



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALÜMİNYUM İLE OLUŞTURULAN SIÇAN İNCE BAĞIRSAK  
TOKSİSİTESİ ÜZERİNDE MELATONİNİN ROLÜ**

**Güner SARIKAYA**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Programı**

**Danışman  
Doç. Dr. Ömür KARABULUT-BULAN**

**Haziran, 2011**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 24/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi




Doç.Dr. Ömür KARABULUT BULAN (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof.Dr. Refiye YANARDAĞ  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Seyhan ALTUN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç.Dr. Gül ÖZCAN ARICAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 4148 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgisini ve değerli görüşlerini esirgemeyen, her zaman güler yüzü ve desteğiyle yanımda olan, bana güveniyle huzur veren çok değerli hocam, Sayın Doç.Dr. Ömür BULAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında deneyimleri ile yanımda olan, her sorunda desteğini esirgemeyen Yard.Doç.Dr. Pelin ARDA-PİRİNÇCİ'ye çok teşekkür ederim.

Deneyleirim sırasında her türlü yardımda bulunmaktan çekinmeyen ve destek olan Araş.Gör. Şenay YILDIRIM'a, tez çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Biyolog Zeynep EROL, Biyolog Semra Zuhul FİCEN ve Biyolog Hüseyin US'a teşekkür ederim.

Biyokimyasal çalışmalarım için "Moleküler Biyoloji" laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT'e ve deney hayvanlarının yetiştirilmesi ve bakımında yardımcı olan İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi manevi her konuda bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili Annem, Babam ve Ablama, bundan sonraki hayatımda her zaman yanımda olacak hayat arkadaşım İlker'e sonsuz teşekkür ederim.

**Haziran, 2011**

**Güner SARIKAYA**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. İNCE BAĞIRSAK.....	3
2.2. ALÜMİNYUM.....	4
2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES.....	6
2.3.1.Miyeloperoksidaz (MPO).....	9
2.4. ANTİOKSİDANLAR.....	10
2.4.1. Glutasyon (GSH).....	12
2.4.2. Melatonin.....	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER.....	16
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	16
3.2.1. Metallothionein (MT) İmmünohistokimyası.....	16
3.2.2. Ki-67 İmmünohistokimyası.....	17
3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	18
3.3.1. Total Protein Tayini.....	18
3.3.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Tayini.....	20
3.3.3. Glutasyon (GSH) Tayini .....	22
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	25
4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	25

4.1.2. Melatonin Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	27
4.1.3. Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	29
4.1.4. Alüminyum Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	31
4.1.5. Alüminyum + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	34
4.1.6. Histolojik Hasar Skoru.....	37
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	39
4.2.1. Metallothionein (MT) İmmünohistokimyasına Ait Bulgular.....	39
4.2.2. Ki-67 İmmünohistokimyasına Ait Bulgular.....	42
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	44
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	68

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> İnce bağırsağın genel yapısı.....	<b>3</b>
<b>Şekil 2.2:</b> Alüminyum sülfat genel yapısı.....	<b>5</b>
<b>Şekil 2.3:</b> Alüminyum oksidasyonu (Exley ve diğ., 2010).....	<b>6</b>
<b>Şekil 2.4:</b> Serbest radikal oluşumuna etkili dış etkenler.....	<b>7</b>
<b>Şekil 2.5:</b> Lipid peroksidasyonu oluşum şeması (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006)	<b>8</b>
<b>Şekil 2.6:</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile metal iyonlarının reaksiyonu ve OH <sup>-</sup> radikali oluşumu.....	<b>9</b>
<b>Şekil 2.7:</b> MPO'nun oksijen radikallerine etkisi.....	<b>9</b>
<b>Şekil 2.8:</b> İnce bağırsakta meydana gelen oksidatif stres şeması (Kruidenier ve diğ.,2003).....	<b>10</b>
<b>Şekil 2.9:</b> Antioksidanların serbest radikallere etkisi.....	<b>11</b>
<b>Şekil 2.10:</b> Glutasyon (GSH) sentezi ve hidrojen peroksitin (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) detoksifikasyonu.....	<b>12</b>
<b>Şekil 2.11:</b> Melatonin'in (N-asetil-5-metoksitriptamin) genel yapısı.....	<b>13</b>
<b>Şekil 2.12:</b> Melatonin'in ritim düzenleyici rolü.....	<b>14</b>
<b>Şekil 3.1:</b> Total protein standart grafiği.....	<b>20</b>
<b>Şekil 3.2:</b> MPO standart grafiği.....	<b>22</b>
<b>Şekil 3.3:</b> Total Glutasyon standart grafiği.....	<b>24</b>
<b>Şekil 4.1:</b> Kontrol grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm,(C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.....	<b>26</b>
<b>Şekil 4.2:</b> Kontrol grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (→) ve goblet hücrelerinde (>) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm .....	<b>27</b>
<b>Şekil 4.3:</b> Melatonin Kontrol grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm, (C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.....	<b>28</b>
<b>Şekil 4.4:</b> Melatonin kontrol grubuna ait çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (>) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.....	<b>29</b>
<b>Şekil 4.5:</b> Melatonin grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm, (C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.....	<b>30</b>
<b>Şekil 4.6:</b> Melatonin grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (>) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100µm.....	<b>31</b>
<b>Şekil 4.7:</b> Alüminyum uygulanan deney grubuna ait ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Villusların	

lamina propriasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu ( $\blackrightarrow$ ), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre ( $\rightarrow$ ), Masson, Bar: 100 $\mu$ m .....	32
<b>Şekil 4.8:</b> Alüminyum uygulanan deney grubuna ait jejunum kesitinin epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, çizgili kenarlarda devamsızlık ( $\blackrightarrow$ ), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücreler ( $\rightarrow$ ), villuslarının lamina propriasında ödem ( $\star$ ), epitel hücrelerde vakuolizasyon (v), hiperplazi (H) ve hiperemi ( $\negrightarrow$ ). Masson, Bar: 100 $\mu$ m.....	32
<b>Şekil 4.9:</b> Alüminyum uygulanan deney grubunun (A) villuslarının lamina propriasında ödem ( $\star$ ), Bar: 200 $\mu$ m, (B) mukozasında nekrotik alan ( $\star$ ), bez bütünlüğünde bozulma ve ödem ( $\star$ ), Masson, Bar: 100 $\mu$ m.....	33
<b>Şekil 4.10:</b> Alüminyum grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde çizgili kenarda ( $\rightarrow$ ) ve goblet hücrelerinde ( $>$ ) gözlenen PAS reaksiyon şiddetinde azalma, Bar: 100 $\mu$ m.....	34
<b>Şekil 4.11:</b> Alüminyum+Melatonin grubuna ait jejunumun (A) Genel histolojik görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 500 $\mu$ m, (B) Villusların görünümü, Masson, Bar: 100 $\mu$ m.....	35
<b>Şekil 4.12:</b> Alüminyum +Melatonin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 100 $\mu$ m.....	35
<b>Şekil 4.13:</b> Alüminyum +Melatonin grubuna ait mukozadaki kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 $\mu$ m.....	36
<b>Şekil 4.14:</b> Alüminyum + Melatonin grubuna ait ince bağırsak kesitinin çizgili kenarda ( $\rightarrow$ ) ve goblet hücrelerinde ( $>$ ) gözlenen PAS reaksiyon şiddetindeki artış, Bar: 100 $\mu$ m.....	36
<b>Şekil 4.15:</b> İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. Her bir grup için elde edilen değerler ‘Ortalama $\pm$ Standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=6): 5.83 $\pm$ 0.6, Melatonin kontrol (n=6): 4.50 $\pm$ 0.95, Melatonin (n=6): 6.16 $\pm$ 0.9, Alüminyum (n=8): 20.37 $\pm$ 0.9, Al+Mel (n=7): 10.0 $\pm$ 0.69. <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı (p<0.01) <sup>b</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı (p<0.01) <sup>c</sup> Melatonin grubundan farklı (p<0.05) <sup>d</sup> Alüminyum grubundan farklı (p<0.001).....	39
<b>Şekil 4.16:</b> Kript epitel hücrelerinde MT immunohistokimyası ile tespit edilen % hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘Ortalama $\pm$ Standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=8): 3.19 $\pm$ 0.17, Melatonin kontrol (n=8): 4.08 $\pm$ 0.21, Melatonin (n=7): 4.55 $\pm$ 0.11, Alüminyum (n=8): 13.16 $\pm$ 0.94, Al+Mel (n=7): 5.34 $\pm$ 0.4. <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı (p<0.001) <sup>b</sup> Alüminyum grubundan farklı (p<0.001) <sup>c</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı (p<0.05).....	40
<b>Şekil 4.17:</b> Kript epitel hücrelerinde MT pozitif hücreler ( $\rightarrow$ ). (A) Kontrol grubu, (B) Alüminyum grubu, (C) Alüminyum + Melatonin grubu.....	41
<b>Şekil 4.18:</b> Kript epitel hücrelerinde Ki-67 immunohistokimyası ile tespit edilen % Ki67 pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘Ortalama $\pm$ Standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=8): 3.19 $\pm$ 0.17, Melatonin kontrol (n=8): 4.08 $\pm$ 0.21, Melatonin (n=7): 4.55 $\pm$ 0.11, Alüminyum (n=8): 13.16 $\pm$ 0.94, Al+Mel (n=7): 5.34 $\pm$ 0.4. <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı (p<0.05) <sup>b</sup> Alüminyum grubundan farklı (p<0.05) <sup>c</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı (p<0.05).....	42
<b>Şekil 4.19:</b> Kript epitel hücrelerinde Ki-67 pozitif hücreler ( $\rightarrow$ ). (A) kontrol grubu, (B) Alüminyum grubu, (C) Al + Mel grubu.....	43



<b>Şekil 4.20:</b> İnce bağırsak homojenatlarının MPO değerleri (ortalama $\pm$ standart hata).	
<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ ).....	<b>45</b>
<b>Şekil 4.21:</b> İnce bağırsak homojenatlarının GSH değerleri (ortalama $\pm$ standart hata).	
<sup>b</sup> Melatonin Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ ), <sup>c</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p < 0.01$ ),	
<sup>d</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p < 0.05$ ).....	<b>45</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1:</b> MPO standart solusyonunun hazırlanışı.....	<b>21</b>
<b>Tablo 3.2:</b> GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı. Çözelti Tamponu (Ç. T.), Okside glutatyon (GSSG).....	<b>23</b>
<b>Tablo 4.1:</b> İnce bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.....	<b>38</b>
<b>Tablo 4.2:</b> MPO ve GSH değerleri, ortalama $\pm$ standart hata. <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ ), <sup>b</sup> Melatonin Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ ), <sup>c</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p < 0.01$ ), <sup>d</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p < 0.05$ ).....	<b>44</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AEC :</b>	3-Amino-9-Etilkarbazol
<b>Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> :</b>	Alüminyum sülfat
<b>Al<sup>3+</sup> :</b>	Alüminyum iyonu
<b>AlO<sub>2</sub> :</b>	Alüminyum oksit
<b>BSA :</b>	Sığır serum albümin
<b>CAT:</b>	Katalaz
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O :</b>	Bakır 2 sülfat pentahidrat
<b>DETAE:</b>	Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
<b>ELISA :</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>G6PD :</b>	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>GSH:</b>	İndirgenmiş glutatyon
<b>GSH-Px:</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>GSH-Rd:</b>	Glutatyon redüktaz
<b>GSSG:</b>	Okside glutatyon
<b>H<sup>+</sup> :</b>	Hidrojen iyonu
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen peroksit
<b>HE :</b>	Hematoksilen & Eosin
<b>HOCl :</b>	Hipokloröz asit
<b>Ki-67:</b>	Çoğalan hücrelerin nükleus antijeni
<b>LPO :</b>	Lipid peroksidasyonu
<b>MDA:</b>	Malondialdehid
<b>MPO :</b>	Miyeloperoksidaz
<b>MT :</b>	Metallotionein
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :</b>	Sodyum karbonat
<b>NaOH :</b>	Sodyum oksit
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>NOS:</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>O:</b>	Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:</b>	Süperoksit radikali
<b>OH:</b>	Hidroksil radikali
<b>PAS :</b>	Periodik Asit Schiff
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponu
<b>RIPA :</b>	Radyoimmünopresipitasyon çözültüsü
<b>ROO :</b>	Peroksil radikali
<b>SOD :</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SPSS :</b>	Sosyal bilimler için istatistik paketi
<b>TMB :</b>	Tetrametilbenzidin

## ÖZET

### ALÜMİNYUM İLE OLUŞTURULAN SIÇAN İNCE BAĞIRSAK TOKSİSİTESİ ÜZERİNDE MELATONİNİN ROLÜ

Alüminyum dünyada yaygın olarak bulunan metallere biridir. Günümüzde endüstriyel gelişmeler ve kirlenmelere bağlı olarak alüminyum besinler, su, hava ve çeşitli ilaçlar yoluyla insan vücuduna daha çok alınmaya başlandı. Alüminyumun, vücut dokularında serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonu yoluyla oksidatif strese yol açarak, hedef organlarda hasara yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca bağırsaktaki mukozal hasar sonucu oluşan iltihaplı hastalıklarda alüminyumun rol alabileceğini gösteren literatürler bulunmaktadır. Alüminyum toksisitesi ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, alüminyumdan kaynaklanan hasarın mekanizmaları henüz açıklanamamıştır.

Biyolojik sistemlerde prooksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stres, birçok patolojik durumla ilişkilendirilmektedir. Organizma, prooksidan etki gösteren serbest radikallere karşı antioksidan ajanlarla kendini korur. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) epifiz bezinden salgılanan ve serbest radikalleri azaltabilen güçlü bir antioksidandır. Ayrıca melatonin antioksidan enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu artırma yeteneğindedir. Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde melatoninin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda ince bağırsakta alüminyum etkisiyle oluşan hasarın mekanizmalarını ve bu hasar üzerinde melatoninin koruyucu özellik gösterip göstermediğini histolojik, immünohistokimyasal ve ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemleriyle ortaya koymayı amaçladık.

Yaptığımız bu çalışmada, toplam 40 adet ergin erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Deney hayvanları beş gruba ayrıldı. Birinci gruba kontrol olarak serum fizyolojik, ikinci gruba melatoninin kontrolü olarak etanol+serum fizyolojik, üçüncü gruba melatonin, dördüncü gruba alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ve beşinci gruba da alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ile birlikte melatonin bir ay süreyle haftada üç kez enjeksiyon yoluyla verildi. Jejunumdan alınan doku örnekleri histolojik incelemeler için Bouin fiksatif ile fikse edildi. Parafin bloklardan alınan doku kesitlerine Hematoksilen & Eosin (HE), Masson'un üçlü boyası ve Periodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı. Formalin ile fikse edilmiş doku kesitlerine metalotionein (MT) ve Ki-67 immünohistokimyası uygulandı. Biyokimyasal olarak mieloperoksidaz (MPO) ve total glutatyon (GSH) değerleri ELISA yöntemiyle tayin edildi.

Alüminyum uygulaması ince bağırsak dokularında histolojik olarak dejeneratif değişikliklere yol açtı. MT uygulamasında MT pozitif kript hücre sayısında artış gözlenirken, Ki-67 uygulamasında Ki-67 pozitif kript hücre sayısında azalış gözlenmiştir. Ayrıca alüminyum, MPO değerlerinde artışa, GSH değerlerinde azalışa sebep olmuştur. Melatonin uygulandığında bu bulgular kontrol bireylerdeki değerlere yakın sonuçlar göstermiştir. Sonuç olarak alüminyumun neden olduğu ince bağırsak toksisitesi üzerinde melatoninin koruyucu etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

## SUMMARY

### THE ROLE OF MELATONINE ON ALUMINUM-INDUCED RAT SMALL INTESTINE TOXICITY

Aluminum is one of the widely found metals on Earth. Due to the industrial developments and contamination, nowadays aluminum is much more started to be taken into human body by food, water, air and variety of drugs. It has been shown in a number of studies that aluminum causes oxidative stress by free radical production and lipid peroxidation in body tissues and as a result of this it has been seen damage on target organs. Besides, there are also some literature showing that aluminum may have role in some inflammatory diseases which were emerged as a result of mucosal damage in intestines. Although there are a number of studies on aluminum toxicity, damage mechanisms caused by aluminum has not been explained yet.

Oxidative stress due to the broken balances of prooxidant/antioxidant in biological systems is correlated with a variety of pathological cases. Organism defense itself with antioxidant agents against free radicals showing prooxidant effect. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine ) is a powerful antioxidant which is secreted from pineal gland and decrease free radicals. Moreover, melatonin has the ability of increasing the activations and expressions antioxidant enzymes. Various studies have shown that melatonin has a protective role on tissue damages. In our study we aimed to put forward with histological, immunohistochemical and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) methods that the mechanisms of aluminum-induced damage and whether melatonin has a protective role on this damage or not.

In this study, 40 male Wistar albino rats were used and were divided into five groups. The first group as a control: serum physiologic, the second group as a control of melatonin: ethanol+serum physiologic, the third group: melatonin, the fourth group: aluminum sulfate ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) and the fifth group: aluminum sulfate ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) and melatonin injected three times a week for one month. Tissue samples from jejunum were fixed with Bouin solution for histological examinations. Tissue sections from paraffin blocks stained with Hematoxylin & Eosin (HE), Masson's trichrome and enforced Periodic Acid Schiff (PAS) reaction. Tissue sections were fixed with formalin and were prepared for immunohistochemical examinations of metallothionein (MT) and Ki-67. In biochemical methods myeloperoxidase (MPO) and total glutathione (GSH) levels were determined by ELISA.

Aluminum caused histological degenerative changes on small intestine tissues. We observed that increase of MT positive crypt cells and decrease of Ki-67 positive crypt cells. Also aluminum caused increase on MPO levels and decrease on GSH levels. When melatonin was applied, these findings showed similar results with values of the control groups. In consequence, we can say that melatonin has protective effects on aluminum-induced small intestine toxicity.

## 1. GİRİŞ

Dünyada yaygın olarak bulunan metallere biri olan alüminyum, endüstriyel gelişim ve kirlenme ile beraber hava, su, besinler ve çeşitli ilaçlar yoluyla insan vücuduna alınmaktadır (Erazi ve diğ., 2011). Alüminyumun vücut dokularında birikmesinin hedef organlarda hasara yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sırasıyla karaciğer, böbrek, beyin, kalp, kan ve kemik dokularında depolandığı görülmüştür (El-Maraghy ve diğ., 2001, Bogdanovic ve diğ., 2008). Alüminyum çeşitli dokularda serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonu yoluyla oksidatif strese yol açmaktadır (Krewski ve diğ., 2007, Garcia ve diğ., 2009). Son yıllarda nöron hasarlarına yol açan metal iyonlarından en çok alüminyum üstünde durulmaktadır. Nehru ve Anand (2005) tavşan beyin dokusunda yaptıkları çalışmada alüminyumun lipid peroksidasyonunda artışa ve antioksidan enzim değerlerinin azalmasına etki ettiğini göstererek, alüminyumun nörotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. Alüminyum toksisitesi ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, alüminyumun neden olduğu hasarın mekanizması açık değildir (Han ve diğ., 2000).

Prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres, serbest radikallerin oluşmasına ve bu radikallerin organizmaya hasar vermesine neden olur (Kranner ve Birtic, 2005). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. En önemli etkiyi lipidler üzerinde gösterirler (Kelly ve diğ., 1998, Droge, 2002). Serbest radikallerin etkisi sonucu oluşan lipid peroksidasyonu, hücrelerde kendi kendini katalizleyerek devam eder ve hasar önlenemez duruma gelir (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006).

Antioksidanlar, serbest radikallerin sebep olduğu peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyici etki gösterirler. Bu etkiyi enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla gerçekleştirirler. Enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) epifiz bezinden (pineal bez) salgılanan ve serbest radikalleri

azaltabilen güçlü bir antioksidandır (Brzezinski, 1997). Ayrıca melatonin antioksidan enzimlerin aktivitesini ve salınımını artırma yeteneğindedir. Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilir (Hardeland ve Poeggeler, 2008). Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde melatoninin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Ianas ve diğ., 1991, Merle ve diğ., 2000, Reiter ve diğ. 2003).

Yemek borusu, mide, ince ve kalın bağırsaktaki bir veya birkaç bölümde kalınlaşma olarak tanımlanan Crohn hastalığı, en çok ince bağırsakta görülmektedir (Lerner, 2007). Crohn hastalığının genetik, mikrobik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan immünolojik bir hastalık olduğu belirtilmektedir (Çokuğraş, 2011). Alüminyumun gastrointestinal sistemlerde oluşturduğu hasarın Crohn hastalığı ile ilgili olabileceğini gösteren hipotezler bulunmaktadır (Perl ve diğ., 2004, Sartor, 2006).

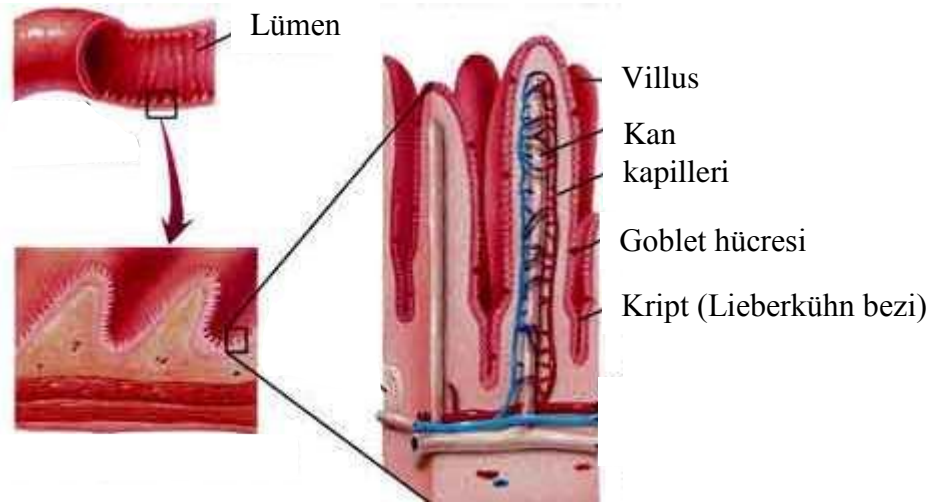
Alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ile yaptığımız bu çalışmada Hematoksilen & Eozin (HE), Masson'un üçlü boyası ve Periodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulanan doku kesitleri histolojik hasarı değerlendirmek üzere incelendi. Ayrıca çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen, ağır metalleri bağlayabilen, düşük moleküler ağırlıklı bir protein olan metallothionein (MT) (Cobbet ve Goldsbrough, 2002) ve hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde gösteren, mitotik indeks ve tümör evrelemesinde sıklıkla kullanılan Ki-67 proteini (Aguilar-Nascimento, 2006) immünohistokimyasal olarak gösterildi. ELISA yöntemi ile oksidatif hasar belirleyicisi olarak miyeloperoksidaz (MPO) değerleri ve antioksidan etkiyi gözlemlemek için total glutatyon (GSH) değerleri tespit edildi.

Çalışmamızda, alüminyumun ince bağırsak dokusunda oluşturduğu hasarları, iltihabi bir hastalık oluşturup oluşturmadığını ve bu hasarlar üzerinde melatoninin iyileştirici bir etkisinin olup olmadığını *in vivo* deneysel bir modelle ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızın sonuçlarının Crohn hastalığını oluşturan sebeplere de ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. İNCE BAĞIRSAK

İnce bağırsak son besin sindiriminin, metabolit emiliminin ve endokrin salınımının yapıldığı yerdir. Sindirim olayı sindirim ürünlerinin epitel hücreleri tarafından emildiği ince bağırsakta tamamlanır. İnce bağırsağın apikal kısmında besinlerin emilimi için özelleşmiş emici hücreler (enterositler) ve aralarında mukus üretiminde görevli goblet hücreleri bulunmaktadır. İnce bağırsak mukozası üç tabakadan oluşur; epitelyum, lamina propria ve muskularis mukoza. Mukozal yüzeyde villus ve kriptler (Lieberkühn bezleri) olmak üzere iki önemli yapı bulunur. Mukozanın emilim yüzeyini artıran villuslar, kriptleri oluşturmak üzere mukozanın derinliklerine dek uzanır. Kriptler de villusların arasına açılarak çöküntüler oluştururlar (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: İnce bağırsağın genel yapısı.

İnce bağırsağın duodenum, jejunum, ve ileum olmak üzere anatomik olarak üç temel kısmı bulunmaktadır. Duodenum, midenin pilor bölgesinden jejunum ile olan bileşke kısmına kadar uzanmaktadır. Submukoza tabakasında Brunner bezleri içermesi ve villuslarının geniş, kısa olması belirgin özelliğidir. Brunner bezlerinin boşaltım kanalları kriptlerin içerisine boşalmaktadır. Jejunumda villuslar daha uzun, kriptler daha derindir. Submukozada bez bulunmamaktadır. Mikrovillusların enzim aktivitesi ve besin absorpsiyon kapasitesi daha fazladır. İleum, jejunuma kıyasla villusların daha



kısa olmasıyla ve iri nodüller oluşturan Peyer plaklarıyla ayırt edilir. Jejunuma oranla besinler, su ve elektrolitlere daha az geçirendir (Junquera ve Carneiro, 2009).

## 2.2. ALÜMİNYUM

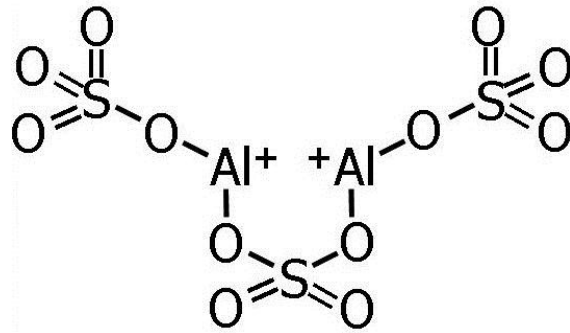
Atom ağırlığı 26.98 g/mol olan alüminyum, doğada en fazla bulunan elementlerden biridir. Bu nedenle bütün organizmalar belli miktarlarda alüminyum içerir (Alfrey, 1984). Alüminyumun bilinen biyolojik bir özelliği yoktur. Özellikle gıdalarda asidik, tuz veya alkali özellik gösterebilir (Farina ve diğ., 2002). Alüminyum ve tuzları gündelik hayatta çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Becaria ve diğ., 2002). Su arıtımında, cam ve seramik üretiminde, ahşap korumada, ahır ve mezbahaların dezenfeksiyonunda, ham petrolün arıtılmasında, kumaş boyamada, parşomen kağıdının üretiminde, paketleme maddelerinde ve plastiklerde doldurucu madde olarak kullanılmaktadır (Greger ve Sutherland, 1997, Yenigül, 2006).

Alüminyum hem bitkiler, baharatlar gibi doğal kaynaklardan hem de çeşitli amaçlar için deneysel yollarla elde edilebilir. Ağırlıklı olarak gıda ürünleri ve içme suyunda bulunmaktadır (Yokel ve McNamara, 2001). Gıda katkı maddeleri ve diğ. macunları alüminyumun en yaygın kullanım alanlarıdır. Ayrıca mısır, kaşar peyniri, baharatlar, otlar, çay ve kozmetik ürünler alüminyumun bulunduğu ortamlardır (Malekshah ve diğ., 2005). Tıp alanında ise alüminyum bileşikleri asit nötralize edici, fosfat bağlayıcı, aspirin tamponu, böbrek rahatsızlığı olan hastalarda plazmadaki fosfor oranını düşürücü olarak kullanılmaktadır. Aşılar ve allerjen enjeksiyonlarında da alüminyum bulunmaktadır (DRAFT, 2000, Nayak, 2002).

Alüminyum, insan sağlığını olumsuz olarak etkilemektedir (Osinska ve diğ., 2004). ATSDR (Toksik Maddeler ve Hastalıkları Ajansı, 2008)'nin açıklamasına göre alüminyum insanlar için potansiyel bir toksik maddedir. Beyin (Albendea ve diğ., 2007), karaciğer (Bogdanovic ve diğ., 2008), böbrek (Amer, 2008), testis (Kutlubay ve diğ., 2007), mide, paratroid, bağırsak (Krewski ve diğ., 2007) ve kan dokusu (Gonzales-Suarez ve diğ., 2003, Turgut ve diğ., 2004, Turgut ve diğ., 2007) gibi çeşitli doku ve organlarda alüminyumun toksik etkiye sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca alüminyum, beyin dokusunda oksidatif hasara ve sonuçta Alzheimer hastalığına yol

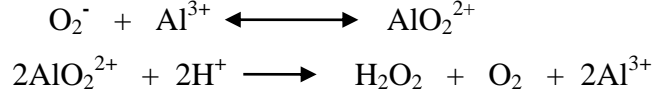
açmaktadır (Esparza ve diğ., 2003). Kronik alüminyum alınımları ise kemikte fosfor ve kalsiyum bozukluklarına ve osteomalasi olarak adlandırılan kemik yumuşaması hastalığına yol açmaktadır (Garcia ve diğ., 2009). Ayrıca, alüminyumun östrojen gibi önemli hormonların yapısını bozduğu ve kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Darbre, 2006).

Alüminyumun farklı formları farklı gastrointestinal absorpsiyona sahiptir. Alüminyum klorür, alüminyum sitrat ve alüminyum hidroksitinin sıçan mide, ince bağırsak ve kolon dokusunda az miktarda bulunabileceği gözlenmiştir (Whitehead ve diğ., 1997). Özellikle alüminyum sülfat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), ince bağırsak dokularında yüksek absorpsiyon oranından dolayı hayvan deneylerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cunat ve diğ., 2000) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Alüminyum sülfat genel yapısı.

Alüminyumun biyokimyasal olarak canlı dokularında herhangi bir metabolizması bulunmadığı ve başka bileşikler tarafından dokulara ulaştırıldığı düşünülmüştür. Toksik etkisinin, reaktif oksijen türlerinin oluşumu sonucu olduğu öne sürülmüştür (Exley, 2003, 2004). Serbest bir radikal olan süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) ile alüminyumun ( $\text{Al}^{3+}$ ) reaksiyonu sonucunda yarı kararlı radikal olan alüminyum oksit ( $\text{AlO}_2^{2+}$ ) oluşur. Alüminyum oksit ortamdaki hidrojen iyonu ile ( $\text{H}^+$ ) ile katalizlenerek oksijen ( $\text{O}_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşmasına sebep olur (Exley ve diğ., 2010). Bu da alüminyumun bir prooksidan olduğunu ve toksik etkisinin temelde serbest radikal oluşumu ile ilgili olduğunu göstermektedir (Moumen ve diğ., 2001, Anane ve diğ., 2001) (Şekil 2.3).



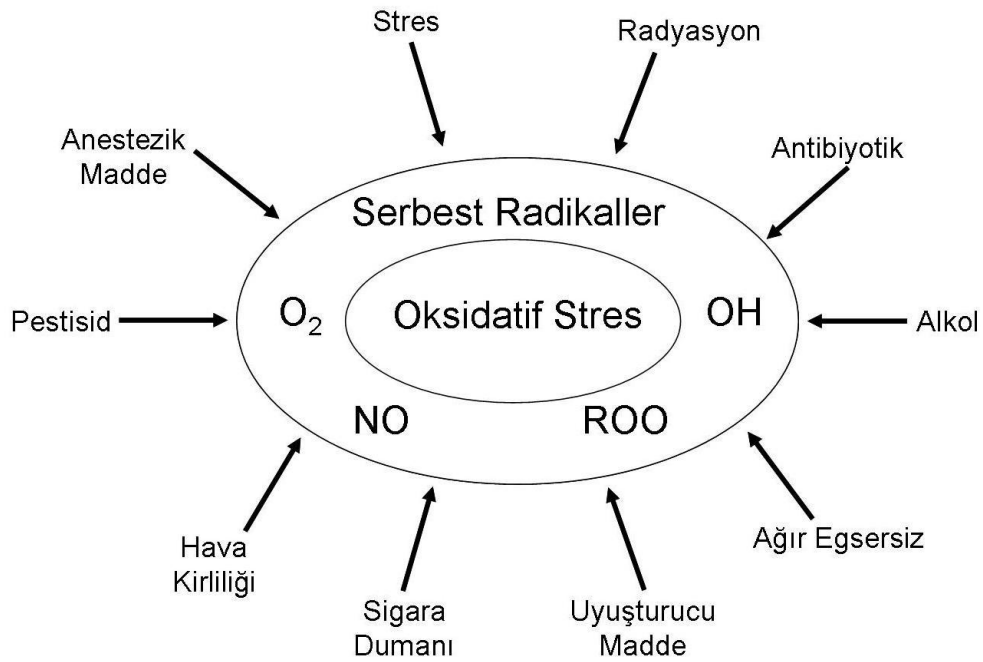
Şekil 2.3: Alüminyum oksidasyonu (Exley ve diğ., 2010).

Yemek borusu, mide, ince ve kalın bağırsaktaki bir veya birkaç bölümde kalınlaşma olarak tanımlanan Crohn hastalığı, ülserler oluşturan bir hastalıktır. Hastalık ağızdan rektuma kadar sindirim sisteminin tüm bölümlerini tutabilmesine rağmen en çok ince bağırsakta görülmektedir. Bağırsaktaki kalınlaşma bu bölgelerde darlıkların oluşmasına yol açmaktadır. Hastalıklı bölgeler birkaç santimetre uzunlukta olabileceği gibi bir metreyi aşan uzunlukta da olabilmektedir (National Digestive Diseases, 2006, Lerner, 2007). Yapılan çalışmalar sonucu, genetik bozukluk (Bamias ve diğ., 2002), immün sistemin zayıflaması (Kontoyiannis ve diğ., 2002) gibi durumlarda Crohn hastalığının oluşabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Crohn hastalarında alüminyum seviyesinin normalin üstünde olduğunu (Sartor, 2006, Merkle, 2007), vücutta bulunan kommensal enterik bakterilerin, alüminyum ve demir varlığında, mukoz bariyeri aşabileceğini, sonuçta da metaller varlığında Crohn hastalığının oluşabileceğini ileri süren hipotezler bulunmaktadır (Pizarro ve diğ., 2003, Perl ve diğ., 2004).

### 2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

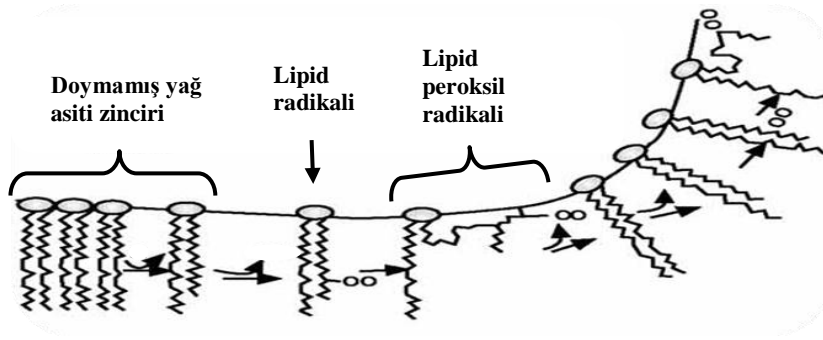
Serbest radikaller, yapılarında bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin atom veya moleküllerdir (Valko ve diğ., 2007). Bu moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı diğer moleküllerden elektron aktarımı yaparak aktif duruma gelirler (Davies ve Pryor, 2005). Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikal türleri, oksijenden oluşan süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ), singlet oksijen ( $\text{O}^\cdot$ ), nitrik oksit ( $\text{NO}^\cdot$ ), hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) ve peroksil radikali ( $\text{ROO}^\cdot$ )'dir (Wu ve Cederbaum, 2003). Bunların yanında hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), serbest radikal olmadığı halde, en reaktif serbest radikal olan  $\text{OH}^\cdot$ 'i oluşturma özelliğinden dolayı reaktif oksijen türevi olarak kabul edilir (Halliwell ve Whiteman, 2004). Serbest radikaller mitokondriyal solunum zinciri gibi aerobik enerji metabolizması ile oluşabildikleri gibi sitoplazmik, peroksizomal, lizozomal gibi hücresel süreçler sonucu da oluşurlar (Kohen ve Nyska, 2002). Radyasyon (Shuryak ve Brenner, 2009), antibiyotikler (Hassett ve Imlay, 2007), ağır egzersiz, alkol, uyuşturucu

maddeler (Wu ve Cederbaum, 2003), pestisidler, sigara dumanı, hava kirliliği (Kelly, 2003), anestezipler ve stres gibi dış kaynakların etkisiyle de meydana gelirler (Kumbul, 2007) (Şekil 2.4). Alüminyum gibi toksik metallerin etkisiyle de oluşan serbest radikaller (Simonovicova ve diğ., 2003) hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler (Darko ve diğ., 2004, Pereira ve diğ., 2010). En önemli etkiyi lipidler üzerinde gösterirler (Kelly ve diğ., 1998, Droge, 2002).



Şekil 2.4: Serbest radikal oluşumuna etkili dış etkenler.

Lipid peroksidasyonu (LPO), oluşan serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olduğundan oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikali meydana gelir. Bu radikal diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer ve yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar. Yeni lipid radikalleri de açığa çıkan hidrojen atomlarını bağlayarak lipid hidroperoksidine dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Akkuş, 1995, Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006) (Şekil 2.5).

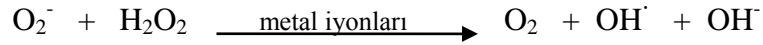


Şekil 2.5: Lipid peroksidasyonu oluşum şeması (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006).

Oksidatif stres, hücre membranlarındaki lipid tabakasının peroksidasyonu ile sonuçlanan serbest radikallerin fazla üretilmesi ve vücudun antioksidan mekanizmalar ile serbest radikallere kendini savunması arasındaki orantısızlık olarak tanımlanır. Bu dengedeki bozulma lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre büyümesinin inhibisyonu (Özden, 2008) gibi etkilerin yanı sıra çok çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında, kanser oluşumunda (Tandon ve diğ., 2005), yaşlanmanın patogeneğinde (Altınışik, 2000), diyabette (Morhan ve diğ., 2010), iskemi/reperfüzyon travmalarında (Lai ve diğ.,2000), inflamatuvar hastalıklarda (Chowdhury ve Soulsby, 2008) ve nörodejeneratif hastalıklarda (Andersen, 2004) rol almaktadır.

Oksidatif stresin zararlı etkilerinin yanında, vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli bir rolü vardır (Turna, 2008). Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan oksijen bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülmektedir (Jones, 2008). Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiğin üretimi, biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (Lesgards ve diğ., 2011). Ancak ortamda serbest oksijen radikalleri sayıca arttığında, ortamdaki başka iyonlarla etkileşime girerek, hasar vermeye başlamaktadırlar (Andreyev ve diğ., 2005).

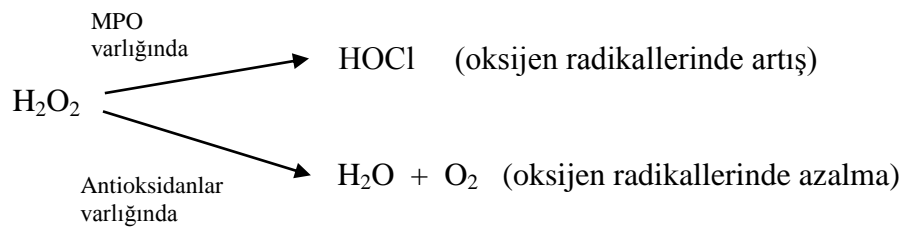
Birçok canlı sistemde süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Bu iki radikal birbirleriyle reaksiyon vererek daha etkili bir radikal olan hidroksil ( $OH^\cdot$ ) radikalini oluştururlar (Droge, 2002). Normal fizyolojik durumlarda  $OH^\cdot$  oluşumu yüksek oranda görülmez. Demir, bakır gibi temel metal iyonlarının yanı sıra krom, vanadyum, kobalt, civa, nikel ve arsenik gibi ağır metal iyonlarının varlığında çok yüksek oranda  $OH^\cdot$  oluşmaktadır (Valko ve diğ., 2005). Ortamdaki  $H_2O_2$  metal iyonlarıyla reaksiyona girerek  $OH^\cdot$  radikalini oluşturur. Yapısı bozulan metal iyonu ortamdaki  $O_2^-$  ile reaksiyona girer ve tekrar  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmeye hazır hale gelir ve döngü tekrarlanır (Jomova ve diğ., 2010) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6:  $H_2O_2$  ile metal iyonlarının reaksiyonu ve  $OH^\cdot$  radikali oluşumu.

### 2.3.1. Miyeloperoksidaz (MPO)

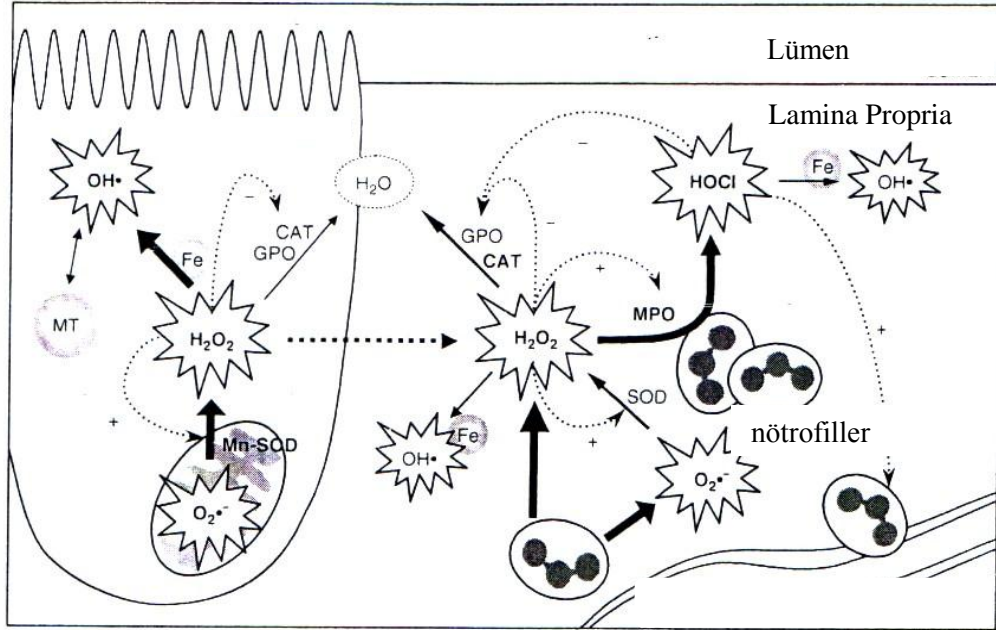
Miyeloperoksidaz, memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzimdir. MPO, halojen (halit) iyonlardan (iyodit, bromit, klorit) birinin bulunduğu bir ortamda  $H_2O_2$ 'yi hipokloröz asite ( $HOCl$ ) dönüştürür (Şekil 2.7). Hipokloröz asit, güçlü bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır (Özelçi-Kavas, 1994, Develioğlu, 1998, Hycult HK-105).



Şekil 2.7: MPO'nun oksijen radikallerine etkisi.

Doku membranında veya doku sıvısında herhangi bir hasar sonucu serbest radikallerin oluşması, süperoksit dismutaz (SOD), nitrik oksit sentaz (NOS) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi enzimlerin süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroklorik asit gibi reaktif ürünleri ortaya çıkarmasına yol açmaktadır (Ambrosone ve diğ., 2005). Fagositlerden kaynaklanan bu oksidanlar doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadır. MPO varlığında oluşan  $HOCl$ , antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidazın

(GSH-Px) etkisini engelleyerek oksidatif strese ve doku hasarına yol açmaktadır (Sureda ve diğ., 2005) (Şekil 2.8).



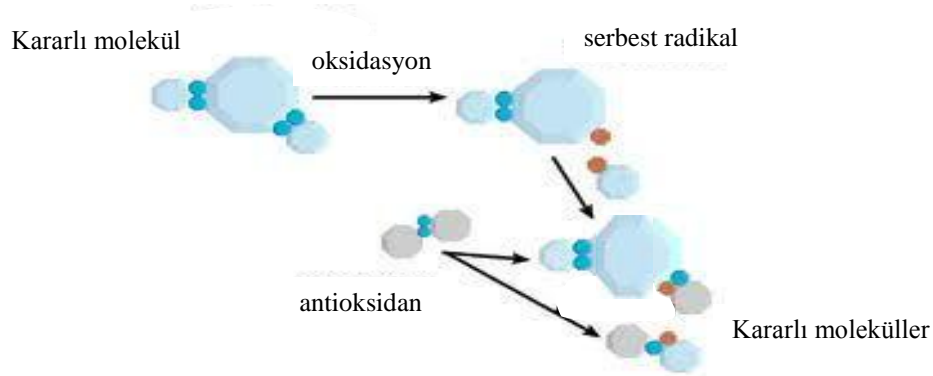
Şekil 2.8: İnce bağırsakta meydana gelen oksidatif stres şeması (Kruidenier ve diğ., 2003).

MPO enziminin bir oksidatif hasar belirleyicisi olarak kullanılması, oluşturduğu HOCl'nin antioksidanların aktivitesini engellemesi ve doku hasarını artırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bunun yanında oksidatif hasarı önlemek amacıyla kullanılan güçlü antioksidanlar varlığında MPO değerlerinin azaldığı gösterilmiştir (Honda ve diğ., 2009, Naito ve diğ., 2010).

## 2.4. ANTIOKSİDANLAR

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için canlılarda 'antioksidan' olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyici etki göstermektedirler (Cadenas ve Packer, 2002). Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Genelde antioksidanlar reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı veya yenilenmesi gibi oldukça farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını

ortaya koyarlar (Akkuş, 1995). İdeal bir antioksidan bu etki şekillerinden birçoğunu yerine getirebilme özelliğine sahiptir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (Turna, 2008) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Antioksidanların serbest radikallere etkisi.

Antioksidanlar, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler. Bu mekanizmalar, oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan toplayıcı etki, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getiren baskılayıcı etki, oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen zincir kırıcı ve onarıcı etki mekanizmalarıdır (Altınışık, 2000, Jones, 2008).

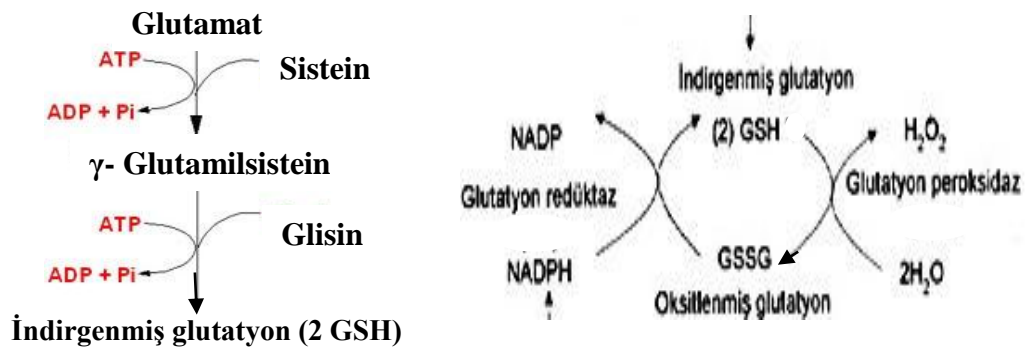
Antioksidan mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla oluşurlar. İlk ve temel antioksidan savunma enzimatik olarak yapılmaktadır. En önemli intrasellüler enzimlerin süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd) ve katalaz (CAT) olduğu bilinmektedir (Mates, 2000, Romeu ve diğ., 2002). Sonraki savunma hattı ise ekstrasellüler enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından oluşturulur (Cadenas ve Packer, 2002). Bunlar glutatyon (GSH) (Balahoroğlu ve diğ., 2008), melatonin (Aydoğdu ve diğ., 2007a, 2007b), vitamin E, vitamin C, beta-karoten (Taşkın ve diğ., 2008), transferrin, seruloplazmin (Arınola, 2004), albumin, bilirubin ve haptoglobin gibi bileşiklerdir (Jones ve diğ., 2003).



### 2.4.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) bir tripeptid olup 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. Vücutta GSH sentezinden sorumlu organ ise karaciğerdir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'nin amino asitleri olan glutamat ve sisteinden,  $\gamma$ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin ve  $\gamma$ -glutamilsisteinden glutasyonu oluşturur. GSH negatif geri bildirim ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir (Penninckx, 2000) (Şekil 2.10).

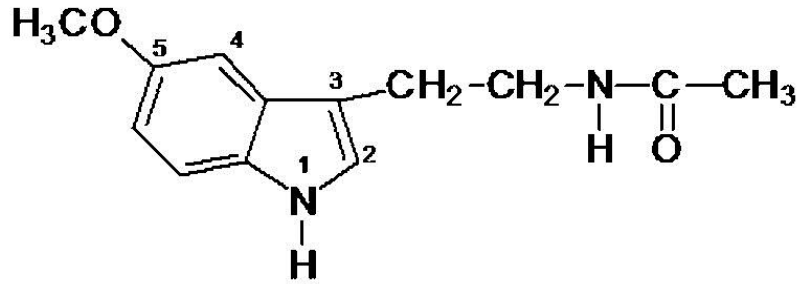
GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve diğ., 2005). Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH'nin non-enzimatik olarak veya GSH-Px'in enzimatik olarak oksidasyonu sonucu oluşan okside glutasyon (GSSG) ise oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. GSSG'nin glutasyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi tarafından GSH formuna indirgenmesi normal durumlar altında dengede olmasına karşı, hücrelerin oksidatif strese maruz kalması sonucu bu denge bozulabilmektedir (Arrick ve Nathan, 1984). Ortamdaki  $H_2O_2$  ile glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin kataliziyle reaksiyona giren GSH, okside glutatona (GSSG) dönüşürken serbest radikal oluşumunu da engellemektedir (Andreyev ve diğ., 2005).



Şekil 2.10: Glutasyon (GSH) sentezi ve hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) detoksifikasyonu.

### 2.4.2. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), memelilerin başlıca beyinde serebral yarım küreler arasındaki epifiz bezinden (pineal bez) ve ayrıca over, göz merceği ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur (Reiter ve diğ., 1997) (Şekil 2.11).



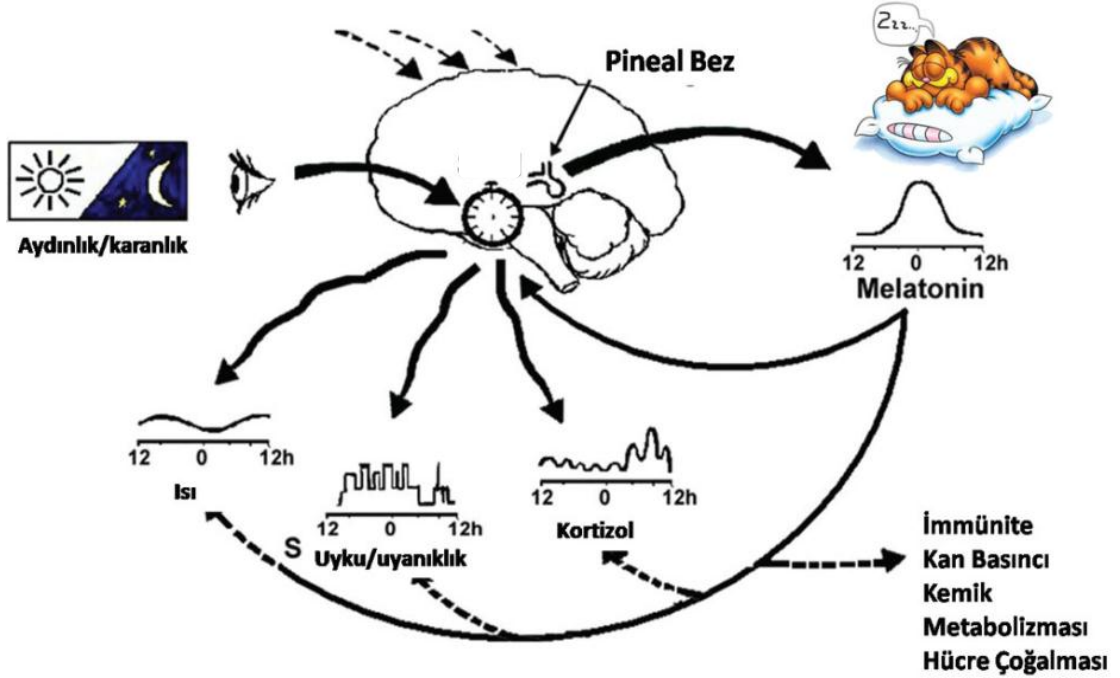
Şekil 2.11: Melatonin'in (N-asetil-5-metoksitriptamin) genel yapısı.

Melatonin sentezi sirkadian ritim gösterir. Sirkadian ritim, tüm ökaryotik organizmalarda varolan zamana bağlı devirsel işlemleri düzenleyen biyolojik saattir (Campbell ve Reece, 2006) (Şekil 2.12). Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olarak, pineal bezde melatonin sentezini başlatırlar. Sentezini takiben pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen melatonin, membran reseptörleri aracılığıyla hedef organlara ulaşır. Melatonin suya göre lipit çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Hardeland ve diğ., 1993).

Ayrıca melatonin lipofilik özelliği nedeniyle bütün hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde melatoninin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Reiter ve diğ., 2003, Karbownik ve Reiter, 2000, Yüce ve Aksakal, 2006, Li ve diğ., 2008, Toklu ve diğ., 2009).

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla birlikte, serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Melatoninin en güçlü serbest radikal tutucu olduğu ileri sürülmektedir. Bu

nedenle melatonine olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Millan-Plano ve diğ., 2010).



Şekil 2.12: Melatonin'in ritim düzenleyici rolü.

Melatoninin bir antioksidan olduğu ilk kez 1991 yılında Ianas ve diğ. (1991) tarafından öne sürülmüş ve bu görüş daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir (Merle ve diğ., 2000). Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, melatoninin antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir (Brzezinski, 1997, Reiter ve diğ., 2003) :

- 1) Direkt antioksidan etki: Oksidatif strese yol açan serbest radikallerle reaksiyona girerek onların zararlı etkilerini önlemesidir.
- 2) Antioksidan enzim aracılı etki: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırıcı etki göstermesidir.
- 3) Prooksidan enzim aracılı etki: Hidrojen peroksit, nitrik oksit gibi prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azaltıcı etki göstermesidir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmada, Wistar albino cinsi, 40 adet, düzenli siklusa sahip, 180-230 g ağırlığında, 12-14 haftalık, ergin erkek sıçan kullanılmıştır. Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 102 sayılı kararı ile etik kurul onayı verilmiştir. Deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde (DETAE) yetiştirilmiştir. Deney öncesi ve süresince sıçanlar kontrollü laboratuvar şartlarında, 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 21-23 °C sabit sıcaklıkta, bağıl nemin % 40-60 olduğu odada, yeterli ölçüde standart pellet yemi ve şehir suyu ile beslenmişlerdir (Institute for Laboratory Animal Research, 2011).

Alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ve melatonin, Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)'dan temin edildi. Alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) % 0.9 serum fizyolojikte çözüldü. Melatonin ise % 2 etanol ve % 0.9 serum fizyolojik karışımında hazırlandı.

Rastgele seçilen hayvanlar herbirinde 8'er adet sıçan bulunan 5 gruba ayrıldı. Bir ay boyunca haftada 3 kez enjeksiyon yapıldı. Birinci grubu oluşturan kontrol grubu sıçanlara % 0.9 serum fizyolojik intraperitoneal yolla, ikinci grubu oluşturan melatonin grubunun kontrolü olan sıçanlara ise % 2 etanol içeren % 0.9 serum fizyolojik subkutan yolla enjekte edildi. Üçüncü grup sıçanlara subkutan yolla 10 mg/kg/gün melatonin, dördüncü gruba intraperitoneal yolla 5 mg/kg/gün  $Al_2(SO_4)_3$ , beşinci gruba da 5 mg/kg/gün  $Al_2(SO_4)_3$  intraperitoneal ve 10 mg/kg/gün melatonin subkutan yolla aynı anda enjekte edildi. Sıçanların vücut ağırlıkları her enjeksiyondan önce ölçüldü ve her bir kimyasal 0.5 ml/kg olacak şekilde deney hayvanlarına enjekte edildi.

Deney sonunda, diseksiyondan 24 saat önce, sıçanların oral beslenmesi kesildi. Sadece su içmelerine izin verildi. Anestezi sağlamak amacıyla 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne®, Hollanda) kas içine verildi. Diseksiyon işlemine başlanarak sıçanların ince bağırsak dokuları Bouin ve % 10 tamponlu formalin fiksatiflerine alındı. Biyokimyasal çalışmalar için alınan dokular çalışmanın yapılacağı güne kadar PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) solusyonunda -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

### 3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Bouin fiksatifinde 22 saat fikse edilen dokular, rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafine gömüldüler. 5 µm kalınlığında alınan doku kesitlerine, Hematoksilen & Eozin (HE), Masson'un üçlü boyası ve Periodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı (Humanson, 1972). Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 model ışık mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP71 model kamera ile fotoğrafları çekildi. Histolojik hasar dereceleri Howarth ve diğ. (1996)'nin belirlediği kriterlerdeki bazı modifikasyonlarla (Arda-Pirinçci ve Bolkent, 2011) saptandı.

### 3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

% 10 tamponlu formalinde fikse edilen dokular, rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafinde bloklandılar. 4 µm kalınlığında alınan doku kesitleri mouse anti-metallotionein (MT, Invitrogen Lot: 730693A) ve anti-Ki-67 (Millipore, Cat:AB9260) primer antikolarıyla 'streptavidin-biotin peroksidaz' yöntemi (Javois, 1999) kullanılarak immünohistokimyasal olarak incelendi.

#### 3.2.1. Metallotionein (MT) Uygulaması

Parafin bloklardan alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler Histogrip (Invitrogen, 00-8050) kaplı lamlara alındı. Kesitler etüvde bir gece 37 °C'de bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (Invitrogen, 00-3002) ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponla (pH 6) mikrodalga fırında 700 Watt'ta 20 dakika inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 10 dakika peroksidaz engelleyici (Invitrogen, 00-2015) solüsyonda bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Histostain-Plus Broad Spektrum Kit (Invitrogen, 85-9043) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edildi. PBS ve % 3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan MT primer antikorla kesitler oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikör 20 dakika ve tekrar yıkamadan sonra

streptavidin peroksidaz 10 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 3 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Invitrogen, 00-2007) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitlere 45 saniye Hematoksilin solusyonu (Invitrogen, 00-8001) ile muamele edildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solusyon (Invitrogen, 00-8010) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

MT boyanma derecesi değerlendirilirken lamalar üzerinde 400 büyük büyütme alanında rastgele seçilen 10 kriptteki MT ile boyanan hücreler tüm hücrelere oranlanarak sayıldı. Boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{MT pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{MT pozitif kript hücre sayısı}}{\text{Toplam kript hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.2.1.1)$$

### 3.2.2. Ki-67 Uygulaması

Parafin bloklardan alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler Histogrip (Invitrogen, 00-8050) kaplı lamlara alındı. Kesitler etüvde bir gece 37 °C'de bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınan kesitler, 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (Invitrogen, 00-3002) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 30 dakika peroksidaz engelleyici (Invitrogen, 00-2015) solüsyonda bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Histostain-Plus Broad Spektrum Kit (Invitrogen, 85-9043) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edildi. PBS ile 1:25 oranında sulandırılarak hazırlanan Ki-67 primer antikoruyla kesitler oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikor 20 dakika ve tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz 10 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 6 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Invitrogen, 00-2007) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya

alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Hematoksilin solusyonu (Invitrogen, 00-8001) ile muamele edildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solusyon (Invitrogen, 00-8010) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

Ki-67 boyanma derecesi değerlendirilirken lamalar üzerinde 400 büyük büyütme alanında rastgele seçilen 10 kriptteki Ki-67 ile boyanan hücreler tüm hücrelere oranlanarak sayıldı. Ki-67 pozitif hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Hücre çoğalma indeksi (\%)} = \frac{\text{Ki-67 pozitif kript hücre sayısı}}{\text{Toplam kript hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.2.2.1)$$

### 3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Diseksiyondan sonra biyokimyasal çalışmalar için PBS solusyonuna alınan ince bağırsak dokularının analizlerine başlanmadan önce -20 °C'lik derin dondurucuda, daha sonrada +4 °C'de bir süre bekletilerek çözümleri sağlandı. Çözünen örneklerden ağırlıkları hesaplanan dokular alınarak, cam homojenizatör içinde her bir kit için önerdiği şekilde (Bölüm: 3.3.2 ve 3.3.3) homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri Sigma 12154 rotoru taşıyan Sigma 3K30 cihazı ile santrifüj edildi.

Dokudaki protein miktarı tayin edildi ve ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) çalışmaları için MPO sıçan ELISA kit (Hycult, HK-105) ve total GSH ELISA kit (Enzo Lab, 900-160) prosedürleri uygulandı.

#### 3.3.1. Total Protein Tayini

Dokuda protein miktar tayini için Lowry metodu kullanıldı (Lowry ve diğ., 1951). Proteinlerin yapısındaki aromatik halka içeren amino asitler, alkali ortamda ve bakır varlığında folin reaktifinde bulunan fosfomolibdotungustik asiti indirgeyerek mavi

renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan mavi rengin spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda verdiği absorbans şiddeti, protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı :

A Reaktifi : % 2 sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0.1 N NaOH içerisinde çözüldü.

B Reaktifi : % 0.5 bakır (2) sülfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), % 1 potasyum tartarat dihidrat içerisinde çözüldü.

C Reaktifi (Alkali bakır sülfat çözeltisi) : 50 ml A reaktifi ile 1 ml B reaktifinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

E Reaktifi : Merck, HC807325 marka Folin reaktifi kullanıldı.

Standart Çözelti : % 100'lük sığır serum albumin (BSA)'den (Sigma, A7906), % 0.9 serum fizyolojik ile stok çözelti oluşturuldu. Bu stoktan seyreltmeler yapılarak % 5, % 10, % 15 ve % 20'lik çalışma standart çözeltileri hazırlandı.

Doku Süpernatantı : % 0.9 serum fizyolojik ile 100 kat seyreltilerek hazırlandı.

Yöntem :

Kör, standart ve örnek tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı:

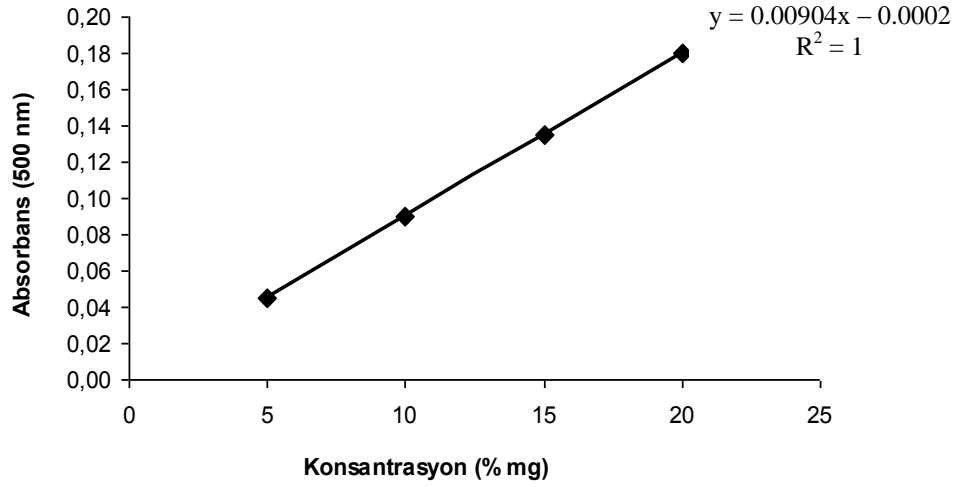
	Kör	Standart	Örnek
C reaktifi	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
FTS	0.5 ml	-	-
Standart çözelti	-	0.5 ml	-
Örnek	-	-	0.5 ml

Karışımlar hazırlandıktan sonra karıştırılıp, oda ısısında 10 dakika bekletildi. Sonra her bir tüpe 0.25 ml E reaktifi (Folin ayırıcı) eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700) 500 nm dalga boyunda absorbanslar köre karşı okundu.

Hesaplama :

Standart çözeltilerin çalışılması sonucu her bir çalışma standardı için elde edilen yaklaşık 30 değer aritmetik ortalamasının hesaplanmasıyla elde edilen grafik yardımı ile total protein tayini yapıldı (Şekil 3.1).





Şekil 3.1: Total protein standart grafiği.

Grafikten elde edilen denklemden yararlanılarak % mg protein miktarı bulundu. Bulunan değer seyreltme katsayısı (100) ile çarpıldı.

### 3.3.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Tayini

İnce bağırsak dokularından MPO sıçan ELISA kitinin önerdiği (Hycult, HK-105) şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlara ELISA yöntemi uygulanarak miyeloperoksidaz (MPO) miktarı tayin edildi.

Çözeltilerin Hazırlanışı :

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi.

Yıkama Tamponu : 20 kat distile su ile seyreltildi.

Dilüsyon Tamponu : Distile su ile 10 kat seyreltilerek hazırlanan A ve B dilüsyon tamponları 1:4 oranında birbiriyle karıştırıldı.

Biyotinli Solusyon: 1:11 oranında, hazırlanan dilüsyon tamponu ile seyreltildi.

Streptavidin-peroksidaz Solusyonu: 1:23 oranında, hazırlanan dilüsyon tamponu ile seyreltildi.

TMB (tetrametilbenzidin) ve durdurma solusyonu kullanıma hazır solusyonlardır.

Lizis Çözeltisi (RIPA) : Doku homojenizasyonu için kullanıldı. Her bir bileşenden belli oranlarda karıştırılarak, kullanılacağı gün hazırlandı. Her bir doku için 3 ml/g doku

olacak şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenatlar iki kere +4 °C'de 1500xg'de 15 dakika santrifüjlendi. Berrak süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

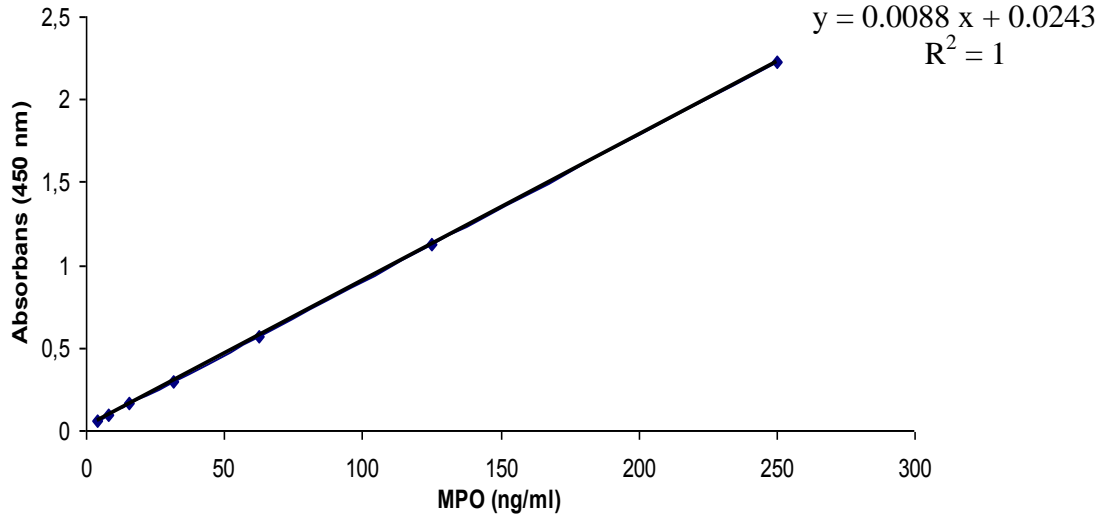
Standart Solusyon: 1 ml distile su enjekte edilerek hazırlandı. Her tüp aşağıdaki tabloda olduğu gibi hazırlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 : MPO standart solusyonlarının hazırlanışı.

Tüpler	Standart MPO Konsantrasyonu (ng/ml)	Dilüsyon Tamponu (µl)	Standart Solusyon (µl)
1	250	562	150 (standarttan)
2	125	225	225 (1'den)
3	63	225	225 (2'den)
4	31	225	225 (3'ten)
5	15.6	225	225 (4'ten)
6	7.8	225	225 (5'den)
7	3.9	225	225 (6'dan)
8	0	225	Kör

#### Yöntem:

Bütün kimyasallar oda ısısına getirildi. Tabloya göre hazırlanan standart solusyonlardan 100'er µl kuyucuklara kondu. Homojenize edilmiş doku örneklerinden 100 µl alınarak diğer kuyucuklara kondu. Oda ısısında 1 saat bekletildi. Daha sonra 4 kere 200 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. 4. yıkamadan sonra 100 µl hazırlanmış biyotinli solusyon kuyucuklara kondu. Oda ısısında 1 saat bekletildi. 200 µl yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrar edildi. 100 µl hazırlanmış streptavidin-peroksidaz solusyonu kondu. Oda ısısında 1 saat bekletildi. 200 µl yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrar edildi. 100 µl hazırlanmış TMB solusyonu kuyucuklara kondu ve karanlıkta oda ısısında 25 dakika bekletildi. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadı ve reaksiyonu durdurmak için 100 µl durdurma solusyonu eklendi. Solusyon eklendikten 30 dakika içerisinde ELISA okuyucuda 450 nm'de absorbans değerleri okutuldu. Elde edilen absorbanslar standart grafiğe göre hesaplandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: MPO standart grafiği.

### 3.3.3. Total Glutasyon (GSH) Tayini

İnce bağırsak dokularından total glutasyon tayin kitinin önerdiği (Enzo Lab., 900-160) şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlara ELISA yöntemi uygulanarak total glutasyon miktarı tayin edildi.

Çözeltilerin Hazırlanışı :

Çözelti Tamponu: 25 kat distile su ile seyreltildi.

Reaksiyon Karışımı: Toz reaksiyon karışımı içeren şişelere 8 ml distile su eklendi. 15 dk çözünmesi için orbital karıştırıcıda karıştırıldı. Daha önceden çalkalanmış 10 µl Glutasyon Redüktaz çözeltisi şişelere eklendi.

% 5 Metafosforik asit : Doku homojenizasyonu için kullanıldı. Her bir doku 20 ml/g doku olacak şekilde % 5 metafosforik asit ile homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C'de 14.000xg'de 15 dakika santrifüjlendi. Berrak süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Standartların hazırlanışı:

A'dan E'ye kadar harflendirilen 1., 2. ve 3. tüplerin hepsine, önceden hazırladığımız 50 µl çözelti tamponu konuldu. A1, A2, A3 tüplerinin üzerine 4 µl okside glutasyon

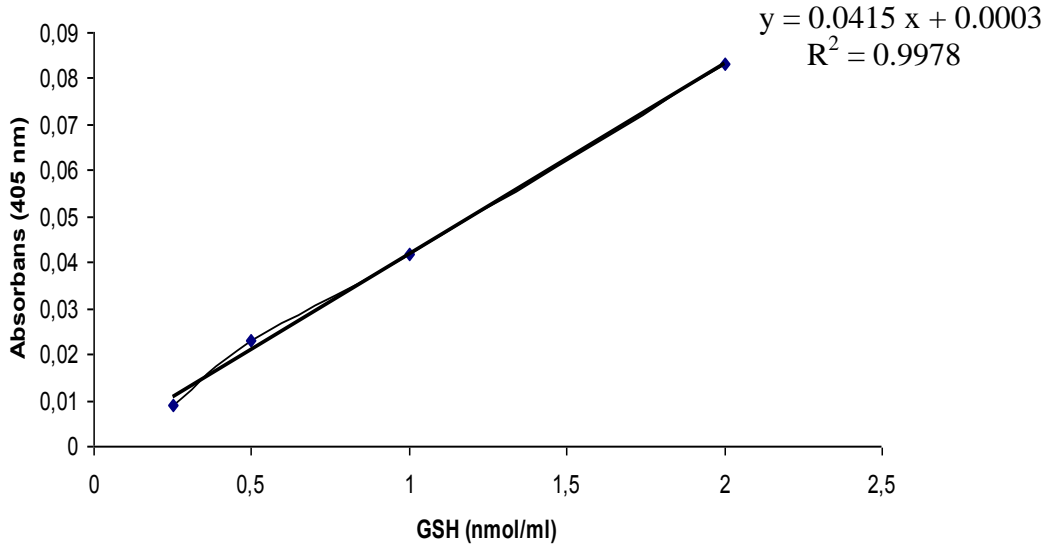
(GSSG) çözeltisinden eklendi. A1, A2 ve A3 tüplerindeki karışımdan 50 µl mikropipetle çekilerek B1, B2, B3 tüplerine aktarıldı. B1, B2 ve B3 tüplerinden çekilen 50 µl karışım C1, C2, C3 tüplerine konuldu. C1, C2 ve C3 tüplerinden çekilen 50 µl karışım D1, D2, D3 tüplerine eklendi. En son D1, D2 ve D3 tüplerinden 50 µl karışım çekildi ve atıldı. Her bir işlemde 10 kez pipetaj yapıldı. E grubundaki tüplere sadece 50 µl çözelti tamponu konuldu ve kör olarak kabul edildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.  
Çözelti Tamponu (Ç. T.), Okside Glutatyon (GSSG).

Tüp	Standart GSH Konsantrasyonu (pmol)	1	2	3
A	100	50µl Ç.T. 50µl GSSG	50µl Ç. T. 50µl GSSG	50µl Ç. T. 50 µl GSSG
B	50	50µl Ç. T. 50µl A'dan	50µl Ç. T. 50µl A'dan	50µl Ç. T. 50 µl A'dan
C	25	50µl Ç. T. 50µl B'den	50µl Ç. T. 50µl B'den	50µl Ç. T. 50µl B'den
D	12.5	50µl Ç. T. 50µl C'den	50µl Ç. T. 50µl C'den	50µl Ç. T. 50µl C'den
E	0	50µl Ç. T. (Kör)	50µl Ç. T. (Kör)	50µl Ç. T. (Kör)

Yöntem :

50 µl seyreltilmiş doku süpernatantları ELISA okuyucu kuyucuklarına kondu. Daha sonra her kuyucuğa 150 µl taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklendi. ELISA cihazında 1-10 dk arasında dakikada bir 405 nm dalga boyunda absorban değerleri okutuldu. Elde edilen absorbanlar standart grafiğe göre hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Total glutatyon standart grafiği.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal veriler, SPSS (Statistical package for the social sciences, 15.0) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandı. İkili gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan değerler için non-parametrik Kruskal-Wallis testi uygulandı. Sonuçlar 'ortalama  $\pm$  standart hata' olarak verildi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

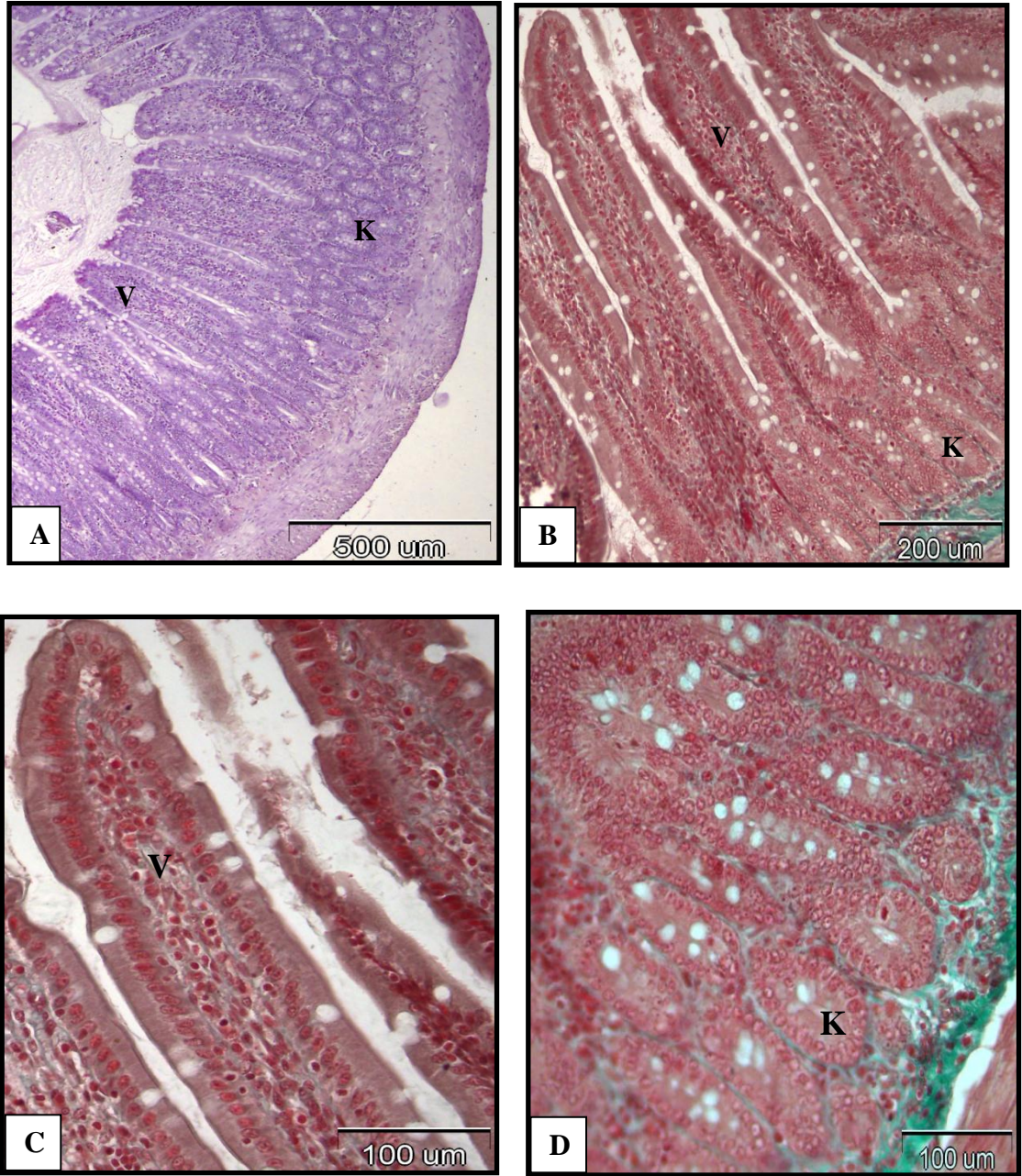
### **4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR**

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ince bağırsak morfolojileri ışık mikroskopik olarak incelendi ve elde edilen bulgular beş grup altında toplandı.

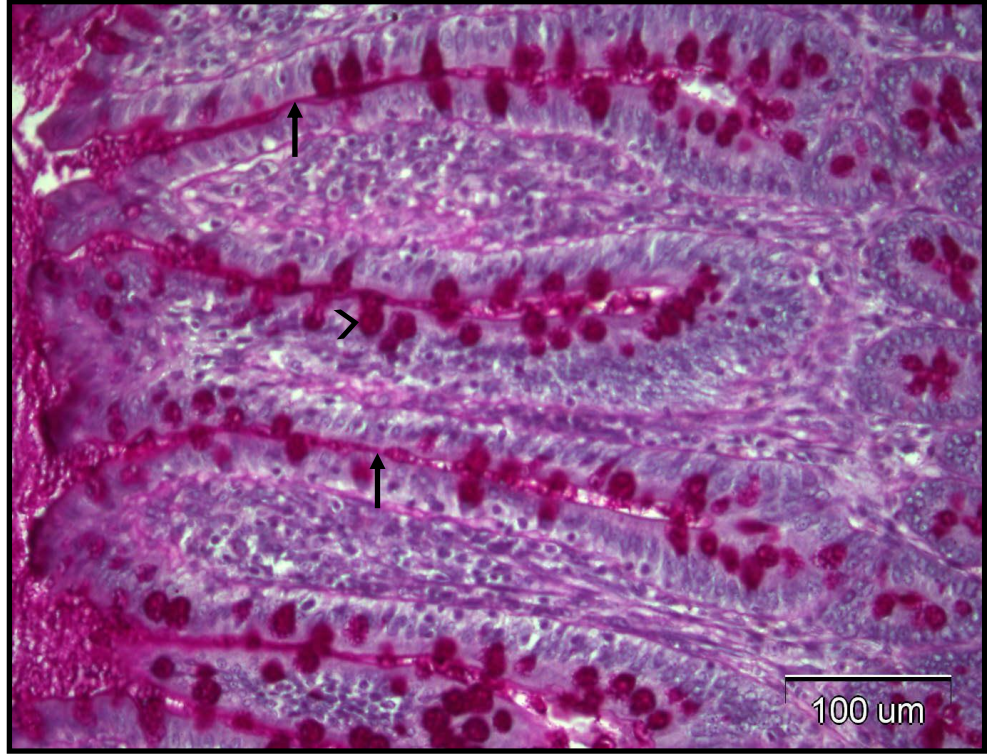
#### **4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular**

Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi (Şekil 4.1). HE, Masson'un üçlü boyası ve PAS reaksiyonu uygulanan kesitlerde ince bağırsağın jejunum bölgesinde lümene doğru epitel ve lamina proprea'nın yaptığı çıkıntılar olan ince uzun villuslarda epitel, tek katlı silindirik epiteldi. Villuslar arasında yer alan Lieberkühn bezlerinde de villus epiteli devam etmektedir. Bu epitel uzun, silindirik, absorptif (emici) hücreler ile bu hücreler arasında yer alan goblet hücrelerinden oluşmuştur.

Absorptif hücreler apikallerinde çizgili kenarı içerirler. Goblet hücreleri ise absorptif hücreler arasında yer alan, mukus içeren ve salgılayan hücrelerdir. Bu hücrelerin mukus salgısı ve absorptif hücrelerin çizgili kenarı şiddetli PAS pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: Kontrol grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm, (C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.

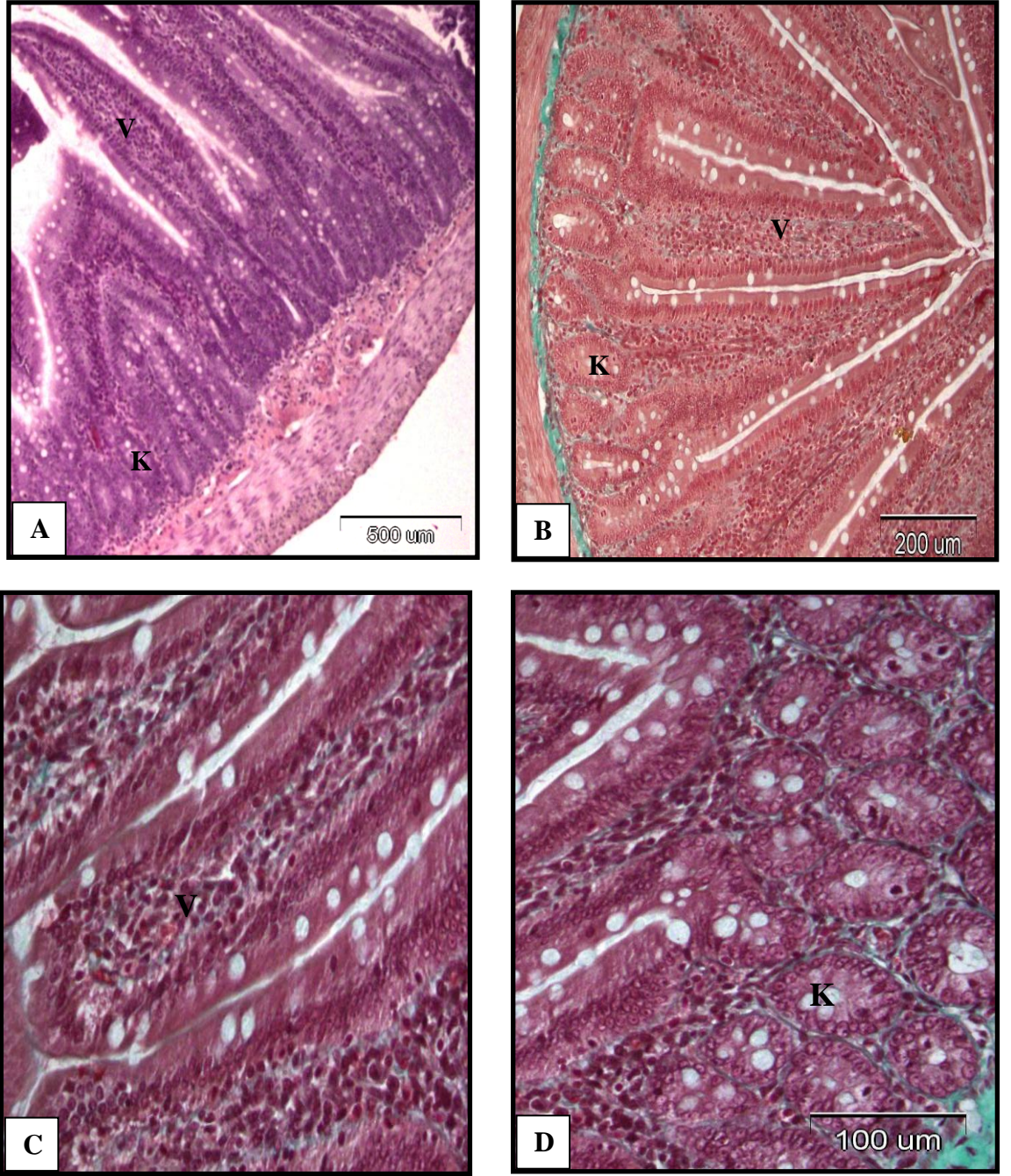


Şekil 4.2: Kontrol grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (→) ve goblet hücrelerinde (>) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

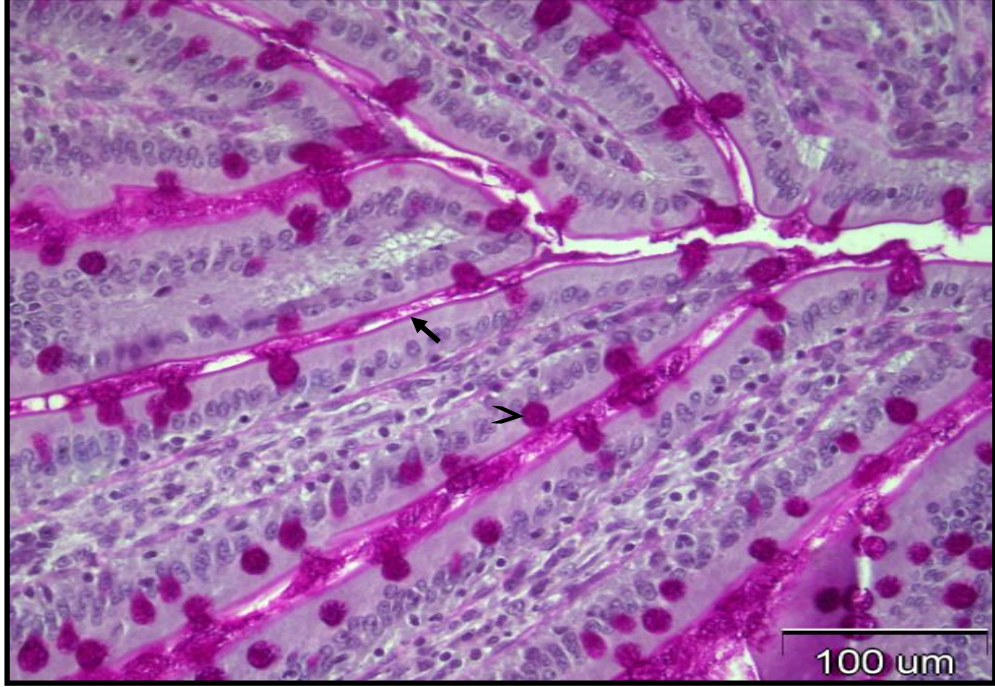
#### 4.1.2. Melatonin Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Etanol + serum fizyolojik verilen melatonin kontrol gruplarına ait histolojik kesitlerde ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi (Şekil 4.3). Çizgili kenar ve goblet hücrelerinde gözlenen PAS pozitif reaksiyon şiddetliydi (Şekil 4.4).





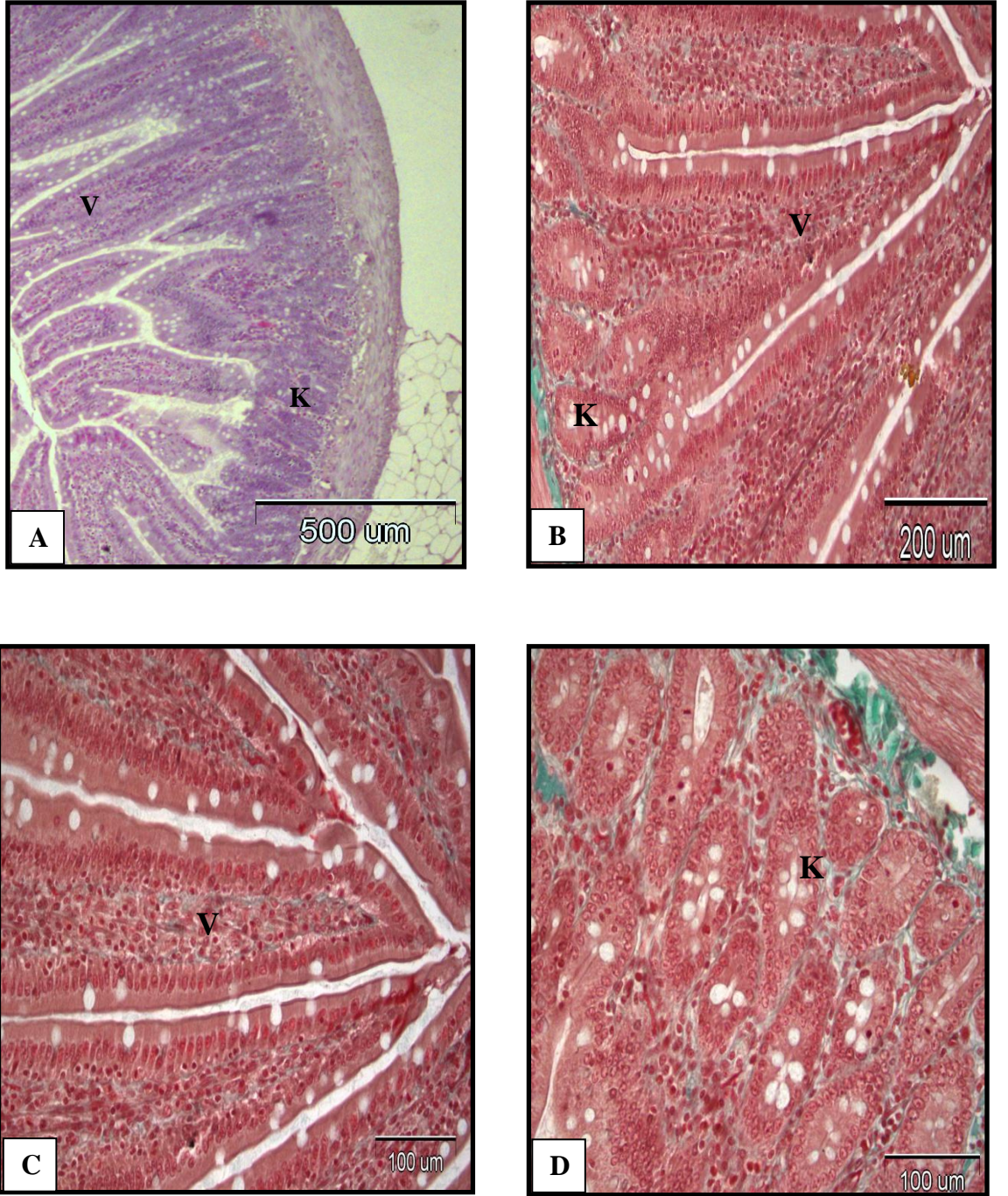
Şekil 4.3: Melatonin Kontrol grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm, (C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.



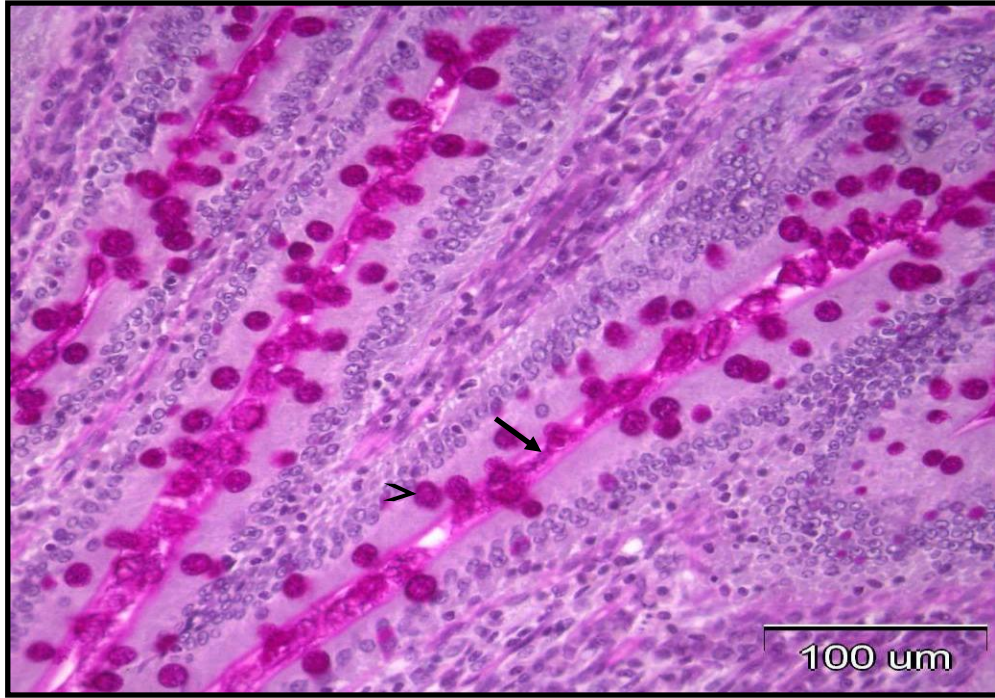
Şekil 4.4: Melatonin kontrol grubuna ait çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (➤) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.

#### 4.1.3. Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Melatonin gruplarına ait histolojik kesitlerde genel olarak ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi. Çizgili kenar ve goblet hücrelerinde gözlenen PAS pozitif reaksiyon şiddetliydi (Şekil 4.6).



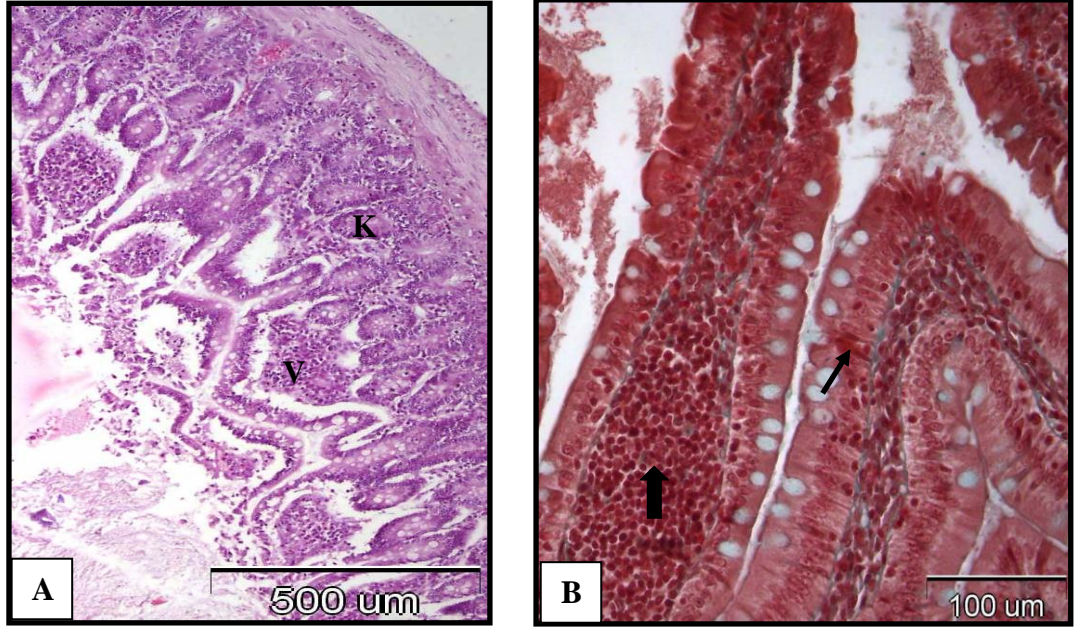
Şekil 4.5: Melatonin grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villus, K: kript. (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Genel görünüm, Masson, Bar: 200µm, (C) Villusların genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm, (D), Kriptlerin genel görünümü, Masson, Bar: 100 µm.



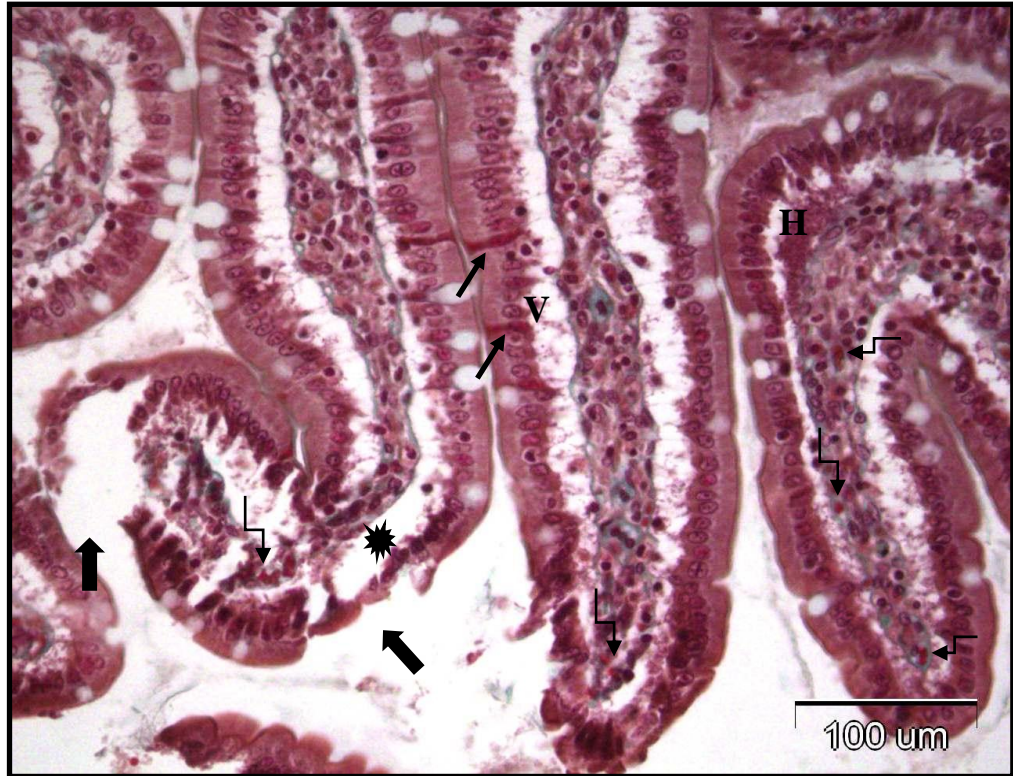
Şekil 4.6: Melatonin grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (>) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

#### 4.1.4. Alüminyum Grubuna Ait Histolojik Bulgular

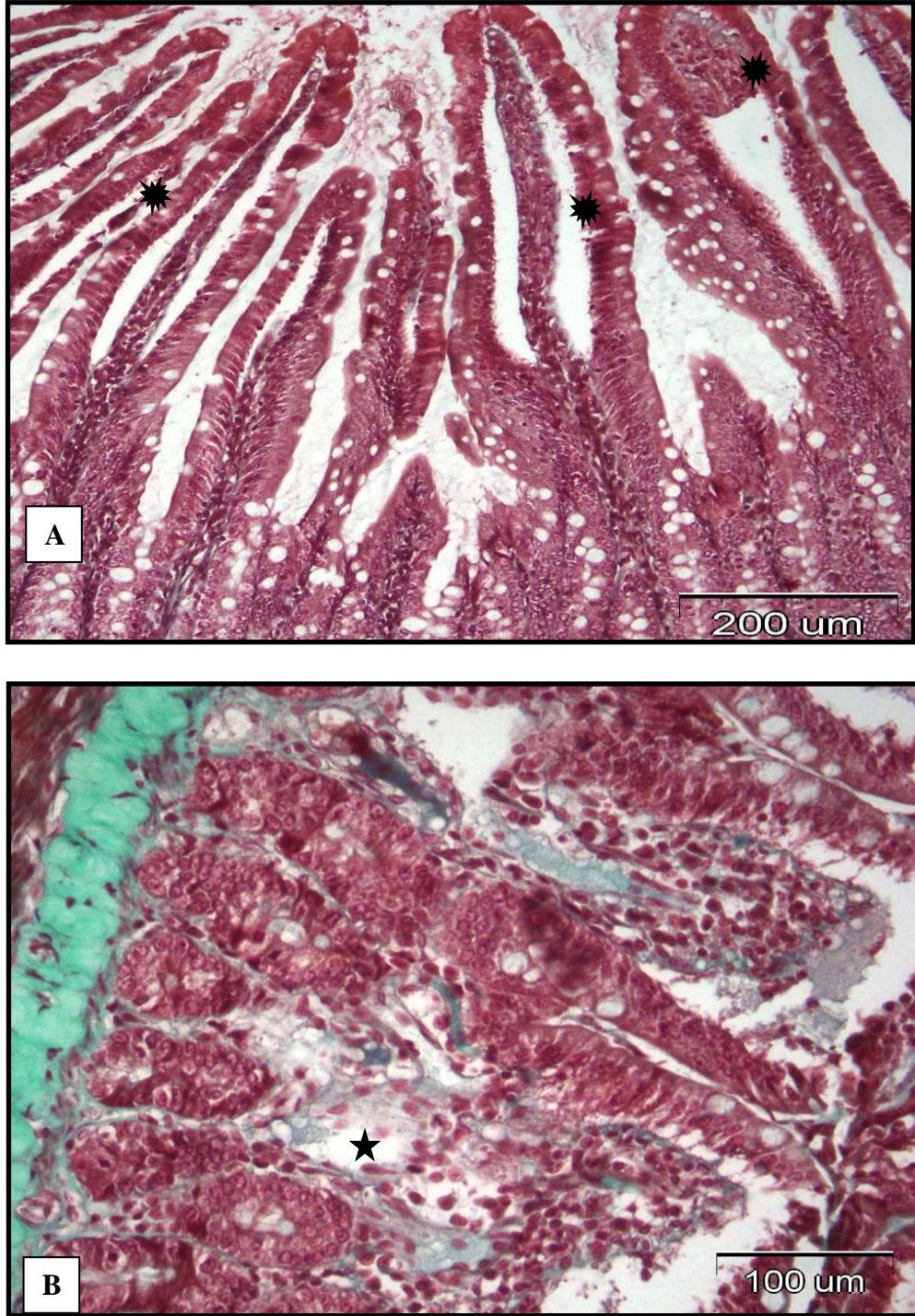
Alüminyum grubuna ait kesitler kontrol bireylerle karşılaştırıldığında mikroskobik olarak belirgin bir hasar tespit edilmiştir (Şekil 4.7A). İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (Şekil 4.7B), epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukoza ve submukozada hiperemi, çizgili kenarlarda devamsızlık, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, hiperplazi ve epitel hücrelerinde vakuolizasyon, villusların lamina propriasında ödem bu grupta belirgin olarak gözlenen bulgulardır (Şekil 4.8, 4.9A). Bu bulguların yanında bez bütünlüğünde bozulma ve mukozada nekrotik alan gözlenmiştir (Şekil 4.9B). Goblet hücrelerinde gözlenen PAS reaksiyon şiddetinin ise kontrol bireyelerine göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).



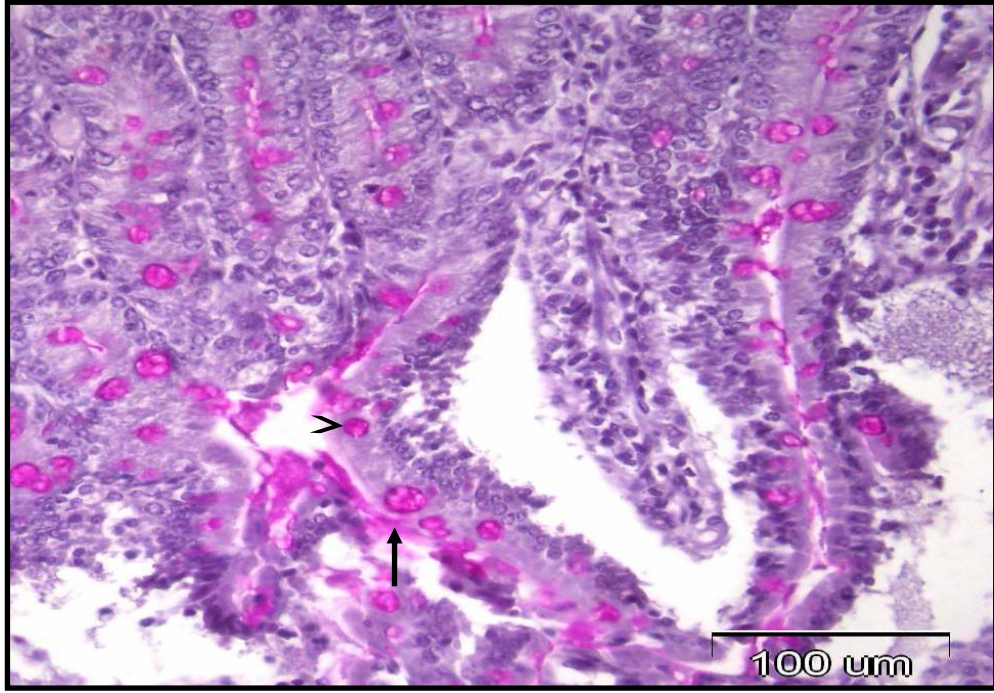
Şekil 4.7: Alüminyum uygulanan deney grubuna ait ince bağırsağının jejunum bölgesinin histolojik görünümü, V: villis, K: kript, (A) Genel görünüm, HE, Bar: 500 µm, (B) Villusların lamina propriasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre (➡), Masson, Bar: 100 µm.



Şekil 4.8: Alüminyum uygulanan deney grubuna ait jejunum kesitinin epitelinde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, çizgili kenarlarda devamsızlık (➡), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücreler (➡), villuslarının lamina propriasında ödem (★), epitel hücrelerde vakuolizasyon (v), hiperplazi (H) ve hiperemi (➡). Masson, Bar: 100 µm.



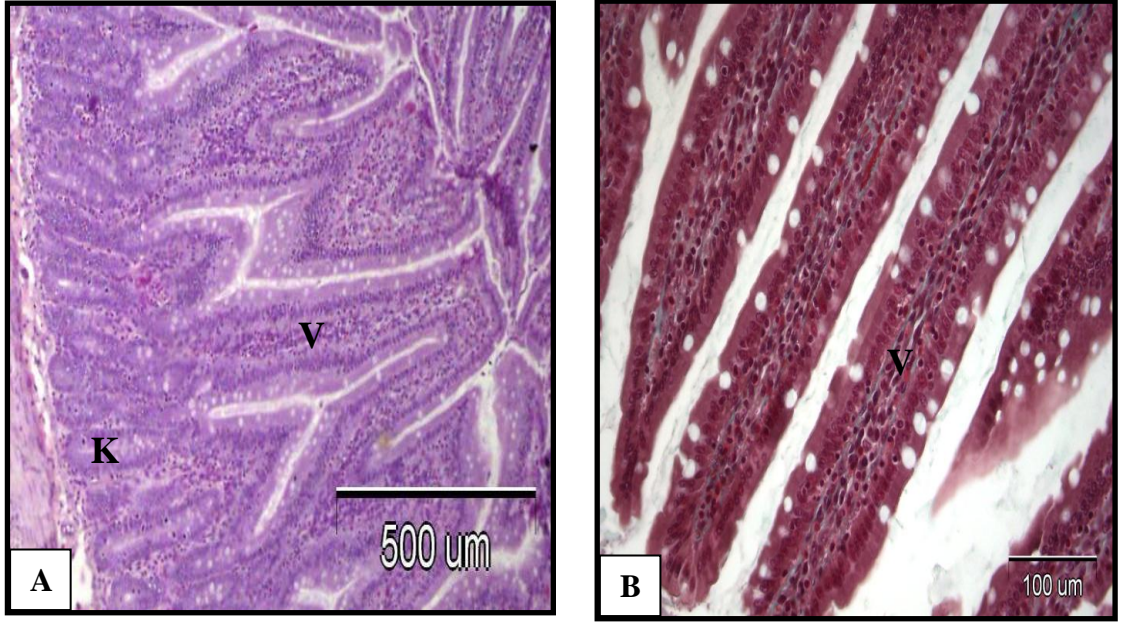
Şekil 4.9: Alüminyum uygulanan deney grubunun (A) villuslarının lamina propriasında ödem (★), Bar: 200 μm, (B) bez bütünlüğünde bozulma ve mukozada nekrotik alan (★), Masson, Bar: 100 μm.



Şekil 4.10: Alüminyum grubuna ait ince bağırsak kesitlerinde çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (⤴) gözlenen PAS reaksiyon şiddetinde azalma, Bar: 100 µm.

#### 4.1.5. Alüminyum + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Alüminyum ve melatoninin birlikte verildiği grupta, alüminyum grubunda görülen çizgili kenarda devamsızlık ve epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukozada nekrotik alan bulgularında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra villus epitel hücrelerinde gözlenen hiperplazi, mukoza ve submukozada hiperemi kontrol gruplarının bulgularına yakındı (Şekil 4.11, 4.12, 4.13). Bu gruba ait kesitlerin epitel hücrelerinin çizgili kenarındaki ve goblet hücrelerindeki PAS pozitif reaksiyon şiddeti, alüminyum grubuna göre artış göstermekteydi (Şekil 4.14).

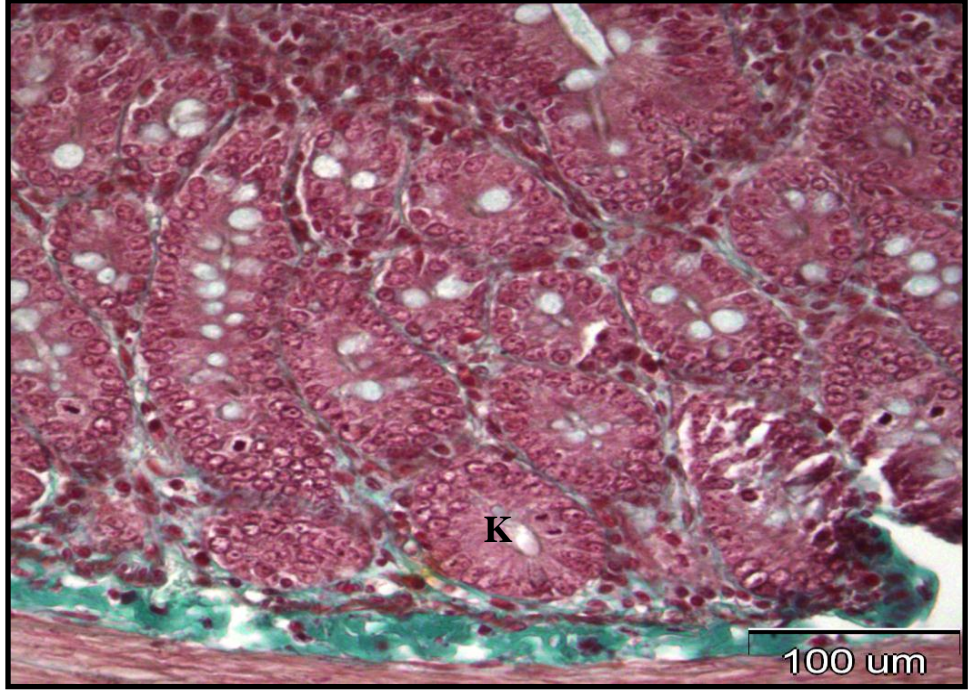


Şekil 4.11: Alüminyum + Melatonin grubuna ait jejunumun (A) Genel histolojik görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 500 µm, (B) Villusların görünümü, Masson, Bar: 100 µm.

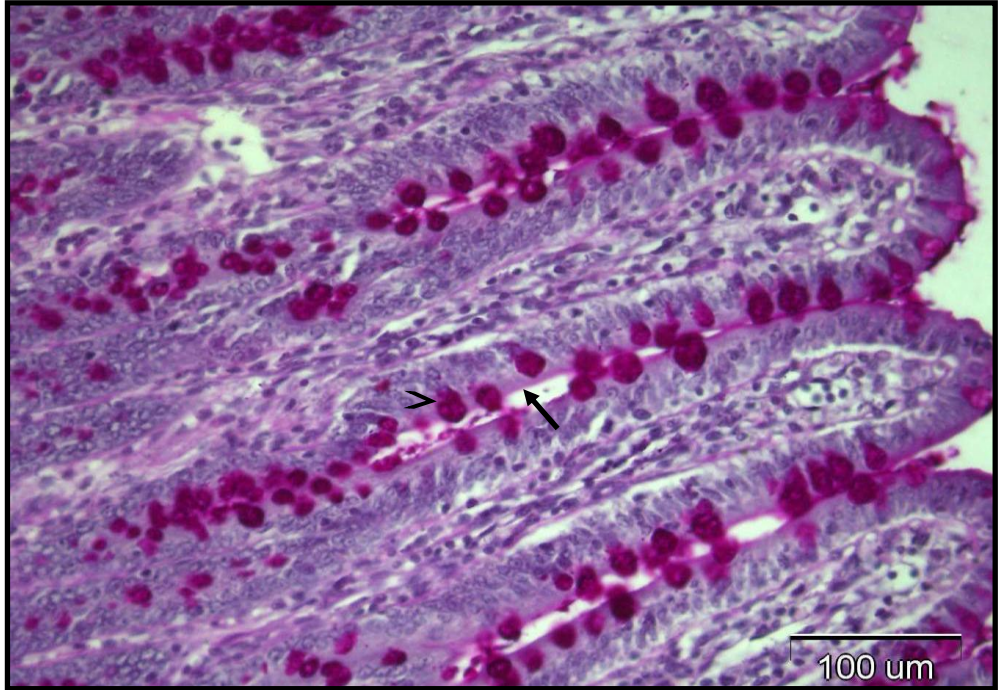


Şekil 4.12: Alüminyum +Melatonin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 100 µm.





Şekil 4.13: Alüminyum +Melatonin grubuna ait mukozadaki kriptlerin genel görünümü, K: kript Masson, Bar: 100 µm.



Şekil 4.14: Alüminyum + Melatonin grubuna ait ince bağırsak kesitinin çizgili kenarda (→) ve goblet hücrelerinde (➤) gözlenen PAS reaksiyon şiddetindeki artış, Bar: 100 µm.

#### 4.1.6. Histolojik Hasar Skoru

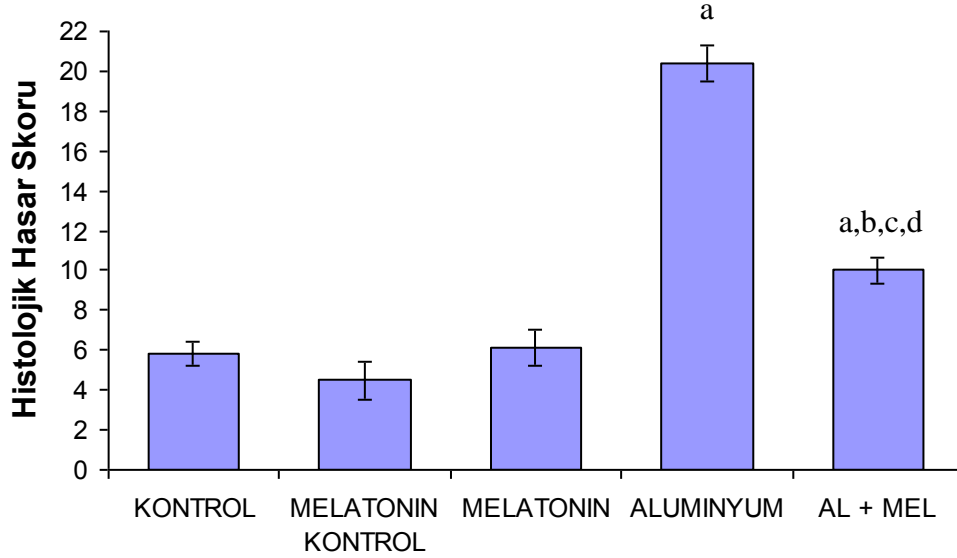
Epitel hücrelerinde hiperplazi, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, çizgili kenarda devamsızlık ve epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villusların lamina propriasında ödem, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada nekrotik alan, mukozada inflamatuvar (mononuklear) hücre infiltrasyonu, mukozada hiperemi gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak her bir bireye ait jejunum kesitleri değerlendirildi. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar) veya 3 (şiddetli hasar) şeklinde derecelendirildi.

Işık mikroskobu ile tespit edilen yarı-kantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 4.1’de ve istatistiksel olarak değerlendirilen bulgular Şekil 4.15’te gösterilmiştir. Hasar derecesi en yüksek olan alüminyum grubu olmuştur. Kontrol bireyler ile kıyaslandığında alüminyum ve alüminyum + melatonin verilen gruplarda histolojik hasar skoru istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $p<0.01$ ). Alüminyum + melatonin verilen grubun hasar skoru melatonin kontrol ( $p<0.01$ ) ve melatonin ( $p<0.05$ ) gruplarına göre anlamlı bir artış gösterirken alüminyum grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ( $p<0.001$ ).

Tablo 4.1: İnce bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.

Histolojik Kriterler	Kontrol (n=6)	Melatonin Kontrol (n=6)	Melatonin (n=6)	Alüminyum (n=8)	Al + Mel (n=7)
Epitel hücrelerinde hiperplazi	1	1	1	7	2
Epitel hücrelerinde vakuolizasyon	4	3	5	15	5
Koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı	2	3	2	16	7
Çizgili kenarda devamsızlık ve epitelde parçalanma	2	2	2	14	6
Villusların lamina propriasında ödem	6	7	6	18	8
Villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp	2	3	3	15	8
Bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp	0	0	1	12	4
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	8	3	6	19	9
Mukozada hiperemi	4	2	4	14	7
Mukozada nekrotik alan	0	0	0	11	4
Ortalama Değer	4.83	4.0	5.0	17.62	8.57

NOT: 0, 1, 2, 3 olarak skorlanan histolojik hasar bulguları bir gruptaki birey sayısı (n) dikkate alınarak verilmiştir.



Şekil 4.15: İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=6):  $4.83 \pm 0.6$ , Melatonin kontrol (n=6):  $4.02 \pm 0.96$ , Melatonin (n=6):  $5.03 \pm 1.09$ , Alüminyum (n=8):  $18.12 \pm 0.85$ , Al+Mel (n=7):  $8.57 \pm 0.68$ .

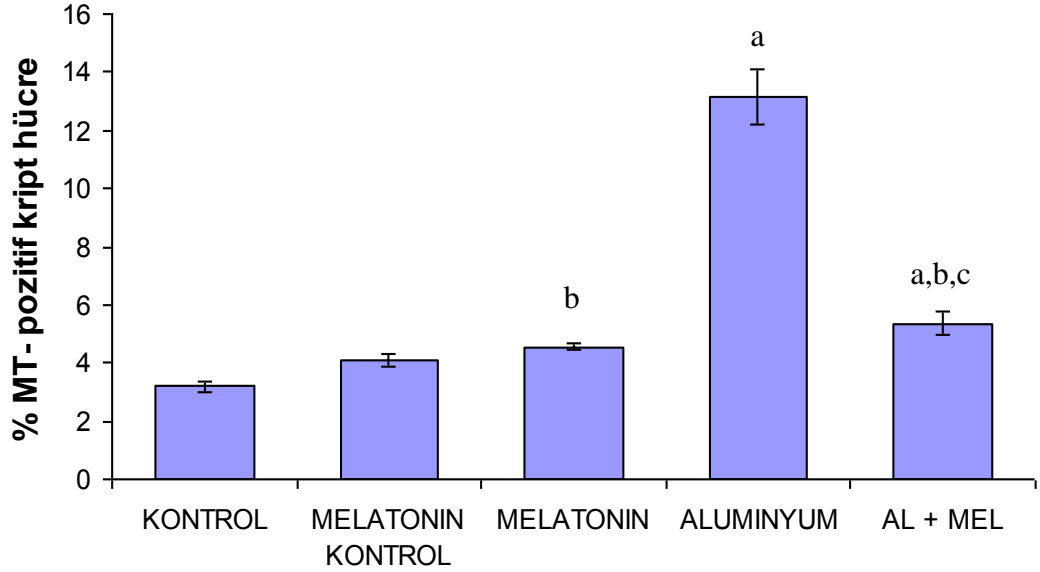
- <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ )  
<sup>b</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ )  
<sup>c</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p < 0.05$ )  
<sup>d</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p < 0.001$ )

## 4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

### 4.2.1. Metallothionein (MT) İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

İnce bağırsak dokularında ağır metal varlığını tespit etmek için MT immünohistokimyası ile elde edilen % MT pozitif kript hücre sayısının gruplara göre dağılımı Şekil 4.16’da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre alüminyum verilen grup ile Al + Mel grubunda, % MT pozitif kript hücre sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $p < 0.001$ ). Ayrıca

Al + Mel grubunun % MT pozitif kript hücre sayısı, melatonin kontrol grubundan anlamlı olarak artış ( $p<0.05$ ) ve alüminyum grubundan anlamlı olarak azalış ( $p<0.001$ ) göstermiştir. Sadece melatonin verilen grupta ise melatonin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.17).

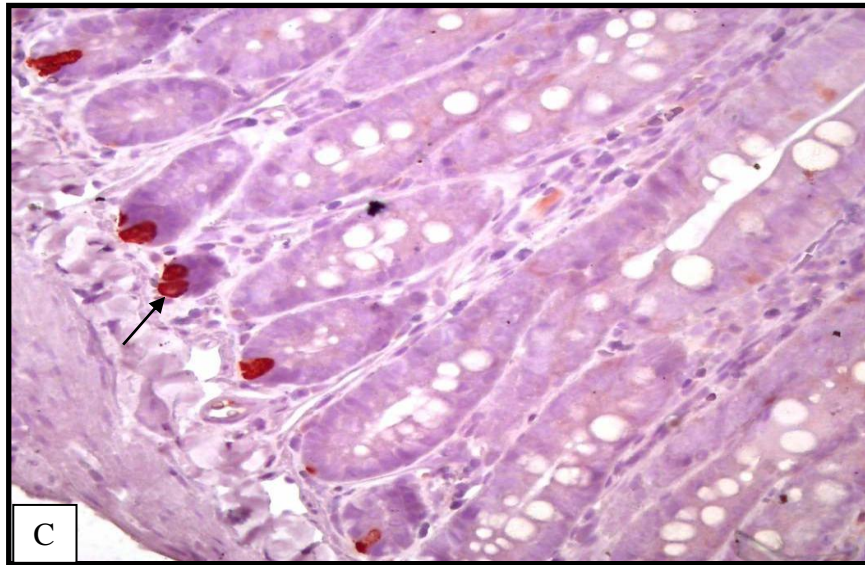
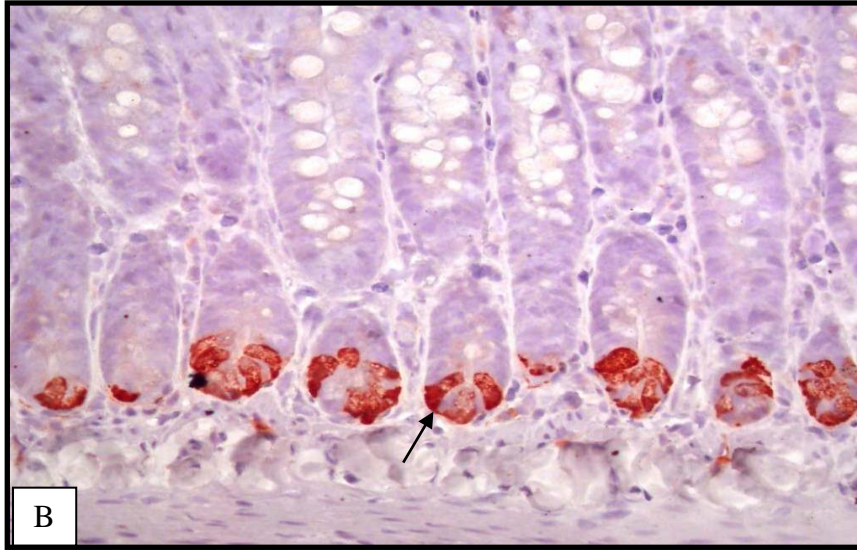
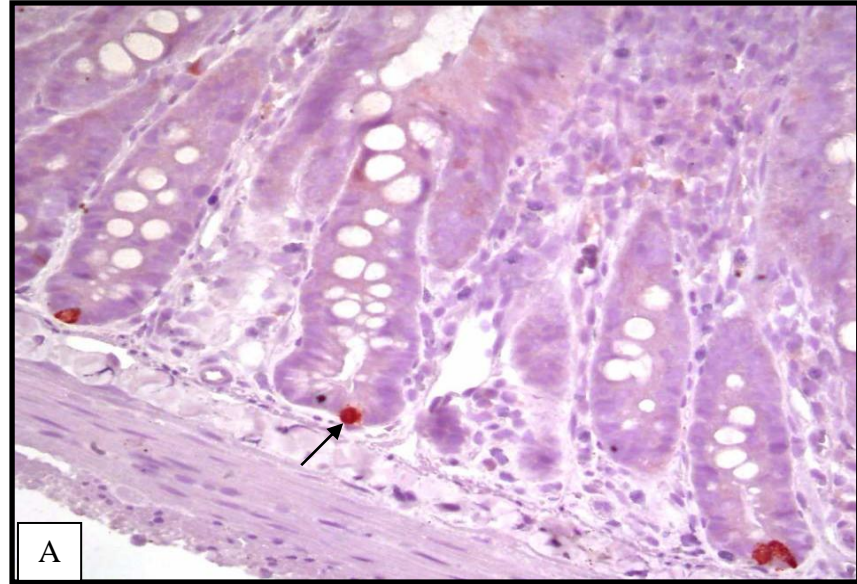


Şekil 4.16: Kript epitel hücrelerinde MT immunohistokimyası ile tespit edilen % MT pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama ± standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=8):  $3.19 \pm 0.17$ , Melatonin kontrol (n=8):  $4.08 \pm 0.21$ , Melatonin (n=7):  $4.55 \pm 0.11$ , Alüminyum (n=8):  $13.16 \pm 0.94$ , Al+Mel (n=7):  $5.34 \pm 0.4$ .

<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p<0.001$ )

<sup>b</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı ( $p<0.05$ )

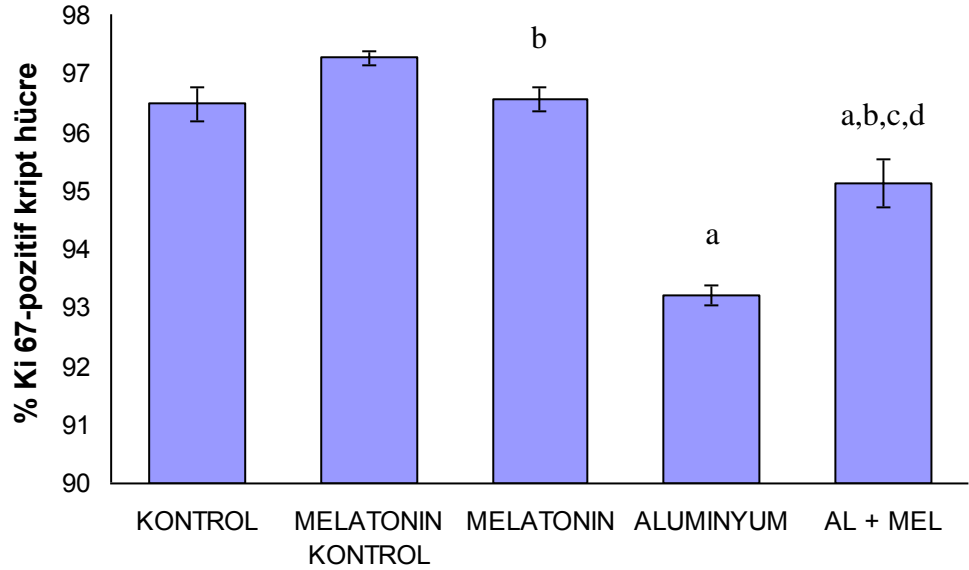
<sup>c</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p<0.001$ )



Şekil 4.17: Kript epitel hücrelerinde MT pozitif hücreler ( →). (A) Kontrol grubu, (B) Alüminyum grubu, (C) Alüminyum + Melatonin grubu.

#### 4.2.2. Kİ-67 İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

Alınan dokulardan yapılan incelemelerde % Ki-67 pozitif kript hücre sayısının gruplara göre dağılımı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.18). Buna göre alüminyum grubu ile Al+Mel grubunda % Ki-67 pozitif kript hücre sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Al+Mel grubu ile melatonin grubu da melatonin kontrol grubundan anlamlı bir fark göstermiştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca Al+Mel grubunun % Ki-67 pozitif kript hücre sayısı alüminyum grubundan anlamlı olarak artış ( $p<0.05$ ), melatonin grubundan ise anlamlı bir azalış ( $p<0.05$ ) göstermiştir (Şekil 4.19).



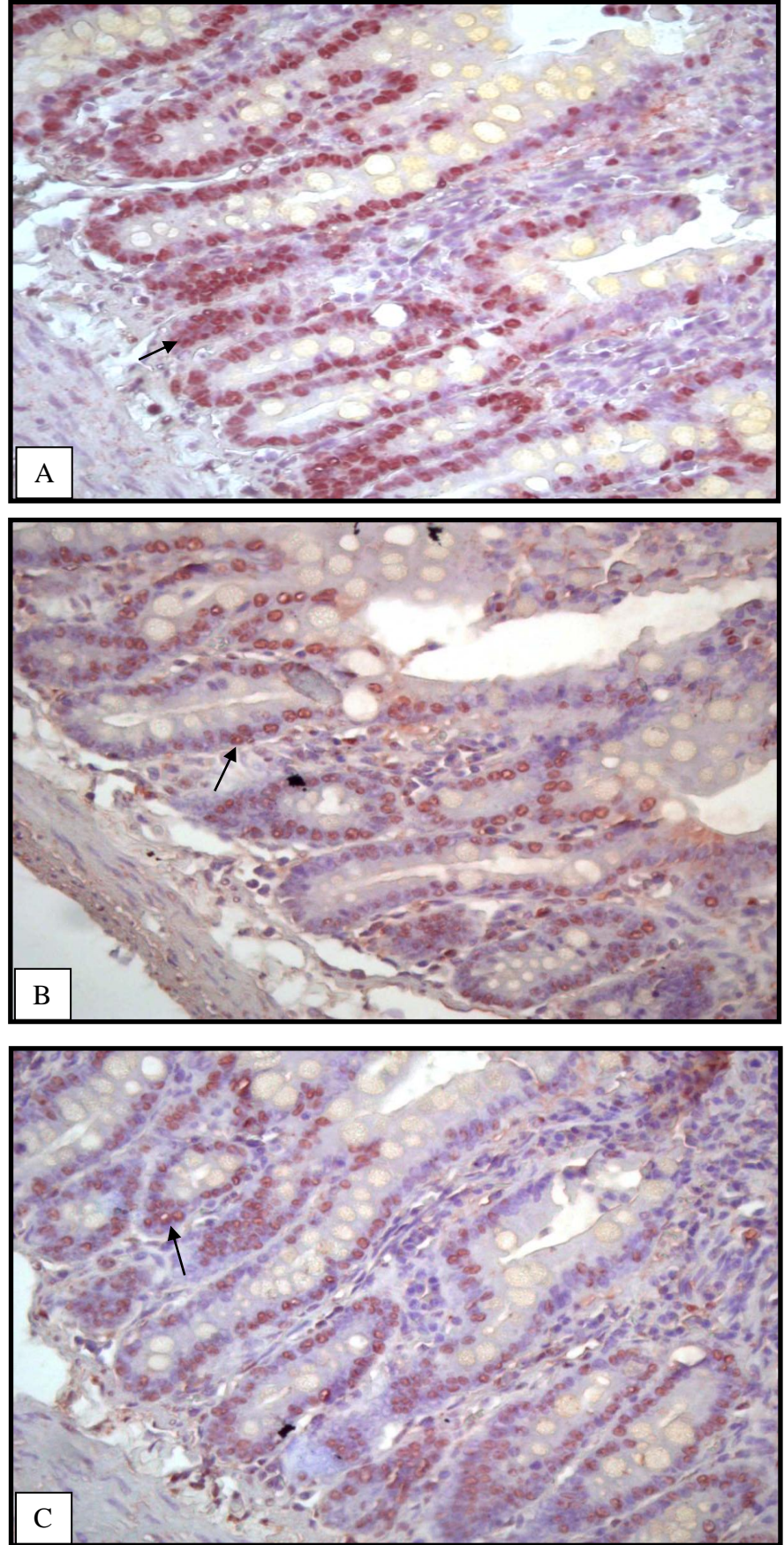
Şekil 4.18: Kript epitel hücrelerinde Ki-67 immunohistokimyası ile tespit edilen % Ki-67 pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol (n=3): 96.49 ± 0.28, Melatonin kontrol (n=3): 97.27 ± 0.12, Melatonin (n=4): 96.56 ± 0.20, Alüminyum (n=4): 93.22 ± 0.17, Al+Mel (n=4): 95.13 ± 0.41.

<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p<0.05$ )

<sup>b</sup> Melatonin kontrol grubundan farklı ( $p<0.05$ )

<sup>c</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p<0.05$ )

<sup>d</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p<0.05$ )



Şekil 4.19: Kript epitel hücrelerinde Ki-67 pozitif hücreler (→). (A) Kontrol grubu, (B) Alüminyum grubu, (C) Al + Mel grubu.



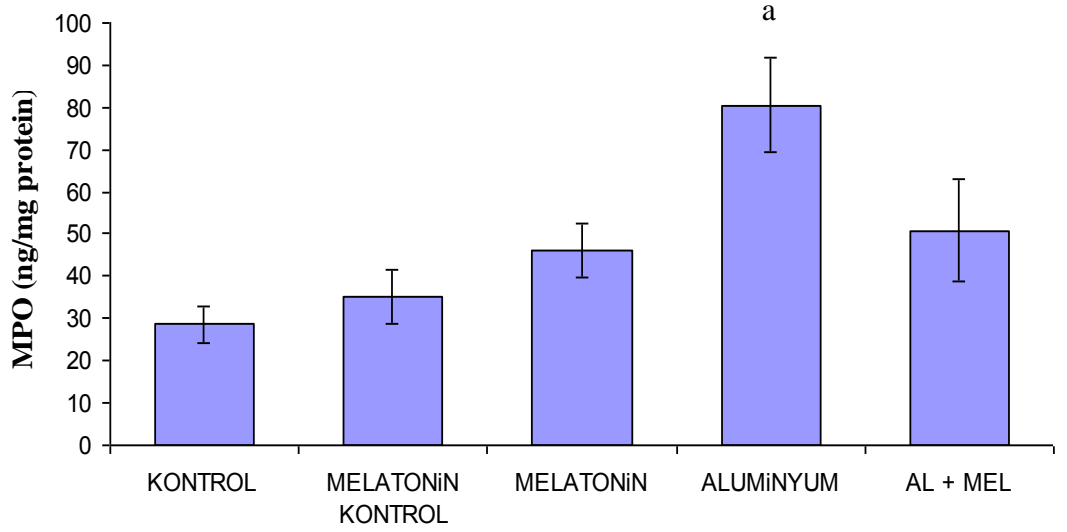
### 4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

İnce bağırsağa ait homojenatların MPO ve GSH değerleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: MPO ve GSH değerleri, ortalama  $\pm$  standart hata. <sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p<0.01$ ), <sup>b</sup> Melatonin Kontrol grubundan farklı ( $p <0.01$ ), <sup>c</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p<0.01$ ), <sup>d</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p<0.05$ ).

GRUPLAR	n	MPO (ng/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)
KONTROL	6	28.69 $\pm$ 4.32	5.40 $\pm$ 0.84
MELATONİN KONTROL	7	34.96 $\pm$ 6.38	3.49 $\pm$ 0.65
MELATONİN	7	46.09 $\pm$ 6.26	4.41 $\pm$ 0.44
ALÜMİNYUM	8	80.53 $\pm$ 11.18 <sup>a</sup>	3.31 $\pm$ 0.21
AL + MEL	7	50.88 $\pm$ 12.24	9.12 $\pm$ 1.45 <sup>b,c,d</sup>

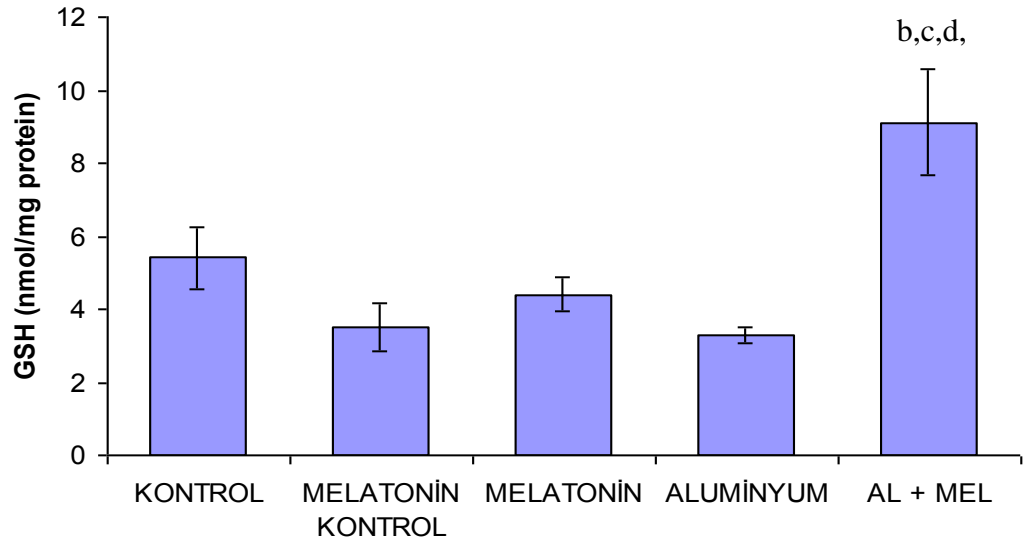
Doku homojenatlarından elde edilen MPO değerlerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.20’de verilmiştir. Alüminyum grubu MPO değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ( $p<0.01$ ), Al+Mel grubu alüminyum grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir.



Şekil 4.20: İnce bağırsak homojenatlarının MPO değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ )

Elde edilen verilere göre GSH değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alüminyum verilen grubun GSH değerleri istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış, melatonin kontrol grubu ile melatonin verilen grubun GSH değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterirken, Al+Mel grubunun GSH değerlerinin, melatonin kontrol, alüminyum ve melatonin gruplarına göre anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: İnce bağırsak homojenatlarının GSH değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

<sup>b</sup> Melatonin Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.01$ ), <sup>c</sup> Melatonin grubundan farklı ( $p < 0.05$ ),

<sup>d</sup> Alüminyum grubundan farklı ( $p < 0.01$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada en fazla bulunan elementler arasında üçüncü sırada olan alüminyum, eski çağlardan beri medikal ilaçlarda, birçok aletin yapımında ve suyun arıtılmasında kullanılmıştır. Günümüzde de alüminyum sülfat suyun berraklaştırılmasında, ev ürünlerinin çoğunda, deodorant üretiminde ve aspirin tamponu olarak kullanılmaktadır (Greger ve Sutherland, 1997, El-Maraghy ve diğ., 2001, Nayak, 2002). Alüminyum bitkiler de dahil tüm canlılarda toksik etki gösterir (Ganrot, 1986). İnsan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle son zamanlarda çok araştırılan bir metal haline gelmiştir (El-Maraghy ve diğ., 2001). Ancak, alüminyumun toksik etkisini hangi yollarla gösterdiği hala tam olarak bilinmemektedir. Bu etkisinin, demir ile aynı kimyasal yapıya sahip olup dokularda demir yerine reaksiyona girebilme özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Becaria ve diğ., 2002).

İnce bağırsak, sindirilmiş olan besin maddelerinin emiliminin dışında, vücut için toksik bazı maddelerin detoksifikasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır (Kierszenbaum, 2006). İnce bağırsaktan sodyum, kalsiyum ve demir iyonları fazla miktarda emilirken diğer metal iyonları, dokularda birikime sebep olup toksik etkiye sebep olacağından, vücut dışına atılmaktadır (Guyton ve Hall, 2007). Alüminyumun vücuda nasıl alındığı ve ne gibi toksik etki gösterdiği birçok araştırmacı için merak konusu olmuştur. Gastrointestinal sistemin alüminyum absorpsiyonunda önemli bir bariyere sahip olduğu, ancak bu bariyerde meydana gelen hasarlar sonucunda vücuda alındığı bildirilmiştir. Dolayısıyla alüminyum, direkt olarak değil, alüminyum içeren ürünlerle beraber, zayıflamış gastrointestinal bariyeri geçerek vücuda alınmaktadır (Domingo, 1995). Yani, alüminyum normalde ince bağırsak tarafından çok az bir emilime (% 0.1) uğrarken ince bağırsaktaki pH değişimi, patolojik bir hastalık ya da epitel dokuda oluşan bir hasar sonucu emilimi artabilmektedir (Nayak, 2002). Çalışmamızda ince bağırsak dokusunda hasar oluşturmak amacıyla intraperitoneal olarak uyguladığımız alüminyum sülfat, Cunat ve diğ.'nin (2000) çalışmalarında belirlemiş oldukları ince bağırsaktan en çok emilen alüminyum formu olması sebebiyle tercih edilmiştir.

El-Maraghy ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmalarında, sıçanlara yapılan alüminyum enjeksiyonundan sonra, karaciğer dokusunda alüminyum seviyesinde % 35 oranında artış olduğunu, serum alüminyum düzeyinde ise normalden % 209 daha fazla alüminyum bulunduğunu belirtmişlerdir. Khattab'ın (2007) sıçan testis dokusunda yapmış olduğu bir çalışmada, bir ay süreyle her gün, farklı dozlarda alüminyum sülfat enjeksiyonu sonucunda incelenen testis dokularında, her dozda histolojik hasar ve doku kaybı gözlemlenmiştir. Güçlü ve Serin (2004) yaptıkları çalışmalarında kalın bağırsak iltihaplanmalarını mikroskobik olarak incelemişler ve ödem, epitel hücrelerinde hiperplazi, hiperemi, koyu sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp bulgularını gözlemlemişlerdir. Oktay (2001), iltihabi bağırsak hastalıklarında immün sistem aktivasyonunun mevcut olduğunu, bunun da lamina propria lenfosit, makrofaj ve diğer hücrelerin infiltrasyonu ile anlaşılabilirliğini belirtmiştir. Aslan ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada, bağırsak iltihaplanmasında bir antioksidan element olan selenyumun lipid peroksidasyonunu engellediği, membran bütünlüğünün korunmasına yardım ettiği, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, ödemi, bez bütünlüğündeki bozulmayı indirgediği ve oksidatif hasar gelişimini önlediği sonucuna varmışlardır. Bir başka çalışmada ise içme suyu ile alüminyum klorür verilen Wistar albino sıçanların beyin dokusunda ödem ve doku bozuklukları tespit edilmiş, antioksidan olarak verilen vitamin E ve C' nin bu hasarları azaltıcı etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Hussein ve diğ., 2010). İyonize radyasyona maruz bırakılan farelerle yapılan çalışmada antioksidan olan melatoninin doku hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği ve DNA hasarını en aza indirdiği gösterilmiştir (Karbownik ve Reiter, 2000).

Melatonin, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen, enzimatik olmayan güçlü bir antioksidandır. Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, melatoninin en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir (Karbownik ve Reiter, 2000, Li ve diğ., 2008). Vitamin E ve GSH gibi, zincir reaksiyonlarını kırabilen, diğer antioksidanlardan farklı olarak melatonin yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır (Millan-Plano ve diğ., 2010). Melatoninin, GSH'dan 5 kat ve mannitolden 14 kat daha güçlü bir şekilde OH<sup>•</sup> radikalini yakaladığı *in vitro* bir çalışma

ile gösterilmiştir (Hardeland ve diğ., 1993). Melatonin oksidatif strese yol açan metaller varlığında antioksidan etki göstererek oluşan hasarı azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadır (Brzezinski, 1997, Reiter ve diğ., 2003, Sharma ve diğ., 2011). Vardı ve diğ. (2007) kronik melatonin uygulayarak yaptıkları histolojik bir çalışmada, sıçan karaciğeri hasarında, melatoninin PAS reaksiyon şiddetini artırdığını ve karaciğer dokusundaki hasarı kontrol düzeyine indirmese de önemli derecede düzelttiğini bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada alüminyum etkisiyle ince bağırsakta oluşan histolojik hasar bulguları, yukarıdaki çalışmalarda gözlemlenen hasar parametreleriyle paralel olup, dokuda bir inflamasyonun oluştuğunu göstermektedir. Yine bu çalışmalara uygun olarak, Al+Mel verdiğimiz grupta antioksidan olarak kullandığımız melatonin, alüminyum grubunda gözlemlediğimiz inflamatuvar hücre infiltrasyonu, epitel hücrelerinde hiperplazi, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, hiperemi, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve ödem, çizgili kenarda devamsızlık ve epitelde parçalanma, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada nekrotik alan bulgularını azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca Vardı ve diğerlerinin (2007) belirttiği gibi, biz de alüminyum grubunda, goblet hücrelerinde ve çizgili kenarda gözlediğimiz azalmış olan PAS pozitif reaksiyon şiddetinin, Al+Mel uygulanan grupta arttığını belirledik. Bilindiği gibi PAS reaksiyonu doku karbohidratlarının varlığını gösteren bir indikatördür (Bancroft ve Stevens, 1982). PAS pozitif maddelerin yapılarındaki ve miktarlarındaki değişiklikler rengin şiddetini değiştirebilir (Dahlquist ve diğ., 1965). Hücre örtüsü ve goblet hücrelerindeki mukusu oluşturan materyaldeki yapı taşlarının miktarının azalması veya kimyasal yapısının bozulması PAS (+) reaksiyonun azalmasının nedeni olabilir. Melatoninin, oksidatif stres oluşumunu engelleyerek tüm histolojik hasar parametrelerinde düzelmeye yol açtığını düşünmekteyiz.

Beaulieu (1999), ince bağırsak dokusunda hücre proliferasyonunun yüksek oranda olduğunu saptamıştır. İnce bağırsakta mukozal yüzeydeki villusların arasına açılarak çöküntüler oluşturan kriplerde yeni villuslar oluşturmak için gelişmekte olan kök hücreler, her zaman bölünme halindedir. Alüminyumun toksik etkisinin sonuçlarını görmek için Malekshah ve diğ. (2005) hamile farelerle yaptıkları bir çalışmada,

alüminyumun intraperitoneal enjeksiyonundan sonra fetüste anomaliliklerin ve anne farenin ağırlığında azalmanın oluştuğunu göstermişlerdir. Sonuçta alüminyumun nükleik asitler ve proteinler gibi fosfor yapılı bileşiklere etki ederek, DNA ve RNA sentezinde azalmaya sebep olduğu, embriyonik hücre proliferasyonu ve protein sentezini engellediği sonucuna varmışlardır. Hücre proliferasyonu belirleyicilerinden biri olan Ki-67, hücre bölünmesi sırasında üretilen bir nükleer antijendir. Hücre bölünmesi sırasında G1, S, G2 ve M fazında eksprese olmakta, fakat dinlenme fazındaki normal hücrelerde eksprese olmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı mitoz giden hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Aguilar-Nascimento, 2006). Alüminyumun hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini gözlemek için yaptığımız Ki-67 immünohistokimyasında, yukarıdaki çalışma sonuçlarına uygun olarak, alüminyum gruplarında kontrol gruplarından daha az işaretli kript hücre sayısı gözlenirken, melatonin varlığında işaretlenme oranının arttığı belirlenmiştir. Alüminyum DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek hücre proliferasyonunda azalmaya neden olabileceğini, melatonin ise antioksidan özelliği ile proliferasyonu artırmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Metallotionein (MT) sistein amino asidince zengin, düşük moleküler ağırlıklı, iki metal bağlayan bölgeye ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) sahip olan ve bu yüzden metal bağlama özelliği yüksek olan bir proteindir (Goyer, 1997). Farklı metallere yüksek bağlanma kapasitesi nedeniyle metal toksifikasyonunu önlemede ve oksidatif strese karşı intrasellüler etki göstermede önemli görevi vardır (Nordberg, 1998). MT dokuda bakır, krom, çinko gibi fizyolojik metalleri bağlayabildiği gibi kadmiyum, civa, gümüş, alüminyum gibi ağır metalleri de bağlamaktadır. Birçok çalışmada hücre ve dokulardaki ağır metal varlığını göstermek için MT kullanılmaktadır (Zhou ve diğ., 2006). MT düşük moleküler yapısı sebebiyle vücudun her yerinde bulunabilmekte, özellikle de kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (Yu ve diğ., 2001). Thompson ve diğ. (2001) diğer hayvanlara kıyasla vücudunda çinko oranı yüksek olan bir balık türüyle yaptıkları çalışmada, MT oranının balığın karaciğer dokusundaki çinko oranı kadar yüksek çıktığını belirtmiştir. Amaral ve diğ. (2007) fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, volkanik olaylar sonucu ağır metal oranının yüksek olduğu ortamda, farelerin akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında MT seviyesinin normalin çok üstünde bulunduğu sonucuna varmıştır. Zhang ve diğ. (1998) oral yolla alüminyum verilmiş olan sıçanların ince bağırsağında MT oranının

yükseldiğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada immünohistokimyasal olarak belirlediğimiz MT sonuçları bu bulgularla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda MT pozitif hücrelerin alüminyum grubunda artış gösterdiği, melatonin varlığında ise azaldığı belirlenmiştir. Al grubunda MT pozitif hücre sayısındaki artışın, MT'nin ince bağırsakta alüminyum ile oluşan toksisiteyi ve oksidatif stresi önlemedeki rolü nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. Aynı zamanda bu değerdeki artış, MT dokuda ağır metal varlığını gösteren bir protein olduğundan dolayı, uyguladığımız alüminyum sülfat dozuyla ince bağırsakta oluşan Al birikimini de göstermektedir. Al+Mel verdiğimiz gruptaki MT pozitif hücre sayısındaki azalışın ise, melatoninin varlığında toksisitenin ve oksidatif stresin azalması sonucu oluştuğunu söyleyebiliriz.

Alüminyum canlı dokularında SOD, GSH-Px, CAT gibi koruyucu enzimlerle direkt etkileşime geçebilmektedir. Bu etkileşim sonucu serbest radikaller oluşmaktadır (Mercan, 2004). Oksidatif stres, hücre membranlarındaki lipid tabakasının peroksidasyonu ile sonuçlanan serbest radikallerin fazla üretilmesi ve vücudun antioksidan mekanizmalar ile serbest radikallere karşı kendini savunması arasındaki orantısızlık olarak tanımlanır (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006). Oksijenle solunum yapan tüm canlılar oksidatif strese maruz kalırlar. Solunumla aldığımız oksijen, enerji ihtiyacımız için çeşitli reaksiyonlarda kullanılırken, serbest oksijen radikalleri açığa çıkar ve bu radikaller mitokondride elektron taşıma sisteminde kullanılır. Ancak ortamda serbest oksijen radikalleri sayıca arttığında, ortamdaki başka iyonlarla etkileşime girerek hasar vermeye başlar. Bunu engellemek için hücre içi antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir (Andreyev ve diğ., 2005).

Hücrelerde antioksidan savunma sistemine dahil olan, ancak enzim yapısında bulunmayan bazı serbest radikal savıcılar mevcuttur. Bunlar arasında pek çok oksijen/nitrojen türevleriyle reaksiyona girme potansiyeline sahip olan glutatyon (GSH), DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev alan çok önemli bir antioksidandır (Chavan ve diğ., 2005). Canlı dokularında oksidatif hasar

mekanizmasını anlayabilmek için GSH değerlerinin belirlenmesi önemlidir. Birçok çalışmada antioksidan savunma sistemi belirleyicisi olarak GSH, okside glutatyon (GSSG) ve katalizör enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px) değerlerine bakılmaktadır (Hong-Shiee ve diğ., 2000, Balahoroğlu ve diğ. 2008). Oksidatif hasardan korunmaya karşı, enzimatik veya enzimatik olmayan hücrel antioksidan mekanizmalar arasında GSH, redoks döngüsünde çok önemli bir role sahiptir. Hücre içi redoks düzeyindeki değişimlerin farklı uyarılara karşı hücrel yanıtın türünü belirlemede rol oynadığı bildirilmektedir (Toborek ve diğ., 1995). GSH/GSSG oranındaki değişimler enzim metabolizması, hücre büyümesi ve gen transkripsiyonu gibi pek çok hücre fonksiyonunu kontrol etmektedir (Hentze ve diğ., 2000). Şiddetli oksidatif/peroksidatif süreçler sırasında hücre içinde GSSG birikimi oksidatif strese hücrel yanıtın bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. GSSG hücre içinde toksik bir düzeye ulaştığında ise, hücre dışına taşınabilir veya hücre içindeki proteinlere katılarak disülfidleri oluşturabilir. Bu olay total GSH'da bir kayıba sebep olmaktadır (Toborek ve diğ., 1995, Coppla ve Ghibelli, 2000). Bizim çalışmamızda alüminyum grubunda gözlediğimiz GSH değerindeki azalmanın sebebinin, oksidatif stres sonucu GSH ve GSSG'nin arasındaki dönüşüm dengesinin bozulması nedeniyle olduğunu söyleyebiliriz.

Diğer bir serbest radikal savıçısı olan melatoninin, biyokimyasal olarak, GSH değerlerine de etkili olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ., 1998). Aydoğdu ve diğ. yaptıkları çalışmalarda kadmiyuma bağılı akciğer (2007a) ve karaciğer (2007b) hasarında melatoninin doku GSH değerlerini artırdığı, bir başka çalışmada da esansiyel bir ara metabolit olan homosisteinde oluşan bozukluk sonucu ortaya çıkan oksidatif stres nedeniyle hiperhomosisteinemi rahatsızlığında azalan GSH değerinin, melatonin uygulamasından sonra arttığı gözlemlenmiştir (Yüce ve Aksakal, 2006). Melatoninin SOD, GSH-Px, glutatyon redüktaz (GSH-Rd), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bilinmektedir. GSH havuzunu koruyan GSH-Rd aktivitesinin ekzojen melatonin ile yükseldiği bildirilmiştir. Melatonin tarafından  $\gamma$ -glutamilsistein sentetazın uyarılmasıyla, insan endotel hücrelerinde total GSH içeriğinin yükseldiği öne sürülmektedir (Yazıcı ve Köse, 2004). Karbownik ve Reiter (2000) ve Thor ve diğ. (2007) yaptığı çalışmalarda melatoninin,



GSH-Px enzimini uyararak  $H_2O_2$ 'yi  $O_2$ 'ye dönüştürürken oluşan GSH'i, okside formu olan GSSG'ye dönüştürmemek için GSH-Rd enzimini aktive ettiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanan alüminyumun beyin ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif strese yol açtığı ve melatoninin bu etkiyi azalttığı sonucuna varılmıştır (Esparza ve diğ., 2003). Yapılan *in vitro* bir çalışmada, farklı dozlarda alüminyum klorür uygulanan tavşan sperm kültürlerinde, antioksidan olan vitamin C ve vitamin E'nin, alüminyumun sitotoksitesini SOD, CAT ve GSH değerlerinde artışa sebep olarak önlediği belirtilmiştir (Yousef ve diğ., 2007). Yaptığımız çalışmada, alüminyum etkisiyle ince bağırsak dokusunda bir antioksidan olan GSH değerlerinde elde ettiğimiz azalma, alüminyumun ince bağırsakta oksidatif strese neden olduğunu düşündürmektedir. Al+Mel grubunda gözlemllediğimiz GSH değerlerindeki artış ise diğer araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu olup, melatoninin alüminyum ile uyarılan oksidatif stresi önleyebileceğini göstermektedir (Kim ve diğ., 1998, Yazıcı ve Köse, 2004, Yüce ve Aksakal, 2006, Aydoğdu ve diğ., 2007a, 2007b).

İnflamasyon, canlı dokuların hasara karşı gösterdiği bir reaksiyon, koruyucu bir yanıttır. Temel amacı, organizmayı hem hücre hasarının etkeni olan mikroorganizma ve toksinlerden korumak ve hem de hasar sonucu olarak ortaya çıkan nekrotik hücre ve doku artıklarından temizlemektir. İnflamasyon oluşumunda önemli olaylardan birisi de, fagositteki oksijen tüketiminin hızlı ve ani artışını sağlayarak hasara neden olan toksin veya mikroorganizmaya karşı savunma sağlamaktır. Oksijen patlaması denen bu olay, reaktif oksijen ürünlerini ortaya çıkarır (Faith ve diğ., 2008). Patojenik etkilere yanıt olarak aktive olmuş nötrofillerden salgılanan MPO, ortamdaki  $H_2O_2$  iyonlarını katalizleyerek güçlü bir oksidan olan hipokloröz (HOCl) oluşturur. Doku üzerinde toksik etkileri olan bu güçlü radikal, ortamda serbest radikal arttıkça toksik etki göstermeye devam eder (Güvenç ve diğ., 2006). Krudeiner ve Verspaget (2002) bağırsak iltihaplanmalarında lökositler tarafından oluşturulan serbest radikallerin ortamda fazla miktarda olmasıyla oksidatif stresin oluştuğunu, bu nedenle iltihaplı bölgedeki hasarın geliştiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda hem bir inflamasyon göstergesi olan (Loria ve diğ., 2008) hem de prooksidan özelliği ile oksidatif stres belirleyicisi olan (Honda ve diğ., 2009) MPO değerleri ELISA yöntemi ile

belirlenmiştir. Alüminyum grubunda MPO değerlerinde görülen artış, alüminyumun ince bağırsakta serbest radikalleri oluşturabileceğini dolayısıyla oksidatif strese ve dokularda inflamasyon oluşmasına neden olabileceğini göstermektedir. Histolojik olarak alüminyum grubunda gözlemlediğimiz ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu da bu bulgumuzu desteklemektedir. Bulduğumuz değerler, bağırsak mukozasındaki alüminyum etkisi ile oluşan toksik etkinin iltihaplanmaya yol açabileceğini düşündürmektedir. Melatonin ise antioksidan olarak alüminyum ile birlikte verildiğinde MPO değerlerinde bir azalmaya neden olmaktadır.

Kronik bir intestinal hastalık olarak bilinen Crohn hastalığı, bağırsakta iltihaplanmalara yol açarak bağırsak dokusuna hasar vermektedir. Crohn hastalığının oluşum sebepleri henüz belirlenmemiştir. Mikrobik, genetik, immünolojik ve çevresel etkenlerle ortaya çıkan immünolojik bir hastalık olduğu ifade edilmiştir (Çokuğraş, 2011). Pizarro ve diğ. (2003) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada hastalığın genetik sebeplerden olabileceğini göstermişlerdir. Lerner (2007), Crohn hastalığında alüminyumun etkisinin olabileceğini öne sürmüştür. Crohn hastalığında iltihaplara yol açan etkinin, alüminyum ile bakterilerin etkileşimi sonucu olabileceği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada Crohn hastalığında saptanan GSH değerlerindeki azalmaya serbest radikallerin neden olabileceği ileri sürülmüştür (Sido ve diğ., 2006). Kruidenier ve diğ. (2003) reaktif oksijen radikallerinin, Crohn hastalığı ve iltihaplı kolon hastalığı gibi tüm inflamatuvar hastalıklarda, doku moleküllerinin yapısını bozarak hasar oluşturabileceğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar çalışmalarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ilişkili antioksidanlardan CAT, GSH-Px, GSH ve oksidan bir parametre olan MPO değerlerini ölçmüşlerdir. Sonuçlarındaki GSH değerleri kontrol grubuna göre azalış gösterirken MPO değerleri artış göstermiştir. Bizim sonuçlarımız da bu araştırmacıların sonuçlarına uygundur. Histolojik bulgularımızda belirlediğimiz inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte bu bulgular, alüminyumun Crohn hastalığına neden olabileceği hipotezlerini desteklediğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ve bu bulgulara dayanarak vardığımız sonuçları kısaca özetlersek;

- Yapmış olduğumuz *in vivo* çalışmada, sıçanların ince bağırsak dokusunda alüminyum etkisiyle hasar oluşturulmuştur. Alüminyum sitotoksitesi, histolojik olarak çizgili kenarda devamsızlık ve epitelde parçalanma, epitel hücrelerinde hiperplazi, vakuolizasyon, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hiperemi ve villusların lamina propriasında ödem, mukozada nekrotik alan, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp parametrelerine bakılarak belirlenmiştir.
- Enzimatik olmayan bir antioksidan olan melatonin uygulaması sonucunda, alüminyum ile melatoninin beraber verildiği gruplarda histolojik hasar parametrelerinde gözlenen azalış, melatoninin alüminyum etkisiyle oluşabilecek hasarı engellediğini göstermiştir.
- Alüminyumun ince bağırsak dokularında varlığı, ağır metal belirleyicisi olan metallothionein (MT) immünohistokimyasıyla gösterilmiştir. Alüminyum verilen gruptaki kript hücrelerde gözlenen MT pozitif hücre sayısındaki artış, metallothioneinin ince bağırsakta alüminyum ile oluşan toksisiteyi ve oksidatif stresi önlemedeki görevinden dolayıdır. Al+Mel verdiğimiz gruptaki MT pozitif hücre sayısındaki azalış ise, melatoninin varlığında toksisitenin ve oksidatif stresin azalması sonucu olabilir.
- Normalde hücre proliferasyonunun hızlı olduğu ince bağırsak kript hücrelerinde, alüminyum grubunda Ki-67 pozitif kript hücre sayısında azalış belirlenirken, Al+Mel grubunda Ki-67 pozitif kript hücre sayısında belirlenen artış, melatoninin proliferatif etkisinden kaynaklanmış olabilir.

- Alüminyumun ince bağırsakta, oksidatif strese yol açarak hasar oluşturduğunu, inflamasyon ve oksidatif stres belirleyicisi olan MPO değerlerindeki artıştan anlamaktayız. Bunun yanında Al+Mel grubunun MPO değerleri azalış göstermiştir.
- Alüminyum etkisiyle oluşan oksidatif hasar GSH değerlerinde azalışa neden olurken, Al+Mel gruplarında GSH değerleri artış göstermiştir. Yani alüminyumun oluşturacağı oksidatif hasarı melatonin antioksidan özelliğiyle engellemiş olabilir.
- Sonuç olarak melatoninin, ince bağırsakta alüminyum etkisiyle oluşabilecek toksisite üzerinde koruyucu bir rol oynadığını söyleyebiliriz.

## KAYNAKLAR

ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY), 2008, *Toxicological profile of aluminum*, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.

AGUILAR-NASCIMENTO, J.E., 2006, Evaluation of intestinal trophism: review of current methods and techniques, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(3), 257-262.

AKKUŞ, I., 1995, *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*, Mimoza Yayınları, İstanbul, ISBN: 975-543-038-5.

ALBENDEA, C.D., GOMEZ-TRULLEN, E.M., FUENTES-BROTO, L., MIANA-MENA, F.J., MILLAN-PLANO, S., REYES-GONZALES, M.C., MARTINEZ-BALLARIN, E., GARCIA, J.J., 2007, Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminum, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 261-268.

ALFREY, A.C., 1984, Aluminum toxicity, *Bulletin New York Academy of Medicine*, 60(2), 210-212.

ALTINIŞIK, M., 2000, *Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar* [online], ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya AD, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 27.Mayıs.2010].

AMARAL, A., CABRAL, C., GUEDER, C., RODRIGUES, A., 2007, Apoptosis, metallothionein and bioavailable metals in domestic mice (*Mus musculus L.*) from a human-inhabited volcanic area, *Ecotoxicology*, 16(1), 475-482.

AMBROSONE, C.B., AHN, J., SINGH, K.K., REZAISHIRAZ, H., FURBERG, H., SWEENEY, C., COLES, B., TROVATO, A., 2005, Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer, *Cancer Researches*, 65(1), 1105-1111.

AMER, M.M.A.L., 2008, *Effects of aluminum exposure on the kidney, liver and brain of albino rats and the possible protective role of vitamin E*, M.D. Thesis, Ain Shams University Faculty of Medicine.

ANANE, R., CREPPY, E.E., 2001, Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamins E and C, *Human and Experimental Toxicology*, 20, 477-481.

ANDERSEN, J.K., 2004, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence, *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 18-25.

ANDREYEV, A.Y., KUSHNAREVA, Y.E., STARKOV, A.A., 2005, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.

ARDA-PIRİNÇCİ, P., BOLKENT, Ş., The role of glucagon-like peptide-2 on apoptosis, cell proliferation, and oxidant-antioxidant system at a mouse model of intestinal injury induced by tumor necrosis factor-alpha/actinomycin D, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 350, 13–27.

ARINOLA, O.G., 2004, Metal binding acute phase proteins and trace elements in Nigerian children with urinary schistosomiasis, *Biokemistri*, 16(1), 23-27.

ARRICK, B.A., NATHAN, C.F., 1984, Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review, *Cancer Research*, 44, 4224-4232.

ASLAN, A., POLAT, G., ATİK, E., TEMİZ, M., BAĞDATOĞLU, Ö.T., ABAN, N., 2008, Deneysel ülseratif kolitte selenyumun etkinliği, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 7-11.

AYDOĞDU, N., ERBAŞ, H., KAYMAK, K., 2007a, Taurin, melatonin ve N-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24(1), 43-48.

AYDOĞDU, N., KANTER, M., ERBAŞ, H., KAYMAK, K., 2007b, Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri, *Erciyes Tıp Dergisi*, 29(2), 89-96.

BALAHOROĞLU, R., DÜLGER, H., ÖZBEK, H., BAYRAM, I., ŞEKEROĞLU, M.R., 2008, Protective effects of antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice, *European Journal of General Medicine*, 5(3), 157-164.

BAMIAS, G., MARINI, M., MOAKALUK, C.A., ODASHIMA, M., ROSS, W.G., RIVERA-NIEVES, J., COMINELLI, F., 2002, Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease, *Journal of Immunology*, 169, 5308-5314.

BANCROFT, J.D., STEVENS, A., 1982, *Theory and practica of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburg.

BEAULIEU, J.F., 1999, Integrins and human intestinal cell functions, *Frontiers in Bioscience*, 4, 310-321.

BECARIA, A., CAMPBELL, A., BONDY, S.C., 2002, Aluminum as a toxicant, *Toxicology and Industrial Health*, 18, 309-320.

BOGDANOVIC, M., BEGIC-JANEVA, A., BULAT, P., 2008, Histopathological changez in rat liver after a single high dose of aluminum, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59, 97-101.

BRZEZINSKI, A., 1997, Melatonin in humans, *The New England Journal of Medicine*, 336, 186-195.

CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker Inc., New York, ISBN: 0-8247-0547-5.

- CAMPBELL, N.A., REECE, J.B., 2006, *Biyoloji*, Palme Yayıncılık, ISBN: 975-8982-85-0.
- CHAVAN, S., SAVA, L., SAXENA, V., PILLAI, S., SONTAKKE, A., INGOLE, D., 2005, Reduced glutathione: importance of specimen collection, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(1), 150-152.
- CHOPPOLA, S., GHIBELLÌ, L., 2000, GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling, *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 56-61.
- CHOWDHURY, P., SOULSBY, M., 2008, Oxidant- antioxidant status in rats exposed to simulated weightlessness by hind-limb unloading and reloading, *The Open Clinical Chemistry Journal*, 1, 47-56.
- COBBETT, C., GOLDSBROUGH, P., 2002, Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annual Reviews Plant Biology*, 53, 159-182.
- CUNAT, L., LANHERS, M.C., JOYEUX, M., BURNEL, D., 2000, , Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats, *Biological Trace Element Research*, 76, 31-55.
- ÇOKUĞRAŞ, F., 2011, Kronik inflamatuvar barsak hastalıkları, *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 46, 70-78.
- DAHLQUIST, A., OLSSON, I., NORDEN, A., 1965, The periodate schiff reaction: specificity, kinetics and reaction products with pure substrate, *Journal of Histochemical Cytochemical*, 13(6), 423-430.
- DARBRE, P.D., 2006, Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of human breast, *Journal of Applied Toxicology*, 26, 191-197.
- DARKO, E., AMBRUS, H., STEFANOVITS-BANYAI, E., FODOR, J., BAKOS, F., BARNABAS, B., 2004, Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection, *Plant Science*, 166(3), 583-591.
- DAVIES, K.J.A., PRYOR, W.A., 2005, The evolution of free radical biology and medicine: a 20-year history, *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1263–1290.
- DEVELİOĞLU, A.H., TANER, I.L., 1998, Miyeloperoksidazın özellikleri ve periodontal hastalıklardaki önemi, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 1(1), 24-27.
- DOMINGO, J.L., 1995, Reproductive and developmental toxicity of aluminum: a review, *Neurotoxicology and Teratology*, 17(4), 515-521.
- DRAFT, 2000, Public health goal for aluminum in drinking water, *Pesticide and Environmental Toxicology Section Office of Environmental Health Hazard Assessment*.

- DROGE, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- EL-MARAGHY, S., GAD, M.Z., FAHIM, A.T., HAMDY, M.A., 2001, Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues, *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 15(4), 207-214.
- ERAZI, H., AHBOUCHA, S., GAMRANI, H., 2011, Chronic exposure to aluminum reduces tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and locomotor performance in rats, *Neuroscience Letters*, 487, 8-11.
- ESPARZA, J.L., GOMEZ, M., ROMEU, M., MULERO, M., SANCHEZ, D.J., MALLOL, J., DOMINGO, J.L., 2003, Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin, *Journal of Pineal Research*, 35, 32-39.
- EXLEY, C., 2003, A biogeochemical cycle for aluminium, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 1-7.
- EXLEY, C., 2004, The pro-oxidant activity of aluminum, *Free Radical Biology and Medicine*, 36(3), 380-387.
- EXLEY, C., SIESJO, P., ERIKSSON, H., 2010, The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work, *Trends in Immunology*, 31(3), 103-109.
- FAITH, M., SUKUMARAN, A., PULIMOOD, A.B., JACOB, M., 2008, How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity, *Clinica Chimica Acta*, 396(1-2), 23-25.
- FARINA, M., LARA, F.S., BRANDAO, R., JACQUES, R., ROCHA, J.B.T., 2002, Effects of aluminum sulfate on erythropoiesis in rats, *Toxicology Letters*, 132, 131-139.
- GANROT, P.O., 1986, Metabolism and possible health effects of aluminum, *Environmental Health Perspective*, 65, 363-441.
- GARCIA, T., RIBES, D., COLOMINA M.T., CABRE, M., DOMINGO, J.L., GOMEZ, M., 2009, Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease, *Toxicology*, 265, 49-55.
- GONZALEZ-SUAREZ, I., NAVES, M., DIAZ-CORTE, C., FERNANDEZ-MARTIN, J.L., MENENDEZ-RODRIGUEZ, P., CANNATA-ANDIA, J.B., 2003, Effect of aluminum on calcium-sensing receptor expression, proliferation and apoptosis of parathyroid glands from rats with chronic renal failure, *Kidney International*, 63(85), 39-43.
- GOYER, R.A., 1997, Toxic and essential metal interactions., *Annual Reviews of Nutrient*, 17, 37-50.
- GREGER, J.L., SUTHERLAND, J.E., 1997, Aluminum exposure and metabolism, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34(5), 439-474.



GUYTON, A.C., HALL, J.E., 2007, *Tıbbi Fizyoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, ISBN:9789754205589.

GÜÇLÜ, M., SERİN, E., 2004, Mikroskopik kolit, *Güncel Gastroenteroloji*, 8(2), 104-110.

GÜVENÇ, Y., ONUR, E., VAR, A., AYDEDE, H., UYANIK, B.S., 2006, Oxidant and antioxidant status in small intestine and colon tissues of rats with portal hypertension, *Turkish Journal of Clinical Biochemistry*, 4(3), 107-114.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M., 2004, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean, *British Journal of Pharmacology* 142, 231–255.

HAN, J., HAN, J., DUNN, M.A., 2000, Effect of dietary aluminum on tissue nonheme iron and ferritin levels in the chick, *Toxicology*, 142, 97-109.

HARDELAND, R., POEGGELER, B., 2008, Melatonin beyond its classical functions, *The Open Physiology Journal*, 1, 1-22.

HARDELAND, R., REITER, R.J., POEGGELER, B., TAN, D.X., 1993, The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(3), 347-357.

HASSETT, D.J., IMLAY, J.A., 2007, Bactericidal antibiotics and oxidative stress: a radical proposal, *ACS Chemical Biology*, 2(11), 708-710.

HENTZE, H., GANTHER, F., KOLB, S.A., WENDEL, A., 2000, Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice, *American Journal of Pathology*, 156(6), 2045-2056.

HONDA, H., UEDA, M., KOJIMA, S., MASHIBA, S., HIRAI, Y., HOSAKA, N., SUZUKI, H., MUKAI, M., WATANABE, M., TAKAHASHI, K., SHISHIDO, K., AKIZAWA, T., 2009, Assessment of myeloperoxidase and oxidative alfa1-antitrypsin in patients on hemodialysis, *Clinic Journal the American Society of Nephrology*, 4, 142-151.

HONG-SHIEE, L., WEI-JAO, C., LONG-YONG, C., 2000, Free radical scavenging activity of fullerol on the ischemia- reperfusion intestine in dogs, *World Journal of Surgery*, 24, 450-454.

HOWARTH, G.S., FRANCIS, G.L., COOL, J.C., XU, X., , BYARD, R.W., READ, L.C., 1996, Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats, *The Journal of Nutrition*, 129, 2519-2530.

HUMANSON, G.L., 1972, *Animal tissue techniques*, H.W. Freeman and Company, San Francisco, ISBN: 61-17383.

HUSSEIN, M.S.H., AZZA, H., ABD-EL-RAHMAN, H., MOHAMED, E.T., 2010, The protective effect of vitamin E against the neurotoxic effect of aluminum chlorid in male albino rat, *Journal of American Science* ,6(10), 978-991.

HYCULT, *HK105 ELISA Kit Product Information and Manual*, Hycult Biotechnology, The Netherlands.

IANAS, O., OLIVESCU, R., BADESCU, I., 1991, Melatonin involvement in oxidative processes, *Romanian Journal of Endocrinology*, 29, 117-123.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH, 2011, *Guide for the care and use of laboratory animals*, The National Academies Press, Washington D.C., ISBN: 0-309-15401-4.

JAVOIS, L.C., 1999, *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Humana press, New Jersey, ISBN: 0-89603-570-0.

JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M., VALKO, M., 2010, Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345, 91-104.

JONES, D.P., 2008, Radical-free biology of oxidative stres, *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 295, 849-868.

JONES, S.P., HOFFMEYER, M.R., SHARP, B.R., HO, Y.S., LEFER, D.J., 2003, Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion, *American Journal of Physiology Hearh and Circulatory Physiology*, 284, 277-282.

JUNQUEIRA, B., CARNEIRO, D., 2009, *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 97897542006999.

KARBOWNIK, M., REITER, R.J., 2000, Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation, *Society for Experimental Biology and Medicine*, 225, 9-22.

KELLY, F.J., 2003, Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects, *Occupation of Environmental Medicine*, 60, 612-616.

KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T.C., ABRAMO, K.H., LEVIN, E.D., 1998, Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 375-384.

KHATTAB, F.K.I., 2007, Histological and ultrastructural studies on the testis of rat after treatment with aluminium chloride, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(1), 63-72.

KIERSZENBAUM, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, İstanbul, ISBN: 994-4341-0-29.

- KIM, C.H., LEE, M.J., LEE, S.M., CHANG-LEE, W., KIM, J.S., 1998, Effect of melatonin on cadmium-induced hepatotoxicity in male sprague-dawley rats, *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 186, 205-213.
- KOHEN, R., NYSKA, A., 2002, Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification, *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650.
- KONTOYIANNIS, D., BOULOUGOURIS, G., MANOLOUKOS, M., ARMAKA, M., APOSTOLAKI, M., PIZARRO, T., KOTLYAROV, A., FORSTER, I., FLAVELL, R., GAESTEL, M., TSICHLIS, P., COMINELLI, F., KOLLIAS, G., 2002, Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced crohn's-like inflammatory bowel disease, *Journal of Experimental Medicine*, 196(12), 1563–1574.
- KRANNER, I., BIRTIC, S., 2005, A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance, *Integrative and Comparative Biology*, 45, 734-740.
- KREWSKI, D., YOKEL, R.A., NIEBOER, E., BORCHELT, D., COHEN, J., HARRY, J., KACEW, S., LINDSAY, J., MAHFOUZ, A.M., RONDEAU, V., 2007, Human health risk assessment for aluminum, aluminum oxide and aluminum hydroxide, *Journal of Toxicologic Environmental Health Reviews*, 10(1), 1-269.
- KRUIDENIER, L., KUIPER, I., DUIJN, W., MIEREMET-OOMS, M.A.C., HOGEZAND, R.A., LAMERS, C.B.H.W., VERSPAGET, H.W., 2003, Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease, *Journal of Pathology*, 201, 17-27.
- KRUIDENIER, L., VERSPAGET, H.W., 2002, Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or ridiculous, *Aliment Pharmacology Therapy*, 16, 1997–2015.
- KUMBUL, K., 2007, *Deneyisel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl esterin akciğer hasarını önlemedeki etkinliği*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- KUTLUBAY, R., OGUZ, E.O., CAN, B., GUVEN, M.C., SINIK, Z., TUNCAY, O.L., 2007, Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminum, *International Journal of Toxicology*, 26, 297-306.
- LAI, H.S., CHEN, W.J., CHIANG, L.Y., 2000, Free radical scavenging activity of fullereneol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs, *World Journal Surgery*, 24, 450-454.
- LERNER, A., 2007, Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107, 329-345.
- LESGARDS, J.F., GAUTHIER, C., IOVANNA, J., VIDAL, N., DOLLA, A., STOCKER, P., 2011, Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes, *Chemico-Biological Interactions*, 190(1), 28-34.

- LI, J.Y., YIN, H.Z., GU, X., ZHOU, Y., ZHANG, W.H., QIN, Y.M., 2008, Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats, *World Journal of Gastroenterology*, 14(48), 7392-7396.
- LORIA, V., DATO, I., GRAZIANI, F., BIASUCCI, L.M., 2008, Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes, *Mediators of Inflammation*, 1155, 1-4.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, W.I., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- MALEKSHAH, A.K., TORABIZADEH, Z., NAGHSHWAR, F., 2005, Developmental toxicity of aluminum from high doses of AlCl<sub>3</sub> in mice, *The Journal of Applied Research*, 5(4), 575-579.
- MATES, J.M., 2000, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species, *Toxicology*, 153, 83-104.
- MERCAN, U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-96.
- MERKLE, V.D., 2007, Crohn's disease, *Science Based Nutrition*, 1-8.
- MERLE, A., DELAGRANGE, P.H., RENARD, P., LESIEUR, D., CUBER, J.C., ROCHE, M., PELLISSIER, S., 2000, Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153, *Journal of Pineal Research*, 29(2), 116-124.
- MILLAN-PLANO, S., PIEDRAFITA, E., MIANA-MENA, F.J., FUENTES-BROTO, L., MARTÍNEZ-BALLARIN, E., LOPEZ-PINGARRON, L., SAENZ, M.A., GARCIA, J.J., 2010, Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 312-328.
- MORHAN, S.D., CHONG, Z.Z., MAIESEL, K., 2010, *Oxidative stress and diabetes, research article*, Wayne State University School of Medicine, Detroit.
- MOUMEN, R., AIT-OUKHATAR, N., FLEURY, C., BOUGLE, D., ARHAN, P., NEUVILLE, D., VIADER, F., 2001, Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat, *Journal of Trace Elements Medical Biology*, 15, 89-93.
- NAITO, Y., LEE, M.C., KATO, Y., NAGAI, R., YONEI, Y., 2010, Oxidative stress markers, *Anti-Aging Medicine*, 7(5), 36-44.
- NATIONAL DIGESTIVE DISEASES, 2006, *Crohn's disease*, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Publication No: 06-3410.
- NAYAK, P., 2002, Aluminum: impacts and disease, *Environmental Research Section A*, 89, 101-115.

NEHRU, B., ANAND, P., 2005, Oxidative damage following chronic aluminum exposure in adult and pup rat brains, *Journal of Trace Elements Medical Biology*, 19(2), 203-208.

NORDBERG, M., 1998, Metallothioneins: historical review and state of knowledge, *Talanta*, 46(2), 243-253.

OKTAY, E., 2001, İnflamatuvar barsak hastalıkları: etyopatogenez, semptomatoloji, tanı ve komplikasyonları, *İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, 11-12 Ocak 2001, İstanbul*, 199-206.

OSINSKA, E., KANONIUK, D., KUSIAK, A., 2004, Aluminum hematoxicity mechanisms, *Annual University of Marie Cruie Sklodowska Medicine*, 59, 411-416.

ÖZDEN, A., 2008, *Ratlarda deneysel olarak oluşturulan iyonik kontrast madde kaynaklı böbrek hasarında oksidatif stresin fonksiyonu ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil esterinin etkisinin araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi.

ÖZELÇİ-KAVAS, G., 1994, Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım, *Ankara Tıp Fakültesi Dergisi*, 47, 579-592.

PENNINCKX, M., 2000, A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses, *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), 737-742.

PEREIRA, L.B., MAZZANT', C.M., GONCALVES, J.F., CARGNELUTTI, D., TABALDI, L.A., BECKER, A.G., CALGAROTO, N.S., FARIAS, J.G., BATTISTI, V., BOHRER, D., NICOLOSO, F.T., MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R., 2010, Aluminum-induced oxidative stress in cucumber, *Plant Physiology and Biochemical*, 48(8), 683-689.

PERL, D.P., FOGARTY, U., HARPAZ, N., SACHAR, D.B., 2004, Bacterial-metal interactions: the potential role of aluminum and other trace elements in the etiology of Crohn's disease, *Inflammatuar Bowel Diseases*, 10(6), 881-883.

PIZARRO, T.T., ARSENEAU, K.O., BAMIAS, G., COMINELLI, F., 2003, Mouse models for the study of Crohn's disease, *Trends in Molecular Medicine*, 9(5), 218-222.

REITER, R., TANG, L., GARCIA, J.J., MUNOZ-HOYOS, A., 1997, Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology, *Life Sciences*, 60(25), 2255-2271.

REITER, R.J., TAN, D.X., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., LEON, J., CZARNOCKI, Z., 2003, Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans, *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129-1146.

ROMEU, M., MULERO, M., GIRALT, M., FOLCH, J., NOGUES, M.R., TORRES, A., FORTUNO, A., SUREDA, F.X., CABRE, M., PATERNAIN, J.L., MALLOL, J.,

2002, Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat, *Life Sciences*, 71, 1739-1749.

SARTOR, R.B., 2006, Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis, *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 3(7), 390-407.

SHARMA, V., SHARMA, S., PRACHETA, S.S., 2011, Lead induced hepatotoxicity in male swiss albino mice the protective potential of the hydromethanolic extract of withania somnifera, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7(2), 116-121.

SHURYAK, I., BRENNER, D.J., 2009, A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in deinococcus radiodurans, *Journal of Theoretical Biology*, 261, 305–317.

SIDO, B., SEEL, C., HOCHLEHNERT, A., 2006, Low intestinal glutamine level and low glutaminase activity in Crohn's disease: a rationale for glutamine supplementation, *Digestive Disease Science*, 51, 2170-2179.

SIMONOVICOVA, M., TAMAS, L., HUTTOVA, J., MISTRİK, I., 2003, Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots, *Biologia Plantarum*, 48(2), 261-266.

SUREDA, A., TAULER, P., AGUILO, A., CASES, N., FUENTESPINA, E., CORDOVA, A., TUR, J.A., PONS, A., 2005, Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise, *Free Radical Research*, 39(12), 1317-1324.

TANDON, V.R., SHARMA, S., MAHAJAN, A., BARDI, G.H., 2005, Oxidative stress: a novel strategy in cancer treatment, *JK Science*, 7(1), 1-3.

TAŞKIN, E.İ., AKGÜN-DAR, K., KAPUCU, A., ALTUNBAŞ, K., FIRAT, İ., DOĞRUMAN, H., 2008, Sıçan kolon epiteli proliferasyonuna orlistat ve yeşil çayın etkisi, beta katenin ile olan ilişkisi, *Nobel Medicine*, 4(3), 15-19.

THOMPSON, E.D., OLSSON, P.E., MAYER, G.D., HAUX, C., WALSH, P.J., BURGE, E., HOGSTRAND, C., 2001, Effects of 17 $\beta$ -estradiol on levels and distribution of metallothionein and zinc in squirrelfish, *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280, 527-535.

THOR, P.J., KROLCZYK, G., GIL, K., ZUROWSKI, D., NOWAK, L., 2007, Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(6), 97-105.

TOBOREK, M., BARGER, S.W., MATTSON, M.P., MCCLAIN, C.J., HENNIG, B., 1995, Role of glutathione redox cycle in TNF- $\alpha$ - mediated endothelial cell dysfunction, *Atherosclerosis*, 117, 179-188.

TOKLU, H., DENİZ, M., YUKSEL, M., KEYER-UYSAL, M., SENER, G., 2009, The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative brain injury in rats, *Marmara Medical Journal*, 22(1), 34-44.

TOMAS-ZAPICO, C., COTO-MONTES, A., 2006, Melatonin as antioxidant under pathological processes, *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 1, 63-82.

TURGUT, G., KAPTANOGLU, B., TURGUT, S., ENLI, Y., GENÇ, O., 2004, Effects of chronic aluminum administration on blood and liver iron-related parameters in mice, *Yonsei Medical Journal*, 45(1), 135-139.

TURGUT, S., BOR-KUCUKATAY, M., EMMUNGİL, G., ATSAK, P., TURGUT, G., 2007, The effects of low dose aluminum on hemorheological and hematological parameters in rats, *Archives of Toxicology*, 81, 11-17.

TURNA, G., 2008, *Ehrlich asid solid tümör model oluşturulmuş farelerde thymus sipyleus ve taurinin karaciğer MDA, glutasyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M.T.D., 2005 Metals, toxicity and oxidative stress *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161-1208.

VALKO, M., NEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.

VARDI, N., IRAZ, M., ÖZTÜRK, F., GÜL, M., UÇAR, M., ÇETİN, A., NALÇACI, N., OTLU, A., 2007, Deneysel diyabetin sıçan karaciğerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri, *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, 27, 641-648.

WHITEHEAD, M.W., FARRAR, G., CHRISTIE, G.L., BLAIR, J.A., THOMPSON, R.P.H., POWELL, J.J., 1997, Mechanisms of aluminum absorption in rats, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1446-1452.

WU, D., CEBERBAUM, A.I., 2003, Alcohol, oxidative stress and free radical damage, *Alcohol Research and Health*, 27(4), 277-284.

YAZICI, C., KÖSE, K., 2004, Melatonin: karanlığın antioksidan gücü, *Erciyes University Journal of Health Sciences*, 13(2), 56-65.

YENİGÜL, E., 2006, *Alüminyum ve bazı organik asitlerin etkileşiminin spektrometrik ve kromatografik yöntemlerle tayini*, Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

YOKEL, R.A., McNAMARA, P.J., 2001, Aluminium toxicokinetics: an updated minireview, *Pharmacologic Toxicology*, 88(4), 159-167.

YOUSEF, M.I., KAMEL, K.I., EL-GUENDI, M.I., EL-DEMERDASH, F.M., 2007, An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants, *Toxicology*, 239(3), 213-223.

YU, W.H., LUKIW, W.J., BERGERON, C., NIZNIK, H.B., FRASER, P.E., 2001, Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease, *Brain Researches*, 894(1), 37-45.

YÜCE, A., AKSAKAL, M., 2006, Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi, 2006, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(1), 51-59.

ZHANG, W., TIE, J., SHEN, H., 1998, A preliminary study on the induction of metallothionein in rats with aluminum administration by different ways, *Journal Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 32(3), 153-155.

ZHOU, G., XU, Y., LI, J., YANG, L., LIU, J.Y., 2006, Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5), 595-606.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında Konya'da doğdum. İlköğrenimimi 1999 yılına kadar İzmir Gazikent İlköğretim Okulu'nda ve daha sonra Ankara Çankaya İlköğretim Okulu'nda tamamladım. 1999 yılında Ankara Süleyman Demirel Anadolu Lisesi'ni kazanarak 2003 yılında mezun oldum. Lisans öğrenimimi İzmir Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun olarak tamamladım. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Programında yüksek lisansa başladım.