

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK FLOROZİS'Lİ FARELERDE PLAZMA  
PARAOKSONAZ, SİYALİK ASİT ve OKSİDATİF STRES  
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN ETKİSİ**

**Arş. Gör. İnan KAYA**  
**Biyokimya Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN**

**2012-KARS**

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK FLOROZİS'Lİ FARELERDE PLAZMA  
PARAOKSONAZ, SİALİK ASİT ve OKSİDATİF STRES  
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN ETKİSİ**

**Arş. Gör. İnan KAYA**  
**Biyokimya Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN**

**2012-KARS**

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: 2011-VF-02

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde Arş. Gör. İnan KAYA'nın Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı "**Kronik Florozis'li Farelerde Plazma Paraoksonaz, Sialik Asit ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Ellagik Asitin Etkisi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi:** 19/10/2012

**Adı ve Soyadı**

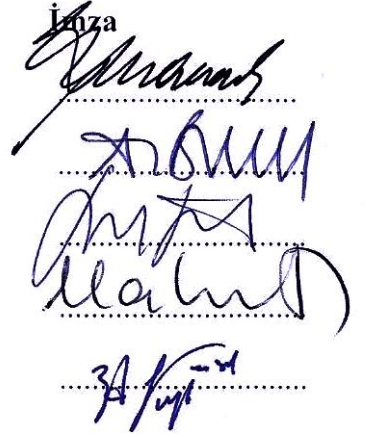
**Başkan :** Prof. Dr. Şaban MARAŞLI

**Üye :** Prof. Dr. Ayla ÖZCAN

**Üye :** Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL

**Üye :** Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI

*İmza*  


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ 2012 gün ve ...../.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL

**Enstitü Müdürü**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Simgeler ve Kısaltmalar .....	I
Grafikler Dizini .....	III
Tablolar Dizini .....	IV
Şekiller Dizini .....	V
Resimler Dizini.....	VI
İthaf .....	VII
Önsöz .....	VIII
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Florun Genel Özellikleri.....	1
1.2. Florun Antropojenik Kullanımı .....	3
1.2.1. Hidrojen Florid .....	3
1.2.2. Sodyum Florid .....	4
1.2.3. Sülfür Hekzaflorid .....	4
1.2.4. Florapatit .....	4
1.2.5. Suni Fosfat Gübresi.....	4
1.2.6. Kalsiyum Florid .....	5
1.3. Florun Etkileri .....	5
1.3.1. Florozis.....	7
1.4. Serbest Radikaller.....	11
1.4.1. Organizmalarda Bulunan Başlıca Serbest Radikaller .....	12
1.4.1.1. Reaktif Oksijen Türleri .....	13
1.4.1.1.1. Malondialdehit .....	16
1.4.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri .....	17
1.4.1.3. Florozis ve Serbest Radikaller .....	19
1.5. Antioksidanlar .....	20
1.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	21
1.5.1.1. Glutatyon .....	23
1.5.1.2. Paraoksonaz Enzimi.....	25
1.5.1.2.1. PON1'in Yapısı ve Özellikleri.....	27

1.5.1.2.2. PON1 ve Oksidan Durum .....	27
1.5.1.3. Ellagik Asit .....	28
1.6. Sialik Asit .....	31
1.6.1. Florozis ve Sialik Asit .....	34
1.7. Plazma Lipidleri .....	34
1.7.1. Trigliserid .....	36
1.7.2. Kolesterol .....	36
1.7.3. Lipoproteinler .....	37
1.7.4. Florozis ve Plazma Lipidleri .....	41
2. MATERYAL ve METOT .....	42
2.1. Materyal .....	42
2.1.2. Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi .....	43
2.1.3. Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi .....	43
2.2. Metot .....	43
2.2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	43
2.2.2. Analizlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	44
2.2.3. Analizlerde Kullanılan Metotlar .....	45
2.2.3.1. LSA Analizi .....	45
2.2.3.2. MDA Analizi .....	47
2.2.3.3. GSH Analizi .....	49
2.2.3.4. Paraoksonaz Aktivitesinin Analizi .....	50
2.2.3.5. Plazma Total Kolesterol, Trigliserid, HDL, LDL, VLDL, Glukoz ve Kalsiyum Analizi .....	52
2.2.3.6. İdrarda Flor Analizi .....	52
2.2.3.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusunun Histopatolojik Değerlendirmesi .....	52
2.2.3.8. İstatistiksel Analizler .....	52
3. BULGULAR .....	54
4. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	70
5. ÖZET .....	83
6. ABSTRACT .....	84
7. KAYNAKLAR .....	85
8. ÖZGEÇMİŞ .....	112

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>Ca<sub>10</sub>F<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b>	: Florapatit
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DTNB</b>	: Ditiyobis Nitrobenzoik Asit
<b>EA</b>	: Ellagik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>ETS</b>	: Elektron Taşıma Zinciri
<b>GHSs</b>	: Büyüme Hormonu Salgılatıcıları
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>GSHP<sub>x</sub></b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub></b>	: Silisik Asit
<b>HDL</b>	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
<b>I.U.</b>	: International Unit
<b>IDL</b>	: Ara Dansiteli Lipoproteinler
<b>LDL</b>	: Düşük Dansiteli Lipoproteinler
<b>LOO<sup>·</sup></b>	: Peroksil radikali
<b>LOOH<sup>·</sup></b>	: Lipit hidroperoksit
<b>LSA</b>	: Lipid Bağlı Sialik Asit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mRNA</b>	: Haberci RNA
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NaF</b>	: Sodyum Florid
<b>NANA</b>	: N-Asetil Nöraminik Asit
<b>Neu5Ac</b>	: N-Asetil Nöraminik Asit
<b>Neu5Gc</b>	: N-Glikolil Nöraminik Asit
<b>PON</b>	: Paraoksonaz
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri

<b>RNS</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>SA</b>	: Sialik Asit
<b>SH</b>	: Sülfidril grubu
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik asit
<b>VLDL</b>	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

**Grafikler Dizini**

	<u>Sayfa no</u>
<b>Grafik 2.2.3.1.1.1.</b> Sialik asit kalibrasyon eğrisi	47
<b>Grafik 2.2.3.2.1.1.</b> MDA kalibrasyon eğrisi	48
<b>Grafik 2.2.3.3.1.1.</b> GSH kalibrasyon eğrisi	50
<b>Grafik 3.1.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma LSA düzeyleri	59
<b>Grafik 3.2.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma MDA düzeyleri	59
<b>Grafik 3.3.</b> Kontrol ve deney gruplarının tam kan GSH düzeyleri	60
<b>Grafik 3.4.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma PON aktivitesi düzeyleri	60
<b>Grafik 3.5.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma total kolesterol düzeyleri	61
<b>Grafik 3.6.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma trigliserid düzeyleri	61
<b>Grafik 3.7.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma HDL düzeyleri	62
<b>Grafik 3.8.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma VLDL düzeyleri	62
<b>Grafik 3.9.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma LDL düzeyleri	63
<b>Grafik 3.10.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma glukoz düzeyleri	63
<b>Grafik 3.11.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma kalsiyum düzeyleri	64



**Tablolar Dizini**

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 1.7.1.</b> Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	22
<b>Tablo 2.2.3.2.1.</b> MDA ölçümü için uygulanan işlemler	48
<b>Tablo 2.2.3.3.1.</b> GSH ölçümü için yapılan işlemler	50
<b>Tablo 2.2.3.4.1.</b> Paraoksonaz aktivite tayini için reaksiyon karışımı	51
<b>Tablo 3.1.</b> Kontrol, NaF ve EA+NaF gruplarında idrar flor düzeyleri	55
<b>Tablo 3.2.</b> Kontrol grubu ile DMSO, EA, NaF ve EA+NaF grubu farelerde biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar	56
<b>Tablo 3.3.</b> Kontrol, DMSO, EA, NaF ve EA+NaF verilen farelerin ikişer hafta aralıklar ile ölçülen vücut ağırlıkları (g)	57
<b>Tablo 3.4.</b> Kontrol ve deney gruplarının plazma LSA, MDA, PON, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, glukoz ve kalsiyum düzeyleri ile tam kan GSH düzeyleri	58

**Şekiller Dizini**

	<u>Sayfa no</u>
<b>Şekil 1.1.1.</b> Doğada flor döngüsü	3
<b>Şekil 1.3.1.</b> Besinler ile alın florun vücutta dağılımı	6
<b>Şekil 1.4.1.1.1.</b> Singlet oksijen formları	16
<b>Şekil 1.4.1.1.1.1.</b> İki önemli MDA oluşum mekanizması	18
<b>Şekil 1.8.1.</b> Glutasyon ( $\gamma$ -glutamil sisteinil glisin)	23
<b>Şekil 1.8.2.</b> GSH'ın süperoksit ve hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sırasındaki fonksiyonu	25
<b>Şekil 1.12.1.</b> PON1'in etkisi ile paraoksonun hidrolizi	26
<b>Şekil 1.9.1.</b> Ellagik asitin sentezi ve kimyasal yapısı	30
<b>Şekil 1.10.1.1.</b> Sialik asit varyasyonları için önemli yapısal özellikler	32
<b>Şekil 1.11.1.1.</b> Plazma lipidlerinin eksojen ve endojen taşınması	36

**Resimler Dizini**

	<u>Sayfa no</u>
<b>Resim 3.1.</b> Kontrol grubu bir fareden 8 hafta sonra alınan karaciğerin görünümü	65
<b>Resim 3.2.</b> 8 hafta süre ile oral yolla 25 mg/L NaF verilen bir farenin karaciğerinde ödem ve dissosiasyon	65
<b>Resim 3.3.</b> 8 hafta süre ile oral yolla 25 mg/L NaF verilen bir farenin karaciğerinde hepatositlerde nekroz, bazı hepatositlerde çekirdekte büyüme ve hiperkromazi	66
<b>Resim 3.4.</b> 8 hafta süre ile 10 mg/L ellagik asit verilen bir farenin karaciğerinde hafif derecede dejenerasyon	66
<b>Resim 3.5.</b> 8 hafta süre ile 10 mg/L ellagik asit verilen bir farenin karaciğerinde yağ ve vakuoler dejenerasyon	67
<b>Resim 3.6.</b> Kontrol grubu bir fareden 8 hafta sonra alınan böbreğin görünümü	68
<b>Resim 3.7.</b> 8 hafta süre ile oral yolla 25 mg/L NaF verilen bir farenin böbreğinde proksimal tubül epitellerinde hidropik dejenerasyon, nekroz ile tubül lümenlerinde dilatasyon	68
<b>Resim 3.8.</b> 8 hafta süre ile oral yolla 25 mg/L NaF ve deri altı yolla olarak 10 mg/kg ellagik asit verilen bir farenin böbreğinde proksimal tubül epitellerinde orta derecede hidropik dejenerasyon, az sayıda nekrotik epitel hücresi ile tubül lümenlerinde dilatasyon	69

**İTHAF**

*Tezimi, 14 Nisan 2012'den beri yokluğunu her an hissettiğim canım babam*

*Karabey KAYA'ya ithaf ediyorum.*

**ÖNSÖZ**

2050 yılına kadar dünya insan nüfusunun yaklaşık 10 milyara ulaşması beklenmektedir. Dolayısıyla; çevre, sağlık, gıda ve enerji 21. YY' da insanlık ve tüm canlılar için en fazla tartışılacak konular arasında bulunmaktadır. Bu doğrultuda, çevresel değişimlere göre gelişen hastalıkların en iyi şekilde teşhis edilebilmesi ve önlemlerinin alınması gerekmektedir.

Toprak, su ve bitkiler aracılığı ile yüksek miktarda flor alınması sonucu şekillenen hastalığa "flor zehirlenmesi" veya "florozis" adı verilmektedir. Canlıların bünyesine katılan flor, en fazla içme suyu yolu ile alınmaktadır. Kronik florozis'li canlılara, volkanik aktivitelerin ve endüstriyel flor atıklarının bulunduğu bölgelerde rastlanılmaktadır. Normal değerlerde alınan flor, diş dokusunda çürük oluşmasını önlemekte ve kemik dokusunun sağlam bir şekilde olgunlaşmasını hızlandırmaktadır. Kronik florozis'te, esas olarak diş ve iskelet sisteminde olumsuz etkiler oluşmasına karşılık, diğer organ ve sistemlerde de metabolik değişiklikler meydana gelmektedir.

Florozis'in metabolik etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, çevresel faktörlerin kontrol altında tutulduğu ortamda oluşan kronik florozis'li canlılarda biyokimyasal parametre düzeylerinin ve bu düzeyler üzerine koruyucu özellikleri olduğu ileri sürülen fenolik bileşiklerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bitkisel besin maddelerinde fenolik bir bileşik olarak bulunan ellagik asitin (EA'nın); antioksidan, antiinflamatuvar, antifibrosis ve antikanserojenik etkiler gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmada, deneysel kronik florozis oluşturulan farelerin plazma kalsiyum, glukoz, malondialdehit (MDA), lipid bağlı sialik asit (LSA), paraoksonaz (PON) aktivitesi ve plazma lipid profilleri ile tam kan redükte glutatyon (GSH) düzeylerinde meydana gelebilecek değişimlere karşı güçlü antioksidan özelliği olduğu ileri sürülen EA'nın koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Doktoram süresince karşılaştığım güçlüklerin giderilmesinde ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN'a, laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Şaban MARAŞLI ve Prof. Dr. Ayla ÖZCAN'a, çalışmanın uygulanmasında

değerlendirmelerinden yararlandığım Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL'e, deney hayvanlarının yetiştirilmesinde tecrübelerini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Yusuf ERSAN'a, Doç. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye, doku örneklerinin alınmasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Hasan ÖZEN, Doç. Dr. Musa KARAMAN ve sevgili eşim Müge MAVİOĞLU KAYA'ya, çalışmanın farklı safhalarında yardımlarını gördüğüm doktora eğitimi arkadaşım Ümit Volkan EKİNCİ, Öğr. Gör. Hacı Ahmet DEVECİ ve Araş. Gör. Abdulsamed KÜKÜRT'e, projeye maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na, manevi desteklerini esirgemeyen ailemin tüm bireyelerine ve "bu çalışmada katkı var" diyen herkese teşekkürlerimi sunmayı zevkli bir görev sayarım.

## 1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1.1. Florun Genel Özellikleri

Flor, atom numarası 9, atom ağırlığı 18.998 g/mol, erime sıcaklığı  $-219.6^{\circ}\text{C}$ , kaynama sıcaklığı  $-188.14^{\circ}\text{C}$ , ozonu andıran kokuya sahip, yeşilimsi açık sarı renkli ve periyodik sistemde halojenler grubunda yer alan bir elementtir. Yer kabuğunda % 0.03 oranında bulunan flor, yüksek elektronegatif özelliğinden dolayı diğer elementlerle birleşerek tuz halinde bulunmaktadır. Flor elementinin başka bir element ile yaptığı tuz, “florid” olarak tanımlanmaktadır. Bu tuzlar sodyum florid (NaF), florapatit  $[\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6]$  veya kalsiyum florid ( $\text{CaF}_2$ ) gibi solid maddelerdir. Toprak, su, kaya, hava, bitki ve hayvanlarda bulunan flor, organizmada başlıca kemik ve dişlerde depolanmaktadır (23, 237).

Çözünebilen inorganik flor, omurgalı canlıların diş ve iskelet dokularında, omurgasızların dış iskelet dokusunda ve bitkilerin hücre duvarlarında birikme eğilimindedir (99, 132, 169). Florid bileşikleri, canlı organizmalarda gastrointestinal sistemden hızlı ve etkili bir şekilde emildikten sonra, kan yoluyla proteinlere bağlanmadan tüm vücuda dağılmaktadır. Flor, vücutta büyük oranda kalsifiye dokularda birikmekte olup, oral yolla alınan florun birincil atılım yeri böbreklerdir. Ayrıca idrar, dışkı ve ter ile vücuttan atılmaktadır (237).

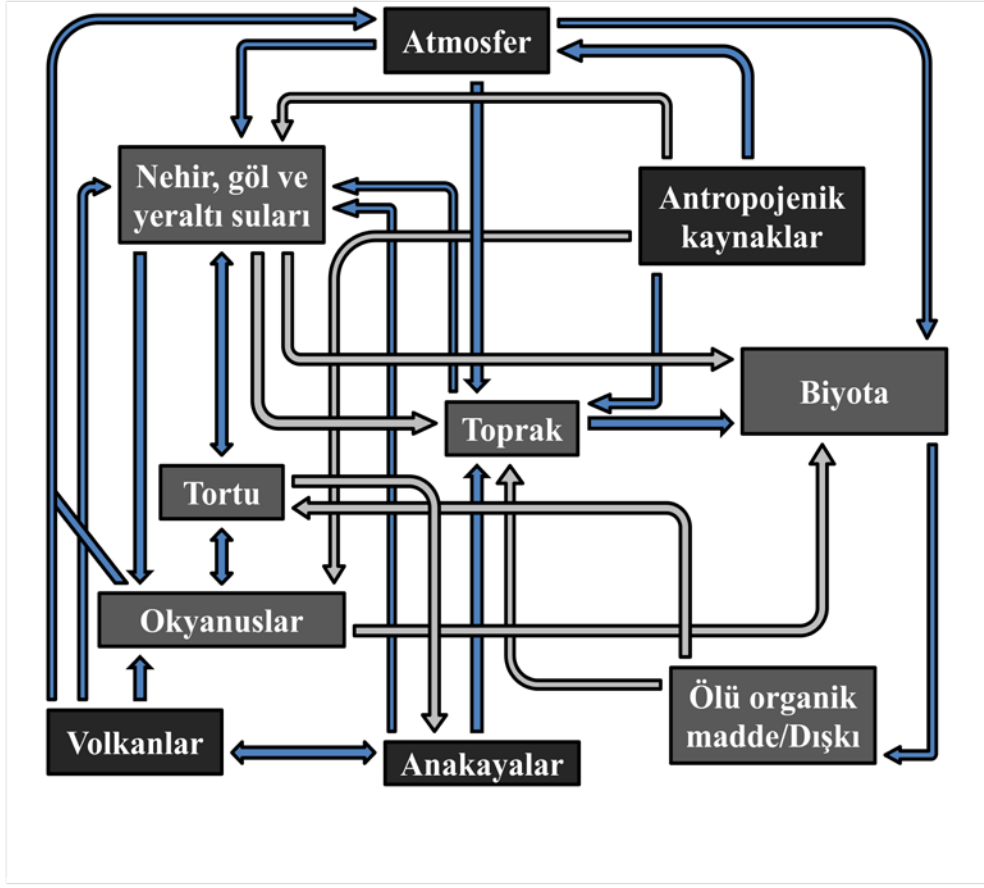
Atmosferde bulunan inorganik flor, aerosol oluşumu, buharlaşma, nem, kuraklık ve hidroliz durumlarının etkisi altında bulunmaktadır. Saf ve uçucu halde bulunmayan inorganik flor partikülleri yoğunlaşma ile atmosferden uzaklaştırılmaktadır. Atmosferik flor hem doğal hem de antropojenik olarak gaz ya da partikül formundadır (133). Atmosferde gaz halinde bulunan flor, hidrojen florid, silisyum tetra florid ( $\text{SiF}_4$ ), florosilisik asit ve sülfür heksaflorid bileşikleri halindedir. Partiküler formda ise kriyolit ( $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ ), alüminyum florid ( $\text{AlF}_3$ ), kalsiyum florid ( $\text{CaF}_2$ ), sodyum heksaflorosilikat ( $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ ), kurşun florid ( $\text{PbF}_2$ ) ve  $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$  şeklindedir. Küresel olarak atmosferdeki florun yaklaşık % 75’inin hidrojen florid, % 25’inin de inorganik florid partikülleri (sodyum ve kalsiyum florid vb.) halinde olduğu kaydedilmektedir (243). Atmosferik flor ve silisyum floridler hidroliz yoluyla

hidrojen floridleri oluşturmaktadır. Floridler atmosferik ortamda genel olarak stabil kalmakta olup kolaylıkla hidrolize edilememektedir (243). Maden kömürü kullanılan kentlerde atmosferik sülfür hekzaflorid miktarının artacağı ve bu gaz oluşumunun atmosferde en az 500 yıl kalabileceği bildirilmektedir (60, 216).

Toprakta bulunan inorganik florun temel kaynağı kayalardır (244). Topraktaki inorganik flor mobilitesini etkileyen temel faktörler pH,  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  kompleksleridir (75, 188). Asiditesi yüksek olan topraklarda inorganik flor içeriği alkali ve tuzlu topraklara göre daha yüksektir. Ayrıca iklim şartları ile toprağın kimyasal ve fiziksel özellikleri inorganik flor dağılımında önemlidir. Yeterli  $CaCO_3$ 'e sahip yüksek alkali topraklarda ( $pH > 6.5$ ) florun tamamına yakını  $CaF_2$  halindedir (243).

Suda bulunan flor,  $Al^{+3}$  ile kompleks oluşturmuş halde olup, aşırı alkali ve asidik yapıdaki sularda bulunan inorganik flor, yüzey suları veya yeraltı sularına karışabilmektedir (10). Florun kompleks bileşikleri,  $Al^{+3}$  ve  $Mg^{+2}$  bakımından zengin bentonit veya humik asit gibi iyon değiştirici maddelerin varlığında daha çok oluşabilmektedir (188). Yengeç (*Tylodiplax blephariskios*), karides (*Palaemon pacificus*) ve tekir balıkları (*Mugil cephalus*) 72 gün boyunca 52 mg/L'lik inorganik florid dozuna maruz bırakıldığında hayvanların kül flor konsantrasyonlarının sırasıyla 1414, 3116 ve 7743 mg/kg olduğu saptanmıştır (99). Yapılan bir çalışmada, deney havuzuna 22 mg/L dozunda ilave edilen  $NaF$ 'nin bu havuzda yaşamakta olan akuatik damarlı bitkiler, algler, yumuşakçalar ve balıklarda flor konsantrasyonlarının sırasıyla 35, 14, 12 ve 7 kat arttığı kaydedilmektedir (139). Florun doğadaki döngüsü Şekil 1.1.1'de gösterilmiştir.





Şekil 1.1.1. Doğada flor döngüsü (78)

## 1.2. Florun Antropojenik Kullanımı

### 1.2.1. Hidrojen Florid (HF)

Hidrojen florid, dünyada yıllık olarak 1 milyon tondan daha fazla kullanılan önemli bir endüstriyel bileşiktir (243).  $\text{CaF}_2$ 'den üretilen HF başlıca sentetik kriyolit,  $\text{AlF}_3$ , motor benzin alkilatları ve kloroflorokarbonların üretimi için kullanılmaktadır. Ancak yasal sınırlamalardan dolayı kloroflorokarbon üretimi azalmaktadır. Hidrojen florid nükleer endüstrisi için uranyum tetraflorid ( $\text{UF}_4$ ) ve uranyum hekzaflorid ( $\text{UF}_6$ ) sentezinde de kullanılmaktadır. Yine hidrojen florid cam, tuğla ve alüminyum yüzeylerin parlatılması, petrokimyasal imalatlarda, deri tabaklamasında ve pasların giderilmesinde de kullanılmaktadır (233, 243).

### **1.2.2. Sodyum Florid (NaF)**

Sodyum florid, HF ile  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve NaOH'den elde edilmektedir. Cam, elik, aluminyum, insektisit ve dış tabaka koruyucularının üretiminde kullanılmaktadır (243).

### **1.2.3. Sülfür Hekzaflorid ( $\text{SF}_6$ )**

Sülfür hekzaflorid, elektriksel donatıların kullanıldığı alanlarda yalıtım malzemesi olması ve eriyik haldeki  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Al}^{+3}$  gibi metaller üzerinde koruyucu ve durağan gaz olarak kullanılması bakımından önemli bir bileşiktir (243).

### **1.2.4. Florapatit [ $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$ ]**

Florapatit gübre sektöründe fosfat kaynağı olarak kullanılan ve önemli oranda  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{F}^-$  iyonu içeren bir bileşiktir (243).

### **1.2.5. Suni Fosfat Gübresi**

Suni fosfat gübreleri tarımsal topraklarda flor kontaminasyonunun önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. Bunlar genel olarak yaklaşık % 3.5 oranında flor içeren kaya fosfatlarından elde edilmektedir (96). Fosfatlı gübrelerin üretimi esnasında sülfür ve amonyum iyonu ile dilüsyon işlemi uygulanırken florun bir kısmı atmosfere karışmaktadır. Atmosfere karışan flordan dolayı fosfatlı gübrelerdeki flor oranı % 1.3-3'dr (243).

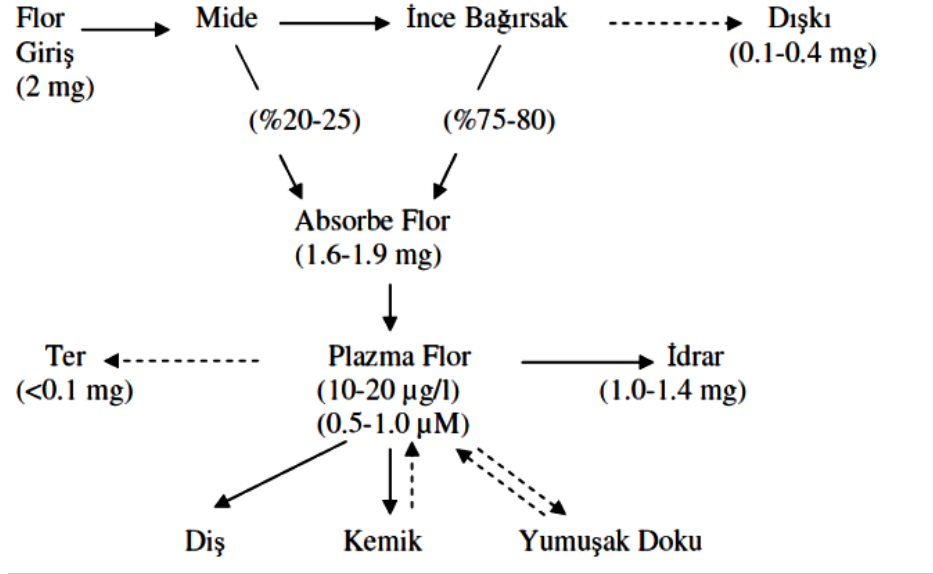
### 1.2.6. Kalsiyum Florid (CaF<sub>2</sub>)

Kalsiyum florid, endüstriyel olarak flor elementinden faydalanmak için kullanılmaktadır (244). Çelik, cam ve parlaticıların üretiminde bir eriyik olarak tüketilmesinin yanında hidroflorik asit üretiminde de ham maddedir. Alüminyum üretiminde oksijen ve Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in ayrılmasında da elektrolit olarak tercih edilmektedir (243).

### 1.3. Flor'un Etkileri

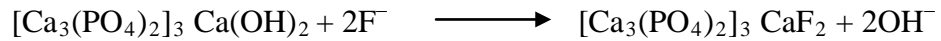
Flor organizmaya sindirim ve solunum sistemi ile alınmaktadır. Besinler ile alındıktan sonra asidik ortamda iyonik hale dönüşerek hem mide hem de bağırsak mukozasından absorbe edilmektedir. Florun absorpsiyonu asidik ortamda artmasına karşın, alkali ortamda düşmektedir (38). Dolaşım sistemine geçen florun yaklaşık % 90'ı proteine bağlı olarak bulunurken, % 10'luk kısmı ise biyolojik bakımdan aktif iyonize flor şeklindedir (81). Flor'un plazmadan ayrılarak mineralize dokularda karbonat veya hidroksil gibi anyonlar ile yer değiştirmesi kemik ve diş dokusunda flor birikimlerine sebep olmaktadır. Kemik ve dişlerde flor'un birikmesi, özellikle hızlı büyüme döneminde meydana gelmektedir. Olgun kemik dokusu gelişmekte olan kemik dokusuna göre daha az oranda flor içermektedir. Ayrıca süngerimsi kemik doku sıkı kemik dokusuna göre daha fazla flor içermektedir (38).

Normal koşullarda toplam flor atılımı % 90 oranında idrar yoluyla gerçekleşmektedir. Flor'un böbrek klirensi, glomerular filtrasyon oranıyla doğru orantılı olup, filtre edilen flor'un yaklaşık % 60'ı yeniden absorbe edilmektedir. Klirens oranı yetişkinlere göre gençlerde yüksektir. Kemik gelişiminin yavaşladığı dönemde flor'un idrarla atılımı artmaktadır. Besinler ile alınan flor'un vücutta dağılımı Şekil 1.3.1'de gösterilmiştir (73, 38).



Şekil 1.3.1. Besinler ile alınan flor'un vücutta dağılımı (38)

Flor, sağlıklı insan ve hayvanların bütün dokularında bulunmakta olup, vücut sıvıları ve yumuşak dokularda düşük düzeydedir (124). Flor bileşikleri oral yolla alındığında, hızla gastrointestinal kanaldan emilip, pasif difüzyonla kana geçmektedir. Organizmada flor'un yaklaşık % 95'i kan yoluyla vücuda dağıldıktan sonra diş ve kemik dokusunda florapatitleri oluşturmaktadır (38).



Diş ve iskelet sistemindeki bu reaksiyon geriye dönüşümlüdür. Eriyebilir halde fazla miktarda alınan inorganik flor bileşikleri; mide içerisinde hidroklorik asite dönüşerek, gastrointestinal kanalda doku dejenerasyonlarına neden olmaktadır. Kan plazmasında  $\text{CaF}_2$  oluşumu sebebiyle yeterli oranda aktif halde  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmayacağı için kanın pıhtılaşma mekanizmasında aksaklıklar meydana gelmektedir (223). Ayrıca flor'un plazmadaki oranının, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi birçok enzim aktivitesinde de değişikliklere neden olabileceği bildirilmektedir (49).

İçme suyu ile alınan flor hızla hücre zarını geçerek iskelet sistemine, kalp kasına, akciğere, deriye ve alyuvarlara dağılmaktadır. Flor'un, organizmada  $\text{Ca}^{+2}$  bağlayıcı ve hipokalsemik etkili bir iyon olduğu belirtilmektedir (57, 223). Aynı zamanda flor,

Ca<sup>+2</sup> iyonunun hücrelere girişini artırdığı için kalsiyum iyonofor olarak adlandırılmaktadır. NaF daha çok insektisit olarak kullanılmasının yanında uygun dozlarda diş çürüklüklerini önlemede ve insanlarda kemik erimesinin tedavisinde tercih edilmektedir (223). Diş minesinin yüzeyindeki plaklarda bulunan oral bakteriler normal metabolizmalarının bir parçası olarak laktik, asetik ve propiyonik asit gibi fermente olabilen organik asitleri üretmekte ve bu ürünler dişin yapısında bulunan hidroksiapatitin yapısını bozmaktadır. Ancak, uygun oranda su ve gıdalar ile alınan flor, dişin yapısındaki florapatit yapısının çözünübilirliğini ve dolayısıyla dişlerdeki çürümeleri azaltabilmektedir (38).

Sodyum florid, HF formuna dönüşerek gastrik hasara neden olmaktadır (101). Flor'un mide asitini artırdığı, mide mukozasında kanlanmayı azalttığı ve gastrointestinal sistemde epitel hücre ölümlerine sebep olabileceği de kaydedilmektedir (66).

Hayvanlara iki ay süre ile deiyonize suda verilen 125 ppm NaF ile oluşturulan deneysel florozis'li ratlarda yapılan bir çalışmada, hayvanların tibia'sında glikozaminoglikanlardan olan dermatan sülfat ve kondroitin-6-sülfat konsantrasyonlarının kontrol gruplarına göre daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir (194). Amira ve ark. (5) tarafından yapılan başka bir çalışmada NaF verilen farelerde besinlerin sindirim sistemindeki hareketi bakımından gastrointestinal motilitenin değişmekte olduğu ve 20 mM NaF'in intestinal geçişi hızlandırdığı kaydedilmektedir. Ayrıca flora maruz kalan farelerde glukoz toleransının bozulduğu, bunun da insülin sekresyonundaki azalmaya ve oksidatif strese bağlı olabileceği rapor edilmektedir (74, 237).

### **1.3.1. Florozis**

Dünyada en önemli çevresel sağlık problemlerinden birisi olan florozis, doğal olarak flor bakımından zengin su kaynaklarının ve flor düzeyi yüksek topraklarda yetişen bitkilerin doğrudan veya dolaylı olarak canlılar tarafından tüketilmesi sonucu oluşmaktadır (129). Florozis'te organizmanın bireysel dayanıklılığının yanı sıra

birbirini takip eden dozlar ve bu dozların uygulanış aralıklarının sıklığı da önem taşımaktadır. Flor bileşiklerinin besin maddeleri, içme suları, solunum ve deriden alınması ile şekillenen genel zehirlenme durumunun değişmemesine karşılık, lokal bulgularda bazı değişiklikler saptanabilmektedir. Flor zehirlenmesinin oluşum hızı alınan doz miktarı, canlının türü, beslenme, yaş ve genel sağlık durumuna bağlı olarak değişmektedir (2, 159, 189, 257). Toprağın yapısı, volkanik oluşumlar, fosfat kayaları, florid rezervleri, tarımda kullanılan süperfosfatlı gübreler, flor içerikli ilaçlar, alüminyum, cam, demir-çelik, tuğla ve çimento fabrikaları gibi sanayi kuruluşları florozis riskini artırmaktadır (1, 57).

Normal değerlerde alınan flor, diş dokusunda çürük oluşmasını önlemekte ve kemik dokusunun sağlam bir şekilde olgunlaşmasını hızlandırmaktadır (72). Florozis'in esas olarak diş ve iskelet sisteminde olumsuz etkiler oluşturmasına karşılık, yapılan pek çok çalışmada diğer organ ve sistemlerde de bozukluklar oluşturabileceği bildirilmektedir (49, 257). Enerji metabolizmasında önemli fonksiyonları olan fosfat ve kinaz enzimleri üzerinde flor'un yavaşlatıcı etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (185).

Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği, içme sularında olabilecek en yüksek flor miktarı 1,5 mg/L'dir (245). İçme sularında bulunan maksimum flor düzeyleri, iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir. İçme suyu flor düzeyinin sıcak iklim koşullarında en fazla 0,7 ppm, soğuk iklimlerde ise 1,2 ppm olması gerektiği belirtilmekte ve sıcak iklim bölgelerinde su tüketimi yüksek olduğundan, daha düşük düzeylerde flor içeren suların fazlaca alınmasıyla da florozis şekillenmektedir (25, 251). Kanwar ve Singh (116) tarafından deneysel florozis oluşturulmuş farelerin karaciğer ve kemik dokusunda çinko seviyelerinin azaldığı kaydedilmektedir. Ratlara içme suyu ile NaF verilerek oluşturulan florozis'in şiddetli ağrılara sebep olduğu saptanmış olup, buna bağlı olarak florozis'in nörotoksisitede önemli etkilere neden olabileceği ileri sürülmektedir (242).

Canlılar, olumsuz etki yapmayacak şekilde sürekli olarak yem ve sularıyla florlu bileşikleri bünyelerine almaktadırlar. Ancak, uzun süreli ya da bir defada aşırı miktarda flor alınması sonucu akut veya kronik florozis şekillenmektedir (124, 231).

### 1.3.1.1. Akut Florozis

Kısa sürede yüksek dozda flor alınması sonucu oluşan flor zehirlenmesi akut florozis olarak adlandırılmaktadır (2). Akut florozis'te nadiren de olsa karın ağrısı, hipersalivasyon, hipokalsemi, pupiller dilatasyon ve kas spazmları gibi çeşitli klinik tablolar ile karşılaşılabilmektedir. Akut florozis tedavisinde genellikle  $Ca^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  ve  $Mg^{+2}$  tuzları kullanılmaktadır (251).

Hızla çözünebilir flor tuzlarını içeren insektisit, rodentisit ve antihelmintik ilaçların bir defada yüksek dozda veya tekrarlayan subletal dozlarda alınması akut florozis şekillenmesine neden olmaktadır (57). Volkanik aktiviteler sonrasında açığa çıkan toz ve gazlardan dolayı patlamadan hemen sonra 20 km'lik sahada öldürücü akut florozis meydana gelebilmektedir. Volkanik patlamalar sonrası yağmurların yağması ise intoksikasyon riskini artırmaktadır (234).

### 1.3.1.2. Kronik Florozis

Florlu bileşiklerin yüksek miktarda uzun süre içme suları veya besin maddeleri ile alınması sonucu oluşan flor zehirlenmesi kronik florozis olarak adlandırılmaktadır (2, 124, 126). Kronik florozis ilk olarak Hindistan'ın Madras eyaletinde 1937 yılında endemik florozis adı ile tanımlanmıştır. İçme suyunda 4 ppm'den daha yüksek konsantrasyonda flor bulunan bölgelerde endemik florozis'in olduğu kaydedilmektedir (242). Beslenmenin iyi olmadığı endemik florozis'li bölgelerde yaşayan bireylerde gastrointestinal semptomlara sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir (59).

Kemik ve diş lezyonları kronik florozis'in teşhisinde önemli bulgulardır. Kronik florozis'te dişler kolaylıkla aşınarak kırılabilen ve doğal yerlerinden çıkıp dökülebilmektedir. Kemikler kalınlaşarak kırılmakta ve kemik iliği hücrelerinin dejenerasyonlarına bağlı olarak aplastik anemi şekillenmektedir (65, 124). Kronik florozis'in kemiksel semptomları sırası ile osteoskleroz, osteoporez, osteomalazi ve hiperosteozis'dir. Kemiklerin periostal yüzeyinde meydana gelen farklılıklardan

dolayı, omuriliğin mekanik baskıya uğraması sonucu nörolojik semptomlarla birlikte omurga bozulmakta ve hareketler yavaşlamaktadır (4, 81, 187). Kronik florozis'te kilo kaybı ve iştahsızlık genel olarak en fazla karşılaşılan belirtilerdir (100). Doku ve organlarda oksidatif hasarın şekillenmesi sonucu oksidan/antioksidan dengesi de değişmektedir (49, 208, 212).

Florozis'te  $\text{CaF}_2$  oluşumu sebebiyle kan  $\text{Ca}^{+2}$  düzeylerinin azalmaktadır (223).  $\text{Ca}^{+2}$  yetmezliği; raşitizm, büyüme ve kemik gelişiminin yavaşlaması, kemiklerin kolay kırılabilir hal alması, kanın pıhtılaşma mekanizmasında aksaklıklar, süt veriminin düşmesi gibi belirtilerle ortaya çıkmaktadır (230). Kronik florozis'in veya aşırı seviyede flor alımının ve diyetle  $\text{Ca}^{+2}$  eksikliğinin ise diş matriksinden  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının kaybına ve kavite oluşumunun hızlanmasına neden olduğu bildirilmektedir (226). Lokal florid uygulamaları sonucu diş yüzeyinde  $\text{CaF}_2$  kristallerinin oluştuğu, pH düşüşlerinin ise bu kristallerin erimesiyle ortama salınan floridlerden dolayı çürük atağını kontrol ettiği kaydedilmektedir. Bu şekilde,  $\text{CaF}_2$  kristallerinin, pH kontrolünü sağlayan bir florid salınım sistemi olduğu belirtilmektedir (11).

Florlu bileşiklerin endüstride kullanımı ile oluşan kronik flor zehirlenmesine endüstriyel florozis adı verilmektedir. Alüminyum, seramik, cam, petrokimya sanayileri, süper fosfat fabrikaları ve termik santraller endüstriyel florozis'in oluşumuna katkı sağlayan önemli faktörlerdir (80).

Kronik florozis'le ilgili olarak klinik muayenelerde kemik ve diş yapısındaki bozuklukların saptanması, kullanılan yöntemin sonuçları bakımından şüpheye dayalı bir teşhis olanağı sağlamaktadır. Florozis, organizmada sistemik bozukluklar oluştururken idrar ve kandaki değişiklikler daha erken bir süreçte ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, florozis'in erken teşhisinde flor,  $\text{Ca}^{+2}$  ve sialik asit (SA) gibi bazı biyokimyasal parametrelerin önemli olduğu ileri sürülmektedir (44, 110, 219, 220, 234). İdrar ve kemiklerdeki flor düzeyi, florozis'in teşhisi için en önemli göstergedir. İnsan ve hayvanlarda alınan flor ile idrarla atılan flor düzeyleri arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. İdrar ile atılan flor düzeyinin 5 ppm'den fazla olduğu durumlarda florozis teşhisi konulabilmektedir. İçme sularında olabilecek en yüksek flor düzeyinin 1,5 mg/L olduğu ve bu düzeyin 4 ppm'den fazla



olması durumunda organizmada kronik florozis oluşabileceği bildirilmektedir (56, 76, 244). Ratlarda yapılan bir çalışmada içme sularına 8 hafta süre ile 25 mg/L flor ilave edilen ratların idrar flor düzeyinin  $8.64 \pm 0.59$  mg/L olduğu belirlenirken, bu düzeyin içme sularına flor ilave edilmeyen ratlarda  $1.33 \pm 0.042$  mg/L olduğu kaydedilmektedir (103). Yapılan başka bir çalışmada ise ortalama idrar flor düzeyi, sağlıklı koyunlarda  $1.65 \pm 0.34$  ppm olarak bulunurken, florozis'li gruba dahil olan koyunlarda  $48.70 \pm 10.60$  ppm olarak tespit edilmiştir (76). Koyunlarla ilgili diğer bir çalışmada ise içme sularına 38 hafta süre ile 4 ppm flor ilave edilen koyunların idrar flor düzeyinin ortalama 16 ppm olduğu belirlenmiştir (56).

Florozis'in teşhisinde biyolojik örneklerde flor düzeylerini belirlemek için tercih edilen en yaygın yöntem iyon seçici elektrot kullanılarak yapılan potansiyometrik ölçüm yöntemidir. Ayrıca flor düzeylerini belirlemek için spektrofotometre, gaz kromatografisi, iyon kromatografisi, kapiller elektroforezis, atomik absorpsiyon ve foton aktivasyonunu içeren yöntemler de bulunmaktadır (243).

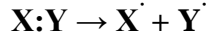
#### **1.4. Serbest Radikaller**

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Bu radikaller, radikal özellikte olmayan bir atom veya molekülün bir elektron kaybetmesi ya da bir elektron kazanması sonucu oluşabilmektedir. Serbest radikaller, reaktif özellik taşıdıklarından dolayı diğer moleküllere elektron verebilmekte ya da onlardan elektron alabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici işlevlere sahiptirler (82, 131).

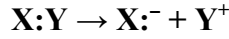
Canlı hücrelerde oksidatif stresin artmasına bağlı olarak hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu hücre zarının permeabilitesi ve elektriksel yük dengesinde değişimler meydana gelmektedir. Serbest radikaller, oksidasyon süreci ilerledikçe başta membran fosfolipidleri olmak üzere, hücresel komponentlerin tümüne zarar verebilmektedir (3, 153).

Organizmada oluşan serbest radikaller, reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri olarak adlandırılmaktadır. Bunlar endojen ve ekzojen kaynaklardan oluşmaktadır (55). Endojen serbest radikaller kaynakları; mitokondriyal elektron transport zinciri (ETS), kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonları, fagositik ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, plastitlerde, peroksizomlarda, otooksidasyon reaksiyonları, ksantin oksidaz, peroksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerin etkisiyle oluşmaktadır (29,33, 55). Ekzojen serbest radikal kaynakları ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonize radyasyon, ultraviyole (UV) ışık, sigara dumanı, ksenobiyotikler, kuraklık, hipoksi, düşük ve yüksek ısı değerleri ile yüksek ışık stresidir (55, 87, 147). Serbest radikaller 3 şekilde oluşabilmektedir (95).

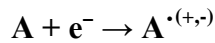
a. Kovalent bağların homolitik kırılması,



b. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi,



c. Normal bir moleküle tek bir elektron transferi sonucu oluşabilmektedir.



#### 1.4.1. Organizmalarda Bulunan Başlıca Serbest Radikaller

Serbest radikal reaksiyonları bakımından önemli olan reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) bazıları radikal, bazıları ise radikal olmayan özellik taşımaktadırlar. Bunlardan süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), alkoksil ( $\text{LO}^{\cdot}$ ), hidroperoksil ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) ve nitrik oksit ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) türleri radikal özellik gösterirken hidrojen

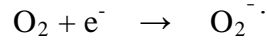
peroksit ( $H_2O_2$ ), lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipokloröz asit (HOCl) radikal olmayan özellik göstermektedir (54).

#### 1.4.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikaller olup, bunlar reaktif oksijen türleri olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikallerden oluşan reaktif oksijen türleri, yapısında oksijen atomu ve dış yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. En önemli ROS'lar şunlardır (55, 140);

##### a. Süperoksit radikali

Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan süperoksit radikali oluşmaktadır.



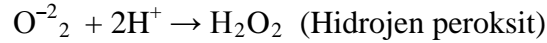
Eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler süperoksit radikali oluşumunu artırmaktadır (204). Süperoksit radikali SOD enzimi tarafından hızlı bir şekilde  $H_2O_2$ 'e dönüştürüldüğü için nadiren oksidatif hasara neden olmaktadır. pH'nın düşük olduğu durumlarda süperoksit radikalinden  $H_2O_2$  ve peroksil ( $HO_2^{\cdot -}$ ) radikalleri üretilmektedir. Süperoksit radikalinin doku ve organlar için zararlı olması,  $H_2O_2$  kaynağı ve geçiş metallerinin (bakır, demir v.b. metal iyonlar) indirgeyicisi olarak reaksiyona girmesine bağlıdır. Ayrıca, süperoksit radikali, mitokondrilerdeki ETS'de, karaciğerde sitokrom P<sub>450</sub>'de, adrenal medullada hormon sentezinde, damar endotelinde nitrik oksitlerin elemine edilmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında oluşmaktadır (55, 140).

##### b. Hidrojen peroksit

Oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksit radikalinin bir elektron alması (indirgenmesi) ile peroksit molekülü oluşmaktadır.



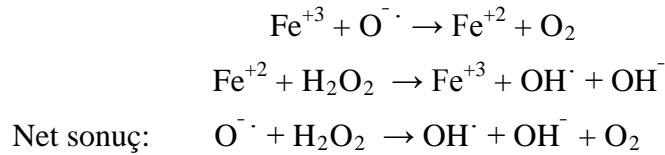
Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i meydana getirmektedir. Dismutasyon sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radikal özellik göstermeyip, ROS'un oluşumunda kullanıldığından ROS grubuna dahil edilmektedir (55, 56, 140).



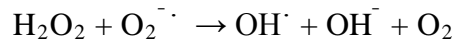
### c. Hidroksil radikali ile Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları

Serbest radikallerin çoğu zararlı etkileri hidroksil radikali ile oluşmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>·-</sup> bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturmaktadırlar (55, 140).

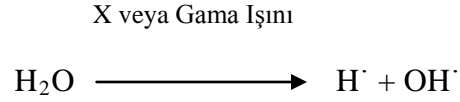
- **Fenton reaksiyonu:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>+2</sup> ve diğer geçiş metallerinin (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH<sup>·</sup> radikalini oluşturmaktadır.



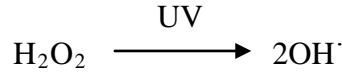
- **Haber-Weiss reaksiyonu:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> katalizi ile) O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ile indirgenmesi sonucu oluşmaktadır.



- Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyonuna maruz kalmasıyla da OH<sup>·</sup> oluşmaktadır.

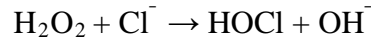


- $\text{H}_2\text{O}_2$  'in UV ışığına maruz kalması ile de  $\text{OH}^\cdot$  oluşmaktadır.



#### d. Hipokloröz asit

Bağışıklık sistemine ait fagositik özellikli nötrofillerin içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla  $\text{O}_2^{\cdot -}$ 'in dismutasyonu ile oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i, klorür ( $\text{Cl}^-$ ) iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan  $\text{HOCl}$ 'ye dönüştürmektedir (55).



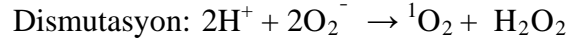
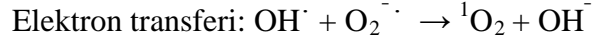
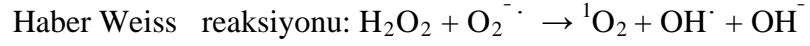
#### e. Singlet oksijen

Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), serbest radikal reaksiyonlarını başlatan ve ortaklanmamış elektron bulundurmeyen bir reaktif oksijen türüdür. Singlet oksijenin delta ( $\Delta$ ) ve sigma ( $\Sigma$ ) olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Şekil 1.4.1.1.1). Delta singlet oksijen, yarı ömrü sigma singlet oksijene göre daha uzun olduğu için singlet oksijenin dahil olduğu reaksiyonlara daha fazla katılmaktadır (3, 128).



Şekil 1.4.1.1.1. Singlet oksijen formları

Singlet oksijen, oksijenin elektronlarından birinin dışarıdan enerji almasıyla kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesinde oluşabileceği gibi; süperoksit radikalının  $H_2O_2$  (Haber Weiss reaksiyonu), hidroksil radikalının süperoksit iyonu (elektron transferi) veya hidrojen ve süperoksit iyonlarının (dismutasyon) reaksiyonları sonucunda da oluşabileceği kabul edilmektedir (128).



#### f. Diğer Reaktif Oksijen Türleri

Hidroksil radikali; yağ asitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin ( $R^{\cdot}$ , alkil radikalleri) oluşmasına neden olmaktadır. Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) daha kuvvetli bir oksidan olup, süperoksit radikalının düşük pH'da protonlanması sonucu oluşmaktadır. Alkoksil radikali ( $RO^{\cdot}$ ),  $Fe^{+2}$  gibi geçiş metallerinin lipid hidroperoksidi indirgemesi ile oluşmaktadır. Buna bağlı olarak okside LDL'nin meydana gelmesi nedeni ile devam eden süreçte hücre ölümü gerçekleşmektedir (55).

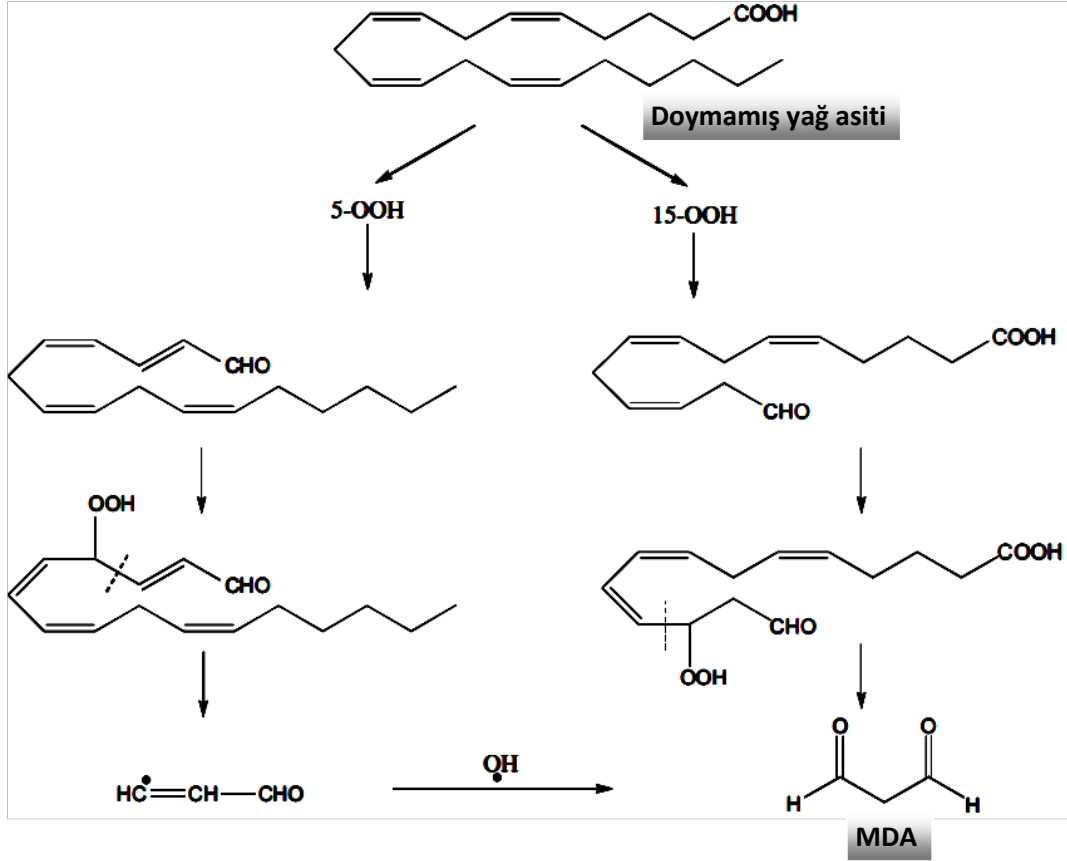
##### 1.4.1.1.1. Malondialdehit

Reaktif oksijen ürünleri birçok kronik hastalığın etiyopatogenezi ile ilişkili olup en çok lipidler üzerinde etki göstermektedir. Lipidlerin oksidasyonu sonucu oksidatif hasarın şiddetini artıran aldehitler oluşmaktadır (232). 1960'lı yıllardan günümüze kadar doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan MDA; uzun ömürlü

ve yüksek reaktiviteye sahip olması nedeniyle lipid peroksidasyonunun şiddetinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (201).

Canlılarda MDA'nın oluşumu hakkında iki önemli mekanizmanın bulunduğu bildirilmektedir (152, 190, 201). Bu mekanizmalardan ilki; iki veya daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinden üretilen prostaglandin benzeri endoperoksitlerin oluşumu ve oluşan bu endoperoksitlerden sitokrom P<sub>450</sub> aracılığıyla MDA sentezlemesini içermektedir. Diğer önemli bir hipotez ise doymamış yağ asitlerinin ard arda devam eden β-kırılımı ile hidroperoksitlerin oluşum mekanizmasıdır. 3-hidroperoksialdehitin β-kırılım şekli ile akrolein ve hidrosil radikalleri arasında gerçekleşen bir reaksiyon ile MDA sentez edilmektedir (Şekil 1.4.1.1.1) (152, 190, 201).

MDA gibi reaktif aldehitler oluştukları bölgeden uzağa diffüze olabildikleri için uzak bölgelerde de doku hasarına sebep olabilirler. MDA en çok linoleik asit, araşidonik asit, dokosaheksaenoik asit gibi ikiden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşmaktadır. Bazen eikozonoidlerin enzimatik metabolizması sırasında da ortaya çıkabilmektedir. Değişik izoformlarda bulunması pH değişikliklerine bağlıdır. Fizyolojik pH'da serbest enolat formunda bulunan MDA, amino gruplarına karşı düşük reaktivite gösterirken düşük pH'da reaktivitesinin artmasından dolayı proteinleri de olumsuz etkilemektedir. MDA, özellikle lizin kalıntıları olmak üzere birçok kalıntıda modifikasyonlara, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşmasına neden olmaktadır. MDA'nın hücre membranlarının geçirgenliğini artırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu bildirilmektedir (95, 201).

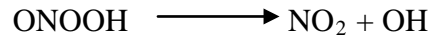
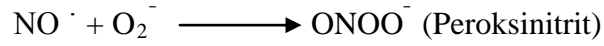
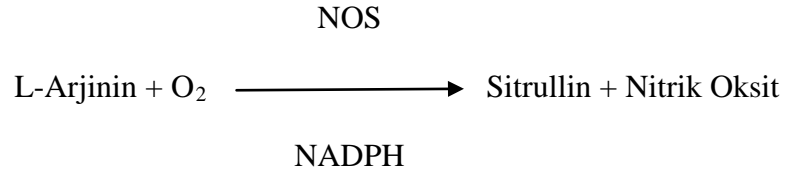


Şekil 1.4.1.1.1. İki önemli MDA oluşum mekanizması (201)

### 1.4.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri

Biyolojik sistemlerde oluşan en önemli reaktif nitrojen türü olan nitrik oksit (NO), bir azot atomu ile bir oksijen atomunun eşleşmemiş elektron veren reaksiyonundan meydana gelmektedir. Damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenmektedir. Düz kaslarda siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyararak damar gevşemesini sağlamaktadır (52, 55).





#### 1.4.1.3. Florozis ve Serbest Radikaller

Flor'un yüksek dozda alınması, fagositozda fonksiyonu olan hücrelerin immün yanıtı esnasında oluşan solunum patlaması ile birlikte hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) ve hidroksil radikali ( $\text{OH} \cdot$ ) üretimini artırmaktadır (204). Solunum patlaması adı verilen süreçte nötrofillerin membranlarında bulunan NADPH'ya bağlı oksidaz sistemleri aracılığı ile hızla yükselen  $\text{O}_2$  tüketimine karşılık  $\text{O}_2^-$  üretimi artmaktadır. NADPH'ya bağlı oksidazlar, normalde inaktif halde iken bakteriler, mitojenler ya da sitokinler tarafından aktive edildiklerinde  $\text{O}_2$ 'nin hidrojen peroksit ve  $\text{O}_2^-$  anyonuna dönüşmesine yol açmaktadırlar. Nötrofil kemotaksisinde önemli olan  $\text{O}_2^-$  anyonları, canlı organizmaya doğrudan zarar vermemesine rağmen  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaynağı olması nedeniyle zararlıdır (114, 204). Florozis'te oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve diğer serbest radikaller farklı bir oksidatif sürece yol açarak membran lipidlerinde lipid peroksidasyonu, süperoksit dismutazın (SOD) inaktivasyonu ve DNA hasarına neden olmaktadır (3, 114, 208, 237). Kronik florozis'te alyuvarlarda lipid peroksidasyonu düzeylerinin artmakta olduğu kaydedilmektedir (141). Günlük 25 ppm dozunda 16 hafta boyunca içme suyu ile flor uygulanan ratlarda yapılan bir çalışmada antioksidan savunma sistemi elemanlarından olan glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSHPx), katalaz (CAT) ve SOD aktivitelerinin azaldığı, lipid peroksidasyonunun ise arttığı bildirilmektedir (208). Endemik florozis'li bireylerde, sağlıklı bireylere göre lipid

peroksidasyonunun bir göstergesi olan plazma MDA düzeylerinin ise önemli oranda daha yüksek olduğu rapor edilmektedir (212).

### **1.5. Antioksidanlar**

Organizmada bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek moleküllerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere ya da serbest radikal oksidasyonuna karşı mücadele eden maddelere antioksidanlar denilmektedir (54, 55). Antioksidanlar, oksidan ürünlere karşı etkilerini dört farklı şekilde göstermektedir (39, 54, 56, 140) .

#### **a. Toplayıcı etki (scavenger etki)**

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olmayan yeni bir moleküle dönüştürme işlemine toplayıcı etki olarak ifade edilmektedir. Enzim yapısında olan antioksidanlar bu tarz bir etki oluşturmaktadırlar.

#### **b. Bastırıcı etki (quencher etki)**

Serbest oksijen radikallerinin aktivitelerini bir hidrojen atomu aktararak azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye bastırıcı etki denilmektedir. Flavonoidler ve  $\beta$ -karoten gibi vitaminler bu tarz bir etki göstermektedirler.

#### **c. Onarıcı etki (repair etki)**

Genellikle DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki oluşmaktadır.

**d. Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)**

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon basamaklarından birini engelleyen etkiye zincir kırıcı etki denilmektedir. Bu etki serbest radikalleri stabilize halde tutmak için meydana gelmektedir. Hemoglobin, mineraller, C ve E vitaminleri bu tarz bir etki oluşturmaktadırlar.

Glutasyon doğrudan ROS düzeyini azaltabilmekte iken, E vitamini zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu esnasında serbest radikal üreten reaksiyonları süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler ise serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirken, geçiş metalleri de şelat oluşturarak etkilerini göstermektedir. Laktoferritin, transferrin ve ferritin molekülleri demir ile; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi önlemektedir (19, 55).

**1.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar; yapılarına göre (doğal veya sentetik, enzim veya enzim olmayan, Tablo 1.7.1), kaynaklarına göre (endojen veya ekzojen), çözünürlüklerine göre (suda veya lipidlerde çözünenler) ve organizmada bulunuşlarına göre (intraselüler veya ekstraselüler) farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır (50, 140, 157, 197, 249).

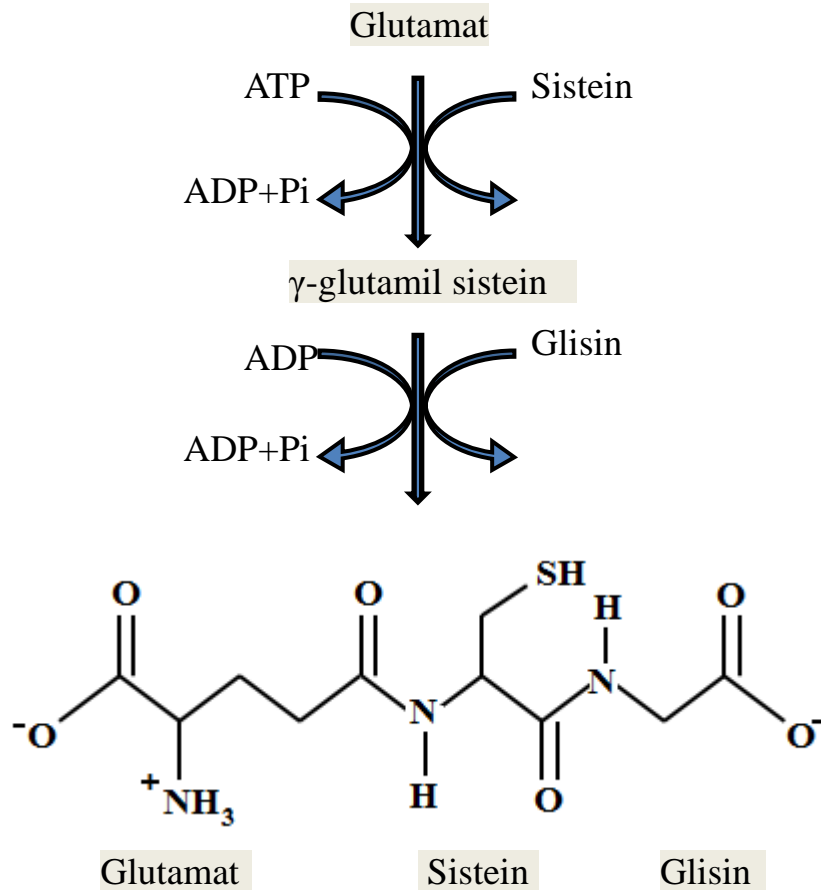
**Tablo 1.5.1.** Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (9, 39).

<b>Enzimatik Antioksidanlar</b>	<b>Enzimatik Olmayan Antioksidanlar</b>	
	<b>Doğal</b>	<b>Sentetik</b>
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitaminler (C, E ve A vitaminleri)	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Katalaz (CAT)	Glutasyon (GSH)	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Glutasyon peroksidaz (GSHPx)	Polifenolik bileşikler (Ellagik asit, gallik asit, hesperetin, kuersetin, genistein vb.)	Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)
Glutasyon redüktaz (GR)	Karotenoidler (zeaksantin, $\beta$ -karoten, likopen vb.)	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Proteinler (Laktoferrin, transferin, albümin, seruloplazmin, ferritin vb.)	Gallik asit türevleri (Propil gallat (PG), oktil gallat, dodesil gallat vb.)
Hidroperoksidaz	Ürik asit	
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz	Mineraller (Çinko, selenyum vb.)	
Sitokrom oksidaz		

Sağlıklı canlılarda serbest radikal üretimi reaksiyonları ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin bozulması durumunda “oksidatif stres” meydana gelmektedir. Oksidan ve antioksidan parametreler arasındaki dengenin veya oksidatif stresin şiddetinin belirlenmesi için MDA ve GSH düzeyleri arasındaki ilişkiye dikkat çekilmektedir (64, 70). Oksidatif stresin kalıcı olması durumunda organizmanın protein, DNA ve membran lipidleri gibi önemli hücresel elemanlarının tümü etkilenerek ilerleyen süreçte hücre ölümü meydana gelmektedir (19, 157).

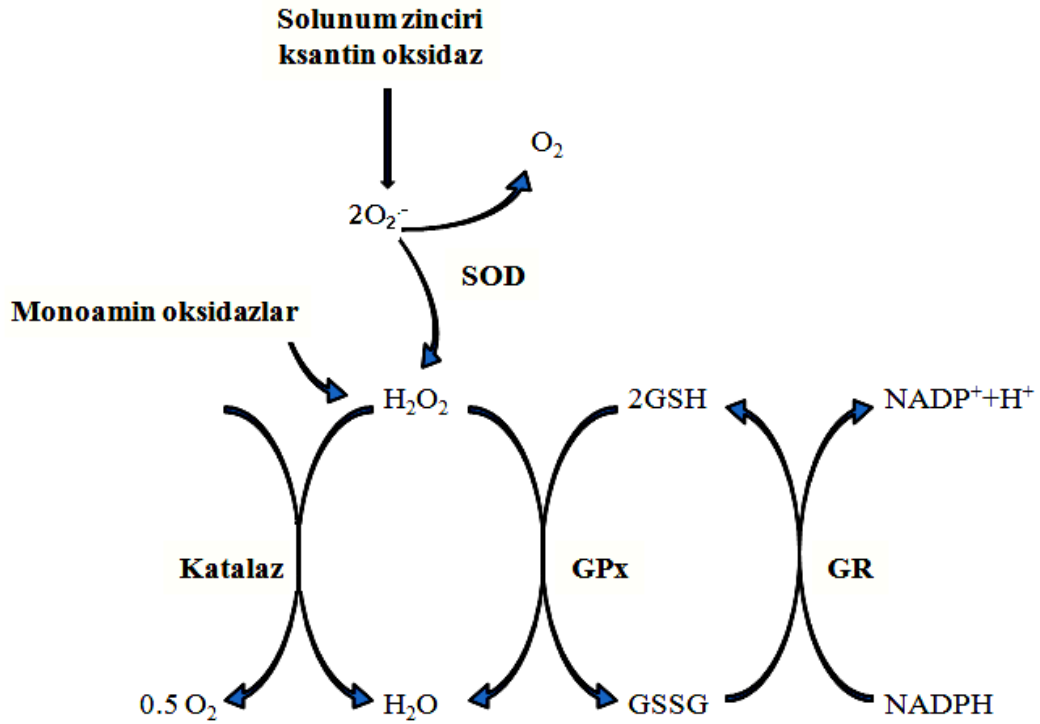
### 1.5.1.1. Glutatyon

Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen glutatyon ( $\gamma$ -glutamil sisteinil glisin), oksidan atom veya moleküller ile redoks reaksiyonları arasındaki dengenin korunmasında fonksiyon görenek hücreyi oksidatif strese karşı koruyan ve tiyol grubu taşıyan bir tripeptiddir (Şekil 1.8.1) (161, 186, 247). GSH, memeli hücrelerinde iki aşamada sentezlenmektedir. İlk aşamada  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim, GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden  $\gamma$ -glutamil-sisteinin oluşumunu katalizlemektedir. İkinci aşamada ise, glutatyon sentetazın katalitik aktivitesi ile glisin ve  $\gamma$ -glutamil-sisteinden glutatyon ( $\gamma$ -glutamilsisteinil glisin) sentezi gerçekleşmektedir. Bu sentez negatif feedback inhibisyon yolu ile kontrol edilmektedir (62). Sentez aşamaları sırasında bir molekül GSH için iki molekül de ATP kullanılmaktadır (84).



Şekil 1.5.1.1.1. Glutatyon ( $\gamma$ -glutamil sisteinil glisin)

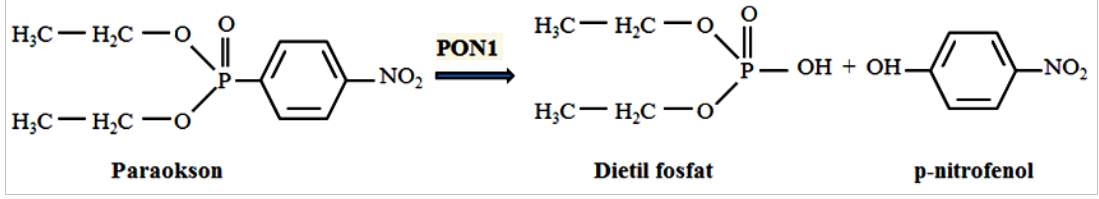
GSH, canlılarda -SH grubu taşıyan proteinler ve hemoglobin gibi moleküllerin indirgenmiş halde tutulması, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin hücre membranından taşınması gibi durumlarda oksidasyona karşı kullanılmaktadır. Taşımakta olduğu tiyol grubu aracılığı ile hücre içerisinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlamaktadır (62). GSH, glutatyon peroksidaz (GPx) ve S-transferaz (GST) enzimleri için kofaktör fonksiyonu görmekte olup, hidroksil ve singlet oksijen radikallerini doğrudan detoksifiye etmektedir (161, 247). GSH serbest radikallerin detoksifiye edilmesi sırasında iki tip reaksiyona katılmaktadır. Bu reaksiyonlardan ilki süperoksit radikal anyonu, nitrik oksit ve hidroksil radikali gibi radikaller ile nonenzimatik olarak katıldığı reaksiyonlardır. İkincisi ise GPx etkisi ile peroksidlerin indirgenmesi esnasında elektron donörü olarak kullanıldığı ve glutatyon disülfid (GSSG) molekülünün oluştuğu reaksiyondur. Bu reaksiyon sonrasında GSSG, GSH redüktaz (GR) enzimi katalizi ile yeniden indirgenmiş GSH meydana getirmektedir. GSH'ın süperoksit ve hidrojen peroksidin detoksifikasyonu sırasındaki fonksiyonu Şekil 1.8.2'de gösterilmiştir (69).



**Şekil 1.5.1.1.2.** GSH'nin süperoksit ve hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sırasındaki fonksiyonu: Solunum zinciri reaksiyonları ve ksantin oksidazlar tarafından üretilen süperoksit anyonları süperoksit dismutazın (SOD) katalitik aktivitesi ile  $H_2O_2$ 'e dönüştürülmektedir. Monoamin oksidazların katalitik aktivitesi ile de  $H_2O_2$  üretilmektedir. Oluşturulan bu peroksitler daha sonra katalaz ve GPx enzimlerinin katalitik aktiviteleri ile yıkılmaktadırlar (69).

### 1.5.1.2. Paraoksonaz (Arildialkil Fosfataz; E.C.3.1.8.1) Enzimi

Paraoksonaz (PON), 1953 yılında Aldridge tarafından keşfedilerek enzim sınıflamasına dahil edilmiştir. Hem arilesteraz, hem de paraoksonaz aktivitesine sahip olan bu enzim, karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit ve parationun aktif metaboliti olan paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum ester hidrolazdır (112, 150, 167). Paraokson, PON1'in kataliz etkisi ile dietil fosfat ve p-nitrofenol bileşiklerine ayrıştırılır (Şekil 1.12.1). Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat gibi organik fosforlu insektisitlerle aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının, çeşitli karbamatların ve birçok aromatik karboksilik asit esterinin hidrolizini de katalize etmektedir. PON1, hücre membranının dış yüzeyinde bulunmakta olup lipoproteinler vasıtasıyla HDL'ye bağlanmaktadır (167, 183).



Şekil 1.5.1.2.1. PON1'in etkisi ile paraoksonun hidrolizi

Ağırlığının % 15'ni oluşturan karbonhidrat üniteleri, 4 farklı konumda proteine bağlı olarak bulunmaktadır. PON1'in amino asit bileşimi incelendiğinde, lösin içeriğinin yüksek olmasına karşılık, kringle yapısına sahip olacak kadar sistein içermemektedir. Bununla beraber, 42, 284 ve 353. konumlarda yer alan sisteinin, PON1'in yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (203). Disülfid bağı, polipeptid zincirinin halkasal yapıda olmasını sağlamaktadır (155, 193). Paraoksonaz (arildialkil fosfataz, E.C.3.1.8.1) ve arilesteraz (ARE, E.C.3.1.1.2) her ne kadar iki ayrı enzim olarak algılanmakta ise de, yapılan çalışmalarla sonucu insan serumunda tek gen ürünü enzimin hem PON hem de arilesteraz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (35, 155). PON1'in bir pestisit olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve ayrıca lipid peroksidleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak şeklinde başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır (156). PON1'in lipid peroksidlerin yanı sıra hidrojen peroksid üzerine de etkili olup peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca lipopolisakkarit inaktivasyonu yoluyla bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır (79, 167). PON1'in LDL'in oksidasyonunu önleyerek oksi-LDL oluşumunu azaltması ve HDL'deki apo A-1 ile olan ilişkisine bağlı olarak koroner arter hastalıklarında önemli bir koruyucu etkisi olduğu belirtilmektedir (20). Alkolik karaciğer hastalığında prognostik bir belirteç olarak önerilmektedir (191).



### 1.5.1.2.1. PON1'in Yapısı ve Özellikleri

İnsan serum paraoksonazı (PON1), 43 kDa molekül ağırlığında 354 aminoasitlik bir protein olup, fiziksel olarak HDL ile bağlantılıdır (167). İnsanlarda ve farelerde aynı kromozom üzerinde, birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, PON2, PON3) bulunmaktadır. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin proteinleri, aminoasit dizilimi açısından birbiriyle yaklaşık olarak % 53 oranında homolog özellik göstermektedir. PON1'in 106. kodonunda lizin bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. Her üç enzimin dokulardaki dağılımları birbirinden farklılık göstermektedir. PON1 ve PON3 karaciğer ve plazmada bulunurken, PON2 karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularının endotel tabakasında ve aortik düz kas hücrelerinde yer almaktadır (196). PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL-lipidlerine bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan başlıca HDL alt birimi apolipoprotein A-1 olarak adlandırılmakta olup, HDL'yi etkileyen metabolik değişiklikler PON aktivitesini de etkilemektedir (155).

### 1.5.1.2.2. PON1 ve Oksidan Durum

PON1'in yapısında bulunan üç sistein amino asitinden 284. pozisyondaki sistein serbest halde iken, 42.ve 353. (Cys 42-353) sistein amino asitleri arasında disülfid bağı bulunmaktadır. Serbest haldeki sistein amino asidi, substratın tanınması ve bağlanması için gerekli olup, tiyol grubu taşıyan 284. pozisyondaki sistein amino asitinin LDL'yi oksidasyondan korumada önemli bir fonksiyona sahip olduğu bildirilmektedir (12, 203). Enzimin aktivitesi sülfidril bileşikleri ile inhibe olurken, sistein ile bu inhibisyon ortadan kaldırılabilen ve PON1'in antioksidan kapasitesinin serbest tiyol gruplarıyla orantılı olduğu ileri sürülmektedir (107).

Flavonoid, kuersetin ve glabridin gibi antioksidan özelliklere sahip maddelerin LDL oksidasyonunu önlediği, okside LDL komponentlerinin (arilesteraz araşidonat ve okside 1-palmitoil-2-araşidonoil-sn-fosfatidilkolin (ox-PAPC) vb.) ise PON1 aktivitesini azalttığı ileri sürülmektedir (192). HDL'nin okside olması sonucu PON1'in paraoksonaz aktivitesinde hızlı bir şekilde azalma olmaktadır (107, 192). PON1'in paraoksonaz aktivitesinde karşılaşılan yüksek orandaki azalmanın HDL'nin

LDL'yi okside olmaktan koruma özelliğinin azalmasıyla pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (192).

Senti ve ark. (206) metabolik sendromlu hastaların serumlarında yaptıkları bir çalışmada; sağlıklı bireylerin serum PON aktivitelerinin hastalara göre anlamlı derece düşük, MDA düzeylerinin ise anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda azalan PON aktivitesinin artan oksidatif stresten kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine yapılan başka bir çalışmada; fiziksel travmalardan sonra serum PON aktivitesinin azaldığı, MDA düzeylerinin ise artış gösterdiği bildirilmektedir (250). Sigara içimi ile PON aktivitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise aşırı sigara içen bireylerde serum PON aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir (93).

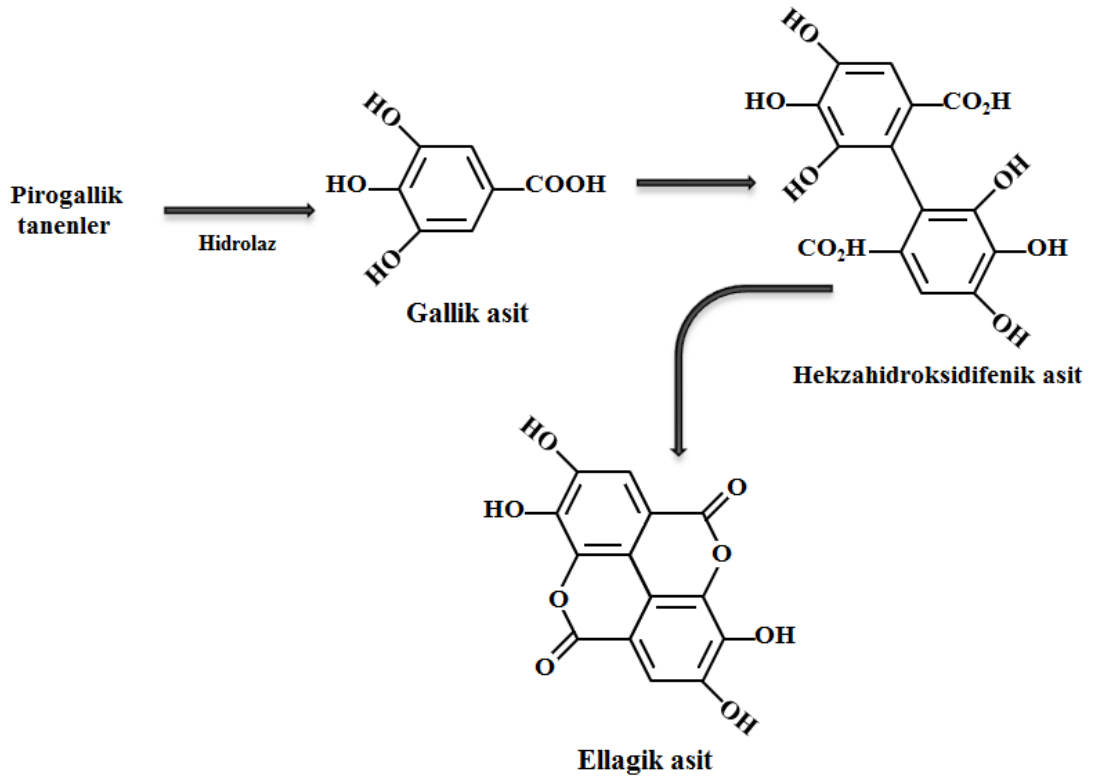
### 1.5.1.3. Ellagik Asit (EA)

Ellagik asit (2,3,7,8-tetrahidroksi[1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopiran-5,10-dion) daha çok miktarda çilek, ahududu, ceviz ve üzüm gibi meyvelerde bulunan bitki kaynaklı bir polifenolik asit molekülüdür. Tanenlerin (pirogallik tanenler) hidrolizi ve hidroksibenzoik asitlerin dimerik kondenzasyonu sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.9.1) (94, 195). EA'nın yapısında bulunan hidroksil gruplarının, antioksidan aktiviteyi artırdığı için hücreleri oksidatif hasara karşı korumada etkili olabileceği belirtilmektedir (184). EA'nın canlı organizma için karakteristik etkileri, saf halde iken suda az çözünmesi, fizyolojik pH'da daha az çözünen bileşiklere dönüşmesi ve aynı zamanda intestinal epitele bağlanma kapasitesi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, EA'nın intestinal mikroflora tarafından biyotransformasyonu sonucu üriner metabolitleri 'Ürolitinler' ortaya çıkmakta olup, EA ve ürolitinler, absorpsiyonu takiben konjugasyona uğramaktadır. Bu bileşiklerin idrar ve plazmada metil, glukuronil ve sülfat grupları ile konjuge formlarının bulunduğu tespit edilmiştir (205).

Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olan ve bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılar fenolik bileşikler olarak adlandırılmaktadır (94, 199). Bu bileşiklerin, bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada önemli

fonksiyonları bulunmaktadır. Ayrıca birçok bitki türü (nar, böğürtlen, yaban mersini, çilek vb.) içerdikleri fenolik bileşikler ve bu bileşiklere bağlı olarak sahip oldukları antioksidatif özelliklerden dolayı fonksiyonel gıdalar olarak değerlendirilmektedir. Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Bu gruplardan fenolik asitler grubuna dahil ve hidroksibenzoik asit türevi olan EA'nın, antioksidan (195), antiinflamatuvar (102), antifibrosis (227) ve antikanserojenik (177) etkiler gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ifade edilmektedir. EA'nın serbest radikal süpürücü aktivite için ideal bir kimyasal yapıya sahip olabileceği, in vitro olarak E ve C vitamininden daha etkin bir antioksidan özellik gösterebileceği bildirilmektedir (184, 199).

Ellagik asitin kanserojenik bir madde olan benzo[a]piren'e karşı antimutajenik ve antikanserojenik etkiye sahip olduğu ve potansiyel bir çevresel kanserojen olan nitrozodietilamine maruz kalmış farelerdeki akciğer neoplazisine karşı tümör inhibitörü olarak fonksiyon yaptığı da belirtilmiştir (130). Fenolik bileşikler ve de EA, özellikle 3',4'-O-dihidroksi gruplarının LDL gibi lipoprotein oksidasyonuna karşı en etkili antoksidanlardandır (168). Oral bakteriler üzerine EA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, EA'nın oral patojenlere karşı önemli koruyucu aktiviteler gösterdiği belirtilmektedir (151). EA'nın pankreatik fibrozis üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- $\beta$ 1) veya trombosit kaynaklı büyüme faktörünün metabolizması sırasında pankreatik satelit hücrelerinde serbest radikal oluşumunun önlenildiği bildirilmektedir (221).



Şekil 1.5.1.3.1. EA'nın sentezi ve kimyasal yapısı (94)

Kronik florozis'te lipid peroksidasyonu düzeylerinin artması ve antioksidatif etkilere sahip olan GSHPx, CAT ve SOD gibi enzim aktivitelerinin azalması flor'un oksidan ve antioksidan dengesi üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermektedir (141, 208, 212). EA'nın in vivo ve in vitro antioksidatif etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (105, 217). EA alkol veya ağır metaller ile deneysel oksidatif stres oluşturulmuş sıçanlarda MDA düzeylerini azaltırken, GSHPx, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimler ile redükte GSH seviyelerini artırdığı ve ayrıca lipid peroksidasyonuna karşı kullanılabileceği belirtilmektedir (63, 182). Flor'un oksidan ve antioksidan dengesi üzerindeki zararlı etkilerini engellemek amacıyla EA kullanılmasının doğrudan yararlı olabileceğini ortaya koyan her hangi bir çalışmaya rastlanamamaktadır. Ancak, yapılan çalışmalarda deneysel florozis oluşturulmuş hayvanlarda MDA düzeylerindeki artış ve antioksidan düzeylerindeki azalışların EA'nın da dahil olduğu bir grup olan fenolik asitler bakımından zengin bitki besin

maddelerinin tüketilmesi ile önlenebileceği rapor edilmektedir (98, 118). Diş çürümelerini önlemek için kullanılan floridlerden dolayı ortaya çıkan diş lekelenmesi ve flor'un yan etkilerinin önlenmesi için EA'nın yararlı olabileceği düşüncesi ileri sürülmektedir (151).

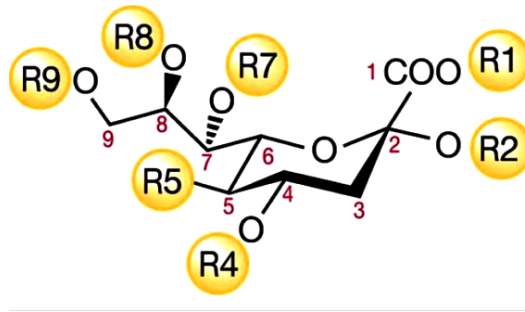
### 1.6. Sialik Asit (SA)

SA'lar, birinci karbon atomunda karboksil grubu bulunduran, dokuz karbonlu bir karbon iskeleti yapısına sahip ve organizmada 40'tan fazla sayıda bulunan türev monosakkarit grubudur (88, 120, 228, 236). Blix tarafından 1936'da submaksillar musininden, 1935-1939 yıllarında ise sinir dokusu glikolipidlerinden (Klenk tarafından) elde edilmiştir (88). SA'lar  $\alpha$ -2,3 veya  $\alpha$ -2,6 bağı ile Galaktoza (Gal),  $\alpha$ -2,6 bağı ile N-asetilglikozamine (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamine (GalNAc) ve  $\alpha$ -2,8 bağı ile diğer bir SA'ya bağlanırlar (32, 235).

Yapısında SA bulunduran glukokonjugatlar, karbonhidratların protein ve lipidlere kovalent bağlar ile bağlanması sonucu oluşan hibrit moleküllerdir (117). Bu moleküller glikoprotein, proteoglikan ve glikolipidler olarak adlandırılan üç önemli başlık halinde sınıflandırılabilir (88, 228). Hücre ve dokularda buldukları yerler açısından farklılıklar göstermektedirler. Hücre içinde sitoplazmada, organellerde ve hücreler arası alanlarda bulunabilirler. İmmünoglobulinler, taşıma proteinleri, yapısal proteinler, hormonlar, hücre tutunma molekülleri, toksinler ve lektinler gibi makromoleküllerin önemli bir kısmını glukokonjugatlar oluşturmaktadır (235). Embriyonik gelişim, metastaz, hücre tanınması ve enfeksiyon bölgelerine kan hücrelerinin göç etmesi gibi durumlarda karbonhidratların konjugat yapısından dolayı moleküller ve hücreler arası tanınmayı sağlayıcı etkileri bulunmaktadır. Bir karbonhidrat reseptörünün diğer bir karbonhidratı maskeleymesi ile tanıma mekanizması önlenebilir. Karbonhidratların hücre yüzeylerinde özel tabaka oluşturma, koruyucu ve sağlamlaştırıcı fonksiyonları da önemlidir. Farklılaşmış ve farklılaşmamış hücreler arasındaki farkı, zar yüzeylerinde bulunan glikolipit, glikoprotein ve proteoglikanların veya kısaca glikokonjugatlardaki karbonhidrat birimleri ve üzerinde taşıdıkları ek grupların (substituentler) belirlediği

kaydedilmektedir (117, 235). Glukokonjugatların oligosakkarit yan zincirlerinde redükte olmayan terminal kısım komponentleri olarak bulunan ve karbonhidrat türevlerinden olan SA'ların hücre ve hücreler arası alan ilişkilerinde sinyal iletimi, tanıma ve tutunma gibi çok sayıda fonksiyonu bulunmaktadır (88, 228).

SA'ların dokulardaki doğal dağılımlarını etkileyen en önemli faktör 4., 5., 7., 8. ve 9. karbon atomlarının süstitüsyon yeteneği ile anomerik bağlanma özelliklerindeki çeşitliliğidir. SA'ların tümü 9 karbon iskeletine sahip olan tek bir konfigürasyonda gösterilmektedir. Karbon atomları ile değişken grupların (R) pozisyonu varyasyonların kaynağını oluşturmaktadır. SA varyasyonları için önemli yapısal özellikler Şekil 1.10.1.1'de gösterilmiştir (42, 235). SA'ların bu yapısal özellikleri ve glukokonjugatların yapısının önemli bir kısmını oluşturması nedeni ile glikobiyoloji bakımından önemli yerleri bulunmaktadır (88).



**Şekil 1.6.1.** SA varyasyonları için önemli yapısal özellikler (235): R1: SA'ların fizyolojik pH'da çözünürlüğü ve negatif yükünden sorumlu, R2: Gal(3/4/6), GalNAc(6), GlcNAc(4/6), sialik asit (8/9) veya 5-O-Neu5Gc'un bağlanmasından, R4: Asetil, fukoz veya galaktozun bağlanmasından, R5: Amino, N-asetil, N-glikolil, hidroksil, N-asetimidoil, N-glikolil-O-asetil, N-glikolil-O-metil veya N-glikolil-O-2-Neu5Gc'un bağlanmasından, R7: Asetil, amino veya N-asetil grubu ile yer değiştirme, R8: Asetil, metil, sülfat, SA veya glukozun bağlanmasından, R9: H ile OH'in yer değişimi ve asetil, laktil, fosfat, sülfat ve SA'ların bağlanmasından sorumludur.

Memelilerde en çok bulunan SA türevlerinin N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac) ve N-glikolil nöraminik asit (Neu5Gc) olduğu bildirilmektedir (42, 235). SA'lar, insanlarda glukozaminlerden sentezlenmekte olup, sitidin mono fosfat (CMP) türevine dönüşmektedir. Bu ürün de oligosakkaritler ve polisakkaritler ile tepkimeye girerek SA kaynağı olarak görev almaktadır. Sialil tranferaz enzimi aracılığıyla SA,

CMP türevinden glikoprotein zincirinin terminal glukozuna bağlanmaktadır (228). SA'ların 1. karbon atomunda karboksil grubu bulunması fizyolojik koşullar altında moleküle negatif yük kazandırmakta olup, bu özelliğinden dolayı molekül, kuvvetli organik asit özelliği taşımaktadır. Taşıdıkları negatif elektrik yük, pozitif yüklü iyon veya moleküllerin bağlanması ve transportunda olduğu kadar hücreler ve moleküller arası çekme ve itme olayında da önemli rol oynamaktadır. Bağışıklık, homeostazis ve inflamasyon gibi farklı tip hücresel etkileşimlerin gerçekleşmesinde, SA'ların taşıdıkları OH, COOH ve N-asetil grupları önemlidir (42, 228, 236).

SA'ların % 10-15'lik kısmı lipidlere, % 85-90'lık kısmı ise  $\alpha$  ve  $\beta$ -globülinlere bağlı olarak bulunmaktadır. Lipidlere bağlı SA'lar, lipid-bağlı SA (LSA veya LBSA), proteinlere bağlı SA'lar ise protein bağlı sialik asit (PSA) olarak adlandırılmaktadır. Total sialik asitler (TSA) ise PSA ve LSA fraksiyonlarından oluşmaktadır (252). Lipide bağlı fraksiyonu oluşturan başlıca lipoproteinler; VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein), LDL(düşük dansiteli lipoprotein), HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) ve lipoprotein (a) [Lp (a)]'dır. SA'nın proteine bağlı fraksiyonunun önemli bir kısmını ise akut faz proteinleri oluşturmaktadır. SA bakımından fakir olan LDL'nin hücre içi lipid birikimine neden olabileceği öngörülmektedir (171). Yine yapılarında SA bulunan dentin glikoproteinleri ve osteoprotegerin gibi bazı glikoproteinler diş ve kemiklerde biyolojik olarak meydana gelen kalsifikasyonlarda önemli fonksiyonlara sahiptir (97, 142). SA'lar, glikoprotein seviyelerinin belirlenmesinde bir belirteç olarak değerlendirilmektedir (51, 106, 209). SA konsantrasyonunun kardiyovasküler (207), kanser (137), diyabet (51), kronik glomerulonefritis ve renal bozukluklara bağlı hastalıklarda (106) artış gösterdiği kaydedilmektedir. Hücre zarında SA bulunduran ve seramite bağlanan glikolipidler, glikosfingolipidler olarak adlandırılmaktadır (31). Gangliozit olarak da adlandırılan glikosfingolipidler çoğunlukla sinir dokusundan izole edilmiş olup, çeşitli yaşamsal süreçlerde reseptör fonksiyonlarına sahiptir (248). Fibrinojen, haptoglobulin, seruloplazmin,  $\alpha$ 1-antitripsin ve transferrin gibi kan plazması proteinleri ile eritrosit, lökosit, trombosit ve membran glikoproteinlerinin yapısında da SA bulunmaktadır (178).

### 1.6.1. Florozis ve Sialik Asit

Florozis'in görüldüğü canlılarda SA düzeylerinin azaldığı bildirilmektedir (46, 58, 91, 110). Ancak, florozis ve SA metabolizması arasında bulunan mekanizmalar hakkında yeterli bilgiye rastlanamamaktadır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda florozis'in erken tanısında dolaşımdaki serum SA düzeylerinin önemli olduğu belirtilmektedir (110). Endemik florozis'li bireylerin serum SA düzeylerinin florozis'li olmayan bireylere göre azaldığı rapor edilmektedir (91). Aşırı flor iyonu maruziyetinde, kollajen ve kemik matriksinde yapısal olarak bulunan glikozaminoglikanlar ile hidrokisprolinlerin idrar yolu ile atılımı ve SA/glikozamin oranının osteoflorosis tanısında önemli olduğu kaydedilmektedir (111, 213).

### 1.7. Plazma Lipidleri

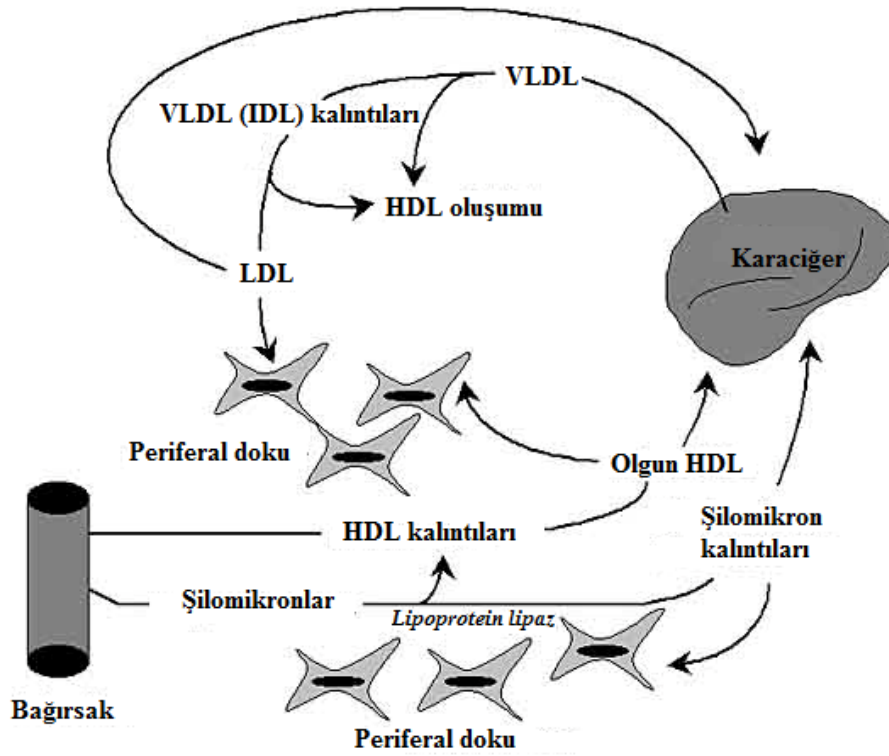
Lipidler plazmada kolesterol, triaçilgliserol, fosfolipid ve serbest yağ asitleri halinde bulunmaktadır. Kolesterol, organizmada bulunan temel steroldür. Triaçilgliseroller, bir gliserol molekülü ile üç yağ asidi molekülünün ester bağı ile birleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Fosfolipidler, bir gliserol molekülünün üç hidroksil grubundan ikisinin yağ asitleriyle, diğerinin ise fosforik asit ile esterleşmesiyle oluşmaktadır. Serbest yağ asitleri plazmada albüminlere bağlı olarak bulunmaktadır. Trigliseridler depo yağlarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (40).

Lipidler suda çözünmediklerinden plazmada taşınmaları için hidrofilik yapıda protein taşıyıcılara gereksinim duymaktadırlar. Apoprotein veya apolipoprotein adı verilen bu proteinler ile lipidlerin oluşturduğu komplekslere lipoproteinler denilmektedir. Lipoproteinlerin dış kısmında apolipoproteinler, serbest kolesterol ve fosfolipidler gibi amfipatik lipidler bulunurken, hidrofobik yapıdaki çekirdek bölümünde nonpolar kolesterol esterleri ve triaçilgliseroller bulunmaktadır (24). Apoproteinler lipoproteinlerin sudaki çözünürlüğünü sağlarken, lipoproteinlerin hücrelerdeki reseptörler tarafından tanınmasını ve bu nedenle lipoproteinlerin reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine alınmasında kolaylaştırmaktadır (24, 40). Ultrasantrifügasyonda lipoproteinlerden büyük ve hafif olanları üstte, küçük ve ağır olanları ise alt kısımda birikmelerine göre beş sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;



şilomikronlar (ŞM), VLDL, orta dansiteli lipoproteinler (IDL), LDL ile HDL'dir (30, 162). Lipoproteinlere bağlı plazma lipidlerinin eksojen ve endojen taşınması Şekil 1.7.1'de özetlenmiştir (254).

Lipidlerin eksojen taşınması, bağırsaklar tarafından absorbe edilen lipidlerden şilomikronların sentezini kapsamaktadır. Kan dolaşımına karışan şilomikronlar, lipoprotein lipaz etkisiyle lipoliz reaksiyonları sonucunda şilomikron kalıntılarına dönüştürülmektedir. Şilomikron kalıntıları büyük oranda karaciğer tarafından kan dolaşımından uzaklaştırılmaktadır. Bir kısım şilomikron da periferel dokular (kemik iliği, arterler, böbreküstü bezi vb.) tarafından tutulmaktadır. Lipidlerin endojen olarak taşınması ise lipoprotein lipaz tarafından VLDL kalıntıları (IDL) ve LDL'ye dönüştürülen VLDL sentezi ile başlamaktadır. VLDL kalıntıları karaciğer tarafından uzaklaştırılırken, LDL'ler steroidojenik dokular ve kolesterol gereksinimi olan dokular tarafından kullanılmakta olup, kalan LDL kısmı yine karaciğer tarafından uzaklaştırılmaktadır. HDL'ler hem karaciğer hem de bağırsaklar tarafından üretilmektedir. Yine fazla miktarda bulunan şilomikron ve VLDL'lerden de sentezlenmektedir (254).



Şekil 1.7.1. Plazma lipidlerinin eksojen ve endojen taşınması

### 1.7.1. Trigliserid

Canlı organizmalarda nötral yağların büyük bir kısmını trigliseridler oluşturmaktadır. Bir molekül gliserol ile üç molekül yağ asidinin esterleşmesi ile oluşan trigliseridlerdeki yağ asitlerinin hepsi aynı ise bunlara basit, farklı ise karışık trigliseridler adı verilmektedir. Doğal yağlarda ki basit trigliseridlerin oranı düşüktür (163). Erime noktaları içerdikleri yağ asitlerine bağlı olup, yağ asitlerinin doymamışlık sayısının artması ile azalmaktadır. İsimlendirilmeleri ise yağ asitlerine ve esterleştikleri gliseroldeki karbon atomu numarasına göre yapılmaktadır. (127).

### 1.7.2. Kolesterol

Kolesterol amfipatik bir lipid olup, membranların ve plazma lipoproteinlerinin dış katmanının önemli bir yapı taşıdır. Lipoproteinler, plazmadaki serbest kolesterolü

taşımaktadır. Kolesteril esteri, birçok dokuda bulunan kolesterolün depo şeklidir. Kolesterol esterleri tüm kolesterolün yaklaşık üçte ikisini oluşturmakta olup, plazmada, aterom plaklarında, böbreküstü bezinin korteksinde, karaciğer ve ince barsakta fazla miktarlarda bulunmaktadır. Karaciğerde üretilen kolesterol lipoproteinlerin yapısına girerek plazmaya geçebileceği gibi doğrudan kolesterol olarak veya safra asitlerine dönüşerek safraya da geçebilmektedir. Kolesterolün patolojik olaylardaki esas rolü, arterlerdeki ateroskleroz oluşumuna etmen olarak serebrovasküler, koroner ve periferik damar hastalıklarına yol açmasıdır. Koroner ateroskleroz, plazma LDL/HDL kolesterol oranının yüksekliği ile ilişkilidir (162).

### **1.7.3. Lipoproteinler**

Lipoproteinler, makromoleküler yapıda dış yüzeyleri hidrofilik, iç kısımları ise hidrofobik olan bileşiklerdir. İç kısımları genel olarak trigliserid ve kolesterol esterleri, amfipatik moleküllerden oluşan yüzey kısımları ise kolesterol, fosfolipid ve apolipoproteinlerden oluşmaktadır. Lipoproteinlerin yapısında bulunan apolipoproteinler, lipidlerin taşınması ve hücrese reseptörlere bağlanma fonksiyonunu yapmaktadır (40, 162). Apolipoproteinler, protein, polipeptid ve glikoprotein yapısında moleküllerdir. ApoB (apolipoprotein B)'nin % 5'i karbonhidrat yapısında olup, mannoz, fukoz, galaktoz, glukozamin ve SA bulundurmaktadır (40).

### **a-Şilomikronlar**

Şilomikronlar bağırsak hücreleri tarafından sentezlenip salınan en büyük moleküler yapıya sahip lipoproteinlerdir. ŞM'nin yapısının % 98'i lipid, % 2'si ise protein'dir (176). Yüksek oranda lipid bulundurmaları nedeniyle tüm lipoproteinler içinde en düşük dansiteye sahiptirler. Besinsel kaynaklı triaçilgliserollerin kas ve yağ dokusuna taşınmasını ve ayrıca diyet ile alınan kolesterolün karaciğere ulaştırılmasında önemlidirler. ŞM'nin lipid içeriğinin en büyük kısmını trigliseridler oluşturmaktadır (162, 176).

**b- Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler**

Çok düşük dansiteli lipoproteinlerin asıl kaynağı karaciğer olup, yaklaşık % 15 veya daha az oranda da bağırsakta sentezlenmektedirler (40). Yapısında yaklaşık olarak % 92 lipid ve % 8 oranında protein bulunmaktadır (176). Besinler ile alınan veya lipoliz ile açığa çıkan yağ asitleri ve karbonhidratlar karaciğerde triaçilgliserollere dönüştürülerek VLDL'nin yapısına katıldıktan sonra dolaşıma verilmektedir (24). VLDL'de bulunan trigliseridler, endotelde bulunan lipoprotein lipaz enzimi tarafından hidrolize uğradıktan sonra açığa çıkan yağ asitleri kas ve yağ dokusu tarafından kullanılmaktadır (30, 40). Yağ asitleri adipositlerde esterleşerek trigliseridlere dönüştürülürken, kas dokusunda oksidasyona uğramaktadır. Trigliseridlerin azalması ve apo C'nin HDL'ye taşınması sebebi ile VLDL, IDL'ye dönüşmektedir (30, 83).

**c- Ara Dansiteli Lipoproteinler**

Çok düşük dansiteli lipoproteinlerin triaçilgliserollerini ve apo C'yi kaybetmesi ile kısa ömürlü IDL partikülleri oluşmaktadır. IDL yaklaşık olarak eşit oranda kolesterol ve trigliserid içermektedir. IDL'deki başlıca apolipoproteinler apo B-100 ve apo E'dir (162, 176). IDL'lerin büyük bir kısmı hepatik lipaz ve lipoprotein lipaz tarafından katabolize edilmektedir. IDL'den trigliseridler ve apo E kısmının uzaklaştırılması ile LDL oluşmaktadır. Bu dönüşüm sırasında IDL partikülü apo B-100 dışındaki tüm apolipoproteinlerini kaybetmektedir. Küçük bir kısmı ise karaciğer tarafından tutulmaktadır. IDL'nin hepatositler tarafından alınması apo B-100 ve apo E apolipoproteinlerinin LDL reseptörü tarafından tanınması sonucu meydana gelmektedir (24).

#### **d- Düşük Dansiteli Lipoproteinler**

Düşük dansiteli lipoproteinler, % 80 lipid ile % 20 proteinden oluşmaktadır. LDL'nin protein içeriğinin artması sonucu partikül çapı küçülmekte (22-28.5 nm) ve dansitesi ise artmaktadır (83, 176). Lipid içeriğinin % 47'sini kolesterol, % 23'ünü fosfolipid ve % 9'unu trigliseridler oluşturmaktadır. Kolesterol içeriği en yüksek lipoprotein olup başlıca apolipoproteini apo B-100'dür. LDL apo B-100, total plazma apo B-100'ünün % 90-95'ini oluşturmaktadır (176). Her LDL partikülü bir molekül apo B-100 bulundurmaktadır (34). LDL'nin yapısında bulunan apo B-100'ün tamamen VLDL kaynaklı olduğu kaydedilmektedir (176).

Vücutta bulunan kolesterolün yaklaşık yarısı karaciğer ve barsaklar tarafından sentezlenirken, kalanı ise diyet ile alınmaktadır (162, 176). Diyet ile alınan kolesterol, karaciğere şilomikron kalıntıları halinde gelmektedir. Karaciğer tarafından sentezlenen kolesterolün ekstrahepatik dokulara taşınması için VLDL'nin yapısına katılması gerekmektedir. VLDL, öncelikle IDL'ye, daha sonra ise LDL'ye dönüştürülmektedir. Apo C-II ve apo E'nin VLDL kalıntıları ve IDL'den HDL'ye transfer edilmesi sonucu oluşan LDL'nin hemen hemen tamamı apo B-100 bulundurmaktadır (30). LDL tüm dokulara kolesterolü taşıyan temel lipoproteindir (24, 40, 176). VLDL'nin önce IDL'ye sonra LDL'ye dönüşmesiyle partikülün plazmada kalma süresi birkaç saatten 60 saate kadar çıkmaktadır. Uzun ömürlü bir partikül olması LDL'nin dokular için kolesterol kaynağı olarak fonksiyon yapmasını sağlamaktadır (24). LDL, hücre içerisine reseptör aracılı endositoz ile alınmaktadır (24, 40). LDL reseptörleri hücre membranının sitozolik kısmında kltrin adlı proteinle kaplı ceplerde bulunmaktadır (40). LDL reseptörü, glikoprotein yapısında olup negatif yüklü ve sisteince zengin kısımları apo B-100'deki pozitif yüklü arginin ve lizin amino asitleri ile etkileşmektedir (24). Endozomlar içerisine alınan LDL partikülü, lizozomlar ile birleşerek partikülün apolipoprotein fraksiyonu yıkıma uğratılmaktadır. Meydana gelen kolesterol esterleri bir asit lipaz tarafından hidroliz edilmekte ve oluşan serbest kolesterol ya hücre membranı yapısında veya steroide gereksinim olan reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Oluşan kolesterol esterleri aşırı miktarda ise açıl-CoA-kolesterol açıl transferaz (ACAT) enzimi tarafından tekrar esterleştirilerek hücre içinde depolanmaktadır. Ayrıca, serbest kolesterol hidroksi

metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini baskılayarak kolesterol sentezini inhibe etmektedir (24, 40, 176). LDL reseptörü yıkıma uğratılmadan tekrar hücre membranında kullanılmak üzere tutulmaktadır (40, 83).

### **e- Yüksek Dansiteli Lipoproteinler**

Moleküler yapısı bakımından en küçük boyutlu ve protein içeriği bakımından da en yüksek oranda protein bulunduran bir lipoproteindir. HDL'nin yoğunluğu 1.063-1.210 g/ml, çapı ise 7.5-12 nm arasındadır. HDL kütlesinin yaklaşık % 50'si protein, % 30'u fosfolipid, % 20'si kolesterolden oluşmaktadır (146, 176). Trigliserid içeriği en az olan lipoprotein olup, HDL'nin başlıca apolipoproteinleri apo A-I ve A-II'dir (146, 149, 176). Apolipoproteinlerinden apo A-I yaklaşık olarak % 65 oranında bulunmakta olup, HDL ile ilişkili PON enzimi esas olarak apo A-I ve apo J (klusterin)'ye bağlanmaktadır (149, 155). Kolesterol ve kolesterol esterlerini periferel dokulardan karaciğere taşırlar (179). HDL periferel hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlamakla birlikte kendisine bağlı paraoksonaz (PON) ve lesitin kolesterol açil transferaz (LCAT) gibi enzimler ile LDL'nin oksidasyonunu önlemektedir (167). LCAT, lesitinden bir yağ asiti transfer ederek bu yağ asitini serbest kolesterol ile esterleştirmektedir. Esterleşme sonrası, kolesterol esterleri HDL partikülünün hidrofob yapıda çekirdek kısmında tutulur ve bu şekilde hücre membranları ile HDL arasında serbest kolesterol için bir konsantrasyon gradiyenti meydana getirilmiş olmaktadır. HDL hücre membranlarından serbest kolesterolü aldıkça küresel yapıda küçük ve yoğun olan HDL<sub>3</sub>'e dönüşmektedir (24, 83). HDL<sub>3</sub> partikülleri hücre yüzeyinden serbest kolesterolü alırken, ayrıca şilomikronlar ve VLDL'nin hidrolizi sonucu açığa çıkan serbest kolesterol, fosfolipidler ve apolipoproteinler de HDL'ye transfer edilmektedir. Kolesterol esterleri bakımından daha zengin hale gelen HDL partikülü daha büyük ve daha az yoğun HDL<sub>2</sub> partikülüne (dansite= 1.063-1.125 gr/ml) dönüşür. HDL<sub>1</sub> Apo E'nin taşınmasını sağlayan partiküldür (86).

#### 1.7.4. Florozis ve Plazma Lipidleri

Farklı düzey ve sürelerle flora maruz bırakılan hayvanlarda lipid metabolizması etkilenmektedir. Özellikle böbreklerde karşılaşılan fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak flor'un plazmadaki yarı ömrü uzayacağı için düşük düzeylerde flor alınsa da kronik florozis oluşmakta ve flor'un metabolik etkileri de artmaktadır (76). Pankreas ve karaciğer lipaz aktivitesi düzeyleri sodyum florid verilen hayvanlarda azalmakta ve bu düzeyler flor maruziyetinin süresi ve dozu yükseltince daha da fazla azalabilmektedir (76, 255). Flor'un lipolitik sistemlerde yer alan birçok enzim için güçlü bir inhibitör olmasına karşılık bu inhibe edici özelliğinin adipoz dokudan izole edilen lipoprotein lipaz enzimi üzerinde zayıf kaldığı da bildirilmektedir (202). Uzun süre flor uygulamasının rat karaciğer lipid bileşimine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada; yüksek dozda flora bağlı olarak düşük düzeylerde bulunan fosfotidiletanolamin (PE), fosfotidilkolin (PC) ve fosfatidilserin (PS) nedeniyle total fosfolipid düzeylerinin azaldığı belirtilmektedir (241). Ayrıca, florozis'li hayvanlarda PE ve PC yağ asidi düzeylerinin aşırı doymamış yağ asitleriyle uyumlu bir şekilde azaldığı, doymuş yağ asiti düzeylerinin ise arttığı kaydedilmiştir. Florozis'li koyunlarda sağlıklı koyunlara göre, serum total kolesterol ve trigliserid düzeylerinin farklılık gösterdiği bildirilmektedir (76). Uzun süreli flor maruziyeti sonrasında oluşan hipotiroidiye bağlı olarak total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL ve VLDL gibi plazma lipid düzeylerinin artması ve lipideminin oluşmasına karşılık kronik florozis'in lipid ve lipoprotein profilinde istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmayacağı da ileri sürülmektedir (89, 180).

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyal

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADEK) Başkanlığı'nın 07.04.2011 tarihli ve 2011/17 sayılı izni ile yapılmıştır. Çalışmada her grupta 7 adet (30-41 g ağırlığında) Swiss albino fare kullanıldı. Farelerden 5 grup oluşturularak 10 gün süre ile adaptasyonları sağlandı. Deneyde kullanılan fareler,  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık döngünün sağlandığı sessiz bir odada barındırıldı. Deneklere 8 haftalık sürede her grup için uygulanan işlemler aşağıda belirtildirmiştir.

1. **Kontrol Grubu (K):** Normal diyet ve su ile 8 hafta beslendi.
2. **Dimetilsülfoksit Grubu (DMSO):** Subkutan (s.c., deri altı) % 0.2'lik DMSO injeksiyonu 8 hafta uygulandı.
3. **Ellagik Asit Grubu (EA):** Deri altı 10 mg/kg/gün EA injeksiyonu 8 hafta uygulandı.
4. **Sodyum Florid Grubu (NaF):** Oral (gavaj) olarak 25 ppm/fare/gün NaF 8 hafta uygulandı.
5. **Ellagik Asit + Sodyum Florid Grubu (EA+NaF):** Oral olarak 25 ppm/fare/gün NaF ve deri altı yolla 10 mg/kg/gün EA injeksiyonu 8 hafta uygulandı.



### **2.1.2. Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi**

Son uygulamalardan 24 saat sonra, farelere servikal dislokasyon yöntemi uygulanarak kan örnekleri heparinli tüplere intrakardiyak olarak alındı. Heparinli tam kan örneklerinden GSH tayini için bir miktar ayrıldı. Kan örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Tam kan ve plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C’de derin dondurucuda saklandı.

### **2.1.3. Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi**

Son uygulamalardan 24 saat sonra servikal dislokasyon yöntemiyle ötenaziyi takiben sistemik nekropsileri yapılan deneklerden histopatolojik incelemeler için karaciğer ve böbrek doku örnekleri alınarak % 10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler**

#### **2.2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

1. 5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit (Sigma)
2. N-asetil nöraminik asit (NANA) (Sigma)
3. Hidroklorik asit (Merck)
4. Sodyum florür (Sigma)
5. Paraokson (Supelco)
6. NaCl (Sigma)
7. n-Bütil asetat (Riedel de Haen)
8. Fosfotungistik asit (Merck)
9. Tiyobarbütirik asit (Merck)
10. Bakır Sülfat (Merck)
11. Kloroform (Merck)
12. Rezorsinol (Merck)
13. n -Bütanol (Merck)
14. Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma)

15. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Merck)
16. Triklorasetik asit (Merck)
17. Metafosforik asit (Merck)
18. Glutatyon (Sigma)
19. Metanol (Merck)
20. Aseton (Merck)

#### 2.2.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. Deiyonize su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest-3000)
2. Ayarlanabilir otomatik pipetler (Axygen 5-1000 µl)
3. Spektrofotometre (Microplate Reader, Epoch)
4. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201)
5. Sogutmalı santrifüj (Heraeus christ)
6. Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)
7. Otoanalizör (HumaStar 600)
8. Su banyosu (SB100, Nüve)
9. Buzdolabı (-20°C) (Bosch)
10. Hassas terazi (Scaltec)
11. pH metre (inoLab)
12. Vorteks (Labinco)
13. Etüv (Nüve)

#### 2.2.2. Analizlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

**1. % 2'lik stok rezorsinol çözeltisi:** 2 g rezorsin bir miktar distile su ile çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. (Bu çözelti -18 °C'de 1 ay süre ile dayanıklıdır)

**2. Rezorsinol ayıracı:** % 2'lik stok rezorsinol çözeltisinden 10 ml alınarak üzerine 9,75 ml distile su ve 0,25 ml 0,1 M CuSO<sub>4</sub> ilave edildi. Sonra % 37'lik HCl ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**3. Triklorasetik asit (% 20):** 20 g triklorasetik asit (TCA) alındı, bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100ml' ye tamamlandı.

**4. Tiyobarbütirik asit (% 0,67):** 1,675 g tiyobarbütirik asit alındı, bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı.

**5. Çöktürücü çözelti:** 1.67g metafosforik asit, 0,2 g etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ve 30 g NaCl alınarak bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

**6. Fosfat çözeltisi (0,3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>):** 53,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O bir miktar distile suda çözülerek hacim litreye tamamlandı.

**7. DTNB çözeltisi (Ellman's çözeltisi):** 40 mg DTNB alındı ve % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**8. Sodyum sitrat çözeltisi (% 1'lik):** 1 g sodyum sitrat alınarak hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**9. HCl çözeltisi (0,1 M) (a):** 10 mL 1 M HCl çözeltisi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**10. Tris çözeltisi (0,1 M) (b):** 1,21 g tris distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

**11. Tris-HCl tamponu (20 mM, pH 8):** 29 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

**12. Çalışma ayıracı [Ca klorür (2 mM)-paraokson (2 mM)]:** 29,4 mg kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) bir miktar tris-HCl tamponu ile çözüldü ve bu karışıma 1,5 mL asetonda çözülen 44 µL paraokson eklenerek tris-HCl tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.

### 2.2.3. Analizlerde Kullanılan Metotlar

#### 2.2.3.1. LSA Analizi

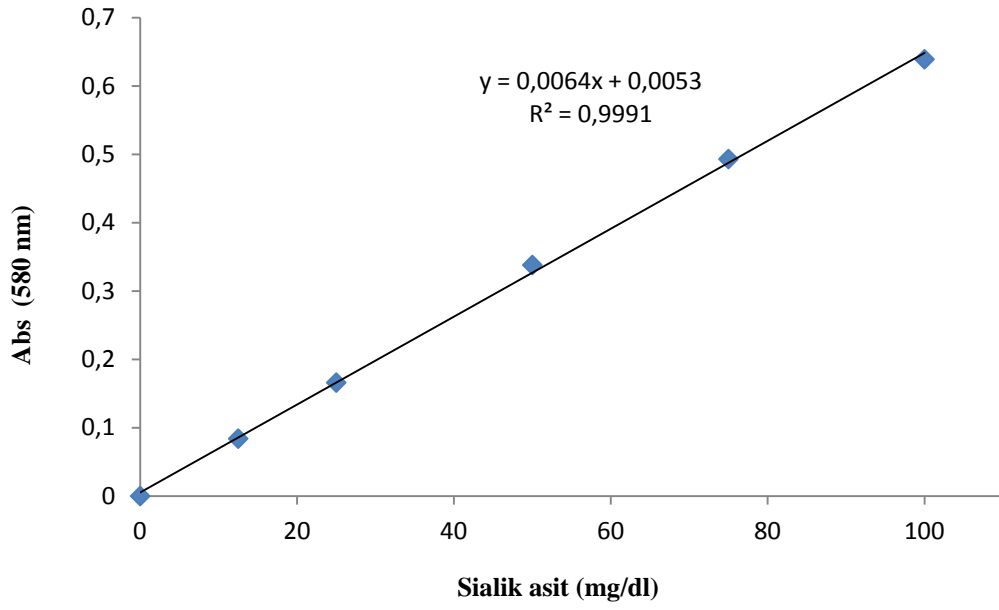
LSA tayini Katapodis ve ark.'nın (122) belirttiği metod ile yapıldı. Deneyin prensibi; lipid fazın ekstraksiyonundan sonra asidik ortamda serbest kalan SA'ların rezorsinol

ayıracı ile mavi renkli kompleksler oluşturması esasına dayanır. Oluşan mavi rengin optik dansitesi 580 nm dalga boyunda okunur.

LSA tayini için 44.7 µl plazma ile 150 µl distile su 5 sn vorteks kullanılarak karıştırıldı. Karışıma buz üzerinde 3 ml kloroform-metanol (2:1 v/v) ilave edildi. Vorteks ile 30 sn karıştırdıktan sonra 0.5 ml bidistile soğuk su ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dk 2500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki süpernatantın 1 ml'si başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl fosfotungstik asit (1 g/ml) eklendi, 5 dk 2500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı aspire edildi. Daha sonra 1 ml distile su koyup dipte katı partikül kalmayınca kadar karıştırıldı, rezorsinol ayıracından 1 ml ilave edildi. Tüpler karıştırılıp, 15 dk kaynar su banyosunda, hemen ardından da 10 dk su ve buz banyosunda tutuldu. Buzlu soğuk tüplere 2 ml bütil asetat-bütil alkol (85:15 v/v) ilave edildi. Oda ısısında tüpler vorteks kullanılarak karıştırıldı. Daha sonra 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mavi ekstraktın spektrofotometrede 580 nm'deki optik dansitesi okundu. Numunelerin LSA düzeyi kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplandı.

#### **2.2.3.1.1. LSA İçin Standart Eğrisinin Hazırlanışı**

Sentetik NANA'dan 10 mg alınarak 5 ml bidistile su içinde eritildi. Bundan 12.5-25-50-75-100 mg/dl olacak şekilde çalışma standartları hazırlandı. Hazırlanan bu çalışma standartlarının absorbansları okunarak SA'nın kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Grafik 2.2.3.1.1.1).



**Grafik 2.2.3.1.1.1.** SA kalibrasyon eğrisi

### 2.2.3.2. MDA Analizi

Plazma MDA analizi Yoshioka ve ark.'nın (253) bildirdiği metoda göre yapıldı. Deneyin prensibi; MDA ve TBA'nın asidik ve sıcak ortamda pembemsi renkte bir kompleks oluşturmaları esasına dayanmaktadır. Bu renkli kompleksin 535 nm'de verdiği absorbans ile MDA konsantrasyonu doğru orantılıdır.

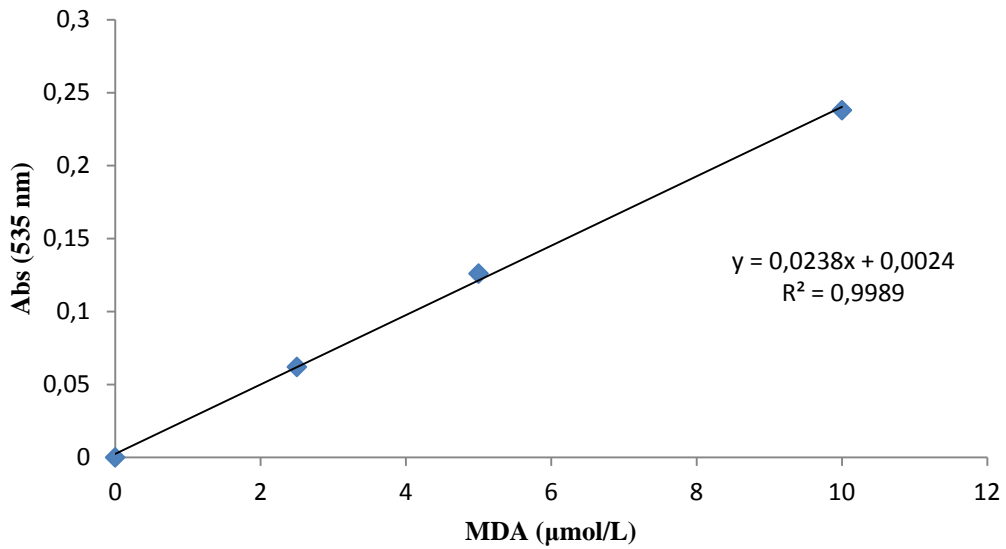
MDA analizi için plazmadan 0.5 ml pipetlenerek üzerine 2.5 ml, kör tüpüne ise 3 ml % 20'lik TCA ilave edildi. Daha sonra her tüpe 1 ml TBA eklendi ve 90°C' lik su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakıldı. Soğutulduktan sonra üzerine 4 ml n-bütanol konularak 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. N-bütanol tabakasından alınarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteler spektrofotometrede okundu (Tablo 2.2.3.2.1).

**Tablo 2.2.3.2.1.** MDA ölçümü için uygulanan işlemler

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Plazma</b>	-	-	0.5 ml
<b>Standart</b>	-	0.5 ml	
<b>TCA</b>	3ml	2.5 ml	2.5ml
<b>TBA</b>	1ml	1 ml	1ml
Karışımlar 90°C' de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi ve su altında soğutuldu.			
<b>n-Bütanol</b>	4 ml	4 ml	4 ml
3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.			
Oluşan üst tabakadan alınarak 535 nm' de köre karşı optik dansiteleri okundu.			

### 2.2.3.2.1. MDA İçin Standart Eğrisinin Hazırlanışı

0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı. Bundan 0.01 ml alınarak hacmi 10 ml'ye tamamlandı ve 20 µmol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözeltilerden 2.5-5-10 µmol/L'lik dilüsyonlar hazırlanarak aşağıdaki gibi çalışıldı, 535 nm'de optik dansiteleri okundu ve sonuçların hesaplanmasında kullanılacak olan kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Grafik 2.2.3.2.1.1).

**Grafik 2.2.3.2.1.1.** MDA kalibrasyon eğrisi

### 2.2.3.3. GSH Analizi

Tam kanda GSH ölçümü Beutler ve ark.'nın (22) bildirdiği yönteme göre yapıldı. Deneyin prensibi; tam kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, sülfhidril (-SH) grupları bulundurmeyen proteinlerin çöktürülerek elde edilen berrak sıvıda -SH gruplarının DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin 412 nm dalga boyunda optik dansitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

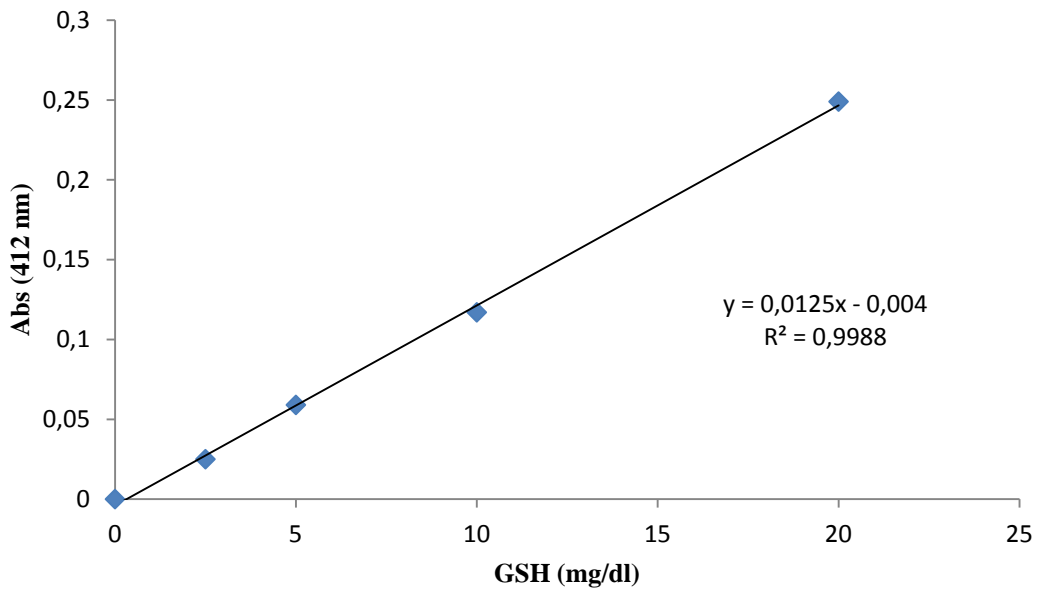
GSH analizi esnasında kör, standart ve numuneler için belirlenen tüplerden numune tüpüne 200 µl EDTA'lı tam kan, standart tüpüne 200 µl standart çözeltisi alındı. Üzerlerine 1800 µl distile su ve 3ml çöktürücü çözelti eklendi. Kör tüpüne 2 ml distile su, 3 ml çöktürücü çözelti pipetlendi. Tüpler karıştırılıp buzlu suda 5 dk bekletildikten 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Tüplerden 2 ml süpernatant başka tüplere aktarıldıktan sonra üzerlerine 8 ml fosfat çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. Son olarak 1 ml DTNB çözeltisi eklenerek 412 nm dalga boyunda optik dansiteleri köre karşı okundu.

**Tablo 2.2.3.3.1.** GSH ölçümü için uygulanan işlemler

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Tam Kan</b>	-	-	200 µl
<b>Standart</b>	-	200 µl	-
<b>Distile Su</b>	2 ml	1800 µl	1800 µl
<b>Çöktürme çözeltisi</b>	3 ml	3 ml	3 ml
Buzlu suda 5 dk bekletilip, 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi ve süpernatanttan başka tüplere 2 ml aktarıldı.			
<b>Fosfat çözeltisi</b>	8 ml	8 ml	8 ml
Vorteks'lendi.			
<b>DTNB</b>	1 ml	1 ml	1 ml
Tüplerin optik dansiteleri 412 nm'de köre karşı okundu.			

### 2.2.3.3.1. GSH İçin Standart Eğrisinin Hazırlanışı

10 mg GSH alındı ve distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı. 2.5-5-10-20 mg/dl dilüsyonlar hazırlanarak aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı. 412 nm'de optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi hazırlandı. GSH düzeylerinin hesaplanmasında mg/dl olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanıldı (Grafik 2.2.3.3.1.1).



Grafik 2.2.3.3.1.1. GSH kalibrasyon eğrisi

### 2.2.3.4. Paraoksonaz Aktivitesinin Analizi

Deneyin prensibi; substrat olarak kullanılan paraoksonun (o,o-dietil-o-p-nitrofenilfosfat) PON tarafından hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (112).

PON'nun aktivitesinin belirlenmesi için, microplate kuyucuklarına 280  $\mu$ L alışma ayıracı konulduktan sonra, kr kuyucuğuna 8  $\mu$ L distile su ve numune kuyucuğuna 8  $\mu$ L plazma ilave edilir. Daha sonra numunelerin absorbansındaki artışlar köre karşı,



37°C’de, 2 dakika boyunca 412 nm’de ölçülerek dakikadaki absorbands ( $\Delta A/dk$ ) değişimleri tespit edilir.

**Tablo 2.2.3.4.1.** Paraoksonaz aktivite tayini için uygulanan işlemler

	Numune	Kör
Çalışma ayıracı	280 $\mu$ L	280 $\mu$ L
Numune	8 $\mu$ L	-
H <sub>2</sub> O	-	8 $\mu$ L

#### 2.2.3.4.1. PON Aktivitesinin Hesaplanması

Her bir örnek için PON aktivitesi, p-nitrofenol için belirlenmiş olan molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak ve yapılan dilüsyonlar dikkate alınarak (U/L olarak) hesaplandı (12, 71). 1 ünite PON, dakikada 1  $\mu$ mol p-nitrofenol oluşumunu katalize eden enzim miktarıdır.

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/dk \times SF \times 10^6}{\epsilon \times 0,6}$$

$\Delta A/dk$  : Bir dakikadaki absorbands değişimi

$\epsilon$  : p-nitrofenolün molar absorpsiyon katsayısı, mevcut deney şartları için  
18290 (pH:8)

SF : Seyreltme faktörü ( Total hacim/Numune hacmi)

$10^6$  :  $\mu$ mole çevirme faktörü

1/0,6 : Plate ışık yolunun uzunluğu

### **2.2.3.5. Plazma Total Kolesterol, Trigliserid, HDL, LDL, VLDL, Glukoz ve Kalsiyum Analizi**

Plazma total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, glukoz ve kalsiyum düzeyleri analiz kitleri (Total Cholesterol, Triglycerides, HDL, LDL, Glucose ve Calcium Liquicolor HumaStar kitleri, Germany) kullanılarak otomatik analizörde (HumaStar 600, Germany) ölçüldü. VLDL düzeyleri Friedewald formülü [ $\text{Trigiserid (mg/dl)} < 400 \text{ mg/dl}$  ise  $\text{VLDL (mg/dl)} = \text{Trigiserid (mg/dl)} / 5$ ] kullanılarak hesaplandı (8, 85).

### **2.2.3.6. İdrarda Flor Analizi**

Çalışmada, kontrol, NaF ve EA+NaF gruplarının her birinden alınan beş farenin idrar örneklerindeki flor iyonu düzeyleri iyon spesifik elektrot (Orion 9609BN ionplus) kullanılarak (Süleyman Demirel Üniversitesi, Jeotermal Enerji, Yeraltısuyu ve Mineral Kaynakları Araştırma ve Uygulama Merkezi, Isparta) analiz edildi (Tablo 3.1).

### **2.2.3.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusunun Histopatolojik Değerlendirmesi**

Tespit edilen dokular, rutin işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Daha sonra bu parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoxilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi.

#### 2.2.3.8. İstatistiksel Analizler

Deney ve kontrol guruplarından elde edilen biyokimyasal parametre sonuçlarının istatistiksel analizleri (SPSS 16.0 for Windows) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılıkların olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. İstatistiksel olarak farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacı ile de çoklu karşılaştırma *post hoc* analiz testlerinden biri olan Tukey testi kullanıldı. Gruplarda araştırılan parametreler arasındaki ilişkiler korelasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SD$ ) olarak gösterildi.

### 3. BULGULAR

Çalışmada, 8 hafta süre ile oral yolla 25 mg/L NaF verilerek oluşturulan deneysel kronik florozis'li farelerin plazma LSA, MDA, PON aktivitesi, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, glukoz ve kalsiyum düzeyleri ile tam kan GSH düzeyleri araştırılmış olup, 8 hafta süre ile deri altı yolla 10 mg/kg EA uygulanan farelerde EA'nın bu parametreler üzerine olan etkileri araştırıldı. Elde edilen bulgular Tablo 3.4 ve Grafik 3.1-3.11'de gösterildi. Denekler üzerinde uygulamalar devam ederken aynı zamanda ikişer hafta aralıklar ile vücut ağırlıkları kaydedilerek Tablo 3.3'de gösterildi. Kontrol grubu ile DMSO, EA, NaF ve EA+NaF grubu farelerde araştırılan biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için tespit edilen korelasyonlar ise Tablo 3.2'de gösterildi.

Korelasyon analizi sonucunda elde edilen bulgulara göre plazma VLDL ve trigliserid düzeyleri arasında yüksek pozitif ( $r= 0.997$ ;  $P<0.01$ ) korelasyonun olduğu tespit edildi. Plazma HDL ve total kolesterol düzeyleri arasında yüksek pozitif ( $r= 0,632$ ;  $P<0.01$ ) korelasyon belirlenirken, plazma HDL düzeyi ile VLDL ve trigliserid düzeyleri arasında düşük pozitif (sırasıyla  $r= 0.370$ ;  $r= 0.376$ ;  $P<0.05$ ) korelasyonun olduğu saptandı. Plazma total kolesterol ve LDL düzeyleri arasında yüksek pozitif ( $r= 0.631$ ;  $P<0.01$ ) korelasyon olduğu gözlemlendi.

Plazma glukoz düzeyi ile VLDL, HDL ve trigliserid düzeyleri arasında yüksek pozitif (sırasıyla  $r= 0.552$ ;  $r= 0.539$ ;  $r= 0.550$ ;  $P<0.01$ ) korelasyon olduğu saptanmış olup, plazma glukoz düzeyi ile total kolesterol ve LSA düzeyleri arasında düşük pozitif (sırasıyla  $r= 0.399$ ;  $r= 0.389$ ;  $P<0.05$ ) korelasyon ilişkisi olduğu tespit edildi.

Tam kan GSH düzeyi ile VLDL, trigliserid, glukoz ve PON aktivitesi düzeyleri arasında yüksek pozitif (sırasıyla  $r= 0.442$ ;  $r= 0.451$ ;  $r= 0.522$ ;  $r= 0.582$ ;  $P<0.01$ ) korelasyonun olduğu tespit edildi. Tam kan GSH ve plazma MDA düzeyleri arasında negatif ( $r= -0.410$ ;  $P<0.05$ ) korelasyon ilişkisi olduğu saptanırken, GSH düzeyi ile total kolesterol, HDL ve kalsiyum düzeyleri arasında düşük pozitif (sırasıyla  $r= 0.353$ ;  $r= 0.350$ ;  $r= 0.390$ ;  $P<0.05$ ) korelasyonun olduğu gözlemlendi.

Plazma PON aktivitesi düzeyi ile MDA düzeyleri arasında yüksek negatif ( $r = -0.468$ ;  $P < 0.01$ ) korelasyon ilişkisi olduğu belirlenmiş olup, PON aktivitesi ile LSA ve kalsiyum düzeyleri arasında düşük pozitif (sırasıyla  $r = 0.386$ ;  $r = 0.390$ ;  $P < 0.05$ ) korelasyon varlığı tespit edildi.

Çalışmada 8 hafta süre ile NaF uygulaması yapılan farelerin kronik florozis'li olduğunu doğrulamak bakımından kontrol, NaF ve EA+NaF gruplarında idrar flor düzeyleri analiz edilerek Tablo 3.1'de gösterildi.

**Tablo 3.1.** Kontrol, NaF ve EA+NaF gruplarında idrar flor düzeyleri

	<b>Gruplar (n=5)</b>		
	Kontrol	NaF	EA+NaF
<b>Flor (mg/L)</b>	1.66±0.05	60.40±0.55	25.00±0.26

**Tablo 3.2.** Kontrol grubu ile DMSO, EA, NaF ve EA+NaF grubu farelerde biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar

	VLDL	Total kolesterol	Trigliserid	HDL	LDL	Glukoz	LSA	MDA	GSH	PON	Kalsiyum
<b>VLDL</b>			0.997**	0.370*		0.552**			0.442**		
<b>Total kolesterol</b>				0.632**	0.631**	0.389*			0.353*		
<b>Trigliserid</b>				0.376*		0.550**			0.451**		
<b>HDL</b>						0.539**			0.350*		
<b>LDL</b>											
<b>Glukoz</b>							0.399*		0.522**		
<b>LSA</b>										0.386*	
<b>MDA</b>								-0.410*		-0.468**	
<b>GSH</b>										0.582**	0.366*
<b>PON</b>											0.390*
<b>Kalsiyum</b>											

\*\* : Korelasyon P&lt;0.01 seviyesinde önemlidir.

\* : Korelasyon P&lt;0.05 seviyesinde önemlidir.

**Tablo 3.3.** Kontrol, DMSO, EA, NaF ve EA+NaF verilen farelerin ikişer hafta aralıklar ile ölçülen vücut ağırlıkları (g)

	<b>Kontrol</b>	<b>DMSO</b>	<b>EA</b>	<b>Flor</b>	<b>EA+Flor</b>	<b>P<sub>ANOVA</sub></b>
<b>İlk gün</b>	30.99±2.09	31.28±2.42	31.64±2.12	32.22±2.71	32.36±2.22	>0.05
<b>2 hafta sonra</b>	33.89±2.41	33.58±2.10	34.96±1.90	34.46±1.63	34.38±1.31	>0.05
<b>4 hafta sonra</b>	36.12±1.58	36.01±1.83	36.45±1.89	35.92±1.95	35.61±1.61	>0.05
<b>6 hafta sonra</b>	38.11±1.48	38.26±1.79	38.17±2.05	36.67±2.23	37.90±1.70	>0.05
<b>8 hafta sonra</b>	38.99±1.57 <sup>a</sup>	38.52±1.88 <sup>a</sup>	38.68±2.00 <sup>a</sup>	36.42±1.81 <sup>b</sup>	37.47±1.85 <sup>a</sup>	<0.05

\* Farelerin vücut ağırlıkları her iki haftada bir X±SD şeklinde verilmiş olup, gruplar arasında vücut ağırlığında ortaya çıkan değişikliklerin istatistiksel olarak önemlilik düzeyi P<0.05'dir.

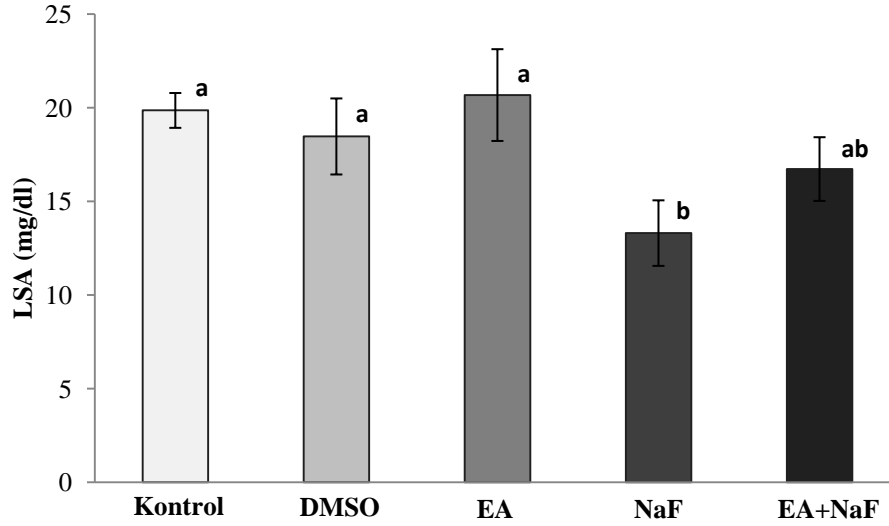
**Tablo 3.4.** Kontrol ve deney gruplarının plazma LSA, MDA, PON, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, glukoz ve kalsiyum düzeyleri ile tam kan GSH düzeyleri (X±SD)

	Gruplar (n= 7)					P
	Kontrol	DMSO	EA	NaF	EA+NaF	
<b>LSA (mg/dl)</b>	19.86±0.93 <sup>a</sup>	18.47±2.03 <sup>a</sup>	20.68±2.45 <sup>a</sup>	13.31±1.75 <sup>b</sup>	16.73±1.70 <sup>ab</sup>	< 0.001
<b>MDA (µmol/L)</b>	10.35±0.97 <sup>a</sup>	9.92±1.01 <sup>a</sup>	9.80±1.86 <sup>ab</sup>	12.08±1.61 <sup>b</sup>	10.04±1.32 <sup>a</sup>	< 0.05
<b>GSH (mg/dl)</b>	5.11±0.33 <sup>a</sup>	4.65±0.66 <sup>ab</sup>	4.51±0.41 <sup>b</sup>	2.74±0.35 <sup>c</sup>	4.14±0.48 <sup>ab</sup>	< 0.001
<b>PON (U/L)</b>	130.40±6.14 <sup>a</sup>	132.43±23.74 <sup>a</sup>	137.29±18.27 <sup>a</sup>	95.88±11.06 <sup>b</sup>	122.72±6.69 <sup>a</sup>	< 0.001
<b>Total kolesterol (mg/dl)</b>	156.17±26.85 <sup>a</sup>	128.26±24.09 <sup>ab</sup>	122.89±24.71 <sup>ab</sup>	114.09±24.84 <sup>b</sup>	138.16±16.40 <sup>ab</sup>	< 0.05
<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	134.86±18.59 <sup>a</sup>	112.0±11.02 <sup>a</sup>	116.86±22.12 <sup>a</sup>	95.89±29.22 <sup>b</sup>	97.23±13.05 <sup>b</sup>	< 0.05
<b>HDL (mg/dl)</b>	57.69±14.18 <sup>a</sup>	47.11±9.90 <sup>ab</sup>	40.73±7.49 <sup>b</sup>	41.09±8.42 <sup>b</sup>	40.47±7.51 <sup>b</sup>	< 0.05
<b>VLDL (mg/dl)</b>	26.91±3.84 <sup>a</sup>	22.39±2.19 <sup>ab</sup>	23.37±4.42 <sup>ab</sup>	19.20±5.90 <sup>b</sup>	19.13±2.73 <sup>b</sup>	< 0.05
<b>LDL (mg/dl)</b>	73.74±18.30 <sup>a</sup>	62.74±15.56 <sup>a</sup>	75.97±18.01 <sup>a</sup>	53.34±16.59 <sup>a</sup>	79.23±15.26 <sup>a</sup>	> 0.05
<b>Glukoz (mg/dl)</b>	190.37±29.65 <sup>a</sup>	154.23±17.28 <sup>ab</sup>	100.49±16.77 <sup>bc</sup>	87.71±32.89 <sup>c</sup>	79.24±17.38 <sup>c</sup>	< 0.001
<b>Kalsiyum (mg/dl)</b>	8.06±0.33 <sup>a</sup>	8.10±0.43 <sup>ab</sup>	8.94±0.72 <sup>ab</sup>	7.48±0.23 <sup>b</sup>	8.34±0.98 <sup>ab</sup>	< 0.005

<sup>a, b, c</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılık önemlidir (P<0.001, P<0.005 veya P<0.05)



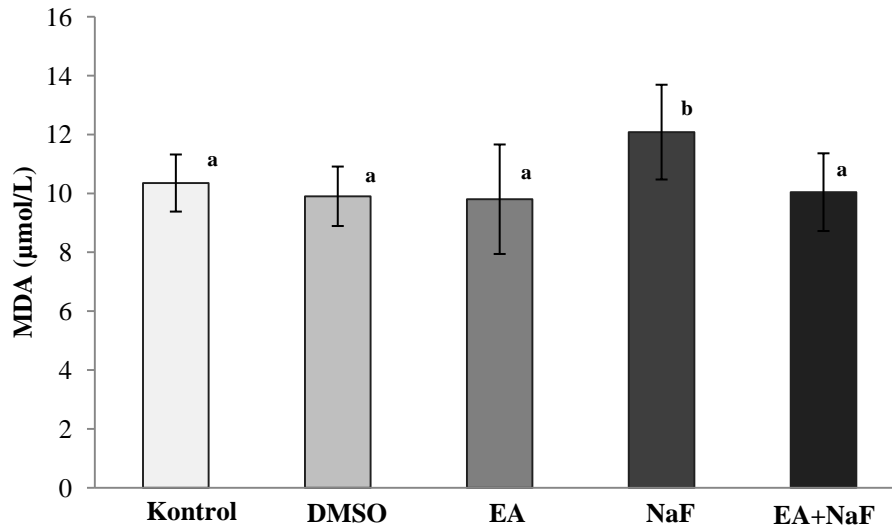
Plazma LSA düzeyinin kontrol grubuna göre NaF ve EA+NaF grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu saptanmış olup, bu azalmanın EA+NaF grubunda daha fazla ( $P<0.001$ ) olduğu tespit edildi (Grafik 3.1).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.001$ )

**Grafik 3.1.** Kontrol ve deney gruplarının plazma LSA düzeyleri

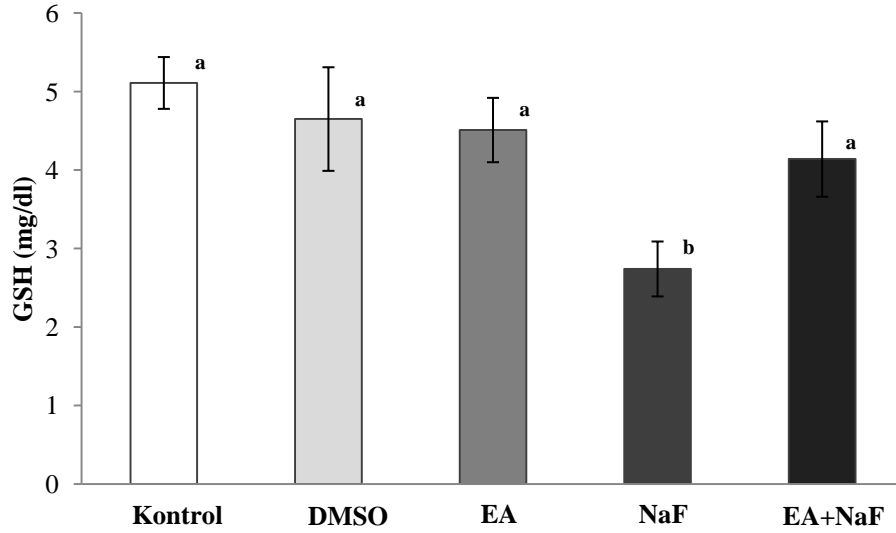
Plazma MDA düzeylerinin NaF grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli derecede artmış ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edildi (Grafik 3.2).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.05$ )

**Grafik 3.2.** Kontrol ve deney gruplarının plazma MDA düzeyleri

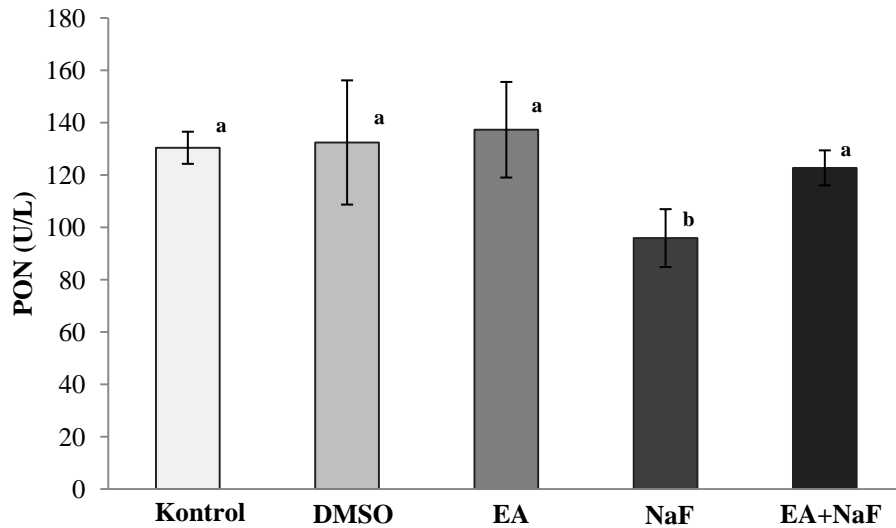
Tam kan GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre NaF grubunda azalmış olduğu tespit edildi ( $P<0.001$ ). EA+NaF grubunda plazma GSH düzeyinin NaF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ( $P<0.001$ ) olduğu belirlendi (Grafik 3.3).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.001$ )

**Grafik 3.3.** Kontrol ve deney gruplarının tam kan GSH düzeyleri

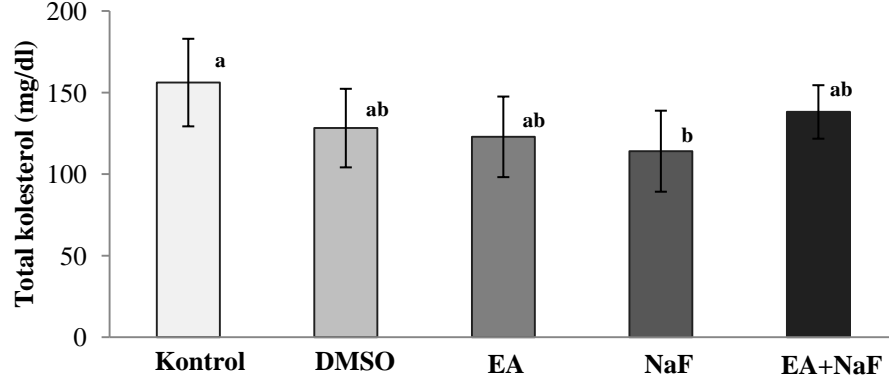
Plazma PON aktivitesinin NaF grubunda diğer 4 gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmış olduğu tespit edildi (Grafik 3.4).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.001$ )

**Grafik 3.4.** Kontrol ve deney gruplarının plazma PON aktivitesi düzeyleri

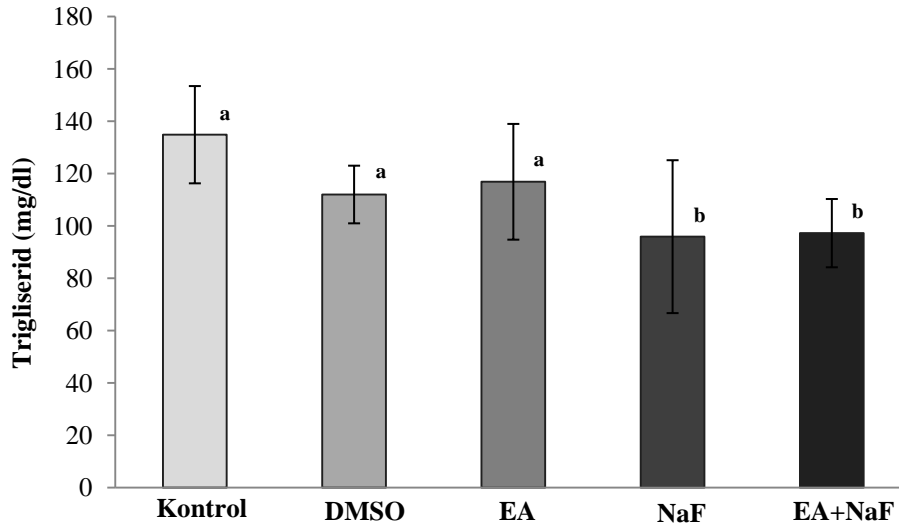
Plazma total kolesterol düzeylerinin kontrol grubu ve diğer gruplara göre NaF grubunda istatistiksel olarak önemli derecede azalmış ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edildi (Grafik 3.5).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.05$ )

**Grafik 3.5.** Kontrol ve deney gruplarının plazma total kolesterol düzeyleri

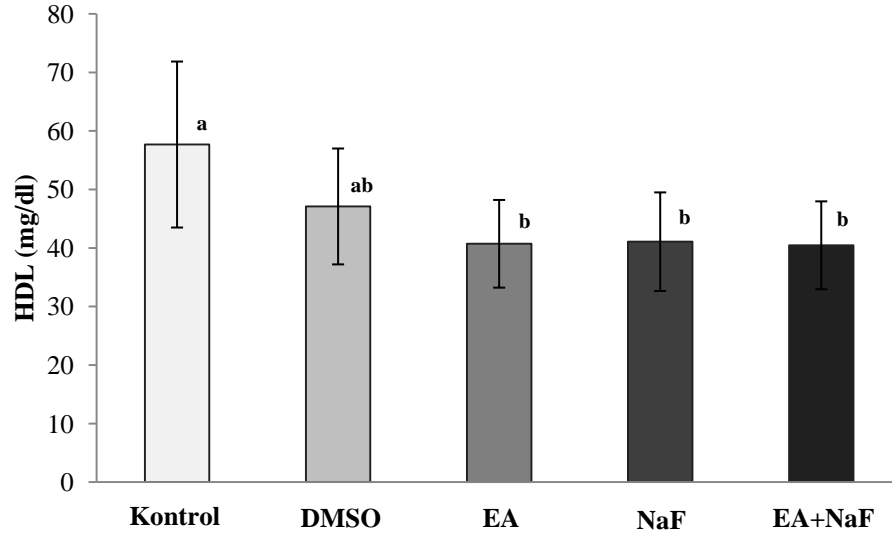
Plazma trigliserit düzeylerinin kontrol grubuna göre NaF ve EA+NaF grubunda azalmış ( $P<0.005$ ) olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.6).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.05$ )

**Grafik 3.6.** Kontrol ve deney gruplarının plazma trigliserid düzeyleri

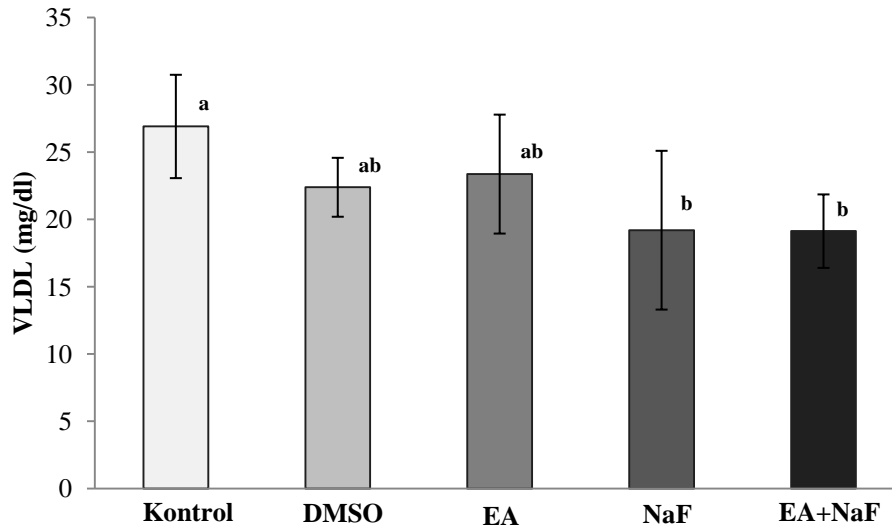
Plazma HDL düzeylerinin kontrol grubuna göre EA, NaF ve EA+NaF gruplarında azalmış ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edildi (Grafik 3.7).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.05$ )

**Grafik 3.7.** Kontrol ve deney gruplarının plazma HDL düzeyleri

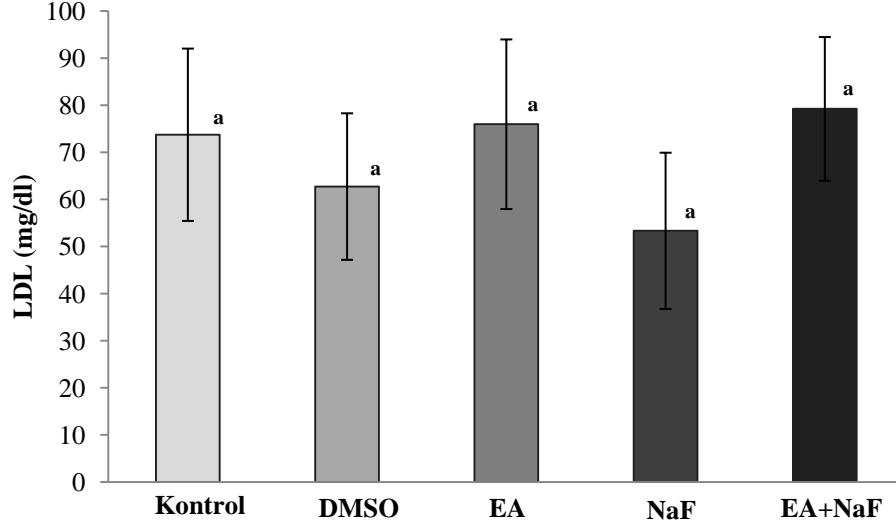
Plazma VLDL düzeylerinin kontrol grubuna göre 8 hafta NaF ve EA+NaF uygulanan gruplarda önemli derecede azalmış ( $P<0.05$ ) olduğu gözlemlenmiştir (Grafik 3.8).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.05$ )

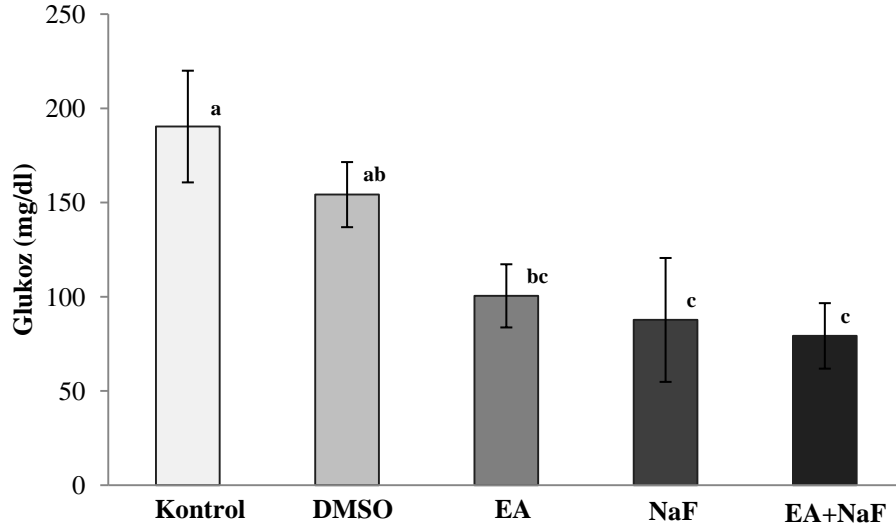
**Grafik 3.8.** Kontrol ve deney gruplarının plazma VLDL düzeyleri

Plazma LDL düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılıklar ( $P<0.05$ ) gösterdiği tespit edilmiş olup, ikili karşılaştırmalarda LDL düzeylerinin herhangi bir grupta diğer bir gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı saptandı (Grafik 3.9).



**Grafik 3.9.** Kontrol ve deney gruplarının plazma LDL düzeyleri

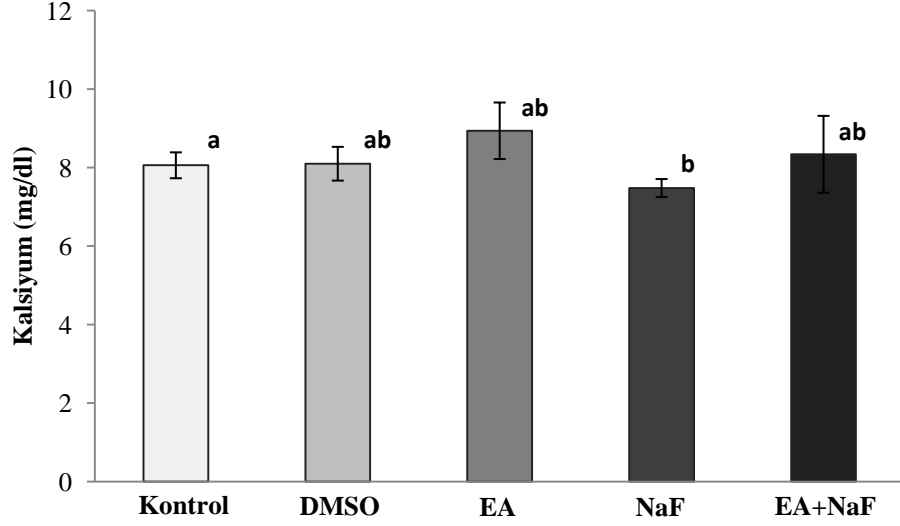
Plazma glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre NaF ve EA+NaF gruplarında istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı ( $P<0.001$ ) tespit edildi (Grafik 3.10).



Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.001$ )

**Grafik 3.10.** Kontrol ve deney gruplarının plazma glukoz düzeyleri

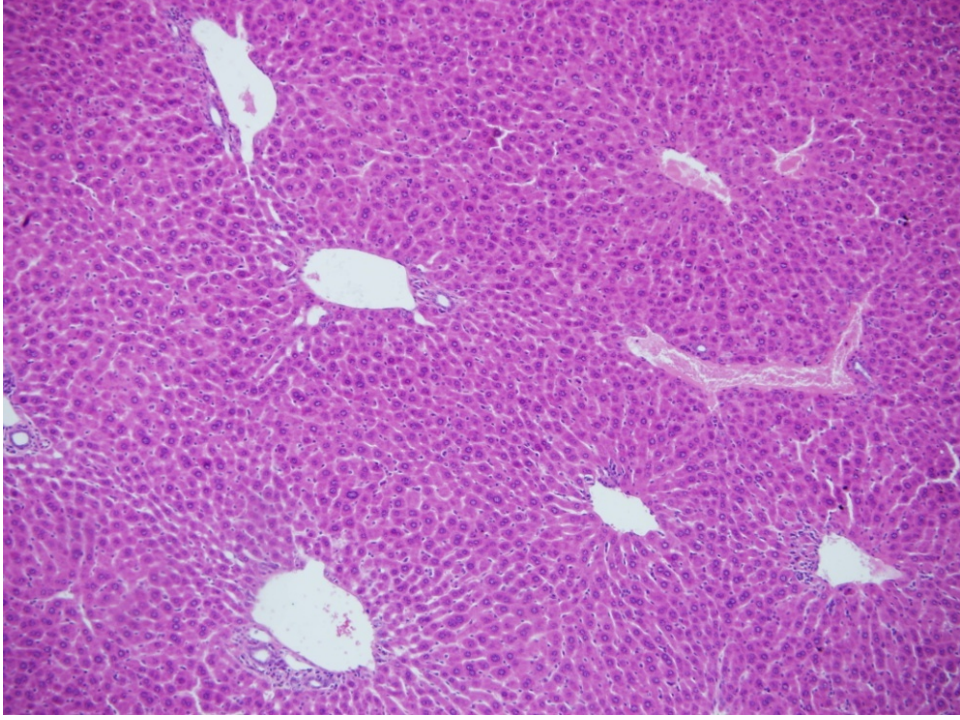
Plazma kalsiyum düzeylerinin kontrol grubuna göre NaF grubunda istatistiksel olarak önemli derecede azalmış ( $P<0.01$ ) olduğu saptandı (Grafik 3.11).



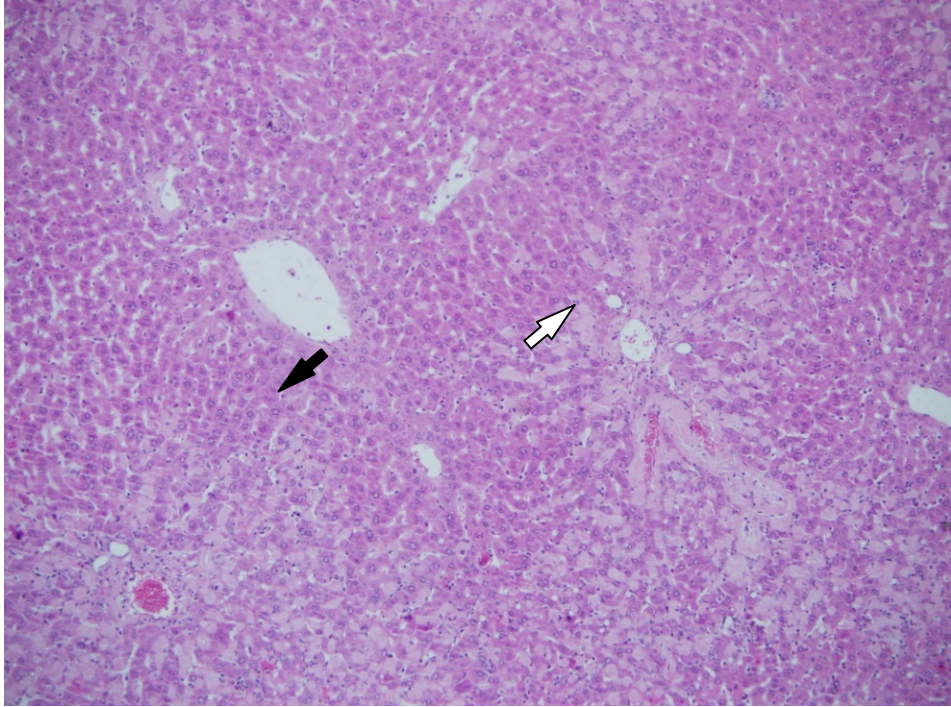
Sütunlar üzerinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $P<0.01$ )

**Grafik 3.11.** Kontrol ve deney gruplarının plazma kalsiyum düzeyleri

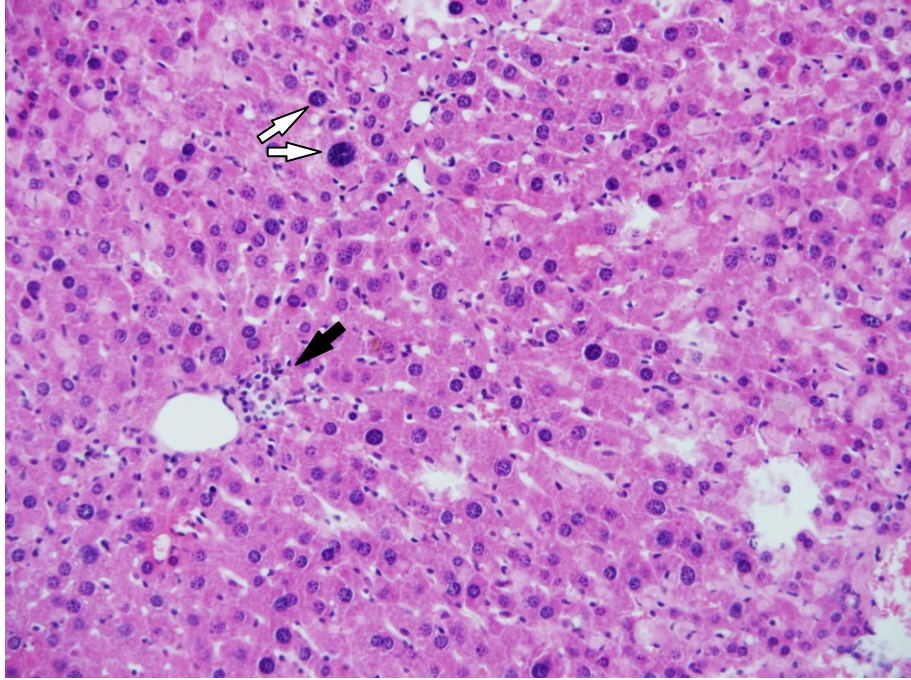
Karaciğer dokularının histopatolojik incelemelerinde kontrol, DMSO ve EA gruplarında herhangi bir patolojik değişikliğe rastlanmamıştır (Resim 3.1). 8 hafta süre ile NaF verilen çalışma grubundaki deneklerin karaciğerinde genel olarak hepatositlerde hidropik ve/veya balonumsu dejenerasyon, periasiner ve midzonal bölgelerde daha belirgin olmak üzere fokal nekrozlar ile sünozoidlerde dissosiasyonlar gözlemlenmiştir (Resim 3.2). Karaciğerde kronik flor toksikasyonuna bağlı olarak bazı hepatositlerin çekirdeklerinde büyüme, çift çekirdek oluşumu, heterokromoz ve piknoz ile parankimde Kupffer hücrelerinde proliferasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının olduğu belirlendi (Resim 3.3). EA+NaF verilen gruplarda ise söz konusu patolojik değişikliklerin sayısında ve şiddetinde azalma olduğu tespit edildi (Resim 3.4.). EA+NaF grubundaki deneklerin karaciğerlerinde periasiner bölgedeki hepatositlerde vakuoller ve yağ dejenerasyonu en belirgin lezyon olarak gözlemlendi (Resim 3.5).



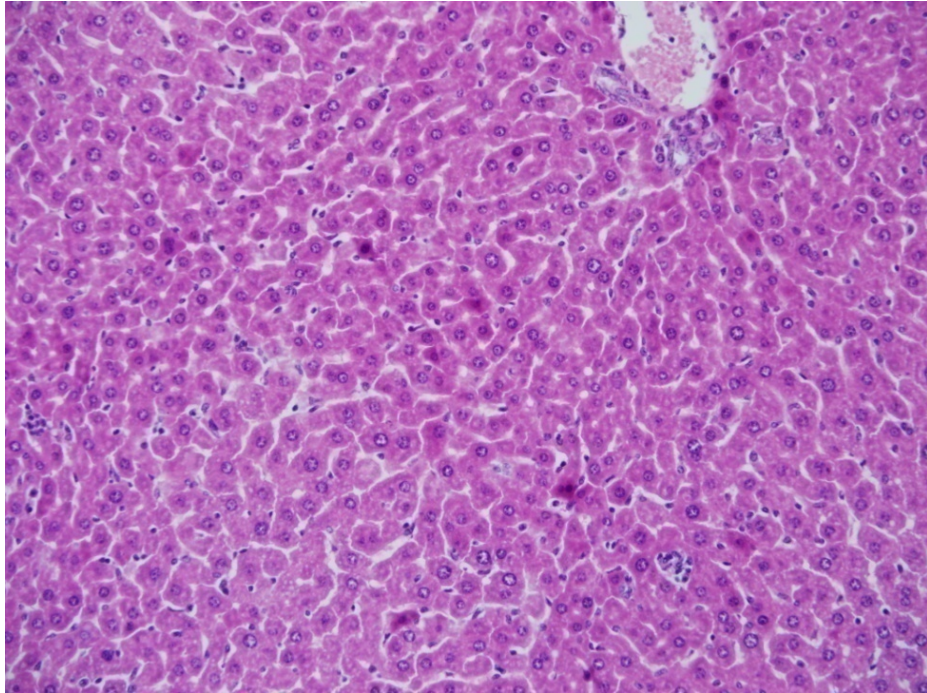
**Resim 3.1.** Kontrol grubu bir fareden 8 hafta sonra alınan karaciğerin görünümü (X20)



**Resim 3.2.** NaF grubundan bir farenin karaciğerinde ödem (beyaz ok ucu) ve dissosiasyon (siyah ok ucu) (X20)

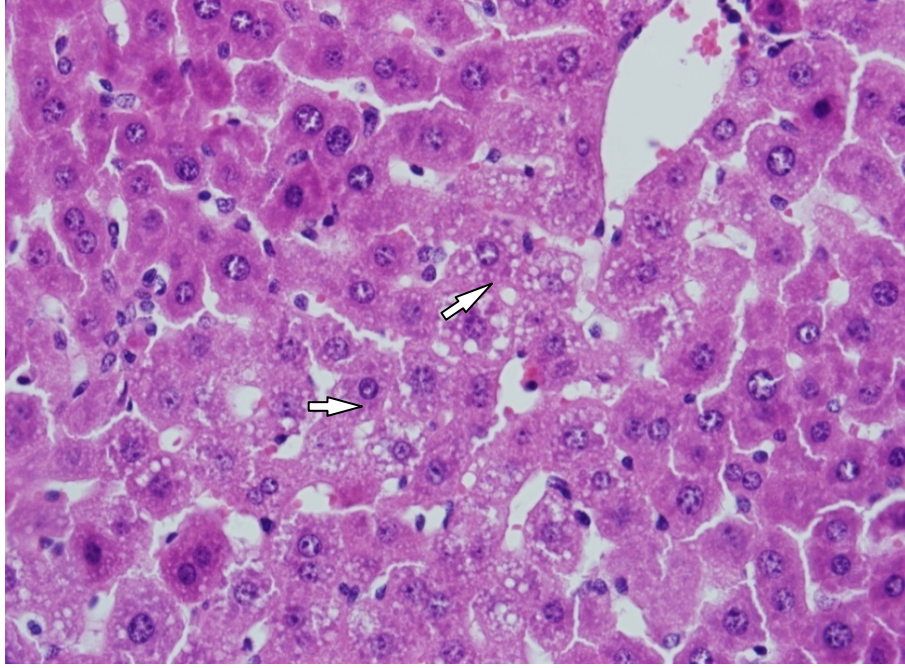


**Resim 3.3.** NaF grubundan bir farenin karaciğerinde hepatositlerde nekroz (siyah ok ucu), bazı hepatositlerde çekirdekte büyüme ve hiperkromazi (beyaz ok uçları) (X40)



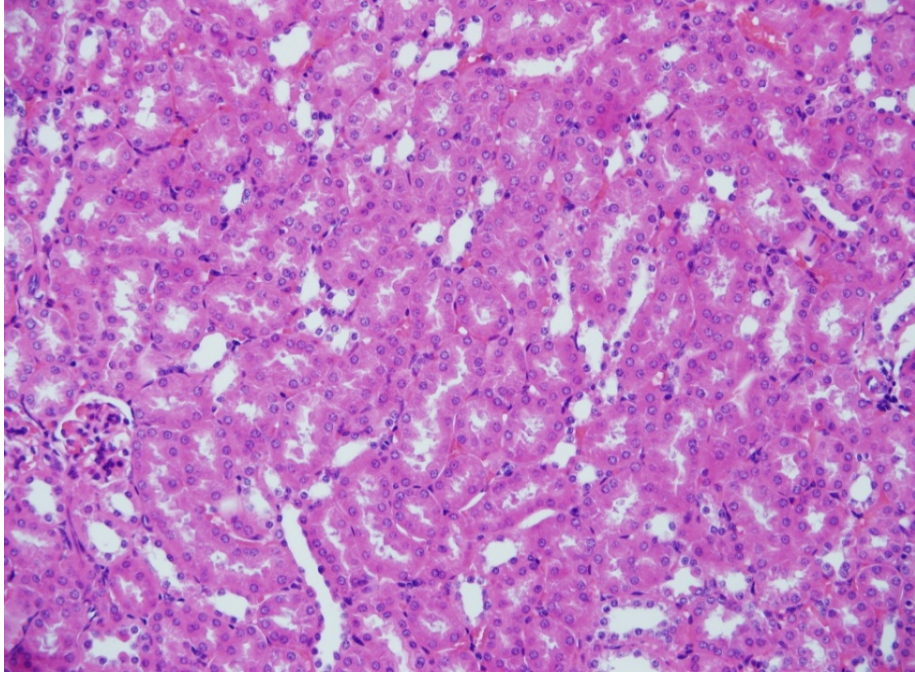
**Resim 3.4.** EA grubundan bir farenin karaciğerinde hafif derecede dejenerasyon (X40)



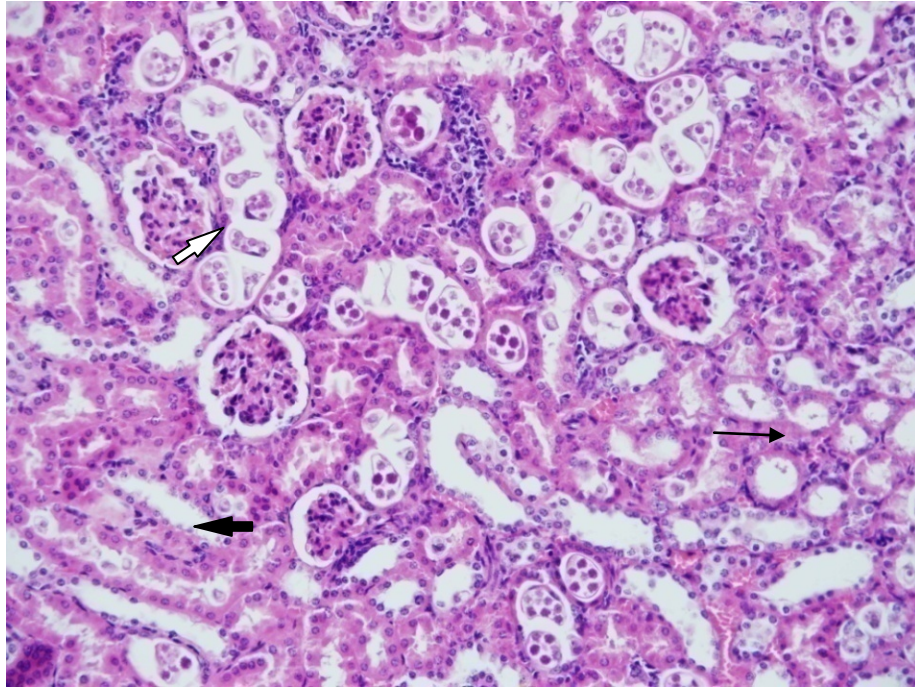


**Resim 3.5.** EA grubundan bir farenin karaciğerinde yağ ve vakuoler dejenerasyon (beyaz ok uçları) (X40)

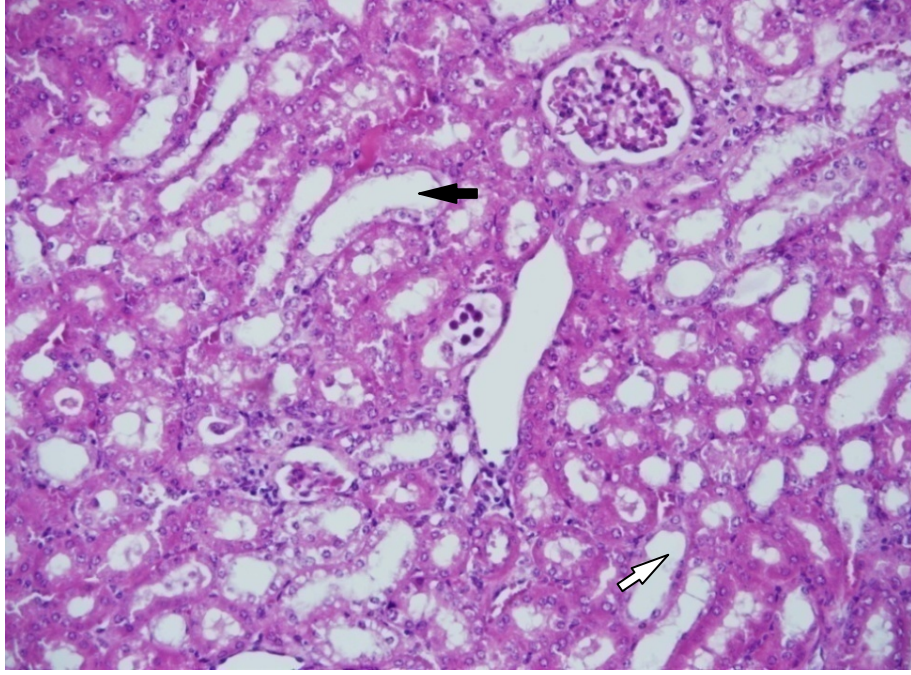
Böbrek dokusunun histopatolojik incelemelerinde kontrol, DMSO ve EA gruplarında organların morfolojik yapısının benzer nitelikte ve normal yapıda olduğu görüldü (Resim 3.6). Çalışmada oral yolla 25 mg/L sadece flor verilen grupta ise daha çok proksimal tübüllerde olmak üzere tüm tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, yer yer nekroz ile tübül lümenlerinde dilatasyon ve hiyalin sislendirlerine rastlandı (Resim 3.7). Flor ile birlikte 10 mg/kg EA verilen grupta flor verilen gruba kıyasla dejenerasyonun şiddetinde azalma olduğu tespit edilirken, bu grupta nekroza ise hiç rastlanmadı (Resim 3.8).



**Resim 3.6.** Kontrol grubu bir fareden 8 hafta sonra alınan böbreğin görünümü (X20)



**Resim 3.7.** NaF grubundan bir farenin böbreğinde proksimal tubül epitellerinde hidropik dejenerasyon (siyah ok ucu), nekroz (siyah ince ok ucu) ile tubül lümenlerinde dilatasyon (beyaz ok ucu) (X20)



**Resim 3.8.** EA+NaF grubundan bir farenin böbreğinde proksimal tubül epitellerinde orta derecede hidropik dejenerasyon (siyah ok ucu), az sayıda nekrotik epitel hücresi ile tubül lümenlerinde dilatasyon (beyaz ok ucu) (X20)

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, deneysel kronik florozis oluşturulan farelerin plazma kalsiyum, glukoz, MDA, LSA, PON aktivitesi ve plazma lipid profilleri ile tam kan GSH düzeylerinde meydana gelebilecek değişiklere karşı güçlü antioksidan özelliği olduğu ileri sürülen EA'nın koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Florozis'li canlıların yumuşak dokularında flor'un tahriş edici,  $Ca^{+2}$ 'u bağlayıcı, çeşitli enzim sistemlerini baskılayıcı etkilerine bağlı olarak şekillenen  $Ca^{+2}$  düzeylerinde ki düşüşler, hücresel oksijen kullanımını azaltmakta ve bunun sonucu çeşitli bozukluklar oluşabilmektedir (41, 48, 200, 234). Kronik florozis'te, yumuşak dokularda ortaya çıkan bozukluklara (akut florozis) ilaveten kemik, böbrek, tiroid bezi, hipofiz, hipotalamus, testis ve dişlerde bozukluklar görülmektedir (6, 27, 173). Kronik flor uygulamalarının dokularda neden olduğu zararın patogenezisinde oksidatif stres ve hücre zararının lipid bileşenlerindeki değişikliklerin önemli olduğu bildirilmektedir (90, 214). Oksidatif strese bağlı olarak hücre membranında çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip olan MDA, kronik hastalıkların etiyopatogenezi ile ilişkili tutulmaktadır (152, 201). GSH ise oksidatif stresin oluşturabileceği hasarın önlenmesi için sentezlenen ve redoks reaksiyonlarında kullanılan hücresel bir antioksidandır (161, 247). MDA ve GSH'ın doku düzeylerinin birlikte değerlendirilmesi, florozis'in oksidan/antioksidan sistem üzerindeki etkileri bakımından kayda değer sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir (152, 161, 173, 201, 247). İçme sularına 8 hafta süre ile 100 mg/L NaF ilave edilen erkek farelerin karaciğer ve böbrek dokusu GSH düzeylerinin azaldığı ve lipid peroksidasyonunun artmış ( $P<0.05$ ) olduğu kaydedilmektedir (173). Ratlara 20 ve 40 gün süre ile oral olarak 25 mg/kg NaF verilmesinin bağırsak dokusu GSH düzeylerini azalttığı, MDA düzeylerini ise artırmış olduğu rapor edilmektedir ( $P<0.05$ ) (41). Yüksek düzeyde flor içeren sulara (7.2-10.7 ppm) kronik olarak maruz kalan insanların kan örneklerinde MDA düzeylerinin yükselmesinden dolayı lipid peroksidasyonun önemli oranda arttığı bildirilmektedir (141). Kronik florozis teşhisi konulan yetişkin erkek bireyler ile (5.5-7 ppm florlu su içen bireyler; plazma F düzeyi=  $0.07 \pm 0.001$  ppm) sağlıklı bireylerin (1 ppm'den düşük miltarda su içen bireyler; plazma F

düze yi=  $0.26 \pm 0.004$  ppm) kan değerlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, kronik florozis'li bireylerin plazma MDA düzeylerinin önemli düzeyde ( $P<0.001$ ) artmış olduğu belirtilmektedir (113). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada flor konsantrasyonu ile kan GSH düzeyleri arasında negatif bir korelasyon ilişkisinin olduğu tespit edilmiş olup ( $r= -0.826$  ile  $-0.628$  arası), buna karşın flor konsantrasyonu ile MDA düzeyleri arasında pozitif ( $r= 0.846$  ile  $0.662$  arası) bir korelasyon ilişkisi bulunduğu ifade edilmektedir (138). Yine 16 hafta boyunca içme sularına 25 ppm/rat/gün dozunda flor verilen ratlarda lipid peroksidasyonun arttığı, GSH düzeylerinin ise azaldığı bildirilmektedir (208). Daha önce yapılan birçok çalışmada, yüksek oranda flora maruz kalan canlılarda MDA düzeylerindeki artış ile GSH düzeylerindeki azalmaların, florozis'in serbest radikal üretimini artırmasından ve antioksidan enzim aktivitelerini ise azaltmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (103, 104, 113, 173, 208).

Yapılan bu çalışmada NaF grubu farelerin tam kan GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı ( $P<0.001$ ) ve plazma MDA düzeylerinin ise artmış ( $P<0.05$ ) olduğu belirlendi. EA+NaF grubu farelerin tam kan GSH düzeylerinin sadece NaF uygulaması yapılan gruba göre arttığı ( $P<0.001$ ), buna karşılık plazma MDA düzeylerinin ise azaldığı ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir. EA için çözücü madde olarak kullanılan % 0,02'lik DMSO verilen grupta ise tam kan GSH ve plazma MDA düzeylerinin hem kontrol hemde sadece EA verilen farelere ait tam kan GSH ve plazma MDA düzeylerine yakın olduğu belirlendi. Elde edilen bu bulgular kronik florozise neden olan flor'un canlı hücreler için oksidatif stres kaynağı olduğu ve antioksidan savunma sistemini olumsuz yönde etkilediğine işaret etmekte ve bulgularımız diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (28, 47, 103,104, 138). Çalışmamızda florozis'li hayvanlarda azalan GSH ve artan MDA düzeylerine bağlı olarak, florozis'in, serbest radikal üretimini üzerinde artırıcı ve antioksidanlar üzerinde ise azaltıcı etkilerinin olduğu düşüncesini paylaşmaktayız (28, 41, 113, 138, 173). Ayrıca, azalan GSH ve artan MDA düzeylerinin, florozis'te fagositotik hücrelerin immün yanıtı esnasında oluşan solunum patlamasından dolayı aşırı düzeylerdeki reaktif oksijen rnlerinin ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$  vb.) katılmış oldukları redoks reaksiyonları ile ilgili olabileceği düşüncesine katılmaktayız (56, 204).

Yapılan çalışmalarda PON1, GSH ve HDL gibi antioksidan moleköl düzeyleri ile florozis arasında negatif bir korelasyonun olduğu ve bu ilişkinin florozis'te oluşan yüksek düzeylerdeki serbest radikal üretimine bağlı olduğu rapor edilmektedir (14, 41, 138, 175, 208). PON1'in serbest haldeki sistein amino asiti, substratın tanınması ve bağlanması için gerekli olup, tiyol grubu taşıyan 284. pozisyonundaki sistein amino asitinin lipid peroksidasyonunun engellenmesi bakımından önemli bir fonksiyona sahip olduğu bildirilmektedir (12, 203). PON1'in antioksidatif etkisi ile serbest tiyol grubu miktarının orantılı olduğu ileri sürülmektedir (107). Ayrıca, plazmada PON1'in güçlü oksidatif özelliklere sahip moleköl ya da atomlara karşı HDL'ye bağlı bir şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi hidrolize etme ve peroksidaz benzeri önemli bir aktivite gösterdiği bildirilmektedir (15). Bu çalışmada kronik florozis oluşturulan grupta kontrol ve diğer gruplara göre artmış olan MDA düzeylerinin plazma PON aktivitesi ile negatif korelasyon (r= -468, P<0.05) gösterdiği tespit edildi. Yapılan birçok çalışmada, aşırı miktarda flor iyonu alan organizmalarda oksidatif stresin meydana geldiği bildirilmekte olup, florozis'te bir antioksidan olarak nitelendirilen PON1'in plazmada tespit edilen azalan düzeyleri nedeni ile oksidatif stresin PON aktivitesi üzerinde negatif yönde bir etkiye sahip olabileceği kanısını paylaşmaktayız (14, 104, 138, 173, 208). Ayrıca, çalışmamızda NaF grubu farelerin plazma PON aktivitesi ve Ca<sup>+2</sup> düzeylerinin kontrol ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı saptanmış olup, plazma PON aktivitesi ve Ca<sup>+2</sup> düzeyleri arasında pozitif (r= 0.390, P<0.05) korelasyon ilişkisi olduğu belirlendi. Bu nedenle plazmada HDL'ye bağlı PON1 enziminin stabilitesi ve aktivitesi için Ca<sup>+2</sup>'nin gerekli olduğu fikrini paylaşmaktayız (16).

İdrarda ve plazmada EA ve fenolik bileşiklerin metil, glukuronil ve sülfat grupları ile konjuge formlarının bulunduğu bildirilmektedir (77, 205). Metabolik olarak EA'dan sülfat konjugasyonlarının oluşturulabilmesi nedeniyle GSH sentezine katkıda bulunan sistin konsantrasyonunda ortaya çıkabilecek düşüşler dolaylı olarak GSH düzeylerini de etkileyebilir (205). Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi pentoz fosfat metabolik yolunda kolesterolün sentezi, glutatyonun indirgenmesi ve detoksifikasyon reaksiyonlarında kullanılacak olan NADPH'ların üretilmesi bakımından önemlidir (166, 246). Flor iyonunun pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzim düzeyini azaltmakta olduğu kaydedilmektedir

(37). Çalışmamızda elde edilen total kolesterol ve GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyasla kronik florozis oluşturulan grupta azalmış olmasına karşılık EA+NaF grubunda tekrar kontrol grubuna yakın bir seviyeye yükselmiştir. Bu sonuca göre, deney gruplarına kronik flor maruziyeti ile eşzamanlı olarak EA verilmesinin, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi inhibisyonunda olduğu gibi pentoz fosfat metabolik yolunda meydana gelen aksaklıkların giderilmesinde önemli ölçüde yararlı olabileceği kanaatini taşımaktayız (37).

Kalsiyum metabolizması, kalsiferol, parathormon ve kalsitonin hormon sistemi tarafından düzenlenmektedir. Bu hormonların sentezlendiği vücut kısımlarında oluşabilecek herhangi bir aksaklık aynı zamanda  $Ca^{+2}$  dengesinde bozukluklara neden olabilmektedir (181). Florozis’li canlılarda serum  $Ca^{+2}$  düzeyleri ile birlikte  $Na^{+2}$  ve  $K^{+}$  gibi diğer elektrolit düzeylerinde de değişiklikler meydana gelmektedir. Flor’un plazma  $Ca^{+2}$  düzeyleri üzerine olan esas etkisi, solid  $Ca_{10}F_2(PO_4)_6$  veya  $CaF_2$  oluşumunu hızlandırmasından kaynaklanmaktadır (23, 237). Kronik florozis’in yüksek organizasyonlu canlıların arter ve böbrek dokularında kalsifikasyonlar oluşturarak normal vücut metabolizmasında değişiklikler meydana getirdiği bildirilmektedir (220, 218). Günlük 10 mg/kg NaF verilerek kronik florozis oluşturulan tavşanlar ile ilgili yapılan bir çalışmada, kronik florozis’in aortik kalsifikasyonlara neden olduğu belirtilmektedir (220). Yine ratlara 35 mg/kg NaF verilerek yapılan bir çalışmada, flor’un renal kalsifikasyon oluşturduğu kaydedilmektedir (218). Endemik florozis görülen bireyler ile ilgili yapılan bir çalışmada ise sağlıklı bireylerin  $Ca^{+2}$  düzeylerinin ( $9.58 \pm 0.45$  mg/dL) florozis’li bireylerin  $Ca^{+2}$  düzeylerine ( $5.95 \pm 0.14$  mg/dL) göre yüksek miktarda olduğu rapor edilmektedir (170). Çalışmamızda kontrol grubu ve sadece NaF verilen kronik florozis’li grubun plazma  $Ca^{+2}$  düzeyleri sırasıyla  $8.06 \pm 0.33$  ve  $7.48 \pm 0.23$  mg/dL olarak belirlendi. NaF grubu farelerin plazma  $Ca^{+2}$  düzeylerinin kontrol ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmış olduğu tespit edildi ( $P < 0.005$ ). Yine plazma  $Ca^{+2}$  düzeylerinin EA grubu farelerde diğer gruplara göre yüksek konsantrasyonda olduğu belirlendi. Florozis’te elde ettiğimiz  $Ca^{+2}$  düzeyleri ile ilgili olan bulgularımız, florozis’te düşük  $Ca^{+2}$  düzeylerinin tespit edildiği çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (23, 170, 237).

EA ile ATPaz enzimi arasındaki ilişkinin araştırılmış olduğu bir çalışmada, EA'nın kardiyak sarkoplazmik retikulum ve iskelet kası hücrelerinin  $Ca^{+2}$  pompaları üzerinde uyarıcı etkileri olduğu kaydedilmektedir (7, 21). Yapılan başka bir çalışmada kalp kası hücrelerinde  $Ca^{+2}$ 'un, bir ATPaz olan fosfolambanın baskılayıcı etkisinin EA tarafından engellenmesiyle daha fazla tutulabileceği belirtilmektedir (21). Aynı çalışmada yüksek dozlarda tannik asit ya da kuersetin gibi fenolik bileşiklerin ATPaz üzerinde inhibitör etkisi oluşturmasına karşılık EA'nın böyle bir etki göstermesi olasılığının zayıf olduğu da ileri sürülmektedir (21, 43, 165). EA'nın kronik florozis'te  $Ca^{+2}$  pompaları üzerinde uyarıcı etki göstermesine bağlı bir mekanizma ile flor iyonu tarafından hücre dışı ortamda  $CaF_2$  formunda bulunan  $Ca^{+2}$ 'un, hücrelerde tutularak kullanıldığı ileri sürülmektedir (7, 21). Elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri sonucu kronik florozis'te azalan plazma  $Ca^{+2}$  düzeyleri üzerinde EA'nın koruyucu özellik gösterebileceği ve  $Ca^{+2}$  suplementasyonlarının yapılması gibi farklı metotlara dayanılarak daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği kanaatini taşımaktayız (7, 21).

SA düzeyleri ile hücrel hasarların şiddeti arasında paralel bir ilişki olduğu ve yangı, miyokard infarktüsü, kanser ve diğer hastalıkların teşhisinin yapılmasında LSA düzeylerinin belirlenmesinin özel bir klinik önemi bulunmaktadır (121, 125). Birçok hastalıkta SA düzeylerinin artmakta olduğu bildirildiği halde florozis'te bu durumun farklılık gösterebileceği yönünde çalışmalar da bulunmaktadır (46, 58, 111). Florotik bölgelerde 2.4, 5.6 ve 13.6 ppm seviyelerinde flor iyonuna maruz kalan bireylerin serum SA düzeylerinin 1.5 ppm'den daha aşağı seviyelerde flor iyonu alan bireylere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir (91). İçme sularına 40 mg/L NaF eklenen tavşanların serum total SA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda ( $P<0.001$ ) azaldığı rapor edilmektedir (58). Hem insanlarda hem de hayvanlarda florozis'in erken tanısında dolaşımdaki serum SA düzeylerinin önemli olduğu ve florozis'te serum SA düzeylerinin sağlıklı bireylere göre % 50 oranında azalabileceği kaydedilmektedir (110). Erkek farelerde 30 gün oral 10 mg/kg/gün flor toksikasyonunun üreme sisteminde SA düzeyleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, serbest SA düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli oranda ( $P<0.01$ ) azalmış olduğu kaydedilmekte olup ayrıca flor iyonunun toksik etkilerine karşılık 30 gün 2  $\mu$ g/gün/fare dozunda antioksidan özellikte E



vitamini uygulamasının SA düzeylerini önemli oranda ( $P<0.01$ ) arttırdığı bildirilmektedir (46). Aynı çalışmada, yüksek flor iyonu konsantrasyonuna maruziyette SA düzeylerindeki azalmanın sebebi, kofaktör olarak  $Mg^{+2}$  veya  $Ca^{+2}$  gibi metal iyonlarına gereksinim duyan enzim (fosforilaz, ATPaz, glikolizis enzimleri vb.) aktivitelerindeki inhibisyonlara bağlanmıştır. Çalışmamızda NaF grubu farelerin plazma LSA düzeylerinin, EA+NaF grubuna göre daha düşük ( $P<0.001$ ) olduğu belirlendi. Kronik florozis grubunda kontrol grubuna göre azalmış olan LSA düzeyleri ile ilgili olan bulgularımız, florozis ve SA düzeylerinin araştırıldığı diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (46, 58, 91, 110). SA'ların biyosentezinde glukoz ve amino grubu vericisi kullanılmasının yanı sıra mannozamin-6-fosfatın fosfoenol pirüvat ile kondenzasyonu ve aktif enolazın katalize ettiği reaksiyonlar gerekli basamaklardır (228). Plazma LSA düzeylerindeki azalmaların SA ve konjugatlarının biyosentez hızında meydana gelen aksaklıklardan kaynaklanabileceği bildirilmektedir (215). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda flor iyonunun glikolizde, 2-fosfogliseratı fosfoenol piruvata katalize eden enolaz enzimini inhibe ettiği belirtilmektedir (134, 240). Enolazın inhibisyonunun in vivo olarak 2,28 mg/L düzeyindeki flor iyonu ile sağlanabileceği kaydedilmektedir (115, 240). Elde edilen bulgulara göre, florozis'te enolaz enziminin baskılanmış olması nedeni ile LSA biyosentez reaksiyonlarında aksaklıkların olabileceği düşüncesini taşımaktayız. Çalışmamızda kronik florozis oluşturulan farelerde LSA ve glukoz düzeylerinin azalmış olması ve bu düzeyler arasında pozitif korelasyon ( $r= 0.399$ ,  $P<0.05$ ) ilişkisi bulunmasının kronik florozis'li canlılarda SA biyosentezi bakımından dikkate değer bir bulgu olduğu kanaatini taşımaktayız. EA+NaF grubu farelerin plazma LSA düzeylerinin NaF grubu farelere göre daha yüksek düzeyde bulunmuş olması ise antioksidan özelliğe sahip olan EA'nın LSA sentezinde önemli fonksiyonlara neden olabileceğini düşündürmektedir (46).

Serum lipoproteinleri ve glikolipidler, metabolik fonksiyonlarını sürdürebilmek için hem moleküler hem de hücresel düzeyde SA'lara gereksinim duymaktadırlar (172). Plazma apolipoproteinlerinin büyük bir kısmının yapısında SA grubu bulunması nedeniyle vücuda gereğinden fazla miktarda alınan reaktif maddelerin bu molekülleri belirgin bir şekilde etkileyebileceği bildirilmektedir (53, 145). HDL'nin yapısında bulunan apo A-II, sadece bir veya iki SA grubu taşımakta olup, HDL'nin bu orandaki

SA düzeyinin, yapısında bulunan total karbonhidrat kısmının % 1'den daha az bir kısmını oluşturduğu kaydedilmektedir (144). LDL'nin yapısında bulunan apo B'ye ait SA gruplarının ise LDL'nin total karbonhidrat kısmının yaklaşık % 10'unu oluşturduğu belirtilmektedir (222). Çalışmamızda florozis'li farelerin plazma LSA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı saptanmış olup, LSA düzeyleri ile HDL'nin yapısında bulunan plazma PON aktivitesi ve glukoz düzeyleri arasında pozitif korelasyon (sırasıyla  $r = 0.399$ ;  $r = 0.386$ ;  $P < 0.05$ ) olduğu belirlendi.

Yapılan bir çalışmada içme sularında 5 ve 50 ppm NaF bulunan ratların 60 günlük kronik flor maruziyeti sonrasında, böbrek dokusunda aldehit redüktaz (ALR) veya 3-deoksiglukozon redüktaz (3-DG-redüktaz) olarak tanımlanan enzimin sentezinin 50 ppm NaF uygulanan hayvanlarda baskılanmakta olduğu bildirilmektedir (134). Bu enzim, glukoz veya fruktozun protein ya da lipidler gibi organik bileşiklere bağlandığı glikozilasyon, proteinlerin polimerizasyonu ve Maillard reaksiyonlarında 3-deoksiglukozonun (3-DG) NADPH bağımlı redüksiyonunu katalize etmektedir (224). Nonenzimatik olarak oluşan glikozilasyon ürünlerinin birikimine sebep olan 3-deoksiglukozon, detoksifiye edilmez ise düzeylerinin artması nedeniyle ortaya çıkan renal hasar sonucunda komplikasyonların gelişebileceği de bildirilmektedir (229). Çalışmamızda, kronik florozis grubu farelerde azalan plazma LSA düzeylerinin, bu gruptaki hayvanlarda bulunan aldehit redüktazın 3-deoksiglukozonu detoksifiye ettiği reaksiyonlara benzer detoksifikasyon mekanizmalarında fonksiyonu olan enzimlerin baskılanması sonucu SA'lar ile lipidlerin glikozilasyonu oranının düşmesiyle de ilgili olabileceği düşüncesini paylaşmaktayız (134, 224).

Birçok araştırmacı tarafından hem deneysel florozis'in oluşturulduğu hem de endemik florozis'li alanlarda yapılan çalışmalarda lipid metabolizması ile ilgili olan bulgular oldukça sınırlı olup, bu sonuçların birbirleri ile çelişkili oldukları görülmektedir (44, 67, 100, 175, 238). Domuzlar üzerinde yapılan çalışmalarda flor toksikasyonun ilk fazında serum kolesterol ve total lipid düzeylerinin azalmış olduğu bildirilmektedir (67, 238). Yapılan bir çalışmada, yüksek flor konsantrasyonuna maruz kalan ratlardan alınan serum örneklerinin lipoprotein düzeylerinde azalmalar

olmasına karşılık, kolesterol düzeylerinde artmalar olduğu belirtilmektedir (175). Endemik florozis görülen koyunlarda da serum kolesterol düzeylerinin artmış olduğu rapor edilmektedir (160). Chinoy ve ark. (44) ise ratlarda NaF maruziyetinin lipid düzeyleri üzerine önemli bir etkisi olmadığını bildirmektedirler. Başka bir çalışmada ratlara 20 mg/kg/gün NaF verilmesi sonucunda kontrol grubuna göre kronik florozis'li grubun serum HDL düzeylerinin azalmasına karşılık LDL düzeylerinin artmış olduğu ifade edilmektedir (175). Doğal florozis'li koyunlarda (idrara flor düzeyi  $48.7 \pm 10.6$  ppm) yapılan bir çalışmada florozis'in serum total trigliserid, total kolesterol, VLDL ve LDL düzeylerinde artışa neden olmasına karşılık, HDL değerlerinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı bildirilmektedir (76). Yine florozis'li sığırların kolesterol düzeylerinde azalma olduğu rapor edilmektedir (100). Kronik flor maruziyetinde değişen serum kolesterol ve trigliserid düzeylerinin özellikle trigliserid lipaz ve bazı spesifik olmayan esterazların enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (154, 175). Bir esteraz olan PON1, lipid metabolizmasında lipoproteinleri oksidasyondan koruyan,  $Ca^{+2}$  düzeylerine duyarlı ve HDL'yi bağlayan bir enzimdir (68). Lipid peroksitleri ve  $H_2O_2$  gibi potent oksidan yapıları enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanabilme özelliği taşımaktadır (14, 148).  $H_2O_2$  özellikle aterogenezis sırasında arter duvarı endotelinde oluşan major bir reaktif oksijen bileşikler türü olup, LDL oksidasyonuna yol açarak daha potent oksidatif ürünlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu sebeple PON1'in  $H_2O_2$ 'i hidrolize edebilmesi, özellikle potent oksidan yapıların ortadan kaldırılmasında önemlidir (148). Serum kolesterol düzeylerinin artması nedeni ile LDL'nin daha hızlı bir şekilde okside olabileceği ve buna bağlı olarak PON aktivitesinin de azalacağı kaydedilmektedir (36). Aviram ve ark. (12) p-hidroksimerkuribenzoat (PHMB) ve iyodoasetat gibi PON1 inhibitörlerinin LDL oksidasyonunu artırıcı etkilere neden olduklarını belirtmektedirler. LDL oksidasyonundaki artış, PON inhibitörleri ve lipid peroksitlerin varlığında enzimin serbest sülfidril gruplarındaki azalmaya bağlanmıştır. Çalışmamızda PON aktivitesinin NaF grubunda azaldığı, EA+NaF grubunda ise sadece NaF uygulaması yapılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı belirlendi ( $P < 0.001$ ). Elde ettiğimiz bulgular ışığında florozis'li canlılarda EA'nın,

PON aktivitesinin korunmasında önemli bir fenolik bileşik olabileceği kanaatine varıldı.

Fenolik bir bileşik olan EA, oksijen ve hidroksil radikalleri ile birlikte lipid peroksidasyonuna karşı antioksidatif özellik göstermektedir (102, 195). Diyetle bulunan fenolik bileşiklerin, makrofajlar aracılığıyla meydana gelen LDL oksidasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmektedir (61). Doğal olarak oluşan kateşinin arterial hücre duvarında  $Cu^{+2}$  ile oluşan LDL oksidasyonunu inhibe ettiği kaydedilmektedir (158). Ratlarda alkol ile başlatılan toksisite esnasında uygulanan EA'nın  $Zn^{+2}$  seviyelerini artırdığı fakat  $Cu^{+2}$  seviyelerini azalttığı bildirilmektedir (63). Kolestatik ratlarda yapılan bir çalışmada EA'in karaciğer, serum  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  seviyeleri üzerinde modülatör bir etkiye sahip olduğu belirtilmekte olup, bu nedenle EA'in kemoprotektif bir ajan olarak etkili olabileceği öngörülmektedir (92). Doğal bir antioksidan olan vitamin C suplementasyonunun da PON aktivitesini artırdığı rapor edilmektedir (108). Jesup ve ark.'nın (109) yaptıkları bir çalışmada ise LDL oksidasyonunun, endojen lipofilik antioksidanların (vitamin E,  $\beta$ -karoten ve likopen vb) azalmasından sonra başladığı bildirilmektedir. Yine EA'nın, sıçan karaciğer mikrozomal sistemlerinde lipid oksidasyonunu önlediği, ancak LDL oksidasyonuna karşı zayıf bir inhibitör olduğu belirtilmiştir (168). Yapılan başka bir çalışmada serum PON aktivitesinin HDL ve  $Ca^{+2}$  düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği, PON1 ve HDL'nin antioksidatif etkilerinin  $Ca^{+2}$  bağımlı reaksiyonlara ihtiyaç duyduğu kaydedilmektedir (16). Çalışmamızda plazma PON aktivitesi ile  $Ca^{+2}$  düzeyleri arasında pozitif ( $r= 390$ ;  $P<0.05$ ) korelasyonun olduğu belirlenirken, PON aktivitesi ve HDL düzeyleri arasında benzer bir ilişkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. EA verilen farelerin plazma HDL, LDL ve VLDL düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak farklar tespit edilmemiştir. Bunun PON1'in bazal ve arilesteraz aktivitelerine ilaveten farklı özgülükte laktonaz aktivitesine sahip olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz (68). EA, kimyasal yapısında iki lakton halkası bulundurması sebebiyle serbest halde iken hidrojen tutucu özellikte olup (17), yine bu yapısı sebebiyle kan dolaşımında laktonaz aktivitesi de gösteren PON1 tarafından hidrolize edilebilmektedir (68). Ayrıca, EA'nın glukuronil konjugatları halinde vücuttan atılmasına bağlı olarak lipolitik reaksiyonları artıran bir etkinin oluşabileceği kanısını taşımaktayız (205).

Florotik bireylerde ve deneysel akut florozis'te adrenal medulladan epinefrin sekresyonu uyarılmakta ve serum katekolamin düzeylerinin artmakta olduğu bildirilmektedir (164, 170). Birkner ve ark.'nın (26) yapmış oldukları bir çalışmada 50 günlük uygulama sonrası alınan kan örneklerinde serum glukoz konsantrasyonunun önemsiz oranda artmış olduğu kaydedilmektedir. 17 gün süre ile diyetlerinde 450 ppm NaF bulunan ratlar ile yapılan bir çalışmada ise karaciğer glukoz düzeylerinin flor verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı bildirilmektedir (211). Motta ve ark. (174) tarafından 10 mg/kg NaF enjeksiyonu yapılan deney grubu ratlarından 1, 3, 6 ve 12 saat sonra alınan kan örneklerinin glukoz düzeylerinin sırasıyla  $108.42 \pm 8.40$ ,  $101.38 \pm 11.51$ ,  $78.00 \pm 5.16$  ve  $67.78 \pm 3.97$  mg/dL olduğu, sadece NaCl enjeksiyonu yapılan kontrol grubu ratlarından 1, 3, 6 ve 12 saat sonra alınan kan örneklerinin glukoz düzeylerinin ise sırasıyla  $74.82 \pm 6.38$ ,  $72.75 \pm 4.89$ ,  $74.00 \pm 4.90$  ve  $65.98 \pm 1.03$  mg/dL olduğu bildirilmektedir. Kısa süreli uygulama yapılan bu çalışmada 1. ve 3. saatler sonrasında kan glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre NaF verilen grupta hızla artmasının ( $P < 0.01$ ) sebebi, flor iyonunun submandibular bezlerde ilerleyerek adenil siklazı aktive etmesine bağlanmıştır (174). Çalışmamızda deneysel kronik florozis oluşturulmuş ve EA verilen gruplarda bulunan farelerin plazma glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük ( $P < 0.001$ ) olduğu tespit edildi. Gözlemlenen hipoglisemi durumu, flor'un glukoz düzeyleri üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalar ile uyum göstermektedir (18, 174, 211).

Enerji metabolizması bakımından enolaz ve piruvat dekarboksilaz enzimlerinin flor iyonu tarafından inhibisyonu ile glikoliz ve sitrik asit döngüsü bloke olabileceği için vücutta enerji dengesi ve glukoz kullanımının yeniden düzenlenmesi gerekebilmektedir (134, 240). İçme sularında 60 gün süre ile 50 ppm flor iyonu verilen ratlarda, sitrik asit döngüsünde fonksiyonu olan oksaloasetat düzeylerinin azaldığı ve oksaloasetat sentezinin piruvat dekarboksilaz enziminin baskılanması nedeniyle engellenmiş olabileceği belirtilmektedir (134). Çalışmamızda plazma glukoz düzeyleri ile HDL, VLDL ve trigliserid düzeyleri arasında yüksek pozitif (sırasıyla  $r = 0.539$ ;  $r = 0.552$ ;  $r = 0.550$ ;  $P < 0.01$ ) bir korelasyon ilişkisi bulunduğu saptanmış olup, kronik florozis'te glukoz ve lipid parametrelerindeki (HDL, VLDL

ve trigliserid) azalmaların glukoz ve enerji kaynaklarının kullanımı ile ilgili metabolik değişiklerden kaynaklanabileceği fikrini paylaşmaktayız (74, 237).

Flor iyonunun, hücre membranlarını kolay bir şekilde geçerek karaciğer, böbrek ve beyin gibi yumuşak dokularda fonksiyon bozukluklarına neden olduğu rapor edilmektedir (28, 103). Gebeliğin 15. gününden doğumdan sonraki 14. güne kadar içme suyu vasıtasıyla 500 ppm NaF uygulanan farelerin karaciğer dokusunda genel olarak balonumsu dejenerasyon, hepatik lobüllerde mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ve nekroz gibi dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin olduğu bildirilmektedir (28). Diyet ile 3 ay 20 mg/kg/gün NaF verilen ratların karaciğer dokularında zonal nekroz ve hepatosit nükleuslarında piknoz belirlendiği kaydedilmektedir (135). Bir çalışmada da oral yolla NaF verilen tavşanların karaciğerinde belirgin nekrotik bölgelerin olduğu bildirilmektedir (239). Çalışmamızda karaciğer dokularının histopatolojik incelemelerinde kontrol, DMSO ve EA gruplarında önemli bir patolojik değişikliğe rastlanmazken (Resim 3.1). 8 hafta süreyle oral yolla 25 mg/L sadece flor verilen çalışma grubundaki deneklerde hepatositlerde hidropik veya balonumsu dejenerasyon, periasiner ve midzonal bölgelerde daha belirgin olmak üzere fokal nekrozlar ile sünozoidlerde dissosiasyon tespit edilmiştir (Resim 3.2 ve 3.3). Ayrıca bazı hepatositlerin çekirdeklerinde büyüme, çift çekirdek oluşumu ve piknoz ile parankimdeki Kupffer hücrelerinde proliferasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları gözlenmiştir (Resim 3.2 ve 3.3). Kronik florozis'te karaciğerde tespit ettiğimiz bu patolojik bulgular daha önce yapılmış olan florozis çalışmaları ile (28, 135, 239) tutarlılık göstermektedir. Sadece EA verilen grubun karaciğerinde hafif derecede dejenerasyon bulunduğu saptanmıştır (Resim 3.4 ve 3.5). Flor ile birlikte EA verilen çalışma grubunda söz konusu bu patolojik değişikliklerin sayısında ve şiddetinde belirgin bir azalma meydana geldiği görüldü ve bu durum flor hepatoksisitesine karşı EA'nın hepatoprotektif nitelikte olabileceği fikrinin oluşmasına neden oldu.

Kronik florozis'li canlılar ile ilgili olan çalışmalarda böbrek dokusunda glomerular ve tubüler fonksiyon bozukluklarının olduğu rapor edilmektedir (90, 198, 257). Domuzlara 50 gün boyunca diyet yoluyla 100 ve 250 mg/kg NaF verilmesinin böbrek dokusunda nekroz ve tubüler dilatasyon gibi histopatolojik bulgulara ve artan

laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi gibi biyokimyasal değişimlere neden olduğu bildirilmektedir (257). Sıçanlarda iki nesil boyunca yapılan bir çalışmada, çalışma süresi boyunca her iki nesildeki deneklere 100 ve 150 ppm florlu içme suyu verilmiş ve ikinci nesil yavruların üçüncü aylarında yaptıkları histopatolojik incelemelerde, böbrek ve karaciğer dokularında kontrol gruplarına göre belirgin farklılıklar olduğu kaydedilmektedir (119). Ayrıca böbrek dokusunda, tübüllerde dejeneratif değişiklikler ile anormal kromatinli düzensiz çekirdekli hücreler, karaciğerde portal alanda safra kanalı proliferasyonu ve fibrozis, lobül periferinde fokal hücreyel infiltrasyon, sinüzoidal kapillerde dilatasyon ve hepatosit çekirdeklerinde heterokromazi gözlemlendiği rapor edilmektedir (119). Çalışmamızda renal dokunun histopatolojik incelemelerinde kontrol, DMSO ve EA gruplarında organların morfolojik yapısının benzer nitelikte ve normal yapıda olduğu görüldü (Resim 3.6). Sadece flor verilen grupta daha çok proksimal tübüllerde olmak üzere tüm tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, yer yer nekroz ile tübül lümenlerinde dilatasyon ve hiyalin sisindirlerine rastlandı (Resim 3.7). Flor ile birlikte EA verilen grupta, flor verilen gruba kıyasla dejenerasyonun şiddetinde azalma olduğu tespit edilirken, bu grupta nekroza ise hiç rastlanmadı (Resim 3.7 ve 3.8). Bu histopatolojik bulgular ile fare, rat, domuz ve tavşanlar üzerinde yapılan başka çalışmalardan elde edilen sonuçlar uyum göstermektedir (90, 136, 198, 210, 214, 225, 257). Çalışmada araştırılan biyokimyasal parametreler ile böbrek dokusunun histopatolojik inceleme bulgularının da tutarlı olduğu saptandı.

Sonuç olarak bu çalışmada,

- 1- Kronik florozis'li farelerde plazma PON aktivitesi, LSA, kalsiyum, total kolesterol, trigliserid, HDL, VLDL ve glukoz düzeyleri ile tam kan GSH düzeylerinde azalma, plazma MDA düzeylerinde artış, karaciğer ve böbrekte ise doku hasarının meydana geldiği,
- 2- Kronik flor iyonu maruziyetinde EA uygulamasının, plazma kalsiyum, PON aktivitesi, total kolesterol ve tam kan GSH düzeylerinde artışa neden olduğu,
- 3- EA'nın, kronik florozis'te oksidan ve antioksidan dengesinin sağlanması ve doku hasarının engellemesi bakımından koruyucu olabileceği,
- 4- EA'nın kronik florozis'li canlılarda enerji dengesi ve biyosentez reaksiyonlarındaki etkileri üzerine daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varıldı.



## 5. ÖZET

Bu çalışmada, deneysel kronik florozis oluşturulan farelerin paraoksonaz (PON) aktivitesi, sialik asit (LSA) ve oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit (MDA) ve redükte glutasyon (GSH) düzeyleri ile lipid profilinde meydana gelebilecek değişikliklere karşı EA'nın etkisinin araştırılması amaçlandı.

Deneysel uygulamalar, 8 hafta süre ile 5 eşit gruba ayrılan 35 adet erkek Swiss albino fareleri üzerinde yapıldı. Grup I için herhangi bir deneysel uygulama yapılmaz iken grup II için deri altı yolla % 0.02 dimetilsülfoksit (DMSO) injeksiyonu, grup III için deri altı yolla 10 mg/kg/gün EA injeksiyonu, grup IV için oral yolla 25 ppm/fare/gün sodyum florid (NaF) ve grup V için hem NaF uygulaması hem de EA injeksiyonu yapıldı. Elde edilen kan örneklerinde plazma LSA, MDA ve PON aktivitesi ile tam kan GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edildi. Plazma kalsiyum, total kolesterol, trigliserid, HDL, VLDL, LDL ve glukoz düzeyleri otoanalizör ile ölçüldü. Ötenaziye takiben, deneklerden elde edilen karaciğer ve böbrek örnekleri hispatolojik olarak değerlendirildi.

MDA düzeylerinin, grup IV'de diğer gruplara göre önemli oranda yüksek ( $P<0.05$ ), GSH ve PON aktivitesi düzeylerinin ise düşük ( $P<0.001$ ) olduğu saptandı. Grup V'de GSH ve PON aktivitesi düzeylerinin grup IV'e göre anlamlı derecede artmış ( $P<0.001$ ) olduğu bulundu. LSA düzeylerinin, kontrol grubuna göre grup IV ve V'de istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış ( $P<0.001$ ) olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; deneysel kronik florozis'te plazma LSA, PON, kalsiyum ve glukoz düzeyleri ile tam kan GSH düzeylerinde azalma, MDA düzeylerinde artış ve lipid profilinde değişikliklere ilaveten karaciğer ve böbrekte hücresel dejenerasyonlar meydana geldiği tespit edilmiş olup, kronik florozis'te EA'nın koruyucu özellikte olduğu belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Florozis, Ellagik Asit, Paraoksonaz, Sialik Asit, Oksidatif Stres

## 6. ABSTRACT

In this study, in mice with experimentally chronic fluorosis was designed to investigate of effect of ellagic acid (EA) on lipid profiles with levels of paraoxonase (PON) activity, sialic acid (LSA), malondialdehyde (MDA) and reduced glutation (GSH).

Experiments were carried out on male 35 Swiss albino mice divided into 5 equal groups for 8 weeks. The mice in group I (control) was not applied experimental operation. It was applied to subcutaneously 0.02% dimethylsulfoxide (DMSO) injection to the mice in group II and subcutaneously 10 mg/kg/day ellagic acid injection (EA) to mice in group III and orally 25 mg/L NaF to the mice in group IV. The mice in group V was applied to both EA injection and NaF application.

On the blood samples obtained at the end of the experimental periods was analyzed spectrophotometrically to plasma MDA, LSA, PON activity and all blood GSH levels. Plasma calcium, glucose, total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein (HDL), very low density lipoprotein (VLDL) and low density lipoprotein (LDL) levels were measured by autoanalyzer. Following euthanasia, liver and kidney tissues obtained from subjects were also evaluated in terms of histopathologic.

MDA levels were detected significantly higher in group IV compared to other groups ( $P<0.05$ ). Levels of GSH and PON activity of group IV were lower compared to control and other groups ( $P<0.001$ ). Levels of PON activity and GSH of group V were increased compared to group IV ( $P<0.001$ ). LSA levels of group IV and V were lower than control group ( $P<0.001$ ).

As a result, in experimental chronic fluorosis was detected to decrease in levels of plasma LSA, PON activity, calcium and glucose and all blood GSH and increase in levels of plasma MDA and changes on lipid profiles and cellular degenerations in liver and kidney. EA in fluorosis was determined that was protective in terms of investigated parameters.

**Key Words:** Fluorosis, Ellagic Acid, Paraoxonase, Sialic Acid, Oxidative Stress

## 7. KAYNAKLAR

1. Ağaoğlu, S., Alişarlı, M., Alemdar, S.: Van bölgesi su kaynaklarında flor düzeylerinin belirlenmesi. YYÜ Vet. Fak. Derg., 18(1): 59-65, 2007.
2. Akdoğan, M., Bilgili, A., Karagöz, E., Gökçimen, A., Eraslan, G., Ustüner, E.: Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 26: 71-77, 2002.
3. Akkuş, İ.: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
4. Al-Hiyasat, A.S., Elbetieha, A.M., Darmani, H.: Reproductive toxic effects of ingestion of sodium flouride in female rats. Flouride, 3382:79-84, 2000.
5. Amira, S., Mulè, F.: Effects of sodium fluoride on the mechanical activity in mouse gastric preparations. Can. J. Physiol. Pharmacol., 83: 367-373, 2005a.
6. Amira, S., Soufane, S., Gharzouli, K.: Effect of sodium fluoride on gastric emptying and intestinal transit in mice. Exp. Toxicol. Pathol. 57(1): 59-64, 2005b.
7. Antipenko, A. Y., Spielman, A. I., Kirchberger, M. A.: Interactions of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. J. Pharm. Exp. Ther., 290: 227-234, 1999.
8. Aral, H., İnal, B. B., Usta, M., Bilgi, P. T., Emecen, Ö., Şahin, M., Güvenen, G.: Friedewald hesaplaması ile direk LDL-kolesterol ölçümünün karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg., 6, 43-49, 2008.
9. Ardağ, A.: Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2008.

10. Ares, J.: Fluoride–aluminium water chemistry in forest ecosystems of central europe. *Chemosphere*, 21(4/5): 597–612, 1990.
11. Avcı, B., Baysal, S. U., Gökçay, G.: Çocuklarda flor kullanımının yarar ve zararlarının değerlendirilmesi. *Çocuk Derg.*, 9(1):8-15, 2009.
12. Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Nelton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C., La Du, B. N: Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 13: 1617-1624, 1998.
13. Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S.: Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 26: 892-904, 1999.
14. Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L., La Du, B. N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J. Clin. Invest.*, 101: 1581-1590, 1998.
15. Aviram, M: Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease. *Mol. Med. Today*, 5: 381-386, 1999.
16. Babacan, F., Işık, B., Bingöl, Banu.: Changes in serum paraoxonase activity, calcium and lipid profiles in pre-eclampsia, a preliminary study. *J. Turk. Soc. Obstet. Gynecol.*, 8 (3): 169-174, 2011.
17. Barch, D. H., Rundhaugen, L. M., Stoner, G. D., Pillay, N. S., Rosche, W. A.: Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis*, 17: 265-269, 1996.
18. Barot, V. V.: Occurrence of endemic fluorosis in human population of North Gujarat, India: human health risk, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 303-310, 1998.

19. Baskin, S. I., Salem, H.: Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, pp 79-120, 1997.
20. Bayrak, T., Bayrak, A., Demirpençe, E., Kılınc, K.: Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoknaz. Hacettepe Tıp Derg., 36: 147-151, 2005.
21. Berrebi-Bertrand, I., Lahouratate, P., Lahouratate, V., Camelin, J. C., Guibert, J., Bril, A.: Mechanism of action of sarcoplasmic reticulum calcium-uptake activators discrimination between sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and phospholamban interaction. Eur. J. Biochem., 247: 801-809, 1997.
22. Beutler, E., Duran, O., Kelly, B. M.: Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 61(5): 882-888, 1963.
23. Beyhan, M.: Atık çamurlar ve doğal malzemeler ile sulardan florür iyonu gideriminin araştırılması. YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul. 2003.
24. Bhagavan, N. V.: Plasma lipoproteins. Medical Biochemistry. 4th edition, Harcourt Academic Press, pp.429-452, 2002.
25. Bildik, A.: Florosisli koyunlarda kan serumundaki iyot değerleri ile bazı spesifik karaciğer enzimleri aktivitelerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 1992.
26. Birkner, E., Grucka-Mamczar, E., Dariusz Chlubek, J., Kasperczyk, S., Stawiarska-Pięta, B., Błaszczuk, U.: Influence of sodium fluoride and caffeine on the concentration of fluoride ions, glucose, and urea in blood serum and activity of protein metabolism enzymes in rat liver. Biol. Trace Element Res., 112: 169-174, 2006.
27. Boillat, M. A., Garcia, J. and Velebit, L.: Radiological criteria of industrial fluorosis. Skeletal Radiol., 5: 161-165, 1981.

28. Bouaziz, H., Ketata, S., Jammoussi, K., Boudawara, T., Ayedi, F., Ellouze, F., Zeghal, N.: Effects of sodium fluoride on hepatotoxicity in adult mice and their suckling pups. *Pest. Biochem. Phys.*, 86: 124-130, 2006.
29. Breusegem, F. V., Dat, J. F.: Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant. Physiol.* 141: 384-390, 2006.
30. Brewer, H. B., Gregg, R. E., Hoeg, J. M., Fojo, S. S.: Apoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. *Clin. Chem.*, 34: 4-8, 1988.
31. Brigande J. V., Platt F. M., and Seyfried T. N., 1998, Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis does not impair growth or morphogenesis of the postimplantation mouse embryo. *J. Neurochem.*, 70: 871-882.
32. Brooks, S.A., Dwek, M.V., Schumacher, U.: *Functional and Molecular Glycobiology.*, BIOS Scientific Publishers, 2002.
33. Camp, W. V., Van Montagu, M., Inze, D.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, 3: 330-334, 1998.
34. Campos, H., Sacks, F. M.: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(10): 4525-4532, 2003.
35. Canales, A., Sanchez-Muniz, F.J.: Paraoxonase, something more than an enzyme?. *Med. Clin.*, 121: 537-548, 2003.
36. Cao, H., Girard-Globa, A., Berthezene, F., Moulin, P.: Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q to R genetic polymorphism. *J. Lipid Res.*, 40: 133-139, 1999.
37. Carlson, J. R., and J. W. Suttie.: Pentose phosphate pathway enzymes and glucose oxidation in fluoride fed rats. *Am. J. Physiol.*, 210: 79, 1966.
38. Cerklewski, F. L.: Fluoride bioavailability-nutritional and clinical aspects. *Nutrition Research.*, 17(5): 907-929, 1997.

39. Chakraborty, P., Kumari, S., Dutta, D., Gupta, V.: Role of antioxidants in common health diseases. *Research J. Pharm. and Tech.*, 2 (2): 238-244, 2009.
40. Champe, P. C., Harvey, R. A.: *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry*, 2.Edition, Lippincott Williams and Wilkins, pp.213-222. 1994.
41. Chauhan, S. S., Ojha, S., Mahmood, A.: Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. *Alcohol*, 45: 663-672, 2011.
42. Chen, X., Varki, A.: Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem. Biol.*, 5: 163-176, 2010.
43. Chiesi, M., Schwaller, R.: Reversal of phospholamban-induced inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase by Tannin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202: 1668- 1673, 1994.
44. Chinoy, N. J., Sharma, M., Michael, M.: Beneficial effects of ascorbic acid and calcium on reversal of fluoride toxicity in male rats. *Fluoride*, 26:45-56, 1993.
45. Chinoy, N. J.: Role of fluoride in animal systems: A review. In: *Toxicity and Monitoring of Xenobiotics*, pp13-30, 1995.
46. Chinoy, N. J., Sharma, A.: Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice. *Fluoride*, 31 (4): 203-216, 1998.
47. Chinoy, N. J., Patel, T. N.: The influence of fluoride and/or aluminium on free radical toxicity in the brain of female mice and beneficial effects of some antidotes. *Fluoride*, 33(1):8, 2000.

48. Chinoy, N. J., Pate T. N.: Effects of sodium fluoride and aluminium chloride on ovary and uterus of mice and their reversal by some antidotes. *Fluoride*, 34 (1): 9-20, 2001.
49. Chlubek, D.: Fluoride and oxidative stres. *Fluoride*, 36, (4): 217-228 (2003).
50. Coşkun, T.: Vitaminler. *Katkı Pediatri Derg.*, 25: 357-540, 2003.
51. Crook, M. A., Pickup, J. C., Lumb, P. J., Giorgino, F., Webb, D. J., Fuller, J. H.: Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Complications Study. *Diabetes Care*, 24(2): 316-322, 2001.
52. Crow, P.J.: Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide Biol. Ch.*, 1; 145–157 1997.
53. Cylwik, B., Chrostek, L., Krawiec, A., Supronowicz, Z., Koput, A., Szmitkowski, M.: Lipid-bound sialic acid in alcoholics participates in increased level of total sialic acid. *Alcohol*, 44(5):457-62, 2010.
54. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T.: Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.*, 3: 92-95, 1997.
55. Çaylak, E.: Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Derg.*, 9(1) : 73-83, 2011.
56. Çenesiz, S.: Deneysel kronik florozis oluşturulmuş Tuj ırkı koyunlarda eritrosit süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kars, 2003.*
57. Çetin, N., Sağmanlıgil, V., Emre, B., Bilgici, A., Toker, M.: Tavşanlarda akut flor zehirlenmesinin bazı ekokardiyografik değerler üzerine etkisi. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 25, 45-49, 2001.



58. Çiftçi, G., Çenesiz, S., Yarım, F. G., Nisbet, O., Nisbet, C., Çenesiz, M., Güvenç, D.: Effect of fluoride exposure on serum glycoprotein pattern and sialic acid level in rabbits. *Biol. Trace Elem. Res.*, 133: 51-59, 2010.
59. Dasarathy, S., Das, T. K., Gupta, I. P., Susheela, A. K., Tandon, R. K.: Gastroduodenal manifestations in patients with skeletal fluorosis. *J. Gastroenterol.*, 31(3): 333-337, 1996.
60. Davison, A.W., Rand, A.W., Betts, W.E.: Measurement of atmospheric fluoride concentrations in urban areas. *Environ. Pollut.*, 5: 23-33, 1973.
61. De Whalley, C., Rankin, S. M., Houlst, J. R., Jessup, W., Leake, D.: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 1743, 1990.
62. Deneke, S. M., Fanburg, B. L.: Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, 257: L163-L173, 1989.
63. Devipriya, N., Sudheer, A. R., Menon, V. P.: Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 21: 621-630, 2007.
64. Dinçer, S., Gülen, Ş.: Leptin uygulanan sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda yara dokusu malondialdehit ve glutatyon düzeyleri. *Erciyes Tıp Derg.*, 32(3): 161-166, 2010.
65. Dodurka, H. T., Or, M. E., Kayar, A., Kar, F.: Kapadokya bölgesi içme suyu kaynaklarında flor düzeyleri ve bu bölgenin koyunlarında fluorosis ile ilgili semptomların saptanması üzerine araştırmalar. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 26, 747-751, 2002.
66. Doull, J., Boekelheide, K., Farishian, B. G., Isaacson, R. L., Klotz, J. B., Kumar, J. V.: Fluoride in drinking water: a scientific review of EPA's standards. Committee on fluoride in drinking water, board on environmental studies and toxicology, division on earth and life sciences, national research

council of the national academies. Washington DC. National Academies Press. p. 530, 2006.

67. Dousset, J. C., Rioufol, C., Philibert, C., Bourbon, P.: Effects of inhaled HF on cholesterol, carbohydrate and tricarboxylic acid metabolism in guinea pigs. *Fluoride*, 20: 137-41, 1987.
68. Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R, La Du, B.N.: Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.*, 46: 1239-1247, 2005.
69. Dringen, R.: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62: 649-671, 2000.
70. Dündar, Y., Aslan, R., Eryavuz, A.: Effects of defaunation and urea on glutathione and malondialdehyde levels in blood and ruminal fluid of Ramlic lambs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 28: 265-269, 2004.
71. Eckerson, H. W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B. N.: The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 214–227, 1983.
72. Edmunds, W. M., Smedley, P. L.: Fluoride in natural waters. In: Selinus O (ed). *Essentials of Medical Geology*. Burlington MA. Elsevier Academic Press. p. 301-329. 2005.
73. Ekstrand, J., Fomon, S. J., Ziegler, E. E., Nelson, S. E.: Fluoride pharmacokinetics in infancy. *Fluoride*, 27(3), 168, 1994.
74. Eliud, A. G. M., Hugo, R. P, Luz, M. D. R.: Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stres. *Toxicology*, 263: 75-83, 2009.
75. Elrashidi, M. A., Lindsay W. L.: Chemical equilibria of fluorine in soils. A theoretical development. *Soil Sci.*, 141: 274-280, 1986.

76. Erkan, S., Fidancı, U. R.: Florozisli koyunlarda serum lipid profili. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 58: 149-153, 2011.
77. Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Maenpaa, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., Aro, A.: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol., 56: 545-553, 2000.
78. Fejerskov, O., Baelum, V., Richards, A.: Dose-response and dental fluorosis. In: Fejerskov O, Ekstrand J, & Burt BA ed. Fluoride in dentistry, 2nd ed. Copenhagen, Munksgaard, pp 153-166, 1996.
79. Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C.: Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. J. Clin. Endocrinol. Metab., 90: 1728-33, 2005.
80. Fidancı, U.R., Sel, T.: The industrial fluorosis caused by a coal-burning power station and its effects on sheep. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25, 735-741, 2001.
81. Fisher, R. L., Medcalf, W. T., Henderson, M. C.: Endemic fluorosis with spinal cord compression. Arch. Intern. Med. 149, 697-700, 1989.
82. Flora, S. J.: Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol. Biol. 53: 1-2, 2007.
83. Fortmann, S. P., Maron, D. J.: Disorders of lipid metabolism. Scientific American Medicine 9; 1-24, 1993.
84. Fraternali, A., Paoletti, M. F., Casabianca, A., Nencioni, L., Garaci, E., Palamara, A. T., Magnani, M. GSH and analogs in antiviral therapy. Molecular Aspects of Medicine 30 99-110, 2009.
85. Friedewald, W.T., Levy, R.I., Frederickson, D.S.: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18; 499-502, 1972.

86. Gavish, D., Oschry, Y., Eisenber, S.: In vivo conversion of human HDL3 to HDL2 and apoE-rich HDL1 in the rat: effects of lipid transfer protein. *J. Lipid Res.*, 28: 257-267, 1987.
87. Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M.: Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.*, 160: 509-515, 2003.
88. Gottschalk, A., Drzenick, R.: Neuraminidase as a in structural analysis: glycoproteins, their composition structure and function, 2 nd. Ed. 402-447, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1972.
89. Guan, Z. Z., Yang, P. S., Yu, N. D., Zhuang, Z. J.: An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Fluoride*, 22: 112-118, 1989.
90. Guan, Z. Z., Xiao, K. Q., Zeng, X. Y., Long, Y. G., Cheng, Y. H., Jiang, S.F., Wang, Y.N.: Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch. Toxicol.*, 74: 602-608, 2000.
91. Gupta, S. K., Gupta, R. C., Gupta, K., Trivedi, H. P.: Changes in serum seromuroid following compensatory hyperparathyroidism: a sequel to chronic fluoride ingestion. *Indian J. Clin. Biochem.*, 23(2): 176-180, 2008.
92. Gümüş, M., Yüksel, H., Evliyaoğlu, O., Kapan, M., Büyük, A., Önder, A., Aldemir, M.: Effects of ellagic acid on copper, zinc, and biochemical values in serum and liver of experimental cholestatic rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 143(1): 386-393, 2011.
93. Gürsu, M. F., Özdin, M.: Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Derg.*, 7(2): 732-37, 2002.
94. Hakkinen, S.: Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. *Kuopio University Publications D. Medical Sciences*, 221, 2000.

95. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Free radicals in biology and medicine, Third Edition, Oxford Science Publications 22- 24, 2001.
96. Hart, E.B., Phillips, P.H., Bohstedt, G.: Relationship of soil fertilisation with superphosphates and rock phosphate to the fluorine content of plants and drainage waters. *Am. J. Public Health.*, 24: 936–940, 1934.
97. Hart, P.S., Hart, T.C.: Disorders of human dentin. *Cell Tissues Organs*, 186: 70-77, 2007.
98. Hassan, H. A., Abdel-Aziz., A. F.: Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1999-2004, 2010.
99. Hemens, J., Warwick, R. J.: The effects of fluoride on estuarine organisms. *Water Research*, 6: 1301-1308, 1972.
100. Hillman, D., Bolenbaugh, D. L., Convey, E. M.: Hypothyroidizm and anemia related to fluoride in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 62: 416-423, 1979.
101. Hoffman, R., Mann, J., Calderone, J., Trumbull, J., Burkhart, M.: Acute fluoride poisoning in a New Mexico Elementary School. *Pediatrics*, 65: 897–900, 1980.
102. Iino, T.: Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sciences*, 70: 1139-1150, 2002.
103. Inkielewicz, I., Krechniak, J.: Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride*, 36: 263-266; 2003.
104. Inkielewicz, I., Krechniak, J.: Fluoride effects on glutathione peroxidase and lipid peroxidation in rats. *Fluoride*, 37: 7-12, 2004.

105. Ippoushi, K.: Prevention of peroxy-nitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. *Food Chem.*, 112 (1): 185-188, 2009.
106. Jaaskelainen, I. P.: Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur. J. Clin. Invest.*, 29: 413-425, 1999.
107. Jaouad, L., Guise, C. D., Berrougui, H., Clouiter, M., Isabellea, M., Fulop, T., Payette, H., Khalil, A.: Age-related decrease in HDL's antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, 185: 191-200, 2006.
108. Jarvik, G. P., Tsai, N. T., McKinstry, L. A., et al.: Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 1329-1333, 2002.
109. Jessup, W., Rankin, S. M., De Whalley, C. V.: Alphas-tocopherol consumption during low density lipoprotein oxidation. *Biochem. J.*, 265: 399, 1990.
110. Jha, M., Susheela, A. K. Krishna, N., Rajyalakshmi, K., Venkiah, K.: Excessive ingestion of fluoride and the significance of sialic acid: glycosaminoglycans in the serum of rabbit and human subjects. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 19: 1023-30, 1982.
111. Jha, M., Koacher, J., Susheela, K.: Urinary excretion of glycosaminoglycans, hydroxyproline and hydroxylysine in rabbits after excessive ingestion of fluoride. *Clin. Experiment. Pharm. Physiol.*, 10: 615-619, 1983.
112. Juretic, D., Tadijanovic, M., Rekić, B., Simean, R. V., Reiner, E., Baricic, M.: Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin. Sci.*, 42: 146-150, 2001.
113. Kalyanalakshmi, P., Vijayabhaskar, M., Naidu, M. D.: Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status of adult males with skeletal fluorosis in Andhra Pradesh, India. *Fluoride*, 40: 42-45, 2007.

114. Kaminski, K. A., Bonda, T. A., Korecki, J., Musial, W. J.: Oxidative stress and neutrophil activation the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Cardiol.*, 86(1): 41-59, 2002.
115. Kanapka, J. A., Hamilton, I. R.: Fluoride inhibition of enolase activity in vivo and its relationship to the inhibition of glucose-6-P formation in *Streptococcus salivarius*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146(1): 167-74, 1971.
116. Kanwar, K. C., Singh, M.: Zinc Depletion following experimental fluorosis in mice. *Sci. Total Environ.* Dec.; 22(1): 79-83, 1981.
117. Karaçalı, S.: Glikobiyoloji. Güncel Moleküler Biyoloji., *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 489-495, 2003.
118. Karadeniz, A., Şimşek, N., Koç, F., Alp, H.: Kronik flor toksikasyonu oluşturulan farelerde testis dokusundaki oksidatif hasar üzerine Panax ginseng'in koruyucu etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 15(1): 1-8, 2009.
119. Karaöz, E., Gülle, K., Mumcu E. F., Gökçimen, A., Öncü, M.: Deneysel kronik florozis oluşturulmuş 2. kuşak sıçan böbrek ve karaciğer dokularında yapısal değişiklikler. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23: 129-134, 2003.
120. Karapehlivan, M.: Laktasyondaki Tuj koyunlarında serum ve süt sialik asit değerlerinin araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kars, 2003.*
121. Karapehlivan, M., Uzlu, E., Atakişi, O., Erdoğan, H. M., Uzun, M., Çitil, M.: Doksorubisin uygulanan tavşanlarda plazma sialik asit, malondialdehit ve redükte glutatyon düzeylerine L-karnitinin etkileri . *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 13(2): 155-160, 2007.
122. Katapodis, N., Hirshaut, Y., Geller, N., Stock, C. C.: Lipid associated sialic acid test for the detection of human cancer. *Cancer Res.*, 42: 5270-5275. 1982.

123. Kaya, S., F. Akar, 1998. (In: Veteriner hekimliğinde toksikoloji. Eds. S. Kaya, İ. Pirinçci ve A. Bilgili). Medisan Yayın Serisi:35, ISBN: 975-7774-32-4, 1. Baskı, Ankara- Türkiye, s.119-149, 1998.
124. Kaya, S., Sanlı, Y., Pirinçci, İ., Yavuz, H., Baydan, E., Demet, Ö., Bilgili, A.: Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayınevi Ankara, Bölüm 2, 80-85, 1995.
125. Kazezoğlu, C., Usta, U., Gökmen, S. S.: Deneysel miyokart infarktüsünde total ve lipide bağlı sialik asid düzeyleri. Türk Klinik Biyokimya Derg., 7(1): 7-15, 2009.
126. Keçeci, H., Özdemir, H.: Elazığ ve çevresindeki sığır ve koyunların kan serumu, idrar, kemik ve dişlerindeki flor düzeylerinin araştırılması. F.Ü. Sağlık Bil. Derg., 16(2): 187-197, 2002.
127. Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ.: Biyokimya, Şafak yayınevi, Erzurum, s183-207, 394-399, 1997.
128. Khan, A. U., Kashat, M.: Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. Proc. Natl. Acad Sci. USA 91: 12365-12367, 1994.
129. Khandare, A. L., Kumar, P. U., Lakshmaiah, N.: Beneficial effect of tamarind ingestion on fluoride toxicity in dogs. Fluoride, 33(1): 33-38, 2000.
130. Khanduja, K. L., Gandhi, R. K., Pathania, V., Syal, N.: Prevention of nitrosodiethylamine induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. Food Chem. Toxicol., 37: 313-318, 1999.
131. Kılınç, K., Kılınç, A.: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Temel Tıptan Klinige, 33(2): 110-118, 2002.
132. Kierdorf, H., Kierdorf, U.: Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. Cell Tissue Res., 289: 125-135, 1997.



133. Kirk, P.W.W., Lester, J.N.: Halogen compounds. In: Harrison RM & Perry R ed. Handbook of air pollution analysis, 2nd ed. London, Chapman & Hall pp 425–462, 1986.
134. Kobayashi, C. A., Leite, A. L., Silva, T. L., Santos, L. D., Nogueira, F.C., Oliveira, R.C., Palma, M.S., Domont, G.B., Buzalaf, M.A.: Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem. Biol. Interact.*, 180(2): 305-311, 2009.
135. Kolodziejczyk, L., Put, A., Grzela, P.: Liver morphology and histochemistry in rats resulting from ingestion of sodium selenite and sodium fluoride. *Fluoride*, 33:6-16, 2000.
136. Kour, K., Singh, J.: Histological findings in kidney of mice following sodium fluoride administration. *Fluoride* 13:163-7, 1980.
137. Kōkoğlu, E., Sönmez, H., Uslu, E.: Sialic acid levels in various types of cancer. *Cancer Biochem. Biophys.*, 13:57–64, 1992.
138. Krechniak, J., Inkielewicz, I.: Correlations between fluoride concentrations and free radical parameters in soft tissues of rats. *Fluoride*, 38(4): 293-296, 2005.
139. Kudo, A., Garrec, J. P.: Accidental release of fluoride into experimental pond and accumulation in sediments, plants, algae, molluscs and fish. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 3: 189-198, 1983.
140. Kumar, S.: Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Advanced Applied Sci. Res.*, 2(1): 129-135, 2011.
141. Kumari, D. S., Rao, R. P.: Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem. Int.*, 23(4): 639-648, 1991.
142. Kurban, S., Mehmetoğlu, İ.: Osteoprotegerin, Rank ve Rank ligandı. *Turk J. Biochem.*, 32: 178-184, 2007.

143. Küçükeşmen, Ç., Sönmez, H.: Diş hekimliğinde florun, insan vücudu ve dişler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. SDÜ Tıp Fak. Derg., 15(3): 43-53, 2008.
144. Lackner, K. J., Edge, S. B., Gregg, R. E., Hoeg, J. M., Brewer, H. B.: Isoforms apolipoprotein A-II in human plasma and thoracic duet lymph. Identification of proapolipoprotein A-II and sialic acidcontaining isoforms. J. Biol. Chem., 260: 703-706, 1985.
145. Lakshman, M. R., Rao, M. N., Marmillot, P.: Alcohol and molecular regulation of protein glycosylation and function. Alcohol, 19: 239-247, 1999.
146. Lamarche, B., Rashid, S., Lewis, G. F.: HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. Clin. Chim. Acta., 286: 145-161, 1999.
147. Lamb, C., Dixon, R. A.: The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol., 48: 251-275, 1997.
148. Lee, M.K., Hae Bok, S., Jeong, T.S.: Supplemnetation of Naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high Cholesterol fed rats. Biorganic Med. Chem., 10: 2239-2244, 2002.
149. Lehmann, C. J.: Lipids and Lipoproteins. Saunders Manual of Clinical Laboratory Science. WB Saunders Company, First print, pp.59-76, 1998.
150. Li, W. F., Costa, L. G., Furlong, C. E.: Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. J. Toxicol. and Environ. Health., 40: 337-346, 1993.
151. Loo, W. T. Y., Jin, L. J., Cheung, M. N. B., Chow, L. W. C.: Evaluation of Ellagic acid on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay. Afr. J. Biotechnol., 9(25): 3938-3943, 2010.

152. Lykkesfeldt, J.: Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin. Chim. Acta*, 380: 50-58, 2007.
153. Machlin, L., Bendich, A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb. J.*, 1: 441-445, 1987.
154. Machoy-Mokrzyńska, A., Put, A., Ceglecka, M., Myśliwiec, Z.: Influence of essential phospholipids (EPL) on selected biochemical parameters of lipid metabolism in rats chronically exposed to ammonium fluoride vapors. *Fluoride*, 27: 201-204, 1994.
155. Mackness, M. I., Mackness, B., Durrington, P. N., Connelly, P. W., Hegele, R. A.: Paraonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, 7: 69-76, 1996.
156. Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S., Turkei, W., Durrington, P. N.: The effect of the human serum paraonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters*, 423: 57-60, 1998.
157. Mahajan, A, Tandon, V. R.: Antioxidants and rheumatoid arthritis. *J. Indian Rheumatol. Assoc.*, 12: 139-142, 2004.
158. Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A.: The inhibition of the oxidation of low density lipoproteins by catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 445, 1992.
159. Maplesden, D. C., Matzok, I., Oliver, W. T., Branion, H. D.: Fluorosis. A review and field observations. *Can. J. Comp. Med.*, 22(12): 427-432, 1958.
160. Maraşlı, Ş.: Doğu Anadolu bölgesinde normal ve florozis belirtisi gösteren koyunlarda serum total lipid, kolesterol ve serbest yağ asitleri düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1992.
161. Masella, R., Benedetto, D. I., Vari, R., Filesi, R. C., Giovannini, C.: Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems:

- Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 16 : 577-586, 2005.
162. Mayes, P. A.: Lipid Taşınması ve Depolanması. Harper'ın Biyokimyası, Editörler: Robert K. Murray, Peter A.Mayes, Daryl K. Granner, Victor W. Rodwell, Appleton & Lange, Çevirenler: Gülriz Menteş, Biltan Ersöz, 22.baskı , Barış Kitabevi, pp.292-326,1993.
163. Mayes, P. A.: Biyoenerji vericiler ve karbonhidrat ile lipid metabolizması, Harper'ın Biyokimyası. Çeviri Dikmen N, Özgünen T, Barış Kitabevi, İstanbul, 24.baskı., 116-306, 1996.
164. McGown, E. L., Suttie, J. W.: Mechanism of fluoride induced hyperglycemia in the rat. *Toxicol. Apply. Pharmacol.*, 40: 83-90, 1977.
165. McKenna, E., Coll, K. E., Mayer, E. J., Mazack, E. K., Antanavage, J., Wiedmann, R.T., Smith, J.S., Johnson, R.G.J.: Quercetin exerts a biphasic effect on cardiac sarcolasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase activity. *Biophys. J.*, 68: A310, 1995 (Abstract).
166. Mehta, A., Mason, P. J., Vulliamy, T. J.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliers Best Pract. Res. Clin. Haematol. Mar.*, 13: 21-38, 2000.
167. Memişoğulları, R., Orhan, N.: Paraoksonaz ve Kanser. *Konuralp Tıp Derg.*, 2(2): 22-26, 2010.
168. Meyer, A. S., Heinonen, M., Frankel, E. N.: Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, *Food Chemistry*, 61: 71-75, 1998.
169. Michel, J., Suttie, J., Sunde, M.: Fluorine deposition in bone as related to physiological state. *Poult. Sci.*, 63: 1407-1411, 1984.
170. Michael, M., Barot, V. V., Chinoy, N. J.: Investigation of soft tissue function in fluorotic individuals of North Gujarat. *Fluoride*, 29: 63-71, 1996.

171. Millar, J. S., Anber, V., Shepherd, J., Packar, C. J.: Sialic acid-containing components of lipoproteins influence lipoprotein-proteoglycan interactions. *Atherosclerosis*, 145: 253-260, 1999.
172. Millar, J. S.: The sialylation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*, 154: 1-13, 2001.
173. Mittal, M., Flora, S.J.S.: Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem. Biol. Interact.*, 162: 128-139, 2006.
174. Motta, M. V., Souza, D. N., Nicolau, J., Paulo, S.: Effects of subtoxic doses of fluoride on some enzymes of the glucose metabolism in submandibular salivary glands of fed and overnight-fasted rats. *Fluoride*, 32: 20-26, 1999.
175. Myśliwiec, Z., Machoy-Mokrzyńska, A., Juzyszyn, Z., Czerny, B., Put, A.: Effects of selenium on serum lipids and enzyme activities in fluoride-intoxicated rats. *Fluoride*, 35(3): 168-175, 2002.
176. Naito, H. K.: *Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. Clinical Chemistry*, Editörler: Lawrence Kaplan, Amadeo J.Pesce, Steven C.Kazmierczak, Mosby, 4.baskı, pp.603-638, 2003.
177. Narayanan, B. A.: p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Lett.*, 136: 215-221, 1999.
178. Nigam, P. K., Narain, V. S., Kumar, A.: Sialic acid in cardiovascular diseases. *Indian J Clin. Biochem.*, 21(1): 54-61, 2006.
179. Nizamlıoğlu, M.: *Lipidler "Biyokimya" İkinci Baskı*, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi Ünitesi, Konya, 216-264, 2000.
180. Oral, B., Özbaşar, D.: The effect of sodium monofluorophosphate therapy on lipid and lipoprotein metabolism in postmenopausal women. *EJOGRB*, 107: 180-184, 2003.

181. Özen, Ş., Haspolat, K.: D vitamini, Ca, kemik metabolizması ve psikiyatrik bozukluklar. *Klinik Psikiyatri*, 6: 102-113, 2003.
182. Özkaya, A.: The Effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 16 (2): 263-268, 2010.
183. Öztürk, H.: Diabetes mellitusda paraoksonaz aktivitesi ve AOPP düzeyleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
184. Pari, L., Sivasankari, R.: Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 22: 395-401, 2008.
185. Park, S., Ajtai, N., Burghard, T.P.: Inhibition of myosin ATPase by metal fluoride complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1430: 127-140, 1999.
186. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F.: Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.*: 333: 19-39, 2003.
187. Phillips, P.H., Greenwood, D.A., Hobbs, C.S., Huffman, C.F.: The Fluorosis problem in livestock production . National Academy of Sciences. National Res. Counc. Pub., 381: 1-17, 1955.
188. Pickering, W.F., Slavek, J., Waller, P.: The effect of ion exchange on the solubility of fluoride compounds. *Water Air Soil Pollut.*, 39: 323–336, 1988.
189. Pişkin, I.: Kobaylarda akut flor zehirlenmesinin elektrokardiyogram üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü., Doktora Tezi, Ankara, 1994.
190. Plastaras, J. P., Guengerich, F. P., Nebert, D. W., Marnett, L. J.: Xenobioticmetabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin

- endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J. Biol. Chem.*, 275: 11784-11790, 2000.
191. Prakash, M., Shetty, J. K., Tripathy, S., Verma, M., Vasudev, S., Bhandary, P.V.: Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease, *Clin. Chim. Acta.*, 37: 232-234, 2007.
192. Précourt, L.P., Amre, D., Denis, M.C., Lavoie, J.C., Delvin, E., Seidman, E., Levy, E.: The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*, 214 20-36, 2011.
193. Primo-Parma, S.L., Sorenson, R.C, Teiber, J., La Du, B.N.: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics*, 33: 498-509, 1996.
194. Prince, C. W., Navia, J. M.: Glycosaminoglycan alterations in rat bone due to growth and fluorosis. *J. Nutr.*, 113(8): 1576-1582, 1983.
195. Priyadarsini, K. I.: Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2200-2206, 2002.
196. Rainwater, D. L., Rutherford, S., Dyer, T. D., et al.: Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity*, 102: 147-154, 2009.
197. Rassin, D. K., Smith, K. E.: Nutritional approaches to improve cognitive development during infancy: antioxidant compounds. *Acta. Paediatr.*, 442: 34-41, 2003.
198. Reggabi, et al.: Renal functions in residents of endemic fluorosis area in southern Algeria. *Fluoride*, 17: 35-41, 1984.
199. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 2: 152-159.

200. Rigalli, A., Morosano, M. and Puche, R.C.: Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforsch*, 46: 531-533, 1996.
201. Rio, D. D., Stewart, A. J., Pellegrini, N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Card. Dis.*, 15(4): 316-328, 2005.
202. Rizack, M.: An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 236(3): 657-662, 1961.
203. Rodrigo, L., Mackness, B., Durrington, P.N., Hernandez, A., Mackness, M.I.: Hydrolysis of platelet activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem. J.*, 354: 1-7, 2001.
204. Rzeuski, R., Chlubek, D., Machoy, Z.: Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride* 31: 43-45, 1998.
205. Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D.: Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J.Nutr.*, 136: 2481-2485, 2006.
206. Senti, M., Tomas, M.: Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 5422-5426, 2003.
207. Serdar, Z., Yesilbursa, D., Dirican, M. et al.: Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem. Funct.*, 25: 655-664, 2007.
208. Shanthakumari, D., Srinivasalu, S., Subramanian, S.: Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidation status in experimental rats. *Toxicology*. 204: 219-228, 2004.
209. Sharma, Y. D.: Serum sialic acid and ceruloplasmin levels in experimental fluorosis. *Toxicol. Lett.*, 15: 1-5, 1983.



210. Shashi, A., Singh, J. P., Thapar, S. P.: Toxic effects of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride*, 35: 38-50, 2002.
211. Shearer, T.R., Suttie, J.W.: Effect of fluoride on glycolytic and citric acid cycle metabolites in rat liver. *Journal of Nutrition* 100(7):749-56, 1970.
212. Shivarajashankara, Y. M. et al.: Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*, 34: 103-107, 2001.
213. Shusheela, A. K.: Fluorosis-early warning signs and diagnostic test. *Fluoride*, 3(23): 144, 1989.
214. Singh, P. P., Barjatiya, M. K., Dhing, S., Bhatnagar, R., Kothari, S., Dhar, V.: Evidence suggesting that high intake of fluoride provokes nephrolithiasis in tribal populations. *Urol. Res.*, 29(4): 238-244, 2001.
215. Singhal, A., Hakomori, S.: Molecular changes in a carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioassays*, 12: 223-30, 1990.
216. Sloof, W., Eerens, H., Janus, J., Ros, J.: Integrated criteria document: Fluorides. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection (Report No. 758474010), 1989.
217. Solon, S., et al.: Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J. Ethnopharmacol.*, 72, 173-178, 2000.
218. Suketa, Y., Mikami, E., Hayashi, M.: Changes in calcium and magnesium in the kidneys of rats intoxicated with a single large dose of fluoride. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 39: 313-319, 1977.
219. Susheela, A.K., Das, T.K., Khurana, J.S., Jayaswal, A., Dave, P.K.: Circulating levels of sialic acid and glycosaminoglycans: a diagnostic test for ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.*, 47: 833-837, 1988.

220. Susheela, A.K., Kharb, P.: Aortic calcification in chronic fluoride poisoning: Biochemical and electronmicroscopic evidence. *Exp. Mol. Pathol.*, 53: 72-80, 1990.
221. Suzuki, N., Masamune, A., Kikuta, K., Watanabe, T., Satoh, K., Shimosegawa, T.: Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male wistar Bonn/Kobori rats. *Dig. Dis. Sci.*, 54:802-810, 2009.
222. Swaminthan, N., and Aladjem, F.: The monosaccharide composition and sequence of the carbohydrate moiety of human serum low density lipoprotein. *Biochemistry*, 15: 1516-1522, 1976.
223. Şireli, M., Bülbül, A.: The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the guinea pig. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 28: 591-595, 2004.
224. Takahashi, M., Fujii, J. Teshima, T. Suzuki, K. Shiba, T. Taniguchi, N.: Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene*, 127(2): 249-253, 1993.
225. Taylor, J.M., Scott, J.K., Maynard, E.A., Smith, F.A., Hodge, H.C.: Toxic effects of fluoride on the rat kidney I. Acute injury from single large doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 3:278-89, 1961.
226. Teotia, S.P.S., Teotia, M.: Dental Caries: A disorder of high fluoride and low dietary calcium interactions. 30 years of personal experience. *Fluoride*, 27: 59-66, 1994.
227. Thresiamma, K.C., Kuttan, R.: Inhibition of liver fibrosis by ellagic acid. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 40(4): 363-366, 1996.
228. Traving, C., Schauer, R.: Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS Cell. Mol.Life Sci.*, 54: 1330-1349, 1998.

229. Tsukushi, S., Katsuzaki, T., Aoyama, I., Takayama, F., Miyazaki, T., Shimokata, K., Niwa, T.: Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: role of the polyol pathway, *Kidney Int.* 55 (5): 1970-1976, 1999.
230. Tuncer, S.D.: Sığır besleme. (In: Sığır hastalıkları. Eds., E. Alaçam, ve M. Sahal). Medisan Yayın Serisi:31, ISBN: 975-7774-28-6, 1. Baskı, Ankara, Türkiye, 497-540, 1997.
231. Turgut, K., Ok, M.: Veteriner Gastroenteroloji. Bahçıvanlar Basım San. Tic. Ltd. Sti. Konya, 291-292, 1997.
232. Uchida, K.: Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 28:1685-96, 2000.
233. Upfal, M., Doyle, C.: Medical management of hydrofluoric acid exposure. *J. Occup. Med.*, 32: 726-731, 1990.
234. Usuda, K., Kono, K., Dote, T., Nishiura, K., Miyata, K. Nishiura, H. Shimahara, M. and Sugimoto, K.: Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.*, 72: 104-109, 1998.
235. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., *Essentials of glycobiology*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2009.
236. Varki, A.: Glycan-based interactions involving vertebrate sialic acid-recognizing proteins. *Nature*, 446: 1023-1029, 2007.
237. Varol, E., Varol, S.: Çevresel bir hastalık olarak florozis ve insan sağlığı üzerine etkisi. *TAF Prevent. Med. Bull.*, 9(3): 233-238, 2010.
238. Vatassery, G.T., Ophanq, R.H., Singer, L.: The effect of fluoride intake on the total lipids, cholesterol and vitamin E levels in serum and liver of guinea pigs on high fat diet. *Life Sci.*, 2: 1961-1966, 1980.

239. Wang, J., Zheng, Z.A., Zhang, L.S., Cao, D.M., Chen, K.Z., Lu, D.: An experimental study for early diagnostic features in fluorosis. *Fluoride*, 26: 61-65, 1993.
240. Wang, T., Himoe, A.: Kinetics of the rabbit muscle enolase-catalyzed dehydration of 2-phosphoglycerate, fluoride and phosphate inhibition. *J. Biol. Chem.*, 249(12): 3895–3902, 1974.
241. Wang, Y., Xiao, K., Liu, J., Dallner, G., Guan, Z.: Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. *Toxicology*, 146: 161-169, 2000.
242. Webb-Peploe, M. M., Bradle, W. G.: Endemic fluorosis with neurological complications in a Hampshire man. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 29: 577, 1966.
243. WHO: Fluorides. Geneva, World Health Organization. *Environmental Health Criteria*, 227, 2002.
244. WHO: Fluorine and fluorides. Geneva, World Health Organization. *Environmental Health Criteria*, 36, 1984.
245. WHO: Guidelines for drinking-water quality. Third Edition. Geneva., p. 221-459, 2006.
246. Wood, T.: Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem. Funct.*, 4: 235-240, 1986.
247. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S.: Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 134(3): 489-492, 2004.
248. Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R. L., 1999, A vital role glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99: 9142-9147, 1999.

249. Yerer, M.B., Aydoğan, S.: Oksidatif stres ve antioksidantlar. Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Derg., 9(1): 49-53, 2000.
250. Yıldırım, A., Aslan, Ş., Ocak, T., Yıldırım, S., Kara, F., Şahin, Y.N.: Travmalı hastalarda serum paraoksonaz/arilesteraz aktiviteleri ve malondialdehit düzeyleri. EAJM, 39(2): 85-88, 2007.
251. Yılmaz, S.: Florozisli koyunlarda nitrik oksit oksidasyon ürünleri, katalaz ve karbonik anhidraz aktivitelerinin araştırılması. YYÜ, Sağlık Bilimleri Ens, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
252. Yokoyama, H., Jensen, J.S., Myrup, B., Mathiesen, E.R., Ronn, B., Deckert, T.: Raised serum sialic acid concentration precedes onset of microalbuminuria in IDDM. Diabetes Care., 19(5): 435-440, 1996.
253. Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am. J. Obstet. Gynecol., 135: 372-381, 1979.
254. Yu, K. C., Cooper, A. D. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. Front. Biosci., 6: 332-354, 2001.
255. Zhan, X., Li, J., Xu, Z., Wang, M.: Effects of fluoride on pancreatic digestive enzyme activities and ultrastructure in young pigs. Fluoride, 38(3): 215-219, 2005a.
256. Zhan, X., Xu, Z., Li, J., Wang, M.: Effects of fluorosis on lipid peroxidation and antioxidant systems in young pigs. Fluoride, 38(2): 157-161, 2005b.
257. Zhan, X.A., Wang, M., Xu, Z.R., Li, J.X.: Toxic effects of F on kidney function and histology in young pigs. Fluoride, 39(1): 22-26, 2006a.
258. Zhan, X.A., Wang, M., Xu, Z.R., Li, W.F., Li, J.X.: Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs. Arch. Toxicol., 80: 74-80, 2006b.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Ardahan'da doğdu. İlkokulunu Ardahan ili Hanak ilçesi Serinkuyu Köyü'nde, ortaokul ve lise öğrenimini ise Hanak ilçesinde tamamladı. Lisans öğrenimini 2004'de Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nde tamamlayarak aynı yıl Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimini 2007-2008 akademik yılı bahar döneminde tamamlayarak takip eden dönemde Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olup, evlidir.