

**ALÜMİNYUM TOKSİSİTESİNİN NEDEN OLDUĞU
OKSİDATİF DNA HASARININ ÖNLENMESİNDE
HİDROKSİTİROZOL'ÜN ROLÜ**

Şeyda UÇARCAN
Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık-2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1406F328**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şeyda UÇARCAN'ın 'Alüminyum Toksisitesinin Neden Olduğu Oksidatif DNA Hasarının Önlenmesinde Hidroksitirozol'ün Rolü' başlıklı, **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi, 01. 12. 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yard. Doç Dr. Volkan KILIÇ
Üye :	Doç. Dr. İbrahim H. CİĞERCİ
Üye :	Doç. Dr. Harun BÖCÜK

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALÜMİNYUM TOKSİSİTESİNİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF DNA HASARININ ÖNLENMESİNDE HİDROKSİTİROZOL'ÜN ROLÜ

Şeyda UÇARCAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç Dr. Volkan KILIÇ
2015, 43 sayfa

Bu çalışmada, alüminyum (Al) toksisitesi ile indüklenen oksidatif stres ve DNA hasarının önlenmesinde, *Olea europea L.*'dan elde edilen güçlü bir antioksidan ve metal şelatlayıcı madde olan hidroksitirozol (HT)'ün etkileri araştırılmıştır. Swiss albino cinsi farelerin beyin dokusunda Grup I (Kontrol: % 0.9'luk NaCl); Grup II (AlCl₃: bir kez 25mg/kg); Grup III (HT: bir kez 100 mg/kg); Grup IV (AlCl₃+HT: sırasıyla bir kez 25 mg/kg ve bir kez 100 mg/kg); Grup V (HT: 10 mg/kg/gün-7 gün); Grup VI (AlCl₃+HT: sırasıyla 25 mg/kg bir kez ve 10 mg/kg/gün-7 gün) olmak üzere toplam 6 grup üzerinde (n=6) çalışılmıştır. Tüm uygulamalar intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri, toplam glutatyon düzeyi ve lipid peroksidasyonu biyokimyasal olarak ölçülmüştür. Dokudaki patolojik değişiklikler ışık mikroskopunda incelenmiştir. DNA hasarı tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, HT Al toksisitesinin oluşturduğu oksidatif stresi azaltmakta, lipid peroksidasyonu ve patolojik değişiklikleri engellemektedir. Buna bağlı olarak, oluşan DNA hasarı da önlenebilmektedir. Bu etkilerin gerçekleşmesinde, HT'ün hem Al'u hem de oluşan Al kaynaklı radikal molekülleri bağlayıp etkisizleştirerek, işlev gördüğü düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, hidroksitirozol, nörotoksosite, oksidatif stres, DNA hasarı

ABSTRACT

Master Thesis

THE ROLE of HYDROXYTHYROSOL in PREVENTION of OXIDATIVE DNA DAMAGE RESULTED FROM ALUMINIUM TOXICITY

Şeyda UÇARCAN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Volkan KILIÇ
2015, 43 pages

The present study investigated the effects of hydroxytyrosol (HT), a powerful antioxidant and metal chelator which is obtained from *Olea europaea L.*, in the prevention of oxidative stress and DNA damage resulted from aluminium (Al) toxicity. On the brain tissue of swiss albino mice, total number of 6 groups (n=6) of animals were studied as: Group I (control: 0.9 % NaCl); Group II (AlCl₃: at one time, 25mg/kg); Group III (HT: at one time, 100 mg/kg); Grup IV (AlCl₃+HT: at one time, 25 mg/kg and 100 mg/kg respectively); Grup V (HT: 10 mg/kg/day-7 days); Grup VI (AlCl₃+HT: 25 mg/kg and 10 mg/kg/day-7 days respectively). All applications were carried out intraperitoneally. Superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase and acetylcholine esterase activities, total glutathione level and lipid peroxidation were measured biochemically. Pathological changes were investigated under a light microscope. DNA damage was determined by single cell electrophoresis (SCGE) method. According to the findings, HT reduced oxidative stress, lipid peroxidation and histopathological changes resulted from Al toxicity. In parallel, DNA damage was prevented. It is thought that HT acted by binding and neutralising either Al or Al-derived radicals while fulfilling those effects.

Keywords: Aluminium, hydroxytyrosol, neurotoxicity, oxidative stress, DNA damage

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma konusunun seiminde bana destek olan, yardımını, bilgisini ve tecrubesini benden esirgemeyen değerli hocam ve danıŐmanım Yard. Doç Dr. Volkan KILIÇ ile çalıŐmamın her aŐamasında gostermiŐ olduğu ilgi ve destekle birikimlerinden faydalandığım değerli hocam ve ikinci danıŐmanım Doç. Dr. Gözde KILIÇ'a teŐekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar ve cihaz olanaklarından faydalandığım, edindiğim tüm mesleki tecrübe ve birikimleri bünyesinde kazandığım A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na, gerek vermiŐ oldukları manevi destek, gerekse yardımlarıyla emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma ve hocalarıma sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Bana vermiŐ oldukları eğitim ve anlayıŐla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii

1.GİRİŞ	1
1.1. Alüminyum Metalinin Genel Özellikleri.....	2
1.2. Alüminyumun Kaynakları ve Biyolojik Etkileri.....	3
1.3. Alüminyum ile İndüklenen Oksidatif Stres, DNA Hasarı ve Nörotoksisite	4
1.4. Hidroksitirozol.....	5
1.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu.....	7
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	9
1.6.1. Glutasyon	10
1.6.2. Süperoksit Dismutaz	11
1.6.3. Katalaz	11
1.6.4. Glutasyon Peroksidaz	12
1.6.5. Glutasyon S Transferaz	13
1.7. Asetilkolin esteraz	13
1.8. Oksidatif Strese Bağlı Olarak Meydana Gelen Hücreyel Değişiklikler	14
2.MATERYAL ve YÖNTEM	16
2.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	16
2.2. Biyokimyasal Analizler	16
2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	17
2.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	18
2.2.3. Glutasyon-S-transferaz (GST).....	19
2.2.4. Toplam Glutasyon (GSH)	19

2.2.5. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü.....	19
2.2.6. Malondialdehit (MDA) ölçümü	19
2.2.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi ölçümü.....	19
2.3. Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Yöntemi.....	19
2.4. Histopatolojik İncelemeler	21
2.4.1. Doku takibi	21
2.5. İstatistiksel Analizler	21
3.BULGULAR	22
3.1. Biyokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular	22
3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi.....	22
3.1.2. Katalaz (CAT) aktivitesi.....	23
3.1.3. Toplam Glutasyon (GSH) düzeyi.....	24
3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi.....	25
3.1.5. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi	26
3.1.6. Lipid Peroksidasyonu	27
3.1.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi	28
3.2. Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Bulguları.....	29
3.3. Histopatolojik İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular.....	31
4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hidroksitirozol'un kimyasal yapısı	5
1.2. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları	8
1.3. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları	9
1.4. Glutasyon'un kimyasal yapısı	10
1.5. Apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki farklılıklar	15
2.1. Süperoksit Dismutaz reaksiyon zinciri	17
3.1. SOD enzim aktivite grafiği	21
3.2. Cat enzim aktivitesi	22
3.3. Toplam GSH düzey grafiği	23
3.4. GSH-Px aktivite grafiği	24
3.5. GST aktivite grafiği	25
3.6. MDA düzey grafiği	26
3.7. AchE aktivite grafiği	27
3.8. SCGE Bulguları	28
3.9. SCGE analiz sonuç grafiği	29
3.10. Grup I beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	30
3.11. Grup II beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	31
3.12. Grup III beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	31
3.13. Grup IV beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	32
3.14. Grup V beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	32
3.15. Grup VI beyin (serebral korteks) dokusu (63x)	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Farklı ürünlerin içeriğinde bulunan hidroksitirozol miktarları	6
3.1. SOD aktivitesi sonuçları	21
3.2. Cat aktivitesi sonuçları.....	22
3.3. Toplam GSH düzeyi.....	23
3.4. GSH-Px aktivite sonuçları	24
3.5. GST aktivite sonuçları.....	25
3.6. MDA düzey sonuçları	27
3.7. AchE aktivite sonuçları	28
3.8. SCGE analiz sonuçları	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	: Asetilkolin Esteraz
Al	: Alüminyum
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S- Transferaz
HT	: Hidroksitirosol
i.p.	: İntraperitoneal
kg	: Kilogram
lt	: Litre
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
M	: Molar
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
$^{\circ}$ C	: Santigrad derece
nm	: Nanometre
Abs	: Absorbans
dk	: Dakika
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
g	: Relative centrifuge force (Nisbi santrifüj gücü)
w/v	: ağırlık/hacim
v/v	: hacim/hacim
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

Alüminyum (Al) yerkürede yaygın olarak bulunan ve günlük yaşantımızda mutfak gereçleri, besin katkı maddeleri, aşular, ilaçlar, çeşitli tıbbi uygulamalar, kozmetik ürünler ve deodorantlar gibi kaynaklardan sıklıkla maruz kalınan bir metaldir. İnsan vücuduna deri, sindirim ve solunum sistemleri yoluyla giriş yapmaktadır. İnsanlarda çeşitli kaynaklardan alınan günlük Al miktarının yaklaşık olarak 10-20 mg olduğu tahmin edilmektedir (Bihaqi ve ark., 2009).

Al yaşamsal işlemler için temel bir element olmamakla birlikte yüksek miktarlarda alındığında beyin, kemik, böbrekler ve kanı içeren birçok organ için toksiktir. Beyindeki Al birikiminin alzheimer, bunama, parkinson, amilotropik lateral skleroz (ALS) gibi nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir. Al toksisitesi reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumu ve oksidatif stres (OS) ile ilişkilendirilmektedir. Al tuzlarının biyolojik dokularda direkt olarak bir pro-oksidan özelliği bulunmamakla birlikte, demir tuzlarının reaktif oksijen türevi oluşumunu indükleyici etkisini arttırmak yoluyla oksidatif stresin artmasına neden olabilmektedir (Yuan ve ark., 2012; S.N.Harsha ve ark., 2013).

Son yıllarda özellikle Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere, kronik hastalıklardaki ölüm oranları ile antioksidan içerikli sebze-meyve alımı arasındaki ters ilişkiye dikkat çeken çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Akdeniz diyetinin önemli bir komponenti olan zeytinyağının özellikle antioksidan içeriğinin bu ilişkideki rolüne dikkat çekilmektedir. Zeytinyağındaki fenolik bileşiklerden hidroksitirozol (HT), katekol (2-hidroksifenol) yapısında olup, bu grubu içeren bileşiklerin antioksidan aktivite gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır. Bu katekolik gruplar, moleküller arası hidrojen bağları oluşturarak serbest radikalleri stabilize etmektedir. Serbest radikalleri temizleyen ve güçlü antioksidan olarak kabul edilen bu fenol bileşiği de, metaller üzerine güçlü şelatlayıcı etkiye sahip olduğundan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı da bildirilmiştir (Kotronoulas ve ark., 2013).

Akut seviyede maruz kalınan Al toksisitesinin neden olduğu nörodejeneratif hasarın önlenmesinde HT'ün etkilerinin belirlenmesi bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır.

HT, zeytinyağı, zeytin ağacı yapraklarına, zeytinde doğal olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Polifenoller içerisinde yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir. HT'ün antioksidan aktivitesinin iki mekanizma ile olduğu düşünülmektedir. Bunlar, oksidatif stress sırasında reaktif oksijenleri temizleyerek yada farklı hücre sinyal yollarını aktif hale getirerek organizmanın oksidatif strese karşı savunmasını artıraraktır. (Kotronoulas ve ark., 2013)

Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanırlar. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini yok ederek, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olan zincir reaksiyonlarını önleyen moleküllerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenin peroksidaz, süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijeni gibi reaktif moleküllerini içerir (Akkuş, 1995). Organizmada hücrel savunma mekanizması aracılığıyla yok edilenden daha fazla reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stresin serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu hücre hasarlarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarının ortaya çıkmasına etken olduğu düşünülmektedir. Endüstriyel ve evsel kimyasallar, pesititidler, suni gübreler, ağır metaller ve iyonize radyasyon gibi çevresel kirliliğine yol açan maddeler oksidatif stresin etkenleri arasındadır. (Casalino ve ark., 2002)

1.1. Alüminyum Metalinin Genel Özellikleri

Al yer kabuğunda en fazla bulunan 3. elementtir. Doğada çok fazla yayılış gösteren bir metal olup yer kabuğunun yaklaşık % 8' ini oluşturmaktadır. Periyodik cetvelde 3-A grubunda bulunan Al'un atom numarası 13, atom ağırlığı 26.98, yoğunluğu 2.70gr/cm³, erime noktası 660.32⁰C ve kaynama noktası 2519 °C'dir (Göğtepe, 2010). Doğada kararlı kombinasyonlarla diğer materyallerle birlikte bulunur. Hava kirliliği stonucunda oluşan asit neminin, toprağa ya da göl

yataklarına inmiş alüminyum ile tepkimeye girmesi sonucunda normal koşullar altında suda çözünmeyen Al, suda çözünebilme özelliği kazanmaktadır. Birçok metal gibi Al'un da çözünebilir formları hedef organlarda daha iyi emilim gösterip, daha iyi dağılmaktadır. Al'un tüm kimyasal formlarında toksikokinetik ve toksikodinamik etkileri büyüktür. Alüminyum sülfat, alüminyum hidroksit, alüminyum florid, monomerik organik ve inorganik formlarda görülebilmekle birlikte alüminyum klorid suda en fazla çözünebilen ve en yüksek toksik etki gösteren formudur. İçme suyu ya da besin zinciri yoluyla bitki, hayvan ve insanlara ulaşarak toksik etkiler yaratmaktadır (Sjögren ve ark. 2007, Pastacı ve ark. 2010).

1.2. Alüminyumun Kaynakları ve Biyolojik Etkileri

İşlenmiş gıdalar, pişirme ve saklama kapları, çeşitli tıbbi uygulamalar ve mesleki maruziyet insanlardaki Al birikiminin önemli nedenlerini oluşturmaktadır.

Al'u en fazla içeren gıdalar; işlem görmüş peynirler, kabartma tozları, hazır kek karışımları, dondurulmuş hamurlar gibi, gıda katkı maddelerini yüksek oranda içerenlerdir. Ayrıca pişirme kaplarında gerçekleşen metal salınımı, Al içeren kutularda uzun süreli olarak saklanan gıdalar ve içme suları oral yolla maruz kalınan diğer kaynaklardır (Lankoff ve ark. 2006., Kaizer ve ark., 2010, Celik ve ark. 2012). Al, ilaçlara ve suyun arıtılma işlemlerine eklenmektedir. Şehir suları yüksek oranda Al iyonları bulunmaktadır (Bhadauria, 2012). Tıpta paranteral ve diyaliz solüsyonlarının hazırlanması için kullanılan su ve hammaddeler, diyaliz ve paranteral solüsyonlar için kullanılan ambalaj materyalleri, hiperfosfatemi ve peptik ülser tedavisinde kullanılan alüminyum içeren oral antiasitler ve diğer hastalıklarda uygulanan Al içerikli farmasötik dozaj şekilleri de vücutta Al birikiminin nedenlerindedir. Bu birikim sıklıkla ölümcül olan diyaliz ensefatopatilerine sebep olmaktadır. Al tozlarına maruziyet pulmoner fibrozisle sonuçlanmaktadır. Astım, kanser, koroner kalp hastalığı alüminyum ile üretim yapan işçiler arasında izlenen hastalıklardır. Ancak alüminyumun bu hastalıklara tek başına sebep olduğu söylenemez (Uysal ve ark. 1990; Sjögren ve

ark. 2007; Pastacı ve ark. 2010). Aşılarda adjuvan olarak alüminyum hidroksit ($\text{Al}(\text{OH})_3$) ile alüminyum fosfat ($\text{Al}(\text{PO})_4$) tuzları yaygın olarak kullanılmaktadır (Yurdakök ve İnce, 2008).

Al gastrointestinal sistemden ve akciğerlerden absorbe edilir. Atılımı ise böbrekler üzerinden alüminyum sitrat şeklindedir. Al, memelilerin beyin, böbrek, karaciğer, kalp, kan, kemik gibi dokularında birikim göstermektedir (Bhadauria, 2012). Çeşitli biyomoleküllere Al, Ca ve Mg gibi biyolojik katyonların bağlanma bölgelerinden bağlanabildiği için her metabolik yol Al'un antagonist etkisinden dolayı potansiyel bir hedeftir. Al tuzları biyolojik dokularda direkt olarak OS oluşturmamaktadır. Fakat ROS oluşumunu yükseltmede aracı olarak etki göstermektedir. Al'un yağların ve proteinlerin peroksidatif hasarlarını artırdığı ve antioksidan kapasiteyi azalttığı bilinmektedir. (Harsha ve Anilakumar, 2013).

1.3. Alüminyum ile İndüklenen Oksidatif Stres, DNA Hasarı ve Nörotoksisite

Beyin dokusu, nöronların bölünememe özelliği, yüksek oksijen tüketim oranı (%20), hücre zarında çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek düzeyde bulundurması, yüksek demir (Fe) içeriği ve düşük anti-oksidan kapasitesi nedeniyle Al toksisitesinin oluşturduğu OS'e karşı oldukça hassas bir organdır. Al kan beyin bariyerini aşarak sinir ve glial hücrelerde birikebilir (Kumar ve ark., 2002; Yuan ve ark., 2012).

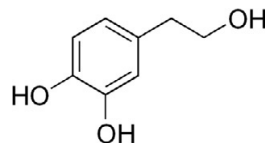
Al, diğer metallerle göre daha düşük oksidasyon redüksiyon kapasitesine sahip olmakla birlikte, oksidatif hasarı çeşitli mekanizmaları harekete geçirerek tetikleyebilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerini içeren negatif yüklü beyin fosfolipidlerine bağlanabilir. Bu sayede O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot ve OH^- gibi reaktif oksijen türevleri (ROS) için bir bağlanma hedefi haline gelebilir. Al, Fenton reaksiyonunda demir ile kontrol edilen ve ROS üretimine neden olan olaylarla lipid peroksidasyonunu stimüle eder. Süperoksit (O_2^-) Al^{+3} tarafından $\text{Al}-\text{O}_2^-$ kompleksi oluşturmak üzere nötralize olur. Bu sayede O_2^- 'nin oksidatif kapasitesi artar (Exley, 2007).

Al nükleik asitler, ATP'nin fosfat grubu, fosforillenmiş proteinler ve karboksilik gruplar gibi yapılara bağlanabilir. Hücrede çoğunlukla çekirdekte

lokalize olur. Bu nedenle etkisinin DNA hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Al insan periferik kan lenfositlerinde 10µg/ml'lik konsantrasyonda DNA hasarını indüklemektedir. Bu konsantrasyonda, DNA'daki okside bazların miktarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Lankoff ve ark., 2006). Bu durum, DNA hasarının oksidatif stres ile de ilişkisi olabileceğini göstermektedir. Alzheimer gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde Al toksisitesi ile indüklenen ROS oluşumu ve OS merkezi bir rol oynamaktadır. ROS oluşumu lipitlere, proteinlere ve DNA'ya hasar vermektedir. Serbest radikallerin etkileri ile ortaya çıkan DNA hasarı mitokondriyal DNA ve çekirdek DNA'sı üzerinde hasar oluşturur. Bununla birlikte Al'un, DNA onarımı ile ilişkili enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir (Bharathi ve ark., 2008).

1.4. Hidroksitirozol

Kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalıklardan ölüm oranında Akdeniz ülkelerinin düşük rakamlarla anılıyor olması, bu ülkelerdeki beslenme alışkanlıklarıyla ilişkilendirilmektedir. Karakteristik Akdeniz diyetinin temelini zeytinyağı tüketimi oluşturmaktadır. Zeytin ağacının (*Olea europea L.*) meyvesinde bulunan bu yağ basınç altında veya kimyasal yöntemlerle elde edildiğinde farklı tat, asidite ve kimyasal içerikte ürünler elde edilmektedir. Ancak basınç altında elde edilen zeytinyağı yüksek hidroksitirozol (2-(3,4-dihydroxyphenylethanol) (HT) içeriği açısından dikkat çekmektedir. HT bir tür fenolik bileşik olan feniletanoid yapısındadır. Ekstra saf zeytinyağının içeriğinin küçük bir bölümünü oluşturan güçlü bir antioksidandır. Bu özelliği nedeniyle, çeşitli patolojilerin önlenmesi ve tedavisi ile ilişkili ilgi çekici özellikleri bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Hidroksitirozol'un kimyasal yapısı (wikipedia)

Saf zeytinyağında, HT'ün ortalama miktarı 9-21 mg/kg arasında değişmektedir (Godoy-Caballero ve ark., 2012). HT oleuropein'in hidrolizi sonucu oluşur. Bu kimyasal işlem, zeytinin olgunlaşması, yağın saklanması ve işlenmesi aşamalarında gerçekleşmektedir.

Zeytin ağacının yaprakları da ateş ve parazitik hastalıkların tedavisinde antioksidan, hipoglisemik, antihipertansif, antimikrobiyal, antiaterosklerotik ve antiviral etkileri nedeniyle kullanılmıştır. Günümüzde, antitümör etkileri de rapor edilmiştir. Bu örneklerde HT'ün ortalama konsantrasyonu 10-17 mg/g arasındadır. Bir süredir, Akdeniz diyetinin şarap gibi diğer bileşenlerinde de HT oranları araştırılmaktadır. Kırmızı şarapta, ortalama 1.8-3.1 mg/L olarak değişmektedir. Beyaz şaraptaki konsantrasyonu ise yaklaşık olarak bu miktarın yarısı kadardır (Fernandez_Mar ve ark., 2012).

Çizelge 1.1. Farklı ürünlerin içeriğinde bulunan hidroksitirozol miktarları

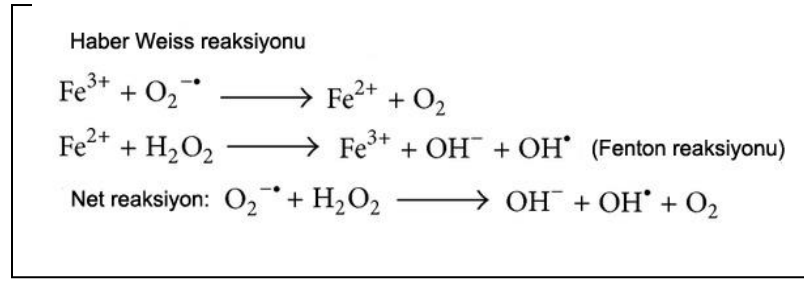
Ürün	HT içeriği
Beyaz şarap	1.5-2.70 mg/L
Kırmızı şarap	2-3.9 mg/L
Eski şarap	25 mg/L
Saf zeytinyağı	9-21 mg/kg
Zeytin yaprağı	10-17 mg/g

HT'ün yüksek antioksidan kapasitesine bağlı olarak, antimikrobiyal aktivitesi, UV etkisine karşı koruyucu özellikleri, kalp damar sağlığı üzerindeki koruyucu etkileri bilinmektedir. Kansere ilişkili etkileri üzerinde çalışılmaktadır. Bu özelliklerinin yanısıra HT etkili bir metal şelatlayıcısıdır. Bu yolla çeşitli metallerinin toksisitesinin önlenmesinde ve metal toksisitesi kaynaklı ROS oluşumunun engellenmesinde etkili olmaktadır. Özellikle demir katyonlarının şelatlanmasında önemli bir rol oynuyor olması, çeşitli metallerin metabolik demir ile ilişkili olarak gerçekleşen toksisitesinin ve Fenton reaksiyonu ile ilişkili ROS oluşumunda önleyici bir potansiyel taşımaktadır (Ramirez Tortose ve ark., 2015).

1.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu

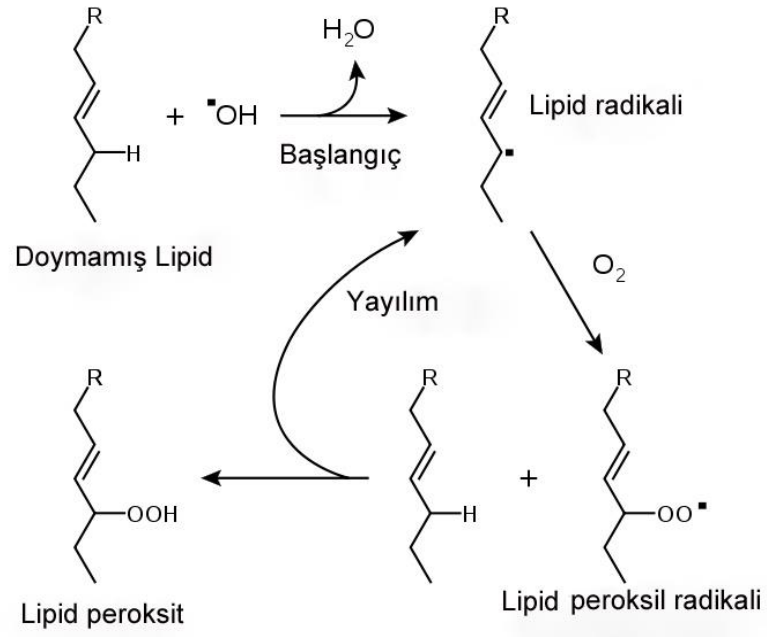
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren (\cdot ile sembolize edilir) atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikaller pozitif yüklü(katyon), negatif yüklü (anyon) veya nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijenin elektronlarının iki tanesi eşlenmemiş olduğu için, oksijen bazen “diradikal” olarak değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi etmenler serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; süperoksit anyonu radikali ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , hidroksil radikali (HO^{\cdot}), hidroklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi oksijen içeren hidrojenli, klorlu ve azotlu bileşikleri temsil eder. $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} ve NO^{\cdot} gibi bazıları serbest radikallerdir (Tomasi, 2003).

Serbest radikaller biyomembranlardaki doymamış lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel bileşenlerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olabilirler. Hidroksil radikali (HO^{\cdot}) bilinen en reaktif radikaldir. H_2O_2 , $HOCl$ ve $ONOO^-$ gibi endojen prooksidanlarda HO^{\cdot} oluşumu ile sonuçlanan parçalanma reaksiyonlarına girebildiklerinden dolayı canlı hücreler için potansiyel olarak zararlı sayılabilecek moleküllerdir. H_2O_2 , H_2O^{\cdot} ya detoksifiye edilmezse demir ile katalize olan Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonları sonucunda HO^{\cdot} meydana gelebilir. HO^{\cdot} son derece reaktif ve kısa ömürlü bir molekül olduğundan, biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatma potansiyeline sahiptir (Aydoğan Kılıç, 2010).



Şekil 1.2. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları

Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarında, HO^\bullet membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asiti (PUFA) zincirindeki karbon atomlarının birinden hidrojen çıkararak su oluşturur. Meydana gelen alkil radikali oksijenle birleşerek peroksil radikalini meydana getirir. Peroksil radikali diğer PUFA alkilerinden hidrojen koparır. Oluşan peroksil radikali hidrojeni yapısına katarak lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Ayrıca yeni bir lipid alkil radikali meydana gelir. Oluşan lipid alkil radikali oldukça kararsız bir moleküldür. Parçalanarak PUFA ile reaksiyona girebilecek ve lipid-karbon merkezli radikali yeniden oluşturabilecek ikincil bir lipid alkoksil radikali meydana getirir. Bu yıkım reaksiyonu sonucunda malondialdehit ve 4-hidroksinoneal gibi çok sayıda sitotoksik ürün oluşur. Lipid peroksidasyonu metallerin varlığında da artış gösterir. Bu metaller redoks katalizörü olarak görev yaparlar. Süperoksitin ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümüne aracılık ederler. Lipid peroksidasyonu, toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılmazsa, otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam etmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri gibi antioksidan enzimler de, hidroksil radikalının hücrelerdeki birikimini önleyerek serbest radikal oluşumuna bağlı lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedirler (Tomasi 2003; Aydoğan Kılıç 2010).



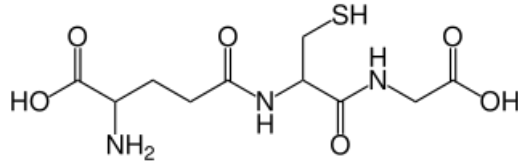
Şekil 1.3. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları (wikipedia)

1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, vücutta serbest radikallerin konsantrasyonunu azaltan, metalleri şelatlayan, lipit peroksidasyonunu önleyen, oksidasyonu önleyen moleküllerdir. Bu özelliklere sahip yiyecekler, serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı kalp-damar hastalıklarını, kanser, katarakt, diyabet gibi hastalıkların önlenmesine yardımcı olur. (Almeida Bezerra 2015) Antioksidan savunma sistemlerinin oksidatif stresi ortadan kaldırma potansiyelleri bulunmaktadır. Endojen antioksidanlar enzim ve enzim olmayan olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzim olanlardan önemlilerine örnek olarak Süperoksiti ($\text{O}_2^{\cdot-}$) detoksifiye eden SOD, hidrojen peroksiti parçalayan CAT, hidrojen peroksit ve glutatyona bağımlı organik peroksiti indirgeyen GSH-Px ve GR verilebilir. (Danabas ve ark 2015)

1.6.1. Glutatyon

Glutatyon (GSH) birçok biyolojik sistemde yaygın olarak bulunan bir moleküldür. Yaşlılıkta, metabolizmada ve çeşitli hastalıklardaki rolünden dolayı GSH'un antioksidan özelliği ele alınmaktadır. GSH'un indirgenmiş formu glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan tripeptid bir yapıya sahiptir. Birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin, GSH'un GSSG indirgenme düzeyi, nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkların bazılarının başlangıç ve ilerlemesi sırasında önemlidir (Lee ve ark 2015).Biyolojik dokularda Glutatyon'un temel olarak redükte formda (GSH) bulunmaktadır. Okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz (GR) enzimi sayesinde kolaylıkla GSH'a dönüşebilir (Hissin ve Hilf 1976). Hücre içindeki düşük molekül ağırlıklı protein olmayan tiollerin en az %90'ını GSH oluşturmaktadır. (Plaa ve Hewitt 1998).



Şekil 1.4. Glutatyon'un kimyasal yapısı

Glutatyon, canlılarda çeşitli kimyasalların biyoaktivasyonu sonucu ortaya çıkan veya moleküler oksijenin metabolize edilmesiyle oluşan hücresel hasarların önlenmesinde rol alan başlıca koruma sistemidir. Çeşitli bileşiklerin ve metabolitlerinin elektrofilik merkezlerini enzimatik ve kimyasal mekanizmalar yoluyla tioeter bağlarına çevirirken aynı zamanda da hidroperoksitlerin glutatyon peroksidaz bağımlı yıkımında kofaktör olarak görev yapmaktadır. GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutarak oksidasyonunu önler. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. % 15-20 oranındaki bir GSH eksikliği, toksik etkilere karşı hücreleri savunmasız

bırakarak hücre hasarı ve ölümüne neden olabilir (Akkuş 1996; Pompella 2002; Aydoğan Kılıç, 2010).

1.6.2. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD; EC1.15.1.1) enzimi süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)'e karşı, vücuttaki temel enzimatik koruyucudur. $O_2^{\cdot-}$ in hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir.

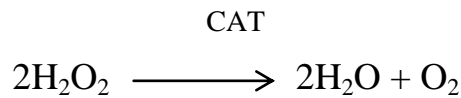


SOD'ın 4 farklı izoformu bulunmaktadır. Cu/Zn SOD ökaryotlarda sitozöl ve nukleusta bulunmaktadır. Fe-SOD ve Mn-SOD hem prokaryot hem de ökaryotlarda mitokondrilerde bulunmaktadır. EC-SOD de hem prokaryot hemde ökaryotlarda ekstraselüler matrikste bulunmaktadır (Whitaker 2002).

Cu/Zn-SOD hücrelerde en fazla bulunan izomer formudur. Yaklaşık 15.600 -16.500 D moleküler ağırlığındaki alt ünitelerden oluşan bir dimerdir. Cu^{+2} iyonu, SOD enzim aktivitesi için şarttır. Zn^{+2} ise Cu^{+2} ile birlikte enzim stabilitesinin sağlanmasında görevlidir (Akkuş 1996).

1.6.3. Katalaz

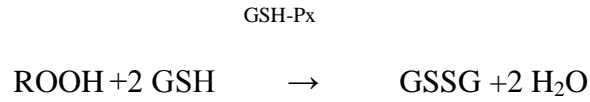
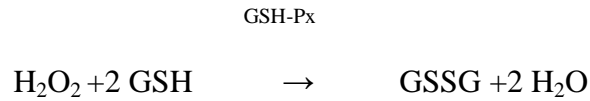
Canlı metabolizma hücrelerinde hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlar böylece hücreler için zararlı olan hidroksil radikalinin oluşumunu engeller. Enzim hücre içinde peroksizomlarda yerleşmiştir ve bir hemoproteindir. Dört tane hem grubu içerir. Ayrıca, katalaz enzimi peroksidatif reaksiyonların oluşturduğu alkoller, formaldehit, formik asit ve fenoller gibi toksik bileşiklerin etkilerini azaltmada da rol oynar.



Bu reaksiyon H_2O_2 konsantrasyonları yükseldiğinde önem kazanırken düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar H_2O_2 'lerin daha az reaktif olan alkollere ve suya parçalanmasını katalizler. Kanda, böbrek ve karaciğerde ayrıca mukoz membranlarda bulunur. Granülomatoz hücreleri solunumsal patlamaya karşı korur (Özyurt, 2014, Geter, 2014).

1.6.4. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9) biyomembranları ve diğer hücrel bileşenleri oksidatif hasara karşı koruyan bir selenoenzimdir. Yaklaşık 85.000 D molekül ağırlığında tetramerik yapıdadır. Sitozölde bulunur ve 4 adet selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



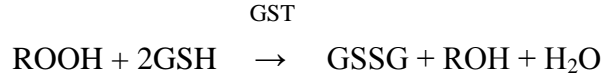
ROOH, H_2O_2 gibi bir hidroperoksit, tert-bütil hidroperoksit, kümene hidroperoksit gibi hidroperoksitlerdir. GSH-Px'ın farklı izoformları hücrel glutasyon peroksidaz (cGSH-Px), fosfolipid hidrojenperoksit glutasyon peroksidaz (PHGSH-Px), plazma glutasyon peroksidaz (pGSG-Px), gastrointestinal glutasyon peroksidaz (gi-GSH-Px)'dir. H_2O_2 dışındaki organik hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen selenyum bağımsız bir izoformu daha mevcuttur. Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH'a dönüşür.



Fagositlerde bulunan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikallerin neden olduğu peroksidasyondan hücreleri korur. GSH-Px eritrositlerdeki oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (Akkuş 1996; Whitaker 2002).

1.6.5. Glutasyon S Transferaz

Glutasyon S transferaz (GST) iki alt birimden oluşan dimerik yapıdan oluşan bir enzimdir. GST'lar araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi ile birlikte antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.(Akkuş 1996)



GST'lar katalitik ve katalitik olmayan bir çok fonksiyona sahiptirler. Detoksifikasyon yaptıkları gibi hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcılık rolleride bulunmaktadır. Katalitik olarak, yabancı maddelerin elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve bu sayede ürünün suda daha fazla çözünür hale gelmesine neden olur. Lipofilik- hidrofobik bir çok bileşiği bağlayarak bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlenir. (Akkuş 1996)

1.7. Asetilkolin esteraz

Asetilkolinesteraz (AChE) sinir sisteminin sağlıklı çalışması için önemli bir enzimdir. AChE sinir ve kas dokusu başta olmak üzere merkezi ve periferel birçok dokuda bulunur. Bu enzim asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini sonlandırmaktadır. 70-80 kDa aralığında kütleyle sahip bir glikoproteindir. AChE fonksiyonunu yerine getiremediğinde, sinaptik aralıklarda asetil kolinin birikmesine ve kas paralize, nöbete ve asfiksiye bağlı olarak ölümün meydana gelmesine neden olur. (Küçükkılınç,2014)

1.8. Oksidatif Strese Bağlı Olarak Meydana Gelen Hücresel Değişiklikler

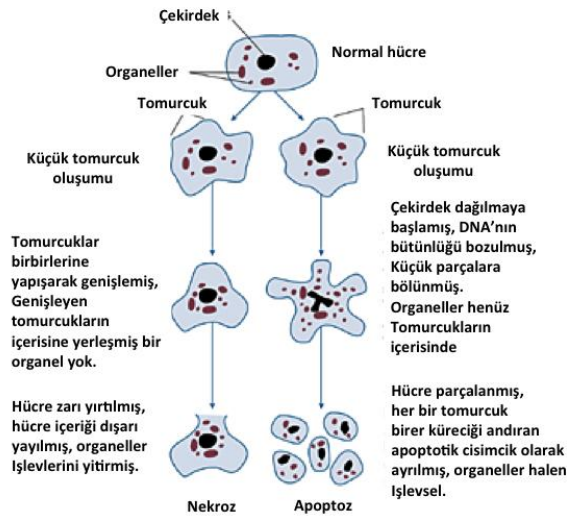
OS'e bağlı olarak gerçekleşen olaylar ve oksidan maddelerin üretimindeki artış GSH seviyesinin yükseltgenmesine, NAD kaybına, DNA kırılmalarına, ATP kaybına ve hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesinde artışa neden olmaktadır. Hücrelerde meydana gelen şişme, hücre zarında balonlaşma gibi değişiklikler, hasarlı ve ölüme gitmekte olan hücrelerin ilk belirtileridir. Hücre zarındaki balonlaşma, hücre içi GSH düzeyi ve Ca^{2+} homeostasisindeki değişikliğe bağlı olarak hücre iskeletinin organizasyonunun bozulmasının bir sonucudur. Buna, mitokondri ve diğer organellerdeki şişme eşlik eder. Sitozölik Ca^{2+} seviyesindeki artış, ağır metaller, organik sülfhidril reaktifleri ve oksidanların varlığında mitokondri zarlarının geçirgenliğinde bozulmaya yol açar. Mitokondri zarlarının geçirgenliğindeki bu bozukluk mitokondriden sitoplazmaya kontrolsüz olarak Ca^{2+} iyonları ve diğer iyonların salınımına yol açmaktadır. Sitoplazmadan mitokondri içine su girişi gerçekleşir ve bu durum mitokondrielerde şişme ile sonuçlanır (Duchen 2000; Plaa ve Hewitt 1998).

Hücreler, çeşitli fiziksel ve patolojik uyarılara maruz kaldıklarında adaptasyonla vücuttaki metabolik işlemlere ve enerji ihtiyaçlarına cevap oluştururlar. Adaptasyon; hücrelerin fonksiyonunda veya morfolojisinde çevre koşullarının etkisiyle oluşan değişiklikleri geri dönüşümlü olarak ayarlayan bir mekanizmadır. Eğer uyarılar ortadan kalkarsa, hücreler normal durumlarına geri dönerler. Karsinojenik kimyasallarla uzun süre uyarılma gibi belirli durumlarda, geri dönüşümlü hücresel değişiklikler geri dönüşümsüz hale gelebilir. Eğer dış uyarı hücrenin uyum kapasitesini aşarsa geri dönüşümsüz hücre hasarları meydana gelir ve sonunda hücre ölümleri oluşur. Oksidatif strese maruz kalan bir hücre ölüme gidebilir (Aydoğan Kılıç, 2010).

Hücre ölümü ile sonuçlanan iki farklı mekanizma "Nekroz" ve "Apoptoz" olaylarıdır. Oksidatif stres bu iki olayın ortaya çıkışında önemli bir rol oynamaktadır. Apoptotik hücre morfolojik olarak özgün bir yapıya sahiptir. Hücre küçülürken, hücre membranı da bütünlüğünü korumaktadır. 'Apoptotik cisimcikler' veya 'tomurcuk' adı verilen yapılar meydana gelir. Apoptotik

cisimcikler membranla kaplıdır. Farklı miktarlarda nükleus veya hücre içi yapılar içermektedir. Apoptotik hücreler ve cisimcikler, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edilirler. Bu nedenle inflamasyon meydana gelmez. Apoptotik hücre DNA'sı internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti boyutunda parçalar oluşturacak şekilde parçalanır. Nekrotik hücrede ise hücre içine sıvı girişi olur. Hücreler şişer ve membran bütünlüğünü kaybeder. Bunun sonucunda hücre içeriği dış ortama salınır ve inflamasyon oluşur. Lizozomal enzimlerin hücre dışına salınımı sonucunda komşu hücreler zarar görebilir. Nekrotik hücre DNA'sı düzensiz olarak parçalanır. (Aldırmaz 2004; Halliwell ve Gutteridge 2007).

Geri dönüşümlü hücre hasarının belirtileri ise hücrelerde şişme (hidrofobik şişme ve dejenerasyon olara da adlandırılır), yağlı değişiklik ve hücre yüzeyindeki balonlaşmalardır. Hücre şişmesi sitoplazmadaki su içeriğinin artmasının bir sonucudur. Hücre büyük, soluk renkli bir sitoplazmaya ve normal olarak lokalize olmuş bir çekirdeğe sahiptir. Bu değişiklik hücre zarındaki hasara bağlı olarak iyonik ve ozmotik dengelerin bozulması sonucunda meydana gelmektedir (Haschek ve Rousseaux 1998). Şekil'de apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki farklılıklar şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki farklılıklar (Wikipedia)

2.MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada uygulanacak tüm deneylerde A.Ü. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun yönergeleri takip edilmiştir. (karar no:2014-15) Deneylerde swiss albino cinsi fareler kullanılmış ve aşağıda özellikleri açıklanan toplam 6 deney grubu üzerinde çalışılmıştır. $AlCl_3$ ve ticari olarak alınan HT(sigma-aldrich) uygulamaları intraperitoneal (i.p.) olarak gerçekleştirilmiştir.

Fareler A.Ü. Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde 19-25 °C sıcaklıkta ve günde 12 saat aydınlatmalı ortamda, pelet yem ile beslenerek 1 hafta süre ile laboratuvar koşullarına alıştırmıştır.

Grup I (Kontrol: %0.9'luk NaCl)

Grup II ($AlCl_3$; bir kez 25mg/kg)

Grup III (HT: bir kez 100 mg/kg)

Grup IV ($AlCl_3$ +HT: sırasıyla bir kez 25 mg/kg ve bir kez 100 mg/kg)

Grup V (HT: 10 mg/kg/gün-7 gün)

Grup VI ($AlCl_3$ +HT: sırasıyla 25 mg/kg bir kez ve 10 mg/kg/gün-7 gün)

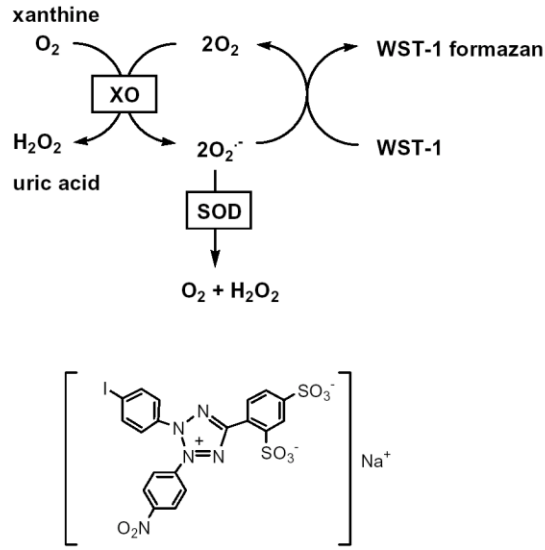
Fareler 80 mg/kg ketamin anestezisinin ardından diseksiyona alınmış, çıkarılan beyin serebral korteks dokusu SCGE veya histolojik doku takibi için işleme alınmış ya da biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotta dondurularak -86 °C de saklanmıştır (Green ve ark., 1981).

2.2. Biyokimyasal Analizler

2.2.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzim aktivitesinin belirlenmesinde Sun ve ark., (1988) metoduna dayalı ticari kit kullanılmıştır.

Prensip:



Şekil 2.1. Süperoksit Dismutaz reaksiyon zinciri

Prensip : WST-1 (2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H tetrazolium, süperoksit anyonu ile indirgendiğinde suda çözünebilen bir formazan boya oluşturur. O_2 'nin süperoksite indirgenme oranı ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğru orantılıdır ve SOD aktivitesi ile inhibe olur. Şekil'de gösterildiği gibi, SOD'ın aktivitesindeki % inhibisyon oranı formazan boyanın ölçümüyle belirlenmektedir.

1 ünite enzim: 37 °C sıcaklıkta ve pH 8.8'de 1 mikromol 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren'in (BXT-01050) 1 dakikadaki otooksidasyonunu sağlayan enzim aktivitesidir.

2.2.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'ya göre belirlenmiştir.

Prensip: GSH-Px ortamdaki H_2O_2 varlığında redükte glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. NADPH ve glutatyon redüktaz bu reaksiyonda oluşan okside glutatyon (GSSG)'u redükte forma çevirirken, redükte formdaki NADPH,

okside forma (NADP⁺) dönüşür. GSH-Px enzim aktivitesi NADPH'nin 340 nm dalga boyunda absorbansta oluşturduğu azalma ölçülerek belirlenmiştir.

1 ünite enzim: 25 °C sıcaklıkta ve pH 7'de H₂O₂ katalizörlüğünde, 1 mikromol redükte glutatyonu okside forma dönüştüren enzim aktivitesidir.

2.2.3. Glutatyon-S-transferaz (GST)

Glutatyon-S-transferaz Enzim Aktivitesi Xie ve ark. (2001) yöntemine dayalı ticari kit kullanılarak belirlenmiştir.

Prensip: 1 kloro-2,4-dinitro benzen (CDNB) ve GSH reaksiyona girerek kromojenik bir bileşik oluşturur. Bu bileşik spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda ölçülerek GST aktivitesi belirlenmiştir

1 ünite enzim: 1 mikromol CDNB-GSH konjugatının 25 °C sıcaklıkta 1 dakika içerisindeki oluşumunu katalizleyen enzim aktivitesidir.

2.2.4. Toplam Glutatyon (GSH)

GSH oranları Tietze (1969) Metoduna dayalı ticari kit kullanılarak belirlenmiştir.

Prensip: Glutatyon redüktaz tarafından redükte hale dönüştürülen glutatyonun DTNB ile reaksiyona girerek oluşturduğu bileşik, spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülerek toplam GSH düzeyi belirlenmiştir.

2.2.5. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Katalaz aktivitesi ölçümü Beers and Sizer (1952) metoduna göre gerçekleştirilmiştir.

Prensip: Hidrojen peroksitin 240 nm ($\epsilon_{240nm} = 40M^{-1} cm^{-1}$) deki dekompozisyonu takip edilerek CAT aktivitesi belirlenmiştir.

2.2.6. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

MDA tayini Ohkawa ve Ohishi (1979) metoduna göre belirlenmiştir.

Prensip: 3 veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu tiobarbitürik asitle ölçülebilen Malondialdehit meydana gelmektedir. Tiobarbitürik asitle malondialdehit spektrofotometrede 532 nm'de ölçülebilen pembe renkli bileşiği meydana getirmektedir.

2.2.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) Aktivitesi Ölçümü

AChE aktivitesi Ellman ve ark. (1961) metoduna göre belirlenmiştir.

Prensip: AChE aktivitesi, tiyokolin ile DTNB arasındaki reaksiyonun sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin verdiği sarı rengin yoğunluğunun, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlenmektedir.

2.3. Tek Hücre Jel Elektrofrez (SCGE) Yöntemi

SCGE için; 0.1 gr beyin dokusu Merchant-EDTA tamponuyla beraber cam tüp içerisinde plastik havan ile ezilmiştir. Ezilen örnekler comet testi için kullanılmıştır. Daha sonra lamalar %1'lik normal agaroz jel ile kaplanarak ve donması beklenmiştir. Daha sonra 8µl örnek ile 73 µl % 0.1'lik düşük erime sıcaklığında agaroz ile karıştırıp, üzeri agaroz ile kaplı lamın üstüne boşaltıp dikkatli bir şekilde lamel kapatılmıştır. Örnekler 5 dakika +4 °C'de bekletildi. Daha sonra lamel çıkarıldı ve örnekler +4 °C'de liziz tamponu (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Örnekler alkali tampon (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) içerisine alındı ve +4 °C'de 40 dakika bekletilmiştir. Sonra tüm örnekler 30 dakika 25 V ve 300

mA'de elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforezden sonra 3 kez 5'er dakika nötralizasyon işlemi yapılmıştır. İşlem sonunda tüm örnekler distile su ile yıkandıktan sonra kurumaları beklenmiştir. Daha sonra tüm preparatlar sybr green ile boyanmıştır. İncelemeler Leica 6000DM floresan mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Her preparattan ortalama 50 hücre sayılmış, comet analizi için BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır.

2.4. Histopatolojik İncelemeler

2.4.1. Doku takibi

Diseksiyonla alınan beyin (serebral korteks) dokusu % 4.5'lük glutaraldehit (pH 7.2-7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır. 1mm³'lük parçalara bölünen dokular tespit solüsyonu (%4 lük glutaraldehit) içerisinde 24 saat boyunca ve + 4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.. Materyal 0.1 M'luk sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Dokular, suyun uzaklaştırılması amacıyla dereceli alkol serilerinden geçirilmiştir. LR white/alkol (%100) (2/1) (v:v) karışımında bekletilmiştir. Dokular 1 gece boyunca saf LR White ile muamele edilmiştir. Gömme işleminin ardından oluşturulan bloklardan ultramikrotom kullanılarak 700 nm kalınlığında kesitler alınmıştır. Toluidin mavisi ile boyama işlemlerinden geçirilen örnekler Leice DM 6000B ışık mikroskobu altında 63X ve 100X'lik büyütmelemlerde histopatolojik olarak incelenmiştir.

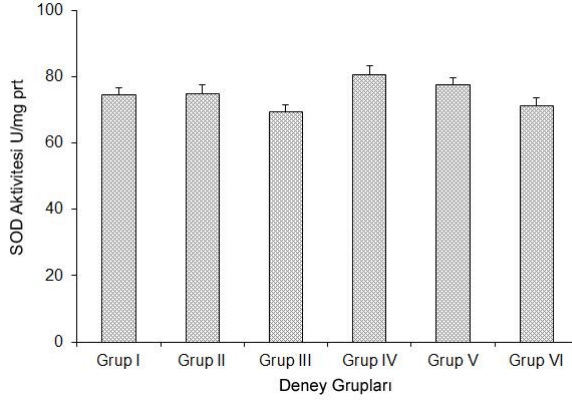
2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için, SPSS Statistics 20 programı kullanılmıştır. Normallik testleri yapıldıktan sonra veriler One Way ANOVA testi ile değerlendirildi. Verilerin ileri analizleri için Post Hoc testlerinden Dunnett T3 testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. p<0,05 olduğunda gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Biyokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi



Şekil 3.1. SOD enzim aktivite grafiği. Levene skoruna göre p:0.436

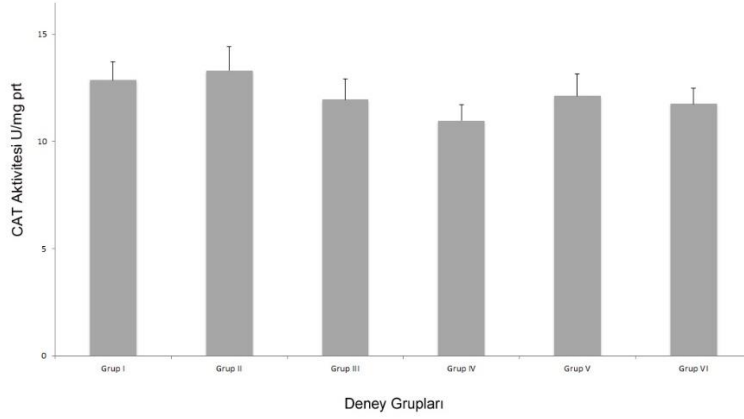
Çizelge 3.1. SOD aktivitesi sonuçları

Deney Grupları	SOD Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	74.57±2.02
Grup II	74.76±2.79
Grup III	69.53±1.96
Grup IV	80.68±2.81
Grup V	77.66±1.96
Grup VI	71.40±2.24

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, SOD aktivitesi açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.1.2. Katalaz (CAT) aktivitesi

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, CAT aktivitesi açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



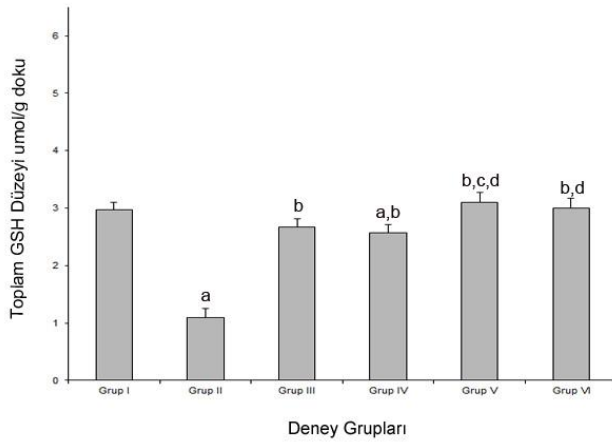
Şekil 3.2. Cat enzim aktivitesi. Levene skoruna göre p:0.499

Çizelge 3.2. Cat aktivitesi sonuçları

Deney Grupları	CAT Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	12.86±0.86
Grup II	13.31±1.12
Grup III	11.95±0.92
Grup IV	10.97±0.72
Grup V	12.12±1.03
Grup VI	11.76±0.73

3.1.3. Toplam Glutasyon (GSH) düzeyi

Toplam GSH, Grup II'de Grup I'e göre anlamlı düzeyde ve dikkat çekici şekilde azalmıştır. Grup II ve Grup IV dışındaki gruplarda ise Grup I'e göre anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Grup IV ve VI kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup IV'daki GSH düzeyinin daha düşük olduğu görülmektedir.

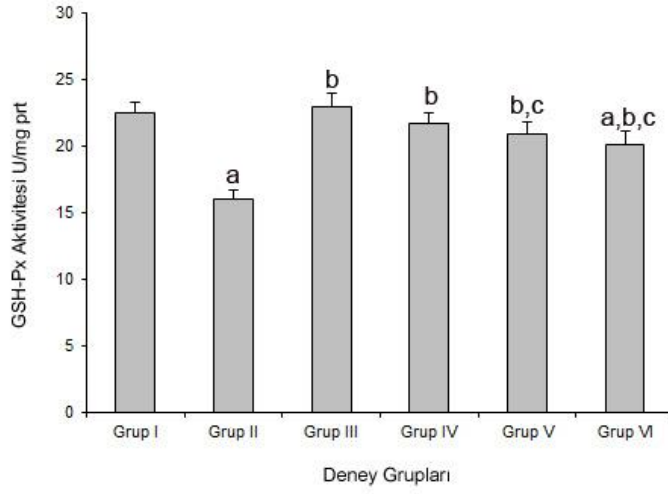


Şekil 3.3. Toplam GSH düzey grafiği: Toplam GSH düzeyi. a. Grup I'e göre; b. GrupII'ye göre; c.. Grup III'e göre; d. Grup IV'e göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.946$

Çizelge 3.3. Toplam GSH düzeyi

Deney Grupları	Toplam Glutasyon (umol/g doku)
Grup I	2.96±0.14
Grup II	1.09±0.16
Grup III	2.67±0.14
Grup IV	2.57±0.13
Grup V	3.10±0.17
Grup VI	2.99±0.18

3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi



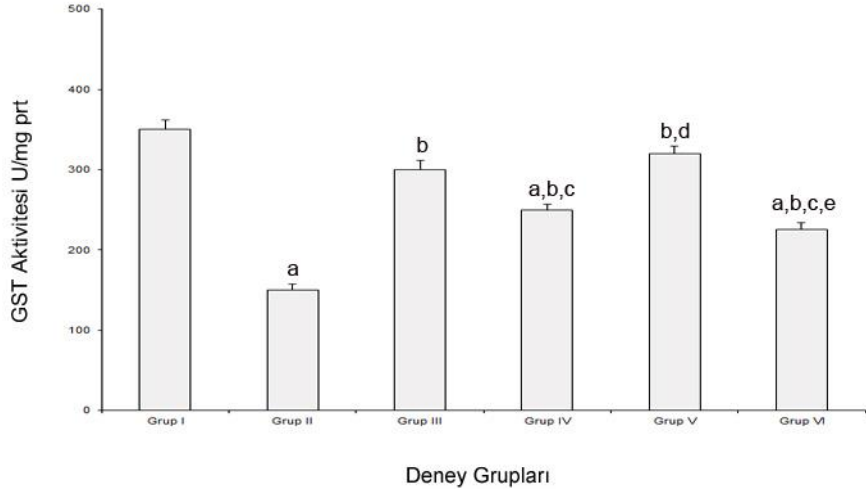
Şekil 3.4. GSH-Px aktivite grafiği a. Grup I'e göre; b. GrupII'ye göre; c.. Grup III'e göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0,972$

Çizelge 3.4. GSH-Px aktivite sonuçları

Deney Grupları	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	22.5±0.84
Grup II	16.0±0.74
Grup III	23.0±0.95
Grup IV	21.70±0.84
Grup V	20.90±0.90
Grup VI	20.10±0.99

GSH-Px aktivitesi Grup II'de Grup I'e ve diğer deney gruplarına göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Diğer deney gruplarında Grup I'e göre anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.1.5. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi



Şekil 3.5. GST aktivite grafiği. a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; c. Grup III'e göre; d. Grup IV'e göre; e. grup V'e göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.384$

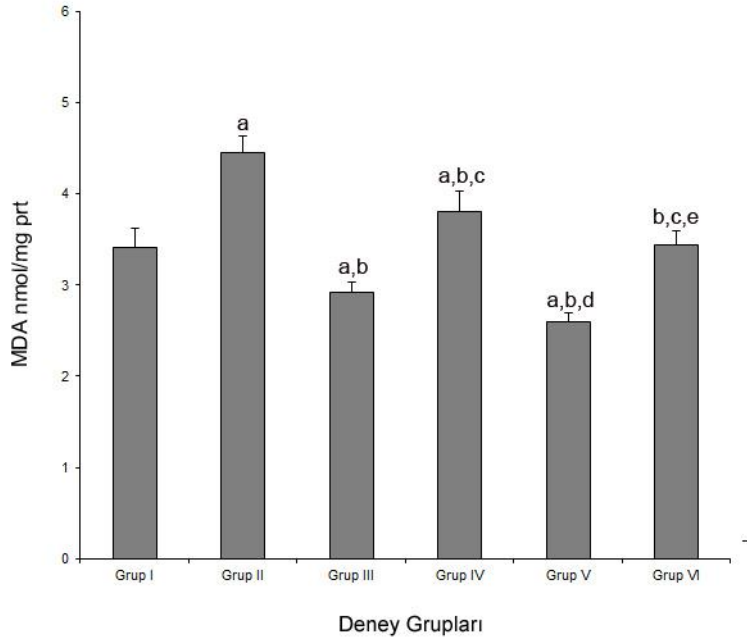
Çizelge 3.5. GST aktivite sonuçları

Deney Grupları	GST Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	350.00±11.46
Grup II	150.00±6.85
Grup III	300.00±10.93
Grup IV	250.00±6.49
Grup V	320.00±9.18
Grup VI	225.00±8.94

GST aktivitesi Grup II, IV ve VI'da Grup I'e göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Ancak Grup IV ve VI'nın GST aktivitesinin Grup II'ye göre anlamlı düzeyde artmış olduğu görülmektedir. Grup II ve Grup V'de ise Grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik görülmemektedir.

3.1.6. Lipid Peroksidasyonu

MDA düzeyi Grup II' de diğer grupların tümüne göre anlamlı düzeyde artmıştır. Grup IV ve Grup VI'da ise Grup II'ye göre azalmıştır. Grup IV ve VI kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup VI'daki MDA düzeyinin daha düşük olduğu görülmektedir.

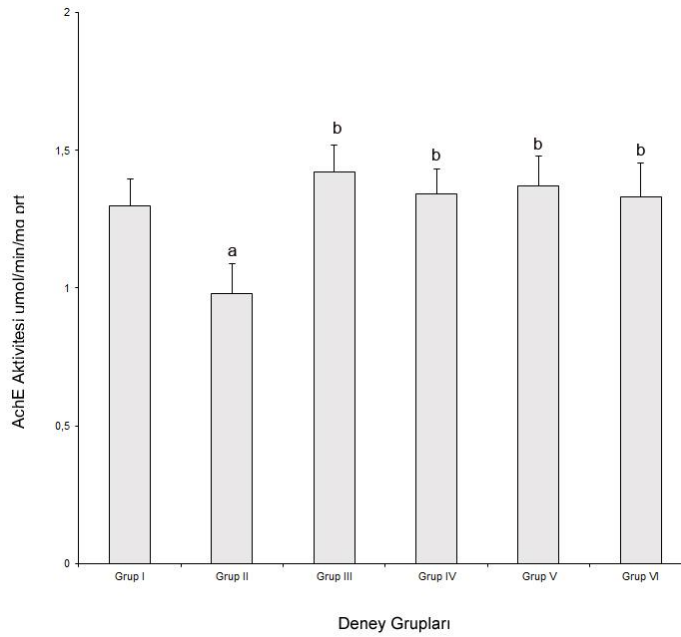


Şekil 3.6. MDA düzey grafiği. a. Grup I'e göre; b. GrupII'ye göre; c.. Grup III'e göre; d. Grup IV'e göre; e. grup V'e göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.125$

Çizelge 3.6. MDA düzey sonuçları

Deney Grupları	MDA (nmol/mg prt)
Grup I	3.41±0.20
Grup II	4.45±0.17
Grup III	2.91±0.11
Grup IV	3.80±0.22
Grup V	2.59±0.09
Grup VI	3.43±0.16

3.1.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi



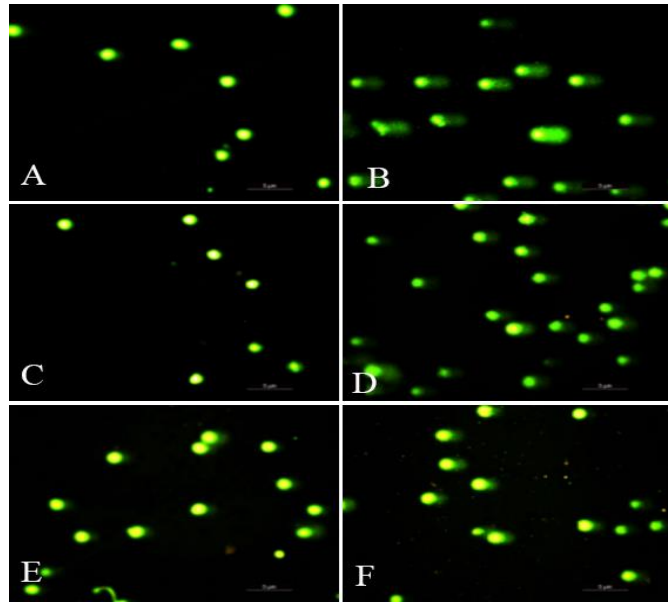
Şekil 3.7. AChE aktivite grafiği. a. Grup I'e göre; b. GrupII'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.846$

Çizelge 3.7. AchE aktivite sonuçları

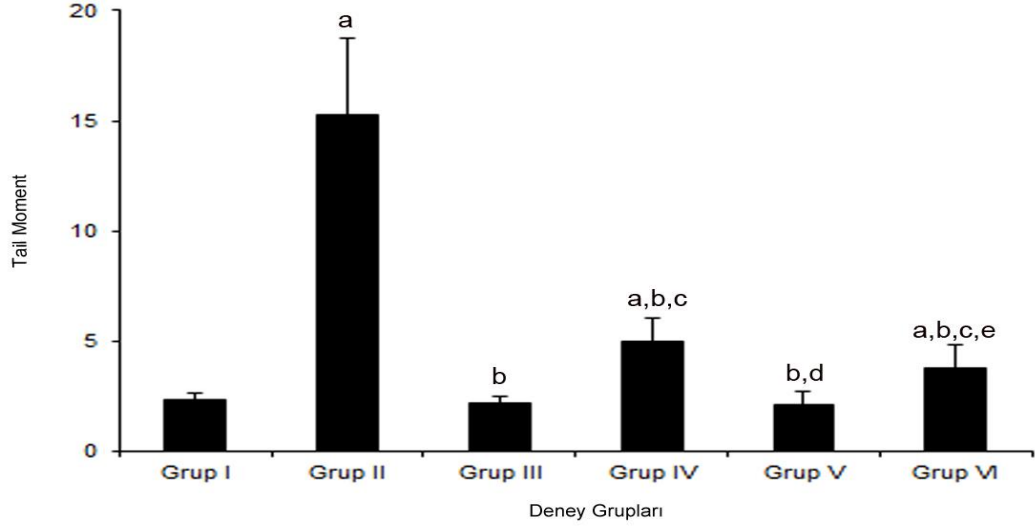
Deney Grupları	AchE Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	1.30±0.095
Grup II	0.98±0.110
Grup III	1.42±0.107
Grup IV	1.34±0.091
Grup V	1.37±0.109
Grup VI	1.33±0.123

AchE Aktivitesi Grup II'de Grup I'e ve tüm diğer deney gruplarına göre azalmıştır. Grup IV ve VI' da ise Grup I ile aynı düzeyde olduğu görülmektedir.

3.2. Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (SCGE) Bulguları



Şekil. 3.8. SCGE Bulguları A) Grup I B) Grup II C) Grup III D) Grup IV E) Grup V F) Grup V



Şekil 3.9. SCGE analiz sonuç grafiği: A) Grup I B) Grup II C) Grup III D) Grup IV E) Grup V F) Grup VI a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; c. Grup III'e göre; d. Grup IV'e göre; e. grup V'e göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.000$

Çizelge 3.8. SCGE analiz sonuçları

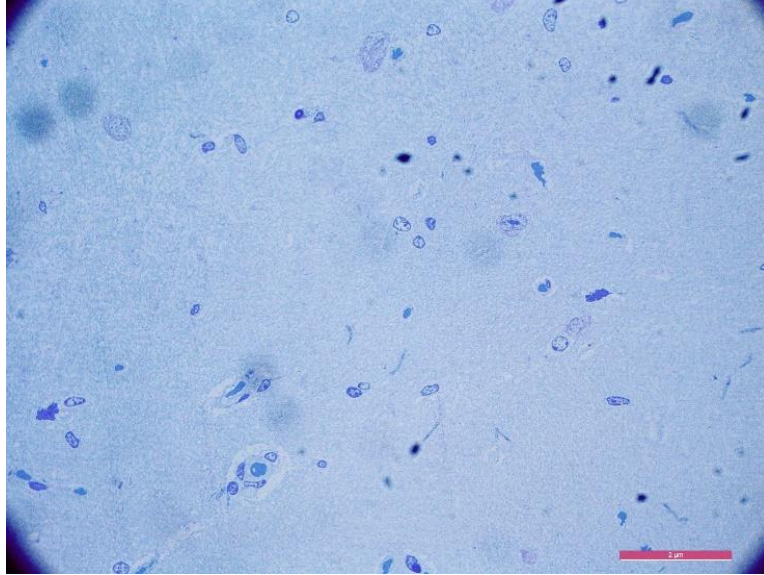
Deney Grupları	Tail Moment
Grup I	2.38±0.27
Grup II	15.26±3.50
Grup III	2.22±0.31
Grup IV	4.97±1.10
Grup V	2.12±0.61
Grup VI	3.76±1.07

SCGE bulgularına göre, DNA hasarı Grup II Grup I e göre istatistiksel açıdan anlamlı ve dikkate değer seviyede artış göstermiştir. Grup IV ve Grup VI'nin, Grup I'e oranla anlamlı seviyede yüksek, Grup II'ye oranla ise oldukça düşük olması dikkati çeken bir diğer bulgudur. SCGE bulgularına göre, Al yüksek

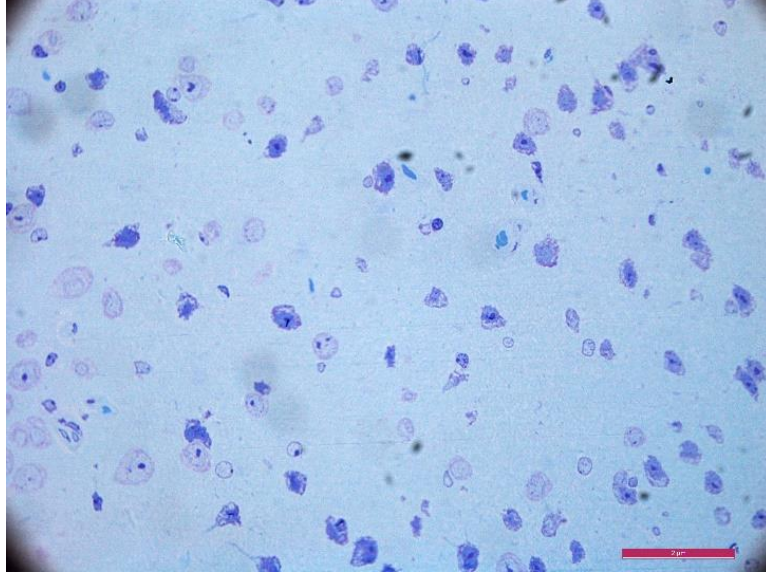
düzeyde DNA hasarı oluşturmaktadır. HT ise bu hasarın azaltılmasında Grup IV ve Grup VI farelerinin tamamında etkilidir.

3.3. Histopatolojik İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

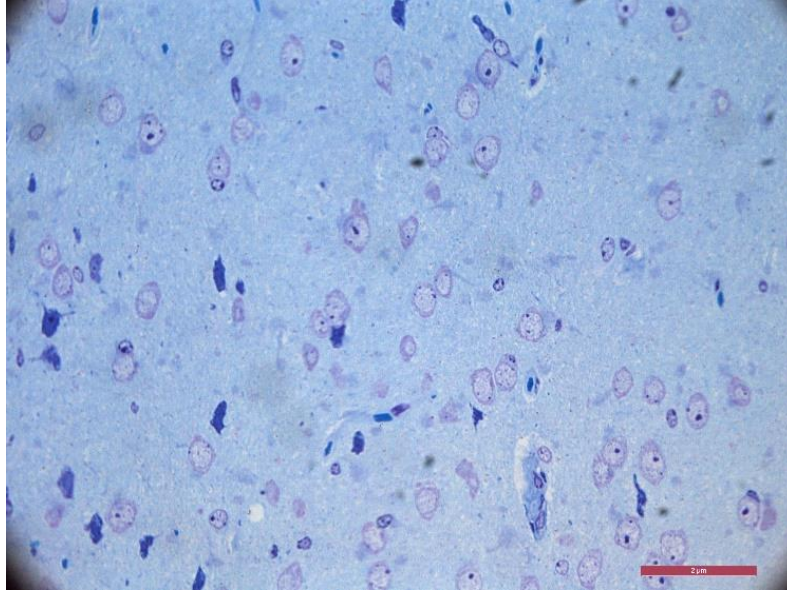
Histopatolojik incelemeler sonucunda Grup II hayvanlarında nöron ve glia hücrelerinde şişme ve vakuolizasyon, hücre membranında parçalanmalar ve hücresel dejenerasyon görülmüştür. Grup IV hayvanlarına hafif bir patoloji gözlenirken, hücrelerde şişme ve az sayıdaki vakuoller göze çarpmaktadır. Diğer grupların histolojisinde Grup I'e göre bir farklılık gözlenmemiştir.



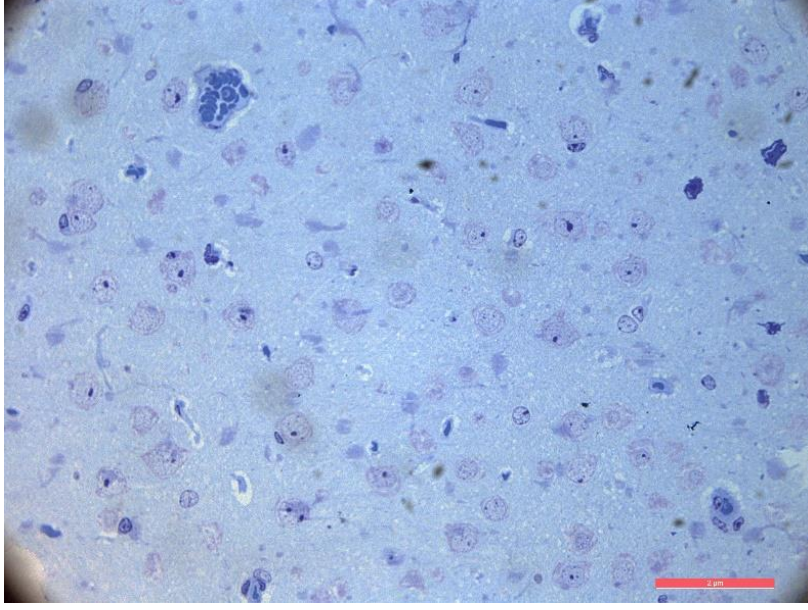
Şekil 3.10. Grup I beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Matriks, nöronlar ve glial hücrelerin normal görünümü



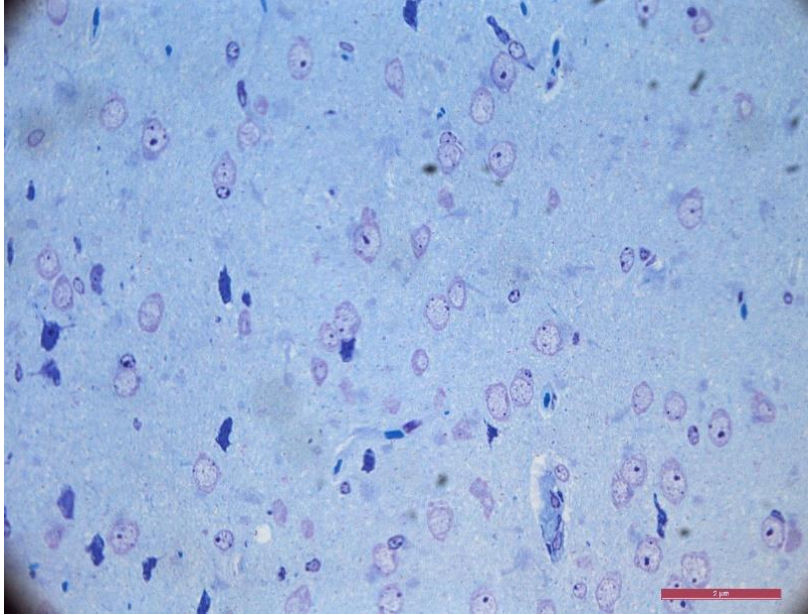
Şekil 3.11. Grup II beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Nöronlar ve glial hücrelerde şişme ve vakuolizasyon, membran hasarı ve hücresel dejenerasyon



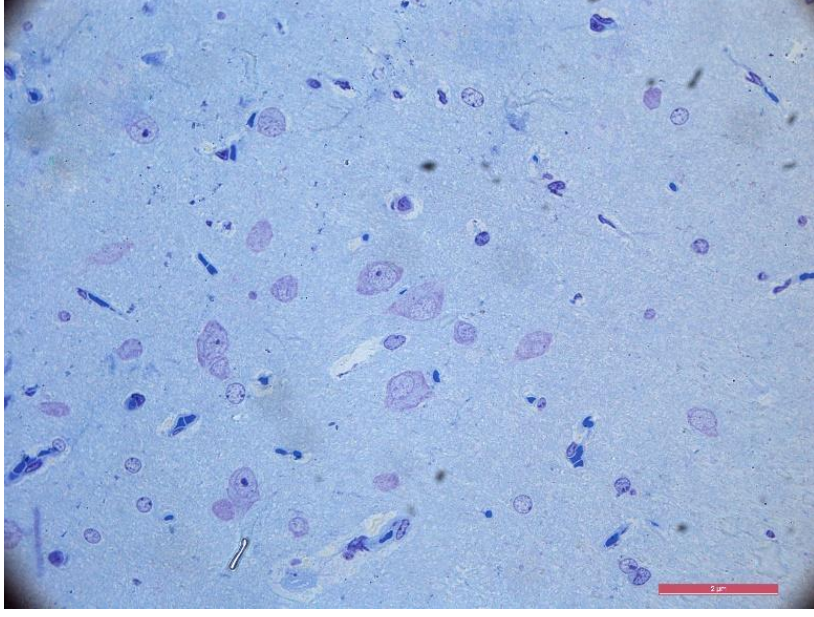
Şekil 3.12. Grup III beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Matriks, nöronlar ve glial hücrelerde herhangi bir patoloji görülmemektedir.



Şekil 3.13. Grup IV beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Nöronlar ve glial hücrelerde hafif düzeyde şişme ve vakuolizasyon



Şekil 3.14. Grup V beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Matriks, nöronlar ve glial hücrelerde herhangi bir patoloji görülmemektedir.



Şekil 3.15. Grup VI beyin (serebral korteks) dokusu (63x): Matriks, nöronlar ve glial hücrelerde herhangi bir patoloji görülmemektedir.

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Al, sinir sistemi ve diğer doku hücrelerinin içinde bir takım süreçlere engel olabilen nörotoksik bir ajandır. Sinir sistemi üzerindeki açıkça gözlenebilen etkileri; Al'a maruz kalan hayvanların motor ve bilişsel davranışlarındaki bozukluklar, yüksek düzeyde Al birikimi olan bireylerin nörodejeneratif hastalıklara yakalanmaya olan yatkınlıkları ve Al'un yüksek düzeyde bulunduğu çevrelerde yaşayan bireylerde görülen sinir sistemi hastalıklarındaki sıklık ile açıklanabilir. Al'un fazlalığı bazı enzimlerin aktivitesini engelleyebilir, lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidatif hasarına sebep olabilir (Berihu ve ark., 2015).

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda Al'un antioksidan sistemler ve LP üzerindeki etkileri başta beyin olmak üzere çeşitli organ ve dokularda ortaya koyulmuştur. El-Sayed ve ark. (2011) farelerde tek doz akut hepatotoksisite çalışmışlar ve oluşan OS'i önlemek için taurine kullanmışlardır. Al karaciğerdeki biyokimyasal enzimlerden GST ve GPx'ın aktivitelerini azaltmıştır. Aynı zamanda hepatositlerde nekroza neden olmuştur. Al toksisitesi ile ilgili yapılan çalışmada Çelik ve arkadaşları (2012) plasmadaki Al içeriğinin, lenfositlerdeki DNA hasarı, plasma protein karbonil içeriği, MDA ve toplam antioksidan kapasite üzerindeki in vivo etkilerini araştırmışlardır. İn vivo olarak Al'a maruz kalan ve kalmayan periferik kan örnekleri toplanarak ölçüm yapılmıştır. Lenfositlerdeki DNA hasarında, plasma MDA ve protein karbonil seviyelerinde Al'a maruz kalan hücrelerde önemli ölçüde yüksek değerler gözlenmiştir. Toplam antioksidan kapasitenin ise kontrol grubuna göre azaldığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda Al toksisitesine maruz bırakılan Grup II ($AlCl_3$: bir kez 25mg/kg) hayvanlarında; toplam GSH düzeyinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, GSH-Px, GST ve AchE aktivitelerinin de Grup I (Kontrol: % 0.9'luk NaCl)'e göre azaldığı görülmektedir. SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre değişiklik olmadığı dikkati çekmektedir. Bu grupta LP'da, DNA hasarında ve beyin dokusundaki patolojik bulgularda ise artış görülmüştür. Çalışmamızda Al toksisitesi ile birlikte HT uygulamasına maruz bırakılan Grup IV ve Grup VI farelerinde Al toksisitesinin etkilerinin önlenilebilir olduğu görülmüştür. Bu gruplardaki deney hayvanlarında toplam GSH düzeyi,

GSH-Px aktivitesi, GST aktivitesi, LP ve AchE aktivitesi, Grup II'ye göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bununla birlikte, 7 gün süre ile düşük doz HT uygulanan Grup VI fareleri Grup IV ile karşılaştırıldığında, toplam GSH düzeyi artmış, LP ve DNA hasarı azalmıştır. Dokularda patolojik bulguya ise her iki grupta da rastlanmamıştır. Bu bulgular, HT'ün düşük dozda ve uzun süreli olarak (10 mg/kg/gün-7 gün) uygulandığında, tek seferdeki yüksek doz (bir kez 100 mg/kg) uygulamaya göre, Al toksisitesinden kaynaklanan nörotoksik etkilerin önlenmesinde daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Toplam GSH düzeyinin Grup II'de dikate değer ölçüde azalmış olması, Grup IV ve Grup VI'da ise tekrar yükselerek Grup I ile yaklaşık olarak aynı seviyede gözlenmesi, HT'ün Al toksisitesinin önlenmesindeki anahtar fonksiyonunun metal şelatlayıcı özelliği olabileceğini ortaya koymaktadır. GSH metal iyonları ile ilişkiye geçebilecek olan, sistenin sülfhidril grupları, glutamil amino, glisil, glutamil karboksil grupları ve iki peptid bağı gibi, toplam altı farklı bağlanma bölgesine sahiptir. Bu gruplar arasında sülfhidril grupları, metal katyonlarına olan yüksek ilgisi nedeniyle önem taşır. GSH- metal kompleksleri spontan olarak oluşur ve kısmi stabiliteye bileşiklerdir (Lushchak., 2012). Bu nedenle GSH dokudaki aktif Al iyonlarının miktarını azaltırken atılımını hızlandırabilir. Çalışmamızda yüksek dozda Al uygulanan Grup II hayvanlarında, GSH-Al kompleksindeki ani artışa bağlı olarak GSH seviyesi azalmıştır. Grup IV ve VI da ise HT uygulaması ile HT-Al komplekslerinin oluştuğu ve HT uygulanan gruplardaki GSH düzeyinin artarak, kontrol grubundakine yakın seviyelerde ifade edildiği görülmektedir. Bu durumun HT'ün Al'u şelatlayıcı özelliğinden kaynaklandığı ve Al'un HT'e karşı olan affinitesinin GSH'a oranla daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Hücrelerdeki DNA hasarı da HT uygulamasına bağlı olarak Grup IV ve Grup VI' da Grup II'ye oranla azalmıştır. Bununla birlikte, bulgular bir bütün olarak göz önüne alındığında, HT'ün Fe ile katalizlenen sekonder ROS oluşumlarının ve AlO_2^{2+} bileşiklerinin reaktif etkilerinin azaltılmasında da rol oynadığı görülmektedir.

Hücrelerde Al toksisitesine bağlı olarak gerçekleşen OS'de özel bir mekanizma rol oynamaktadır. Al'un kendisi red-oks aktif bir metal olmamakla birlikte, in vivo ve in vitro preperasyonlarda prooksidan özellik göstermektedir.

Al, O_2^- radikali ile etkileşime girerek biyolojik dokular için daha reaktif bir radikal molekül olan AlO_2^{2+} yi oluşturmaktadır. Bu durum, O_2^- radikalinin SOD ile katalizlenen H_2O_2 'e dönüşüm reaksiyonunu engellemektedir. Elde ettiğimiz bulgularda Al toksisitesine maruz bırakılan gruplarda SOD ve CAT aktivitelerinde değişiklik olmaması, ancak LP'da anlamlı bir artışla birlikte dokularda patolojik bulgulara ve DNA hasarına rastlanmış olması bu durumla bağlantılı olarak gerçekleşmiştir. Bununla birlikte Al, Fe ile başlatılan reaksiyonlarla LP'nu arttırıcı etki göstermekte, Fe^{+3} ve ROS oluşumunu indüklemektedir. Biyolojik sistemlerde Mg, Ca, Fe gibi fizyolojik fonksiyonu olan metallerle yer değiştirerek hücre membranındaki fosfat gruplarına, DNA ve ATP'ye bağlanabilmektedir.

Dikkate değer bir başka bulgu, Al'un GST enzim aktivitesini azaltmış olduğu yönündedir. GST aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında Grup II, Grup IV ve Grup VI farelerinin tamamında GST aktivitesinin Grup I'e göre azalmış olduğu görülmektedir. Ancak HT uygulaması bu inhibisyonu azaltmaktadır. Bu durum Al'un GST'in aktif merkezi ile ilişkiye geçerek ve fonksiyonel yapısını değiştirerek toksik etki gösterdiğini düşündürmektedir. HT'ün bu inhibisyonu azaltıcı etkisi antioksidan özelliği ile değil, metal şelatlayıcı fonksiyonu ile ilişkilendirilebilir.

Çeşitli çalışmalarda vitamin E, selenyum, taurin, L-theanine gibi antioksidan özellikli maddelerin Al toksisitesinin etkilerini azaltabildiğine dair bulgular rapor edilmiştir. El-Demerdash'ın yaptığı çalışmada (2004), 30 gün süre ile sıçanlara düşük dozda $AlCl_3$ uygulanmış ve Al'un oluşturduğu oksidatif stresin önlenmesi için vitamin E ve selenyum kullanmıştır. Deney sonunda beyin, karaciğer, testis ve böbreklerdeki LP, enzim aktiviteleri ve biyokimyasal parametreler incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, GST aktivitesini azalmış, SH gruplarının seviyesini düşürmüştür. El-Sayed ve ark. (2011) farelerde tek doz akut hepatotoksisite çalışmışlar ve ortaya çıkan OS'i önlemek için taurine kullanmışlardır. Bu çalışmada da Al'un karaciğer GST, GPx ve katalaz aktivitelerini azalttığı ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda hepatositlerde nekroz görülmüştür. Bununla birlikte taurin'in bu etkileri azalttığı rapor edilmiştir.

HT'ün biyolojik sistemlerdeki etkileri de daha önce yapılmış farklı çalışmalara konu olmuştur. Ancak beyin dokusundaki Al toksisitesi üzerinde HT'ün etkilerini OS ve DNA hasarı ile ilişkilendirilerek araştıran bir başka çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Beyinde AchE aktivitesi de önemli derecede azalmıştır. Drira ve ark. (2011) çalışmalarında adiposit hücrelerinin farklılaşması üzerine hidrokstirosol ve oleuropeinin etkilerini araştırmışlardır. Hücreler, oranları 0-150 µmol/L arasında değişen hidrokstirosol ve oleuropein ile 8 gün boyunca muamele edilmiştir. Hücrelerin yaşayabilirliği etkilenmeksizin çoğu adiposit hücrelerinin farklılaşması üzerinde HT ve oleuropein'in inhibe edici etkileri görülmüş, trigliserit birikimini azalttığı, GPDH enzim aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Pereira-Caro ve ark. (2013) çalışmalarında hidrokstirosol (HT) ve hidrokstirosol etil eter (HT-Et) in bağırsaktaki antikanserojen etkilerini karşılaştırılmışlardır. Her iki maddeninde kontrolsüz hücre çoğalmasını baskıladığını, HTy-Et'nin HT'den daha güçlü etki ettiği rapor etmişlerdir (Pereira-Caro G ,2013).

D'Angelo ve ark. (2005) çalışmalarında ultraviyole radyasyona maruz bırakılmış melonom hücrelerinde HT'ün OS ve protein hasarını önleyici etkilerini incelemişlerdir. 365 nmde 7.5 J/cm^2 UV ışınlarına maruz kalan M14 (insan melonom hücreleri) hücreleri HT'ün farklı dozları ile muamele edildiğinde, UV hücre içi proteinlerde OS sonucu meydana gelen hasarı önlemede HT'nin 400 µM'lık konsantrasyonda uygulandığında olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak ele alındığında; HT'ün hem tek seferde ve 100 mg/kg'lık dozda hem de 7 gün süre ile ve 10 mg/kg'lık dozda i.p. olarak uygulandığında, swiss albino cinsi farelerin beyin serebral korteks dokusunda Al toksisitesi nedeniyle ortaya çıkan OS ve DNA hasarını önlemede etkili olduğu görülmüştür. HT'ün bu etkisi, ağırlıklı olarak metal şelatlayıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte Fe katalizörlüğünde ortaya çıkan ROS oluşumlarını etkisiz hale getirdiği ve AlO_2^{2+} 'in radikal özelliğini de baskılayarak hücrede Al toksisitesi nedeniyle meydana gelen LP ve DNA hasarı gibi olayları önleyici etki gösterdiği de ortaya koyulmuştur. 7 gün süre ile 10 mg/kg dozunda yapılan HT uygulaması Al'un toksik etkilerini önlemede seferde yapılan 100 mg/kg dozundaki uygulamaya göre daha güçlü etki göstermiştir.

HT'ün Al toksisitesi üzerindeki etki mekanizmalarının kimyasının daha detaylı olarak aydınlatılabilmesi için, gelecekte çeşitli analitik tekniklerle yapılabilecek *in vitro* çalışmalar, bu çalışmanın bulgularına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkuş İ. (1995), *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, s. 3-10, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aldırmaz, N. (2004), *Kurşun asetatın bir decapoda türü olan Palaemonetes turcorum'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Anonim (2007),
https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxytyrosol#/media/File:Hydroxytyrosol_structure.png
- Anonim (2013),
https://en.wikipedia.org/wiki/Necrosis#/media/File:Structural_changes_of_cells_undergoing_necrosis_or_apoptosis.png
- Anonim (2007),
https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation#/media/File:Lipid_peroxidation.svg
- Aydoğan Kılıç, G.,(2010), *Rat karaciğer hücrelerinde talyum toksisitesinin neden olduğu oksidatif strese karşı metallotioneinlerin etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılması*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Berihu B.A., (2015), "Histological and Functional Effect of Aluminium on Male Reproductive System," *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, Vol. 6 No.8.
- Bhadoria M. (2012), "Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats," *Food and Chemical Toxicology* ; 50: 2487–2495.
- Bharathi, Vasudevaraju P., Govindaraju M., Palanisamy A.P., Sambamurti K., & Rao K.S.J. (2008), "Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration," *Indian J Med Res* 128, pp 545-556.

- Bezerra Almeida M.L., Edelky de Souza Freitas W., Dantas de Morais P. L., Sarmiento J. D. A., Alves R. E. (2015), "Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L.," *Food Chemistry* 192 1078–1082.
- Bihaqi S. W., Sharma M. Singh A. P., Tiwari M. (2009), "Neuroprotective role of *Convolvulus pluricaulis* on aluminium induced neurotoxicity in rat brain," *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 409-415.
- Celik, H., Celik, N., Kocyigit, A., Dikilitas, M. (2012), "The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils Daily," *Clinical Biochemistry*; 45 ,1629-1633.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, V., Tecce, M.T., Landriscina, C. (2002), "Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn in liver of 2q cadmium-intoxicated rats," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133; 625–632.
- Damjanow I. (1996), "*Histopathology, A color Atlas and Textbook*," Williams and Wilkins Maryland, A.B.D.
- Danabas D., Cickikoglu Yildirim N., Yildirim N., Oztufekci Onal A., Uslu G., Unlu E., Danabas S., Ergin C., Tayhan N. (2015), "Changes in antioxidant defense system in gills of *Capoeta umbla* caught from Uzuncayir Dam Lake, Turkey", *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 63, pages 72-79.
- D'Angelo S., Ingrosso D., Migliardi V., Sorrentino A., Donnarumma G., Baroni A., Masella L., Antonietta Tufano M., Zappia M., Galletti P.(2005), "Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells," *Free Radical Biology & Medicine*; 38:908– 919.
- Drira R, Chen S, Sakamoto K. (2011), "Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells," *Life Sciences*; 89 :708–716
- Duchen M.R. (2000), "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death," *Journal of Physiology*; 529; 57-68.

- El-Sayed, W.M., Al-Kahtani, M.A. and Abdel-Moneim, A.M. (2011),
“Prophylactic and therapeutic effects of taurine against aluminum-induced acute hepatotoxicity in mice,” *Journal of Hazardous Materials*. 192: 880-886.
- Exley C. (2007), “The prooxidant activity of aluminium”, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.36, No.3, pp.380-387 Halliwell., B., Gutteridge, J.M.C. ,
“*Free Radicals in Biology and Medicine*,” Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Fernandez-Mar M.I., Mateos R, GarciaParilla M.C.,Puertas B., Cantos-Villar E.(2012), “Bioactive compounds in wine; resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin; a review.” *Food Chem* 130(4):797-813.
- Geter, S. (2014), “Diabetik Anne Bebeklerinde Serum Paraoksonaz Aktivitesi ve Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi”, Uzmanlık Tezi.
- Godoy-Caballero M., Galeano-Díaz T, Isabel Acedo-Valenzuela M. (2012),
“Simple and fast determination of phenolic compounds from different varieties of olive oil by nonaqueous capillary electrophoresis with UV-visible and fluorescence detection,” *J Sep Sci*. 35(24):3529-39. doi: 10.1002/jssc.201200696.
- Göğtepe, S. (2010), “Alüminyum Zehirlenmesinin *Capoeta capoeta capoeta*’nın Serum Proteinleri ve Solungaç Histopatolojisi Üzerine Etkileri”. Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Harsha S.N., Anilakumar K. R. (2013), “Protection against aluminium neurotoxicity: A repertoire of lettuce antioxidants,” *Biomedicine & Aging Pathology* 3 179-184.
- Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. (1998), “Fundamentals of Toxicologic Pathology”, Academic Press, Londra, B.K.
- Hissin, P.J., Hilf, R. (1976), “A fluorometric Method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues” *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.

- Kaizer, R.R., Gutierrez, J.M., Schmatz, R., Spanevello, R.M., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Rocha, J.B.T. (2010), "In vitro and in vivo interactions of aluminum on NTPDase and AChE activities in lymphocytes of rats," *Cellular Immunology* 265, 133-138.
- Kotronoulas, A., Pizarro, N., Serra, A., Robledo, P., Joglar, J., Rubió, L., Hernaéz, A., Tormos, C., Motilva, M.J., Fitó, M., Covas, M.I., Solà, R., Farré, M., Saez, G. and Torrea, R. (2013), "Dose-dependent metabolic disposition of hydroxytyrosol and formation of mercapturates in rats," *Pharmacological Research*.; 77:47-56.
- Kumar, S. (2002), "Aluminium-induced changes in the rat brain serotonin system," *Food and Chemical Toxicology*.; 40:1875–1880.
- Küçükkılınc, T. T. (2014), "Organofosfat zehirlenmelerinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanılma olasılığı," *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*; 39 (2) ; 126–131.
- Lankoff A., Banasik A., Duma A., Ochniak E., Lisowska H., Kuszewski T., Gozdz S., ve Wojcik. (2006), "A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes," *Toxicology Letters*, 161: 27-36.
- Lee P.T., Goncalves L. M., Compton R.G. (2015), "Electrochemical determination of free and total glutathione in human saliva samples," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol:221 pages: 962-968.
- Lima P.D.L., Leite D.S., Vasconcellos M.C., Cavalcanti B.C., Santos R.A., Costa-Lotufo L.V., Pessoa C., Moraes M.O., Burbano R.R. (2007), "Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle," *Food and Chemical Toxicology* ; 45: 1154–1159.
- Lushchak V.I. (2012), "Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions," *Journal of Amino Acids* Volume 2012 ,Article ID 736837, 26.
- Pastacı, N., Bahtiyar, N., Karalük, S., Gönül, R., Or, M.E., Dursun, Ş. Ve Barutçu, Ü.B. (2010), "Köpeklerde Alüminyum Toksikasyonunun Alzheimer Hastalığı Üzerine Etkisi," *Tubav Bilim Dergisi*.; 3(3): 271-275.

- Özyurt, D., (2014), *Florometrik Bir Antioksidan Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Uygulamaları*, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Plaa, G.L. ve Hewitt, W.R.(1998), *“Toxicology of the Liver,”* Taylor and Francis, Washington, A.B.D.
- Pompella, A., (2002), *“Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions”*. IOS Press, Amsterdam, Hollanda.
- Pereira-Caro G, Mateos R., Traka M.H., Bacon J.R., Bongaerts R., Sarriá B., Bravo L., Kroon P.A. (2013), “Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol,” *Food Chemistry*; 138:1172–1182.
- Ramirez-Tortose M.C., Moran-Pulido M., Granados S. Gaforio J.J., QuliesJ.L. (2015), “Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention,” chapter 20, section 2, pages 205-215.
- Sjögren B., Iregren A., Elinder C.G., Yokel R.A., (2007), “Aluminum. Handbook on the Toxicology of Metals” 3E; 17; 339-352.
- Tomasi, A., (2003), *“Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation. Molecular, Biochemical and Clinical Aspects”*. IOS Press, Amsterdam, Hollanda.
- Whitaker, J. R. 2002, *“Handbook of Food Enzymology”*. Marcel Dekker Incorporated, New York, A.B.D.
- Uysal H. Ergene N. Baltacı A.K.,(1990), “Alüminyum ve insan sağlığı” S.Ü. Tıp fakültesi dergisi.; 6(2); 230-237.
- Yuan C., Lee Y. ve Hsu W. G. (2012), “Aluminium overload increases Oxidative stres in four functional brain of neonatal rats,” *Journal of Biomedical Science*.
- Yurdakök K., İnce T. (2008), “Aşı Adjuvanları” *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*,; 51: 225-239.