

**ALÜMİNYUM TOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE
ANTIOKSİDAN BİR ŞELATLAYICI OLARAK
MODİFİYE SİTRUS PEKTİN'İN ETKİLERİ**

Zeynep ELDEM
Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık-2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1406F327**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zeynep ELDEM'in "Alüminyum Toksisitesinin Önlenmesinde Antioksidan Bir Şelatlayıcı Olarak Modifiye Sitrus Pektin'in Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı, **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Doktora 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 ÖNLENMESİNDE ANTIOKSİDAN BİR ŞELATLAYICI OLARAK MODİFİYE SİTRUS PEKTİN'İN ETKİLERİ

Zeynep ELDEM

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç Dr. Volkan KILIÇ
2015, 54 sayfa

Bu çalışmada, Sprague Dawley cinsi ratlarda alüminyum (Al) toksisitesinin neden olduğu nörotoksisite, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, patolojik değişiklikler ve DNA hasarının önlenmesinde modifiye sitrus pektin (MCP)'in antioksidan ve metal şelatlayıcı özellikleri araştırılmıştır. Bir kontrol ve üç deney grubu (n=6) olmak üzere toplam 24 rat üzerinde çalışılmış, deneylerdeki tüm uygulamalar otuz gün süre ile ve oral yolla gerçekleştirilmiştir. Grup I'e (kontrol) fizyolojik salin (% 0.9); Grup II'ye AlCl₂ (34 mg/kg/gün); grup III'e MCP (50 mg/kg/gün); grup IV'e ise sırasıyla ve 2 saat ara ile AlCl₂ (34 mg/kg/gün) ve MCP (50 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Çalışma süresinin sonunda beyin serebral korteks dokusu çıkarılmış ve biyokimyasal ölçümler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, asetilkolin esterase aktiviteleri, toplam glutatyon düzeyi ve lipid peroksidasyonu) ve histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. DNA hasarı 'tek hücre jel elektroforezi (SCGE)' yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular MCP'in özellikle metal şelatlayıcı özelliğine bağlı olarak, rat beyin dokusunda Al toksisitesinin neden olduğu oksidatif stresi, lipid peroksidasyonuna eşlik eden doku hasarını ve nöronal sinyal iletimdeki fonksiyonel bozuklukları azaltabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, MCP uygulaması ile DNA hasarı da azaltılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, Modifiye sitrus pektin, nörotoksisite, oksidatif stres, DNA hasarı

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS of MODIFIED CITRUS PECTIN as an ANTIOXIDANT CHELATOR in PREVENTION of ALUMINIUM TOXICITY

Zeynep ELDEM

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department**

**Supervisor: Assist. Prof. Dr. Volkan KILIÇ
2015, 54 pages**

The present study investigated antioxidant and metal chelating properties of modified citrus pectin (MCP) in prevention of neurotoxicity, oxidative stress, lipid peroxidation, histopathological changes and DNA damage resulted from aluminium (Al) toxicity on Sprague Dawley rats. The study was conducted on a control and three experimental groups with a total number of 24 rats. All applications were carried out orally in a period of 30 days. Group I (control) was administered physiological saline (% 0.9); group II was administered AlCl₂ (34 mg/kg/day); group III was administered MCP (50 mg/kg/day); group IV was administered AlCl₂ (34 mg/kg/day) and MCP (50 mg/kg/day) with 2 hour intervals respectively. At the end of the working period, brain cerebral cortex tissue was excised and used in the biochemical measurements (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and acetylcholin esterase activities, total glutathione level and lipid peroxidation) and histopathological investigations. DNA damage was measured by single cell gel electrophoresis (SCGE) method. The findings manifested that, particularly with its metal chelating effects, MCP can decrease oxidative stress, tissue damage accompanying lipid peroxidation and functional defects in neuronal signaling resulted from Al toxicity. Besides, DNA damage can also be decreased with the application of MCP.

Keywords: Aluminium, modified citrus pectin, neurotoxicity, oxidative stress
DNA damage

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma konusunun seçiminde 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, eğitimim süresince desteklerini eksik etmeyen değerli teyzem Gülben Erden ve ailesine sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Metaller, toksisite ve oksidatif stres	3
1.1.2. Alüminyum	4
1.1.3. Pektin	6
1.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	8
1.2.1. Süperoksit radikali	10
1.2.2. Singlet oksijen.....	11
1.2.3. Hidrojen peroksit	11
1.2.4. Hidroksil radikali	12
1.2.5. Nitrik oksit	13
1.2.6. Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri	15
1.2.6.1. Membran lipidlerine etkileri	16
1.2.6.2. Proteinlere etkileri	18
1.2.6.3. Karbonhidratlara etkileri	19
1.2.6.4. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri	19
1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	20
1.3.1. Enzimatik antioksidanlar	24
1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	24
1.3.1.2. Katalaz.....	25

1.3.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px).....	25
1.3.1.4. Glutatyon Redüktaz (GR)	26
1.3.1.5. Glutatyon S Transferaz (GST)	26
1.3.2. Enzimatik olmayan endojen ve bazı eksojen antioksidanlar	26
1.3.2.1. Glutatyon.....	26
1.3.2.2. Vitaminler	27
1.3.2.3. β Karotenoid.....	28
2. MATERYAL ve METOD	29
2.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması	29
2.2. Biyokimyasal Ölçümler.....	29
2.2.1. Toplam protein düzeylerinin belirlenmesi	29
2.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin belirlenmesi	30
2.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesinin belirlenmesi	30
2.2.4. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü.....	31
2.2.5. Malondialdehit (MDA) tayini ile dokulardaki lipid peroksidasyonunun belirlenmesi.....	31
2.2.6. Toplam Glutatyon seviyelerinin ölçümü	31
2.2.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi ölçümü.....	31
2.3. Histopatolojik İncelemeler	32
2.3.1. Doku örneklerinin tespiti	32
2.3.2. Doku takip işlemleri.....	32
2.4. Moleküler Ölçümler	32
2.4.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi	32
2.5. İstatistiksel Analizler	33
3. BULGULAR	34
3.1. Biyokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular	34
3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi.....	34
3.1.2. Katalaz (CAT) enzim aktivitesi	35
3.1.3. Toplam Glutatyon (GSH) düzeyi.....	36
3.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi.....	37
3.1.5. Glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi	38
3.1.6. Lipid Peroksidasyonu aktivitesi.....	39

3.1.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi.....	40
3.2. Moleküler Ölçümler	41
3.2.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi.....	41
3.3. Histopatolojik Bulgular	43
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1 Alüminyumun kullanım alanları	5
1.2. Pektin polisakkaritinin kimyasal yapısı	6
1.3. Serbest radikal oluşumuna etki eden dış faktörler	10
1.4. Hidroksil radikali ve hücredeki çeşitli moleküllere etkileri	12
1.5. NOS aracılı NO oluşumu	13
1.6. Serbest radikallerin hücre üzerindeki etkileri	16
1.7. Çoklu doymamış yağ asitlerinden malondialdehit oluşumu	17
1.8. Serbest radikallerin hasar oluşturma mekanizmaları	19
1.9. Antioksidanların serbest radikallere etkisi	20
1.10. Antioksidan gruplar ve görevleri	22
1.11. Glutatyon sistemi	27
1.12. C vitaminin kimyasal yapısı.....	28
3.1. SOD aktivitesi sonuçları grafiği.....	34
3.2. Cat aktivitesi sonuçları grafiği	35
3.3. Toplam GSH düzeyi sonuçları grafiği	36
3.4. GSH-Px aktivitesi sonuçları grafiği	37
3.5. GST aktivitesi sonuçları grafiği	38
3.6. Lipid peroksidasyonu sonuç grafiği	39
3.7. AChE aktivitesi	40
3.8. SCGE analizi sonuçları grafiği.....	41
3.9. SCGE yöntemi sonucunda DNA molekülünde tespit edilen hasarın floresan mikroskopik görüntüsü (40x).....	42
3.10. Serebral korteks yarı ince kesitlerinde patolojik değişiklikler (63x)	43
3.11. Serebral korteks yarı ince kesitlerinde patolojik değişiklikler (100x)	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Bazı meyvelerdeki pektik madde oranları	7
1.2. Bazı sebzelerdeki pektik madde oranları	7
1.3. Serbest radikallerin, hücrel moleküller üzerine etkileri.....	14
1.4. Antioksidanların etki şekilleri	21
1.5. Antioksidanların sınıflandırılması.....	23
3.1. SOD aktivitesi sonuçları	34
3.2. Cat aktivitesi sonuçları.....	35
3.3. Toplam GSH düzeyi.....	36
3.4. GSH-Px aktivitesi	37
3.5. GST aktivitesi	38
3.6. Lipid peroksidasyonu	39
3.7. AChE aktivitesi	40
3.8. SCGE analizi sonuçları	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
AChE	: Asetilkolin Esteraz
Al	: Alüminyum
AlCl ₃	: Alüminyum Klorür
ATP	: Adenozin Trifosfat
CAT	: Katalaz
cm	: santimetre
CP	: Sitrus Pektin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
GSSH	: Okside Glutatyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
kg	: kilogram
LP	: Lipid Peroksidasyonu
M	: Molar
MCP	: Modifiye Sitrus Pektin
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
nm	: nanometre
O ₂	: Moleküler Oksijen
OH [·]	: Hidroksil Radikali
OS	: Oksidatif Stres
R [·]	: Serbest Radikal
red-oks	: Oksidasyon - Redüksiyon
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SCGE	: Tek Hücre Jel Elektroforezi

SOD : Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Çevre kirliliği, doğal çevreyi tehdit eden en önemli unsurların başında yer almaktadır. Bu kirliliğin nedenlerinin başında ise hava, su, toprak ve dolayısıyla da flora ve fauna kirliliğine yol açan ağır metaller gelmektedir (Yılmaz, 2013). Günümüzde çok sayıda özellikle de sanayi alanında kullanılan metaller çevrede kirliliğe neden olmaktadır. Bu kirlilikte insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir (Göğtepe, 2010).

Alüminyum (Al) yeryüzünde en çok bulunan ağır metallere biridir ve yer kabuğunun %8'ini oluşturmaktadır. Doğal olarak gıdada toprakta ve suda bulunur (Silva ve ark. 2014, Kaizer ve ark. 2010). Doğal olarak bulunmakla birlikte Al, üretilmiş gıdalarda ve içme suyunun saflaştırılmasında da kullanılmaktadır. Canlının günlük olarak aldığı Al'un yaklaşık % 20'si Al içeren pişirme kaplarından kaynaklanmaktadır. Çeşitli yerlerden alınarak insan vücudunda biriken toplam Al'un ortalama miktarı 30-50 mg arasında değişiklik göstermektedir (Celik ve ark. 2012).

Al yaşamsal olaylar için temel bir element olmamakla birlikte, beyin, kemikler, böbrekler ve kan içeren birçok organ için toksiktir. Al kan-beyin bariyerini aşarak sinir ve bağ dokusu hücrelerinde birikebilir (Harsha ve Anilakumar 2013). Yüksek düzeylerdeki Al'un mikrositik anemi ve kemik bozuklukları gibi patojenik hastalıklar ile alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların artışında bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Ancak birçok genotoksik ve sitotoksik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen etki mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Kaizer ve ark. 2010; Celik ve ark. 2012).

Al'un vücut dokularında birikmesinin hedef organlarda hasara yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sırasıyla karaciğer, böbrek, beyin, kalp, kan ve kemik dokularında depolandığı görülmüştür. Al çeşitli dokularda serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonu yoluyla oksidatif strese (OS) yol açmaktadır (Sarıkaya, 2011). Daha önce yapılmış çeşitli çalışmalarda Al'un nörotoksik etkileri üzerine çok sayıda bulgular mevcuttur (Stacchiotti ve ark., 2007; El-Demerdash, 2004; Flora ve ark., 2003).

Son yıllarda araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda meyvelerin özellikle narenciye ve elma familyalarının içerdiği bol vitamin, çözünebilir şeker, organik asit, potasyum tuzları, flavonoid, polifenol ve pektin içeriklerini keşfederek bunların sağlık açısından olumlu olduklarını belirlemişlerdir (Salman ve ark., 2008).

Sitrus pektin doğada pek çok narenciye meyvesinde özellikle limon, greylift, portakal, elma gibi meyvelerin kabuk ve etli kısmında bulunur. Narenciye meyvelerinin kabuk ve etli kısımlarından alınan sitrus pektin molekülü, laboratuvar ortamında pH ve sıcaklık ayarlarının değiştirilmesi ile küçük-kısa zincirli ve suda çözünebilir polisakkaritlere dönüştürülerek modifiye sitrus pektin (MCP) elde edilir. MCP, kısa, dallanmamış ve galaktozca zengin karbondhidrat zincirleri oldukları için uzun zincirli pektinlere göre bağışıklık sistemi tarafından kolaylıkla emilirler ve vücut tarafından kullanılırlar (Eliaz ve ark. 2008; Guess ve ark. 2003; Glinsky ve ark. 2009; Easa ve ark. 2010).

Pektin ve MCP ile yapılan çalışmaların sonucunda bunların herhangi bir toksisite ve diğer ciddi yan etkileri olmaksızın kanser metastasını ve çoğalmasını engelleyerek, antimitojenik aktivite gösterdiği (Liang, ve ark., 2006) belirlenmekle beraber bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri de gözlemlenmiştir. MCP, kanser gelişimini önleyici etkilerinin yanı sıra etkili bir antioksidan ve ağır metal şelatlayıcıdır (Kang ve ark. 2009; Eliaz ve ark. 2008; Easa ve ark., 2010; Glinsky ve ark., 2009).

Bu çalışmada; subkronik olarak ve düşük dozda alüminyum klorür ($AlCl_3$) verilen sıçanların beyin hücrelerinde oluşturduğu oksidatif stres ve DNA hasarının ticari olarak satın alınan ve *Citrus limon*'dan elde edilen MCP' nin antioksidan ve ağır metal şelatlayıcı özelliğinden yararlanarak iyileştirici özelliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Metaller, toksisite ve oksidatif stres

Metaller; elektrik iletkenlikleri, katyon formları ve temel oksitleri bulunan elementlerdir. Fiziksel özellik bakımından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha fazla olan metaller için ağır metal terimi kullanılmaktadır. Ağır metaller yeryüzünde doğal olarak bulunurlar. Bunlar biyokütlenin her bir parçasında düşük konsantrasyonda olsa bile yer alırlar (Yılmaz 2013; Akman ve ark., 2011). Metallerin organizmalar tarafından alınması ağız, solunum ve deri yolu ile gerçekleşmektedir. Organizmaya alınma şekilleri birikim gösterecekleri dokunun türünü etkilemekte ve dolayısıyla da toksik etkilerinin yol açtığı fizyolojik etkileri de yönlendirmektedir. Ağır metallerin canlıda neden oldukları toksisiteler; kimyasal reaksiyonlar, taşıma sistemleri ve yapı taşları üzerine etkiler, alerjen, kanserojen, mutajen ve spesifik etkiler olarak sıralanabilir (Yılmaz, 2013).

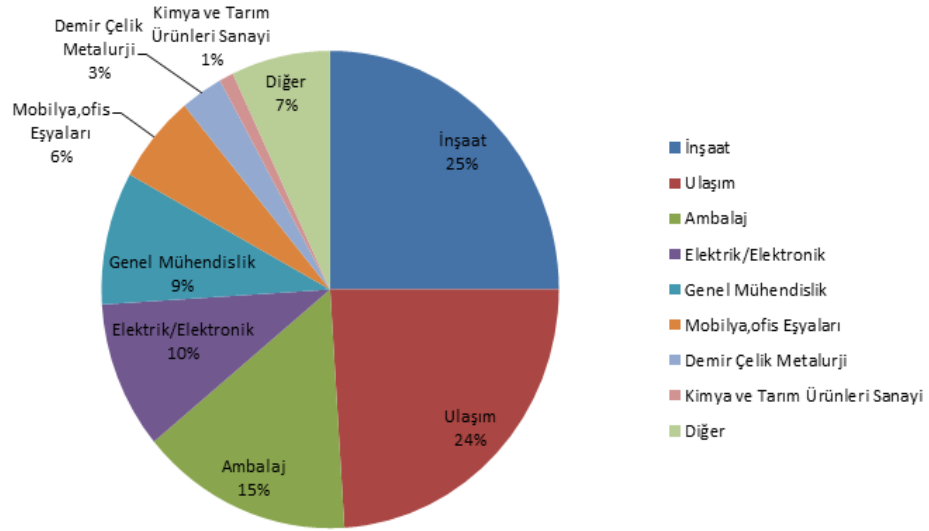
İnsan ve hayvanlar için toksik etki gösteren (El-Sayed, ve ark., 2011) Al elementine maruz kalınma sonucunda ortaya çıkan toksik ve karsinojenik etkiler yapılan birçok çalışmada tanımlanmıştır. Bununla birlikte, çinko, demir, bakır, kobalt, magnezyum ve mangan gibi birçok metalin çeşitli metabolik yollarda ve sinyal iletim mekanizmalarında görev yaptığı bilinmektedir. Metallerin zengin koordinasyon kimyaları ve oksidasyon-redüksiyon (red-oks) özellikleri, bu elementlerin homeostasisi, taşınımı, kompartmanlaşması ve dokusal-hücre sel bileşenlerle etkileşimlerini etkilemektedir. Bu mekanizmaların herhangi birinde ortaya çıkan aksaklıklar metallerin farklı proteinlere bağlanmalarını ve doğal bağlanma bölgelerinin dışında bulunmalarını etkiler. Metallerle ilişkili olarak ortaya çıkan serbest radikaller DNA bazlarında modifikasyonlara, artan lipid peroksidasyonuna, değişen kalsiyum ve sülfidril homeostasisine neden olur. Membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşen lipid peroksidatları, red-oks metalleri ile ilişkiye geçerek toksik ve karsinojenik özellikteki malondialdehit, 4-hidroksinoneal ve diğer ekzosiklik DNA reaktif bileşenleri oluşturur (Valko ve ark., 2007).

1.1.2. Alüminyum

Al elementi periyodik cetvelde 3-A grubunda içerisinde yer alır. Bu elementin atom numarası 13, atom ağırlığı 26.98, yoğunluğu 2.70gr/cm^3 , erime noktası 660.32°C ve kaynama noktası 2519°C 'dir (Göğtepe, 2010). Al, dünya yüzeyinde geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Doğada saf halde bulunmayan bu elementin saf hali suda çözünmemektedir. Suda çözünen formları olan Al tuzları da alüminyum hidroksit ve karbonat şeklinde çöktüğü veya absorbe edildiğinden dolayı akarsularla buldukları yerlerden daha uzaklara taşınmamışlardır. Alüminyum klorür (AlCl_3) ise suda kolayca çözünebilmekte ve kuvvetli asidik korrozif bir özellik göstermektedir (Çolak, 2008).

Al bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilebileceği gibi, çeşitli amaçlar doğrultusunda deneysel yollarla da oluşturulabilmektedir. Yoğun olarak gıda ürünleri ve içme suyunda bulunmaktadır. Al'un en yaygın kullanıldığı alanların başında gıda katkı maddeleri ve diş macunları gelir. Ayrıca mısır, kaşar peyniri, baharatlar, otlar, çay ve kozmetik ürünler Al'un yer aldığı ortamlardır. Tıp alanında ise Al bileşiklerinden asit nötralize edici, aspirin tamponu, fosfat bağlayıcı, böbrek rahatsızlığı olan hastalarda plazmadaki fosfor oranını düşürücü olarak yararlanılmaktadır. (Sarıkaya, 2011). Aşılarda adjuvan olarak yaygın şekilde kullanılan alüminyum tuzları ise alüminyum hidroksit ($\text{Al}(\text{OH})_3$) ve alüminyum fosfat ($\text{Al}(\text{PO})_4$) tuzlarıdır (Yurdakök ve İnce, 2008). Bunlarla birlikte, kozmetik sanayisi ile toksoid ve alerjenlerin hazırlanmasında da Al sıklıkla kullanılmaktadır (Çolak, 2008).

Al bileşikleri hafifliği ve ısıyı iyi iletmesinden dolayı uçak, otomobil ve elektrik sanayinde kullanılmaktadır. Ayrıca çabuk soğuyarak ısıyı emen bir metal olmasından dolayı soğutma sanayinde önemli bir yere sahiptir. Bunların dışında Al spot ışıklarda, mutfak araç ve gereçlerinin yapımında, ambalaj ve cam endüstrisinde, şehir şebeke sularının arıtılmasında folükülasyon ajanı olarak, çeşitli farmosötik preparatların bileşiminde kullanılmaktadır (Şekil 1.1), (Lione, 1985).



Şekil 1.1: Alüminyumun kullanım alanları (Akman ve ark., 2011)

Al absorpsiyonu iki yolla gerçekleşir. Bunlardan ilki solunum yolu ile gerçekleşen emilimdir. Al elementinin kuvvetli bir radyoaktif izotopu bulunmadığından dolayı vücuda solunum yolu ile alınması ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Solunum yolu ile alınan Al dışında vücuda alınan Al'un en önemli kaynağını içme suları ve gıdalar oluşturmaktadır. (Göğtepe, 2010).

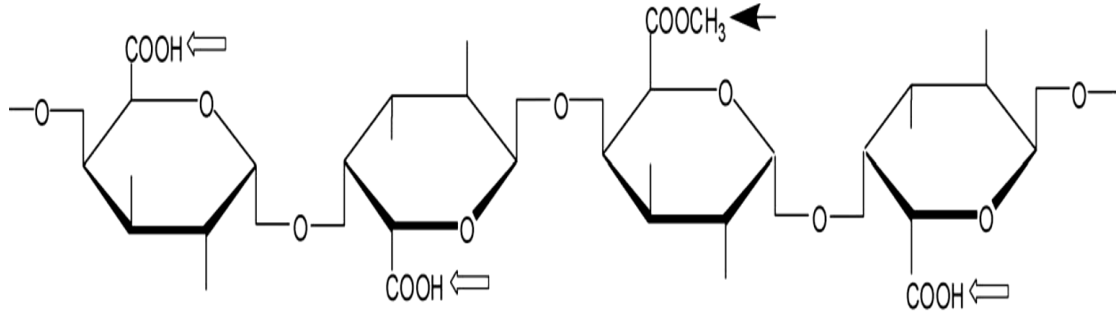
Al'un absorpsiyonun ikinci yolu ise farklı formlarının gastrointestinal emilimdir. $AlCl_3$, alüminyum sitrat ve $Al(OH)_3$ ile yapılan çalışmalarda bunların sıçan mide, ince bağırsak ve kolon dokusunda az miktarda bulunabileceği gözlemlenmiştir. Özellikle alüminyum sülfat ince bağırsak dokularında yüksek absorpsiyon yeteneğinden dolayı hayvan deneylerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sarıkaya, 2011).

Al, insan sağlığını olumsuz olarak etkilemektedir. ATSDR (Toksik Maddeler ve Hastalıkları Ajansı, 2008)'nin açıklamasına göre Al insanlar için potansiyel bir toksik maddedir. Beyin, karaciğer, böbrek, testis, mide, paratroid, bağırsak ve kan dokusu gibi çeşitli doku ve organlarda Al'un toksik etkiye sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bir nörotoksin olan Al, ensefalopati ve Alzheimer hastalığı gibi pek çok sinirsel bozukluklara da yol açmaktadır. Mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte Al toksisitesini Alzheimer hastalığı ile

ilişkilendiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Besinlerle birlikte düşük düzeylerde de olsa kronik olarak Al alınması, insan vücudunun doğal yapısına fazla gelebilmektedir ve kronik olarak Al alınımı kemikte fosfor ve kalsiyum bozukluklarına ve osteomalasi olarak adlandırılan kemik yumuşaması hastalığına yol açmaktadır. Ayrıca, Al'un östrojen gibi önemli hormonların yapısını bozduğu ve kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Sarıkaya, 2011; Lankoff ve ark., 2006; El-Sayed, ve ark., 2011).

1.1.3. Pektin

Pektin, çeşitli sayıda metil ester grupları içeren galakturonik asit polimeridir. Kimyasal yapısı Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Pektin polisakkaritinin kimyasal yapısı (Chien-Ho ve ark., 2006)

Pektinler doğal yüksek moleküller yapıları bileşikler olup bütün yüksek yapıları bitkilerin hücre duvarlarında ve hücre aralarında bulunurlar (Wang, ve ark., 2014). Pektin bitkisel kaynaklı bir stabilizatör olup, her meyve ve sebzede farklı nitelik ve miktarlarda (% 0.5 - % 1.0 düzeyinde) bulunur (Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2) (Yener, 2007; Kar, 1998).

Çizelge 1.1. Bazı meyvelerdeki pektik madde oranları (Yılmaz-Çelik, 2007)

Meyve	Doku	Pektik Madde (%)
Elma	Taze	0.5 - 1.6
Muz	Taze	0.7 - 1.2
Şeftali	Taze	0.1 - 0.9
Çilek	Taze	0.6 - 0.7
Kiraz	Taze	0.2 - 0.5
Armut	Taze	0.9 - 1.4
Portakal	Kuru madde	12.4 - 28.0

Çizelge 1.2. Bazı sebzelerdeki pektik madde oranları (Yılmaz-Çelik, 2007)

Sebze	Doku	Pektik Madde (%)
Patates	Kuru madde	1.8-3.3
Domates	Kuru madde	2.4-4.8
Şeker pancarı	Kuru madde	10.0-30.0

Pektinler alternatif şelatlayıcı potansiyeli göstermektedirler ve sindirim sisteminde toksik metalleri bağlayarak bu metallerin biyolojik birikimini ve emilimini azaltırlar (Eliaz ve ark., 2006). Anyonik özelliğe sahip olan sitrus pektin polisakkariti (CP) ise, omurgadaki bu anyonik yapısından dolayı yüksek jelleştirici etkiye sahiptir. Bu etkisi nedeniyle CP, gıda endüstrisinde jelleştirici olarak tercih edilmektedir (Ataol, 2014).

CP, laboratuvar ortamında pH ve sıcaklık ayarlarının değiştirilmesi ile küçük-kısa zincirli ve suda çözünebilen polisakkaritlere dönüştürülebilir. Bu molekül 'modifiye sitrus pektin' (MCP) olarak adlandırılır. Doğada pek çok narenciye meyvesinde özellikle limon, greyfurt, portakal, elma vb. meyvelerin kabuk ve etli kısmından elde edilebilen MCP, damıtılmış pektin olarak da bilinir (Alternative Medicine Review, Vol. 5, Num. 6, 2000). MCP, galaktoz kalıntıları bakımından oldukça zengindir. In vitro ve in vivo çalışmalarının ikisinde de

MCP'nin bu bol galaktoz kalıntıları sayesinde çeşitli kanser hastalıkları (prostat, kolon, meme, melanoma, çoklu miyelom kanserleri vb.) üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Glinsky, 2008).

MCP'nin, hücre zarında yer alan karbonhidratları bağlayan proteinlere (lektin) tümör hücrelerini yapıştırarak, tümör hücrelerinin normal hücrelere yapışmasını engellediğine inanılmaktadır (Liang, 2006). Kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin dışında, kolesterol değerinin düşürülmesi, sindirim ve bağışıklık sisteminin uyarılması üzerinde de olumlu etkileri vardır. MCP'nin en önemli rollerinden biri de, güvenli ve etkili bir ağır metal (arsenik, civa vb.) şelatlayıcı olmasıdır (Eliaz ve ark., 2006).

1.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller en dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron taşıdıklarından dolayı elektron alışverişi yapabilen (Kumbul, 2007), birçok fizyolojik ve patolojik süreçte oluşturulabilen, düşük moleküler ağırlıklı, kısa ömürlü, kararsız ve oldukça aktif atom ya da moleküller olup organik ve inorganik formlarda bulunurlar (Demirci, 2010). Serbest radikaller molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta ile ifade edilirler (R^{\cdot}). Serbest radikaller bir ya da daha fazla ortaklaşmamış elektrona sahip olmalarından dolayı manyetik bir alana çekilirler. Bu yolla reaktif forma geçerek son yörüngesindeki ortaklanmamış elektronu eşleyebilmek için diğer moleküller ile reaksiyona girme eğiliminde olurlar. Stabil forma geçmeden çok kısa bir süre durabilirler (10^{-9} , 10^{-12} sn) (Gürler, 2012). Aslında serbest radikal denince anlatılmak istenen reaktif oksijen türleri (ROT)'dir. Canlılar için büyük önemi bulunan, vücuttaki tüm hücrelere rahatlıkla girebilen ve vücut tarafından en fazla kullanılma özelliği bulunan Oksijen (O_2) yapısı gereği oldukça reaktiftir.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller O_2 'den meydana gelen radikallerdir. Canlılarda toksik etki gösteren moleküler oksijenin kendisi olmayıp O_2 'in tam olmayan indirgenmesi (kısmi indirgenme) ile meydana gelen oksijen radikalleri toksisiteyi oluşturmaktadırlar.

Vücuttaki sistemler içerisinde oksidatif hasara daha duyarlı olan sistem Santral Sinir Sistemidir. Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Vücuttaki oksijenin %20 sini beyin tarafından kullanmaktadır. Oksijen ürünleri de toksik etki gösterdiklerinden dolayı nöral dokular diğer organlara kıyasla oksidatif hasara daha açıktır.

2. Oksidatif metabolik aktivite hızı beyinde oldukça yüksektir.

3. Beyinde antioksidan enzim seviyelerinin düşük olmasından dolayı oksidatif hasara karşı koyma yeteneği kısıtlıdır.

4. Nöral membran fosfolipidleri, linoleik asit ve araşidonik asit gibi poliansatüre yağ asitlerini yüksek konsantrasyonlarda içerirler. Bu yağ asitleri de kolayca okside olabilmektedirler. (Karakuş, 2011; Demirci, 2010).

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur:

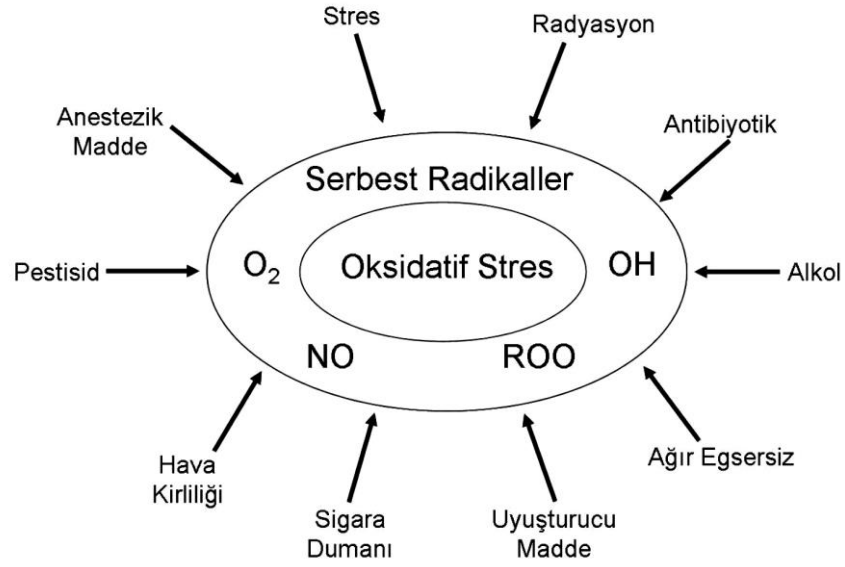
1. Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi,

2. Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında bir ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması,

3. Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi (Akkuş, 1996).

Bu reaksiyonlardan herhangi biri olduğunda, radikal olmayan türler radikal forma geçerler. Serbest radikaller ile serbest radikal olmayan moleküllerin reaksiyona girmeleri sonucunda radikal olmayan formlar serbest radikallere dönüşür ve bunlar hasar zincirini ilerleterek yayılırlar.(Karakuş, 2011).

Serbest radikaller mitokondriyal solunum zinciri gibi aerobik enerji metabolizması ile meydana gelebilecekleri gibi sitoplazmik, lizozomal peroksizomal gibi hücresel olaylar sonucu da meydana gelebilirler. Serbest radikaller endojen kaynaklı oluşabildikleri gibi alkol, hava kirliliği, ağır egzersizler, radyasyon, antibiyotikler, sigara dumanı, uyuşturucu maddeler, pestisidler, anestezipler ve stres gibi dış faktörlerin etkisiyle de oluşabilirler (Şekil 1.3). Al gibi toksik metallerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller, hücrelerin protein, DNA, lipid, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. Bunlar içinde en önemli etkiyi ise lipidler üzerinde göstermektedirler (Sarıkaya, 2011).



Şekil 1.3. Serbest radikal oluşumuna etki eden dış faktörler (Sarıkaya, 2011)

Organizmadaki serbest radikallerin önemli ve büyük kısmı O_2 kaynaklı serbest radikallerdir. Normal koşullarda biyolojik sistemlerde bulunan O_2 'nin büyük bir çoğunluğu aerobik glikoliz ile adenozin trifosfat (ATP) üretmek amacıyla bir dizi reaksiyonla beraber suya indirgenir; ama bu indirgenme işlemleri sırasında aerobik metabolizmayla O_2 , serbest oksijen radikali formuna dönüşür. O_2 'in kısmi indirgenmesiyle beraber, ROT içerisinde yer alan hidroksil (OH) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri meydana gelmektedir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (1O_2) molekülleri de radikal olmayan ROT'dir (Demirci, 2010; Karakuş, 2011).

1.2.1. Süperoksit radikali

Genel olarak tüm aerobik organizmalarda O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur (Demirci, 2010). Ayrıca $O_2^{\cdot-}$ indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile de meydana gelebilmektedir. Organizmada farklı etmenlerle en rahat ve en fazla oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir (Kaya, 2010). $O_2^{\cdot-}$ 'nin diğer radikallere göre reaktivitesi daha azdır ve oluşumlarına sebep olduğu diğer serbest radikallerle

beraber organizmada indükleyici gibi davranırlar (Karakuş, 2011). Süperoksit grubu radikaller asidik pH'da kation, alkali ve nötral pH'da ise anyon formunda bulunur. Bu nedenle, O_2^- vücut sıvılarında süperoksit anyon grubu şeklindedir (Kaya, 2010).

1.2.2. Singlet oksijen

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu bulunmadığından dolayı radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Bu oksijen molekülü serbest radikal reaksiyonları sırasında oluştuğundan dolayı serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına yol açarlar (Akkuş, 1995). O_2 'nin enerji almasıyla meydana gelen ve O_2 'den daha reaktif bir tür olan singlet oksijenin yarı ömrü oldukça kısadır (Karakuş, 2011).

Süperoksit gruplarının meydana getirdiği singlet oksijen, hücre membranındaki yapılarla etkileşime geçerek alkol, aldehit, peroksit hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon moleküllerini oluştururlar (Kaya, 2010).

1.2.3. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), hücre zarından rahatlıkla geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Bu radikal enzimatik yollarla O_2 'in iki elektron alarak indirgenmesiyle veya O_2^- radikallerinin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu sonucunda oluşmaktadır.

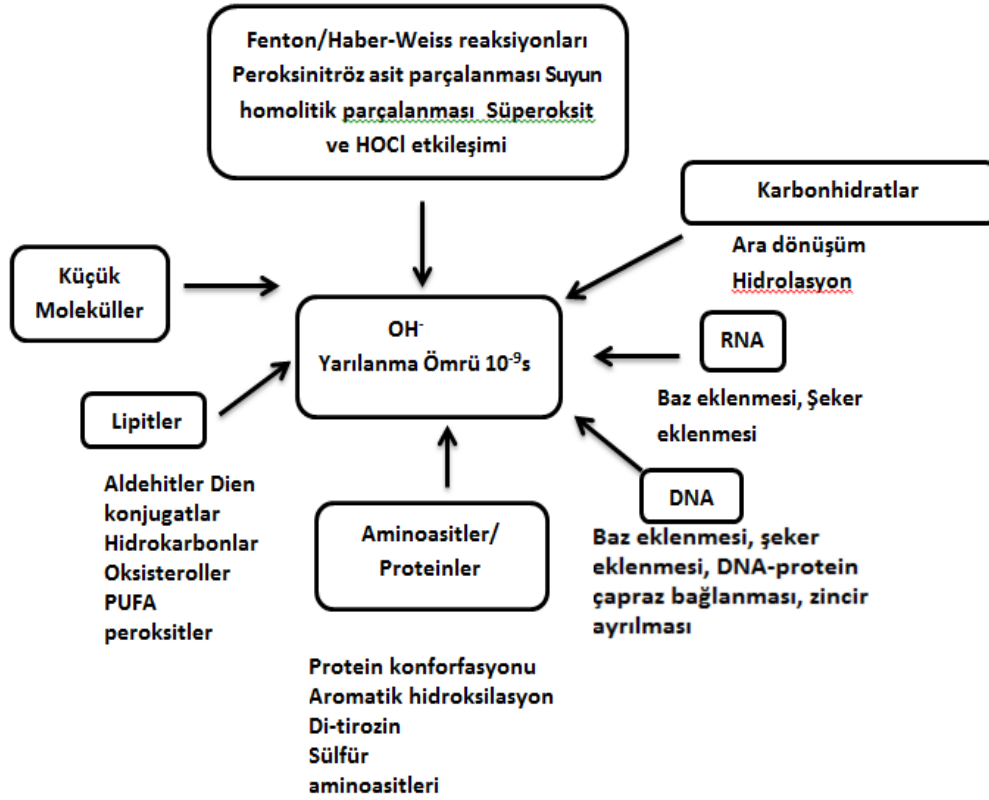
H_2O_2 , serbest radikal içermediğinden dolayı gerçek bir radikal sayılmamaktadır; ama bununla birlikte ROT içerisinde içinde yer alır. Bu radikal serbest radikal biyokimyasında hidroksil radikalini (OH^*) oluşturduğu için çok önemli bir yere sahiptir. H_2O_2 , Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin aracılığıyla Fenton reaksiyonunu; O_2^- 'nin yardımıyla da Haber-Weiss reaksiyonunu gerçekleştirerek en reaktif ve ciddi düzeyde hasar oluşumuna yol açan OH^* 'i oluşturur (Kaya, 2010; Demirci, 2010; Akkuş,1995).

Hücreye çeşitli yollardan giren H_2O_2 , Adenosin trifosfatı (ATP) oranını azaltır ve hücre membranı, DNA, kalsiyum depoları ve mitokondri gibi hedef

yapıların hasarlarına yol açar. Bu radikalin yüksek konsantrasyonları ise hücrenin parçalanmasına sebep olur (Karakuş, 2011).

1.2.4. Hidroksil radikali

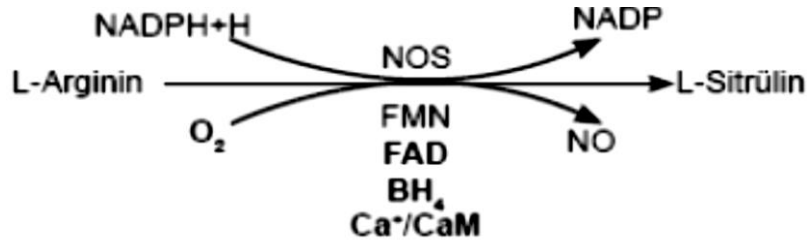
Hidroksil radikali (OH^\cdot), H_2O_2 'in geçiş metallere varlığında indirgenmesiyle (Fenton Reaksiyonu) oluşmaktadır (Akkuş,1995). Radikal reaktivitesinin oldukça yüksek olmasından dolayı hemen hemen bütün biyolojik moleküllerle tepkimeye girebilir. Yarılanma ömrü çok kısa olduğundan dolayı tepkimeye girmeden önce hücreye difüzyonu oldukça zordur. Buna rağmen bu radikalin çok az miktarları bile üretildiği dokularda çok büyük hasarlara yol oluşturabilmektedir (Karakuş, 2011).



Şekil 1.4. Hidroksil radikali ve hücredeki çeşitli moleküllere etkileri (Yılmaz, 2006)

1.2.5. Nitrik oksit

Nitrik oksit, bir nitrojen ve bir oksijen atomu içeren, eşleşmemiş elektronu bulunan, birçok biyokimyasal reaksiyonu etkileyen ve zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen olarak görev yapan bir serbest radikaldir. Bu radikal reseptöre bağımlı olmadan rahatlıkla diffüze olabilen, renksiz, gaz formunda bulunan inorganik bir moleküldür (Nergiz, 2011).



Şekil 1.5. NOS aracılı NO oluşumu (Demirci, 2010)

NO canlı organizmanın beyin yapısında nörotransmitter madde olarak etki gösteren bir moleküldür. Bu molekülün öğrenme, bellek, görme, koklama, sinaptik plastisite ve ağrı algılanmasında çok önemli bir rolü vardır. Aşırı miktarlarda NO sentezlenirse sinir hücrelerinde hasar oluştururlar. O₂⁻'nin NO molekülü ile reaksiyonu sonucunda oluşan peroksinitrit anyonu (ONOO⁻), NO'dan kaynaklanan toksisitenin nedeni olabilir (Paşaoğlu, 2011).

Çizelge 1.3. Serbest radikallerin, hücresel moleküller üzerine etkileri (Akpoyraz ve Durak, 1995)

<i>ETKİLENEN BİLEŞİK</i>	<i>SONUÇLAR</i>
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	a) Protein denaturasyonu b) Çapraz bağlanma c) Enzim inhibitasyonu d) Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik asit bazları	a) Hücre gelişiminde değişimler b) Mutasyon
Karbonhidratlar	a) Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	a) Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	a) Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma b) Askorbat ve porfirin oksidasyon
Antioksidanlar	a) A-tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	a) Denaturasyon b) Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	a) Baz modifikasyonları b) Zincirde kırılmalar
Hyaluronik asit	a) Synovial sıvının vizkozitesinde değişim

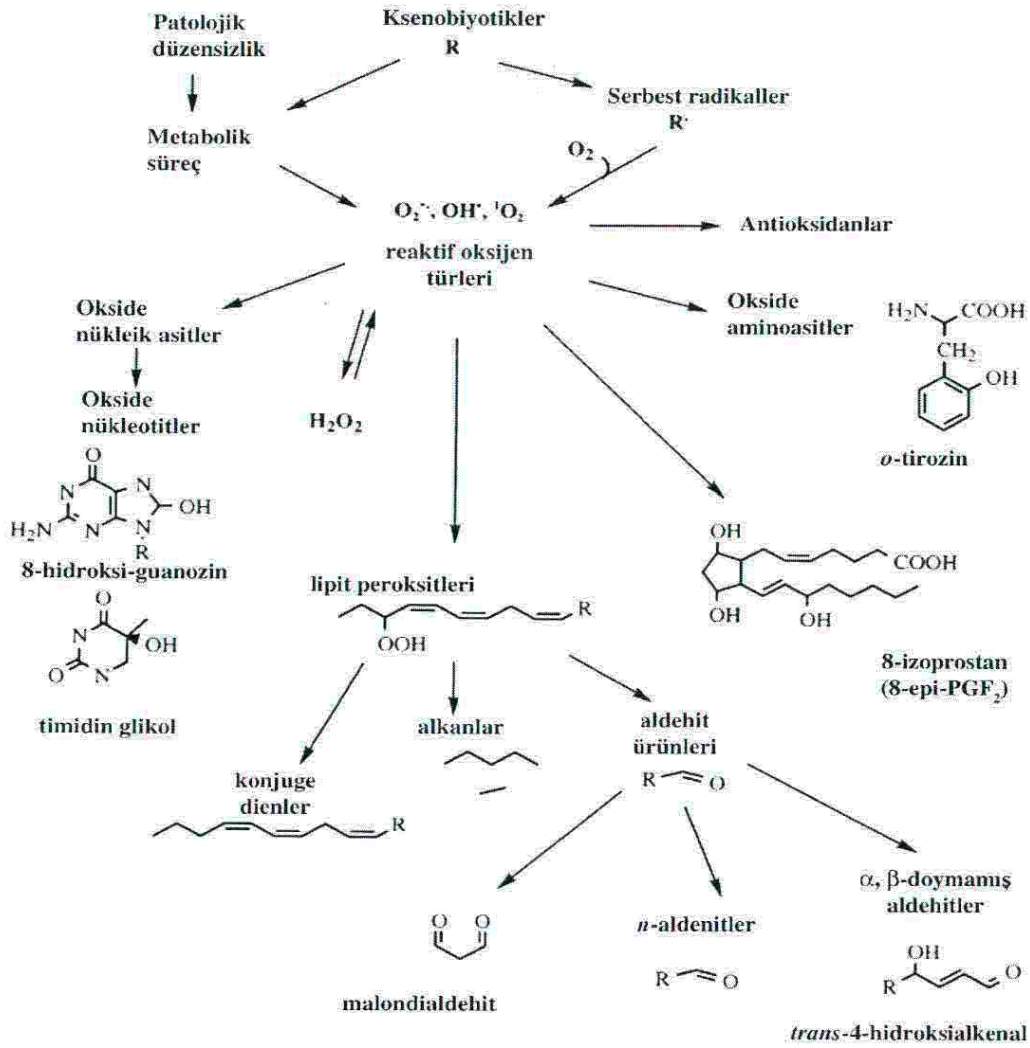
1.2.6. Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri

Serbest oksijen radikalleri canlıda birçok enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Organizmada serbest radikallerin ortaya çıkması ve bunların ortadan kaldırılması bir denge (oksidatif denge) durumundadır. Bu dengenin (prooksidan/antioksidan denge) prooksidanlar (lipid, protein ve nükleik asit gibi hücrenin önemli komponentleri üzerinde oksidatif hasara yol açan ve bu hasardan dolayı da çeşitli hastalıklara ve patolojik olaylara neden olan toksik maddeler) yönünde kayması sonucu oluşan oksidatif stres, hücresel hasara neden olur (Özyurt, 2014).

Serbest radikallerin hücre ve dokularda oluşturduğu zararlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ DNA hasarı,
- ✓ Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- ✓ Protein ve lipitlerle yeni kovalent bağlar oluşması,
- ✓ Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması,
- ✓ Proteinlerin hasar görmesi ve protein yıkımının artması,
- ✓ Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- ✓ Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- ✓ Steroid ve yaşlılık pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
- ✓ Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki bozulma.

Canlıda normal koşullarda serbest radikaller, bağışıklık sistemi hücreleri (nötrofil, makrofaj gibi) tarafından vücudu savunmak amacıyla kullanılsa da, bunların aşırı miktarda üretimi doku hasarına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Kartal, 2013). Bunların meydana gelmesi durumunda, membran lipid ve proteinleri yok olur, hücre zarı sertleşir ve hücre fonksiyonları engellenir; çekirdek zarının bozulması sonucu nükleustaki DNA'da kırılmalar olur ve DNA mutasyonlara açık hale gelerek hücreler ölüme gider (Şekil 1.7.) (Gürler, 2012).

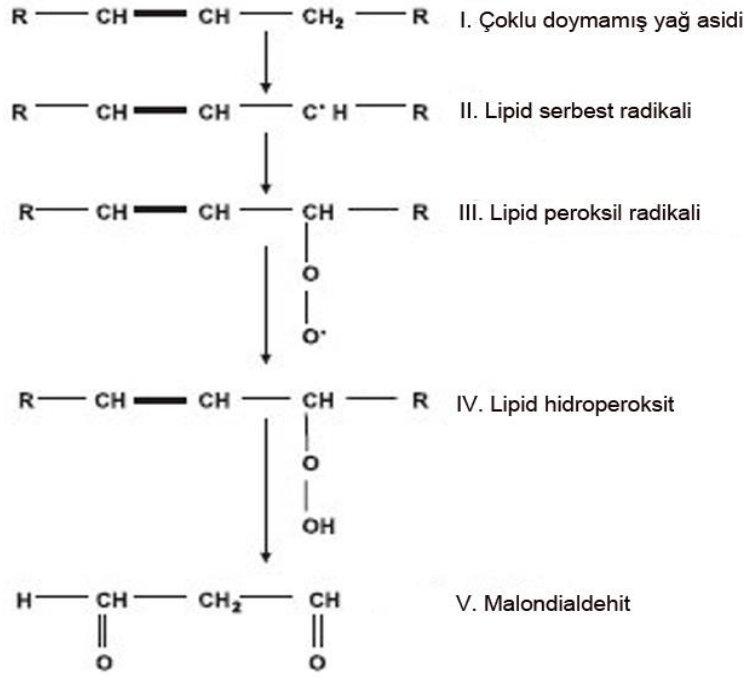


Şekil 1.6. Serbest radikallerin hücre üzerindeki etkileri (Gürler, 2012)

1.2.6.1. Membran lipidlerine etkileri

Hücre membranı serbest radikaller için çok önemli bir bariyerdir, çünkü serbest radikallerin hücre komponentleri ile etkileşime geçebilmeleri için öncelikle bu bariyerin aşılması gerekir (Demirci, 2010). Lipid peroksidasyonu, hücre zarında yer alan poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri aracılığıyla peroksitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri, aldehidler, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılma reaksiyonudur (Karakuş, 2011). Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyona “nonenzimatik lipid peroksidasyonu”

denmektedir. Lipid peroksidasyonu membranda lokalize olan yağ asitlerinin konjuge çift bağlarından hidrojen atomlarının uzaklaştırılması sonucu oluşan lipid radikali ile başlamaktadır. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra ortamda kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı zar geçirgenliğini ve akışkanlığını önemli derecede etkileyebilir (Kaya, 2010). Lipid peroksidasyonu lipid hidroksi peroksitlerinin aldehit ve diğer karbonil ürünlere dönüşümüyle sonlanır. Malonildialdehit ve hidroksinonenal bu ürünlerin en önemlileridir ve bunlar, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler meydana getirirler. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan bileşiklerden biri olan MDA'nın ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi olarak kabul görmektedir (Demirci, 2010).



Şekil 1.7. Çoklu doymamış yağ asitlerinden malondialdehit oluşumu (Grotto, 2009)

Lipid peroksidasyonunun organizmadaki etkileri;

- a) Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının akışkanlığı azalır ve normalde hücre içine giremeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.

- b) Lipid peroksidler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına saldırarak onların protein yapılarını bozar ve bunlarda hasar meydana getirirler.
- c) Lipid peroksidasyonu sırasında aktiviteleri için sülfidril ve amino grubuna ihtiyaç duyan, özellikle de hormonal uyarılara hücrenin cevap verebilmesini sağlayan yüzey reseptörlerini inhibe ederler (G6P-az ve Na-K ATPaz gibi).
- d) Hücre zarına yakın konumda bulunan DNA molekülleri de lipid peroksidasyonu sonucunda hasar görürler ve bundan dolayı zaman zaman DNA'nın replikasyonu yapılamaz.
- e) Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.
- f) MDA gibi aldehitler, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler (Akkuş,1995).

1.2.6.2. Proteinlere etkileri

Protein oksidasyonu, ROT ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyona girmesi sonucunda indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak nitelendirilmektedir ROT'nin üretimine sebep olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna da neden olabilmektedir (Doğan, 2012; Gürler, 2012).

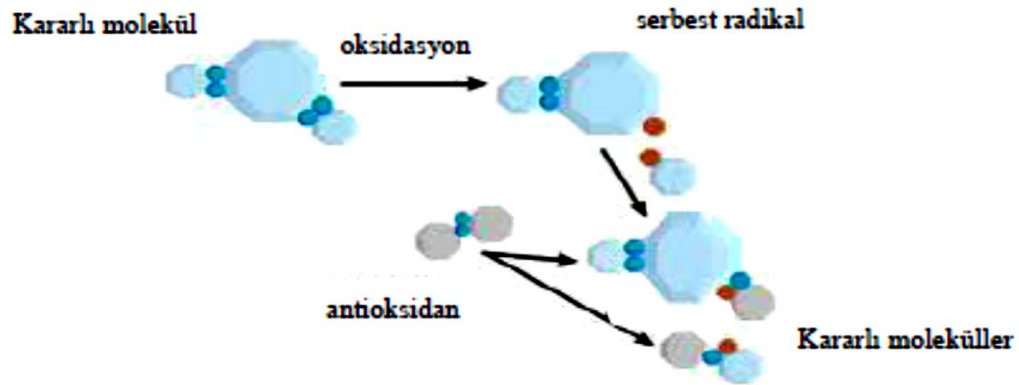
Aminoasit kompozisyonuna bağlı olarak serbest radikaller proteinleri önemli derece etkilerler. Doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı oldukça fazladır. Bununla birlikte sistin, sistein, histidin, metiyonin, triptofan ve trozin içeren proteinler ise oksidanlara karşı en duyarlı olanlarıdır (Yılmaz, 2006). Serbest radikaller immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi yapılarında fazlaca disülfid bağı bulunan proteinlere etki ederek onların tersiyer yapıları bozarlar. Böylece hücreler faaliyetlerini yerine getiremezler. Prolin ve lizin aminoasitleri ROT üreten reaksiyonlara maruz kaldıkları zaman enzimatik olmayan hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler (Altınışık, 2000).

radyasyon aracılığıyla oluşan bu serbest radikaller, DNA'yı etkileme yoluyla hücrede mutasyona ve hatta ölüme sebep olmaktadır. Sitotoksiste, genellikle nükleik asit-baz modifikasyonlarına bağlı kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır (Karakuş, 2011).

1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin canlıdaki zararlı etkilerini önleyebilmek için organizmada antioksidan savunma sistemleri (antioksidanlar) geliştirilmiştir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğu zaman hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik oluşabilmektedir (Akkuş, 1996).

Antioksidanlar, prooksidan üretimini ve lipid oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren, onların toksik olmayan ürünlere dönüştürülmesini sağlayan, hem vücut hücreleri tarafından üretilen hem de gıdalarla alınabilen bir grup kimyasal maddelerdir (Özyurt, 2014).

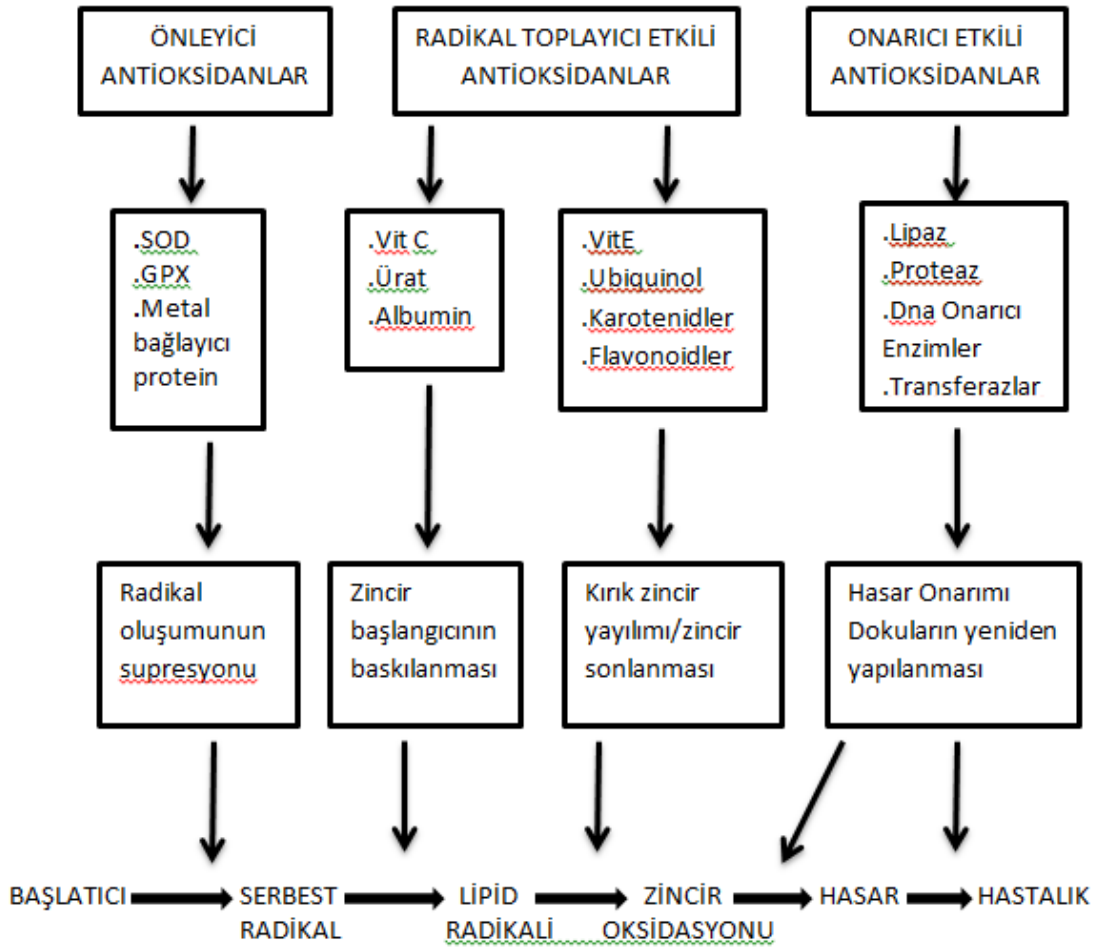


Şekil 1.9. Antioksidanların serbest radikallere etkisi (Sarıkaya, 2011)

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde gösterirler (Çizelge 1.4.).

Çizelge 1.4. Antioksidanların etki şekilleri (Aluç, 2013; Yılmaz, 2006; Karakuş, 2011)

1.Serbest radikal oluşumunun engellenmesi	2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi
a) Reaksiyonu başlatıcı reaktif türevlerinin uzaklaştırılması b) Oksijenin uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması c) Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması	a) Süpürücü etki (scavenging): Antioksidanların serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle dönüştürerek toplayıcı etki göstermesidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterirler. b) Bastırıcı etki (quencher): Antioksidanların serbest oksijen radikalleriyle etkileşime girerek onlara bir hidrojen atomu aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif forma dönüştürerek etki göstermesidir. Vitaminler, flavanoidler bu şekilde bir etkiye sahiptirler. c) Zincir kırıcı etki (chain breaking): Antioksidanların serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırarak onların fonksiyonlarını engelleyici etki göstermesidir. Hemoglobin, seroplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler. d) Onarıcı etki (repair): Antioksidanların serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde gösterdikleri etkidir



Şekil 1.10. Antioksidan gruplar ve görevleri (Akkuş,1995)

Antioksidanlar, endojen (doğal) kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar diye ikiye ayrılır (Çizelge 1.5.) (Akkuş,1995).

Çizelge 1.5. Antioksidanların sınıflandırılması (Akkuş,1995)

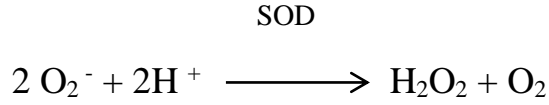
A) Endojen Antioksidanlar	B) Ekzojen Antioksidanlar
1. Enzimler: ✓ Süperoksit dismutaz ✓ Katalaz ✓ Glutasyon-S-transferaz ✓ Glutasyon peroksidaz	1. Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopürinol, aldehit, folik asit, oksipürinol, pterin, tungsten
2. Enzim Olmayanlar: ✓ Lipid fazda bulunanlar: α - tokoferol, β - karoten Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar: Askorbik asit, glutasyon, urat, laktoferrin, bilirubin, sistein, seruloplazmin, albumin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin	2. Soya Fasülyesi İnhibitörleri: Ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
	3. NADPH Oksidaz İnhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar

Canlıda herhangi bir prooksidan ile karşılaşıldığında ilk ve temel olarak enzimatik antioksidan savunma sistemi devreye girer. En önemli enzimatik antioksidanların süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) olduğu bilinmektedir. Bunlardan sonraki savunma ise ekstrasellüler enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından gerçekleştirilir (Sarıkaya, 2011).

1.3.1. Enzimatik antioksidanlar

1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi ilk olarak 1968 yılında Mccord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Bu enzim antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur. Süperoksit radikalının H_2O_2 'e ve O_2 'ne dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir.



SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun hızı, hücrede kendiliğinden gerçekleşen reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. SOD aktivitesi O_2 kullanımının fazla olduğu dokularda daha çoktur. Canlıdaki normal metabolizma faaliyetleri sırasında hücreler tarafından yüksek oranda oluşturulan O_2^- SOD enzimi yardımıyla hücre içi konsantrasyonu düşürülerek denge sağlanır. SOD enzimin hücre dışı aktivitesi ise oldukça düşüktür (Akkuş, 1995).

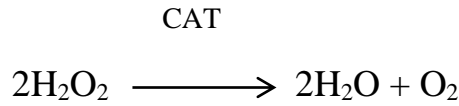
SOD enzimi hücreleri radikallere karşı koruyan ilk antioksidan savunma mekanizmasıdır. Bu enzimin katalizlediği tepkimeler sonucunda oluşan ürünlerin birikimi ise katalaz enzimi tarafından engellenmektedir. Normal koşullarda metabolik faaliyetler sırasında O_2 radikalının oluşumu oldukça fazladır. SOD enzimi O_2^- 'nin hücre içi yoğunluğunu düşük seviyelerde tutarak O_2 seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri O_2^- 'nin etkilerinden korur. Böylece hücrelerdeki lipid peroksidasyonu da engellenmiş olur (Demirci, 2010).

SOD enziminin katalizlediği reaksiyon sonucunda O_2^- daha stabil olan H_2O_2 'e dönüşür. Bu da SOD enziminin bir prooksidan özellik kazanmasına neden olur; çünkü H_2O_2 etkin bir şekilde hücreden temizlenmez ise, daha reaktif bir radikal olan OH^- dönüşür. H_2O_2 'in etkili bir şekilde ortadan kaldırılması, katalaz ve Glutasyon Peroksidaz enzimlerinin H_2O_2 'i zararsız bir ürün olan suya dönüştürmesiyle gerçekleşir. Katalaz enzimi katalizlediği reaksiyonda substrat

olarak sadece H₂O₂'i kullanır. Glutasyon Peroksidaz enzimi ise H₂O₂ 'den başka peroksitleri de substrat olarak kullanabilir (Gürler, 2012).

1.3.1.2. Katalaz

Katalaz enzimi canlı metabolizma hücrelerinde H₂O₂'nin O₂ ve suya parçalanmasını kataliz eder. Bu sayede hücreler için oldukça zararlı olan OH⁻ oluşumu engellenir. Dört tane hem grubu içeren ve bir hemoprotein olan bu enzim hücrenin peroksisomlarında lokalizedir. Katalaz enzimi H₂O₂ reaksiyonunu kataliz etmenin dışında peroksidatif reaksiyonların meydana getirdiği alkoller, formik asit, formaldehit, ve fenoller gibi toksik bileşiklerin zararlı etkilerinin azaltılmasında da rol oynar.

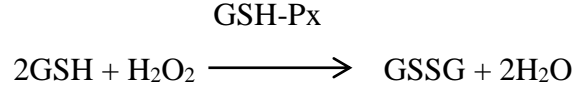


Bu reaksiyon H₂O₂ konsantrasyonları hücrede arttığı zaman önem kazanırken düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar H₂O₂'lerin daha az reaktif olan alkollere ve suya parçalanmasını kataliz ederler. CAT, kanda, böbrekte karaciğerde ve mukoz membranlarda bulunur. Ayrıca granülomatoz hücrelerini solunumsal patlamalara karşı korur (Özyurt, 2014; Geter, 2014).

1.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

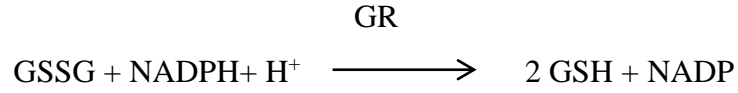
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), pek çok hücrenin sitoplazma ve mitokondrilerinde bulunan ve hücrelerde oluşan H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında rol oynayan önemli bir enzimdir. Enzim yaklaşık olarak 85000 Dalton moleküler ağırlığa sahiptir. GSH-Px enzimi, enzimatik bir reaksiyonu kataliz edebilmek için selenyum elementine kofaktör olarak ihtiyaç duyar. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen GSH-Px hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüştürmektedir. Glutasyon peroksidaz glutasyonu hidrojen donör olarak kullanarak H₂O₂ elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı

organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücrel membranları korumaya yarar (Akkuş,1995; Geter, 2014; Güngör, 2014).



1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

H₂O₂ indirgenmesi esnasında GSH oksitlenir. Glutasyon peroksidazın fonksiyonunun devamlılığı için okside glutasyon tekrar indirgenmelidir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir (Geter, 2014).



1.3.1.5. Glutasyon S Transferaz (GST)

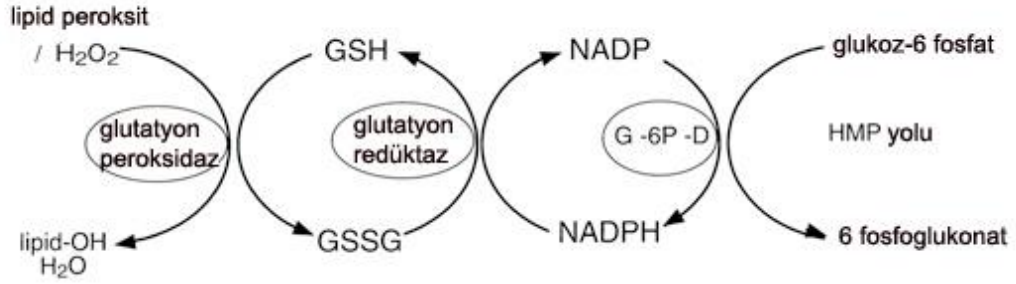
Endojen ve ekzojen kaynaklı olan Glutasyon S-transferazlar (GST), Faz II detoksifikasyonu enzim ailesinin bir üyesidir. GST'ler elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile bağlanmasını sağlayarak bu bileşikleri suda çözülebilir forma dönüştürüp vücuttan daha kolay atılımını ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü kataliz ederler (Akkuş, 1995).

1.3.2. Enzimatik olmayan endojen ve bazı ekzojen antioksidanlar

1.3.2.1. Glutasyon

Glutasyon; düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Bu antioksidan suda çözülebilir olup karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duymadan glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden doğal olarak sentezlenen ama protein olmayan bir tiyol bileşigidir. Hücrede en çok bulunan bileşiktir. Tüm hayvan hücrelerinde bulunan GSH, indirgenmiş formda sitozolde sentezlenir, ancak mitokondri ve nükleusta da az miktarda bulunmaktadır. GSH sentezinde kullanılan sisteinin kaynağı N-asetilsisteindir. GSH'dan kaynaklanan glutatyon radikali (GS⁻) bir prooksidandır. Ancak iki GS⁻ birleşerek okside glutatyonu (GSSG) oluştururlar bu da GSH

redüktaz tarafından GSH'ya indirgenir. Doğrudan veya dolaylı yollarla reaktif oksijen türlerini temizler. Hücrel oksidasyon-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan tiyol proteinleriyle etkileşime girer (Sarıkaya, 2011; Kıbrıslıoğlu, 2013; Geter, 2014; Doğan, 2014).

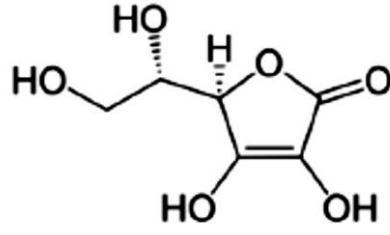


Şekil 1.11. Glutasyon sistemi (Rahman ve MacNee, 1999)

1.3.2.2. Vitaminler

E vitamini yağda çözünebilen vitaminler grubunun önemli bir üyesi olup, tokoferol ve tokotrienol türevlerini içeren bir vitamindir. Dokularda mitokondri ve mikrozom gibi hücrel yapılarda bulunur. Oldukça güçlü bir antioksidandır. E vitamini hücre zarında lokalize olan fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal saldırılarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. α -Tokoferol vitamin E türevleri içerisinde en aktif bileşik olup, yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır (Akkuş, 1995; Geter, 2014; Aluç, 2013).

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu vitamin olan C vitamini (şekil 1.12.) suda çözünebilen, bitkilerin kloroplastlarında ve hayvanların karaciğer veya böbreklerinde glikozdan sentezlenen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Askorbik asit türevleri metabolizma için önemlidir. İnsan, glukozu C vitaminine dönüştüren enzimden yoksundur. Birçok meyve ve sebze bol miktarda bulunur (Kıbrıslıoğlu, 2013; Güngör, 2014).



Şekil 1.12. C vitamininin kimyasal yapısı (Güngör, 2014)

Askorbik asit, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu elektron vererek durdurur ve serbest radikalleri hücre membranına varmadan etkisiz hale getirir. Süperoksit, hidroperoksit radikalleri ve singlet oksijen ile peroksinitrit, nitrojen dioksit ve nitroksit radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir. Paradoksik olarak C vitamini in vitro koşullarda bir prooksidan gibi davranabilir. C vitamininin demir ve bakır ile birlikteliği lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif modifikasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır (Geter, 2014; Güngör, 2014).

1.3.2.3. β Karotenoid

A vitamininin metabolik bir ön maddesi olan ve yağda çözünen bir antioksidan olan beta karoten son derece güçlü bir oksijen temizleyicisidir. Serbest radikalleri doğrudan yakalayabilir. Ayrıca, bu antioksidan zincir kırıcı bir etkiye sahip olup de peroksit radikallerini oluşumunu engellerler (Geter, 2014).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada uygulanacak tüm deneylerde A.Ü. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun yönergeleri takip edilmiştir (Karar no:2014-14). Çalışmada 1 kontrol ve 3 deney grubu (n=6) bulunmaktadır.

Grup I: Kontrol; Grup II: AlCl₃; Grup III: MCP; Grup IV: AlCl₃+MCP

Sprague Dawley cinsi ratlar 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 alıştırılmıştır. Alüminyum klorür 34 mg/kg olarak 2 ve 4. Gruplara 30 gün boyunca oral olarak uygulanmıştır (Türkez, ve ark., 2010; Sarıkaya, 2011; Bommavaram ve ark., 2013, Harsha ve Anilakumar, 2013; Çolak, 2008). Alüminyum uygulanmasıyla beraber oral olarak ticari olarak satın alınan ve *Citrus limon* 'dan elde edilen Modifiye Sitrus Pektin (50 mg/kg/gün) (Khramova ve ark., 2009) 30 gün uygulanmıştır.

30 günün sonunda sıçanlar 80 mg/kg ketamin anestezisinin ardından diseksiyona alınarak, diseksiyonla alınan beyin örneklerinin bir kısmı SCGE veya histolojik doku takibi işlemleri için kullanıldı. Kalan kısımlar ise biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotta dondurularak -86 °C de saklanmıştır (Green ve ark., 1981). Analizlerin değerlendirilmesi için SPSS Dunnett-T3 testi uygulanmıştır.

2.2. Biyokimyasal Ölçümler

2.2.1. Toplam protein düzeylerinin belirlenmesi

Toplam protein düzeyleri Lowry (1951) metoduna göre belirlenmiştir.

2.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin belirlenmesi

SOD enzim aktivitesi Nebot ve ark., (1993) metoduna dayalı ticari kit kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: SOD 525 metodu, 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren'in (BXT-01050) sulu alkali solüsyondaki Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimine bağımlı otooksidasyon oranının, reaksiyon sonucunda ortaya çıkan kromofora bağılı ölçümüne dayanmaktadır. 1-metil-2-vinilpiridinyum triflorometansülfonat (BXT 03077) merkaptanlara bağılı safsızlıkların giderilmesi amacıyla reaksiyon karışımında bulunmaktadır. Reaksiyon pH 8.8 de ve 37 °C'de, 3 mM borik asit ve 0,1 M dietilentriaminpentaasetik asit içeren 50mM 2 amino-2-metil-1,3-propandiol tampon içerisinde gerçekleşir. 525 nm' deki absorbans değişiminin kinetik ölçümü 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo[c] floren'in 37 °C' deki reaksiyon karışımına eklenmesinden sonra gerçekleşir.

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.

2.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesinin belirlenmesi

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

Prensip: GSH-Px ortamdaki H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon ortamında NADPH ve glutasyon redüktaz enzimi bulunması durumunda bir önceki reaksiyonda oluşan okside glutasyon (GSSG) redükte forma çevrilirken, beraberinde redükte formdaki NADPH, okside forma (NADP⁺) dönüşür. NADPH'in 340 nm dalga boyunda oluşturduğu absorbanstaki azalma ölçülerek GSH-Px enziminin aktivitesi belirlenir.

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

2.2.4. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü

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

Prensip: Hidrojen peroksitin 240 nm ($\text{De}_{240\text{nm}} = 40\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) deki dekompozisyonu takip edilmektedir.

2.2.5. Malondialdehit (MDA) tayini ile dokulardaki lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

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

2.2.6. Toplam Glutasyon seviyelerinin ölçümü

GSH oranları Tietze (1969) Metoduna dayalı Cayman ticari kiti kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: Glutasyon redüktaz tarafından redükte hale dönüştürülen glutasyon DTNB ile reaksiyona girerek spektrofotometrede 412 nm de ölçülebilen bileşiği oluşturur.

2.2.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi ölçümü

AChE aktivitesi Ellman ve ark. (1961) metoduna göre belirlenmiştir. Bu enzim, asetiltiyokolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonunu katalizlemektedir.

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. Histopatolojik İncelemeler

2.3.1. Doku örneklerinin tespiti

Dokulardan diseksiyonla alınan örnekler hayvandan çıkarıldıktan hemen sonra otolize uğramamaları için % 4'lük paraformaldehit (fosfat tampon içinde pH 7.2-7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır.

2.3.2. Doku takip işlemleri

1mm³'lük parçalara bölünen dokular tespit solüsyonu (%4 lük paraformaldehit) içerisinde 24 saat boyunca ve + 4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Materyal 0.1 M'lık sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanıp dokulardan suyun uzaklaştırılması amacıyla alkol serilerinden geçirilmiştir. Resinin hücre içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacıyla dokular (2:1) LR White/alkol karışımında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 1 gece LR White içerisinde bekletilmiştir. Gömme işleminin ardından oluşturulan bloklardan kesitler alınmıştır.

2.4. Moleküler Ölçümler

2.4.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi

Ratlardan çıkarılan beyin örnekleri 0.1 gr olacak şekilde kesildikten sonra 2 ml Merchant-EDTA tamponu içerisinde ezilerek parçalanmıştır. Daha sonra %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz jel hazırlanmış ve lamalar agaroz jel ile kaplanmıştır. Hazırlanan örneklerden 8 µl alıp 73 µl %1'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jel ile karıştırdıktan sonra karışım lama aktarılmış ve üzeri lamel kapatılmıştır. 5 dakika sonra lamel çıkarılıp preparatlar 1 saat liziz tamponu (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, pH 10) içerisinde bekletilmiştir. Örnekler alkali tamponda (300mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) 40 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler aynı alkali tampon içerisinde elektroforezde yürütülmüştür. Uygulanan akım 30 dakika boyunca 25 V ve 300 mA'dir. Elektroforez uygulamasından sonra örnekler nötralizasyon tamponunda 5'er dakikadan 3 kez bekletilmiştir (İşlemler +4 °C'de

gerçekleştirilmiştir). Nötralizasyon işleminden sonra preparatlar distile su ile yıkanarak kurutulduktan sonra sybr green boyası ile boyanmıştır. Örnekler Leica 6000DM floresan mikroskobunda fotoğraflanmış ve analiz işlemi için BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır. Her preparattan 50 hücre sayılmıştır.

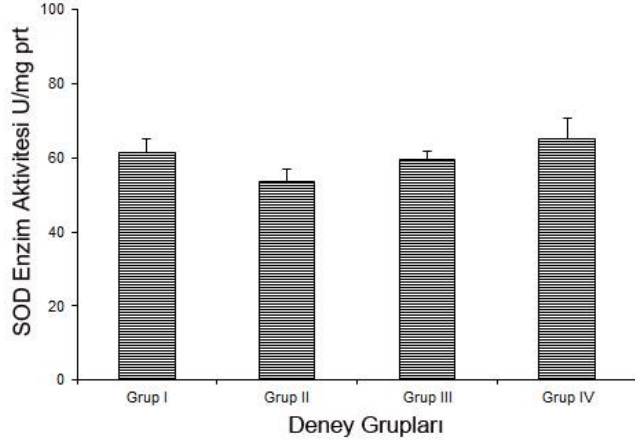
2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için, SPSS Statistics 20 programı kullanılmıştır. Normallik testleri yapıldıktan sonra veriler One Way ANOVA testi ile değerlendirildi Verilerin ileri analizleri Post Hock 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



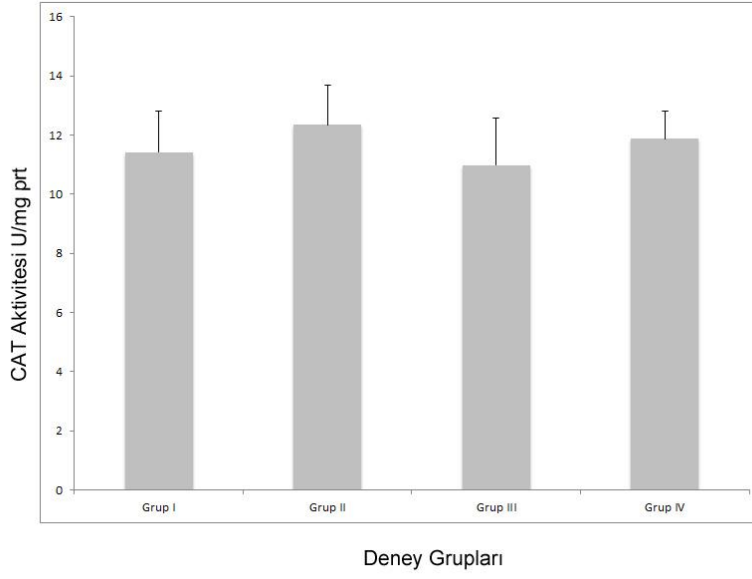
Şekil 3.1. SOD aktivitesi sonuçları grafiği. Levene skoruna göre p:0.037

Çizelge 3.1. SOD aktivitesi sonuçları

Deney Grupları	SOD Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	61.48±3.76
Grup II	53.72±3.09
Grup III	59.55±2.29
Grup IV	65.27±5.44

SOD aktivitesi açısından deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.1.2. Katalaz (CAT) enzim aktivitesi



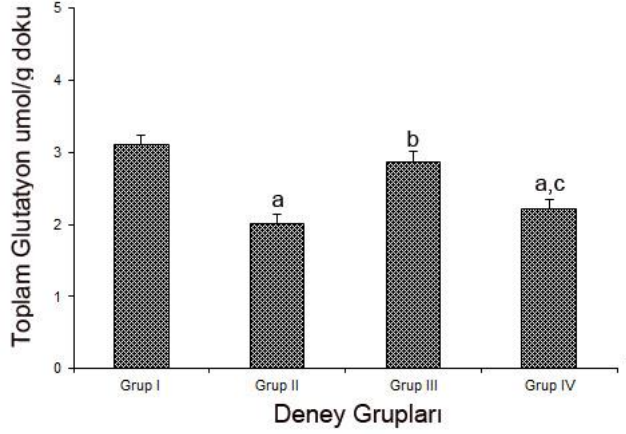
Şekil 3.2. Cat aktivitesi sonuçları grafiği. Levene skoruna göre p:0.434

Çizelge 3.2. Cat aktivitesi sonuçları

Deney Grupları	CAT Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	11.42±1.4
Grup II	12.35±1.34
Grup III	10.98±1.59
Grup IV	11.87±0.95

CAT aktivitesi açısından deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.1.3. Toplam Glutasyon (GSH) düzeyi



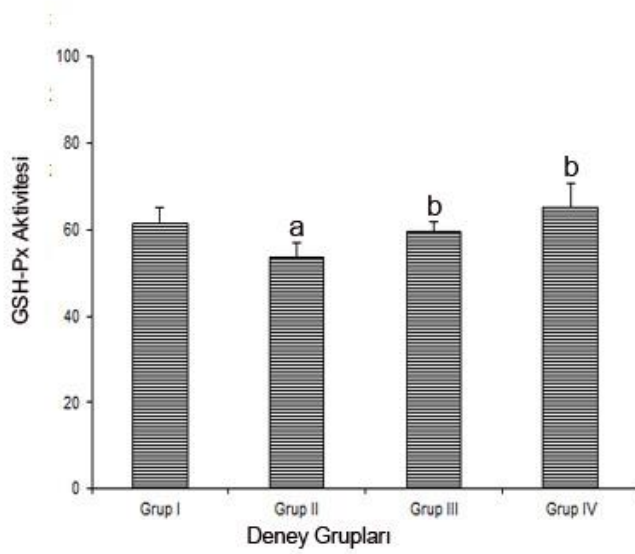
Şekil 3.3. Toplam GSH düzeyi sonuçları grafiği. a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; c. Grup III'e göre; istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p: 0.766$

Çizelge 3.3. Toplam GSH düzeyi

Deney Grupları	Toplam Glutasyon (umol/g doku)
Grup I	3.11±0.128
Grup II	2.01±0.118
Grup III	2.86±0.151
Grup IV	2.20±0.132

Toplam GSH düzeyinin grup II ve grup IV'de, grup I'e göre anlamlı düzeyde azalmış olması nedeniyle Al toksisitesinin etkileri deney gruplarında açıkça görülebilmektedir. Grup III'de ise toplam GSH düzeyi grup I ile yaklaşık olarak aynı seviyededir. Bununla birlikte grup II ve grup IV arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi



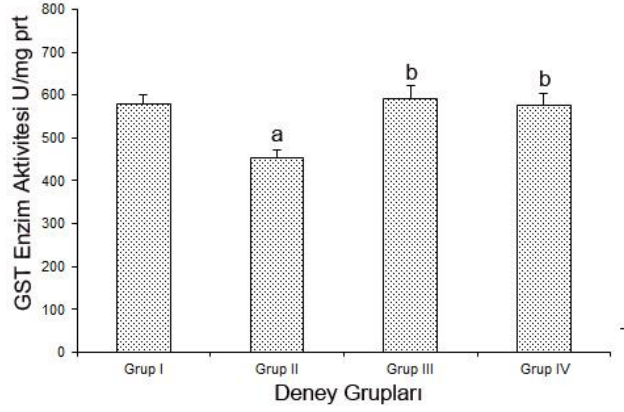
Şekil 3.4. GSH-Px aktivitesi sonuçları grafiği a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.870$

Çizelge 3.4. GSH-Px aktivitesi

Deney Grupları	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	24.80±1.34
Grup II	17.50±1.4
Grup III	23.60±1.46
Grup IV	22.80±1.26

Toplam GSH düzeyinin grup II ve grup IV'de, grup I'e göre anlamlı düzeyde azalmış olması nedeniyle Al toksisitesinin etkileri deney gruplarında açıkça görülebilmektedir.

3.1.5. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi



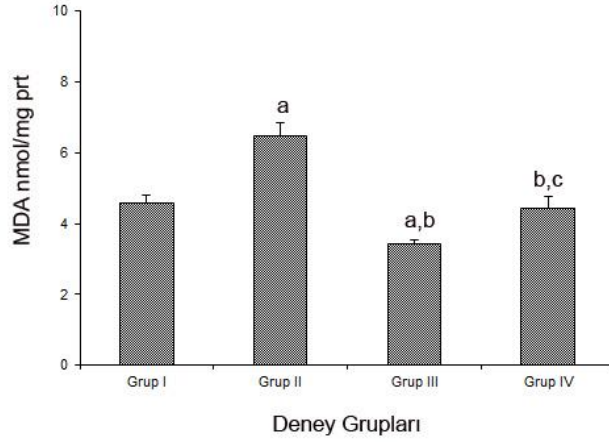
Şekil 3.5. GST aktivitesi sonuçları grafiği. a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.086$

Çizelge 3.5. GST aktivitesi

Deney Grupları	GST Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	580.13±20.82
Grup II	453.69±17.96
Grup III	590.62±31.43
Grup IV	576.92±27.47

GST aktivitesi grup II'de, grup I'e göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Grup III ve grup IV'de ise GST enzim aktivitesinin grup I ile aynı seviyede olduğu bununla birlikte grup II'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

3.1.6. Lipid Peroksidasyonu aktivitesi



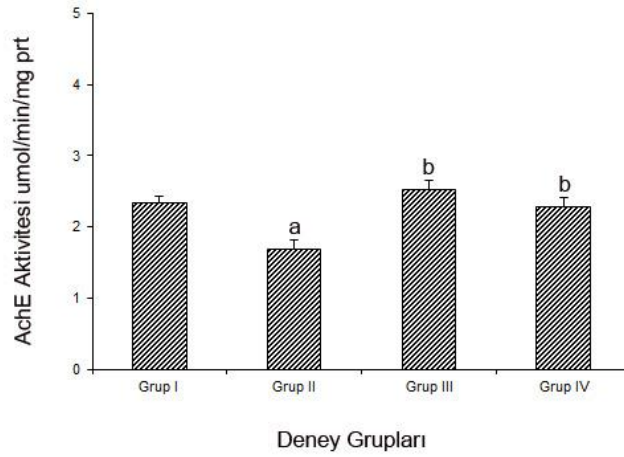
Şekil 3.6. Lipid peroksidasyonu sonuç grafiği. a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; c. Grup III'e göre; istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.000$

Çizelge 3.6. Lipid peroksidasyonu

Deney Grupları	MDA (nmol/mg prt)	
Grup I	4.57±0.23	
Grup II	6.46±0.4	
Grup III	3.43±0.121	
Grup IV	4.44±0.32	

MDA seviyelerine bağlı lipid peroksidasyonu kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldığında, grup II'de grup I'e göre anlamlı seviyede artmış, grup III'de ise grup I'e göre anlamlı seviyede azalmış olduğu görülmektedir. Bununla birlikte lipid peroksidasyonu grup IV'de grup II'ye oranla daha düşük, grup III'e oranla ise daha yüksek seviyededir.

3.1.7. Asetilkolin Esteraz (AChE) aktivitesi



Şekil 3.7. AChE aktivitesi a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p: 0.685$

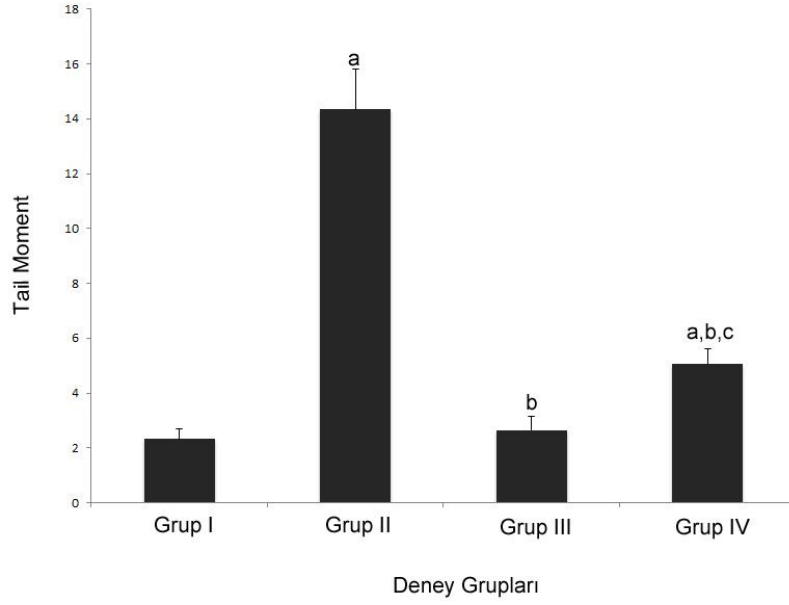
Çizelge 3.7. AChE aktivitesi

Deney Grupları	AChE Aktivitesi (U/mg prt)
Grup I	2.33±0.10
Grup II	1.69±0.123
Grup III	2.52±0.13
Grup IV	2.29±0.13

AChE aktivitesi grup II'de grup I'e oranla azalmıştır. Grup III ve IV AChE enzim aktivitesinin grup II'ye oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülürken, grup I ile de aynı seviyede oldukları görülmektedir.

3.2. Moleküler Ölçümler

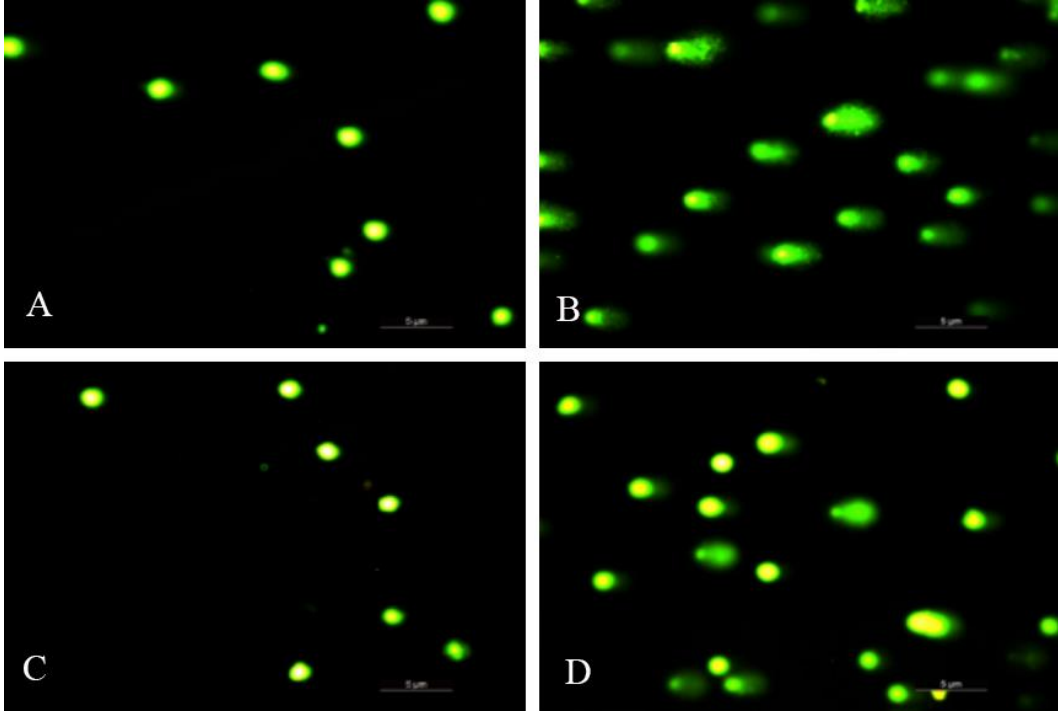
3.2.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi



Şekil 3.8. SCGE analizi sonuçları grafiği a. Grup I'e göre; b. Grup II'ye göre; c. Grup III'e göre; istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları ifade etmektedir. Levene skoruna göre $p:0.000$

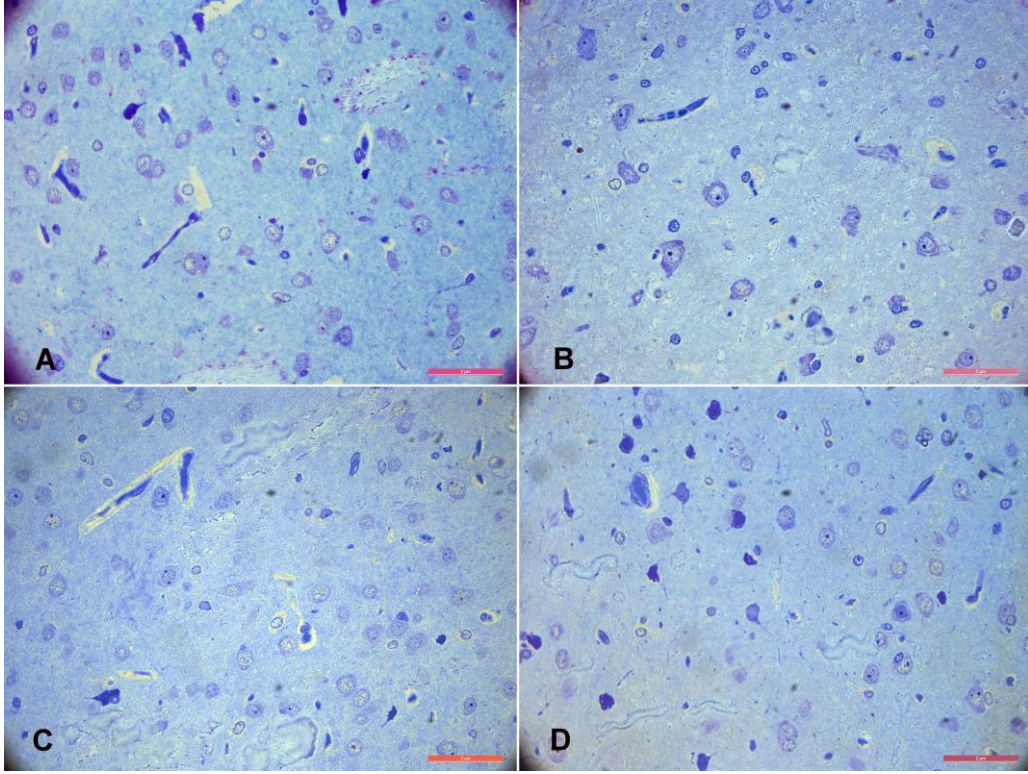
Çizelge 3.8. SCGE analizi sonuçları

Deney Grupları	Tail Moment
Grup I	2.32±0.38
Grup II	14.35±1.46
Grup III	2.65±0.51
Grup IV	5.07±0.56

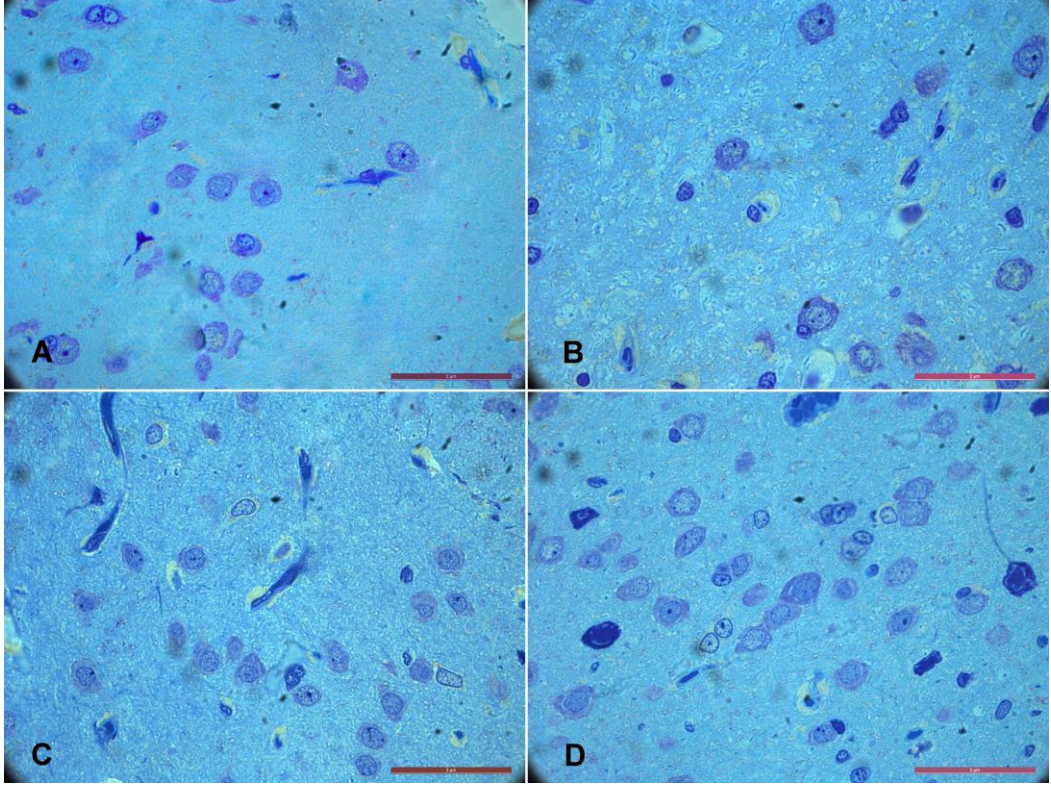


Şekil 3.9. SCGE yöntemi sonucunda DNA molekülünde tespit edilen hasarın floresan mikroskopik görüntüsü (40x) A) Grup I (Kontrol) B) Grup II ($AlCl_3$) C) Grup III MCP) D) Grup IV ($AlCl_3$ +MCP)

3.3. Histopatolojik Bulgular



Şekil 3.10. Serebral korteks yarı ince kesitlerinde patolojik değişiklikler (63x). A) Grup (Kontrol) B) Grup II ($AlCl_3$) C) Grup III (MCP) D) Grup IV ($AlCl_3+MCP$)



Şekil 3.11. Serebral korteks yarı ince kesitlerinde patolojik değişiklikler (100x) A) Grup I (Kontrol) B) Grup II ($AlCl_3$) C) Grup III (MCP) D) Grup IV ($AlCl_3+MCP$)

Histopatolojik bulgular, Al toksisitesine maruz bırakılan Grup III hayvanlarının beyin hücrelerinde kısmi dejenerasyon ve az sayıda hücrede nekroz ile karakterizedir. Diğer gruplarda (Grup II ve Grup IV) patolojik bir bulguya rastlanmamıştır.

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Al dejenerasyona uğramış nöron hücrelerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Al'un kan-beyin bariyerinden geçebilme kabiliyeti ve beyinden eliminasyonunun nispeten düşük bir hızda gerçekleşmesi, bir neurotoksikolojik risk oluşturmasına neden olmaktadır (Sanchez-Iglesias ve ark. 2007). Çok sayıdaki biyolojik moleküle olan affinitesi nedeniyle Al, diğer biyolojik kationlara (Ca ve Mg gibi) bağlanabilmektedir. Bu nedenle birçok metabolik yol Al toksisitesi için potansiyel bir hedef oluşturmaktadır. Al tuzlarının DNA ve RNA'ya bağlandıkları, birçok enzimin aktivitesini inhibe edebildiği, özellikle beyinde OS'e neden olarak hücrelerin antioksidan kapasitesini azalttığı ve LP'u arttırdığı bilinmektedir (Sumathi ve ark., 2015).

Çalışmamızın bulguları Al'un daha önceki çalışmalarda değinilen toksik etkilerini doğrularken, MCP'in bu etkilerin azaltılmasında rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (El-Demerdash ve ark., 2004, Rodella ve ark. 2008; Sanchez-Iglesias ve ark. 2007). Bu bulgulara göre Al, SOD ve CAT enzimlerinin aktiviteleri üzerinde ölçülebilir bir etki göstermemiştir. Bu durum Al'un oluşturduğu OS'in sıradışı bir mekanizma ile ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Al, O_2^- radikali ile etkileşime girerek biyolojik dokular için daha reaktif bir radikal molekül olan AlO_2^{2+} yi oluşturmaktadır. AlO_2^{2+} , SOD ile reaksiyona giremez (O_2^- nin H_2O_2 'e dönüşümü bu sebeple engellendiğinden, CAT enzimi için bir substrat oluşmamaktadır. Elde ettiğimiz bu bulgular Serra ve ark.'ın in vitro ortamda Al ve antioksidan enzimler arasındaki etkileşimleri inceledikleri çalışmaları ile desteklenmektedir (Serra ve ark., 1991). Al toksisitesinin toplam GSH düzeyleri üzerindeki etkisine bakıldığında Grup II (Al)'deki toplam GSH düzeyinin Grup I (Kontrol)' e göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, Grup IV'ün toplam GSH düzeyi Grup II ile aynı seviyededir. Bu durum Al'un şelatlanmasında GSH'un MCP'ye göre daha etkin bir rol oynadığını ve GSH'ın Al'a karşı MCP'ye oranla daha yüksek affinite gösterdiğini düşündürmektedir.

GSH metal iyonları ile ilişkiye geçebilecek olan, sisteinin 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 sahip bileşiklerdir. Bu nedenle GSH dokudaki aktif Al iyonlarının miktarını azaltırken atılımını hızlandırabilir (Mierzynski ve Hutsaylyuk, 2012).

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre Al, GSH-Px, GST ve AChE aktivitelerini inhibe edici bir etki göstermektedir. Bu bulguyu destekleyici nitelikteki bulgular daha önce yapılmış çalışmalarda mevcuttur (El-Demerdash, 2004; El-sayed, 2011). Bununla birlikte Grup IV hayvanlarına Al, MCP ile birlikte uygulandığında her üç enzimin de aktivitesinin Grup I (Kontrol) ile aynı düzeyde olduğu görülmektedir. Bu durum, MCP'nin bir metal şelatlayıcı olarak GSH'dan sonra sekonder bir etki ile Al'u şelatlayıcı özellik gösterdiğini düşündürmektedir. Bu sayede Al etkisizleştirilerek enzimlerin aktif merkezine bağlanması ve bu enzimlerin inhibisyonu azaltılabilir. MCP'nin çeşitli metaller için şelatlayıcı etkisi önceki çalışmalarda da ortaya koyulmuştur. Eliaz ve arkadaşları (2008) çalışmalarında canlıda biriken total civa oranının azalmasında MCP'nin etkili olabileceği ortaya koyulmuştur (Eliaz ve ark 2008).

LP ile ilgili bulgular Al'un LP'nu arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte yalnızca MCP uygulanan Grup II hayvanlarında LP Grup I (Kontrol)'e göre azalmış; Al ile birlikte MCP uygulanan Grup IV hayvanlarında ise Grup I (Kontrol) ile aynı seviyede olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre MCP'nin Al kaynaklı LP'nu önlediği açıkça görülmektedir. Çalışmamızın histopatolojik bulguları da bu sonucu desteklemektedir. Al uygulanan Grup II hayvanlarındaki sinir hücrelerinde kısmi bir dejenerasyon ve bazı hücrelerde nekrotik bulgular izlenirken, diğer gruplarda bu bulgulara rastlanmamıştır.

Çalışmamızda SCGE bulguları Al'un beyin hücrelerinde DNA hasarını indüklediğini göstermektedir. Bununla birlikte Al ile birlikte MCP uygulanan Grup IV hayvanlarında DNA hasarının azaldığı görülmektedir. Buna rağmen Grup IV için ölçülen DNA hasarının seviyesi Grup I (Kontrol)'e göre yüksek düzeydedir. Celik ve arkadaşları (2012) periferik kan hücreleri üzerinde Al'un etkilerini inceledikleri çalışmalarında, Al'un lenfositlerde DNA hasarına, plasma MDA ve protein karbonil seviyelerinde önemli ölçüde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir (Celik ve ark., 2012).

Tüm bulgular; Sprague Dawley cinsi sıçanlarda oral yolla ve 30 gün süre ile gerçekleşen Al toksisitesinin (34 mg/kg/gün) sinir hücreleri üzerinde oluşturduğu hasarın azaltılmasında, oral yolla ve 30 gün süre ile (50 mg/kg/gün) uygulanan MCP'nin etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Konu ile ilgili olarak gelecekte yapılacak çalışmalarda, MCP'nin Al toksisitesini önleyici etki mekanizmasının moleküler detaylarının açıklanmasına yönelik araştırmalar katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Anonim (2000), *Alternative Medicine Review*, Volume 5, Number 6.
- Alu, E. (2013), *Rat Beyninde Yüksek Doz Radyasyonla Oluşan Akut Hasara Karşı Melatonin ve Diklofenak'ın Koruyucu Etkisi*, Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Malatya.
- Altınışık, M. (2000) *Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar*.
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
- Akman, ., Atasever, S., Güçlü, E., Gümüş, G. (2011), *Alüminyum ve İnsan*, XIII. Öğrenci Sempozyumu alışma Grubu Sunumları.
- Akpoyraz, M., Durak, İ. (1995), "Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri", *Ankara Tıp Mecmuası*, Vol. 48 : 253-262.
- Ataol, S. (2014), *Development And Characterization Of Silk Fibroin And Citrus Pectin Based Scaffolds For Bone Tissue Engineering*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bommavaram, M., Korivi, M., Borelli, D.P.R., Pabbadhi, J.D., Nannepaga, J.S. (2013) "Bacopa monniera stabilized gold nanoparticles (BmGNPs) alleviated the oxidative stress induced by aluminum in albino mice" *Drug Invention Today*, 5 (2013) 113-118.
- 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.
- Chien-Ho, C., Ming-Thau, S., Tzeng-Fu, C., Ying-Ching W., Wen-Chi, H., Der Zen, L., Tsao-Chuen C., Yu-Chih, L. (2006), "Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways" *Biochemical Pharmacology*, 72 (2006) 1001– 1009.
- olak, S. (2008), *Alüminyum Klorid ve Borik Asidin Rat Beyin Dokusu zerinde Histolojik Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Demirci, K. (2010), *Paliperidonun Rat Beynindeki Oksidan/Antioksidan Sistem zerine Etkileri*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta.

- Doğan, . (2014), *Ratlarda Testiküler Torsiyon/Detorsiyon Modeline Bağlı Oluşan Doku Hasarında Amlodipinin Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Doğan, Z. (2012), *Gebe Ratlarda Siprofloksasin Kullanımının Fetal Beyin Gelişimi ve Morfolojik Yapı zerine Etkilerinin Araştırılması; Quercetinin Olası Koruyucu Rolünün Belirlenmesi*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Easa, A.M., Wai, W.W., AlKarkhi, A. (2010), “Comparing biosorbent ability of modified citrus and durian rind pectin” *Carbohydrate Polymers*, 79 584–589.
- Eliaz, I., Hotckiss, T., Fishman, M.I., Rode, D. (2006a) “The Effect of Modified Citrus Pectin on Urinary Excretion of Toxic Elements” *Phytotherapy Research*, 20, 859–864.
- Eliaz, I., Zhao, Z.Y., Liang, L., Fan, X., Yu, Z., Hotchkiss, A.T., Wilk, B.J. (2008b), “The Role Of Modified Citrus Pectin As An Effective Chelator Of Lead In Children Hospitalized With Toxic Lead Levels” *Alternative Therapies*, VOL. 14, NO. 4.
- El-Demerdash, F.M. (2004), “Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18 113–121.
- El-Sayed, W.M., Al-Kahtania, M.A., Abdel-Moneima, A.M. (2011) “Prophylactic and therapeutic effects of taurine against aluminum-induced acut hepatotoxicity in mice” *Journal of Hazardous Materials*, 192 880–886.
- Flora, S.J.S., Mehta, A., Satsangi, K., Kannan, G.M., Gupta, M. (2003) “Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 134 (2003) 319–328.
- Gete, S. (2014), *Diabetik Anne Bebeklerinde Serum Paraoksonaz Aktivitesi ve Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, şanlıurfa.

- Glinsky, V.V., Raz, A. (2009) "Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets" *Carbohydrate Research*, 344 1788–1791.
- Göğtepe, S. (2010), *Alüminyum Zehirlenmesinin Capoeta capoeta capoeta (Guldenstaedt 1772)'nin Serum Proteinleri ve Solungaç Histopatolojisi Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Green, C.J., Knight, J., Precious, S., Simpkin, S. (1981), "Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience" *Laboratory Animals*, 15 163-170.
- Guess, B.W., Scholz, M.C., Strum, S.B., Lam, R.Y., Johnson, H.J., Jennrich, R.I. (2003) "Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study" *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 6, 301–304.
- Güngör, N. (2014), *Antioksidanlara Duyarlı Soy Metal Nanoparçacık Esaslı Yeni Sensörler Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Gürler, H.Ş. (2012), *Elektromanyetik Radyasyonun (2.45 GHZ) Rat Beyninde Oluşturduğu Oksidatif Hasar ve Sarımsağın Koruyucu Etkisi*, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Samsun.
- Harsha, S.N., Anilakumar, K.R. (2013) "Protection against aluminium neurotoxicity: A repertoire of lettuce antioxidants." *Biomedicine & Aging Pathology*. 3 179-184.
- 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.
- Kang, H.J., Kwon, J.H., Ahn, D.U., Lee, J.W., Lee, W.K., Jo, C. (2009) "Effect of Citrus Pectin Oligosaccharide Prepared by Irradiation on High Cholesterol Diet B6.KO ApoE Mice" *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 18, No. 4, pp. 884-888.

- Kar, F. (1998), *Portakal Kabuğu Pektininin Fizikokimyasal Özellikleri ve Pektin Ekstratının Sabit Basınç Filtrasyonu*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Karakuş, K. (2011), *Duloksetinin Rat Beyin Dokularındaki Oksidatif Stres Üzerine Olan Etkisi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta.
- Kartal, Ş. (2013), *Karbonmonoksit Zehirlenmesi Hastalarında Oksidan/Antioksidan ve Oksidatif Stres İndeks Seviyelerinin Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gaziantep.
- Kaya, Z. (2010), *Arsenikle Lipid Peroksidasyon Oluşturulan Ratlarda Çuha Çiçeği Yağının Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Khramova, D.S., Popov, S.V., Golovchenko, V.V., Vityazev, F.V., Paderin, N.M., Ovodov, Y.S. (2009), “Abrogation of the oral tolerance to ovalbumin in mice by citrus pectin” *Basic Nutritional Investigation*, 25: 226–232.
- Kıbrıslıoğlu, G. (2013), *Biyolojik Örneklerde Peroksil Radikali Süpürme Etkinliği Ölçümü İçin Spektroflorometrik Yöntem Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kumbul, K. (2007), *Deneysel İntestinal İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Caffeic Acid Phenethyl Ester in Akciğer Hasarını Önlemedeki Rolü*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta.
- Lankoff A., Banasik A., Duma A., Ochniak E., Lisowska H., Kuszewski T., Gozdz S., ve Wojcik., A. (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.
- Liang, Y., Chen, C., Sheu, M., Chen, T., Wang, Y., Hou, W., Liu, D., Chung, T. (2006), “Suppression Of Endotoxin-İnduced Proinflammatory Responses By Citrus Pectin Through Blocking LPS Signaling Pathways”, *Biochemical Pharmacology*, 72 1001–1009.

- Lione, A. (1985) "Aluminium intake from non-prescription drugs and sucralfate" *General Pharmacology*, 16,223-228.
- Mierzynski, J., Hutsaylyuk, V., (2012) "Fatigue crack growth in the aluminium alloy in the presence of a calibrated hole under simple bending." *International Journal of Fatigue*, Vol 39, page 54-60.
- Nergiz, S. (2011), *Esansiyel Hipertansiyonlu Hastalarda ve Sağlıklı Kontrollerde Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmleri ve Bu Polimorfizmlerin Nitrik Oksit (NO), Okside LDL (OX-LDL) ve Homosistein Düzeyleri İle Olan İlişkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Özyurt, D. (2014), *Florometrik Bir Antioksidan Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Uygulamaları*, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Paşaoğlu, O.M. (2011), *L-Name Uygulanan Sıçan Dokularında Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Propolisin Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Rahman, I., MacNee, W. (1999) "Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease", *American Journal of Physiology*, Vol. 277 no.6, L1067-L1088.
- Rodella, L.F., Ricci, F., Borsani, E., Stacchiotti, A., Foglio, E., Favero, G., Rezzani, R., Mariani C., Bianchi, R. (2008) "Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain" *Histol Histopathol*, 23: 433-439.
- Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, M., Orlin, J., Bessler, H. (2008), "Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells" *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62 579-582.

- Sanchez-Iglesias, S., Mendez-Alvarez, E., Iglesias-Gonzalez, J., Munoz-Patino, A., Sanchez-Sellero, I., Labandeira-Garcia, J.L., Soto-Otero, R. (2009), "Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease" *Journal of Neurochemistry*, Vol 109, Issue 3, pages 879-888.
- Sarıkaya, G. (2011) *Alüminyum İle Oluşturulan Sıçan İnce Bağırsak Toksisitesi Üzerinde Melatoninin Rolü*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Silva, V.S., Gonçalves, P.P. (2014), "Effects of lysine acetylsalicylate on accumulation and (Na⁺/K⁺) ATPase activity in rat brain cortex synaptosomes after aluminium ingestion" *Toxicology Letters*, 232 167–174.
- Stacchiotti, A., Lavazza, A., Ferroni, M., Sberveglieri, G., Bianchi, R., Rezzani, R., Rodella, L.F. (2007), "Effects of aluminium sulphate in the mouse liver: Similarities to the aging process" *Experimental Gerontology*, 43 (2008) 330–338.
- Sumathi, T., Shobana C., Thangarajeswari, M., Usha, R., (2015), "Protective effect of L-Theanine against aluminium induced neurotoxicity in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rat brain - histopathological, and biochemical approach." *Drug Chem Toxicol*, 38(1):22-31.
- Tekkes, Y. (2006), *Streptozotosin İle Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin Ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Türkez, H., Yousef, M.I. and Geyikoğlu, F. (2010), "Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver" *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2741-2746.
- Wang, X., Chen, Q., Lü, X. (2014), "Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water", *Food Hydrocolloids*, 38 129-137.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser J. (2007), "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44-84.
- Yener, F. (2007), *Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yurdakök, K., İnce, T. (2008), *Aşı adjuvanları*, Derleme, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51: 225-239.
- Yıldırım-Çelik, S. (2007), *Meyve Suyu Üretiminde Kullanım Amaçlı, Pektin Liyaz Üreten Yeni Mikroorganizmaların Aranması ve Bulunan Türlerde Enzim Saflaştırılıp Karakterize Edilmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Yılmaz, E. (2013), *Farklı Dozlardaki Alüminyum Klorür'ün Galleria mellonella(L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nin Biyolojisine ve Hemosit Sayılarına Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- Yılmaz, Z. (2006), *Öğrenme ve Hafızanın Şekillendiği Beyin Bölgelerinde Alkolün Oluşturduğu Hasarlarda Propolisin Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.