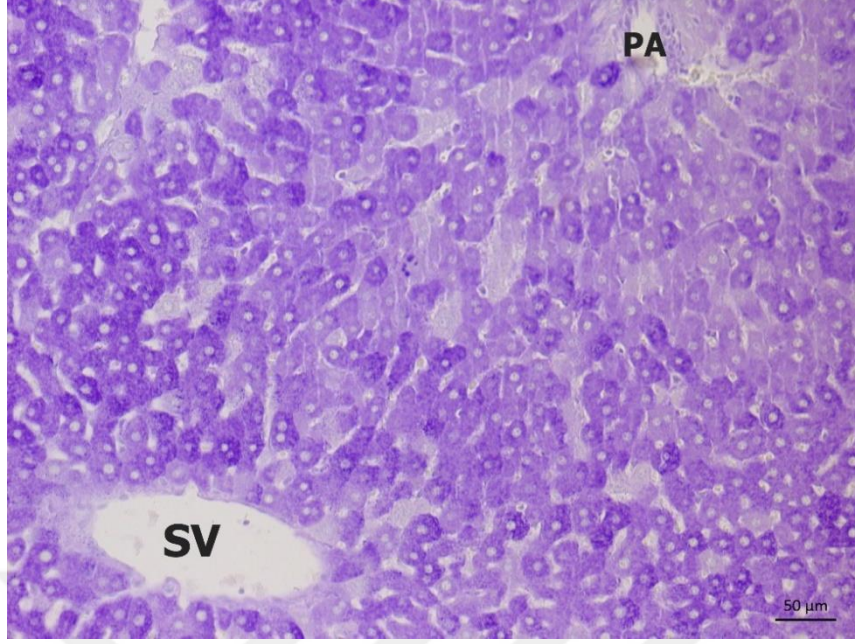
Resim 10. Kontrol grubuna ait mikrograf.

(Hepatositlerdeki glikojen içeriği PAS+ reaksiyon varlığında görülmektedir.SV: Santral ven. PAS reaksiyonu.)



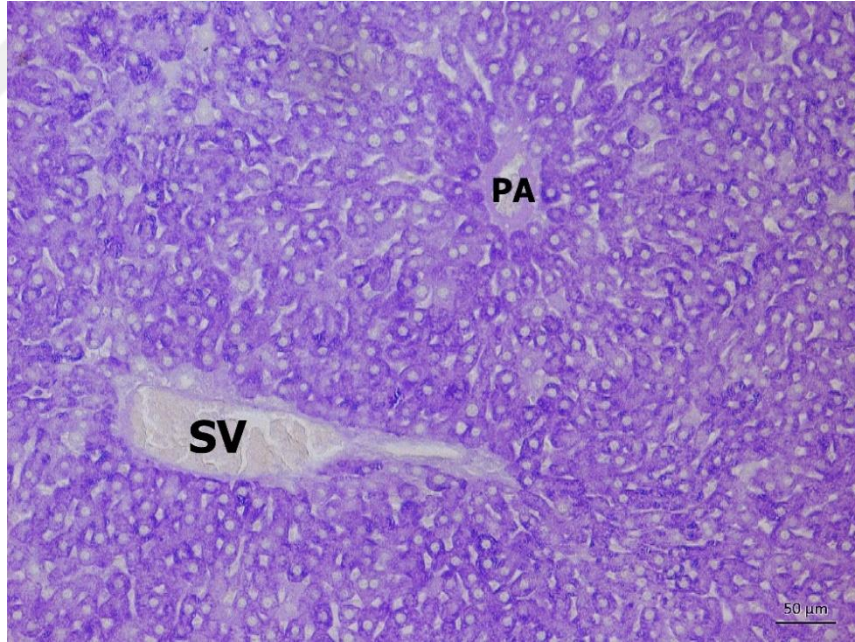
Resim 11. APO grubuna ait mikrograf.

(Hepatositlerin sitoplazmalarında belirgin PAS+ reaksiyon eşliğinde glikojen dağılımı görülmektedir.SV: Santral ven, PA: Periportal alan. PAS reaksiyonu.)



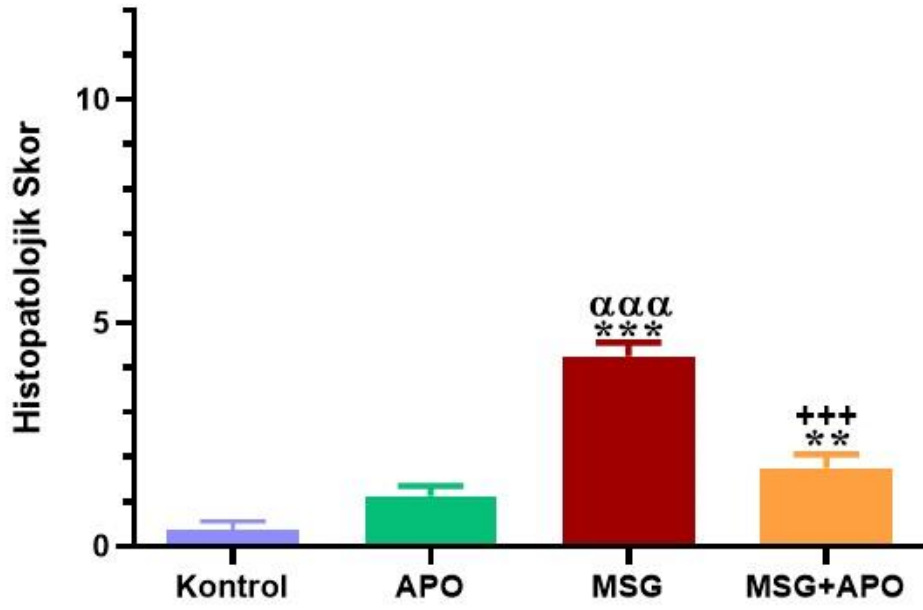
Resim 12. MSG grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasındaki çok sayıda hepatosit sitoplazmasında PAS+ reaksiyonda azalma görülmektedir. SV: Santral ven, PA: Periportal alan. PAS reaksiyonu.)



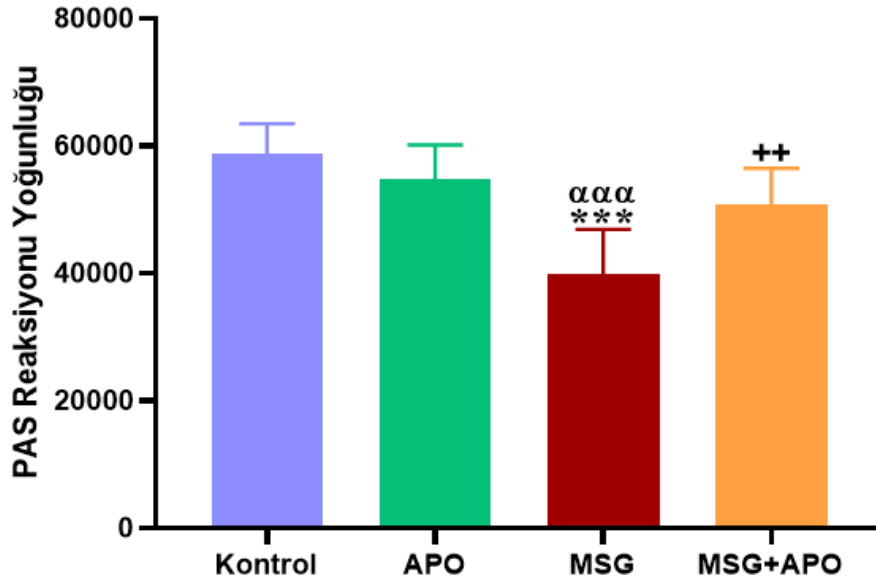
Resim 13. MSG+APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasındaki hepatositlerin sitoplazmalarında yoğun PAS+ reaksiyon görülmektedir. SV: Santral ven, PA: Periportal alan. PAS reaksiyonu.)



Şekil 12. Karaciğer dokusunun histopatolojik skor grafiği.

(*** p <0,001, ** p <0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ααα p <0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. +++ p <0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)



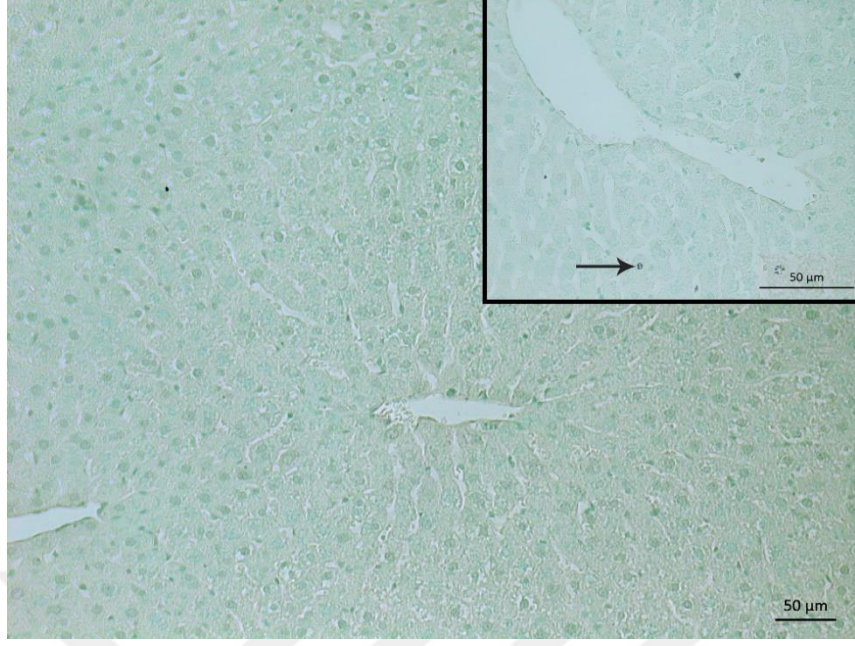
Şekil 13. PAS reaksiyonu yoğunluğu grafiği.

(*** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ααα p <0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ++ p <0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)

4.3 TUNEL İmmünohistokimyası Bulguları

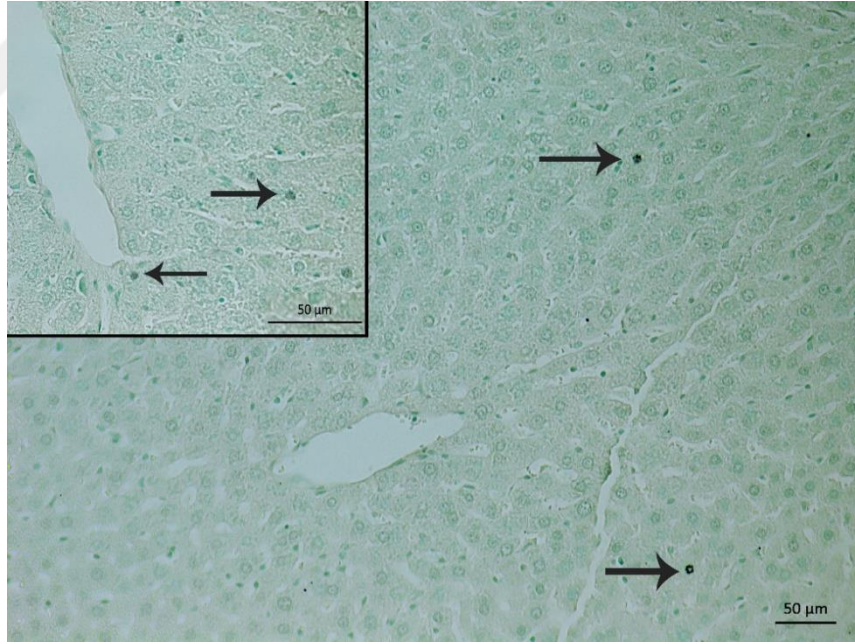
Tüm deney gruplarındaki hayvanlarda TUNEL- pozitif hücreler koyu siyah renkte izlendi. Kontrol (Resim 14) ve APO (Resim 15) gruplarındaki hepatositlerde az sayıda pozitif hücreye rastlandı. MSG grubu kesitleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL- pozitif hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi (Resim 16). MSG+APO grubu kesitleri MSG grubu kesitleri ile karşılaştırıldığında az sayıda TUNEL- pozitif hücre izlendi (Resim 17).

Deney gruplarına ait apoptotik indeks Kontrol grubunda $0,58 \pm 0,58$, MSG grubunda $18,77 \pm 3,23$, APO grubunda $1,03 \pm 0,58$ ve MSG+APO grubunda $1,16 \pm 0,83$ olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol ve APO grupları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla * $p < 0,05$, $^{\alpha}p < 0,05$). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($^+p < 0,05$) (Şekil 14).



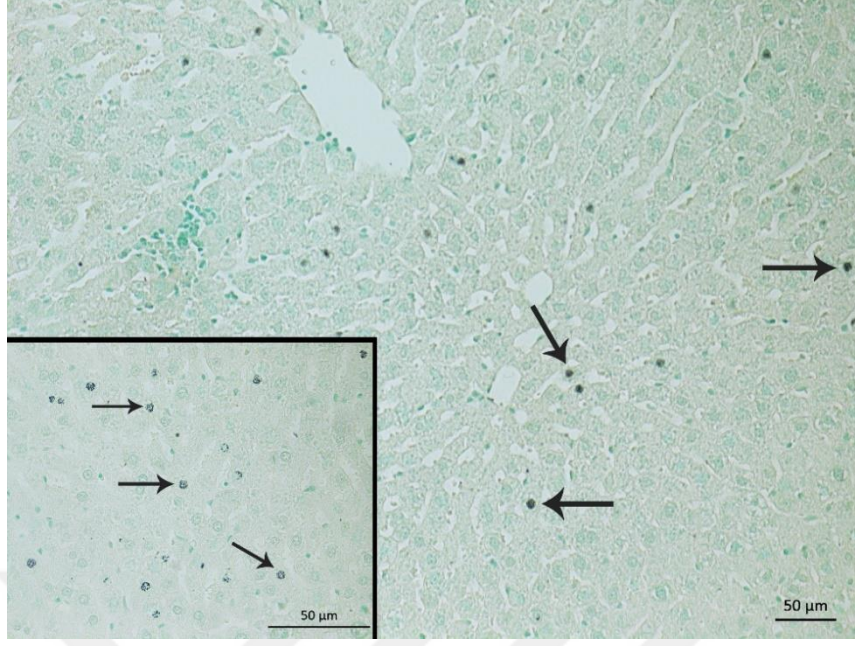
Resim 14. Kontrol grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında az sayıda TUNEL-pozitif hücre (→) izlenmektedir. İnet: TUNEL-pozitif hücre (→).)



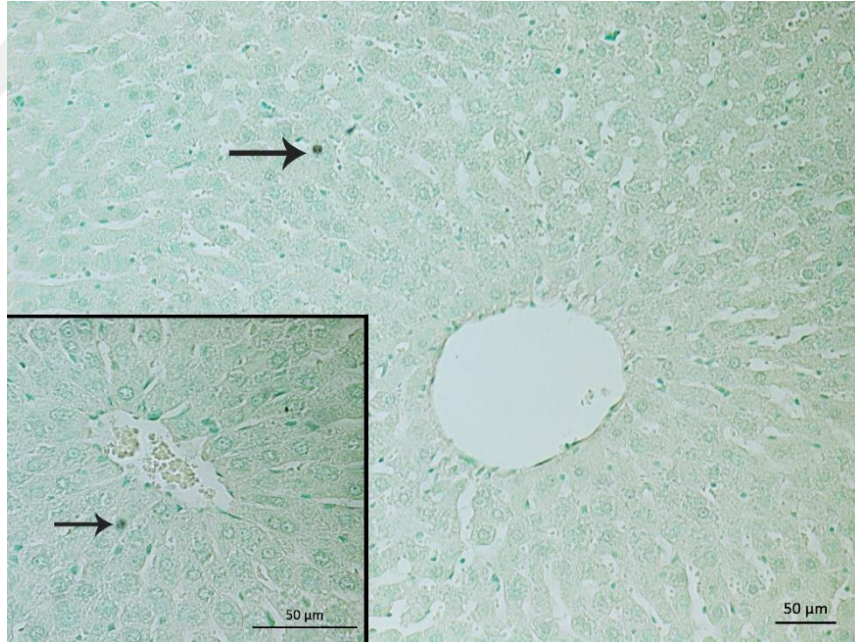
Resim 15. APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer dokusunda seyrek olarak TUNEL-pozitif hücreler (→) görülmektedir. İnet: TUNEL-pozitif hücreler (→).)



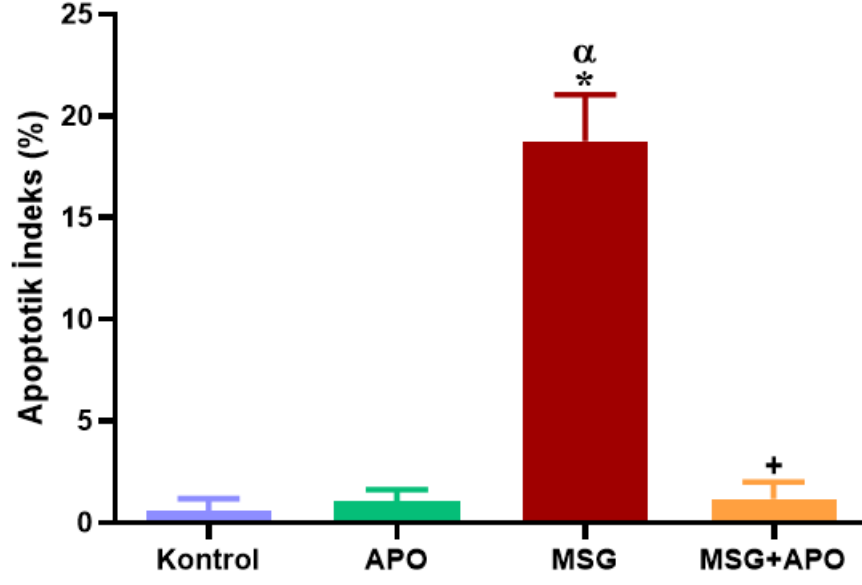
Resim 16. MSG grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında TUNEL-pozitif hücre (→) sayısında artış görülmektedir. İncet: TUNEL-pozitif hücreler (→).)



Resim 17. MSG+APO grubuna ait mikrograf.

(Karaciğer parenkimasında az sayıda TUNEL-pozitif hücre (→) izlenmektedir. İncet: TUNEL-pozitif hücre (→).)



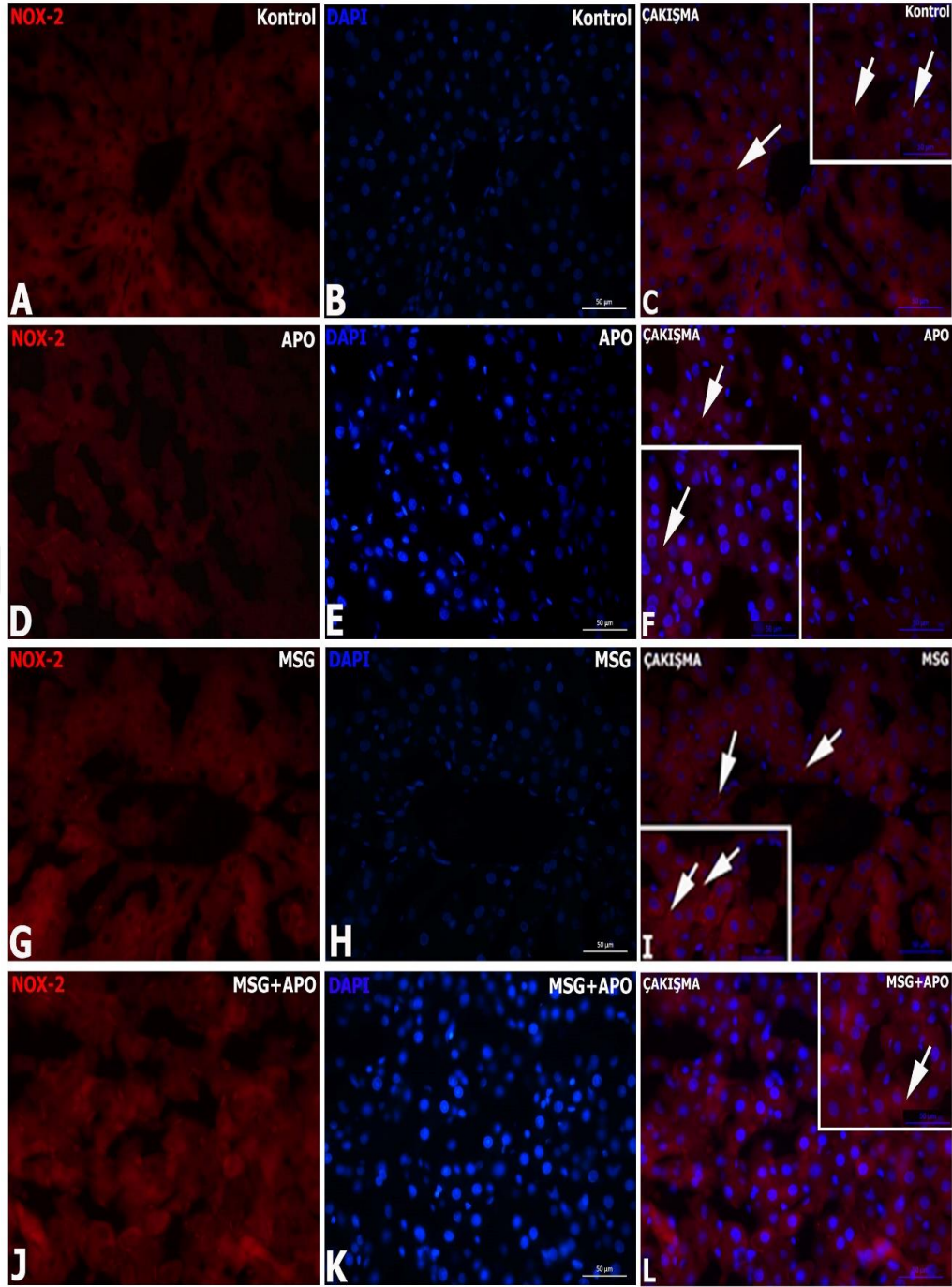
Şekil 14. Deney gruplarına ait apoptotik indeks grafiği.

(*p <0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^αp<0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. +p <0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)

4.4 NOX-2 İmmü Floresan Boyaması Bulguları

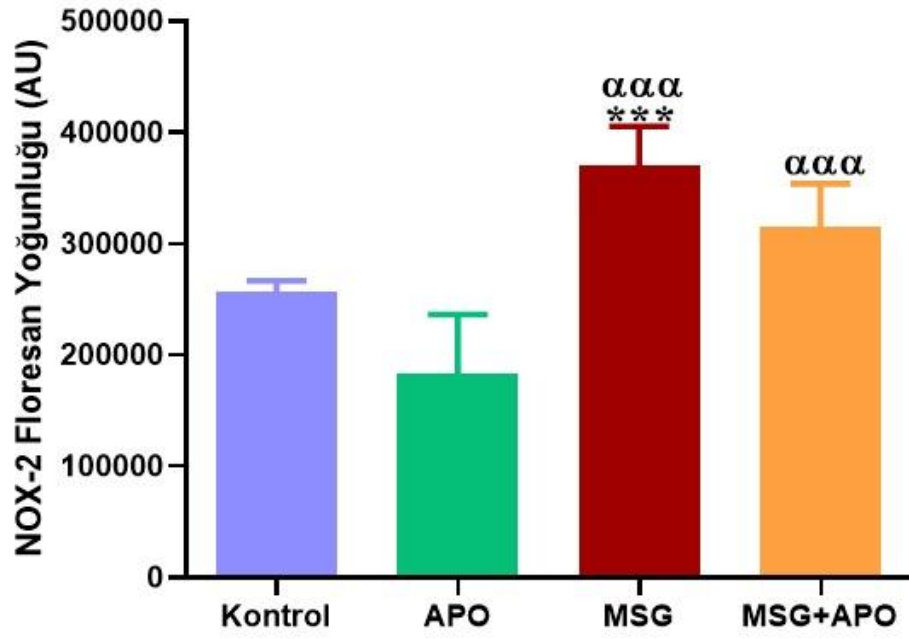
Kontrol grubuna ait karaciğer dokularındaki hepatositlerin sitoplazmalarında NOX-2-pozitif hücreler parlak kırmızı renkte izlendi (Resim 18 A-C). APO grubunda NOX-2-pozitif olan hepatosit sayısında azalma gözlemlendi (Resim 18 D-F). MSG grubunda hepatosit sitoplazmalarında NOX-2-pozitif işaretleme oranında ise artış belirlendi (Resim 18 G-I). MSG+APO grubunda ise NOX-2-pozitif hücre sayısında azalma gözlemlendi (Resim 18 J-L).

Deney gruplarındaki NOX-2 floresan yoğunluğu Kontrol grubunda 256635 ± 5076 , APO grubunda 183418 ± 23731 , MSG grubunda 369815 ± 13459 , MSG+APO grubunda ise 314688 ± 16000 AU olarak belirlendi. MSG grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NOX-2 floresan yoğunluğunda anlamlı bir artış gözlemlendi (** $p < 0,001$). APO grubu ile karşılaştırıldığında MSG ve MSG+APO grubu NOX-2 floresan yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusu idi ($^{***}p < 0,001$) (Şekil 15).



Resim 18. Deneysel gruplarına ait karaciğer kesitlerinde NOX-2-immünfloresan boyanması.

((A-C) Kontrol, (D-F) APO, (G-I) MSG, (J-L) MSG+APO gruplarında NOX-2-pozitif hücreler (→) parlak kırmızı renkte, hepatosit nükleusları DAPI ile boyanma sonucu parlak mavi renkte görülmektedir.)



Şekil 15. Deney gruplarına ait NOX-2 floresan yoğunluğu grafiği.

(*** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ααα p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında.)

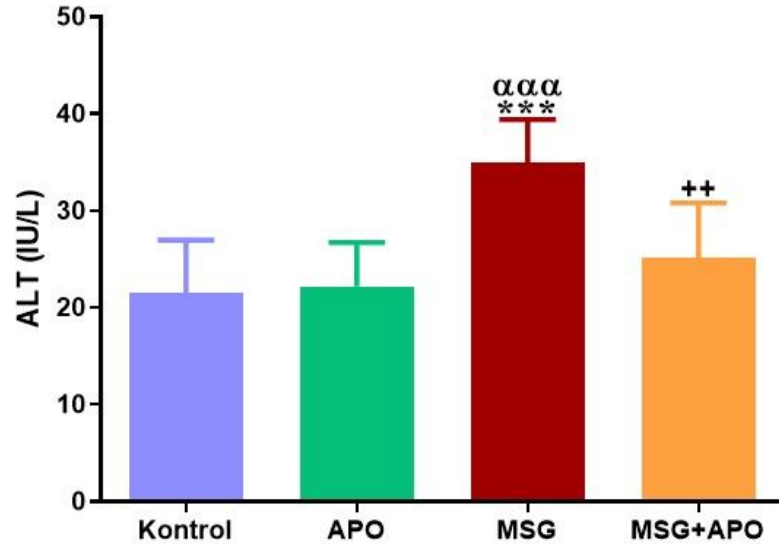
4.5 Biyokimya Bulguları

4.5.1 Serum ALT, AST ve ALP seviyeleri

Deney gruplarındaki ALP konsantrasyonu seviyeleri Kontrol grubunda $21,50 \pm 1,938$ IU/L, APO grubunda $22,15 \pm 1,616$ IU/L, MSG grubunda $34,92 \pm 1,582$ IU/L, MSG+APO grubunda ise $25,10 \pm 2,019$ IU/L olarak belirlendi. Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında MSG grubunda ALP konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla $***p < 0,001$, $^{ααα}p < 0,001$). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise ALP konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($^{++}p < 0,01$) (Şekil 16).

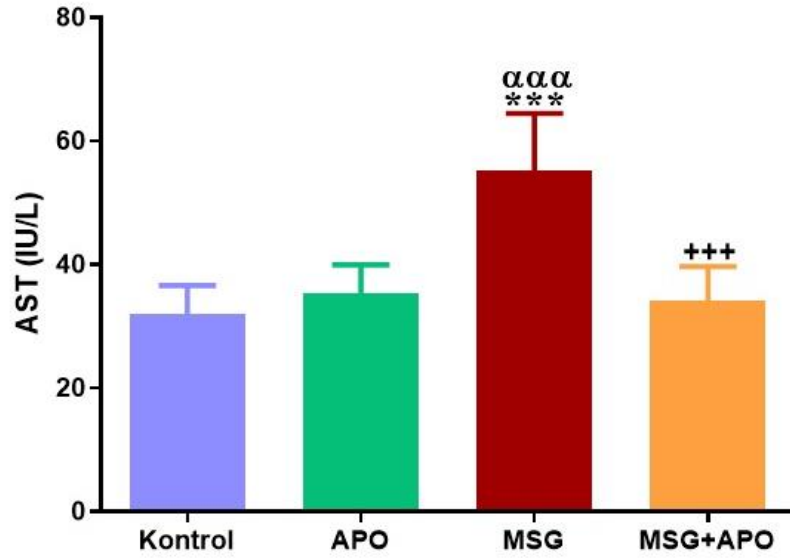
Deney gruplarındaki AST konsantrasyonu seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $31,95 \pm 1,642$ IU/L, APO grubu $35,28 \pm 1,650$ IU/L, MSG grubu $55,27 \pm 3,239$ IU/L, MSG+APO grubu ise $34,13 \pm 2,087$ IU/L olarak belirlendi. Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında MSG grubunda AST konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla $***p < 0,001$, $^{ααα}p < 0,001$). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise AST konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($^{+++}p < 0,001$) (Şekil 17).

Deney gruplarındaki ALP konsantrasyon seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $16,20 \pm 1,634$ IU/L, APO grubu $23,35 \pm 0,776$ IU/L, MSG grubu $36,69 \pm 2,973$ IU/L, MSG+APO grubu ise $30,25 \pm 1,874$ IU/L olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG ve MSG+APO gruplarında ALP konsantrasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($***p < 0,001$). APO grubu ile karşılaştırıldığında ise MSG grubunda ALP konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($^{αα}p < 0,01$). (Şekil 18).



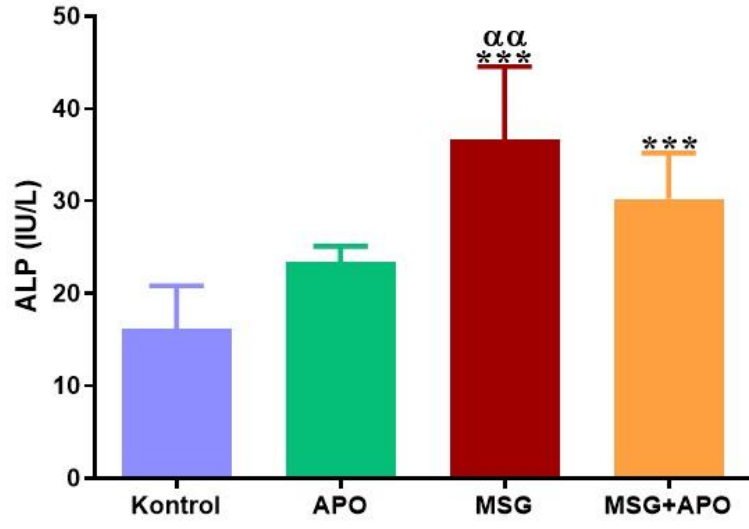
Şekil 16. Deney gruplarına ait ALT konsantrasyon seviyeleri.

(*** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. αααp<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ++p <0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)



Şekil 17. Deney gruplarına ait AST konsantrasyon seviyeleri.

(*** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. αααp<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. +++p <0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)

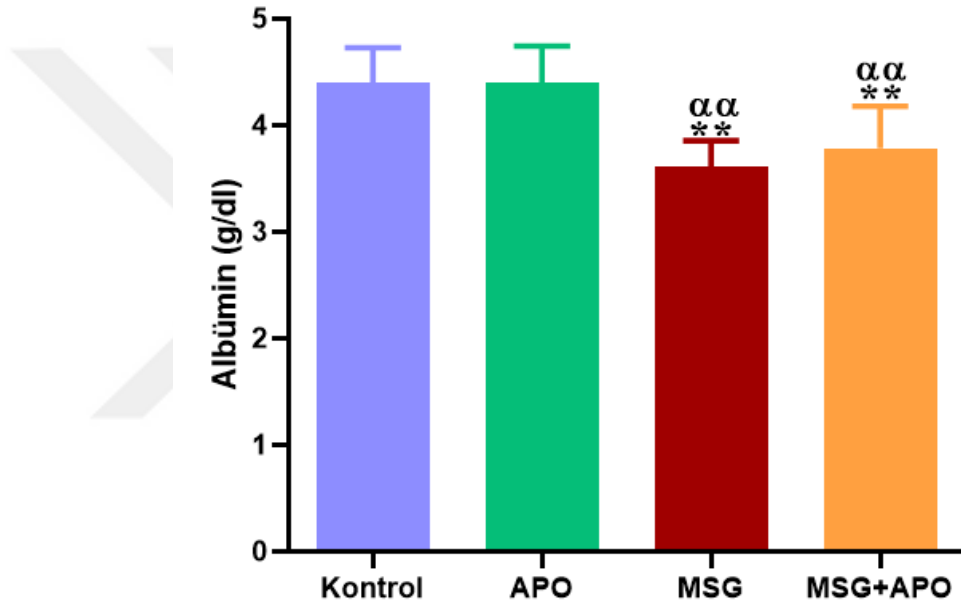


Şekil 18. Deney gruplarına ait ALP konsantrasyon seviyeleri.

(*** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $\alpha\alpha$ p<0,01 APO grubu ile karşılaştırıldığında.)

4.5.2 Serum albümin konsantrasyon seviyeleri

Deney gruplarındaki albümin konsantrasyonu seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $4,396 \pm 0,1260$ g/dl, APO grubu $4,403 \pm 0,1287$ g/dl, MSG grubu $3,615 \pm 0,098$ g/dl, MSG+APO grubu ise $3,785 \pm 0,1395$ g/dl olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG ve MSG+APO gruplarında albümin konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($^{\alpha\alpha}p < 0,01$). MSG ve MSG+APO grupları APO grubu ile karşılaştırıldığında ise albümin konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($^{++}p < 0,05$) (Şekil 19).

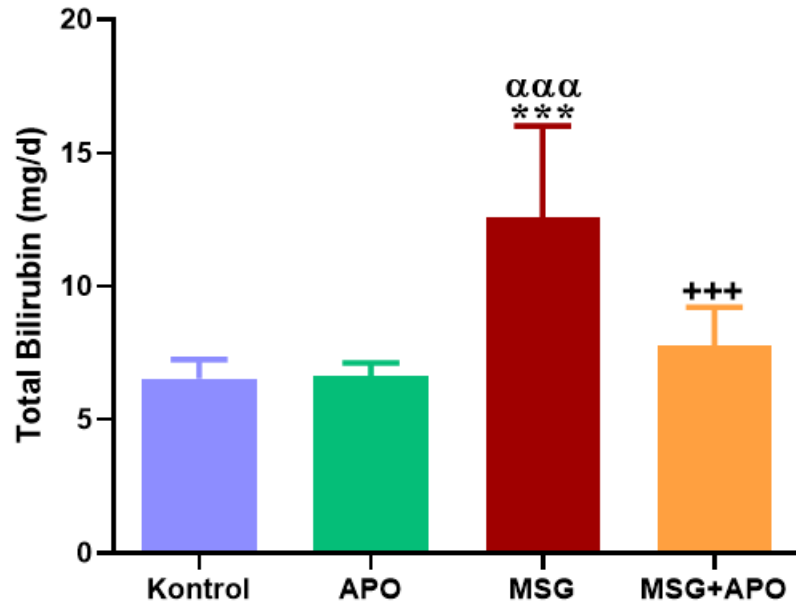


Şekil 19. Deney gruplarına ait albümin konsantrasyon seviyeleri.

(**p < 0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{\alpha\alpha}p < 0,01$ APO grubu ile karşılaştırıldığında.)

4.5.3 Serum total bilirubin konsantrasyon seviyeleri

Deney gruplarındaki total bilirubin konsantrasyonu seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $6,541 \pm 0,2521$ mg/dl, APO grubu $6,626 \pm 0,1756$ mg/dl, MSG grubu $12,57 \pm 1,217$ mg/dl, MSG+APO grubu ise $7,752 \pm 0,549$ mg/dl olarak belirlendi. Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında MSG grubunda total bilirubin konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla $***p < 0,001$, $^{***}p < 0,001$). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise total bilirubin konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($^{+++}p < 0,001$) (Şekil 20).



Şekil 20. Deney gruplarına ait total bilirubin seviyeleri.

($***p < 0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{***}p < 0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{+++}p < 0,01$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)

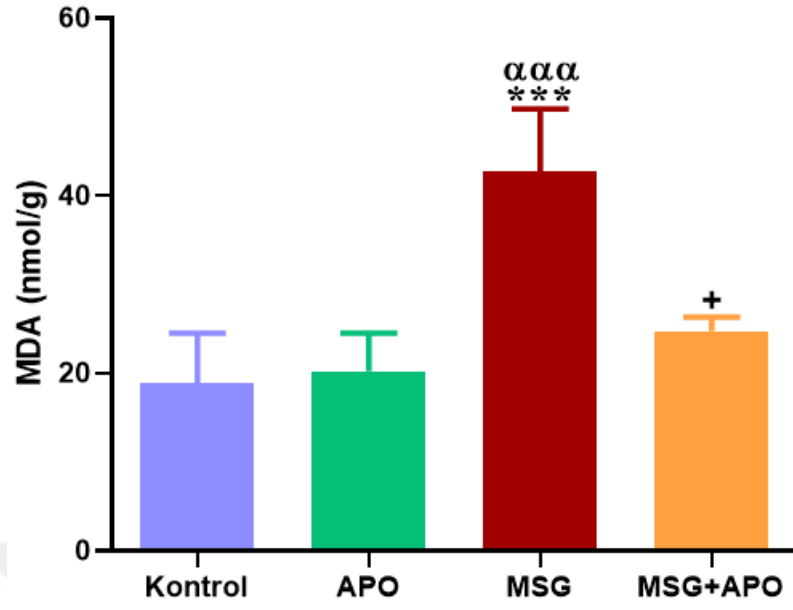
4.5.4 Doku MDA ve GSH, SOD ve MPO seviyeleri

Karaciğer dokusundaki MDA konsantrasyonu seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $18,81 \pm 2,534$ nmol/g, APO grubu $20,23 \pm 2,122$ nmol/g, MSG grubu $42,67 \pm 3,545$ nmol/g, MSG+APO grubu ise $24,7 \pm 1,139$ nmol/g olarak belirlendi. Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında MSG grubunda MDA konsantrasyonu seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla *** $p < 0,001$, $\alpha\alpha p < 0,001$). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($^+p < 0,05$) (Şekil 21).

Karaciğer dokusundaki GSH konsantrasyon seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $13,94 \pm 1,217$ IU/g protein, APO grubu $14,02 \pm$ IU/g protein, MSG grubu $6,433 \pm 0,7126$ IU/g protein, MSG+APO grubu ise $12,69$ IU/g protein olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında GSH konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla *** $p < 0,001$, $\alpha\alpha p < 0,001$). MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise MSG+APO grubunda bu seviyede istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($^{++}p < 0,01$) (Şekil 22).

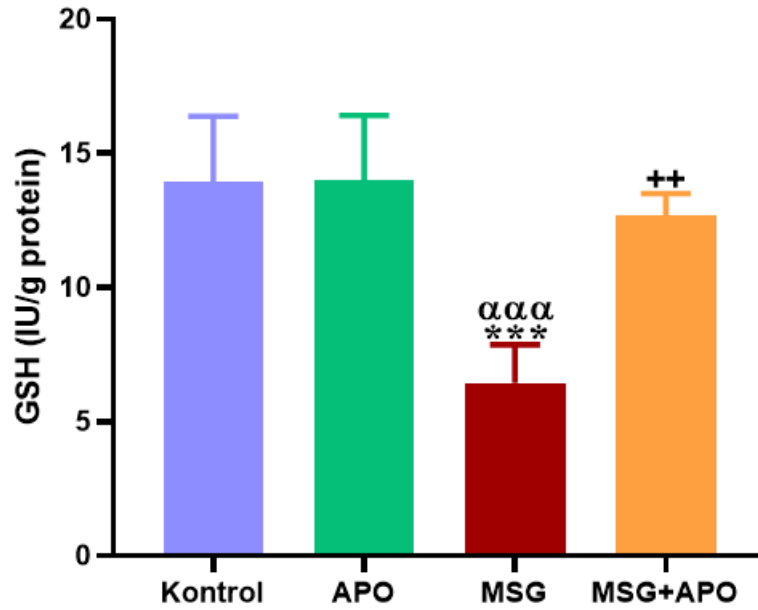
Karaciğer dokusundaki SOD konsantrasyonu seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $89,68 \pm 2,736$ IU/g protein, APO grubu $86,34 \pm 3,941$ IU/g protein, MSG grubu $70,85 \pm 1,925$ IU/g protein, MSG+APO grubu ise $81,79 \pm 6,570$ IU/g protein olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında SOD konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla * $p < 0,05$, $^{\alpha}p < 0,05$) (Şekil 23).

Karaciğer dokusundaki MPO konsantrasyon seviyeleri incelendiğinde Kontrol grubu $47,54 \pm 6,158$ nm/ml, APO grubu $71,76 \pm 7,008$ nm/ml, MSG grubu $93,72 \pm 8,968$ nm/ml, MSG+APO grubu ise $78,71 \pm 7,793$ nm/ml olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MPO konsantrasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (* $p < 0,05$) (Şekil 24).



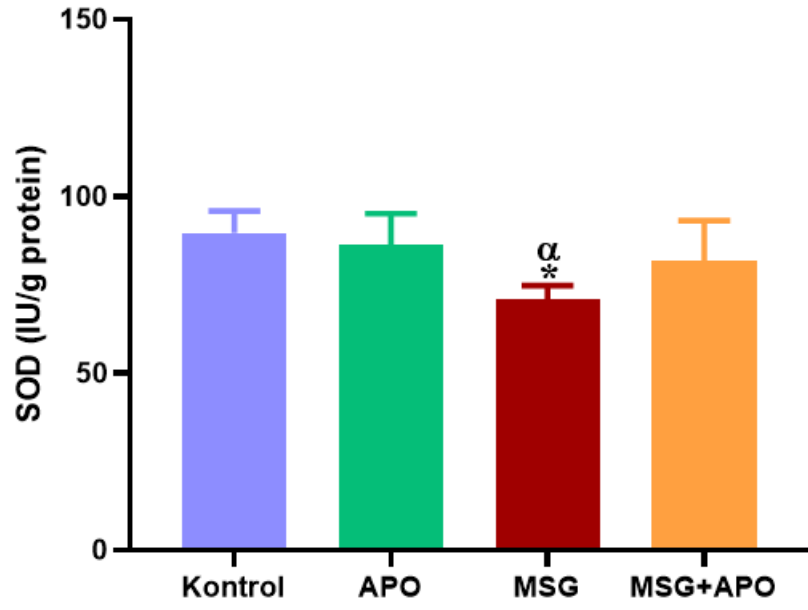
Şekil 21. Deney gruplarına ait MDA seviyeleri.

(**p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. αααp <0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. +p <0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)



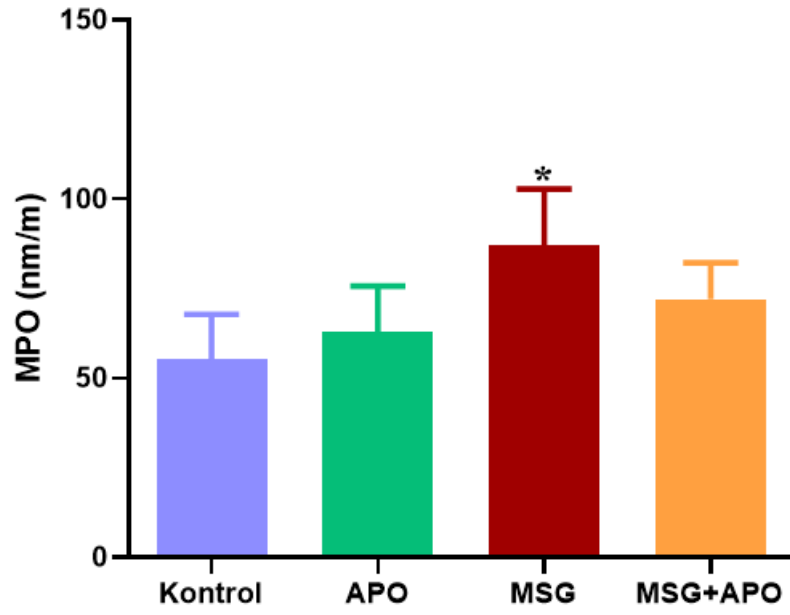
Şekil 22. Deney gruplarına ait GSH seviyeleri.

(**p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. αααp <0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ++p <0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.)



Şekil 23. Deney gruplarına ait SOD seviyeleri.

(*p <0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^αp <0,05 APO grubu ile karşılaştırıldığında.)



Şekil 24. Deney gruplarına ait MPO seviyeleri.

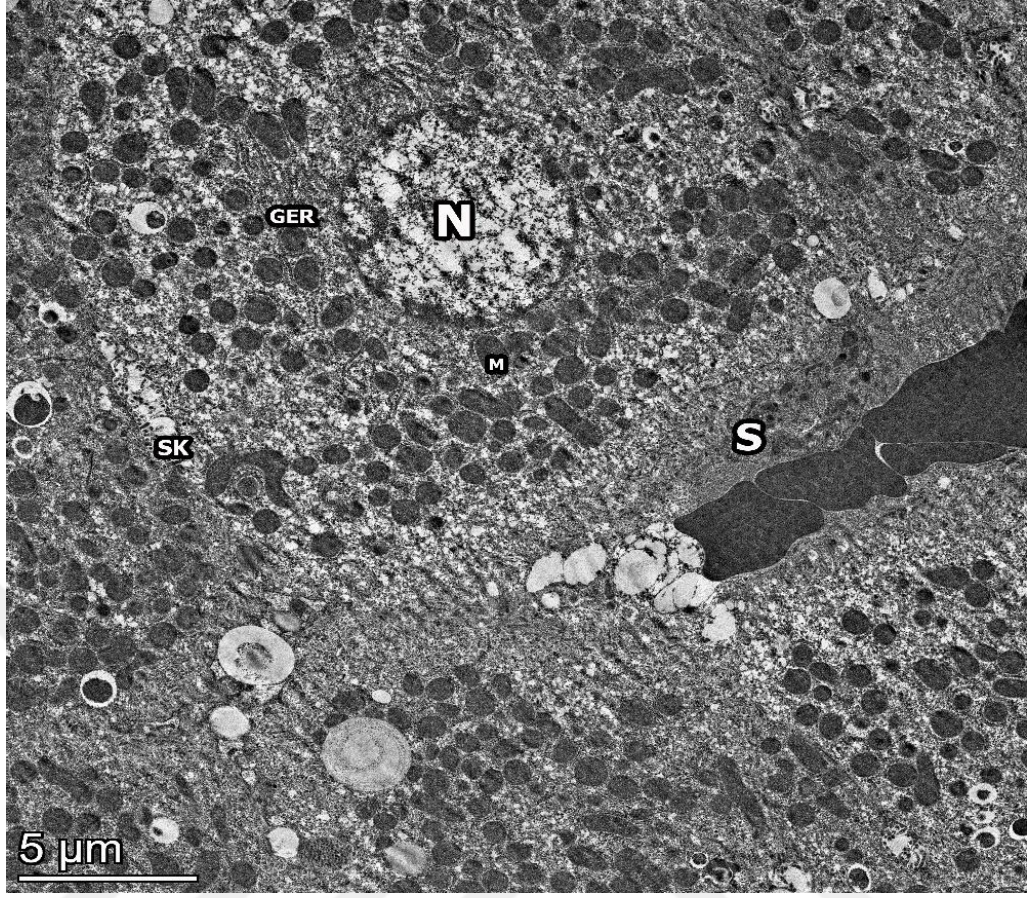
(*p <0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.)

4.6 Geçirimli Elektron Mikroskopik Düzeyde Bulgular

Kontrol grubuna ait karaciğer dokularının geçirimli elektron mikroskobu düzeyinde gerçekleştirilen incelemesi sonucunda, hepatosit ve sinüzoid yapıları normal ince yapıda izlendi (Resim 19 ve 20). APO grubuna ait elektron mikrograflarda Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer ince yapı bulguları gözlemlendi (Resim 21 ve 22).

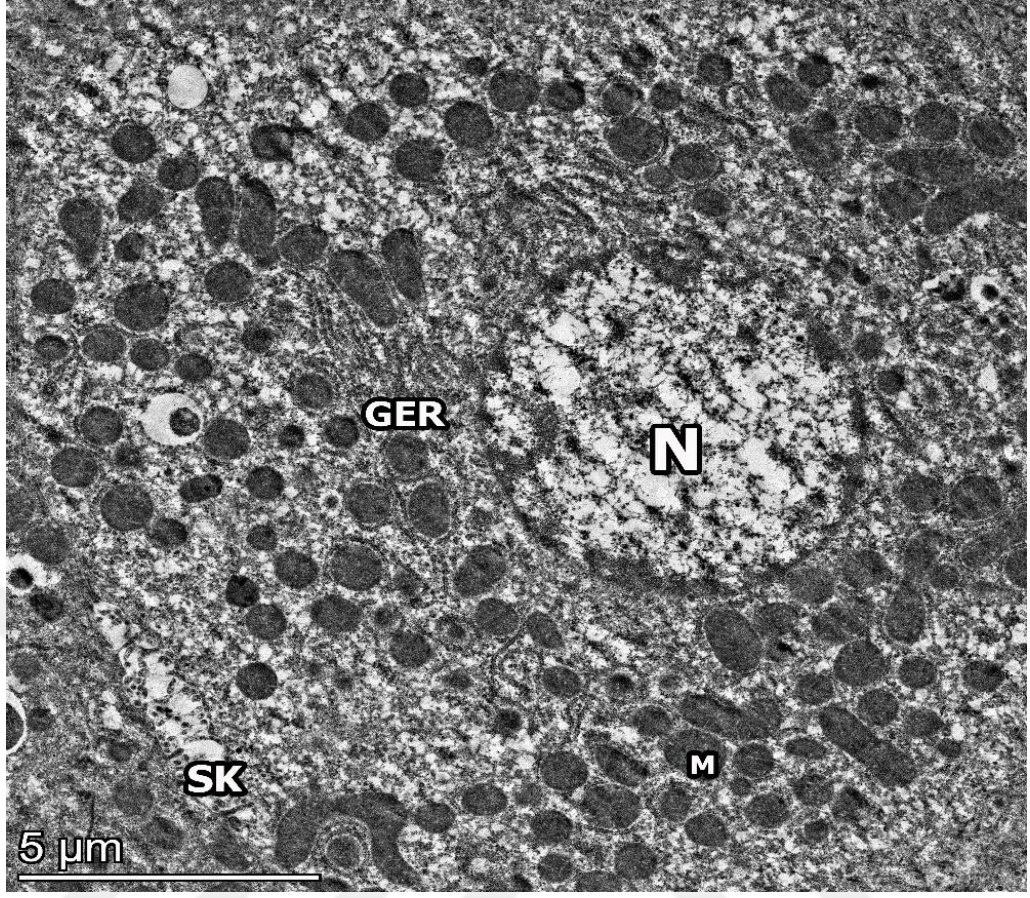
MSG grubuna ait karaciğer elektron mikrograflarında piknotik nükleus içeren hepatositlerde yoğun harabiyet gözlemlendi. Hepatosit sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacığı, endoplazmik retikulum genişlemesi eşliğinde steatosis yansıtır vakuolizasyon ve mitokondriyon kristalarında silinme izlendi. Safra kanalikülünün mikrovillus yapısında silinme şeklinde harabiyet mevcuttu (Resim 23- 26).

MSG+APO grubuna ait elektron mikrograflarda az sayıda dejeneratif bulgu içeren hepatositler varlığında normale yakın karaciğer parenkimasını yansıtmakta idi. Hepatositlerin sitoplazmalarında vakuolizasyonun ve lipid damlacıklarının oldukça az olduğu bu gruba ait gözlenen bulgular arasında idi (Resim 27- 29).



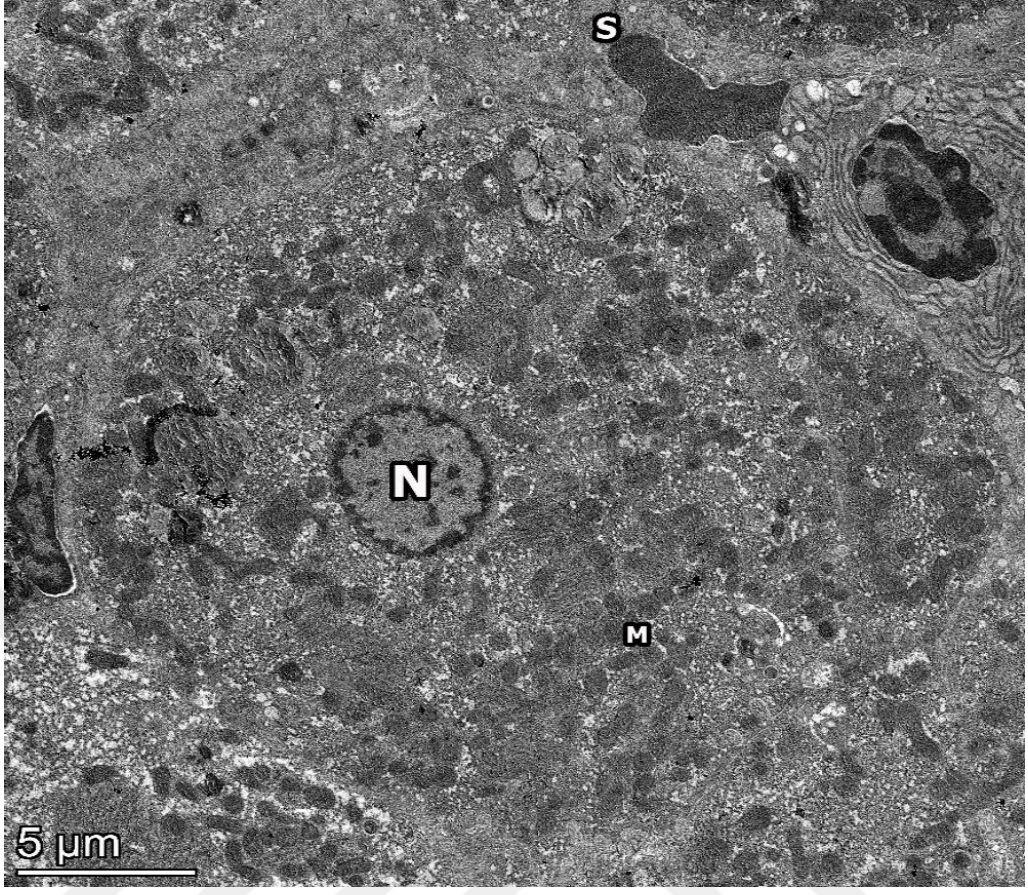
Resim 19. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Karaciğer parenkimasında normal ince yapı izlenmektedir. N: Nükleus, GER: Granüllü ER, M: Mitokondriyon, S: Sinüzoid, SK: Safra kanalikülü.)



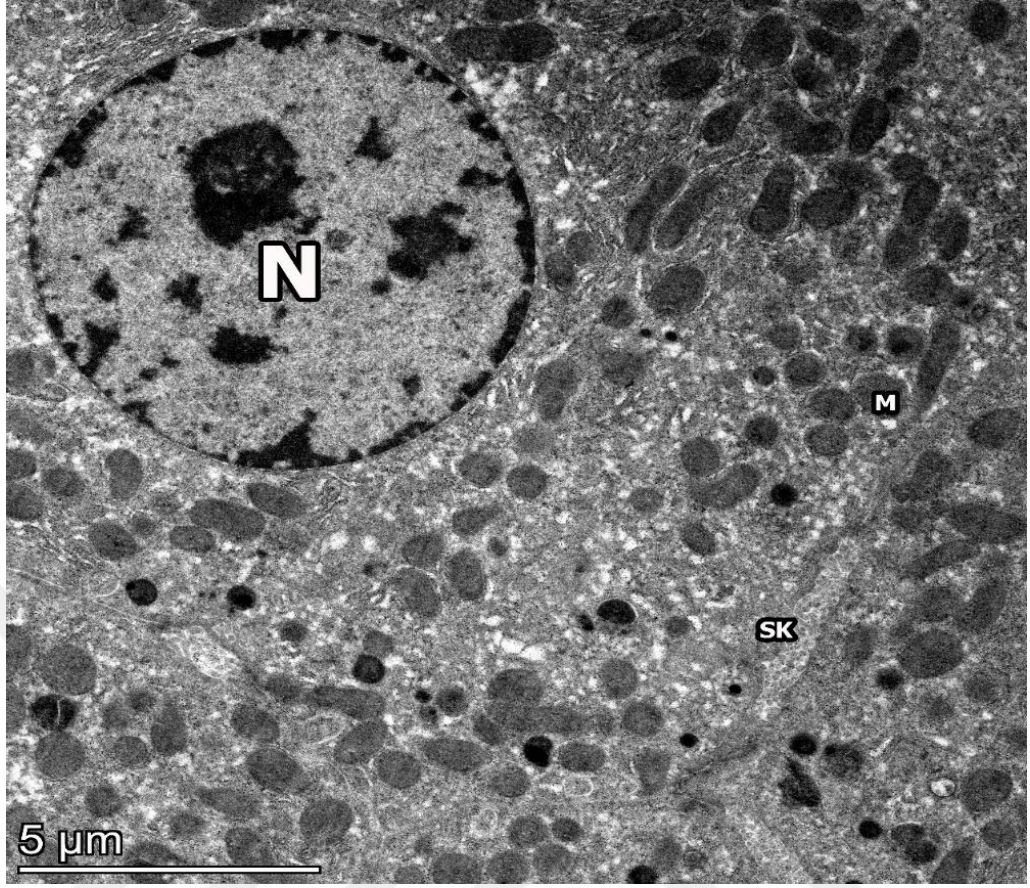
Resim 20. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Hepatositlerde yuvarlak ve merkezi yerleşimli nükleuslar, sitoplazmada çok sayıda mitokondriyon ve granüllü endoplazmik retikulum eşliğinde normal ince yapı izlenmektedir. N: Nükleus, GER: Granüllü ER, M: Mitokondriyon, SK: Safra kanalikülü.)



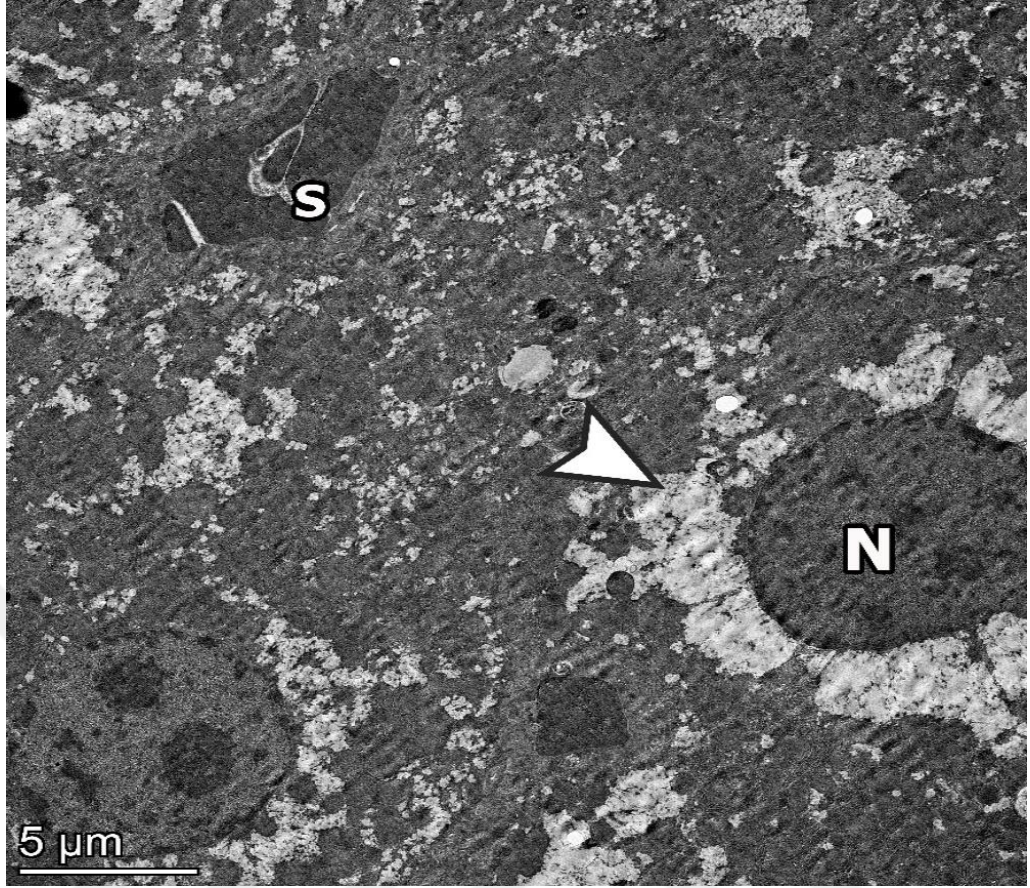
Resim 21.APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Karaciğer parenkimasında normal ince yapı izlenmektedir. N: Nükleus, M: Mitokondriyon, S: Sinüzoid.)



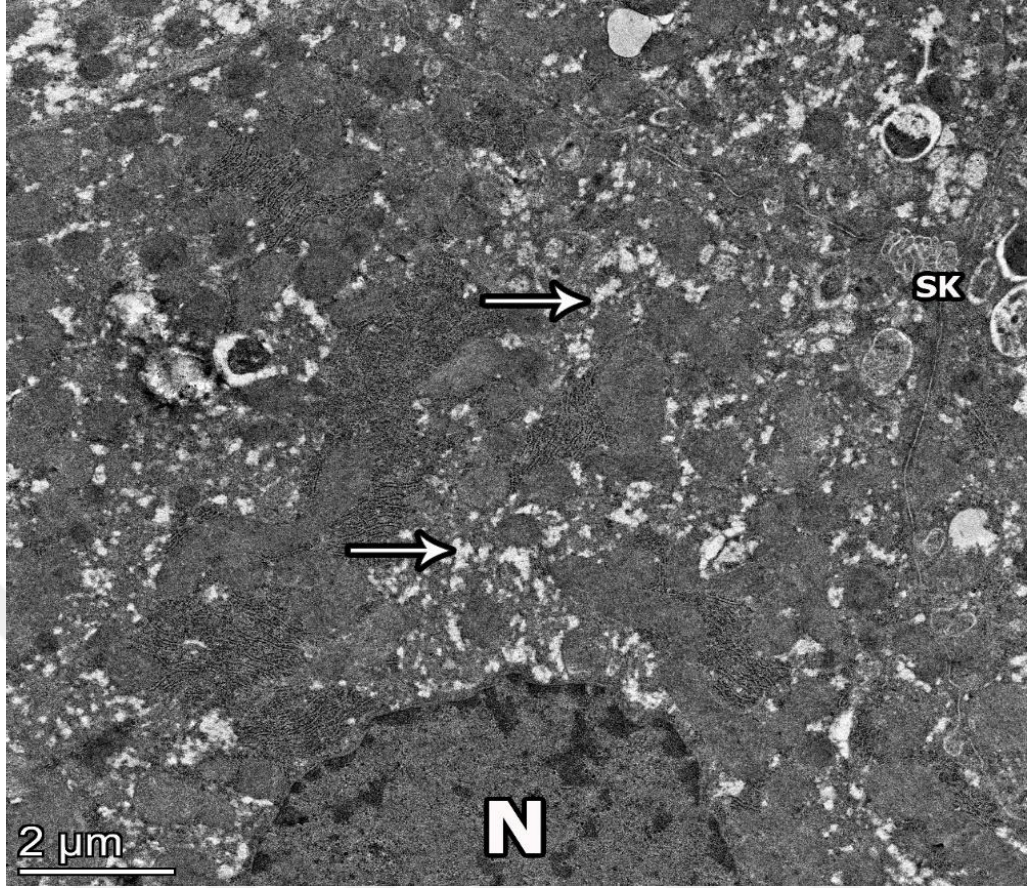
Resim 22. APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Hepatositlerde normal ince yapıyı yansıtan organeller ve iki hepatosit arasında safra kanalikülü izlenmektedir. N: Nükleus, M: Mitokondriyon, SK: Safra kanalikülü.)



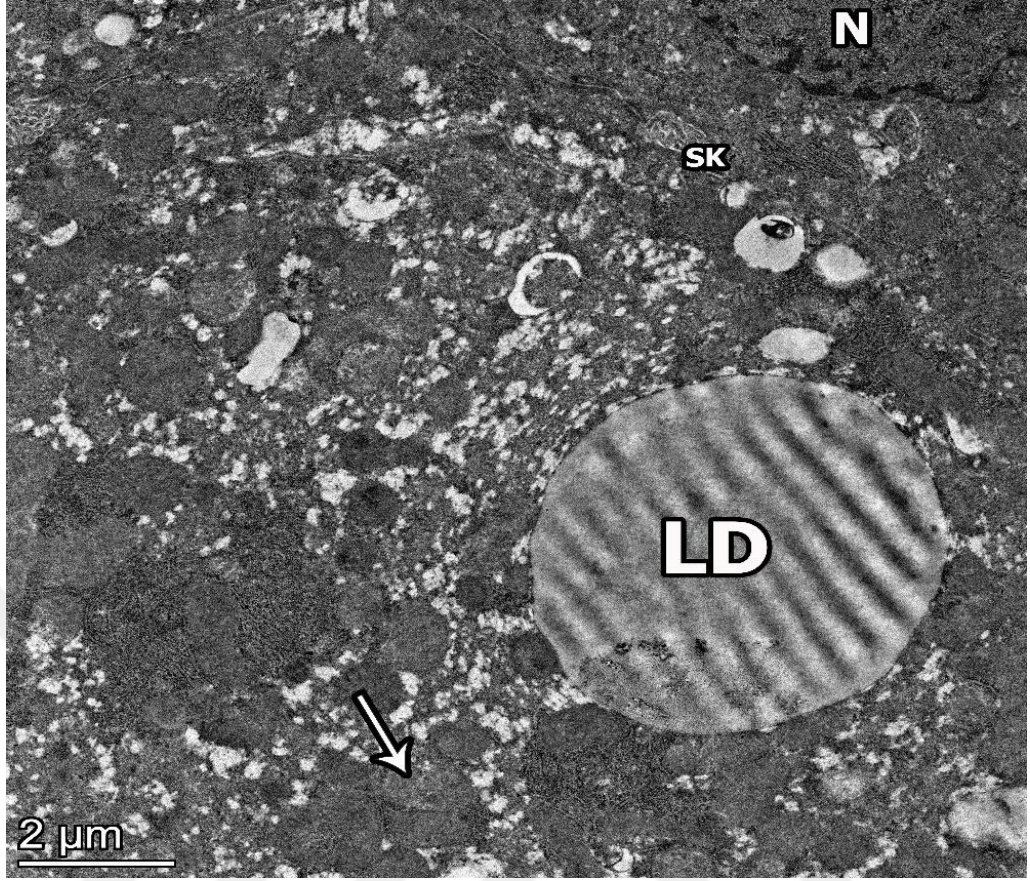
Resim 23. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrosafı.

(Hepatosit sitoplazmasında steatosisi yansır vakuoller (▷) ve piknotik nükleus gözlenmektedir. N: Nükleus, S: Sinüzoid.)



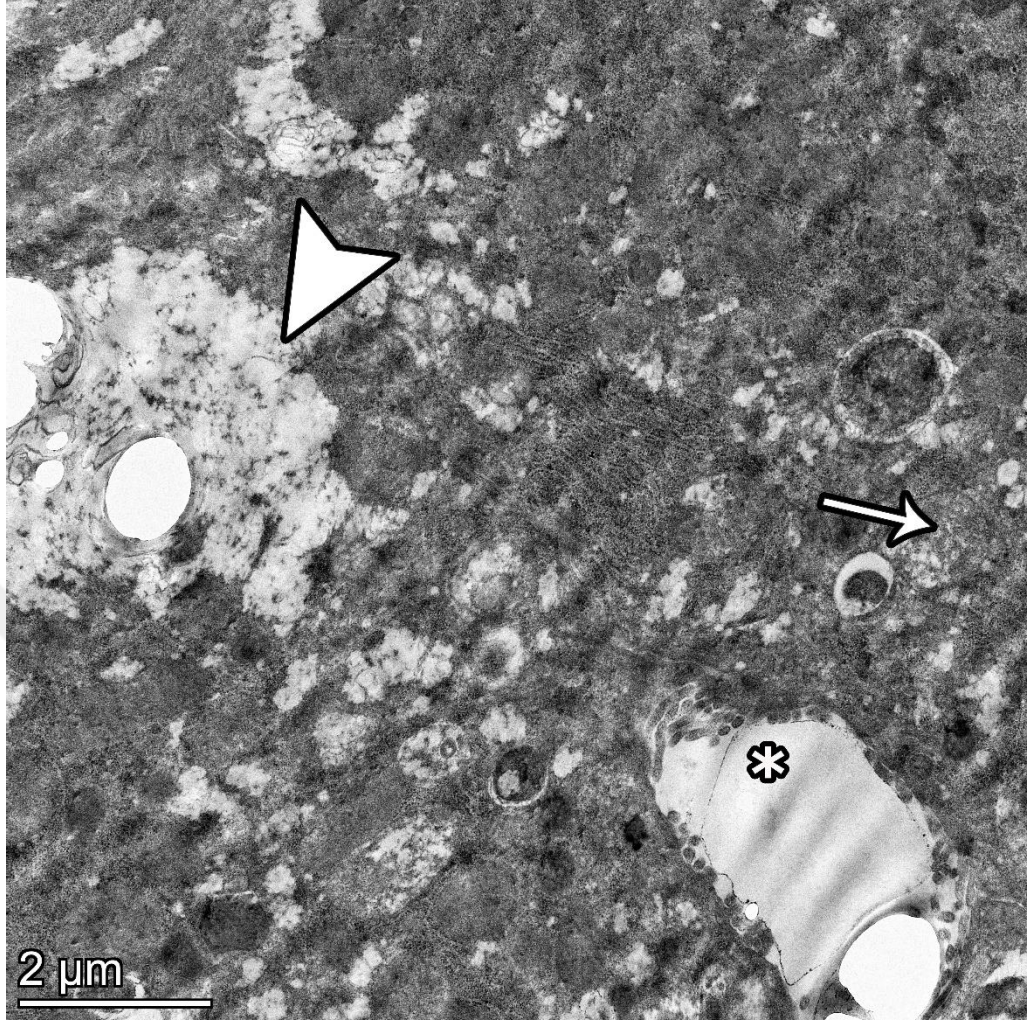
Resim 24. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.

(Hepatosit sitoplazmasında genişlemiş endoplazmik retikulum membranları ve vakuolizasyon (→) gözlenmektedir. N: Nükleus, SK: Safra kanalikülü.)



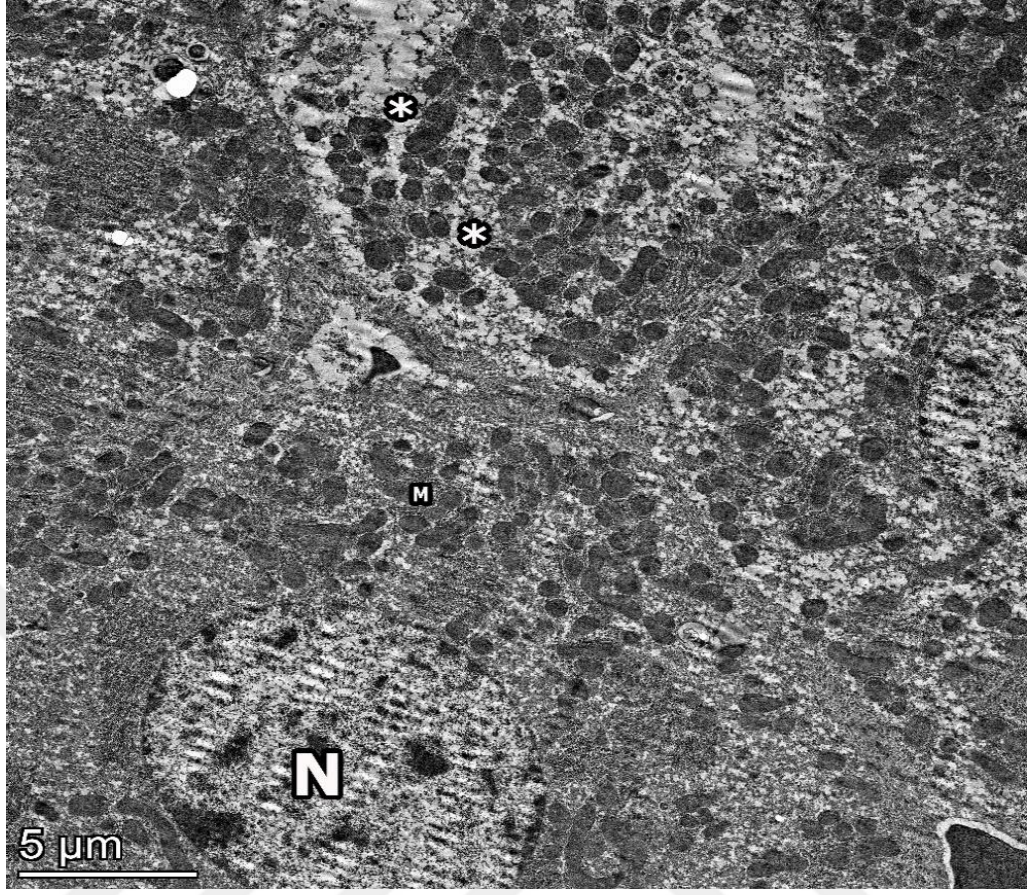
Resim 25. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Hepatosit sitoplazmasında iri lipid damlası ve mitokondriyon yapısında bozulmalar (→) gözlenmektedir. N: Nükleus, SK: Safra kanalikülü, LD: Lipid damlacığı.)



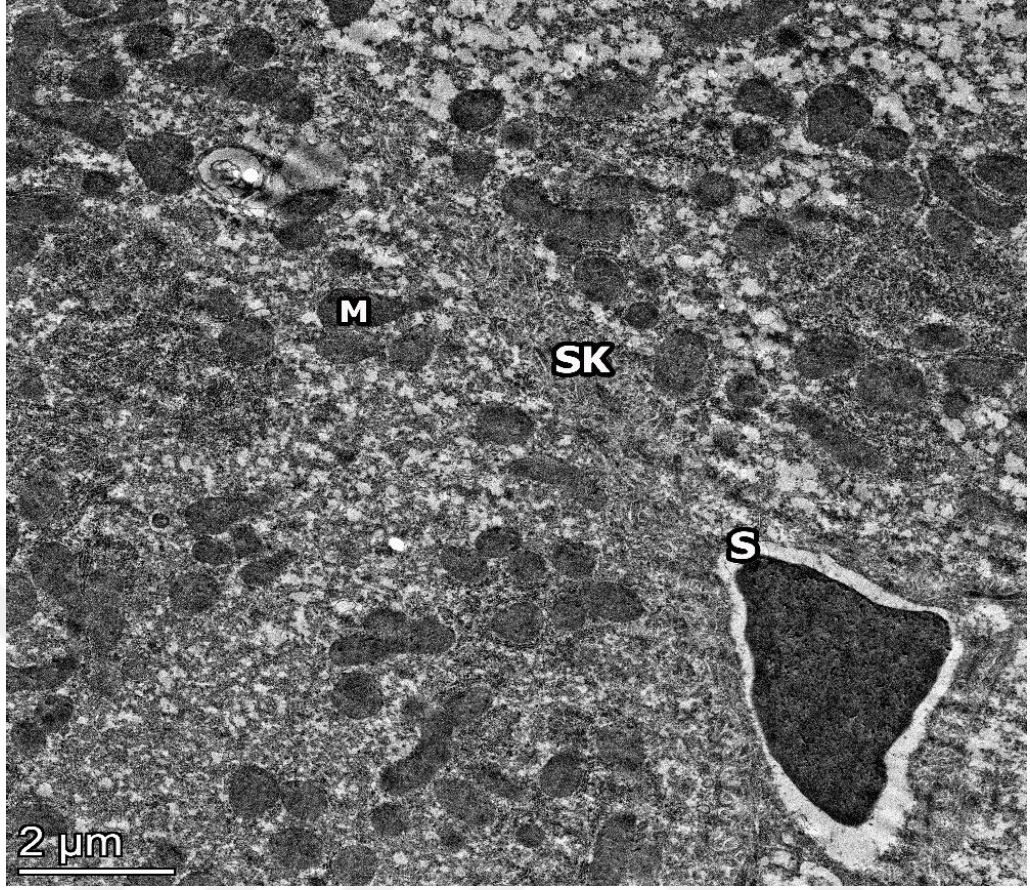
Resim 26. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.

(Hepatosit sitoplazmasında steatosis (▷), mitokondriyon yapısında bozulma (→) gözlenmekte olup, safra kanalikülünün ince yapısında mikrovillus bazında bozulmaların (*) meydana geldiği izlenmektedir. N: Nükleus, M: Mitokondriyon.)



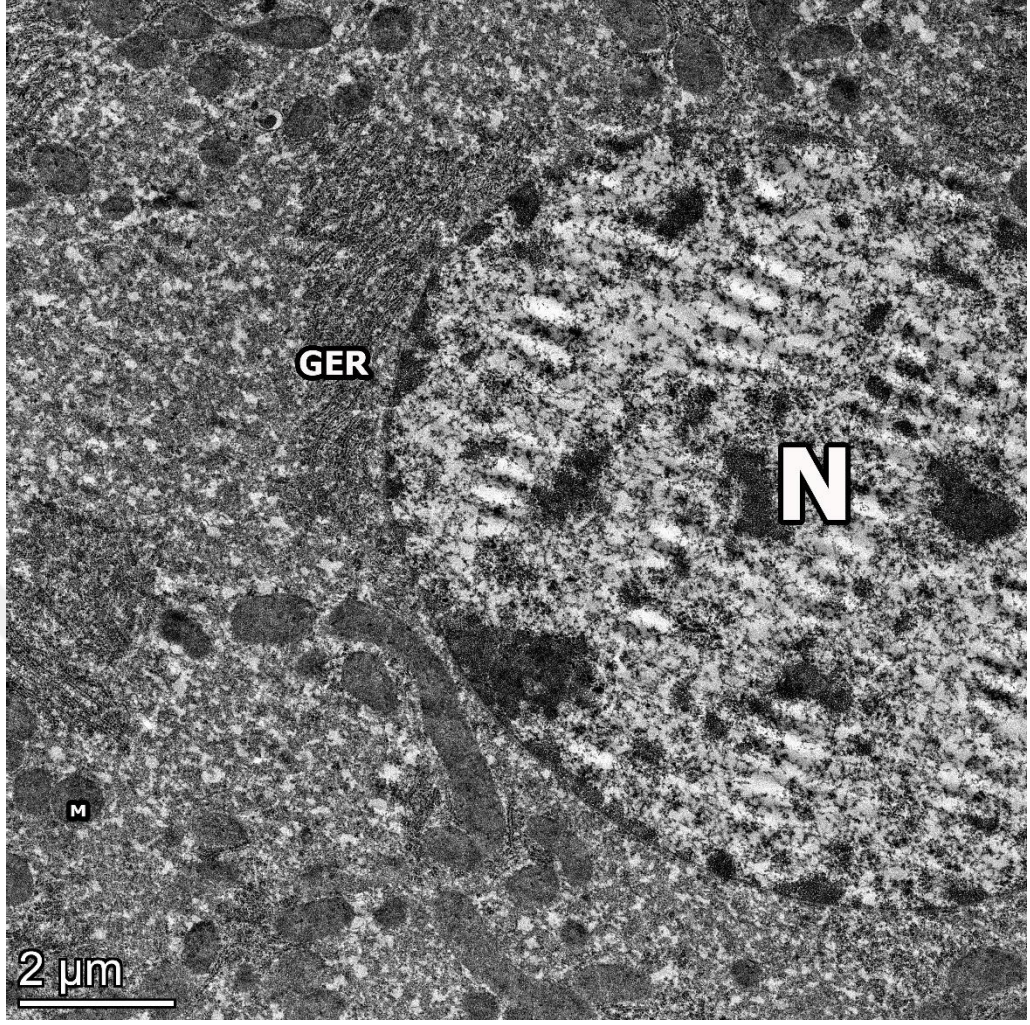
Resim 27. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Bazı hepatositlerde yer yer genişlemiş endoplazmik retikulum membranları (*) hafif derecede dejenerasyonu işaret etmektedir. N: Nükleus, M: Mitokondriyon.)



Resim 28. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Karaciğer parenkimasında normale yakın ince yapı izlenmektedir. S: Sinüzoid, SK: Safra kanalikülü, M: Mitokondriyon.)



Resim 29. MSG+APO grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

(Normale yakın hepatosit ince yapısı izlenmektedir. N: Nükleus, GER: Granüllü ER, M: Mitokondriyon.)

5 TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında MSG'nin karaciğer dokusunda oluşturduğu hasar ve APO'nun bu hasara karşı iyileştirici etkisi histolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve geçirimli elektron mikroskobu düzeyinde incelendi. MSG uygulanan deney grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sıçanların ağırlıklarında artış, hepatositlerde steatosis, vakuolizasyon, PAS+ reaksiyonda azalma, parenkimada nötrofil infiltrasyonu ve bağ dokusunda artış meydana geldiği görüldü. Ayrıca TUNEL ve NOX-2 pozitif hücre sayılarında artış görüldü. MSG grubunda serum ALT, AST, ALP ve total bilirubin seviyelerinde artış görülürken albümin konsantrasyonu seviyesinde düşüş olduğu tespit edildi. MSG grubunda karaciğer dokusunda oksidatif stres belirteçleri olan MDA ve MPO seviyelerinin arttığı, GSH ve SOD seviyelerinin ise azaldığı sonucuna ulaşıldı. MSG 'ye ek olarak ilgili zaman diliminde APO uygulaması sonucunda, MSG kullanımına bağlı olarak karaciğer parenkimasında oluşan histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal düzeydeki harabiyetlerde belirgin iyileşmenin meydana geldiği gözlemlendi.

MSG, özellikle Çin, Japon ve Tayland yemeklerinde yaygın olarak kullanılan bir lezzet arttırıcıdır. Çeşitli Batı Afrika ülkelerinde A-One, Ajinomoto ve Vedan ticari isimleri ile satılmaktadır. A-One (>%99 MSG) çorbalarda, güveç soslarında ve yulaf lapası hazırlanışında oldukça popüler olarak kullanılmakta olan bir baharattır (65). MSG aynı zamanda marine edilmiş kırmızı ette, balıkta, tavukta, sebzelerde, soslarda ve ticari paket gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (66, 67).

MSG'nin güvenilirliği 1968 yılında Kwok tarafından ilk kez tanımlanan Çin Restoranı Sendromu (ya da MSG'ye bağlı kompleks semptomlar)'ndan beri yaygın bir şekilde tartışılmaktadır. Kwok'un bu raporuna göre MSG içeren yemekler ya da Çin yemekleri tüketen kişilerde baş ve boyun ağrıları, halsizlik ve çarpıntı gibi semptomların görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar MSG tüketiminin astım, atopik dermatit, ürtiker ve solunum zorluğu gibi başka semptomlara da neden olduğunu belirtmişlerdir (68).

MSG ve sodyum benzoat, nitritler ve nitratlar gibi diğer besin katkı maddelerinin kardiyovasküler hastalıklar, sinir sistemi, karaciğer hasarı, ishal, sindirim sorunları,

depresyon, baş ağrısı, alerjik reaksiyon, kanser gibi sağlık sorunlarının olası nedenleri olabileceği düşünülmektedir. Toksik dozdaki MSG'nin karaciğerde inflamasyona, oksidatif strese ve hepatoselüler hasara neden olduğu bilinmektedir (63).

Yüksek dozda MSG'nin küçük kemirgenlerde vücut ağırlığı ve yağ kütlelerinde artışa neden olduğu bilinmektedir (69). Yapılan çalışmada albino erkek farelere oral yolla 4 mg/g MSG uygulaması gerçekleştirilmiş ve çalışma sonucunda MSG'nin vücut ağırlıklarında artışa neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır (70).

Bir çok deneysel çalışmada uzun süreli tedavilerde olumsuz etkisi olmaksızın kullanılan güvenli bir ilaç olan APO, *Picrorhiza kurroa* bitkisinden elde edilmektedir (71). NOX kompleksini inhibe ederek bir bağışıklık düzenleyicisi görevi görmekte ve buna bağlı olarak hücre içi ROS oluşumunu azaltmaktadır (72, 73). Gerçekleştirilen bir çalışmada Kunming erkek farelere intraserebroventriküler enjeksiyon yoluyla 2.5 nmol seratonin, 0.3 nmol Trolox ve 0.9 nmol APO uygulanmıştır. Uygulamadan 3 saat sonra hayvanlar kurban edilip besin tüketimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre seratonin uygulamasının hayvanlarda besin tüketimini düşürdüğü, Trolox ve APO uygulamasının ise bu düşüşü tersine çevirerek besin tüketimini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (74).

Gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG, APO ve MSG+APO gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıklarında artışın meydana geldiği sonucuna ulaşıldı. Ancak çalışmamızda deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı vücut ağırlığı artışı gözlenmedi.

Yapılan çalışmada deri altı 2 mg/g MSG uygulaması gerçekleştirilen Swiss albino farelerin hepatositlerinin hücre membranının yapısının bozularak özelliğini kaybettiğini, nükleusların ise küçük ve piknotik hale geldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca hepatositlerde yoğun vakuolizasyon olduğunu belirterek hepatositlerdeki PAS-pozitif reaksiyonun azaldığını vurgulanmıştır (67).

Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada 1 ve 2 aylık Wistar albino deney hayvanlarından oluşan olmak üzere 2 ayrı deney grubu oluşturulmuş ve bu deney sürelerinde Wistar albino sıçanlara 60 mg/1000 g oral MSG uygulaması

gerçekleştirilmiştir. Ayrıca üçüncü bir deney grubu olarak bir ay boyunca deney hayvanlarına 100 mg/1000 g MSG uygulanmıştır. Tedavi edici ajan olarak ise guanidinoethan sülfonik asit (GES) seçilmiştir. MSG uygulaması sonucunda karaciğer morfolojisinin bozulduğu, santral ven etrafında kanamanın arttığı, nekrotik bölgelerin olduğu, vakuolizasyonun, kollajen liflerin ve hücre inflamasyonunun arttığı sonucuna ulaşılmıştır. GES tedavisi gerçekleştirilen hayvanlarda ise MSG'ye bağlı olarak oluşan hücresel harabiyetin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (75).

Gerçekleştirilen bir diğer deneysel çalışmada Wistar albino erkek sıçanlara 4 mg/g MSG intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası sırasıyla 0, 15, 30 ve 45 dakika sonra deney hayvanları kurban edilmiştir. Otuzuncu dakikada kurban edilen deney grubunda karaciğer hücrelerinde hipertrofi ve küçük veziküller görülürken, 45. dakikada kurban edilen hayvanların karaciğer hücrelerinde çok daha fazla sayıda vezikül ve sitoplazmik hasar izlenmiştir (76).

Yapılan bir başka çalışmada Sprague Dawley erkek sıçanlara oral yolla 2 hafta boyunca 2,5 g/kg MSG uygulaması gerçekleştirilmiş, tedavi edici ajan olarak antioksidan özelliğinden dolayı oral yolla 4 hafta boyunca 24 mg/ml zencefil özütü kullanılmıştır. MSG uygulaması sonucunda özellikle parenkimada bağ dokusunda önemli derecede artış izlenmiştir. Tedavi grubu hayvanları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise parenkimada bağ dokusu yapısının normale yakın olduğu vurgulanmıştır (77).

Yapılan bir diğer çalışmada 60 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar Kontrol, %2 Kreatin (Cr) (4 hafta uygulama), %4 %2 Cr (1 hafta %4'lük Cr uygulaması ardından 3 hafta %2'lik Cr uygulaması) grupları şeklinde 3 ayrı gruba ayrılmıştır. 4 hafta sonra bu gruplar alt gruplara ayrılmış, intraperitoneal enjeksiyon ile bir kemoterapi ilacı olan doksorubin (DOX) (15 mg/kg) ve %0,9 serum fizyolojik uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda Kontrol/DOX grubu %4%2 Cr/DOX ve %2 Cr/DOX grubu ile karşılaştırıldığında karaciğerde hücre içi oksidatif strese ve fibrosiste artış görülmüştür(78).

Gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubunu oluşturan deney hayvanlarının karaciğer parenkimasında sinüzoidlerde

genişleme, hepatositlerde vakuolizasyon, parenkimada özellikle periportal alanda lökosit infiltrasyonu ve artmış bağ dokusu yapısı gözlemlendi. MSG sonrası APO uygulanan deney grubunda hepatosit vakuolizasyonu, sinüzoid genişlemesi ve parenkimada lökosit infiltrasyonunun ve bağ dokusunun azaldığı, karaciğerin morfolojisinin Kontrol grubuna benzer bir yapıda olduğu sonucuna ulaşıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubunda hepatositlerde glikojen varlığını işaret eden PAS+ reaksiyonda azalmanın olduğu, MSG+APO ve APO gruplarında ise bu pozitif reaksiyonun normal seviyede olduğu gözlemlendi.

Apoptoz, homeostazın sürdürülebilmesi ve normal gelişim için birçok yönden esastır. Karaciğerde apoptoz, hasarlı hücrelerin temizlenmesi ve homeostazın kontrolü için gerekli bir fizyolojik süreçtir. Fizyolojik olarak, karaciğerde 10.000 hücrede 1-5 arasında apoptotik hücre saptanmaktadır. Karaciğerin patolojik durumlarında, aşırı aktivasyon sonrası apoptotik süreç hepatositlerde hasara, apoptozun inhibisyonu ise hepatositlerde proliferasyona ve transformasyona neden olabilmektedir (79).

Gerçekleştirilen bir diğer çalışma kapsamında farklı konsantrasyonlardaki MSG'nin (1 mM ile 100 mM arası) Wistar albino erkek sıçan timositleri üzerindeki apoptotik etkisini *in vitro* olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre yüzdesinde doza bağlı olarak önemli bir artış olduğu sonucuna ulaşılmıştır(43).

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada dişi sıçanlara gebeliğin 0. Gününden 20. Gününe kadar oral yolla günlük 1g/5mL/kg MSG uygulaması gerçekleştirilmiştir. 20. Günün sonunda hamile dişi sıçanlardan ve yavru sıçanlardan alınan karaciğer dokularında kaspaz-3 aktivitesi incelenmiştir. Elde edilen sonuca göre MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hepatositlerdeki kaspaz-3 immünreaksiyonunda önemli derecede artışın meydana geldiği, buna bağlı olarak bu hücrelerin apoptoza duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (80).

Bizim yaptığımız çalışma sonucunda da benzer şekilde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubunda hepatositlerde apoptotik hücre sayısının arttığı ve paralel bulgu olarak hepatositlerde yoğun dejenerasyon olduğu izlendi. MSG+APO grubunda ise karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi.

NOX, ROS'un üretim kaynağı olan bir enzim ailesinin parçasıdır. APO NOX enzim ailesinin en seçici inhibitörüdür (81). Yapılan bir deneysel çalışmada doğal tip C57BL/6J dişi farelere 8 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyon yoluyla akut karaciğer hasarını oluşturmak üzere 240 mg/kg doksisisiklin uygulaması gerçekleştirilmiştir. Tedavi edici ajan olarak ise intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 5 mg/kg APO uygulanmıştır. Çalışmada araştırmacılar NOX'a bağlı olarak akut karaciğer hasarının gerçekleştiğini, APO'nun ise hücre içi ROS seviyesini azalttığını ve inflamatuvar sitokinlerin oluşumunu baskıladığı sonucuna ulaşmışlardır (82).

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada Sprague Dawley erkek sıçanlara %5 sodyum taurokolat uygulayarak şiddetli akut pankreatitis (SAP) (bağırsak mukoza yaralanması) deney modeli oluşturulmuş ve 30 dakika sonra bu deney grubu hayvanlarına tedavi edici ajan olarak 50 mg/kg APO uygulanmıştır. Kontrol grubu ve tedavi grubu deney hayvanlarında NOX-2 immünreaktivitesinde düşüş, SAP grubu deney hayvanlarında ise NOX-2 immünreaktivitesinde artış gözlenmiştir (83).

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde Wistar albino erkek diyabetik sıçanlara 4 hafta boyunca 30 mg/kg ve 100 mg/kg orogastik katater yardımıyla intragastrik yöntemle APO uygulanmıştır. Diyabetik hayvanların omuriliklerinde NOX ekspresyonunda artışın olduğu, tedavi grubu hayvanlarında ise NOX ekspresyonunda azalmanın meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır(84).

Bizim çalışmamızda, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında APO grubundaki hayvanların karaciğer dokusu kesitlerinde NOX-2 immünfloresan boyamada floresan yoğunluğunda azalma, MSG grubunda ise floresan yoğunluğunda artışın meydana geldiği görüldü. APO'nun oksidatif hasarı inhibe edici özelliğine bağlı olarak MSG+APO grubundaki hayvanlarda ise NOX-2 immünfloresan yoğunluğunda azalma gerçekleştiği belirgindi. Karaciğer dokusu hasar modellerinde NOX-2 proteinine yönelik gerçekleştirilen çalışmaların mevcut olmamasından dolayı elde ettiğimiz veriler çalışmamıza özgünlük katmaktadır.

Karaciğer ve böbrek vücuda giren yabancı bileşenlerin detoksifikasyonundan sorumlu organlardır (39). AST, kalp, karaciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas gibi

birçok dokuda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, ALT enzimi öncelikli olarak hepatositlerde bulunmakta olup, bu nedenle hepatoselüler hasar için oldukça duyarlı bir belirteçtir. Böylelikle hepatoselüler hasarın derecesinin nicel olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (85). MSG, glutamine dönüşen sodyum ve L-glutamata kolayca ayrışmaktadır. Hepatositlerde birikmekte olan glutamin hücre hasara neden olmakta, buna bağlı olarak kandaki ALT ve AST enzim seviyeleri artmaktadır (39). ALP, hücre zarında yer alan bir enzim olup, karaciğerde hücre hasarının gerçekleştiği durumlarda seviyesinde artış izlenmektedir. Bu nedenle karaciğer hasarı için önemli bir diğer belirteçtir (86).

Glutasyon (GSH), vücutta glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelen doğal bir bileşendir. Bu molekül, karaciğer, böbrek, bağırsak ve karaciğer hücrelerinde temel olarak meydana gelen detoksifikasyon sürecinde kritik rol oynamaktadır. GSH, lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikallerle ve hidrojen peroksit ile birleşme yeteneğinden dolayı lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir (87). Lipid peroksidasyonunun bir diğer belirteci olan MDA, artan lipid peroksidasyonu ile birlikte enzimlerle çapraz olarak bağlanarak inaktivasyona neden olur. Artış gösteren lipid peroksidasyonuna yüksek seviyedeki süperoksit, H₂O₂ ve hidroksil radikallerine neden olmaktadır (88).

Hemoglobinin parçalanarak oluşan bir ürünü olan bilirubin, tutulum, konjugasyon ve atılım fonksiyonunu yansıtması nedeniyle bozulmuş karaciğer fonksiyonunu tanımlamak için spesifik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (89). Karaciğerde oluşan yüksek hasar ve dolaylı olarak fonksiyon kaybı durumunda plazmadaki bilirubin miktarı artmaktadır. Ardından konjuge olmayan “dolaylı” bilirubin üretimi gerçekleşmekte ve karaciğere taşınmak üzere albümine bağlanmaktadır. Karaciğer hastalığı durumunda albümin sentezinde azalma olmaktadır (90).

Karaciğer dokusunda oksidatif stres ve buna bağlı olarak gerçekleşen serbest radikal oluşumu inflamasyon şiddetini arttırarak karaciğer hasarına neden olabilmektedir. Vücuttaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan, hücreyi hasardan korumak amacıyla serbest radikalleri temizleyebilmektedir. SOD, ROS’u yok etme ve süperoksit serbest radikalleri ile ilişkili karaciğer hasarını önleme ve tedavi etmede birincil derecede savunma elemanıdır (91). MPO, fagositlerin toplanıp

aktive olmasından sonra salınan ve ROS oluşumunda önemli bir rol oynayan enzimdir. MPO, nötrofiller tarafından yüksek oranda ekprese edilmektedir ve bir nötrofil infiltrasyonu belirteci olarak kullanılmaktadır (92) .

Gerçekleştirilen bir deneysel çalışma kapsamında 2 hafta boyunca Sprague-Dawley albino erkek sıçanlara oral yoldan 35 mg/kg MSG uygulaması gerçekleştirilmiş, tedavi edici ajan olarak da vitamin D (500 IU/kg) ve L-Arginin (1 ml /kg'da 200 mg olacak şekilde)'i 2 hafta süresince uygulanmıştır. Çalışma sonucunda kandaki ALT, AST ve MDA seviyelerinin arttığı, total antioksidan kapasitesinin ise azaldığı sonucuna ulaşılmıştır(39).

Yapılan başka bir çalışmada Wistar albino sıçanlara 10 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 4mg/g MSG uygulaması gerçekleştirilmiştir. Tedavi edici ajan olarak ise 200 mg/kg vitamin C ve vitamin E ile 10 mg/kg kersetin uygulanmıştır. İlgili çalışmanın sonucunda MSG uygulanan grupta karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki MDA, glukoz-6-fosfataz (G6P) ve glutatyon-S-transferaz (GST) seviyelerinin önemli derecede arttığı, GSH seviyesinin ise azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Katalaz (CAT) aktivitesi karaciğer dokusunda artarken, böbrek ve beyin dokularında azalmıştır. ALT, AST ve γ -glutamil transferaz (GGT) seviyelerinde ise ilgili dokularda artış gözlenmiştir. Uygulanan tedavi sonucunda MDA, ALT, AST, GGT, G6P ve GST seviyelerinin bu organlarda önemli ölçüde azaldığı, GSH seviyelerinin bu organlarda önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (65).

Yapılan bir deneysel çalışmada 8 hafta boyunca albino erkek sıçanlara oral yoldan 1 g/kg MSG uygulaması gerçekleştirilmiş, tedavi edici ajan olarak ise 200 mg/kg propolis uygulanmıştır. Çalışma sonucunda ALT, AST, ALP ve MDA seviyelerinin önemli ölçüde arttığı, GSH seviyesinde ise önemli ölçüde azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır (93).

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada 8 hafta boyunca Wistar albino erkek sıçanlara oral olarak 2,4 g/kg MSG uygulaması gerçekleştirilmiştir. Tedavi edici ajan olarak 200 mg/kg graviola özütü kullanılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesinde önemli ölçüde artış gözlemlerken, SOD, CAT, GST ve GSH seviyelerinde anlamlı bir düşüş meydana geldiği sonucuna ulaşmışlardır (94).

Bizim çalışmamızda da literatürde belirtilen çalışmalara benzer şekilde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSG grubu deney hayvanlarının serumlarındaki ALT, AST, ALP ve total bilirubin konsantrasyonlarında artış görülürken albümin seviyelerinde düşüş olduğu gözlemlendi. Deney gruplarının karaciğer doku örneklerinde oksidatif stres belirteçleri olan MDA ve MPO seviyelerinde artış izlenirken, GSH ve SOD seviyelerinde düşüş olduğu izlendi.

Sprague Dawley sıçanlara 90 gün boyunca oral olarak 4 mg/kg MSG uygulamasının gerçekleştirildiği bir deneysel çalışmada Tedavi grubu deney hayvanları Hasar grubu ile aynı dozda MSG uygulamasında maruz bırakılmış ardından bu hayvanlar doku rejenerasyonunu gözlemlemeye yönelik olarak 4 hafta bekletilmiştir. Geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki inceleme sonucunda MSG grubu karaciğer dokusu ince kesitlerinde hepatosit sitoplazmasında piknotik nükleus, çok sayıda lipid damlacıkları, şişmiş mitokondriyonlar ve sinüzoidlerde vazokonjesyon gözlenmiştir. Tedavi grubu incelendiğinde ise hepatosit sitoplazmalarında az sayıda lipid damlacığı ve normal ince yapıyı yansıtan organel yapısı görülmüştür (95).

Bizim çalışmamızda da geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki incelemeleri değerlendirildiğinde, benzer şekilde MSG grubuna ait deney hayvanlarının karaciğer dokularında hepatositlerde steatosise bağlı lipid damlacıklarında artış, safra kanaliküllerinde mikrovillus yapısında bozulma, piknotik nükleus ve kristalleri silinmiş çok sayıda mitokondriyon izlendi. Tedavi grubu incelendiğinde ise tüm bu hasar parametrelerinde belirgin bir azalma ile normale yakın hepatosit ve safra kanalikülü ince yapısı gözlemlendi.

Çalışmamızda, literatür verileri ile uyumlu olarak, MSG ile indüklenmiş karaciğer hasarında, APO'nun ROS'ların oluşumunun düzenlenmesinde ve apoptozun engellenmesinde etkili olduğu ve MSG etkisi ile oluşan oksidatif hasar kaynaklı karaciğer dokusu hasarının iyileşmesine katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir.

6 SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada MSG ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarında hepatositlerde vakuolizasyon eşliğinde steatozis oluştuğu, hepatosit sitoplazmasında glikojen içeriğinde azalmanın gerçekleştiği, parenkimada genişlemiş sinüzoidlerde vazokonjesyon, lökosit infiltrasyonu ve bağ dokusundaki belirgin artış en önemli histopatolojik bulgular olarak izlenmiştir. Bu grupta MSG etkisi ile oluşan oksidatif hasara bağlı olarak apoptotik hücre sayısında ve NOX-2- pozitif hücre sayısında artış gözlenmiştir. MSG grubuna ait deney hayvanlarının kan örneklerinde ALT, AST, ALP ve total bilirubin seviyelerinde artış, albümin seviyesinde ise düşüş saptanmıştır. Karaciğer dokusundaki biyokimyasal belirteçler incelendiğinde MDA, MPO seviyelerinde artış, GSH ve SOD seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir. MSG+APO grubunda ise mikroskopik ve biyokimyasal hasar parametrelerinde anlamlı derecede iyileşme gözlenerek APO'nun iyileştirici etkisi belirgin olarak izlenmiştir.

Literatürdeki benzer çalışmalar ve elde ettiğimiz veriler doğrultusunda MSG'nin karaciğer dokusu üzerinde neden olduğu hasara karşın APO'nun ilgili doz aralığında reaktif oksijen türlerinin oluşmasının önlenmesinde rol oynayarak oksidatif hasarı engellediği, apoptozu düzenlediği ve karaciğer parenkimasında MSG etkisi ile oluşan harabiyeti belli bir oranda iyileştirdiğini düşünmekteyiz.

7 KAYNAKLAR

1. Williams AN, Woessner KM. Monosodium glutamate 'allergy': menace or myth? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(5):640-6.
2. Chakraborty SP. Patho-physiological and toxicological aspects of monosodium glutamate. *Toxicology mechanisms and methods*. 2019;29(6):389-96.
3. Shrestha S, Jha CB, Das B, Yadav P, editors. *Effects of Monosodium Glutamate on Liver Tissue of Wistar Albino Rats-A Histological And Biochemical Study* 2018.
4. Al-Badr MTaN. Adverse Effects of Monosodium Glutamate on Liver and Kidney Functions in Adult Rats and Potential Protective Effect of Vitamins C and E. *Food and Nutrition Sciences*. 2012;3:651-9.
5. Afifi MM, Abbas AM. Monosodium glutamate versus diet induced obesity in pregnant rats and their offspring. *Acta physiologica Hungarica*. 2011;98(2):177-88.
6. Jumah SIOaMB-. Histomorphological Changes in Mono-sodium Glutamate Induced Hepato-renal Toxicity in Mice. *International Journal of Pharmacology*. 2019;15:449-56.
7. Eweka A, Igbigbi P, Ucheya R. Histochemical studies of the effects of monosodium glutamate on the liver of adult wistar rats. *Annals of medical and health sciences research*. 2011;1(1):21-9.
8. Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, et al. The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Suppresses Preneoplastic Liver Foci of Rats. *Toxicologic pathology*. 2017;45(4):544-50.
9. Fayed MR, El-Naga RN, Akool ES, El-Demerdash E. The potential antifibrotic impact of apocynin and alpha-lipoic acid in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats: Role of NADPH oxidases 1 and 4. *Drug Discov Ther*. 2018;12(2):58-67.
10. Yücel A, Aydoğan MS, Ucar M, Sarıcı KB, Karaaslan MG. Effects of Apocynin on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Transplantation proceedings*. 2019;51(4):1180-3.
11. Qin L, Crawford JM. 1 - Anatomy and Cellular Functions of the Liver. In: Sanyal AJ, Boyer TD, Lindor KD, Terrault NA, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology (Seventh Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 2-19.e4.
12. Dancygier H. *Clinical hepatology : principles and practice of hepatobiliary diseases*. Volume 1 Volume 1. 2010.
13. Ovalle W. *Netter's Essential Histology (2nd ed.)*.
14. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology*. London: Elsevier Health Sciences; 2015.
15. Michael HR, Wojciech P. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular biology*, 7e.
16. Krishna M. Microscopic anatomy of the liver. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2013;2(Suppl 1):S4-S7.
17. Saxena R. *Microscopic Anatomy, Basic Terms, and Elemental Lesions*. 2011:3-28.
18. Rogers AB, Dintzis RZ. 13 - Hepatobiliary System. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2018. p. 229-39.

19. Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Laboratory Investigation*. 2004;84(2):153-9.
20. Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Chapter 9 - The Liver. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 197-235.
21. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol*. 2017;11:622-30.
22. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*. 2014;96:121-9.
23. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-R51.
24. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev*. 1989;69(3):708-64.
25. Ross MH, Pawlina W. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology* 2020.
26. Tsung A, Geller DA. Gross and Cellular Anatomy of the Liver. In: Monga SPS, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Boston, MA: Springer US; 2011. p. 3-6.
27. Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, Torimura T, Aguirre-García J. Chapter 2 - Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiology*. Boston: Academic Press; 2017. p. 23-44.
28. Potter BJ. Components of the Hepatic System☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier; 2019.
29. Bogdanos D, Leung PSC, Gershwin ME. Chapter 87 - Liver and the Biliary Tract. In: Mestecky J, Strober W, Russell MW, Kelsall BL, Cheroutre H, Lambrecht BN, editors. *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 1695-717.
30. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-72.
31. Hajjhasani MM, Soheili V, Zirak MR, Sahebkar A, Shakeri A. Natural products as safeguards against monosodium glutamate-induced toxicity. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(4):416-30.
32. Kaitano TE. Food Additives: Flavors and Flavor Enhancers. In: Motarjemi Y, editor. *Encyclopedia of Food Safety*. Waltham: Academic Press; 2014. p. 466-70.
33. Stanska K, Krzeski A. The umami taste: from discovery to clinical use. *Otolaryngol Pol*. 2016;70(4):10-5.
34. Wang W, Zhou X, Liu Y. Characterization and evaluation of umami taste: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;127:115876.
35. Kurihara K. Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *Biomed Res Int*. 2015;2015:189402.
36. Zandfirescu A, Ungurianu A, Tsatsakis AM, Nitulescu GM, Kouretas D, Veskoukis A, et al. A review of the alleged health hazards of monosodium glutamate. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(4):1111-34.

- 37.El-Meghawry El-Kenawy A, Osman HE, Daghestani MH. The effect of vitamin C administration on monosodium glutamate induced liver injury. An experimental study. *Exp Toxicol Pathol.* 2013;65(5):513-21.
- 38.Augustine I Airaodion EOO, Etinosa U Osemwowa, Uloaku Ogbuagu, Chimdi E Esonu, et al. . Toxicological Effect of Monosodium Glutamate in Seasonings on Human Health. *Global Journal of Nutrition & Food Science.* Volume 1 - Issue 5, 2019.
- 39.Elbasuoni EA, Ragy MM, Ahmed SM. Evidence of the protective effect of l-arginine and vitamin D against monosodium glutamate-induced liver and kidney dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:799-808.
- 40.Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
- 41.Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology.* 2018;175:71-102.
- 42.Park E, Yu KH, Kim DK, Kim S, Sapkota K, Kim SJ, et al. Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. *Food Chem Toxicol.* 2014;67:1-9.
- 43.Pavlovic V, Cekic S, Kocic G, Sokolovic D, Zivkovic V. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and Bcl-2/Bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiological research.* 2007;56(5):619-26.
- 44.Storto M, Sallese M, Salvatore L, Poulet R, Condorelli D, Dell'Albani P, et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis. *Journal of Endocrinology.* 2001;170(1):71-8.
- 45.Rahimi Anbarkeh F, Baradaran R, Ghandy N, Jalali M, Reza Nikravesh M, Soukhtanloo M. Effects of monosodium glutamate on apoptosis of germ cells in testicular tissue of adult rat: An experimental study. *International journal of reproductive biomedicine.* 2019;17(4):261-70.
- 46.Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators of Inflammation.* 2008;2008:106507.
- 47.Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2008;56(2):301-6.
- 48.Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YMF, Hoijer MA, Garssen J, et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology.* 2006;531(1):264-9.
- 49.Kim JY, Park J, Lee JE, Yenari MA. NOX Inhibitors - A Promising Avenue for Ischemic Stroke. *Exp Neurobiol.* 2017;26(4):195-205.
- 50.Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Front Physiol.* 2016;7:17.
- 51.Pastori D, Pignatelli P, Carnevale R, Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* 2015;120:50-5.

52. Viridis A, Gesi M, Taddei S. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2016;87:1-5.
53. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):247-58.
54. Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schröder K, et al. Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. 2008;51(2):211-7.
55. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
56. Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2018;15(12):738-52.
57. Wu Q, Wu W, Jacevic V, Franca TCC, Wang X, Kuca K. Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020;35(1):574-83.
58. Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2018;67(5):2013-24.
59. Wu J, Zhang W, Liu X, Wu L, He G, Li P, et al. Apocynin protects endothelial cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via IRE1 α engagement. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2018;449(1):257-65.
60. Peng X, Yang Y, Tang L, Wan J, Dai J, Li L, et al. Therapeutic benefits of apocynin in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury via suppression of the late stage pro-apoptotic AMPK/JNK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020;125:110020.
61. Schumacher-Petersen C, Christoffersen BØ, Kirk RK, Ludvigsen TP, Zois NE, Pedersen HD, et al. Experimental non-alcoholic steatohepatitis in Göttingen Minipigs: consequences of high fat-fructose-cholesterol diet and diabetes. *Journal of Translational Medicine.* 2019;17(1):110.
62. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry.* 1979;95(2):351-8.
63. Eid RA, Al-Shraim M, Zaki MS, Kamar SS, Abdel Latif NS, Negm S, et al. Vitamin E protects against monosodium glutamate-induced acute liver injury and hepatocyte ultrastructural alterations in rats. *Ultrastruct Pathol.* 2019;43(4-5):199-208.
64. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of laboratory and clinical medicine.* 1963;61:882-8.
65. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human & experimental toxicology.* 2006;25(5):251-9.
66. Ugur Calis I, Turgut Cosan D, Saydam F, Kerem Kolac U, Soyocak A, Kurt H, et al. The Effects of Monosodium Glutamate and Tannic Acid on Adult Rats. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18(10):e37912.
67. Bhattacharya T, Bhakta A, Ghosh SK. Long term effect of monosodium glutamate in liver of albino mice after neo-natal exposure. *Nepal Med Coll J.* 2011;13(1):11-6.
68. Maluly HDB, Ariseto-Bragotto AP, Reyes FGR. Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. *Food Sci Nutr.* 2017;5(6):1039-48.

69. Tordoff MG, Aleman TR, Murphy MC. No effects of monosodium glutamate consumption on the body weight or composition of adult rats and mice. *Physiology & behavior*. 2012;107(3):338-45.
70. El-Helbawy N, Radwan D, Salem M, El-Sawaf M. Effect of monosodium glutamate on body weight and the histological structure of the zona fasciculata of the adrenal cortex in young male albino rats. *Tanta Medical Journal*. 2017;45(2):104-13.
71. Simonyi A, Serfozo P, Lehmidi TM, Cui J, Gu Z, Lubahn DB, et al. The neuroprotective effects of apocynin. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2012;4:2183-93.
72. Liu F, Lin C, Hong J, Cai C, Zhang W, Zhang J, et al. Apocynin protects retina cells from ultraviolet radiation damage via inducing sirtuin 1. *Journal of drug targeting*. 2020;28(3):330-8.
73. Rahman MM, Muse AY, Khan D, Ahmed IH, Subhan N, Reza HM, et al. Apocynin prevented inflammation and oxidative stress in carbon tetra chloride induced hepatic dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:421-8.
74. Fang X-L, Shu G, Yu J-J, Wang L-N, Yang J, Zeng Q-J, et al. The Anorexigenic Effect of Serotonin Is Mediated by the Generation of NADPH Oxidase-Dependent ROS. *PLOS ONE*. 2013;8(1):e53142.
75. Waer H, Edress S. The Effect of Monosodium Glutamate (MSG) On Rat Liver And The Ameliorating Effect Of Guanidino Ethane Sulfonic acid (GES) (Histological, Histochemical and Electron Microscopy Studies). *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2006;24:524-38.
76. Ortiz GG, Bitzer-Quintero OK, Zarate CB, Rodriguez-Reynoso S, Larios-Arceo F, Velazquez-Brizuela IE, et al. Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(2):86-91.
77. Abd El Hady Mousa M, Mansour H, Eid F, Mashaal A. Anti-inflammatory activity of ginger modulates macrophage activation against the inflammatory pathway of monosodium glutamate. *Journal of Food Biochemistry*. 2021;45(8):e13819.
78. Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, et al. Creatine Alleviates Doxorubicin-Induced Liver Damage by Inhibiting Liver Fibrosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Cellular Senescence. *Nutrients*. 2020;13(1).
79. Wu YH, Hu SQ, Liu J, Cao HC, Xu W, Li YJ, et al. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice. *Int J Mol Med*. 2014;33(6):1498-506.
80. Gad El-Hak HN, Abdelrazek HMA, Zeidan DW, Almallah AA, Khaled HE. Assessment of changes in the liver of pregnant female rats and their fetuses following monosodium glutamate administration. *Environmental science and pollution research international*. 2021;28(32):44432-41.
81. Connell BJ, Saleh MC, Khan BV, Saleh TM. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(12):3063-9.
82. Mitazaki S, Hashimoto M, Matsuhashi Y, Honma S, Suto M, Kato N, et al. Apocynin reduced doxycycline-induced acute liver injury in ovariectomized mice. *Toxicology Reports*. 2016;3:357-63.
83. Deng W, Abliz A, Xu S, Sun R, Guo W, Shi Q, et al. Severity of pancreatitis-associated intestinal mucosal barrier injury is reduced following treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3525-34.

84. Olukman M, Önal A, #252, Çelenk F, Uyan, #305, et al. Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. *Neural Regeneration Research*. 2018;13(9):1657-64.
85. Al-Mamary M, Al-Habori M, Al-Aghbari AM, Baker MM. Investigation into the toxicological effects of *Catha edulis* leaves: a short term study in animals. *Phytotherapy research : PTR*. 2002;16(2):127-32.
86. Negahdary M, Ranjbar A, Asadi A. The toxicity effect of cerium oxide nanoparticles on ALT, AST and ALP enzymes in male Rat. *Annals of Biological Research*. 2012;3:4386-92.
87. Galicia-Moreno M, Rosique-Oramas D, Medina-Avila Z, Alvarez-Torres T, Falcon D, Higuera-de la Tijera F, et al. Behavior of Oxidative Stress Markers in Alcoholic Liver Cirrhosis Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9370565.
88. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3(1):17.
89. Ge PL, Du SD, Mao YL. Advances in preoperative assessment of liver function. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2014;13(4):361-70.
90. Hoekstra LT, de Graaf W, Nibourg GA, Heger M, Bennink RJ, Stieger B, et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. *Annals of surgery*. 2013;257(1):27-36.
91. Islam MS, Yu H, Miao L, Liu Z, He Y, Sun H. Hepatoprotective Effect of the Ethanol Extract of *Illicium henryi* against Acute Liver Injury in Mice Induced by Lipopolysaccharide. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(10).
92. Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, et al. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2009;175(4):1473-82.
93. Ashry M, Abd Ellah H, Gheth E. The possible ameliorative effect of propolis in rat's liver treated with monosodium glutamate (MSG). *Nature and Science*. 2012;10(12):209-19.
94. Shukry M, El-Shehawi AM, El-Kholy WM, Elsisy RA, Hamoda HS, Tohamy HG, et al. Ameliorative Effect of *Graviola (Annona muricata)* on Mono Sodium Glutamate-Induced Hepatic Injury in Rats: Antioxidant, Apoptotic, Anti-inflammatory, Lipogenesis Markers, and Histopathological Studies. *Animals (Basel)*. 2020;10(11).
95. Doaa A. El-Morsi MDHAMD, Mohamed El-Sherbiny MDME-SMD, Eslam K. Fahmy MDHAE-KMD, Al-Moniem Saeed MDAA. Monosodium Glutamate Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress: Pathophysiological, Biochemical and Electron Microscopic Study. *The Medical Journal of Cairo University*. 2019;87(March):397-406.

8 EKLER

EK 1 Etik Kurul Onayı



EK 1 Etik Kurul Onayı (devam)



EK 1 Etik Kurul Onayı (devam)



EK 1 Etik Kurul Onayı (devam)



9 ÖZGEÇMİŞ



