

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BESİN HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN :  
Prof. Dr. BÜLENT NAZLI**

**GIDALARDA KULLANILAN NİTRİTLERİN FAZLA  
ALIMI DURUMUNDA ORGANİZMADA SERBEST  
RADİKAL OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

407910

**Veteriner Hekim Emek Dümen**

**İstanbul 2001**

# İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR.....	
KISALTMALAR.....	
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Gıdalarda Nitrit ve Nitrat Kullanımı .....	3
2.2. Sağlık Açısından Nitrit ve Nitratların Önemi.....	9
2.3. Serbest Radikaller.....	12
2.3.1 Serbest Radikallerin Tanımı, Çeşitleri ve Kaynaklar.....	12
2.3.2 Radikallerin Hücre İçi Kaynakları.....	13
2.3.3 Radikallerin Biyolojik Kaynakları.....	16
2.3.4. Radikal Harabiyeti Riski Altındaki Hücre Komponentleri.....	18
2.3.5. Lipid peroksidasyonu.....	20
2.3.6. Radikal Etkilerine Karşı Koruyucu Enzimler.....	21
2.3.6.1. Katalaz.....	21
2.3.7. Nitrik Oksid'in Temel Kimyası ve Fizyolojik Rollerini.....	23
3.MATERYAL ve METOD.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.2. Deney Grupları.....	27
3.3. Metod.....	27
3.3.1. Biyokimyasal Ölçümler.....	28
3.3.1.1. Lipid Peroksidasyon Analizi.....	28
3.3.1.2. Nitrik Oksid Analizi.....	29
3.3.1.3. Karaciğerde Katalaz Aktivitesi Tayini.....	30
4. BULGULAR.....	31
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	35
6. ÖZET.....	43
7. SUMMARY.....	45
8. KAYNAKLAR.....	47
9. ÖZGEÇMİŞ.....	62

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında benden destek ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent NAZLI ile doktora çalıőmalarımın her aşamasında bana değerli bilgileri ve hoőgörüsü ile rehberlik eden hocam Sayın Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a,

Doktora öğrenimim süresince her konudaki değerli yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Muammer UĞUR ile her konudaki bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Özer ERĐUN'e,

Deneysel çalıőmalarımı yaptığım İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi'nde biyokimyasal analizlerin yapılması aşamasında değerli yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet BELCE'ye ve Sayın Uzm. Dr. Hafize UZUN'a,

Çalıőmalarımın yürümesi sırasında bana her zaman rehberlik eden hocam Sayın Doç. Dr. Arif KAYGUSUZ'a,

İstatistiki değerlendirmelerin yapılması esnasında yardımını esirgemeyen Biyoistatistik Bilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN'a ve deneysel çalıőmamın her aşamasında emeği geçen Tıbbi Biyolog Sayın İbrahim BAYRAK ile bugüne kadar her zaman sevgi, güven ve anlayıőla destek olan sevgili eőim ve anneme en içten dileklerle teşekkür ederim.

## KISALTMALAR

<b>ALT :</b>	Alanin transamilaz
<b>CAT:</b>	Katalaz
<b>GSH:</b>	Glutatyon
<b>GSH – px:</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Hidrojen peroksid
<b>HNO<sub>2</sub>:</b>	Nitröz asid
<b>L:</b>	Lipid radikali
<b>LOO. :</b>	Lipid peroksid
<b>LOOH. :</b>	Lipid hidroperoksid
<b>MDA:</b>	Malondialdehid
<b>NADP<sup>+</sup>:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( oksidlenmiş )
<b>NADPH<sup>+</sup>:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( indirgenmiş )
<b>NO<sup>+</sup>:</b>	Nitrozamin katyonu
<b>NO<sup>-</sup>:</b>	Nitroksil katyonu
<b>N<sub>2</sub>O:</b>	Nitröz oksid
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</b>	Diazot trioksid
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Nitrit
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b>	Nitrat
<b>NR:</b>	Nitrat redüktaz
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:</b>	Süperoksid radikali
<b>ONOO<sup>-</sup>:</b>	Peroksinitrit
<b>PGG<sub>2</sub>:</b>	Prostoglandin G <sub>2</sub>
<b>SOD:</b>	Süperoksid dismutaz

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ülkemizde yaygın olarak tüketilmekte olan sucuk, salam, sosis, pastırma vb. gibi et ürünlerine üreticiden tüketiciye ulaşma süresi içerisinde, dayanıklılığını korumak üzere bazı kimyasal katkı maddeleri katılmaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bu katkı maddelerinin başında nitrit ve nitrat yer almaktadır.

Nitrit ve nitratlar, ilk olarak 1600'lü yıllarda renk verme ya da varolan rengi koruma amacı ile gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde nitrit ve nitratlar gıdalara sodyum ( Na ) ya da potasyum ( K ) elementlerinin nitrit ya da nitrat tuzları olarak katılmaktadırlar. Beyaz kristalize toz halinde olan ve suda kolay eriyen bu kimyasallar gıdalarda arzu edilen rengin ve aromanın oluşumunda ve ürünün dayanma süresinin uzamasında önemli rollere sahiptirler. Nitrit ve nitratlar ağırlıklı olarak et ürünlerinde ve deniz ürünlerinde kullanılmaktadır. Nitritler deniz ürünlerinde özellikle gram-pozitif ve gram-negatif kokların, *Serratia* ve *Pseudomonas* türlerinin üremesini inhibe eden kimyasallardır, ayrıca nitritler et ürünlerinde ise psikotrof ve laktik asit bakterilerinin ve mayaların üremesini önemli ölçüde engellemektedir. Besin zehirlenmelerinde önemli bir role sahip olan *Clostridium botulinum*'u da nitritler etkisiz hale getirmektedirler. Etin ve et ürünlerinin rengi depolama aşamalarında bazı biyokimyasal tepkimeler ile bozulmaktadır. Tüketici tarafından istenmeyen bu durumu engellemek için yine nitritler kullanılmaktadır.

Ancak nitrit ve nitratların kontrolsüz kullanımı istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. İnsanların nitrit alımı günlük 0.4 mg/kg'ı, et ürünlerine katılan nitrit ve nitratların dozu ise 0.02 mg/kg'ı geçmemelidir.

Kontrolsüz olarak kullanılan nitrit ve nitratlar vücuda fazla miktarlarda alındıklarında, amin grupları ile reaksiyona girerek nitrozamin bileşikleri ve nitrik oksid ( NO ) oluşturmakta, dolayısı ile kan ve dokularda serbest radikal gruplarının oluşumunu stimüle ederek kanserojen etki meydana getirebilmektedirler. Bu etkiler genotoksik ve sitotoksik olup kanserojen nitroso bileşikleri ve NO tarafından oluşturulmaktadır.

Özellikle mide ve barsak kanserlerinin etiyolojisinde nitrit ve nitratların rollerinin önem arz ettiği bilinse de nitrit ve nitratların hangi koşullarda ve hangi mekanizma ile nitrozaminleri oluşturduğu bugün bile tam olarak bilinmemektedir. Nitrozaminler aracılığı

serbest radikaller oluştuktan sonra hücreslerde çeşitli yollarla değişik hasarlar oluşmaktadır. En önemli etkilerinden bir tanesi de hücrenin DNA'sını etkileyerek, karsinogenesis mekanizmasının başlangıç evresini oluşturmalarıdır.

MDA konsantrasyonu non-enzimatik oksidatif lipid peroksid dekompozisyonu neticesidir. Lipid peroksidasyonu doku hasarının bir göstergesidir. İki serbest radikal karşılaştığında çiftleşmemiş elektronlarını birleştirerek bir kovalan bağ oluşturur. Bu şekilde süperoksit ve nitrik oksit çok hızlı reaksiyonlaşır ve peroksinitrit oluşur.

Fizyolojik pH'da peroksinitrit direkt olarak proteinlerde hasar oluşturur ve nitronyum iyonu, nitrojen dioksid gazı ve OH radikali gibi toksik etkili bileşiklere parçalanır. Bu şekilde fazla NO'nun toksisitesi oksijen ile etkileşimine bağlıdır. Katalaz, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem-enzimdir.

Biz de bu çalışmayı, gıdalar ile alınan nitrit ve nitratların organizmada artışının, karaciğer ve kandaki malondialdehit ( MDA ), ve nitrik oksit ( NO ) oluşumu ile karaciğer kalataz enzimi üzerine etkisini incelemek amacıyla planladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gıdalarda Nitrit ve Nitrat Kullanımı

Nitritler birkaç yüzyıldır et ve ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Ancak son yıllarda nitrit ve nitratlar oluşturdukları karsinojen nitrozamin bileşikleri nedeni ile sorgulanmaktadır. Nitratın antimikrobiyel etkisi az olduğundan birçok uygulamada onun yerine daha düşük konsantrasyonlarda nitrit kullanılmamaktadır. Ayrıca, daha iyi hijyen koşulları nitrite olan gereksinimi azaltmaktadır (140). Günümüzde nitrit ve nitratlar gıdalara sodyum (Na) ya da potasyum (K) elementlerinin nitrit ya da nitrat tuzları olarak katılmaktadır. Beyaz kristalize toz halinde olan ve suda kolay eriyen bu kimyasallar gıdalarda arzu edilen rengin ve aromanın oluşumunda ve ürünün dayanma süresinin uzatılmasında önemli rollere sahiptirler (91). Etilerde gerek kesim öncesinde, ve gerekse kesimden sonraki prosesler boyunca primer ve sekonder kaynaklı mikroflora oluşumu görülmektedir. Mikroflorayı oluşturan bakterilerden bazıları besinlerde bozulmaya, bazıları da, gıda enfeksiyonu ve / veya gıda entoksikasyonuna neden olmaktadır. Bazı bakteriler ise starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (152).

Gıda enfeksiyonu ve / veya entoksikasyonuna neden olan başlıca mikroorganizmalar aşağıda sıralanmaktadır:

- *Escherichia coli*
- *Proteus spp.*
- *Salmonella spp.*
- *Staphylococcus spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Streptococcus spp.*
- *Bacillus spp.*
- *Clostridium spp.*

Nitritler, et ürünlerinde ise psikotrof ve laktik asit bakterilerinin ve mayaların üremesini önemli ölçüde engellemektedir (119). Ayrıca nitritler besin zehirlenmelerinde

önemli bir role sahip olan *Clostridium botulinum*'u da etkisiz hale getirmektedirler (72). Nitritler deniz ürünlerinde özellikle gram-pozitif ve gram-negatif kokların, *Serratia* ve *Pseudomonas* türlerinin üremesini inhibe ederler (138). Nitritler, botilismus ismi ile tanınan gıda zehirlenmesine neden olan *Clostridium botulinum*'u inhibe etmektedirler. Böylece üreyemeyen etken, toksin de üretememektedir (113). Nitritler, gerek *Bacillus* gerekse *Streptokok* suşlarının aerobik üremesini inhibe edememektedir. Ancak *Bacillus* suşlarının anaerobik üremelerini inhibe edebilmektedir. Bu durum, zamanla nitrit seviyesinin, oksijen varlığında azalmasından kaynaklanmaktadır (8). *Escherichia coli*, *Micrococcus* ve *Staphylococcus* suşları ise, nitratı nitrite indirgemektedirler (152). Ayrıca *Escherichia coli*'nin patojen suşlarının da nitrit varlığında hem ısı işlemi görmüş hem de ısı işlemi görmemiş et ürünlerinde üremelerinin anlamlı şekilde inhibisyona uğradığı gözlenmiştir (66). *Proteus* suşları nitrit varlığında üreyememekte, ancak *Pseudomonas*'ın anaerobik ya da fakültatif anaerob suşları ise nitrit ve nitrat varlığından etkilenmemektedirler (21).

Mikroorganizmaların üremelerinin durdurulması ve normalde oluşan fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olayların mümkün olduğu kadar kısıtlanabilmesi için gıda maddelerinin üretim aşamasından itibaren soğukta muhafazası gerekmektedir. Nitritlerin mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkilerinin düşük ısı derecelerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Sabit pH ve yüksek ısı derecelerinde gıdalardaki nitrit seviyesinin ısıya bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (79). Diyetteki nitratların çoğu, bir dereceye kadar da toprağın yapısı ve gübre kullanımı gibi faktörlere bağlı olarak bitkilerde bulunur (62,99).

Etin ve et ürünlerinin rengi depolama aşamalarında bazı biyokimyasal tepkimeler ile bozulmaktadır. Tüketici tarafından istenmeyen bu durumu engellemek için yine nitritler kullanılmaktadır.

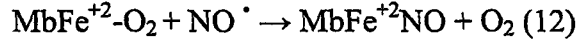
Nitritler, miyoglobin ve hemoglobin gibi renkli pigmentler ile birleşerek nitrosopigmentleri oluşturmakta ve böylece doğal renk korunmaktadır.

Mide içeriği oldukça asidiktir ve diyetteki  $\text{NO}_2^-$ , nitroz asid ( $\text{HNO}_2$ ) oluşturabilmektedir. Bu da azot oksidlerine parçalanabilir. Ayrıca tükürük bezleri, plazmadan  $\text{NO}_3^-$  konsantre eder ve  $\text{NO}_3^-$ 'yi tükürük salgısına verir. Burada  $\text{NO}_3^-$ , ağız bakterileri tarafından  $\text{NO}_2^-$ 'ye indirgenir. Açlıkta, ortalama tükürük nitrat düzeylerinin 100  $\mu\text{M}$  olduğu belirtilmiştir. Olası nitrik oksid oluşumu; midede antibakteriyel bir mekanizma



ile meydana gelmektedir (38). Nitröz asid deaminasyona neden olan güçlü bir ajandır ve onun mutajenik etkisi bir tartışma konusu olmuştur.  $\text{NO}_2^-$ , hayvanlarda büyük bir olasılıkla, hemoglobin ile etkileşerek hızla oksitlenir ve  $\text{NO}_3^-$  ile methemoglobin oluşturur (62).

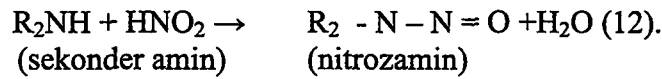
Nitritlerin yokluğunda etin rengi kararmaktadır. Çünkü miyoglobindeki  $\text{Fe}^{+2}$  - hem oksitlenerek kahverengi kırmızı renkli metmiyoglobini oluşturur. Nitrik oksid, miyoglobine bağlanarak, kırmızı renkli bir kompleks oluşturur ki bu da reaksiyonu yavaşlatır (62).



İngiltere’de, 15-74 yaşları arasında 747 kişide yapılan bir çalışmada diyetle alınan nitratların % 90’ından fazlasının sebzelerle, nitritin ise %65’ inin et ve et ürünleri ile alındığı gösterilmiştir. Su ile alımın ise toplam alımının yaklaşık %12’sini oluşturmakta ve su-nitrat konsantrasyonuna bağlı olarak yaygın dağılım göstermektedir (81).

Ancak nitrit ve nitratların kontrolsüz kullanımı istenmeyen sonuçlar doğurabilmektedir. İnsanların nitrit alımı günlük 0.4 mg/kg’ı, et ürünlerine katılan nitrit ve nitratların dozu ise 0,02 mg/kg’ı geçmemelidir (152,138).

Birçok avantajlarına rağmen, nitritlerin kullanımı ile göze alınması gereken şeylerden biri, nitritlerin, sekonder aminler ile reaksiyona girerek, nitrozaminleri oluşturabilmeleridir (62).



Nitrozaminler oldukça karsinojenik bileşiklerdir. N-nitrozo bileşikleri, gıdada nitrit veya nitrat, aminler ve aminoasidler gibi öncül moleküllerin varlığında oluşabilir. Bunların sentezi, teknolojik proses, depolama ve pişirme sırasında meydana gelebilir. Bu bileşikler, in vivo ortamda, midenin asid ortamında, sindirim sırasında veya barsaktan geçiş sırasında bakterilerin etkisi ile sentezlenebilir (140,81).

Nitrat, nitritin daha stabil bir hali olmasına rağmen, nitrit deposu olarak etki gösterebilir. Bu nedenle et ürünlerinin kalite ve güvenliğinin sağlanmasında hem nitritin, hem de nitratın dikkatli bir şekilde kullanılmasına gereksinim vardır (126).

Sosislerin ısı işleminden önce su ile 5 dakika muamele görmesi nitrosodimetilamin oluşumunu yaklaşık %52 oranında azaltmaktadır. Sosislerin daha uzun süre su ile muamele edilmesi (17 saate kadar ) aynı sonuçları vermektedir (110).

Hollanda'da 1986 yılında yapılan bir çalışmaya göre 16 farklı tür et ürününden alınan 140 örnekte nitrit ve N – nitrozamin kalıntılarının varlığı araştırılmıştır. Nitritin varlığı sülfanilamid / naftiletilediamin reaksiyonu varlığında kolorimetrik yöntemleri ile belirlenmiştir. Buna göre 6 adet örnekte nitrite rastlanmazken ( $> 1$  mg sodyum nitrit / kg ), geri kalan örneklerde 1 – 140 mg sodyum nitrit / kg saptanmıştır. Bu örneklerde ortalama değer 6.8 mg / kg'dır. 46 örnekte, N – nitrozamin saptanamazken 75 örnekte 0.1 – 0.9 mikrogram / kg N – nitrozamin saptanmıştır . Bu 75 örnekte, ortalama 0.3 mikrogram / kg'dır . (41)

1985'te İngiltere Tarım, Su Ürünleri ve Gıda Bakanlığı tarafından yapılan belirlemeye göre İngiliz halkında tahmin edilen günlük nitrat alımı ortalama 54 mg., tahmin edilen günlük nitrit alımı ise 2.4 – 4.2 mg.'dir. (119)

Kanatlı etlerinde, et ürünlerinde ve yumurtalarda bulunan nitrat, nitrit ve nitrozaminlerin seviyeleri kaynatma ve kızartma ile anlamlı derecede azaltılabilmektedir. ( $p < 0.05$  ). Nitrit seviyeleri de yine aynı işlemlerle anlamlı derecede azaltılabilmektedir ( $p < 0.05$  ). Bu işlemlerden kaynatma, kızartmadan daha etkilidir (108) .

Nitrit, nitrat ve tuzlarının sosis imalatında istenmeyen florayı ( enterobakteriler ve psikotroflar ) anlamlı derecede azalttığı ( $p < 0.01$  ) ancak starter kültürlerle çok fazla etkisi olmadığı belirlenmiştir. Buna göre sosis imalatında nitrit kullanımının hijyene bağlı riskleri azalttığı söylenebilmektedir (119).

İspanya'da, 1997 yılında yapılan bir çalışmada, 4 adet ticari markanın 145 gün boyunca  $3^{\circ}$  C'de muhafaza edilen sosisleri incelenmiştir. Bu markalardan iki adedi ürünlerinde hem nitrit, hem de nitrat kullandığını belirtmesine rağmen, diğer iki adedi

ürünlerinde sadece nitrit kullandığını belirtmiş, ancak yapılan incelemeler sonucunda nitrat kullanılmadığı belirtilen ürünlerde de 36 mg / kg 'dan 88 mg / kg'a varan dozlarda nitrate da rastlanmıştır (112).

Nitritler, günlük diyetler içerisinde, içme suyu, sebze, et ve et ürünleri gibi farklı gıdalar vasıtası ile alınmaktadır. Nitritler, ayrıca et ürünlerine katkı maddesi olarak da katılmaktadırlar. Nitritin önemli etkilerinden bir tanesi de *Clostridium botulinum* gibi toksin oluşturan bakterileri inhibe etmesidir. Nitritlerin kimyası, nitritten türeyen bileşikler ve bunların bakteriler ile ilgisi karışıktır. Ancak gıdalardaki bakterisid etkiyi nitrit sadece kendi başına değil, gıdalardaki hazırlanma prosesleri esnasında nitritten türeyen kimyasalların da yardımı ile oluşturmaktadır. Nitritten türeyen kimyasallardan olan nitrozil bileşikler *Clostridium sporogenes*' in inhibisyonunda önemli bir göreve sahiptir. Bu bileşik, gıdarda bozulma oluşturan aerobik ve anaerobik bakterilere karşı da inhibitör etkilidir (22).

Çevre kirlenmesi, süt ineklerinin içme su kaynaklarında nitritlerin miktarında artışa neden olmaktadır. Bu nedenle süt ve süt ürünlerindeki nitrit miktarlarının da dikkate alınması gerekmektedir. İçme suyu ile 0- 180 mg / litre dozajında nitrit alan süt ineklerinin sütlerinde yapılan araştırmada sütlerde anlamlı derecelerde nitrit artışına rastlanamamıştır. Bu dozda, içme suyu ile nitrit alan süt ineklerinin sütleri ve bu sütler kullanılarak imal edilen süt ürünlerinde halk sağlığı açısından bir tehlike unsuru bulunmamakla beraber, rutin analizlerin yapımı devam etmelidir (76).

Yoğunlaştırılmış ya da kurutulmuş sütlerdeki nitrat içerikleri bazen anormal derecede yüksek olabilmektedir. Endüstriyel ısı işlem prosesleri, nitrat ve türevlerinin konsantrasyonunu yükseltebilmektedir. Yapılan incelemelerde kısa zaman pastörizasyonundan sonra nitrat seviyesinin bu ürünlerde ikiye, pastörizasyon ve sterilizasyon sonrası ise dörde katlandığı görülmektedir. 90 ° C'de 120 dakika ısıtılan %2' lik kazein solüsyonunda nitrate benzer maddelerin seviyesi 14.7'den 30.8 mg / kg'a çıkmıştır. Bu arada süt proteinlerinin biüre çözeltisi ile reaksiyona girmeleri de hızlanmıştır. 106 mg nitrat / kg içeren süt tozunun diyalizi gösterir ki varolan nitratların % 95'i serbest haldedir. Bağlı nitratların seviyesi çözünür proteinlerde kazeine kıyasla 4 kat daha fazladır (56).

Yarı yumuşak peynirlerin teknolojisinde nitrat, özellikle *Clostridia*'ların üremesini engellemek için kullanılmaktadır. Normal teknolojik şartlar altında bu işlem tüketici için risk taşımamaktadır. Ancak eğer peynir altı suyu ya da sütün sıvı kısmı tekrar tekrar kullanılacak ise buradaki nitrit ve nitrat içeriklerinin kontrolü gerekmektedir (34).

Fransa'da 1980 yılında yapılan bir çalışmada en popüler çeşitlerden seçilen 1256 et ürünü ( 435 sosis, 226 Strazburg sosisi, 165 Frankfurter sosisi, 430 pates de Campagne – köy tipi et dilimleri - ) incelenmiştir. Ortalama değerler izin verilen kullanım dozlarının altındadır. Ancak çoğu ürün nitrat kullanımı açısından geniş bir dozaj dağılımı göstermektedir (37).

Slovakya'da 2000 yılında yapılan bir çalışmada nitrit ve nitratların, Emmental peyniri üretimindeki etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Buna göre çiğ süt, pastörize edilmiş süt, pastörizasyon sonrası nitrat eklenmiş süt, peynir altı suyu, olgunlaşmakta olan peynir, ve olgunlaşmış peynirden olmak üzere üretimin altı farklı kademesindeki ürünlerden örnekler alınmıştır. Çiğ ve pastörize sütteki ortalama sodyum nitrit değerleri 0.1 - 0.2 mg / kg veya litre, ortalama sodyum nitrat değerleri ise 0.9 mg / kg veya litre olarak saptanmıştır. Nitritler özellikle süt ve süt ürünlerinde üremesi olası patojenleri inhibe etmek için kullanılır. Nitrat eklenmiş süt analiz edildiğinde ise ortalama değer 81.2 mg /kg veya litre, maksimum değer ise 90 mg / kg veya litre sodyum nitrat olarak belirtilmiştir. Presleme sonrası peynir altı suyunda yapılan analizlerde ise ortalama değer 20.6 mg / kg veya litre sodyum nitrat olarak saptanmıştır. Olgunlaşmakta olan peynirde ise kayda değer derecede nitrat geçtiği görülmektedir ( 67 mg / kg veya litre sodyum nitrat ). Olgunlaşmış peynirdeki analizlerde ise nitrit ve nitrat konsantrasyonunun azaldığı anlaşılmaktadır ( 3.3 mg / kg veya litre sodyum nitrat, 0.2 mg / kg veya litre sodyum nitrit ) (86)

Nitritler ve nitrozo bileşikleri bazı peynirlerde anormal renklenmelere ( pembe – kahverengi çizgilerin oluşması ) ve çukurcukların oluşmasına neden olabilmektedir. Nitritler, peynirlerde nitrozo bileşiklerinin oluşmasına neden olmaktadır. Nitrozo bileşiklerinin mayalarda bulunan bir enzim vasıtası ile dekompoze olması olasıdır. Bu enzim aynı zamanda nitrozo bileşiklerin dekompoze etmesi ile birlikte ortamı da detoksifiye etmektedir. Peynir üretimi esnasında ortama maya eklenmesi anormal renklerin kaybolma hızının artmasını stimüle etmektedir (70).

## 2.2. Sağlık Açısından Nitrit ve Nitratların Önemi

Nitrit ve nitratların kontrolsüz kullanımı istenmeyen sonuçlar doğurabilmektedir. İnsanların nitrit alımı günlük 0.4 mg/kg'ı, et ürünlerine katılan nitrit ve nitratların dozu ise 0,02 mg/kg'ı geçmemelidir (152).

Kontrolsüz olarak kullanılan nitrit ve nitratlar vücuda fazla miktarlarda alındıklarında, amin grupları ile reaksiyona girerek nitrozamin bileşikleri ve nitrik oksid (NO) oluşturmakta, dolayısı ile kan ve dokularda serbest radikal gruplarının oluşumunu stimüle ederek kanserojen etki meydana getirebilmektedirler. Bu etkiler genotoksik ve sitotoksik olup kanserojen nitroso bileşikleri ve NO tarafından oluşturulmaktadır.

Özellikle mide ve barsak kanserlerinin etiolojisinde nitrit ve nitratların rollerinin önem arz ettiği bilinse de nitrit ve nitratların hangi koşullarda ve hangi mekanizma ile nitrozaminleri oluşturduğu bugün bile tam olarak bilinmemektedir. Nitrozaminler aracılığı ile serbest radikaller oluştuktan sonra hücrelerde çeşitli yollarla değişik hasarlar oluşmaktadır. Nitrozaminlerin en önemli etkilerinden bir tanesi de hücrenin DNA'sını etkileyerek, karsinogenesis mekanizmasının başlangıç evresini oluşturmalarıdır.

1986 yılında, yaşları 9, 12, 15, 18, 21, 24 olan 1212 Finli'nin günlük diyetlerindeki nitrit ve nitrat alımları incelenmiştir. Bu çalışmada yiyeceklerin yanısıra su ile alınan nitrit ve nitratlar da dikkate alınmıştır. Buna göre, yiyeceklerle alınan nitrat ve nitritler sırası ile 54 mg. ve 1.4 mg. iken su ile alınan nitrat 1 – 2 mg arası su ile alınan nitrit ise 0 – 0.2 mg. arasında bulunmuştur. Bu çalışmaya göre nitrat alımının % 86'sının sebzelerden, nitrit alımının ise % 69'unun et ürünlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (88).

Sodyum nitritin, gıdalarda çok yüksek dozda kullanılması akut gıda entoksikasyonları oluşturabilmektedir. 1997 yılında İngiltere'de bir kasabın üç çocuğu yüksek doz sodyum nitrit kullanılarak üretilmiş sosislerden yemiş ve bunu takiben çocuklar entoksikasyon semptomları göstermiş, zehirlenen çocuklara methemoglobinemi teşhisi konulmuştur. Tehlikenin büyümemesi için etler toplatılarak imha edilmiştir (2).

1996 – 1997 yıllarında Polonya'da yapılan bir çalışmada 6 adet hastanenin menülerinden alınan örneklerdeki nitrit ve nitrat seviyeleri araştırılmıştır. Bu araştırma 2

adet farklı metod kullanılarak yürütülmüştür. Bu metodlar sırası ile analitik ve hesaplama metodlarıdır. Analitik metoda göre hastaların kişi başı günlük nitrat alımı 85 mg, hesaplama metoduna göre ise kişi başı günlük nitrat alımı 65 mg olarak saptanmıştır (15).

2001 yılında, İngiltere’de yapılan bir çalışmaya göre 6 adet erkek gönüllüde diyetteki nitrit varyasyonuna göre metabolik faaliyetler incelenmiştir. 10 gün boyunca günlük diyetlerdeki et miktarı 0 gr’dan sırası ile 60, 240 ve 420 gr’a çıkarıldığında fekal bakıda N- nitrozo bileşikleri ve nitrit düzeylerinde anlamlı artışlar saptanmıştır (sırası ile  $p < 0.0001$  ve  $p = 0.046$  ). Fekal bakıda, diyetle et bulunmazken nitrit ve N – nitrozo düzeyleri  $54 \pm 7$  mikrogram / gün iken, bu değerler sırası ile diyetlere 60 gr et eklendiğinde  $52 \pm 11$  mikrogram / gün, diyetlere 240 gr et eklendiğinde  $159 \pm 33$  mikrogram / gün, diyetlere 420 gr et eklendiğinde ise  $199 \pm 36$  mikrogram / gün olarak değişiklik göstermiştir (69).

Nitratların inek sütünde, anne sütünde ve süt bazlı bebek mamalarındaki miktarları 205 nm’deki direkt kromotografi ve iyon kromotografi yöntemleri ile saptanabilmektedir (99).

Nitrit türevlerinden özellikle volatil N – nitrozaminin anne sütünde olma olasılığı da araştırmacıların ilgisini çekmektedir. 16 farklı emziren anneden alınan 175 adet süt örneğinin analizi sonucunda, bu örneklerin % 76.5’inde 0.2 ppb N – nitrozodimetilamin saptanmıştır. Bu, minimum ölçülebilen değer sınırında bir sonuçtur. Diyetlerinde jambon bulunan ve yemek yedikten 6 saat sonra emzirme işlemine başlayan gönüllü annelerin sütleri analiz edildiğinde, sütlerde nitrozamin artışına rastlanamamıştır. Diyetlerinde jambon ile birlikte yüksek dozda nitrit içeren sebze yiyen annelerin sütlerindeki N- Nitrozodimetilamin miktarları ise nadiren yüksek seviyelere çıkabilmektedir (89).

Federal Alman Cumhuriyeti’nde, halkın günlük nitrit ve nitrat alımı sırası ile 3.3 mg / gün ve 75 mg / gün olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda nitrat içermeyen içme suları içildiği baz alınmıştır. Yine Almanya’da 1971 yılına bakıldığında ise kişi başı günlük tüketim 49 mg nitrat ve 1.7 mg nitrit değerlerini göstermektedir. Aradaki değerlerdeki farklılığın ise market kültürünün yoğunlaşması sonucu gıdalar ile alınan nitrit ve nitratın artışından meydana geldiği yüksek bir olasılıktır. Bunun yanında nitrat alımının sadece gıda ile değil de, içme suyu ile de alındığı ve hesaplanan değerlerdeki artışın payında içme

sularındaki nitrat varlığının da olduğu düşünülmektedir. Almanya’da nitrit ve nitrat alımının en çok patates, sosis ve et tüketimi ile gerçekleştiği bildirilmektedir (121).

Danimarka, Finlandiya, Norveç ve İsveç gibi ülkelerde süt ürünlerinde kullanılması gereken nitrat miktarı 150 – 200 mg / litre potasyum nitrat olarak belirlenmiştir. Ancak nitrat kaynaklı non volatil N – nitrozamin bileşiklerinin oluşum potansiyeli, potasyum nitratın üretici firmalar tarafından tercih edilmemesine neden olmaktadır. Nitratların bazı ürünlerine katımına halen Danimarka, Finlandiya ve İsviçre’de izin verilmesine rağmen bu uygulamaya birkaç yıl içinde son verileceği düşünülmektedir. Nitritlerin su ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılması ise sözkonusu ülkelerde yasaklanmıştır. Nitratların, Norveç ve İsveç’te et ve et ürünlerine katkı maddesi olarak katımına izin verilmemektedir. Finlandiya ve Danimarka’da ise nitratların kullanımı azaltılmaktadır. Nitrit ve nitratlardan oluşabilen N – nitrozo bileşiklerinin karsinojen etkileri ve tüketici sağlığı düşünülerek sözkonusu ülkelerdeki nitrit ve nitrat kullanımının planlı olarak azaltılmasına neden olmaktadır (114).

Sütteki yüksek nitrat konsantrasyonları sadece insan ve bebek sağlığı için tehlikeli olmakla kalmayıp aynı zamanda teknolojik olarak bir takım problemlere de neden olmaktadır. Zemlinka Teplica Veteriner Araştırma Merkezi’ne ait 6 adet süt ineğinde nitrat yüklemesi ardından, bu ineklerin sütlerindeki nitrit ve nitrat miktarları incelenmiştir. Çalışmanın başlangıcında, ineklerin sütleri, yemleri ve içme sularından incelenmek üzere örnekler alındıktan sonra, içme sularına potasyum nitrat katılmış ineklere peroral olarak iki hafta aralıklarla sırası ile 150; 75; 37.5; 18.75; 9.5 gram dozlarında akşam sağımından iki saat önce uygulanmıştır. Sütteki olası nitrit ve nitrat kalıntıları ineklere potasyum nitrit uygulanmasından sırası ile 2, 14, 26, 38, ve 50 saat sonra incelenmiştir. Sağımlar manuel olarak yapılmıştır. 150 gram potasyum nitrat uygulanmasından iki saat sonra, sütteki ortalama nitrat kalıntısı 34.6 mg / litre olarak bulunmuştur. Bu artmış değerler potasyum nitrit uygulanmasından 38 saat sonraki yapılan sağımda da stabil kalmıştır. Uygulamadan 50 saat sonraki sağımda da residüel nitrat değerleri hemen hemen 2 ve 38. saatteki sağımlar ile aynı değerlerde kalmaya devam etmektedir (5).

## 2.3. SERBEST RADİKALLER

### 2.3.1. Serbest Radikallerin Tanımı, Çeşitleri ve Kaynakları

Radikal, bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom ya da atomlar grubudur (85). Radikal, formülünün sağ üst kısmına bir nokta işareti konularak belirtilir ( Örn : HO<sup>•</sup> ). Radikali belirten nokta işaretinden sonra yükü belirten işaret konulur ( Örn : O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ) (85).

Reaktif oksijen türleri bilimadamları tarafından sıklıkla kullanılan kolektif bir terim olup sadece süperoksid radikali ( O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ) ve hidroksil radikali ( OH<sup>•</sup> ) gibi oksijen radikallerini değil, aynı zamanda oksijenin radikal olmayan türevlerini de kapsamaktadır (62).

Tablo 1- REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

RADİKALLER	NON- RADİKALLER
Süperoksid ( O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Hidrojen peroksid ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Hidroksil ( OH <sup>•</sup> )	Hipoklöröz asid ( HOCl )
Peroksil ( RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Ozon ( O <sub>3</sub> )
Alkoksil ( RO <sup>•</sup> )	Singlet oksijen ( <sup>1</sup> Δ g )
Hidroperoksil ( HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Peroksinitrit ( ONOO <sup>-</sup> )

Reaktif, kuşkusuz relatif bir terimdir; ne O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ne de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sulu çözeltilerde reaktif değildir. Bu nedenle bazı yazarlar “ oksijen türevleri ” terimini kullanmaktadırlar. Diğer bir popüler terim ise “ oksidanlar “ dır. Bununla beraber O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sulu çözeltilerde farklı sistemlerde hem indirgen hem de yükseltgen ajanlar olarak etki edebildiklerinden bu terim pek tercih edilmemektedir (62).

Radikaller, hem organik hem de anorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik gösterirler. Normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller, ayrıca organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara (bazı antitümöral ilaçlara) ve ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelebilirler (130). Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri çok sayıda enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidirler. Ancak herbir radikalin yapısı ve etkili olduğu yere göre hücre sel hedefler risk altındadır. Bu nedenle

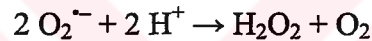


radikallerin hücrel kaynakları, rol aldıkları reaksiyonlar ve hücrel savunma mekanizmalarının henüz açıklık getirilmemiş bazı klinik durumların patogenezinde de ışık tutabilir (77).

### 2.3.2. Radikallerin Hücre içi Kaynakları

Bir molekül oksijenin tamamen indirgenebilmesi için dört adet elektron gerekmektedir. Bu indirgenme eğer tek değerlikli reaksiyon adımları yolu ile ilerlerse süperoksid radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi ara ürünler meydana gelmektedir (49).

Aerobik hücreler için radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksid radikali açığa çıkar (48).



Süperoksid radikalının yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu, özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali meydana gelir (106). Normal metabolizmanın yanısıra hiperoksi, doku iltihabı ve radyasyonla artan oksijen metabolizması  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  oluşumunu artırır (77). Tedavi amacı ile kullanılan birçok preparat, özellikle antineoplastik ajanlar ve aktiviteleri için kinon grupları ve bazı metallere gereksinim duyan antibiyotikler oksijen radikalleri açığa çıkarabilirler. Bu preparatların kemoterapötik etkilerinin ve sitotoksik yan etkilerinin çoğu oksijeni,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$ ' ye indirgeme özelliklerine bağlanmaktadır (75).

Organizmanın elektromanyetik radyasyona (x ışınları, gama ışınları) ve partiküllü radyasyona (elektronlar, protonlar, nötronlar, alfa ve beta partikülleri) maruz kalması sonucu primer radikaller açığa çıkar. Ayrıca fotokimyasal hava kirleri, hiperoksi, sigara dumanı, anestetikler ve genel olarak aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli çevresel ajanlar da radikallerin meydana gelmesine yol açarlar (94).

#### Eksojen Kaynaklar

- Antineoplastik ilaçlar

- Paraquat
- Alloksan
- Oksidan ilaçlar
- Sigara dumanı
- İyonize edici radyasyon
- Güneş ışınları
- Işık şoku
- Glutasyonu oksitleyici maddeler

### **Endojen Kaynaklar**

- Mitokondriyel elektron transport zinciri
- Kloroplast elektron transport zinciri
- Oksidan enzimler
  - İndolamin dioksijenaz
  - Triptofan dioksijenaz
  - Galaktoz oksidaz
  - Siklooksijenaz
  - Lipooksijenaz
  - Mononamin pksidaz
- Fagositik hücreler
  - Nötrofiller
  - Monosit ve makrofajlar
  - Eozinofiller
  - Endotelyal hücreler
- Otooksidasyon reaksiyonları

Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda redoks reaksiyonlarına girebilen hücre bileşenlerinin çoğu hücre içinde radikaller oluştururlar. Bunlar arasında tiyoller, hidrokinonlar, ketakolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler bulunur (98,100,4,43). Bu maddelerin tümü dioksijenin indirgenmesini sağlarken primer olarak süperoksit

radikallerinin meydana gelmesine neden olurlar. Radikal oluşturan enzimlere örnek olarak ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrojenaz ve triptofan dioksijenaz örnek verilebilir (47).

Aerobik hücrelerde oksijen konsantrasyonunun artması ile birlikte  $O_2^{\cdot -}$  oluşum hızı da artar (46,105). Fagositoz sırasında oksijen kullanımı arttığından oksijenden  $O_2^{\cdot -}$  oluşumu ve dolayısı ile  $H_2O_2$  açığa çıkışı da artar (39).  $H_2O_2$ , membranları hemen hemen su molekülü kadar kolay geçebilir. Süperoksit radikalleri de transmembran anyon kanalları ile hücre içine ulaşır (78). Fagositlerin oluşturduğu bu radikaller bakteri membranlarını harap ederek bazı bakteri suşlarının öldürülmesinde etkin bir rol oynamaktadırlar (31). Bakteri membranları çok düşük konsantrasyonlarda çok doymamış yağ asitleri içerirler. Bu nedenle burada etkili olan radikal,  $H_2O_2$ 'den çok  $O_2^{\cdot -}$  sisteminde oluşan  $OH^{\cdot}$ 'dir. Çünkü  $OH^{\cdot}$ , her organik molekülle yüksek bir hızda reaksiyona girer (144). Fagositoz sırasında oluşan radikaller, normal olarak hücre dışına bazen de endositik vakuollerin içine salınırlar (3).

Membrana bağlı siklooksijenaz tarafından araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile radikaller açığa çıkmaktadır (95). Siklooksijenazın katalizlediği araşidonik asidin metabolizması sırasında oluşan radikalın  $OH^{\cdot}$  olduğu ve prostoglandin  $G_2$  (  $PGG_2$  ) üzerindeki hidroperoksidin parçalanması sonucu açığa çıktığı ileri sürülmektedir (40,74).

Endoplazmik retikulum ve nukleus membranında, membrana bağlı sitokromların oksidasyonu sonucu radikaller meydana gelirler. Oluşan radikaller, hem organel içinde ve hem de sitozolde etkisini gösterebilirler. Endoplazmik retikulum ve nukleus membranları sitokrom  $P_{450}$  ve  $b_5$  içerdiklerinden doymamış yağ asitlerini indirgeyebilirler (1,23). Ayrıca flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da otooksidasyon ile  $O_2^{\cdot -}$  ve  $H_2O_2$  oluştururlar (136). Sığan karaciğer mikrozomlarında da  $OH^{\cdot}$  radikalının oluştuğu saptanmıştır (77).

Peroksizomlar, hidrojen peroksidin hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan D- aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, L- alfa hidroksi asit oksidaz enzimleri hidrojen peroksid açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (96).

Plazma membranı birçok nedenden dolayı, radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir. Membranda bulunan fosfolipidler, glikolipidler, steroller, doymamış yağ asitleri ve

kolayca okside olabilen aminoasidleri içeren transmembran proteinleri, radikal harabiyetine açıktır. Ayrıca, radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu ya da membran yapısında bulunan proteinlerin oksidasyonu, transmembran iyon gradientinin bozulmasına, salgılama fonksiyonlarının kaybına ve hücre içi metabolik olayların inhibisyonuna yol açabilir (77).

Radikallerin reaktif özelliği başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir. Örneğin OH<sup>•</sup> son derece yüksek reaktif özellikte olduğundan, oluştuğu hücre bölümünden daha uzağa difüzyona gerek kalmadan derhal oluştuğu yerde reaksiyona girer. Ancak, bu difüzyon hücre içindeki süperoksid dismutaz enziminin yüksek konsantrasyonları ile sınırlıdır (77).

### 2.3.3. Radikallerin Biyolojik Kaynakları

Radikallerin biyolojik reaksiyonlarını genel bir başlık altında incelemek oldukça zordur. Çünkü organizmanın yaşam boyunca karşılaştığı radikal türleri sürekli olarak değişiklik gösterir. Bilindiği gibi bir ya da birden fazla tek sayılı elektron içeren radikaller, hücrede geçiş metallere oksijen türlerini elektron transferinden açığa çıkarlar. Daha sonra radikal reaksiyon dizileri başlar ki bunlar atom transferlerini içerirler. Hücre içinde bir diğer önemli radikal reaksiyonu doymamış bağlara ( yağ asitleri ve aromatik halkalara ) radikal katılmasıdır. Radikal reaksiyonları ilerleyerek hücresel tahribat ile sonuçlanabilir. Bu tür reaksiyonlar, bir reaksiyonlar dizisi halinde devam edebileceği gibi, radikal etkisini ortadan giderici moleküller tarafından sona erdirilebilirler (77).

Oksijen radikalleri; aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler dahil tüm biyokimyasal moleküllere geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak hasar verici etkiler yapabilirler. Bu radikaller aynı zamanda membran fonksiyonu, metabolizma ve gen ifadesi gibi hücre aktiviteleri üzerine de etkilerini gösterebilirler (27). Oksijen radikalleri hücreler için ciddi tehdit oluştururlar ve büyük bir olasılıkla hücre ve doku hasarı, DNA modifikasyonu ve birçok hastalığın patojenezinden sorumlu olabilirler (27,25,50).

Oksijen radikali O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve hidrojen peroksid oluşumundaki artışlar direkt olarak hücre hasarına neden olabilirler. Bunlar uygun geçiş metalleri ile etkileşime girerek oldukça reaktif özellikte olan OH<sup>•</sup> ve diğer oksidan ürünleri meydana getirirler (35,65). Bu primer

hasar NADH, indirgenmiş glutatyon ve ATP'nin azalmasına ve sitozolik kalsiyum iyonlarının artmasına ve bunlar da sonuçta hücre hasarına neden olabilir (61).

Hidrojen peroksit fazla reaktif özellikte olmamasına rağmen biyolojik membranları kolayca geçebilir. Yüklü olan  $O_2^{\cdot-}$  'nin membrandan geçebilmesi için membranda anyon kanallarına gereksinim vardır. Aksi takdirde  $O_2^{\cdot-}$  'nin membrandan geçişi daha yavaş olur (92,135). Eritrosit membranlarında böyle bir kanal olduğu bilinmektedir. Damar endotel hücrelerinde de  $O_2^{\cdot-}$  için anyon kanalları bulunması mümkündür (92).

Hidrojen peroksidin hücre ve hücre organellerine farklı toksik etkileri bulunmaktadır. Bazı bakteriler ve hayvan hücreleri mikromolar düzeyde hidrojen peroksitten zarar gördükleri halde, diğer bazı bakteriler ve fotosentez yapabilen algler önemli miktarlarda hidrojen peroksit oluştururlar (111).

Sulu çözeltilerde  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  'nin reaktivitelerinin ılımlı olması nedeni ile hücreye hasar verici etkilerinin direkt olarak  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  tarafından olmadığını düşündürmektedir. Bununla beraber  $O_2^{\cdot-}$  'nin dihidroasit dehidratazi, kalp dokusundaki kreatin kinazı inhibe ettiği belirlenmiştir (87). Bununla beraber genel olarak hücrelere  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  'nin hasar yapıcı etkisi onların büyük bir olasılıkla çok daha reaktif ürünlere dönüşümü nedeni ile olmaktadır.  $O_2^{\cdot-}$  'nin protonlanması ile hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşur, bunun herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü olduğunu gösteren bir kanıt olmamasına rağmen,  $HO_2^{\cdot}$  'nin potansiyel önemi şu iki faktörden kaynaklanmaktadır (14).

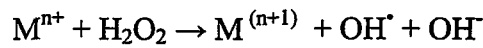
1-  $HO_2^{\cdot}$  'nin polaritesi  $O_2^{\cdot-}$  'den daha azdır ve bu nedenle biyolojik membranları hidrojen peroksit kadar kolay geçebilir.

2-  $HO_2^{\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot-}$  'den daha reaktiftir ve  $O_2^{\cdot-}$  'den farklı olarak yağ asitleri ile direkt olarak etkileşime girebilir (62)

$HO_2^{\cdot}$  'nin etkisi ile esansiyel amino asitlerin peroksidlere dönüştüğü kanıtlanmıştır (10). Jeosup ve arkadaşları'na göre (7)  $HO_2^{\cdot}$  'nin, LDL'nin lipid bileşiklerinin peroksidasyonunu başlatabileceği önerilmektedir.

Su molekülü, yüksek enerjili iyonizan ışınlarla maruz bırakıldığında OH<sup>•</sup> oluşur. OH<sup>•</sup> oldukça reaktif özellikte olup oluştuğu yerde veya oluştuğu yere yakın kısımlarda hızla reaksiyona girer (120). Bu nedenle hücre hasarının tipi bu radikalin oluşum yerine bağlı olacaktır. Örneğin; DNA'ya yakın OH<sup>•</sup> oluşumu, pürin veya pirimidinlerin modifikasyonu veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur. OH<sup>•</sup>'nın biyolojik bir molekülle reaksiyonu daha az reaktif özellikte başka bir radikal oluşturabilir. Bunlar da oluşum yerinden daha uzağa difüzlenererek spesifik biyomoleküller ile reaksiyona girebilirler (80).

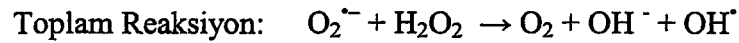
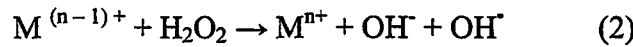
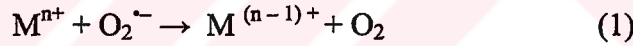
İyonizan ışınlarla aşırı maruz kalınmanın dışında organizmada oluşan OH<sup>•</sup> 'nın çoğu hidrojen peroksidin metale bağlı yıkımı ile oluşur.



Bu reaksiyonda M<sup>n+</sup>, metal iyonu olup titan, demir veya kobalt olabilir (57,101). Fe (II) 'ye bağımlı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yıkılımı ile OH<sup>•</sup> oluşumu Fenton reaksiyonu olarak bilinir (65,64).



Metal iyonları ve kompleksleri tarafından katalizlenen Haber – Weiss reaksiyonu ile OH<sup>•</sup> oluştuğuna inanılmaktadır (14,29,44,59,84).



O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 'nin süperoksit düsmutaz enzimi tarafından düsmutasyonu ile, sitotoksik OH<sup>•</sup> oluşumu önlenmektedir (53).

#### 2.3.4. Radikal Harabiyeti Riski Altındaki Hücre Komponentleri

**1-Proteinler:** Sulu fazda radikal oluşturan sistemlerin proteinler üzerine etkileriyle ilgili çok sayıda literatür yayınlanmıştır (3,30,33,52,128,147,148). Lipid radikallerinin proteinler üzerine hasar yapıcı etkilerinin olabileceği de bilinmektedir (31). Membran bileşenlerinden monoamin oksidaz ve membran transport proteinlerine radikallerinin hasar verici etkileri çok önemlidir (33,117). Roger T. Dean ve arkadaşlarının (32) elde ettiği

bulgulara göre proteinler üzerine radikallerin etkileri; radikallerin oluşum yerine, hedef moleküllere ve antioksidanlara bağlıdır. Örneğin : Lipid peroksidasyonuna yol açan radikaller membranların veya lipoproteinlerin hidrofobik kısımlarının proteinleri üzerine etkili olabilirler (33,73). Hidrofilik radikaller, çözünür haldeki veya membrana bağlı proteinleri üzerine daha etkilidirler (32). Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler radikallerden kolayca etkilenirler. Gliseraldehid – 3 – fosfat dehidrojenaz gibi aktiviteleri yukarıdaki aminoasitlere bağımlı olan enzimler, radikaller tarafından inhibe edilirler (18). Sitoplazmik proteinler ve membran proteinleri de oksidan ajanlara maruz kaldıklarında radikallerle proteinlerin amino asit kalıntıları arasında geri dönüşümsüz reaksiyonlar meydana gelir. Prolin ve lizin amino asitleri ile protein yapısını oluşturan peptid bağları da oksijen radikallerinden etkilenebilir. Bu radikallerin etkisiyle nonenzimatik olarak prolin ve lizin hidroksilasyonu meydana gelebilir (137) .

Proteinlerin, radikallerin hasar yapıcı etkilerinden ne derecede etkileneceği onların amino asit içeriklerine bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın sitotoksik gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir (77).

**2- Nükleik Asitler ve DNA:** İyonize edici ışınların etkisi ile oluşan radikaller, DNA' yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar (11,14). Sitotoksik etki ya nükleik asitlerdeki bazların modifikasyonuna ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır.

**3-Sitozolik Moleküller:** Sitozoldeki proteinler radikallerin etkisi ile değişime uğrarlar. Hemoproteinler ( Örn: Oksihemoglobin ),  $O_2^-$  'nin ya da  $H_2O_2$  'nin demir ( II ) ile reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür (143). Bir diğer önemli sitoplazmik hemoprotein olan katalaz,  $O_2^-$  tarafından inhibe edilir (83).  $O_2^-$  'nin dismutasyon ürünü olan  $H_2O_2$ , süperoksid dismutaz enziminin +2 değerlikli bakırını +1 değerliğe indirgeyerek enzimi inhibe edebilir (68).

**4-Membran Lipidleri:** Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Lipid peroksidasyonu sırasında çok doymamış yağ asitleri hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijen ile reaksiyona girer. Bazı metallerin varlığında peroksidasyonun şiddeti artırılabilir (122).

### 2.3.5. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller hücre membranlarındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (104). Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Bu olay, başlama, ilerleme ve sonlanma basamaklarını içerir. (104,97).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çok doymamış yağ asidi zincirindeki alfa – metilen gruplarından hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, yağ asidi zincirinin radikal haline dönüşmesine neden olmaktadır. Oluşan bu lipid radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup, molekül içi çift bağ aktarılması sonucunda dien konjugatlarına dönüşmektedir. Daha sonra lipid radikalının moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi ile lipid peroksid (LOO.) radikali oluşmaktadır. Bu lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine ( LOOH. ) dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun otokatalitik bir biçimde yürütmesi sağlanmaktadır (104,97).

Lipid peroksidasyonunun, membran yapısında oluşturduğu değişiklikler nedeni ile membran işlevinin bozulması ve son ürünler olan aldehidlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollar ile hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir (51).

Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid (MDA), membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi intrinsik membran özelliklerini etkileyebilir ve DNA'nın azotlu bazları ile de reaksiyona girebilir. Bu özellikleri ile malondialdehid mutajenik kültür hücreleri için ise genotoksik ve karsinojenik etkilidir (102).



### 2.3.6. Radikallerin Etkilerine Karşı Hücreyi Koruyucu Enzimler

Aerob hücrelerin tümünün, serbest radikallerin oluşumunu en az düzeye indirecek ya da alternatif olarak serbest radikaller oluşur oluşmaz bunları hızla parçalayacak koruyucu mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir (42).

Organizmada sürekli bir biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler oluşmasına rağmen, güçlü savunma sistemlerinin varlığı bu bileşiklerin lipid peroksidasyonunu uyarmasını önlemektedir (20).

Radikallerin etkilerine karşı organizmada antioksidan adı verilen koruyucu savunma sistemleri enzimatik ve radikal tutucu maddeler olmak üzere iki grupta toplanmaktadır (104).

Enzim sistemleri, süperoksit dismutaz ( SOD ), katalaz ( CAT ) ve glutatyon peroksidaz ( GSH – Px ) 'dır. İkinci grup radikal tutucu maddeler arasında E ve C vitaminleri, beta karoten, retinoik asit, ubikinon, ürik asit, albümin, serüloplazmin, transferrin, glutatyon ( GSH ) sayılmaktadır (104). Sağlıklı organizmalarda oksidanlar ve antioksidanlar denge içerisindeyler. Patolojik durumlarda denge bozulmakta ve kontrol edilmez ise hücre hasarına yol açmaktadır (97).

#### 2.3.6.1. Katalaz

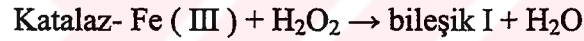
Katalaz bilinen en eski enzimdir. 1901 yılında Loew tarafından bu isim verilmiştir (125). Enzim,  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  reaksiyonunu katalizler. Hidrojen peroksit,  $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile oluşur. Birkaç bakteri dışında aerobik hücrelerin çoğunda katalaz bulunur. Katalaz hayvanlarda organların çoğunda özellikle de eritrositlerde ve karaciğerde bolca bulunmaktadır. Katalaz, eritrositlerde hemoglobinin otooksidasyonu sonrasında meydana gelen  $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksitine karşı hücreyi korumada yardımcı olabilir. Eritrositler kolayca difüzyona uğrayan hidrojen peroksidi absorbe ederek diğer dokuları da oksidatif hasara karşı koruyabilirler (146).

Hücre alt fonksiyonları düzeyinde katalaz, peroksizomlarda %80 oranında, sitozolde ise yaklaşık %20 oranında bulunmaktadır. Dokuların katalaz aktivitesi fazlası ile değişkendir. Beyin, kalp, iskelet kası karaciğere göre daha düşük düzeylerde katalaz

içermektedir. Katalaz aktivitesi karaciğer ve böbrekte yüksek iken, bağ dokusunda düşüktür. En yüksek aktivite eritrositlerde olup, plazmadan 3600 kat daha fazladır. Dokularda çoğunlukla mitokondri ve peroksizomlarda kısmen bağlı olarak bulunur. Serum katalaz aktivitesi ile eritropoez arasında bir korelasyon vardır. Bu korelasyon hemolizden etkilenir (54,93,131,149).

Katalaz dört adet protein alt biriminden ibarettir. Her bir alt birim aktif merkezine bağlı bir ferrik hem grubu içerir. Hem grupları nonpolar cepler içerisinde saklı olup molekül yüzeyine dar kanallar ile bağlanırlar, böylece hidrojen peroksitten daha büyük moleküllerin geçişini önlerler. Enzim depolandığında, dondurulup çözülmesinde veya asid ya da alkaliye maruz bırakıldığında alt ünitelerine ayrılır, bu da aktivite kaybına neden olur (127). İnhibitörleri; siyanür, 3 - amino -1,2,4, - tirazol, indirgenmiş glutatyon (GSH ) ve ditiyotrietoldür (131).

Katalazın reaksiyon mekanizması süperoksid dismutaz'a benzer bir şekilde esas olarak bir dismutasyondur. Bir hidrojen peroksid, suya indirgenmesinde diğeri oksijene oksidlenir.



Sığıçan karaciğer katalazı için  $k_1$  ve  $k_2$  hız sabitleri sırası ile  $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ve  $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  'dir. Bileşik I,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den iki elektron alarak tekrar ferrik katalazı oluşturur.

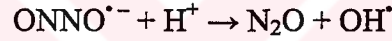
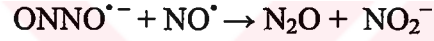
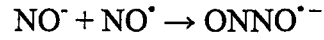
Katalazı  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile doymak oldukça zordur. Enzimin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin yıkımı için  $V_{\max}$  değeri oldukça yüksektir. Ancak  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin tam olarak uzaklaştırılması için iki molekül  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin katalaz enziminin tek bir aktif kısmı ile etkileşmesi gerekmektedir. Bu  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu düşükçe azalır. Katalaz ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  karışımında bileşik I'in miktarı bunların konsantrasyonlarına ve  $k_1$  ve  $k_2$  hız sabitlerine bağlıdır (24).

Kono ve Fridovich (83) süperoksid radikallerinin katalazı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Hidrojen peroksidin, katalazı inhibe ettiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Hidrojen peroksid tarafından katalazın inaktivasyonu NADPH'nin önlediği

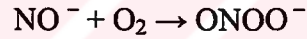
göstermiştir. İndirgenmiş glutatyonun ( GSH ) katalazı dozaja bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (145).

### 2.3.7. Nitrik Oksid'in Temel Kimyası ve Fizyolojik Rollerini

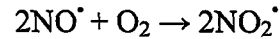
Nitrik oksid ( NO ) renksiz bir gaz olup suda çözünür bir özelliğe sahiptir. Organik çözücülerde çok daha fazla çözünür. Nitrik oksid, hücreler arasında ve hücre içinde kolayca difüze olabilir. Nitrik oksid ortaklanmamış elektrona sahiptir, bu nedenle bir serbest radikaldir. Eğer ortaklanmamış elektron, bir elektron oksidasyonu ile uzaklaştırılır ise nitrozamin katyonu ( NO<sup>+</sup> ) oluşur. Bir elektron indirgenmesiyle nitroksil katyonunu ( NO<sup>-</sup> ) oluşturur. Nitroksil reaktif ve kısa ömürlü bir üründür, nitrik oksid ile reaksiyona girerek nitroz oksid ( N<sub>2</sub>O ) ve muhtemelen hidroksil radikali oluşturur (62).



NO<sup>-</sup>, aynı zamanda oksijen ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir (62).

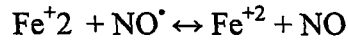


Nitrik oksid, havada bulunan oksijen ile reaksiyon vererek nitrojenioksit 'i (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturur. Bu, nitrik oksidten çok daha fazla reaktif bir serbest radikaldir (62)



Nitrik okside olan ilgi, onun çok sayıda önemli fizyolojik rollerinin keşfi ile artmıştır. Nitrik oksid, bazı metal iyonlarına kolayca bağlanır ve onun fizyolojik etkilerinin çoğu guanilat / siklaz enzimindeki Fe<sup>+2</sup> hem gruplarına bağlanması sonucu meydana gelir. Örneğin kan damarlarının iç kısmında uzanan damar endotel hücreleri tarafından sentezlenen nitrik oksid bütün yönlere difüze olabilir, fakat bir kısmı alttaki kas tabakasına uzanarak guanilat siklazı bağlayarak aktifler. Bunun sonucu olarak daha fazla siklik GMP oluşur, bu da intrasellüler serbest kalsiyum düzeyini azaltır ve kas gevşemesine, damar

dilatasyonuna ve kan basıncının azalmasına neden olur. In vivo ortamda oluşan nitrik oksidin çoğu hemoglobinin hem grubu ile etkileşim sonucu kaybolur. Nitrik oksid  $Fe^{+2}$  ve deoksihemoglobin gibi bileşikler ile stabil kompleksler oluşturur (62).



Oksihemoglobin ile eser miktarda  $NO^{\bullet}$  tiyol gruplarına bağlanabilir. Daha fazla miktardaki nitrik oksid, hemoglobinin methemoglobine ve nitrata oksidasyonuna yol açar. Nitrik oksid, bir kere eritrosite girdiğinde yarı ömrü bir milisaniyeden daha az olacaktır. Hücreler nadiren en yakın kan damarına 10 mikro metreden daha uzaktadır. Nitrik oksidin difüzyonu bir saniyeden daha kısa sürmektedir. İnsanda bazal plazma  $NO_3^-$  düzeyi, düşük  $NO^{\bullet}$  diyetinde yaklaşık olarak 30 mikro molarıdır. Fakat  $NO_3^-$  'den zengin gıda alımı ile hızla artabilir. Bu bazal düzey muhtemelen nitrik oksidin metabolizması sonucudur (145).

Nitrat, sonunda idrarla atılmaktadır. Mikrozoal bir enzim olan sitokrom  $P_{450}$  'nin hem grubuna nitrik oksidin bağlanması enzimin aktivitesinin inhibisyonuna neden olabilir. Nitrik oksid hem  $Fe^{+2}$ , hem de  $Fe^{+3}$  şeklindeki "hem demirine" geri dönüşümlü inhibisyona neden olabilir (62).

Canlı organizmalarda nitrik oksid, nitrik asid sentaz'lar adı verilen bir grup enzimin etkisi ile arginin amino asidinden sentezlenmektedir. (62).

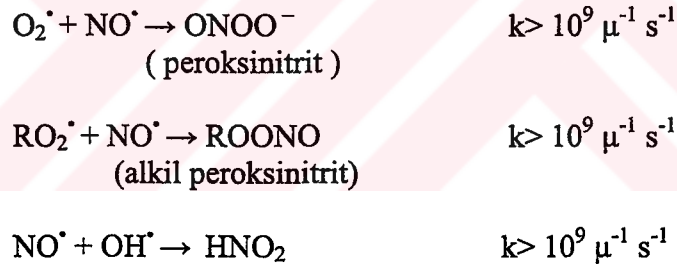
### **$NO^{\bullet}$ , $O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ 'ın DNA Bazları Üzerine Etkileri**

Süperoksid, nitrik oksid veya hidrojen peroksid fizyolojik düzeylerde DNA veya RNA bazlarının herhangi biri ile veya, riboz ya da deoksiriboz şekerler ile anlamlı hızlarda reaksiyona girmemektedir. Ancak oldukça reaktif olan hidroksil radikalının DNA' ya maruz bırakılması, beklendiği gibi şekerler, pürinler ve pirimidinlere hızla etki ederek çok sayıda ürün oluşturur (16,141).

Nitrik oksid, genellikle radikal olmayan bileşiklerin çoğu ile reaksiyona girmez. Örneğin tiyol ( -SH ) bileşikleri ile reaksiyon hızı düşüktür. Nitrozotiyollerini oluşturabilmesi için, nitrik oksid genellikle önce  $N_2O_3$  veya peroksinitrite dönüştürülmektedir (6,116).

ONNO<sup>-</sup>, NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub>Cl gibi çeşitli reaktif azot türlerinin hem serbest, ve hem de proteinlerde bulunan tirozin üzerine etki etmesi 3 – nitrotirozin oluşumuna yol açar (71). Nitrotirozin metabolitleri insanda idrar ile atılmaktadır (107). Nitrotirozin oluşumu, sıklıkla ONOO<sup>-</sup> ‘nun proteinler üzerine etkisinin bir kanıtı olarak ele alınmaktadır. Fakat diğer reaktif azot türleri tirozini nitratlayabilir. Sağlıklı hayvanlarda ve insanlarda çevredeki NO<sub>2</sub><sup>•</sup> düzeylerinin anlamlı derecede tirozin nitrasyonuna neden olmadığı görülmektedir.

Nitrik oksid, diğer radikallerin çoğu ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer, örneğin tirozil radikali ile reaksiyon hız sabiti 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> ‘den daha büyüktür. Tirozil radikalleri özellikle ribonükleotidredüktaz gibi bazı enzimlerin aktif kısımlarında esansiyeldir. Aşırı düzeydeki nitrik oksidin hücreler üzerine toksik etkilerinden biri bu enzimin inhibisyonu olabilir. Çünkü nitrik oksid katalitik aktivite için gerekli olan tirozil radikali ile reaksiyona girer. Nitrik oksid aynı zamanda süperoksit radikali ( O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ) peroksit radikalleri ( RO<sub>2</sub><sup>•</sup> ) ve hidroksit radikali ( OH<sup>•</sup> ) tirozinden başka triptofan gibi diğer aminoasitlerden oluşan radikaller ile ve hidrojen peroksit ile işlem gören hem proteinlerinden oluşan ferril hem türleri ile hızla reaksiyona girer (17,123).



Nitrik oksidin RO<sub>2</sub><sup>•</sup> ile ve hem protein / hidrojen peroksit sistemi ile reaksiyonları, bu türevlerin hasar yapıcı etkilerini inhibe edebilir ve bu nitrik oksidin bir antioksidan etkisi olarak değerlendirilebilir. ONOO<sup>-</sup> ve ROONO’nun biyolojik öneminin anlaşılması reaktif azot türevleri gibi önemli bir araştırma alanının doğmasına neden olmuştur. Örneğin hücrelerin aşırı nitrik okside maruz bırakılması gliseraldehid – 3 – fosfat dehidrojenaz üzerindeki - SH gruplarının kovalan modifikasyonu ve mitokondrideki demir – sülfür proteinlerinin hasarına yol açabilir. Bununla beraber, etkilerin ikisi de büyük bir olasılıkla nitrik oksidin kendisinden çok türevleri olan N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup> gibi oksidasyon ürünleri nedeniyledir. Aşırı nitrik oksidin direkt toksik etkileri ribonükleotid redüktazın ve sitokrom oksidazın inhibisyonunu kapsar. Nitrik oksid, bu esansiyel mitokondriyel multi enzim kompleksini oksijene bağlanarak kompetatif olarak inhibe eder (17). Nitrik oksid, aynı

zamanda ferro sitokrom c ile reaksiyona girerek Fe ( III ) sitokrom c ve nitrik oksid oluşturur, bu da oksijen ile reaksiyona girerek ONOO<sup>-</sup> oluşturabilir (123).



### 3. MATERİYAL ve METOD

#### 3.1. MATERİYAL

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından temin edilen genç erişkin Wistar albino soyu 50 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar beş gruba ayrıldı. Her deney grubu 10 sağlıklı dişi sıçan seçilerek oluşturuldu. Sıçanların ağırlıkları 200-230 gram arasında değişiklik göstermekteydi.

#### 3.2. DENEY GRUPLARI

**Grup 1:** Kontrol grubu olup (n=10), hergün içme suları değiştirildi ve %21 protein içeren pellet yem ( Eriş Yem Sanayii ve Tic A.Ş.) ile ad libidum beslendi.

**Grup 2:** İçme sularına 0.4 mg / L sodyum nitrit alan grup olup; (n=10), hergün içme sularına 0.4 mg / L olacak şekilde sodyum nitrit eklendi ve %21 protein içeren pellet yem ile ad libidum beslendi.

**Grup 3:** İçme sularına 1 mg / L sodyum nitrit alan grup olup (n=10), hergün içme sularına 1 mg / L olacak şekilde sodyum nitrit eklendi ve %21 protein içeren pellet yem ile ad libidum beslendi.

**Grup 4:** Yemlerine kg vücut ağırlığı başına 0.4 mg sodyum nitrit olacak şekilde pellet toz yeme sodyum nitrit eklenen grup olup (n=10), hergün içme suları hergün tazelendi.

**Grup 5:** Yemlerine kg vücut ağırlığı başına 1 mg sodyum nitrit olacak şekilde pellet toz yeme sodyum nitrit eklenen grup olup (n=10), hergün içme suları hergün tazelendi.

#### 3.3. METOD

Sodyum nitrit ( Sodium Nitrite - Carlo Erba ) her gün düzenli olarak belirtilen şekilde verilmeye başlandıktan 110 gün sonra sıçanlar eter anestesi altında sakrifiye edildi,

kalbin sağ ventrikülünden alınan heparinli kan örneklerinden santrifüj ile plazma elde edildi. Ayrıca karaciğer dokusu çıkarıldı, plazma ve karaciğer dokuları analiz gününe kadar biyokimyasal incelemeler için  $-70^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya kaldırıldı. Kan ve karaciğer örneklerinin alımı sırasında normal cerrahi setleri kullanıldı ve antisepsi kurallarına uyuldu.

### 3.3.1. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Yaş ağırlıkları 0.4001- 0.5250 gram arasında değişim gösteren doku örnekleri, hassas terazi ile tartıldıktan sonra, pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde, Potter tipi cam homojenizatör ( Heidolph - RZR 2021 ) kullanılarak homojenize edildi ve %20'lik ( % 20 gr. / ml ) homojenatlar hazırlandı. Elde edilen doku homojenatları orta şiddette ve 30 saniye süre ile 2 kez sonike edildi ( MSE, Kod:11-73, Seri: PG597 ). Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yapıldı. Homojenatlar daha sonra, 1500 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüje edildi. Elde edilen süpernatantlarda NO ve MDA, katalaz düzeylerine bakıldı. Bütün analizler aynı koşullarda ve aynı gün uygulandı.

#### 3.3.1.1. Lipid Peroksidasyonu Analizi

MDA ile lipid peroksidasyonunun tayininde, Buege ve Aust'un tanımladığı yöntem kullanılmıştır (19). Çok doymamış yağ asitlerinin yıkımından oluşan MDA, peroksidasyon reaksiyonunun sonunu belirlemede yaygın olarak kullanılan bir indekstir. MDA; tiyobarbitürik asitle reaksiyona girerek 535 nm dalga boyunda reaksiyon veren kırmızı renkli ürünler oluşturan lipid peroksidasyonunun ürünleri olarak tanımlanmıştır.

#### Reaktifler

Stok TCA – TBA – HCl : %15 gr / ml trikloroasetik asid; % 0.0375 gr / ml tiyobarbitürik asid; 0.25 N hidroklorik asid. Bu çözelti tiyobarbitürik asidin çözünmesi için orta derecede ısıtılabilir.

#### Yapılışı

1 ml plazma ve %20'lik karaciğer doku homojenatı 2 ml TCA – TBA – HCl reaktifi ile karıştırıldı. Kaynar su banyosunda 15 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra oluşan çözelti 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Örneğin absorbanstireaktif içeren

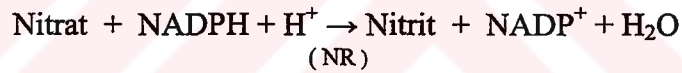


blank'e karşı 535 nm dalga boyunda saptandı. Örneğin malondialdehid ( MDA ) konsantrasyonu dilüsyon faktörleri dikkate alınarak plazmada nmol / ml, dokuda ise nmol / gram yaş doku olarak belirtildi.

### 3.3.1.2. NO Analizi

Son yıllarda nitrik oksidin çok sayıda biyolojik olarak önemli fonksiyonları gösterilmiştir. Molekül, geniş bir fizyolojik etki spektrumu ile ( örneğin; kan basıncının regülasyonu ve nörotransmitter fonksiyonundan immün sistem ile ilişkisine kadar ) ile hücre içi ve hücreler arası mesaj taşıyan madde olarak etki etmektedir.

Memelilerin hücrelerinde nitrik oksid, bazik bir amino asid olan L – arjinin substratı ile ko - substrat olarak moleküler oksijenden nitrik oksid sentaz enziminin katalizörlüğünde sentezlenir. Biyolojik sıvılarda nitrik oksid, çok hızlı bir şekilde oksidasyon ile aktivasyonunu kaybederek nitrit ve nitrata dönüşür. Bu yöntemde nitrik oksid oksidasyon ürünleri , fotometrik olarak tayin edilerek saptanmıştır. Nitrik oksid, biyolojik sıvılarda oluşan nitrit yolu ile saptanabilir. Örnekte bulunan nitrat; nitrat redüktaz enzimi ( NR ) varlığında NADPH ile nitrite indirgenir.



Oluşan nitrit sülfanil amid ve N – ( 1 – naftil ) – etilendiamin hidroklorür ile kırmızı menekşe renkli diazo boya oluşturur.

Nitrit + sülfanilamid + N–(1 – naftil)–etilendiamin + hidroklorür → Diazo boyası

Diazo boyasının absorbansı 550 nm dalga boyunda ölçülür.

### Yapılışı

300 µl plazma veya %20'lik karaciğer homojenatı alınarak normal testprosedürü uygulandı. Blank, test ve standard tüplerinin absorbans değerleri spektrofotometrede ( Schimatzu UV - VIS 1201, Japan ) 550 nm dalga boyunda ölçülerek standardın konsantrasyon değerlerinden yararlanılarak örneklerin nitrit düzeyleri belirlendi. Birimler dokuda µM / gr yaş doku, plazmada ise µM olarak ifade edildi.

### 3.3.1.3. Karaciğerde Katalaz Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesinin tayininde modifiye Aebi yöntemi kullanıldı (150). Bu yöntemde reaksiyon hızı, 240 nm'de hidrojen peroksidin absorpsiyonundaki azalma hızı ile belirlenmektedir.

#### Plazmada

	Test (mL)
Plazma	0.005
Fosfat tamponu ( pH: 7 )	0.395
Hidrojen peroksid	0.2

Reaksiyonun başladığı an 0. dakika olarak kabul edildi. İlk absorpsiyon ölçüldü, tüpler 30 C ° 'de 5 dakika inkübe edildi ve son absorpsiyon ölçüldü.

#### Dokuda

	Test (mL)
Doku ( %20'lik homojenat )	0.005
Fosfat tamponu ( pH: 7 )	0.395
Hidrojen peroksid	0.2

$$\text{Hesap : Aktivite ( kU / L )} = \Delta A / dk \times (600 / 5) \times 1 / 0.04$$

#### 4.BULGULAR

Elde edilen bulgular istatistiksel olarak Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde bütün gruplar arasında anlamlı farklar bulundu. Grupların herbirini kendi arasında ayrı ayrı değerlendiren Bonferroni testi uygulandığında ise aşağıda belirtilen sonuçlar elde edildi.

**Tablo 2 - Karaciğer ve Plazma Örneklerinde Saptanan MDA ( nmol /ml ), NO (µm / gr yaş doku ve µM) ve Katalaz ( ünite /gr yaş doku) düzeyleri**

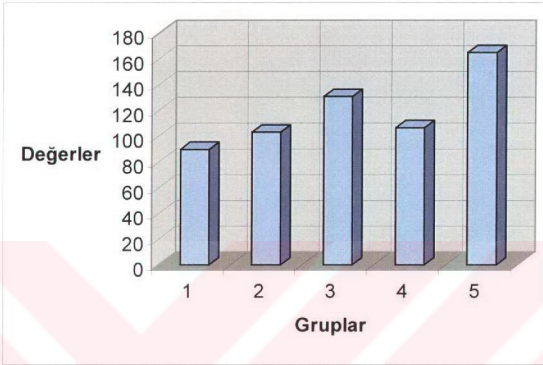
Gruplar	Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	Grup5
Karaciğer MDA düzeyleri	89.68±20.16 <sup>b</sup>	103.09±31.67 <sup>b</sup>	130.70±37.48 <sup>ab</sup>	106.47±24.00 <sup>b</sup>	164.90±29.58 <sup>a</sup>
Plazma MDA düzeyleri	9.24±1.03 <sup>ab</sup>	8.76±1.05 <sup>b</sup>	10.04±2,07 <sup>ab</sup>	11.10±2.11 <sup>a</sup>	10.09±1.79 <sup>ab</sup>
Karaciğer NO düzeyleri	0.9±0.11 <sup>b</sup>	0.94±0.09 <sup>ab</sup>	1.02±0.15 <sup>ab</sup>	1.00±0.12 <sup>ab</sup>	1.07±0.18 <sup>a</sup>
Plazma NO düzeyleri	61.51±7.72 <sup>b</sup>	62.7±7.25 <sup>ab</sup>	70.9±6.77 <sup>a</sup>	69±7.54 <sup>ab</sup>	67.89±6.79 <sup>ab</sup>
Karaciğer Katalaz düzeyleri	586.03±161.96 <sup>a</sup>	368.52±133.79 <sup>b</sup>	477.43±123.01 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	504.25±134.6 <sup>ab</sup>	422.46±110.13 <sup>ab</sup>

<sup>ab</sup> : Her bir satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki bakımdan önemlidir (p<0.05).

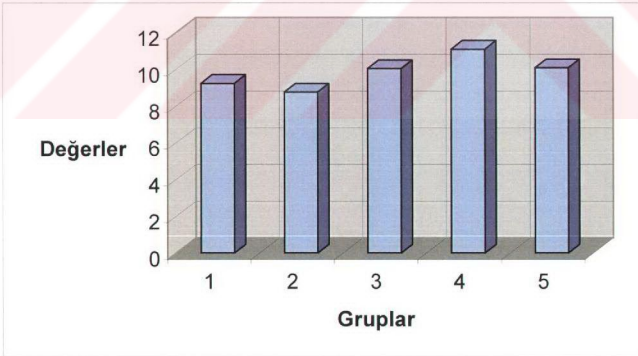
Grupların aralarındaki farkları grafiksel olarak gösteren tablolar ise aşağıdaki

gibi oluşturulmuştur.

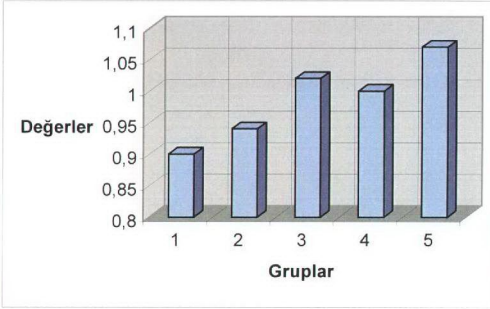
**Grafik 1 - Karaciğer dokusu MDA düzeyleri (nmol/gr. yaş doku)**



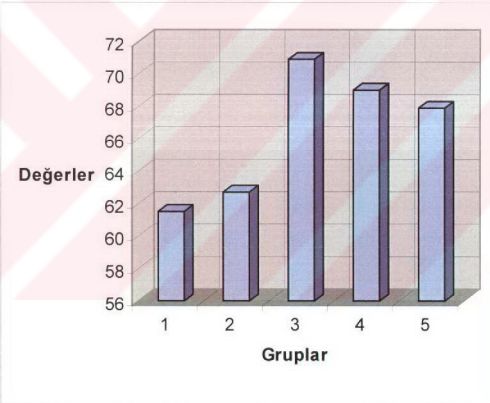
**Grafik 2 - Plazma MDA Düzeyleri (nmol / ml )**



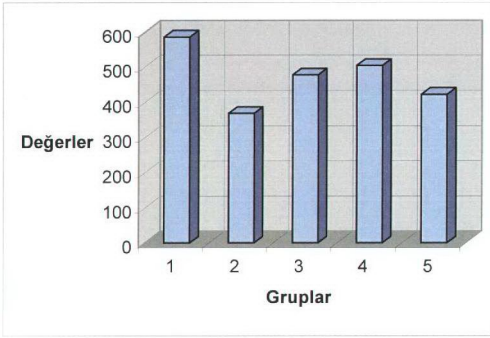
**Grafik 3 - Karaciğer Dokusu NO Düzeyleri ( $\mu\text{m}/\text{gr.yaş doku}$ )**



**Grafik 4 - Plazma NO Düzeyleri ( $\mu\text{M}$ )**



**Grafik 5 - Karaciğer Dokusu Katalaz Düzeyleri (Ünite/gr.yaş doku)**



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sodyum nitrit, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de et, balık ve peynir ürünleri gibi gıdaların raf ömürlerini uzatmak, renk, koku ve aroma oluşumunu sağlamak amacı ile katkı maddesi olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bu çalışma Dünya Sağlık Örgütü'nün gıdalarda kullanımına izin verdiği en yüksek doz olan 0.4 mg / kg vücut ağırlığı olacak şekilde (152), ayrıca daha yüksek doz olan 1 mg / kg vücut ağırlığı olacak şekilde dişi Wistar albino soyu genç erişkin dişi sıçanların bir grubunun yemlerine ve bir grubunun da içme sularına sodyum nitrit eklenmiştir. Bu dozajların 110 gün boyunca uygulanması sonucu plazma ve karaciğerde bazı oksijen ve nitrik oksid radikallerinin oluşumu üzerine, ayrıca karaciğer dokusunda hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda görev yapan en önemli enzimlerden biri olan katalaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Biyomedikal literatür, serbest radikal ve diğer reaktif ürünlerin insanlarda çeşitli hastalıkları ile ilişkisini gösteren iddialar ile doludur (60,129). Bunların romatoid artrit ve kardiyomiyopati ile hemorajik şok ve kistik fibrozis'den, gastrointestinal iskemi, AIDS ve hatta erkeklerdeki pattern kelliğe ( pattern baldness ) kadar yüzden fazla durumla ilişkisi gösterilmiştir. 1984 yılında, bu geniş dağılım gösteren insanlardaki hastalıkların hepsinde olmasa da çoğunda, bu maddelerin artışının doku hasarına eşlik ettiği bildirilmiştir (63). Bunun nedeni, oksidatif stresin, doku hasarına yol açmasıdır (60).

Nitrik oksid, vücutta en bol bulunan serbest radikallerden biridir ve damar fizyolojisi ve patolojisinde önemli olduğu bildirilmektedir (62).

Nitrik oksid, hem normal homeostazı sağlamada, hem de çeşitli hastalıkların patojenezinde önemli bir rol oynar. Nitrik oksidin biyolojik yarı ömrü kısa olup hızla stabil metabolitleri olan nitrit ve nitrata dönüştürülür. Plazmada nitrit hızla nitrata oksidlenir ve bizim de çalışmamızda uyguladığımız gibi vücut sıvılarında da nitrit ve nitrat tayini nitrik oksid oluşumu belirteci olarak yaygın bir biçimde kullanılır (62).

Lipid peroksidasyonu, hem bitkilerde, hem de hayvanlarda meydana gelen kompleks bir proses olarak bilinmektedir. Lipid radikallerinin oluşumu ve artışı, oksijen alınımı ( uptake ), doymamış lipidlerdeki çift bağların yeniden düzenlenmesi, ve alkoller,

ketonlar, aldehidler ve eterleri gibi çeşitli yıkım ürünlerinin oluşumunu kapsamaktadır. Sadece linoleik asidin peroksidasyonu 20'den fazla yıkım ürününün oluşumuna neden olmaktadır. Biyolojik membranlarda genellikle yağ asitleri boldur ve oksijenden zengin bir ortamda bulunur. Bu nedenle membran lipidlerinin peroksidatif hasara yatkınlığı sürpriz değildir.

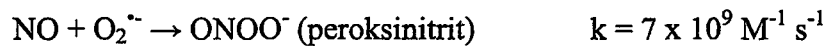
Elde ettiğimiz bulgulara göre gerek plazmada ve gerekse karaciğer dokusunda oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) oluşumunda, 2. grubun plazma değerleri dışında genel olarak bir artış saptanmıştır.

Hall ve Chambers (58) Wistar soyu sıçanlara tek doz 5 mg / 100 gr canlı vücut ağırlığı olacak şekilde sodyum nitrit verilmesinin lipid peroksidasyonunun şiddetlenmesine yol açtığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da plazma ve karaciğer dokusu nitrik oksid düzeylerinde lipid peroksidasyonuna benzer şekilde kontrol grubuna göre nitrit verilen gruplarda artış saptanmıştır.

Yüksek konsantrasyondaki nitrik oksidin patolojik etkilerinin ve biyokimyasal mekanizmalarının bir kısmı molekülün direkt etkilerine bağlıdır. Bu etkilerden biri, normal substratı oksijen olan sitokrom c oksidaz gibi mitokondriyel solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonunu kapsamaktadır (62).

Nitrik oksid, lipid türevi peroksi radikalleri ile hızla reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu inhibe etmek için yeterince stabil ürünler oluşturur. Nitrik oksidin lipid peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona girmesi, lipidde çözünür özelliği ve endotelial nitrik oksid sentaz tarafından sabit bir şekilde oluşturulması, onun arter duvarında bir antioksidan rolü olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak radikal – radikal sonlandırma reaksiyonlarının ürünleri, daima stabil olmayıp bunların parçalanması başlangıç moleküllerinden daha toksik mediyatörler oluşturabilir. Buna iyi bir örnek olarak nitrik oksidin süperoksid radikali ile reaksiyonu verilebilir (62).





Bu reaksiyon oldukça hızlıdır. Nitrik oksid ile süperoksid radikalının reaksiyonu biyolojik olarak önemlidir. Nitrik oksid ve süperoksid radikali birbirlerinin biyolojik etkileri üzerine antagonisttirler (62).

Nitrik oksid, bazı sistemlerde lipid peroksidasyonunu inhibe edebilir . Peroksinitrit, hücre, doku veya vücut sıvılarında hızla protonlanır. Bunu tiyol gruplarının ve diğer antioksidanların tükenmesi ve lipidlerin oksidasyonu, DNA iplik kırılması, DNA bazlarının ( özellikle guaninin ) nitrolanması ve deaminasyonu ve proteinlerdeki aromatik amino asitlerin nitrolanması izler (151). Tirozin kalıntılarının nitrolanması glutatyon redüktaz gibi bazı antioksidan enzimlerin inaktivasyonuna ve sinyal iletilisinde interferenslere yol açabilir (9,45,55). Protonlanmış peroksinitritin hedefleri arasında glutatyon transferaz, süperoksid dismutaz, aktin ve nörofilament L ve seruloplazmin gibi proteinler bulunmaktadır. Nitrotirozin toksik etkisini sinyal iletilisi ile, interferens yaparak veya mikrotübül proteini olan tubulinin yapısına dahil olarak ve hücre iskeletini bozarak hücre ölümüne yol açarak gösterir (62).

Peroksinitrit, bir seri kompleks mekanizma ile biyolojik hasara yol açar. Bununla beraber aşırı miktarda nitrik oksid varlığı, bazen peroksinitritin neden olduğu hasarı inhibe edebilir. Örneğin nitrik oksid ve süperoksid radikali eşit artışlar gösteriyor ise lipid peroksidasyonunun peroksinitrit oluşumu yolu ile stimüle edebilir, nitrik oksid / süperoksid radikali oranının yüksekliği ise nitrik oksidin peroksil ve alkoksil radikallerini temizleme özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonunu azaltabilir (62).

Bulgularımız için Pearson - regresyon korelasyon analizi yapıldığında sadece 4. grup için karaciğer malondialdehid düzeyi ile nitrik oksid düzeyi arasında ters yönde geçerli bir bağıntı bulundu (  $r = - 0.7681$ ,  $p < 0.001$  ). Buna göre, oksidatif stresin ve bir ölçüde süperoksid radikal oluşumunun dolaylı bir göstergesi olan lipid peroksidasyonu, nitrik oksid bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, yukarıdaki bilgiler ışığında yüksek nitrik oksid düzeylerinin lipid peroksidasyonunu inhibe edebileceği, bu durumda oluşan hasarın önemli bir kısmının peroksinitrit oluşumu yolu ile daha çok enzim ve proteinlere etkileri üzerinden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

1991 – 1995 yılları arasında Polonya’da yapılan bir çalışmada diyetle alınan nitratların %94 - %98’inin sebzeler ile, nitritin ise %98 et ürünleri ile alındığı gösterilmiştir (142).

Normalde yavaş olan hemoglobinin otooksidasyonu bazı toksinler ile hızlandırılabilir. Bunlardan biri, nitrit iyonudur (  $\text{NO}_2^-$  ). Bazı kırsal alanlarda aşırı miktarda inorganik gübrelerin kullanılması nedeni ile su kaynaklarında aşırı miktarda nitrit (  $\text{NO}_3^-$  ) varlığı bebeklerde problemlere neden olabilir. Sudaki nitrat, beslenmede kullanıldığında barsak bakterileri tarafından nitrite indirgenir, bu sonra emilir ve vücut dokularının oksijenlenmesi ile interferens yapmak üzere methemoglobin oluşumuna neden olur (62).

Oksidatif stres in vivo’da karaciğer fibrozu ve Kupffer hücresinin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bununla beraber oksidan stresin hepatik stellat hücre aktivasyonuna doğrudan doğruya mı yoksa hasarlı hepatositler tarafından parakrin bir stimülasyon yolu ile mi katkıda bulunduğu hala çelişkilidir (132).

Plazma nitrik oksid ve ALT düzeylerinin kronik hepatit B ve aktif siroz hastalarında ölçüldüğünde, bu iki parametre arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu durumda araştırmacılar, nitrik oksid düzeyinin yükselmesinin karaciğer hasarının şiddeti ile ilişkili olduğunu önermektedirler (134).

Sosis imalatı sırasında stafilokok türleri tarafından katalaz ve nitrat redüktaz oluşturulmasının lipid oksidasyonundaki rolünü araştırmak amacı ile farklı koşullarda çoğaltılan stafilokokların süpernatantlarında ve istirahat sırasındaki hücrelerde bu enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Büyüme ortamına nitrat ilavesi katalaz sentezini ve aynı zamanda katalazın salınımını arttırmıştır (133).

Shimizu ve arkadaşları (124), beyaz farelerin sodyum nitrit ile entoksikasyonunun eritrosit antioksidan enzimlerinden süperoksid dismutaz ve katalaz aktivitesinin azalmasına neden olduğunu, ayrıca sodyum nitrit alan fare gruplarında eritrosit lipid peroksidasyon düzeyinin de kontrol grubuna göre yüksek bulunduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da Shimizu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya paralel olarak karaciğerde yaptığımız katalaz aktivitesi ölçümünde, kontrol grubuna göre tüm gruplarda doku enzim

aktivitelerinde azalmalar saptanmıştır. Bu azalmalar sadece ikinci grup için anlamlı bulunmuştur (  $p < 0.005$  ). Karaciğerde katalaz aktivitesinin azalmasının olası nedenlerinin reaktif oksijen ve azot türlerinin etkisi ile doku harabiyeti sonucu enzimin hücre dışına çıkışının artması ve / veya radikal etkisi ile enzim aktivitesinin inhibisyonu olabileceği kanısındayız.

Çocukluk çağı kanserlerinden ölüm nedenlerinden birini de beyin tümörleri oluşturur. Deneysel olarak düşük dozlarda sistemik uygulama ile beyin tümörlerine yol açan bazı kimyasallar bilinmektedir. Bunlardan özellikle N – nitrozo bileşikleri, nitrozamidler ( özellikle nitrozürelere ) bir grup oluşturur. Sodyum nitrit gibi nitrozamid öncül moleküllerin gebe hayvanlara verilmesi, yavrularında sinir sistemi tümörlerinin insidansının yüksek olmasına neden olur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1984-1991 yılları arasında primer beyin tümörü teşhisi konulan 20 yaşın altındaki 540 çocuğun annesinde ve 801 kontrol grubunda yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre işlenmiş et ürünlerinin yenme sıklığı, tüketilen etin veya etteki nitritin miktarının yükselmesi ile risk artmaktadır. Buna göre bugüne kadar yapılan annenin beslenmesi özellikleri ile çocuklarında oluşan beyin tümörlerinin ilişkisini gösteren en kapsamlı çalışma gebelik sırasında endojen olarak oluşan nitrozo bileşiklerine maruz kalmanın tümör oluşumu ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir (115).

Benzer şekilde 1987-1988 yıllarında güneybatı Almanya'da yapılan bir çalışmada işlenmiş et ve peynir ile N - nitrozamin alınımları gliom ve menenjiom riski arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (13).

Daha önceki bebeklerinde doğumsal kusurlar olan 123 annede yapılan çalışmada nöral tüp defektine katkıda bulunan faktörlerin içinde gebelik sırasında litrede 10 miligramdan daha fazla nitrat bulunan içme sularının tüketilmesinin de olduğu gösterilmiştir (90).

Farklı N – nitrozo bileşiklerinin karsinojenik etkiye sahip olduğunu gösteren çeşitli hayvan çalışmaları bulunmaktadır. N – nitrozo dimetilamin'den zengin gıdaların tüketimi, üst solunum – sindirim yolları, kanser riskinde %79'luk bir artış ile ilişkilidir. Nitrit içeren etlerin günlük alınımının ise özofagus kanser riskini arttırdığı bildirilmektedir (118).

Çin'de özofagus kanserinin yüksek olduğu bir bölgede 538 kişide yapılan bir çalışmada hasta gruplarında idrar nitrat düzeylerinin sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (26).

Knekt ve arkadaşları (82), 9995 Finlandiya'lı kadın ve erkekte gastrointestinal sistem kanserleri riski ile nitrit, nitrat ve N – nitrozodimetilamin ( NDMA ) alınımı arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmaya katılanların total diyetini kapsayan ve bir yıllık diyet verilerinden elde edilen sonuçlardan yararlanarak nitrat, nitrit ve N-nitrozodimetilamin alınımı ile kolorektal kanserlerin ortaya çıkması arasında anlamlı derecede pozitif bir ilişki saptanmıştır. N – nitrozodimetilamin ile baş boyun ve mide kanserleri arasında ve nitrit veya nitrat alınımı ile gastrointestinal kanser riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Elde edilen bulgular N – nitrozo bileşiklerinin insanlarda kolorektal kanserleri indükleyeceği fikri ile uyum göstermektedir.

Mide kanserinin indüksiyonunun önemli komponentleri invivo'da gösterilen nitratın nitrite, bakterilerin etkisi ile indirgenmesi ve mide içerisinde mutajenik / karsinojenik nitrozo ve olasılıkla nitro bileşenlerinin oluşumudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada 1925 yılından 1972 yılına kadar mide kanseri mortalitesinde 3 kat azalma bulunmuştur. Mortalitedeki bu azalma, mide nitrit yükünde yaklaşık olarak 4 katlık bir azalma ile paralellik göstermektedir. 1972'den sonra Amerika Birleşik Devletleri'nde nitrat / nitritin aşırı alımı ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni, et ürünlerindeki çok yüksek nitrit / nitrat içeriğidir (67).

Kanser nedeni olarak düşünülen diyet faktörleri büyük bir olasılıkla diyetle alınan veya midede oluşan karsinojenik maddelerin etkilerinin karsinogenезin ikinci aşamasında promotörleri olarak etki edebilirler. Örneğin mide kanserinin nedeni midede nitrozamin oluşumu olabilir. Bunu, diyetle alınan nitrit ve nitrat hızlandırır, buna karşılık, nitratlarla bakterilerin oluşturduğu aminlerin birleşmesini önleyen vitamin C reaksiyonu inhibe eder. Bu nedenle C vitamini ve türevleri birçok gelişmiş ülkede, gıdalarda antioksidan katkı maddesi olarak kullanılırlar (28).

Mide özsuyunda yüksek nitrit konsantrasyonu ve artmış pH'nın mide kanserinin öncülleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Nitritin inklüzyonu ile ya da inklüzyonu olmadan midede endojen oluşumun mu yoksa daha önceden oluşan karsinojenlerin alınımının mı

tümörü başlatan ( inisiyatör ) veya ilerleten ( promotör ) maddelerin en önemli kaynağı olduğu hala açık olarak bilinmemektedir. Bu proseste etin hazırlanması ve / veya korunması önemli bir rol oynar (12).

Polonya'da, mide kanser riski yüksek olan bir bölgede yapılan bir çalışmada idrar nitrat düzeylerinin düşük risk bölgesindeki kişilere göre 1.4 kat daha yüksek olduğu saptanmış, fakat tüketilen et ürünleri ya da sebze tiplerinin miktarı ile nitrat düzeyleri arasında korelasyon bulunamamıştır. İdrar nitrat düzeyleri ile nitrozo amino asitler arasında ilişki bulunmaktadır. Buna göre nitrozamin oluşum potansiyeli yüksektir, muhtemelen de bu, intragastrik nitrozolanma ile olmaktadır (153).

Nitritli biftek ekstratlarının reaksiyonu ile oluşan ürünler, *Salmonella / mikrozom* mutajenite testi ile incelenmek amacı ile sığanlara, oral yolla nitrozolanmış sığır ekstraktı şeklinde verilmiştir. Safra sıvısı, mide, idrar, ince barsak ve kan örnekleri alınıp çalışıldığında, mutajenik özellik mide ve ince barsakta bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre sığır ekstraktının nitrozo ürünü safraya verilmemektedir fakat doğrudan doğruya mide ve ince barsaktan geçmektedir (103).

1967-1972 yılları arasında Finlandiya'da 5304 erişkin erkek ve 4750 erişkin kadında yapılan, diyetle nitrit, nitrat ve N – nitrozodimetilamin alınımı ile ilgili çalışmada sebzeler, meyveler, peynir, et ve balık ürünlerinden alınan bu bileşiklerin miktarı hesaplanmıştır. Bu çalışmada içme sularından alınan nitrit ve nitrat göz önüne alınmamıştır. İşlenmiş et ürünleri ve tütsülenmiş ve tuzlanmış balıklar, N – nitrozodimetilamin'in önemli kaynakları arasındadır. Söz konusu çalışmada kadın ve erkeklerin günlük nitrat alınımı benzer bulunmuştur. Oysa nitrit ve N – nitrozodimetilamin alınımı erkeklerde daha yüksek bulunmuştur. Bireysel düzeyde diyetle nitrat, nitrit ve N – nitrozodimetilamin alınımının tahmin edilmesinin epidemiyolojik çalışmalarda bu bileşiklerin sağlık üzerine etkilerini değerlendirmede faydalı olacağı önerilmektedir (36).

Bu çalışmada ortalama ömürleri yaklaşık 40 ay kadar olan Wistar soyu dişi sığanların 3 aylık yani genç erişkin bireyleri kullanıldı. Bu sığanlar insanların, yaklaşık genç erişkin dönemine karşılık dönemleri temsil etmekteydiler. Ortalama ömrün 1 / 10'u kadar bir süre boyunca ( 110 gün ) düzenli nitrit tüketiminin gerek plazmave gerekse en önemli fonksiyonlarından birisi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu olan karaciğerde, oksidatif

stresi, bazı gruplarda anlamlı olmak üzere, genel olarak arttırdığı, buna karşılık hidrojen peroksid detoksifikasyonun en önemli enzimlerinden katalazın dokudaki aktivitesinin genel olarak azalmasına yol açtığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, nitrat, nitrit ve N- nitrozo bileşiklerinin sağlık üzerine potansiyel tehlikeli etkileri olması düşüncesi, bu bileşiklere maruz kalmanın kronik etkilerinin düşünülmesi ve normal popülasyonlarda kullanım dozlarının hesaplanmasını zorunlu kılmaktadır.



## 6. ÖZET

Bu çalışmada; gıdalarda raf ömrünü uzatmak, istenilen koku ve aromayı elde etmek ve bazı patojenleri inhibe etmek amacı ile sıklıkla kullanılan bir katkı maddesi olan nitritin, organizmada serbest radikal oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın deneysel kısmında 50 adet Wistar albino soyu 3 aylık genç erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Her bir grupta 10 adet sıçan olmak üzere 5 gruba ayrılan sıçanların 4 grubu deney, bir grubu kontrol amacı ile seçilmiştir. Kontrol grubuna her gün düzenli olarak %21 protein içeren pellet yem ( Eriş Yem Sanayii ve Tic A.Ş. ) ile ad libidum beslenmiştir ve çeşme suyu verilmiştir. İkinci gruba, %21 protein içeren pellet yem ad libidum verilmiş ancak içme sularına Dünya Sağlık Örgütü'nün nitrit kullanımında üst sınır olarak belirlediği doz olan 0.4 mg / L sodyum nitrit ( Carlo-Erba ) düzenli olarak her gün katılmıştır. Üçüncü gruba, %21 protein içeren pellet yem ile ad libidum verilmiş, ancak içme suyuna 1 mg / L sodyum nitrit düzenli olarak her gün katılmıştır. Dördüncü gruba , 0.4 mg / kg canlı ağırlık dozunda sodyum nitrit içeren toz yem ile beslenmiş ve içme suyu verilmiş, beşinci grup ise, 1 mg / kg canlı ağırlık dozunda sodyum nitrit içeren toz yem ile beslenmiş ve içme suyu olarak da çeşme suyu içmişlerdir. Deney 110 gün devam etmiştir.

Planlı beslenmeden 110 gün sonra sıçanlardan alınan kan ve karaciğer doku örnekleri biyokimyasal analizlere tabi tutulmuş ve plazmada ve malondialdehid ( MDA ), nitrik oksid ( NO ) ve karaciğer dokusunda MDA, NO ve katalaz ( CAT ) olmak üzere 5 adet parametre incelenmiştir.

Elde edilen bulgular, istatistiksel olarak Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde bütün gruplar arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Grupların herbirini kendi arasında ayrı ayrı değerlendiren Bonferroni testi uygulandığında ise karaciğer dokusu MDA değerlerinde Grup 5 ile Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında, plazma MDA değerlerinde Grup 2 ve Grup 4 arasında, karaciğer NO düzeylerinde Grup 1 ve Grup 5 arasında, plazma NO düzeylerinde Grup 1 ve Grup 3 arasında, ve karaciğer dokusu CAT düzeylerinde ise Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı farklar bulunmuştur.

Bu çalışmada ortalama ömürleri yaklaşık 40 ay kadar olan Wistar soyu dişi sıçanların, insanların, yaklaşık genç erişkin dönemine karşılık yaşı olan dönemlerinde ( 3

aylık genç erişkin dişi Wistar soyu sıçanlar kullanılmıştır ), ortalama ömrün 1 / 10'u kadar bir süre boyunca ( 110 gün boyunca ) düzenli nitrit tüketiminin gerek plazmada ve gerekse en önemli fonksiyonlarından birisi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu olan karaciğerde, oksidatif stresi, bazı gruplarda anlamlı olmak üzere, genel olarak arttırdığı, buna karşılık hidrojen peroksid detoksifikasyonun en önemli enzimlerinden katalazın dokudaki aktivitesinin genel olarak azalmasına yol açtığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, nitrat, nitrit ve N- nitrozo bileşiklerinin sağlık üzerine potansiyel tehlikeli etkileri olması düşüncesi, bu bileşiklere maruz kalmanın kronik etkilerinin düşünülmesi ve normal popülasyonlarda kullanım dozlarının hesaplanmasını zorunlu kılmaktadır.





## 7. SUMMARY

In this study the free radicals existing in the metabolism caused by nitrites that is widely used for providing expected colour and odor, for inhibiting some pathogens and for extending the shelf life of the foods are explored

In the experimental part of the study 3 months aged of 50 young adult female Wistar albino rat strains are used. The rats are separated into 5 groups and each group included 10 rats. One of the groups is determined as control group whereas four other groups are chosen as experimental groups of the study. The control group is regularly fed ad libitum with pelleted feed containing 21 % protein and they are given tap water. The second group is also regularly fed ad libitum with pelleted feed containing 21 % protein but 0.4 mg / liter sodium nitrite which is indicated as the up limit dose of usage of nitrites in foods by the World Health Organization ( WHO ) is added to the tap water that is given to the rats. The third group is regularly fed ad libitum with pelleted feed containing 21 % protein and 1 mg / liter sodium nitrite is added to the tap water. The fourth group is regularly fed with powder feed containing 21 % protein containing 0.4 mg / live weight of kg and tap water is given. The fifth group is regularly fed with powder feed containing 21 % protein and 1 mg / live weight of kg and tap water is given. The experimental part of the study continued 110 days.

At the end of the experimental part, blood and liver tissue samples that are taken from the rats are analysed biochemically; malondialdehyde ( MDA ), nitric oxide ( NO ) levels are studied in the plasma and MDA, NO and catalase ( CAT ) are studied in the liver tissues. As a result five parameters are analysed totally.

When the results are interpreted statistically by Anova unidirectional variation analysis significant differences are found among all the groups for each parameter. Also the Bonferroni test is applied to the groups to compare the differences among the groups one by one. According to the Bonferroni test, significant differences are found :

- at liver tissue MDA levels, between Group 1 and Group 5 , Group 2 and Group 5, Group 4 and Group 5;
- at plasma MDA levels , between Group 2 and Group 4 ;
- at liver NO levels , between Group 1 and Group 5 ;
- at plasma NO levels , between Group 1 and Group 3 ;
- at liver tissue CAT levels , between Group 1 and Group 2.

In this study, 3 months aged (which corresponds approximately to the adolescence period of the humans) of female Wister rat strains whose average life span is 40 months are used . It's observed that in some groups the regular consumption of the nitrites during 110 days ( which is approximately 1/10 th of their life span) caused a significant increase in the oxidative stress in the plasma and in the liver which has a very important function in detoxifying xenobiotics; whereas this also caused a decrease in the activity of the catalase ( in the tissue ) which is a very important enzyme that works in hydrogen peroxide detoxification.

Finally, because of the potential dangerous effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health and regarding the chronic effects of these compounds due to their consumption , there should be an obligation in determining the dosage of them in food in the population .

## 8. KAYNAKLAR

- 1- **Aust SD, Roering DL.** Evidence for superoxide generation by NADPH – cytochrome reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;47:1133-7
- 2- **Bacon R.** Nitrate preserved sausage meat causes an unusual food poisoning incident. *Commun Dis Rep* 1997;7:45-7
- 3- **Badwey JA, Karnowsky ML.** Production of superoxide by phagocytic leukocytes: a paradigm for stimulus - response phenomena . *Curr Topics Cellul Regul* 1986;28:183-208
- 4- **Ballou D, Palmer G, Massy V.** Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 1969;36:898-904
- 5- **Baranova M, Mal' a P, Burdova O.** Transport of nitrates and nitrites into the milk of dairy cows through the digestive system. *Vet Med (Praha)* 1993;38:581-8
- 6- **Beckmann JS, Koppenol WH.** NO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and ONOO<sup>-</sup>: the good, the bad, the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424
- 7- **Bedwell S, Dean RT, Jessup W.** The action of defined oxygen centered free radicals on human low – density lipoprotein. *Biochem J* 1989;262:707-12
- 8- **Bell RG, De Lacy KM.** Nitrite loss and spoilage microflora development in chub-packed luncheon meat. *J Appl Bacteriol* 1983;55:473-80
- 9- **Berlett BS, et al.** Peroxynitrite mediated nitration of tyrosine residues in E. Coli glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1776
- 10- **Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW.** A study of the reactivity of HO<sup>•</sup> / O<sub>2</sub><sup>•-</sup> with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 1983;258:4759-61

- 11- **Biemond P, Swaak AJG, Penders JMA, Beindorff CM, Koster JF.** Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis and osteo arthritis in vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADP-Oxidase. *Ann Rheum Dis* 1986;45:249-55
- 12- **Boeing H.** Epidemiological research in stomach cancer: progress over last the ten years. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991;117:133-43
- 13- **Boeing H, Schlehofer B, Blettner M, Wahrendorf J.** Dietary carcinogens and the risk for glioma and meningioma in Germany. *Int J Cancer* 1993;53:561-5
- 14- **Borg DC, Schaich KM, Elmore JJ, Bell JA.** Cytotoxic reactions of free radicals of Oxygen. *Photochem Photobiol* 1978;28:889-907
- 15- **Borowska M, Markiewicz R, Witkowska A.** Nitrate and nitrite content in daily hospital diets during the winter season – comparison of analytical and calculation methods. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:489-93
- 16- **Breen Ap, Murphy JA.** Reactions of hydroxyl radicals with DNA. *Free Rad Biol Med* 1995;18:1033
- 17- **Brown GC, Cooper CE.** Nanomolar concentrations of NO reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with O<sub>2</sub> at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1994;356:295
- 18- **Buchanan JD , Armstrong DA.** The radiolysis of glyceraldehyde -3 phosphate dehydrogenase . *Int J Radiat Biol* 1978;33:409-418
- 19- **Buege JA, Aust SD.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 12: 302-310, 1978
- 20- **Burton GW, Foster DO, Perly B, Slater TF, Smith ICP, Ingold KU.** Biological antioxidants. *Phil Trans R Soc Lond* 1985;311:565-78

- 21- **Calmels S, Ohshima H, Bartsch H.** Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J Gen Microbiol* 1988;134:221-6
- 22- **Cammack R, Joannau CL, Cui XY, Torres Martinez C, Maraj SR, Hughes MN.** Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:475-88
- 23- **Capdevila J, Parhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS, Estabrook RW.** The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P<sub>450</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;101:1357-63
- 24- **Chance B.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605
- 25- **Chance B, Sies H, Boveris A.** Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605
- 26- **Chang Claude J, Warhendorf J, Qui SL, Yang Gr, Munoz N, Crespi M, Raedsch R, Thurnham DI, Correa P.** Epidemiological study of precursor lesions of oesophageal cancer among young persons in Huixian, China. *IARC Sci Publ* 1991;105:192-6
- 27- **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.** Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987;107:526-45
- 28- **Cummings JH.** Dietary factors in the aetiology of gastrointestinal cancer. *J Hum Nutr.* 1978;32:455-65
- 29- **Czapski G, Ilan Y.** On the generation of the hydroxyl agent from superoxide radical: Can Haber - Weiss be the source of OH<sup>•</sup> radical? *Photochem Photobiol* 1978;28:651-3

- 30- **Davies KJA**. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : an hypothesis . *Free Radic Biol Med* 1986;2:155-73
- 31- **Dean RT, Cheeseman KH**. Restriction of free radical attack on monoamine oxidase in the mitochondrial membrane by vitamin E. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1277-82
- 32- **Dean RT , Hunt JV , Grant AJ , Yamamoto Y , Niki E**. Free radical damage to proteins : The influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins. *Free Radic Biol Med* 1991,11:161-168
- 33- **Dean RT, Thomas SM , Garner AC**. Free radical mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane . Roles for lipid radicals . *Biochem J* 1986;240:489-494
- 34- **Devoyod JJ**. Use of nitrates in cheese making. *Ann Nutr Aliment* 1976;30:789-92
- 35- **Di Guisseppi J, Fridovich I**. The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984;12:315-342
- 36- **Dich J, Jarvinen R, Knekt P, Penttila PL**. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Addit Contam* 1996;13:541-52
- 37- **Durand P, Vendevre JL**. Residual content of nitrite and nitrates in cooked French meat products. *Ann Nutr Aliment* 1980;34:1019-24
- 38- **Dykhuzen RS, et al**. Antimicrobial effect of acidified  $\text{NO}_2^-$  on gut pathogens: importance of dietary  $\text{NO}_3^-$  in host defense. *Antimicrob Ag Chemother* 1996;40:1422
- 39- **Edwards SW, Hallett MB, Lloyd D, Campbell AK**. Decrease in apparent  $K_m$  for oxygen after stimulation of respiration of rat polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 1983;161:60-4

- 40- **Egan RW, Paxton J, Kuehl FA.** Mechanism for irreversible self deactivation of prostoglandin synthetase. *J Biol Chem* 1976;15:789-792
- 41- **Ellen G, Egmond E, Sahertian ET.** N- nitrosamines and residual nitrite in cured meats from the Dutch market. *Z Lebensm Unters Forsch* 1986;182:14-8
- 42- **Feeney L, Berman ER.** Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals. *Invest Opthal* 1976;15:789-92
- 43- **Fisher DB, Kaufman S.** Tetrahydropterin oxidation without hydroxilation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxilase. *J Biol Chem* 1973;248:4300-4
- 44- **Fong KL, McCay PB, Poyer JL, Misra HP, Keele BB.** Evidence for superoxide – dependent reduction of Fe and its role in enzyme – generated hydroxyl radical formation *Chem Biol Interact* 1976;15:77-89
- 45- **Francescutti D, et al.** Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the GSSG binding site. *Protein Eng* 1996;9:189
- 46- **Freeman BA, Crapo JD.** Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitichondria. *J Biol Chem* 1981;256:10986-92
- 47- **Fridovich I.** Quantitative aspect of production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970;245:4035-7
- 48- **Fridovich I.** Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44:147-159
- 49- **Fridovich I.** The biology of oxygen radicals: The superoxide radical is an agent of toxicity; süperoxide dismutases provide an importanat defense. *Science* 1978;201:875-80
- 50- **Fridovich I.** Superoxide radical: an endogenous toxicant *Ann Rev Pharmacol* 1983;23:239-257

- 51- **Gallagher EP, Kavanagh TJ, Eaten DL.** Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Methods Toxicol* 1994;18:349-65
- 52- **Garrison WM.** Radiation chemistry of organo –nitrogen compounds . *Curr Top Radiat Res* 1968;4:43-94
- 53- **Goldstein S, Michel C, Bors W, Sarran M, Czapski G.** A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radic Biol Med* 1988;4:295-303
- 54- **Goth L.** Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hung Sci Instrum* 1982;53:43-46
- 55- **Gow AJ, et al.** Effect of ONOO<sup>-</sup> induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996;385:63
- 56- **Guingamp MF, Linden G.** Effect of treatment technologies on the nitrate and nitrite content of milk. *Ann Nutr Aliment* 1980;34:1061-8
- 57- **Gutteridge JM.** Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron – and copper - dependent oxygen radical formation *FEBS Lett* 1983;157:37-40
- 58- **Hall TJ, Chambers TJ.** Molecular aspects of osteoclast function. *Inflamm Res* 1996;45:1
- 59- **Halliwell B.** Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron in degradation of hyaluronic acid by superoxide generating system. *FEBS Lett* 1978;96:238-42
- 60- **Halliwell B, et al.** Free radicals antioxidants and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598
- 61- **Halliwell B, Grootveld M.** The measurement of free radical reactions in humans: some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 1987;213:9-14



- 62- **Halliwell B, Gutteridge M.C.J.** Free Radicals in Biology and Medicine Oxford University Press 1999
- 63- **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984;1:1396
- 64- **Halliwell B, Gutteridge JM.** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-514
- 65- **Halliwell B, Gutteridge JM.** The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol Aspects Med* 1985;8:89-193
- 66- **Harrison JA, Harrison MA, Rose RA.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef jerky assessed on two plating media. *J Food Prot* 1998;61:11-3
- 67- **Hartman PE.** Putative mutagens and carcinogens in foods. Nitrate / nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ Mutagen* 1983;5:111-21
- 68- **Hodgson EK, Fridovich I.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1974;14:5294-99
- 69- **Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S.** Dose – dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N- nitrosation. *Carcinogenesis* 2001;22:199-202
- 70- **Huynh CH, Huynh S, Boivinet P.** Role of nitrites and nitroso derivatives on the development of abnormal colorations in cheeses. Study of their decomposition. *Ann Nutr Aliment* 1980;34:1069-76
- 71- **Ischiropoulos H, et al.** Detection of peroxynitrite methods. 1995,7-109
- 72- **İnal T.** Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü. Final Ofset, 1992

- 73- **Jessup W ,Bedwell S ,Kwok K ,Dean RT.** Oxidative modification of low-density lipoproteins :initiation by free radicals and protection by antioxidants. *Agent and Actions, Supplement* 1989;26:241-6
- 74- **Kalyanaraman B, Mason RP, Tainer B, Eling TE.** The free radical formed during the hydroperoxide – mediated deactivation of rat seminal vesicles in hemoprotein – derived . *J Biol Chem* 1982;257:4764-8
- 75- **Kalyanaraman B, Perz – Reyes E, Mason RP.** Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anti – cancer drugs. *Biochim Biophys Acta* 1980;630:119-30
- 76- **Kammerer M, Pinault L, Pouliquen H.** Content of nitrate in milk. Relationship with its concentration in the water supply for livestock. *Ann Rech Vet* 1992;23:131-8
- 77- **Kavas G.** Serbest Radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989;9:1-8
- 78- **Kellog EW, Fridovich I.** Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1977;252:6721-8
- 79- **Kilic B, Cassens RG, Borchert LL.** Influence of turkey meat on residual nitrite in cured meat products. *J Food Prot*;64:235-9
- 80- **Kittridge KJ, Willson RL.** Uric acid substantially enhances the free radical – induced inactivation of alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* 1984;170:162-4
- 81- **Klein D, Poullani B, Debry G.** Nitrozamines. *Ann Nutr Aliment* 1976;30:1-13
- 82- **Knekt P, Jarvinen R, Dich J, Hakulinen T.** Risk of colorectal and other gastro – intestinal cancers after exposure to nitrate and N – nitroso compounds: a follow up study. *Int J Cancer* 1999;80:852-6
- 83- **Kono K, Fridovich I.** Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257:508-16

- 84- **Koppenol WH, Butler J, Van Leeuwen JW.** The Haber – Weiss cycle. *Photochem Photobiol* 1978;28:655-60
- 85- **Koppenol W.H.** Rules For Radicals, What is it in Name? *Free Radic Biol Med* 1990;9:225-7
- 86- **Korenekova B, Kottferova J, Korenek M.** The fat of added nitrate used in the manufacture of Emmental cheese. *Food Addit Contam* 2000;17:377
- 87- **Kuo CF, Mashino T, Fridovich I.** Alpha, beta – dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide – sensitive enzyme. *J Biol Chem* 1987;262:4724-7
- 88- **Laitinen S, Virtanen Sm, Rasanen L, Penttila PL.** Calculated dietary intakes of nitrate and nitrite by young Finns. *Food Addit Contam* 1993;10:469-77
- 89- **Lakritz L, Pensabene JW.** Survey of human milk for volatile N – nitrosamines and the influence of diet on their information. *Food Chem Toxicol* 1984;22:721-4
- 90- **Li G, Tian J, Hu X.** A study risk factors of neural tube defects. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1996;30:17
- 91- **Lyhs U, Björkroth J, Hyytia E, Korkeala H.** The spoilage of vacuum packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold smoked rainbow trout stored at 4 degrees. *Int J Food Microbiol*, 1998;45:135-42
- 92- **Lynch RE, Fridovich I.** Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem* 1978;253:4697-9
- 93- **Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G.** Copper and zinc containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982;42:1955-6

- 94- **Mason RP, Chingnell CF.** Free radicals in pharmacology and toxicology – selected Topics. *Pharmacol Rev* 1982;33:189-211
- 95- **Mason RP, Kalvanaraman B, Tainer BE, Eling TE.** A carbon centered free radical intermediate in the prostoglandin synthetase oxidation of arachidonic acid: Spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* 1980;255:5019-5022
- 96- **Masters C, Holmes R.** Peroxisomes: New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol Rev* 1977;57:816-882
- 97- **Mccord JM.** Human disease, free radicals, and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993;26:361-7
- 98- **McCord JM, Fridovich I.** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J Biol Chem* 1970;245:1374-7
- 99- **Meah MN, Harrison N, Davies A.** Nitrate and nitrite in foods and the diet. *Food Addit Contam* 1994;4:519-32
- 100- **Misra HP, Fridovich I.** The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrin and a single assay for superoxide dismutase. . *J Biol Chem* 1972;247:3170-5
- 101- **Moorhouse PC, Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM.** Cobalt ( II ) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible “crypto – hydroxyl radical formation under physiological conditions. Different aspects of hydroxyl radical scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1985;843:261-8
- 102- **Mukai FH, Goldstein BD.** Mutagenicity of malondialdehyde a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acid. 1976;191:868-9
- 103- **Munzner R, Wever J.** Mutagenic activity in the stomach and small intestine of rats after oral administration of nitrosated beef extract. *Cancer Lett* 1984;25:225-30

- 104- **Nakazawa H, Genka C, Fujishima M.** Pathological aspect of active oxygens / free radicals. *Jpn J Physiol* 1996;46:15-32
- 105- **Nohl H, Hegner D, Summer KH.** The mechanism of toxic action of hyperbaric oxygenation on the mitochondria of rat heart cells. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1753-7
- 106- **Nohl H, Jordan W, Hagner D.** Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO. *FEBS Lett* 1981;123:241-4
- 107- **Ohshima H, et al.** Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem Toxicol* 1990;28:647
- 108- **Ologhobo AD, Adegede HI, Maduagwu EN.** Occurance of nitrate, nitrite and volatile nitrosamines in certain feedstuffs and animal products. *Nutr Health* 1996;11:109-14
- 109- **Oshino N, Chance B, Sies H, Bucher T.** The role of hydrogen peroxide generation in perfused rat liver and reaction of catalase Compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys* 1973;154:117-131
- 110- **Osterdahl BG.** Effect of water on nitrosamine formation in fried bacon. *Food Addit Contam* 1988;5:33-7
- 111- **Packer L, Glazer AN.** Oxygen radicals in biological system. *Methods Enzymol* 1990;186:1-21
- 112- **Perez – Rodrigez ML, Bosch – Bosch N, Garcia – Mata M.** Residual nitrite and nitrate levels of frankfurters along with their shelf- life. *Food Addit Contam* 1997;14:803-8
- 113- **Pierson MD, Smoot LA.** Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1982;17:141-87

- 114-**Poulsen E.** Use of nitrates and nitrites as food additives in Nordic countries. *Oncology* 1980;37:299-301
- 115- **Preston – Martin S, Pogoda JM, Mueller BA, Holly EA, Lijinsky W, Davis RL.** Maternal Consumption cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:599-605
- 116- **Pryor WA, Squadrito GL.** The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of NO with  $O_2^-$ . *Am J Physiol* 1995;268:699
- 117-**Richards DCH , Jessup W,Dean RT.** Cell surface proteins may be the primary target during free radical-mediated catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1988;946:281-288
- 118-**Rogers MA, Vaughan TL, Davis S, Thomas DB.** Consumption of nitrate, nitrite and nitrosodimethylamine and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:29-36
- 119-**Sanz Y, Vila R, Toldra F, Flores J.** Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 1998;42:213-7
- 120- **Scholes G.** Radiation effects on DNA. The Silvanus Thompson Memorial Lecture. *Br J Radiol* 1983;56:221-231
- 121- **Selenka F, Brand – Grimm D.** Nitrate and nitrite in human food calculation of the daily intake and its range. *Zentralbl Bakteriol* 1976;162:449-66
- 122- **Sevingen BA, Buege JA, O' Neal FO, Aust SD.** The mechanism of NADPH – dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1979;254:5892-99
- 123- **Sharpe ME, Cooper CE.** Reactions of NO with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of  $NO^-$  and  $ONOO^-$ . *Biochem J* 1998;332:9

- 124- **Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori H, Ito S.** Effects of Sho - saiko - to , a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999;29:149-60
- 125- **Shohami E, Beit – Yannai E, Horowitz M, Kohen R.** Oxidative stress in closed head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;10:1007-1019
- 126- **Siu DC, Henshall A.** Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *J Chromotogr A* 1998;804:157-60
- 127- **Sichak SP, Dounca A.** A study of the catalase monomer produced by lyophilization. *Biochim Biophys Acta* 1987;925:282-
- 128- **Slater TF.** Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-13
- 129- **Southorn PA.** Free radicals in medicine II: involment in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988;63:390
- 130- **Sun Y.** Free Radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. Rewiev article. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:595-602
- 131- **Sun Y, Oberley LW.** The inhibition of catalase by glutathione. *Free Rad Biol Med* 1989;7:595-602
- 132- **Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzono R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A.** Fibrogenic effect of oxidative Stress on rat hepatic stellat cells. *Hepatology* 1998;3:720-6
- 133- **Talon R, Walter D, Chartier S, Barriere C, Montel Mc.** Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by saphylococci. *Int J Food Microbiol* 1999;52:47-56

- 134- **Tang Q, Zeng L.** Study on the correlation of plasma NO, ET – 1 and ALT in the patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *J Tongji Med Univ* 2000;20:203-4
- 135- **Takahashi MA, Asada K.** Superoxide anion permeability of phospholipid membranes chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 1983;226:558-566
- 136- **Terelius Y, Ingelman – Sundberg M.** Cytochrome P<sub>450</sub> – dependent oxidase activity and hydroxyl radical production in micellar and membranous types of reconstituted systems. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1383-9
- 137- **Trelstadt RL, Lawley KR, Holmes LB.** Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine by reduced oxygen derivatives. *Nature* 1981;289:310-12
- 138- **Uğur M, Nazlı B, Bostan.** Özel Besin Hijyeni Ders Notları, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. İstanbul, 1996
- 139- **Vlácil F, Vins I.** Determination of nitrates in milk by ion – chromatography. *Nahrung* 1985;29:467-72
- 140- **Vogtmann H, Biedermann R.** The nitrate story – no end in sight. *Nutr Health* 1985;3:217-39
- 141- **Von Sonntag C.** The chemical basis of radiation Biology 1987 Taylor and Francis, London
- 142- **Wawrzyniak A, Gronowska – Sengwer A, Gorecka K.** The evaluation of nitrates and nitrites food intake among Polish households in 1991 – 1995. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1999;50:269-87
- 143- **Weiss SJ.** Neutrophil – mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1982;257:2947-53
- 144- **Wiess SJ, LoBuglio AF.** Phagocyte – generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982;47:5-18



- 145- **Wennmalm A, et al.** Metabolism and excretion of NO in humans. *Circul Res* 1993;73:121
- 146- **Winterbourn CC, Stern A.** Human red cells scavenge extracellualr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inhibit formation of HOCl and OH<sup>•</sup>. *J Clin Invest* 1987;80:1486-1491
- 147- **Wolff SP ,Dean RT.** Fragmentation of polypeptides by free radicals and its effects on susceptibility to proteolysis. *Biochem J* 1986;234:399-403
- 148- **Wolff SP , Garner A, Dean RT.** Free radicals, lipids and protein breakdown. *Trends in Biochemical Science* 1986;11:27-31
- 149- **Yamagata S, Seino S.** Studies on blood and plasma catalase *Tohoku J. Exp Med* 1953;57:231-8
- 150- **Yasmineh WH, Kaur TP, Blazar BR, Thelogides A.** Serum Catalase as marker of Graft vs – Host disease in Allogenic Bone Marrow Transplant Recipients : Pilot Study. *Clin Chem* 1995;41:1574-80
- 151- **Yermilov V, et al.** Effects of CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> on induction of DNA single strand breaks and formation of 8 – nitroguanine, 8 – oxoguanine and base propenal mediated by ONNO<sup>•</sup>. *FEBBS Lett* 1996;399:67
- 152- **Yıldırım Y.** Et Endüstrisi. 3. Baskı. Yıldırım Basımevi, Ankara, 1992
- 153- **Zatonski W, Ohshima H, Przewozniak K, Drosik K, Mierzwinska J, Krygier M, Chmielarczyk W, Bartsch H.** Urinary excretion of N – nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high - and low – risk areas for stomach cancer in Poland. *Int J Cancer* 1989;44:823-7

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Eseniş Koleji'nde tamamladıktan sonra 1992 yılında öğrenime başladığım İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1997 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimime başladım. Doktora öğrenimim esnasında sırası ile Nestle Türkiye Gıda Sanayii A.Ş. ve Danone – Sabancı A.Ş.'de yöneticilik görevlerinde bulundum.

