



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KURŞUN ASETAT MARUZİYETİ SONUCU OLUŞAN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI MİRİSETİN, KAEMFEROL,
FİSETİN VE GALANGİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Ayhan YİĞİT
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURŞUN ASETAT MARUZİYETİ SONUCU OLUŞAN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI MİRİSETİN, KAEMFEROL,
FİSETİN VE GALANGİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Ayhan YİĞİT
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ

VAN-2021

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2021-8970 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Kurşun Asetat Maruziyeti Sonucu Oluşan Nefrotoksisiteye Karşı Mirisetin, Kaemferol, Fisetin ve Galanginin Koruyucu Rolünün Araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayhan YİĞİT

Tarih: 12/07/2021

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ'e teşekkür ederim. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Yavuz YARDIM'a, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Oruç YUNUSOĞLU'na, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Serap YALIN'a, Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ferbal Özkan-YILMAZ'a ve Sayın Prof. Dr. Arzu Özlüer HUNT'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı Sayın Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ve Kurul üyelerine, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürü Sayın Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN'a, Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan KOŞAL'a, Araştırma Merkezi çalışanları Sayın Orhan ASLAN'a ve Sayın Sofi AŞKAN'a, tez çalışmamın proje olarak desteklenmesini sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, yüksek lisans tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Seda ÜNAL'a, Hava GEZİCİ'ye, Davut VOLKAN'a ve Oğuzhan ÇİFTÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Ayhan YİĞİT

ÖZET

YİĞİT A, Kurşun Asetat Maruziyeti Sonucu Oluşan Nefrotoksisiteye Karşı Mirisetin, Kaemferol, Fisetin ve Galanginin Koruyucu Rolünün Araştırılması, Van Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Eczacılık Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. Çalışmada; deneysel olarak kurşun asetat (LA) indüksiyonu oluşturulmuş sıçanlarda, antioksidan ve antienflamatuvar etkileri bilinen mirisetin, kaemferol, fisetin ve galangin uygulamasının böbrek dokusundaki oksidatif stres ve enflamatuvar yanıtı ne ölçüde engelleyebileceği ortaya konulmaya çalışıldı. Çalışmada 70 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek 10 gruba ayrıldı. Bu gruplar sırasıyla; kontrol, LA (100 mg/kg), LA+MYC100 (100 mg/kg), LA+MYC200 (200 mg/kg), LA+KMP100 (100 mg/kg), LA+KMP200 (200 mg/kg), LA+FST100 (100 mg/kg), LA+FST200 (200 mg/kg), LA+GLG100 (100 mg/kg) ve LA+GLG200 (200 mg/kg) gruplarıdır. Çalışmada kullanılan tüm maddeler 28 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın sonunda tüm hayvanlar anestezi altında, kardiyak puncture ile alınan kanlarından serum elde edildi, böbrek dokuları ise çıkartıldı. Serum örneklerinde üre, kreatinin ve kan üre azotu miktarları otoanalizörde ticari kit kullanılarak bakıldı. Böbrek dokularında ise lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) düzeyi, protein oksidasyonunu belirlemek için protein karbonil, toplam ve serbest tiyol düzeyleri, DNA oksidasyonunu belirlemek için 8-hidroksi deoksi guanozin (8-OH dG) düzeyi, antioksidan durumu belirlemek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rx), paraoksonaz (PON), aril esteraz (ARE) aktiviteleri ile redükte glutatyon (GSH) düzeyi, inflamatuvar yanıtın gözlenmesi için ise nitrik oksit (NOx) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) düzeyleri ölçüldü. Çalışmanın istatistik analizi SPSS v16.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi ve p değeri 0.05 ve daha küçük olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanıldı. Kurşun uygulamasının böbrek fonksiyon testlerini bozduğu, böbrek dokusundaki lipid peroksidasyonunu, protein ve DNA oksidasyonunu ve enflamatuvar yanıtı arttırdığı, antioksidan savunma sistemini ise zayıflattığı görüldü (p<0.05). Mirisetin ve fisetin uygulamasının ise böbrek dokusundaki oksidatif stresi ve enflamasyonu önlediği gözlemlendi (p<0.05). Sonuç olarak özellikle yüksek dozda mirisetin ve fisetin uygulamalarının oluşabilecek nefrotoksisitenin önüne geçebileceği, kaemferol ve galanginin ise istenildiği kadar koruyucu bir etkiye sahip olmadığı görüldü. Ancak yine de kurşun kullanımı mümkün olduğunca sınırlandırılmalı, şayet kullanılacaksa azami ölçüde gerekli önlemler alınarak çevreye olan aşırı yayılımı asgari düzeye indirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Flavonoidler, Kurşun Asetat, Nefrotoksisite, Oksidatif Stres.

ABSTRACT

YİĞİT A, Investigation of the Protective Role of Myricetin, Kaempferol, Fisetin and Galangin Against Nephrotoxicity Caused by Lead Acetate Exposure, Van Y.Y.Ü. Institute of Health Sciences, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Biochemistry Science, Master Thesis, Van, 2021. In this study, it was tried to reveal to what extent the administration of myricetin, kaempferol, fisetin and galangin, which are known to have antioxidant and anti-inflammatory effects, can prevent oxidative stress and inflammatory response in the kidney tissue in rats with experimental lead acetate (LA) induction. 70 rats were used in the study. Rats were randomly selected and divided into 10 groups. These groups are respectively; control, LA (100 mg/kg), LA+MYC100 (100 mg/kg), LA+MYC200 (200 mg/kg), LA+KMP100 (100 mg/kg), LA+KMP200 (200 mg/kg), LA+FST100 (100 mg/kg), LA+FST200 (200 mg/kg), LA+GLG100 (100 mg/kg) and LA+GLG200 (200 mg/kg) groups. All substances used in the study were given by gavage every day for 28 days. At the end of the study, serum was obtained from the blood of all animals taken by cardiac puncture under anesthesia, and kidney tissues were removed. The amounts of urea, creatinine and blood urea nitrogen in serum samples were measured in an autoanalyzer using a commercial kit. In kidney tissues, malondialdehyde (MDA) level to determine lipid peroxidation, protein carbonyl, total and free thiol levels to determine protein oxidation, 8-hydroxy deoxy guanosine (8-OH dG) level to determine DNA oxidation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rx), paraoxonase (PON), aryl esterase (ARE) activities and reduced glutathione (GSH) level, and nitric oxide for observing the inflammatory response. (NOx) and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels were measured. Statistical analysis of the study was performed using SPSS v16.0 statistical program. Obtained data were expressed as mean±standard deviation, and data with a p value of 0.05 or less were considered statistically significant. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were used to evaluate biochemical parameters. It was observed that lead administration impaired kidney function tests, increased lipid peroxidation, protein and DNA oxidation and inflammatory response in kidney tissue, and weakened the antioxidant defense system ($p<0.05$). It was observed that myricetin and fisetin administration prevented oxidative stress and inflammation in kidney tissue ($p<0.05$). As a result, it was observed that especially high-dose myricetin and fisetin applications could prevent nephrotoxicity, while kaempferol and galangin did not have a protective effect as desired. However, the use of lead should be limited as much as possible, and if it is to be used, necessary precautions should be taken to the maximum extent and its excessive release to the environment should be minimized.

Key Words: Antioxidant, Flavonoids, Lead Acetate, Nephrotoxicity, Oxidative Stress.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
TABLolar LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağır Metaller.....	3
2.2. Kurşun.....	7
2.2.1. Kurşun Üretimi.....	8
2.2.2. Kurşun Maruziyetinin Kaynakları.....	9
2.2.3. Kurşunun Toksikokinetiği.....	11
2.2.4. Kurşun Maruziyetinin Patogenezi.....	12
2.2.5. Kurşunun Toksik Etkileri.....	13
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	16
2.3.1. Serbest Radikaller	16
2.3.2. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri.....	17
2.3.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	18
2.3.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri.....	19
2.3.5. Oksidatif Stres.....	20
2.3.6. Malondialdehit.....	21
2.3.7. 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin.....	22
2.4. Enflamasyon.....	23
2.4.1. Enflamasyon Biyobelirteçleri.....	23
2.5. Antioksidan Sistem.....	25
2.5.1. Süperoksit Dismutaz.....	26

2.5.2. Katalaz.....	26
2.5.3. Glutasyon Peroksidaz.....	26
2.5.4. Redükte Glutasyon.....	27
2.5.5. Paraoksonaz ve Arilesteraz.....	28
2.6. Kurşun Maruziyetinin Oksidatif Strese Etkileri.....	28
2.6.1. Kurşunun Hücre Membranlarına Etkisi.....	29
2.6.2. Kurşunun DNA Üzerine Etkisi.....	30
2.6.3. Kurşunun Hücresel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkileri.....	31
2.7. Kurşun Maruziyetinin Tanısı.....	33
2.8. Kurşun Maruziyetinin Tedavisi.....	33
2.8.1. Kurşun Maruziyetinin Tedavisinde Antioksidanların Kullanımı.....	35
2.9. Mirisetin.....	39
2.10. Kaemferol.....	42
2.11. Fisetin.....	45
2.12. Galangin.....	46
2.13. Çalışmanın Amacı.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48
3.1.1. Deney Hayvanları	48
3.1.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar	48
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	50
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Hayvanlara Uygulanan Maddelerin Hazırlanması	50
3.2.2. Hayvan Gruplarının Oluşturulması	51
3.2.3. Hayvanların Anesteziye Alınması, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	52
3.2.4. Böbrek Dokularının Homojenizasyonu	52
3.2.5. Serum Analizleri	52
3.2.6. Böbrek Dokusu Analizleri	52
3.2.7. Malondialdehit Düzeyi Tayini	53
3.2.8. Protein Karbonil Düzeyi Tayini	54
3.2.9. Toplam ve Serbest Tiyo Düzeylerinin Tayini	54
3.2.10. 8-Hidroksi Deoksi Guanozin Düzeyi Tayini	55

3.2.11. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	56
3.2.12. Katalaz Aktivitesi Tayini	58
3.2.13. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini	58
3.2.14. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini	59
3.2.15. Paraoksonaz Aktivitesi Tayini	60
3.2.16. Aril Esteraz Aktivitesi Tayini	61
3.2.17. Redükte Glutasyon Düzeyi Tayini	62
3.2.18. Nitrik Oksit Düzeyi Tayini	63
3.2.19. Prostaglandin E ₂ Düzeyi Tayini	64
3.2.20. Doku Protein Düzeyi Tayini	65
3.2.21. İstatistik Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1. Serum Üre Düzeyi Sonuçları	67
4.2. Kan Üre Azotu Düzeyi Sonuçları	68
4.3. Serum Kreatinin Düzeyi Sonuçları	69
4.4. Böbrek Dokusu MDA Düzeyi Sonuçları	70
4.5. Böbrek Dokusu Protein Karbonil Düzeyi Sonuçları	71
4.6. Böbrek Dokusu Total Tiyoil Düzeyi Sonuçları	72
4.7. Böbrek Dokusu Serbest Tiyoil Düzeyi Sonuçları	73
4.8. Böbrek Dokusu 8-OH dG Düzeyi Sonuçları	74
4.9. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları	75
4.10. Böbrek Dokusu Katalaz Aktivitesi Sonuçları	76
4.11. Böbrek Dokusu GSH-Px Aktivitesi Sonuçları	77
4.12. Böbrek Dokusu GSH-Rx Aktivitesi Sonuçları	78
4.13. Böbrek Dokusu PON Aktivitesi Sonuçları	79
4.14. Böbrek Dokusu ARE Aktivitesi Sonuçları	80
4.15. Böbrek Dokusu GSH Düzeyi Sonuçları	81
4.16. Böbrek Dokusu NO _x Düzeyi Sonuçları	82
4.17. Böbrek Dokusu PGE ₂ Düzeyi Sonuçları	83
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	115

EKLER	116
EK 1. Kesin Sonuç Raporu.....	116
EK 2. Tez Orijinallik Raporu	117



SİMGELER VE KISALTMALAR

4-HNE	: 4-hidroksinonenal
8-OH dG	: 8-hidroksi-deoksiganosin
ALA	: δ -aminolevulinik asit
ALAD	: δ -aminolevulinik asit dehidrataz
ANOVA	: Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi
ARE	: Arilesteraz
ATP	: Adenozin trifosfat
Bo	: Maksimum bağlanma
BSA	: Bovin serum albumin
BUN	: Kan üre azotu
CAT	: Katalaz
cGMP	: 3',5'-siklik guanozin monofosfat
COX-2	: Siklooksijenaz 2
ÇSS	: Çevresel sinir sistemi
CuZn SOD	: Bakır-çinko SOD
DMPS	: Dimerkaptopropan 1-sülfonat
DMSA	: Dimerkaptosüksinik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNPH	: 2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	: 5, 5' dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
eNOS	: Endotel nitrik oksit sentaz
Et4Pb	: Tetraetil kurşun
Fe-NTA	: Ferik nitrilo triasetat
FST	: Fisetin
G6PH	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GABA	: Gama aminobütirik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GLG	: Galangin
GSH	: Redükte glutatyon

GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
i.p.	: İntraperitoneal
IL-33	: İnterlökin-33
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KMP	: Kaemferol
LA	: Kurşun asetat
LD50	: Letal doz-50
MDA	: Malondialdehit
Me4Pb	: Tetrametil kurşun
MG	: Metilglioksal
MnSOD	: Manganez SOD
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MYC	: Mirisetin
NAC	: N-asetil sistein
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
NEDD	: N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOx	: Nitrik oksit
NSB	: Spesifik olmayan bağlanma
PbCO₃	: Serüsit
PbS	: Galen
PbSO₄	: Anglezit
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PI3-kinaz	: Fosfatidil inositol-3 kinaz

PON	: Paraoksonaz
Prx	: Peroksiredoksin
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAM	: S-adenozil-L-metiyonin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TA	: Total aktivite
TAC	: Total antioksidan kapasite
TBA	: Tiobarbitürik asit
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri
TCA	: Trikloroasetik asit
ThT	: Tioflavin T
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
UV	: Ultraviyole
UV-B	: Ultraviyole-B
VCl3	: Vanadium klorür
ΔOD	: Zamana göre absorbans değişimi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Oksijen ve azot kaynaklı aktif bileşikler	17
Şekil 2. Organizmada antioksidan sistem elemanları	26
Şekil 3. Mirisetinin moleküler yapısı	40
Şekil 4. Kaemferolun moleküler yapısı	43
Şekil 5. Fisetinin moleküler yapısı	45
Şekil 6. Galanginin moleküler yapısı	46
Şekil 7. Serum üre düzeyleri	67
Şekil 8. Kan üre azotu düzeyleri	68
Şekil 9. Serum kreatinin düzeyleri	69
Şekil 10. Böbrek dokusu MDA düzeyleri	70
Şekil 11. Böbrek dokusu protein karbonil düzeyleri	71
Şekil 12. Böbrek dokusu toplam tiyol düzeyleri	72
Şekil 13. Böbrek dokusu serbest tiyol düzeyleri	73
Şekil 14. Böbrek dokusu 8-OH dG düzeyleri	74
Şekil 15. Böbrek dokusu SOD aktiviteleri	75
Şekil 16. Böbrek dokusu katalaz aktiviteleri	76
Şekil 17. Böbrek dokusu GSH-Px aktiviteleri	77
Şekil 18. Böbrek dokusu GSH-Rx aktiviteleri	78
Şekil 19. Böbrek dokusu PON aktiviteleri	79
Şekil 20. Böbrek dokusu ARE aktiviteleri	80
Şekil 21. Böbrek dokusu GSH düzeyleri	81
Şekil 22. Böbrek dokusu NOx düzeyleri	82
Şekil 23. Böbrek dokusu PGE ₂ düzeyleri	83

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar	20
Tablo 2. MDA düzeyinin tayininde yapılan pipetleme	53
Tablo 3. GSH-Px aktivitesinin tayininde yapılan pipetleme	59
Tablo 4. Doku protein düzeyinin tayininde yapılan pipetleme	65



1. GİRİŞ

Kurşun, yerkabuğunun en yaygın beşinci elementi olup doğal olarak oluşmaktadır. Oldukça zehirli bir ağır metaldir. Ayrıca bitki, hayvan, su, hava ve toprakta hem serbest hem de bileşik halinde yer alır. Kurşunun birçok fiziksel özelliği, endüstriyel ölçekte kullanım alanını artırmaktadır. Geçmişte ve günümüzde, kurşunun diğer kullanım alanları kurşunlu benzin, boya, seramik, su boruları, lehim, kozmetik, saç boyaları, çiftlik ekipmanları ile uçak, röntgen makineleri ve binada kullanılan korozyon ve asit dirençli malzemelerin üretimini içine alır. Boya ve benzinde kullanımı artık yasak olmasına rağmen, toprakta kısa sürede yıkımlanmaması nedeniyle özellikle yakıtlardan ileri gelen kurşuna canlıların maruziyeti hala devam etmektedir. Kurşun kaynaklı toksisite genel olarak kurşunla kontamine içme suyu, gıda, boya, bitkisel ilaçlar, benzin katkı maddeleri, içme suyu boruları, halk sağlığı ilaçları vb. bileşiklere maruziyet sonucu ortaya çıkar (Hermes-Lima ve ark., 1991).

Kurşuna maruziyet, başlıca ağız ve solunum yoluyla gerçekleşmektedir. Emilen kurşun, vücutta kanla özellikle dokulara ve kalsiyumunkine benzer bir mekanizma ile kemiğe girer. Ayrıca merkezi sinir sistemi, böbrekler, karaciğer ve kalbi de etkiler. Emilen kurşun karaciğerde konjuge forma dönüşür ardından böbreklere geçerek düşük oranda atılır. Yüksek oranda ise çeşitli organlarda birikim özelliği gösterir (Hermes-Lima ve ark., 1991).

Kurşun, proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak merkezi ve çevresel sinir sistemi ile böbrek ve vasküler sistemi de etkiler. Organlara yönelik çoklu etkilerinin yanı sıra aynı zamanda oksidatif strese de yol açmaktadır. Oksidatif stres oluşturma mekanizmaları, hücre zarına kurşunun doğrudan etkisi, kurşun-hemoglobin etkileşimi, gama-aminolevulinik asitin yol açtığı serbest radikal üretimi ve hücresel antioksidan savunma sistemine müdahalesi şeklinde özetlenebilir. Aynı zamanda, glutasyonla da birleşerek oksidatif strese sebep olur. Ek olarak, sülfidril içeren enzimleri inhibe eder ve enzim aktivitelerinde rol alan metallerle etkileşime girer. Bütün bu reaksiyonlar, lipid oksidasyonuna yol açar; zar akışkanlığını ve yağ asit kompozisyonunu değiştirir (Rogers ve ark., 1971; Calderon-Salinas ve ark., 1993; Gurer ve Ercal, 2000).

Literatürde gerek kurşuna gerekse diğer ağır metallere maruziyet sonucunda ortaya çıkan oksidatif stresin önlenmesi için çeşitli flavonoidler ve flavonoidlerce zengin bitki ekstraktları denenmiş ve bunlardan bazılarında olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak kurşun asetat intoksikasyonu sonucunda oluşan oksidatif strese karşı güçlü antioksidan özellikleri olduğu bilinen mirisetin, kaemferol, fisetin ve galanginin koruyucu etkileri araştırılmamıştır.

Mirisetin, flavonol grubu bir moleküldür. Bu molekülün hücreleri serbest radikallerle oluşan hücre hasarından koruduğu çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur. Mirisetin'in antioksidan özelliğinin yanı sıra, anti-kanser, anti-diyabetik ve benzeri terapötik olabilecek özellikleri olduğu da bildirilmektedir (Ong ve Khoo, 1997). Kaemferol, brokoli, lahana, fasulye, hindiba, pırasa, domates, çilek, üzüm ve çay gibi rutin gıdalarla alınan birçok bitkinin içinde bol miktarda bulunan bir flavonoidtir (Dabeek ve Marra 2019). Fisetin, benzersiz bir flavanoid türevidir olup özellikle çilek, mango, elma, üzüm, soğan ve salatalık olmak üzere pek çok meyve ve sebzede az miktarda bulunmaktadır. Fisetinin antikanser, anjiogenez inhibisyonu ve antiallerjik olmak üzere birçok farmakolojik özelliği tespit edilmiştir. Aynı zamanda hem glikojenolizisi hem de glukoneogenezi baskılayarak antidiyabetik potansiyeli olduğu *in vitro* gösterilmiştir. Fisetin iskemi ve oksidatif stres gibi toksik uyarılardan sinir hücre kültürlerini korumaktadır. Direkt antioksidan kapasitesinin yanı sıra major intraselüler antioksidan olan glutasyon seviyesini de artırmaktadır (Lu ve ark., 2005; Bhat ve ark., 2012; Goh ve ark., 2012). Galangin en etkili antioksidatif flavonoidlerden birisi olup birçok biyolojik aktivite rol almaktadır. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda galanginin çeşitli mutajenlerin DNA'ya bağlanmasını veya DNA'yı metillemesini azaltarak antigenotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Heo ve ark., 2001).

Yapılan bu çalışmada deneysel olarak kurşun asetat indüksiyonu oluşturulmuş sıçanlarda, antioksidan ve antienflamatuvar etkileri bilinen mirisetin, kaemferol, fisetin ve galanginin uygulamalarının böbrek dokusundaki oksidatif stres ve enflamatuvar yanıtı ne ölçüde engelleyebileceği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

Ağır metal terimi genel olarak kirletici ve yüksek oranda toksikolojik veya ekotoksikolojik potansiyele sahip metalleri ve yarı metalleri (metaloid) içine alan bir grup metal için kullanılmaktadır. Bu kapsamdan dolayı ağır metal olarak kabul edilen elementler söz konusu olduğunda, gerçekte birbirlerinden oldukça farklı özellikleri olan elementler topluluğu anlatılmak istenmektedir (Buha ve ark., 2021).

Literatürdeki ağır metal tanımları incelendiği zaman yoğunluk, atom ağırlığı, atom numarası ve diğer kimyasal özelliklere göre çeşitli ağır metal tanımları bulunmaktadır. Yoğunluğa göre yapılan tanımlarda; en düşük 3.5 g/cm^3 den başlamak üzere 7 g/cm^3 ve üzeri yoğunluğa sahip elementlerin ağır metal olduğunu belirten pek çok farklı ağır metal tanımı bulunmaktadır. Atom ağırlığına göre yapılan tanımlarda ise; “atom ağırlığı sodyumdan büyük olanlar” veya “atom ağırlığı 40’dan büyük olan metaller ağır metaldir” şeklinde tanımlar bulunmaktadır. Eğer atom ağırlığı sodyumdan fazla olan metaller ağır metal olarak kabul edilirse, ağır metaller magnezyum elementinden itibaren başlamakta, atom ağırlığı 40’dan fazla olan elementler ağır metal olarak kabul edilirse, ağır metaller skandiyum elementinden itibaren başlamaktadır. Atom numarasına göre yapılan tanımlarda ise; “atom numarası kalsiyumdan fazla olan metaller”, “atom numarası 20 den fazla olan metaller” ve “atom numarası 21 (skandiyum) ila 92 (uranyum) arasında olan metaller ağır metal olarak kabul edilmektedir” şeklinde tanımlar bulunmaktadır. Ağır metallerin skandiyumdan itibaren başladığını belirten tanımlar kabul edildiğinde ise, bu durumda yoğunluğu 3 g/cm^3 ’ün altında olan elementler de ağır metal kategorisine girmektedir (Buha ve ark., 2021).

Literatürde pek çok ağır metal tanımı olmasına karşın, günümüzde ağır metaller için herkes tarafından kabul edilmiş ve fikir birliğine varılmış tek bir tanım bulunmamaktadır (Balali-Mood ve ark., 2021). Duffus ağır metal terimini yanlış kullanılan ve anlamsız bir terim olarak kabul etmekte ve bu nedenle periyodik tablo temelli olarak yeni bir metal sınıflandırılma yapılması gerektiğini bildirmektedir (Buha ve ark., 2021).

Ağır metaller yer kabuğunun doğal bileşenleri olup bozunmayan ve yok edilmeyen bileşiklerdir (Rahman ve ark., 2019; Wu ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020). Ağır metallerin genellikle yer kabuğunun derinliklerinde bulunmalarından dolayı, doğal yollar ile canlılara geçme olasılığı azdır. Ancak insan faktörü nedeni ile bu durum günümüzde tamamen ortadan kalkmış ve ağır metaller ekosistemin her tarafında bulunur hale gelmiştir (Wu ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020). Son yüz yıl içerisinde madencilik faaliyetlerinin sınırlandırılmamış olması, fosil yakıtların kullanılması, sanayi ve endüstriyel faaliyetlerin artması, bu faaliyetlerde ağır metallerin kullanılması ve ağır metal içeren atıkların doğrudan veya işlem gördükten sonra doğaya verilmesi gibi insan faktöründen kaynaklanan nedenlerle biyosferde büyük oranda ağır metal kirliliği gerçekleşmektedir. Bugünün endüstri toplumunda toksik kimyasallara ve ağır metallerle maruz kalma kaçınılmaz hale gelmiştir. Ağır metallerin yaşama olan tehditleri her geçen gün artmaktadır. Çünkü her yıl çevreye eklenen ağır metal kirliliğinin toksisite toplamı, tüm organik ve radyoaktif atıkların birleşiminin toksisite toplamını geçmektedir (Pan ve ark., 2018; Fu ve ark., 2020). Atmosfere giren ağır metaller uzak mesafelere taşınabilmekte ve bazı formları canlıların yaşamını tehdit etmektedir (Rahman ve ark., 2019; Wu ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020).

Bazı ağır metalleri de içine alan çeşitli elementler canlıların yaşamlarını devam ettirilmesi için mutlaka gereklidirler (Pan ve ark., 2018; Fu ve ark., 2020). İz element olarak ta adlandırılan bu metaller/elementler veya bazı formları sebze, meyve, gıda maddeleri ve ticari olarak satılan multi-vitamin ürünlerinde bulunmaktadır (Bjørklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020). İz elementlere örnek olarak demir, çinko ve bakır verilebilir. Çinko pek çok enzim için kofaktör olarak görev alırken, demir de aneminin önlenmesinde rol oynamaktadır. Normal şartlarda bu metaller canlılarda düşük miktarlarda bulunurlar (Cao ve ark., 2015). Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda canlılar için toksik olabilirler (Amadi ve ark., 2019). Kurşun, kadmiyum ve cıva gibi ağır metaller ise herhangi bir biyolojik rolü olmayan ve düşük konsantrasyonlarda bile canlılar için toksik olan metallerdir (Cao ve ark., 2015; Bjørklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020).

Ağır metaller yer kabuğunun doğal bileşenleri olup bozunmayan ve yok edilmeyen bileşiklerdir (Wu ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020). Ağır metallerin genellikle

yer kabuğunun derinliklerinde bulunmalarından dolayı, doğal yollar ile canlılara geçme olasılığı azdır. Ancak insan faktörü nedeni ile bu durum günümüzde tamamen ortadan kalkmış ve ağır metaller ekosistemin her tarafında bulunur hale gelmiştir (Rahman ve ark., 2019; Wu ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020). Son yüz yıl içerisinde madencilik faaliyetlerinin sınırlandırılmamış olması, fosil yakıtların kullanılması, sanayi ve endüstriyel faaliyetlerin artması, bu faaliyetlerde ağır metallerin kullanılması ve ağır metal içeren atıkların doğrudan veya işlem gördükten sonra doğaya verilmesi gibi insan faktöründen kaynaklanan nedenlerle biyosferde büyük oranda ağır metal kirliliği gerçekleşmektedir. Bugünün endüstri toplumunda toksik kimyasallara ve ağır metallere maruz kalma kaçınılmaz hale gelmiştir. Ağır metallerin yaşama olan tehditleri her geçen gün artmaktadır. Çünkü her yıl çevreye eklenen ağır metal kirliliğinin toksisite toplamı, tüm organik ve radyoaktif atıkların birleşiminin toksisite toplamını geçmektedir (Björklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020). Atmosfere giren ağır metaller uzak mesafelere taşınabilmekte ve bazı formları canlıların yaşamını tehdit etmektedir (Rahman ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020).

Bazı ağır metalleri de içine alan çeşitli elementler canlıların yaşamlarını devam ettirilmesi için mutlaka gereklidirler (Björklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020). İz element olarak ta adlandırılan bu metaller/elementler veya bazı formları sebze, meyve, gıda maddeleri ve ticari olarak satılan multi-vitamin ürünlerinde bulunmaktadır [9]. İz elementlere örnek olarak demir, çinko ve bakır verilebilir. Çinko pek çok enzim için kofaktör olarak görev alırken, demir de aneminin önlenmesinde rol oynamaktadır. Normal şartlarda bu metaller canlılarda düşük miktarlarda bulunurlar. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda canlılar için toksik olabilirler (Rahman ve ark., 2019; Sall ve ark., 2020). Kurşun, kadmiyum ve cıva gibi ağır metaller ise herhangi bir biyolojik rolü olmayan ve düşük konsantrasyonlarda bile canlılar için toksik olan metallerdir (Björklund ve ark., 2019).

Ağır metaller metabolize edilemedikleri ve biyobirikim eğilimleri oldukları için tehlikelidirler (Björklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020). Biyobirikim terimi zamanla bir organizmada bir kimyasal konsantrasyonunun, kimyasalın doğadaki konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artması olarak ifade edilmektedir. Biyobirikimin nedeni bileşiğin organizmaya alınmasının ve depolanmasının, metabolize edilmesi

veya atılmasından daha hızlı olmasından kaynaklanmaktadır (Björklund ve ark., 2019). Meslekleri gereği ağır metallere maruz kalan insanlar hariç, canlıların ve insanların ağır metallere maruz kalmalarındaki ana yol kontamine olmuş su ve besinlerin alınması yani besin zinciridir (Mathew ve ark., 2016; Wu ve ark., 2016; Mishra ve ark., 2017). Ağır metaller ayrıca solunum ve deri yolu ile de organizmaya geçebilmektedirler (Wu ve ark., 2016; Mishra ve ark., 2017).

Ağır metallere maruz kalma bir çevresel stres faktörü olarak ta değerlendirilebilir. Ağır metal stresi ve toksisitesi hemen hemen tüm fizyolojik mekanizmalar üzerine çoklu doğrudan ve dolaylı etkilere sahiptir (Mathew ve ark., 2016; Wu ve ark., 2016). Ağır metal toksisitelerinin patofizyolojisi genel olarak benzerdir (Shahid ve ark., 2014). Toksik metaller tarafından oluşan hasarın çoğu sebep oldukları oksidatif serbest radikallerin artışından kaynaklanmaktadır (Shahid ve ark., 2014; Mirkov ve ark., 2020). Bu hasarlar artan lipid peroksidasyonunu, DNA hasarını ve protein sülfidril gruplarının oksidasyonunu içermektedir (Shahid ve ark., 2014). Ağır metaller pro- oksidan/antioksidan dengesini değiştirmekte ve proteinlerin sülfidril gruplarına karşı yüksek affinite göstermektedirler. Sülfidril gruplarına bağlanmaları sonucu ağır metaller glutatyon metabolizmasının, çeşitli enzimlerin ve hormonların fonksiyonlarının inhibisyonuna yol açarlar (Shahid ve ark., 2014; Mirkov ve ark., 2020).

Genel olarak ağır metaller nörotoksik, nefrotoksik, fetotoksik ve teratojenik etkileri olan sistemik toksinlerdir (Björklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020). Hemen hemen bütün organlar ağır metal toksisitesinden etkilenmektedir. Ancak, genel olarak merkezi sinir sistemi (MSS), çevresel sinir sistemi (ÇSS), hematopoietik, böbrek, mide barsak kanalı, kardiovasküler sistem daha büyük oranda etkilenirken, iskelet-kas sistemi ve üreme sistemi daha az oranda etkilenmektedir. Organların bu toksisiteden etkilenme dereceleri metalin türüne, bireyin yaşına ve maruz kalınan doza göre değişmektedir (Sall ve ark., 2020). Ağır metaller metabolik mekanizmaları değiştirerek, nörotransmitter üretimi ve kullanımını etkileyerek, mental ve nörolojik fonksiyonları zayıflatarak, davranış yapısını doğrudan etkileyebilirler. Toksik metaller alerjik reaksiyonları artırabilir, genetik mutasyonlara neden olabilir, biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli olan faydalı iz elementleri ile yarışabilir ve antibiyotik

olarak rol alıp faydalı bakterileri öldürebilirler. Ağır metallerin biyolojik yarı ömürleri oldukça uzundur ve bazı ağır metaller karsinojenik etkiye sahiptirler. Pek çok ağır metal, plasentaya ve anne sütüne geçebilir ve dolayısı ile çocuklarda da ciddi davranış, entelektüel ve gelişim bozukluklarına yol açabilirler (Shahid ve ark., 2014; Mirkov ve ark., 2020). Çocuklar ağır metallerin toksisitesine daha duyarlıdır. İnorganik kurşun tuzları vücuda besin veya solunum yolu ile girmektedir. Yetişkinlerde besin ile alınan kurşunun yaklaşık % 10'u absorbe edilirken, çocuklarda bu oran % 50 olabilmektedir (Björklund ve ark., 2019; Fu ve ark., 2020).

Endüstriyel faaliyetlere ilaveten alaşım, lehim, pestisit spreyleri, bakır borular, pişirme kapları, sigara dumanı, diş dolguları, lateks boyalar, piller, elektrokaplama, çelik imalatı ve kozmetikler ağır metal kaynağıdır. Ağır metal zehirlenmelerinde ilk belirtiler bulantıdır. Bulantı ile birlikte baş ağrısı, yorgunluk, kas ağrısı, hazımsızlık, titreme, kabızlık, anemi, beniz sarılığı, baş dönmesi ve koordinasyon bozukluğu ağır metal zehirlenmesindeki erken belirtilerdir. Toksikite artıkça belirtilerin şiddeti de artmaktadır (Shahid ve ark., 2014; Björklund ve ark., 2019; Mirkov ve ark., 2020). Deneysel çalışmalar ağır metallerin çeşitli immün sistem parametrelerini etkilediği ve enfeksiyonlara, otoimmün hastalıklara ve alerjik cevaplara karşı duyarlılığa neden olduğunu göstermektedir (Shahid ve ark., 2014; Mirkov ve ark., 2020).

2.2. Kurşun

Kurşun yer kabuğunda doğal olarak bulunan mavimsi gri renkte ağır bir metaldir. Doğada nadiren metal halinde bulunan kurşun, daha çok iki ya da daha fazla elementle biraraya gelerek kurşun bileşiklerini oluşturur. Genellikle çinko, gümüş ve bakır madenlerinde bulunur ve bu metallerle birlikte çıkarılır. Çıkarılması ve işlenmesi kolay olduğundan, doğada yaygın olarak bulunduğu ve çeşitli alaşımlar meydana getirebilme özelliğinden dolayı tarihte bilinen ve kullanılan en eski metallerden biridir. Bununla birlikte korozyon direnci, yoğunluğu, düşük erime sıcaklığı, kurşun ve kurşun bileşiklerinin kolay şekillendirilebilir olması nedeniyle modern endüstride de önemli bir yeri vardır (Willers ve ark., 1988; Morisi ve ark., 1992; Mulware ve ark., 2013; Panchal ve ark., 2021).

Kurşunun atomik ağırlığı 207.19'dur. 1 µg kurşun 0.004826 µmol'dur (Baxter ve ark., 1915). Kurşunun doğada dört adet kararlı izotopu bulunur; ²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb ve

^{208}Pb . Kurşun izotoplarından sadece bir tanesi (^{204}Pb) radyoaktif bozunma sonucu oluşmaz. Diğer kurşun izotopları ise radyoaktif bozunma sonucu oluşur. Uranyum serisi bozunmanın son ürünü ^{206}Pb , toryum serisi bozunmanın son ürünü ^{208}Pb ve aktinyum serisi bozunmanın son ürünü ^{207}Pb 'dur. Farklı kurşun örneklerinde bu dört kararlı izotopun bolluk oranları değişmektedir. Bu nedenle kurşunun farklı izotopları arasında sabit bir oran yoktur. Bu oran kurşun örneğinin hangi jeolojik kaynaktan alındığına bağlı olarak değişmektedir. Kurşunun yoğunluğu 11.3 g/cm^3 , kaynama noktası 1740°C , erime noktası ise 327.5°C 'dir. Metalik kurşunun suda çözünmesi zordur ancak nitrik asit ve konsantre sülfürik asitte çözünür (Osman ve ark., 1998; Cheema ve ark., 2020).

Kurşun periyodik tablonun IVA grubunda yer alır (Osman ve ark., 1998). Kurşunun görünümü bileşiğinin fiziksel yapısına göre değişiklik gösterir. Kurşun +2 ya da +4 değerlikli olarak bulunur. İnorganik kurşun bileşikleri genellikle +2 değerlikli kurşun içerir. +2 değerlikli kurşunun kimyasal özellikleri grup 2 metallerine (berilyum, magnezyum, kalsiyum, stronsiyum ve baryum) benzemektedir (Sun ve ark., 2002).

2.2.1. Kurşun Üretimi

İnorganik Kurşun Üretimi

Dünya madenlerinde yılda yaklaşık 3 milyon ton kurşun üretilmektedir. Madenlerden çıkarılan kurşunun üçte ikisinden fazlası Çin, Avusturalya, Birleşik Devletler ve Peru'da üretilmektedir (Sun ve ark., 2002). Kurşunun geri dönüştürüldüğü de düşünülürse dünyada kurşun tüketiminin çok fazla olduğu görülecektir. 2001 ve 2004 yılları arasında toplam kurşun tüketimi 6.5 milyon tondan 7.0 milyon tona çıkmıştır (Flora ve ark., 2012).

Sülfür minerali galen (PbS), onun oksitlenmiş ürünleri olan serüsit (PbCO_3) ve anglezit (PbSO_4) kurşunun en sık rastlanan cevherleridir. Bu minerallerden en önemlisi ise galendir (Mudipalli ve ark., 2007).

Organik Kurşun Üretimi

Endüstriyel önemi olan organik kurşun bileşikleri sadece tetra metil kurşun (Me_4Pb) ve tetra etil kurşun (Et_4Pb)'dur. Her iki bileşiğin de suda çözünürlüğü düşüktür ve her iki bileşik de oldukça lipofiliktir. Tetra metil kurşunun yoğunluğu 1.99 g/cm^3 , erime noktası -28°C , kaynama noktası 110°C , buharlaşma basıncı ise 0.03 kPa 'dır. Tetra etil kurşunun yoğunluğu 1.66 g/cm^3 , erime noktası -137°C , kaynama noktası 198°C ,

buharlaşma basıncı ise 0.03 kPa'dır (Hirsch ve ark., 2010).

Birçok ÷lkede Me₄Pb ve tetra Et₄Pb'un benzinde katkı maddesi olarak kullanımı büyük ölçüde azalmıştır ancak Afrika gibi bazı ÷lkelerde kurşun içeren benzinin kullanımı devam etmektedir. 1970'li yılların başlarında sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda benzine yaklaşık 250000 ton kurşun eklenmiştir (Needleman, 2004).

2.2.2. Kurşun Maruziyetinin Kaynakları

Gizli ve kalıcı bir toksik metal olan kurşun doğada yok edilememektedir. Kurşun önemli ve yaygın bir çevresel kirleticidir. Bu nedenlerle kurşunun neden olduğu kirlilik popülasyonu geniş ölçüde etkilemektedir (Chandran ve Cataldo, 2010).

Kurşun çevreye madenlerden ve fabrikalardan yayılabilmektedir. Özellikle işlek oto yolların, eski evlerin, madenlerin, kurşun arsenatın pestisit olarak kullanıldığı eski meyve bahçelerinin, endüstri bölgelerinin, elektrik santrallerinin, çöp fırınlarının ve zararlı atıkların bulunduğu bölgelerin yakınlarında toprakta yaygın olarak kurşun bulunur. Kurşun bir kez toprağa düştükten sonra toprak zerrecilerine sıkıca yapışır ve toprağın üst yüzeyinde kalır. Bu nedenle geçmiş tarihlerde benzin, ev boyaları ve pestisitlerde kullanılan kurşun, toprakta bulunan kurşun miktarını önemli ölçüde etkilemektedir (Rosin, 2009).

Toprak yağmur suları ile taşındığında, az miktarda da olsa kurşun nehirlerle ve göllere karışabilir. İnsanlar soludukları hava, içtikleri su, yedikleri yiyecekler veya yuttukları toz ve kir zerrecikleri ile kurşuna maruz kalabilmektedir (Kumar ve Scott Clark, 2009).

Bazı mesleklerde çalışan işçiler yüksek dozda kurşuna maruz kalır. Cephane, pil, levha, lehim, bazı bronz ve prinç su tesisatları, seramik cila, astar, radyasyon zırhı, devre levhası, akü, tel ve kablo, jet tribün motorları, askeri izleme sistemleri gibi ekipmanlar, damar içi pompaları, bazı ameliyat malzemeleri ve yapı kaplamaları üretiminde çalışan işçiler kurşuna maruz kalmaktadır. İnşaat işçilerinin de yüksek oranda kurşuna maruz kalma risklerinin olduğu bilinmektedir (Gottesfeld ve Pokhrel, 2011).

Kurşun içeren boyalar çocuklar için kurşuna maruziyetin ana kaynağıdır (Rusyniak ve ark., 2010). Bu boyalar bozuldukça kurşun havada taşınmaya başlar, toprağa ve tozlara bulaşır (Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011). Çocuklar için, kurşun içeren toprağa ve ev tozlarına maruziyet de önemli ölçüde zararlıdır. Çocuklar kurşun içeren toprağa ve ev tozlarına sindirim yoluyla maruz kalırlar. Kan kurşun düzeyleri açık alandan çok kapalı alanda toza maruziyet ile yakından ilişkilidir (Rusyniak ve ark., 2010).

Bir popülasyon çalışmasına göre, yakın zamanda yenilenme veya onarım yapılan evlerde yaşayan çocukların yüksek kan kurşun düzeyine sahip olma olasılığı böyle bir uygulama yapılmayan evlerde yaşayan çocuklara göre 1.3 kat daha fazladır (Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011). Bu olasılık ısı tabancası ile boya çıkarılan evlerde yaşayan çocuklar için daha da fazladır (Kumar ve Scott Clark, 2009; Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011).

İçme suyu da önemli bir kurşuna maruziyet kaynağıdır. Evlerde kurşun borular kullanılıyorsa özellikle içme suyu asidik olduğunda kurşun içerebilmektedir (Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011).

Kurşunla sırlanmış seramiklerde de kurşun bulunur. Kurşun bazlı boyalar ile boyanmış veya kurşun içeren sırla kaplanmış kaplarda yenilen ya da saklanan yemekler önemli ölçüde kurşun içerir. Bir çalışma kurşun içeren sırla kaplanmış kaplarda saklanan yemeğin tüketilmesinin yüksek kan kurşun düzeyi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Kumar ve Scott Clark, 2009; Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011).

Sigara dumanı, kurşunla lehimlenmiş konserve kutularında bulunan yemekler, oyuncaklar, beslenme kapları, çocukların kullandığı süs eşyaları da önemli ölçüde kurşun içermektedir (Rusyniak ve ark., 2010; Gottesfeld ve Pokhrel, 2011).

Hindistan, Çin ve Asya'nın bazı bölgelerinden getirilen bitkisel ilaçlar potansiyel kurşun kaynağı olabilmektedir. Asya'nın güneyinde üretilen bazı bitkisel ürünlerin 5-37 000 µg/g kurşun içerdiği gösterilmiştir (Rosin, 2009). 1978 ile 1979 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri ve diğer ülkelerde 55 tane akut kurşun

zehirlenme vakası ayurvedik ilaçların sindirim yoluyla alınması ile doğrudan bağlantılıdır (Gracia ve Snodgrass, 2007; Rosin, 2009). Bazı saç boyaları, kozmetik ürünler de kurşun içermektedir (Gracia ve Snodgrass, 2007; Rosin, 2009; Jomova ve Valko, 2011).

2.2.3. Kurşunun Toksikokinetiği

Emilim: İnorganik kurşun esas olarak akciğerler ve gastrointestinal sistem tarafından emilen birikici bir bileşiktir; organik kurşun dışında deriden emilim oldukça düşük düzeydedir. Boyada bulunanlar gibi inorganik kurşun bileşikleri cilde uygulandığında az miktarda deriden geçiş vardır. Aksine, benzinde bulunan organik (tetraetil) kurşun, deri yoluyla emilebilir. Solunum yolu endüstrilerde çalışanların maruz kalmasına yol açan en önemli yoldur ve inhale edilen kurşunun %4-50'si kan dolaşımına geçer. Solunum yoluyla emilmede öncelikle partikül büyüklüğü önemlidir. Partikül büyüklüğü küçükse oran %100'e yaklaşır. Alınan kurşunun yaklaşık %30-40'ı kan dolaşımına geçer. Diyetle alınanın yaklaşık % 10'u emilir (Sakai, 2000; Sanborn ve ark., 2002; Papanikolaou ve ark., 2005; Patrick, 2006). Kurşunun mide-barsak emilimi yavrularda erginlere göre daha yüksektir. Mide-barsak emilimi ve tutulma gastrointestinal boşluğun yapısı ve kompozisyonu, yaş ile diyetteki demir içeriğine (kişinin beslenme durumu) ve ortamın kimyasına bağlı olarak değişir. Bazı diyet bileşenleri (askorbik asit, amino asitler, D vitamini, protein, yağ ve laktoz gibi) kurşunun çözünürlüğünü böylece emilimini artırır. Ayrıca bağırsaktan emilimde demir, kalsiyum, fosfor veya çinko alımının düşük olduğu durumlarda artış görülür. Kurşunun toplam vücut içeriğinin emilimini sınırlandıran bir mekanizması yoktur (Papanikolaou ve ark., 2005; Furst, 2002; Ros ve Mwanri, 2003; Alissa ve Ferns, 2011).

Dağılım: Emiliminden sonra kurşun kanda eritrositlerde toplanır, plazmada ise % 1'den daha az konsantrasyonlarda bulunur. Eritrositlerdeki bu yüksek kurşun yüzdesi albumin için yüksek kurşun afinitesi ile açıklanabilir. Bu protein için çinkodan 20 kat daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Sonuç olarak, albümininde çinkonun yerini alabilir ve işlevini engelleyebilir. δ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD), eritrosit kurşununun yaklaşık % 80'ini bağlasa da aktivitesi sınırlıdır ve eritrositlerdeki kurşun seviyeleri yükselmeye devam ederse bu metale yüksek duyarlılık gösteren pirimidin 5'-nükleotidaza yani başka bir yapıya bağlanır (Bergdahl ve Skerfving, 2008; Gonick,

2011). Toksik ajanların çoğunluğunun aksine kan sadece kurşun taşıma yolağı değil aynı zamanda zehirliliğin değerlendirilmesi için kritik yapıyı temsil eder. Birçok organa dağılır ve böbrekler ile vücut yükünün %90'ından fazlasını oluşturan kemiklerde birikir. Beyin ve böbreklerde, sitoplazmik kurşun bağlayıcı protein 5 kDa ağırlığında tiyosin β 4 bulunur (Gonick, 2011; Matovic ve ark., 2015). Bu sebeple tam kanda ölçülen kurşun düzeyi, maruziyetinin ana belirteçleri değildir. Kan kurşun düzeyi toplam vücut yükünün % 1-5'ini oluşturur ancak vücutta çoğu zaman kemik ve diğer kalsifiye dokularda birikir. Süre kemik için 30 yıl ve trabeküler kemik için on yıla yakındır. İlerleyen dönemlerde kemikten salınır ve bu kan kurşun kaynağı olarak görev yapar ve kardiyovasküler sisteme, nöral dokulara ve böbreklere geçişinde rol alır (Rosin, 2009; Lamas ve ark., 2016). Plazma kurşun konsantrasyonu hedef organlardan (yani beyin, akciğerler, dalak, renal korteks, diş ve kemiklerdekinden) daha düşüktür. Kandan yumuşak dokulara kurşun geçiş kinetiği uzundur ve yaklaşık 4 ila 6 hafta sürer. Sürekli maruziyet durumunda kandaki kurşun 35 günde yumuşak dokuda, 40 günde ise kemiklerde yüksek yoğunluğa ulaşır (Miller ve ark., 1983; Papanikolaou ve ark., 2005).

Metabolizma ve Atılım: Konsantrasyonu oldukça düşük olmasına rağmen plazmadaki kurşunun, vücut kurşun yükünün aktif merkezi olduğu ve kurşun metabolizmasında önemli bir rol aldığı bilinmektedir. Serumdakinin yarı ömrü maruz kalma süresine bağlı olarak değişir ancak genellikle 30 gündür ve idrar/safra içinde atılır. Kan kurşun düzeyi sadece maruz kalma belirteçidir ve mutlak doku hasarını yansıtmaz. Kan seviyelerindeki azalmalar kısmen dokulara geçiş ve kemiğe yeniden dağılımdan kaynaklanır. Yumuşak dokularda yaklaşık 40 günlük bir yarı ömre sahiptir. Yetişkinler akut maruziyetin ardından birkaç hafta içinde çoğunluğunu salgırlar, ancak gençler daha uzun bir süre daha kurşun atılabilir. Keratinize dokularla (örneğin tırnaklarla) da atılmakla birlikte bu yolların pratik önemi yoktur. Sonuçta vücuttan son derece yavaş bir şekilde atılır bu da vücutta birikimini kolaylaştırır (Papanikolaou ve ark., 2005; Patrick, 2006).

2.2.4. Kurşun Maruziyetinin Patogenezi

Kurşuna maruziyet hedef organ/sistemleri etkiler. Bu metal/metaloid oksidatif stres gelişimi, sülfidril grupları ile reaksiyon ve temel metallerle etkileşim dahil olmak üzere toksisitenin altında yatan birkaç ortak mekanizmayı harekete geçirir. Özellikle

sülfidril grupları bulunan enzimlere bağlanır ve oksidan/antioksidan dengede bozulmaya sebep olur. Spesifik sülfidril içeren enzimlerden ALAD ve glutatyon redüktaz aktivitesini inhibe eder. Glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferazın aktivasyonunu etkiler (Ercal ve ark., 2001; Sanders ve ark., 2009). Glutatyon, sülfidril grupları için yüksek afiniteye sahip olan toksik metallere de doğrudan bağlanır (Patrick, 2006). Kurşun toksisitesinin iyonik mekanizması, esas olarak, kurşun metal iyonlarının Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} ve Na^{+} gibi tek değerlikli katyonların yerini alma kabiliyetinden kaynaklanır. Kurşun, nöral eksitasyon ve nörotoksisite mekanizmasında oksidatif stres, membran biyofizik değişiklikleri, hücre sinyallemesinin değişimi ve kurşun nörotoksisitesinde rol oynayan nöral geçişin bozulması bulunmaktadır (Cory-Slechta ve ark., 1997). Kurşun astroglial hücrelerde (kurşun bağlayıcı proteinler içeren) birikir. Etkileri kurşun bağlayıcı proteinlere sahip olmayan olgunlaşmamış astroglial hücrelerde (gelişen sinir sistemi) daha belirgindir ve miyelin kılıf oluşumunu engeller. Kurşun asetatla, gama aminobütirik asit (GABA) ve dopamin ve histidinin K (+)-depolarizasyona bağlı salımında bir düşüşe yol açar. Ayrıca, hücre-hücre iletişimi amacıyla eksitator dokularda aksiyon potansiyeli oluşturma, nörotransmitterlerin (kolin, dopamin ve GABA) alınması ve regülasyon gibi canlı biyolojik aktivitelerden sorumlu sodyum iyonu konsantrasyonunu ve kalsiyum tutulumu etkiler (Struzyńska ve Rafałowska, 1994).

Akut kurşun maruziyeti kardiyak fonksiyonları etkiler ve kronik kurşun maruziyeti kalbin elektriksel ve mekanik aktivitesi ile düz kas fonksiyonunu değiştirir. Reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik ederek hedef dokularda oksidatif stres ve inflamasyon döngüsünü tetikler. Kurşun maruziyetinin hipertansif etkisi de vardır. Bunun böbrek fonksiyonunda kurşunun yol açtığı hasarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Fioresi ve ark., 2013).

2.2.5. Kurşunun Toksik Etkileri

Kurşun hematopoetik sistemi, merkezi periferel sinir sistemini, böbrek fonksiyonlarını ve vasküler sistemi etkiler. Kurşunun toksik etkileri çok çeşitlidir. Örneğin düşük düzeyde maruziyette nörokognitif fonksiyonlarda belli belirsiz bir değişiklik görülebilenken, akut kurşun zehirlenmesinde ölümcül ensefalopati görülebilir (Needleman, 2004). Bununla birlikte kurşun bağışıklık sistemini ve üreme sistemini de

olumsuz yönde etkilemektedir (Wozniak ve Blasiak, 2003; Chia ve ark., 2006). Çocuklar kurşun toksisitesine yetişkinlerden daha yatkındır, çünkü sindirim yoluyla kurşunu daha fazla absorbe ederler ve kan beyin bariyerleri geçirgendir (Järup, 2003).

Kurşunun Merkezi Sinir Sistemi Üzerindeki Etkisi

Kurşun nörotoksitesinin yetişkin ve çocuklarda ilk belirtileri baş ağrısı, sinirlilik, dikkat süresinde azalma, hafıza kaybı ve düşük düzeyde kavrama bozukluğudur. Çocuklarda maruziyet arttıkça davranışsal bozukluklar, sıralama ve yönleri takip etmede başarısızlık, oyun aktivitesinde azalma, IQ'da düşüş ve dikkatte azalma görülür (Smith ve ark., 1995; Papanikolaou ve ark., 2005). Yetişkinlerde kurşun toksisitesinin en sık görülen nörolojik belirtileri ekstensör kas gruplarını ilgilendiren periferik nöropatidir.

Radial ve peroneal sinirler söz konusu olduğunda bilek ve ayakta nöropati görülür (Philip ve Gerson, 1994). Kurşunun nörotoksik etkilerinin en büyük nedeni kalsiyumun hareketlerini taklit etmesi ve onunla yarışmasıdır (Needleman, 2004). Çok düşük konsantrasyonlarda (pikomolar) kurşun serebellumda fosfokinaz C'nin bağlanma bölgeleri için yarışır. Bu kalsiyumun hücrelere girmesini, nöron fonksiyonlarını etkiler, mitokondri yapısını değiştirerek hücre solunumu engeller ve kalsiyuma bağlı reaksiyonlar ile nöronlarda sinyal iletimini değiştirir (Barry, 1975; Bressler ve Goldstein, 1991). Bu eş zamanlı nörotransmitter salınımının artması ile sonuçlanır (Needleman, 2004). Bu toksisite özellikle gelişmekte olan ceninin sinir sistemine zarar verir. Ceninde normal şartlarda kurşunu izole ederek elimine eden olgun astrosit hücrelerinde bulunan kurşun bağlayan proteinler eksiktir. Kurşun olgunlaşmamış astrositler için toksiktir ve miyelin oluşumunu engeller. Kan beyin bariyerinin oluşumunda astrositler ve miyelin gereklidir. Altıncı aya kadar tam olarak gelişmeyen kan beyin bariyerindeki bu bozulma ceninde ve yeni doğanda daha çok kurşun toksisitesi ile sonuçlanır. Bariyer bozulduğunda albumin gibi proteinler merkezi sinir sisteminin dokularına girer ve ödem, kafa içi basıncında artış ve ensefalopati ile sonuçlanır (Holtzman ve ark., 1984). Çocuklar kurşun nörotoksitesine yetişkinlerden daha yatkındır, çünkü kurşunu daha fazla absorbe ederler, farklılaşmakta ve gelişmekte olan hücre sistemleri inhibisyona ve hasara karşı daha korumasızdır (Needleman, 2004). Kurşun toksisitesi gelişmekte olan insanın toksik maddelere karşı

hassasiyetini kanıtlayan en güzel ve üzerinde en çok çalışılmış örneklerden biridir. Kurşun nöral gelişim aşamalarını etkilediği için beyin fonksiyonunda kalıcı değişikliklere neden olabilmektedir (Krigman, 1978; Holtzman ve ark., 1984).

Kurşuna maruziyet bebeklerde ve çocuklarda okuma yetersizliği, motor fonksiyonlarda bozukluk, okuma hızında düşüklük, liseden mezun olamama ve ortalama 18.7 yaşına kadar sınavlardan düşük not alma ile doğrudan bağlantılıdır. Kurşunun 10-15 µg/dL'de nörolojik davranışlarda bozukluklara neden olabildiği bulunmuştur. Kurşun maruziyetinin beyindeki tüm nörotransmitterleri (dopaminerjik, kolinerjik ve glutaminerjik sistemler) etkilediği gösterilmiştir (Davis, 1990). Sıçanlarla yapılan çalışmalara göre kurşunun neden olduğu öğrenme bozuklukları bu sistemlerdeki bozukluklar aracılığı ile olmaktadır (Cory-Slechta, 1997).

Kurşunun Boşaltım Sistemi Üzerindeki Etkisi

Kurşun nefropatisi mesleki maruziyeti olan işçilerde çalışılmıştır. Proksimal tüplerde hasar, glomerüler skleroz ve interstisyel fibroz olarak kendini açıkça gösterir. Belirtiler proteinüri, glukoz ve organik anyonların taşınmasında bozukluk ile glomerular filtrasyon hızında düşüştür (Gracia ve Snodgrass, 2007).

Akut kurşun toksisitesinde böbrek yetmezliği görülür ve bu kurşun koluğu denilen karın ağrısı, bilinç bozuklukları, periferik nöropati, basofilik noktalanma ile birlikte anemi, arthralgias, dişlerde ve damakta kurşun çizgisi ve kanda 80 µg/dL'den fazla kurşun düzeyi ile birlikte görülür (Marsden, 2003). Ancak populasyon genelinde çok daha düşük maruziyette böbrek hasarının görüldüğü kanıtlanmıştır (Muntner ve ark., 2003). Bu çalışmalarda kan kurşun düzeyi ve serum kreatinini arasında kuvvetli bir bağlantı bulunmaktadır; kan kurşun düzeyindeki her 10 katlık artış için serum kreatinini miktarı 0.14 mg/dL artmıştır. Ancak bu çalışmalarda sınırlamalar vardır çünkü hipertansiyon, anjiyotensini dönüştüren enzimlerin kullanımı veya üriner protein atılımı gibi faktörler gözardı edilmiştir (Pollock ve Ibels, 1988).

Kurşunun Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkisi

Yüksek kan kurşun düzeyi (20-29 µg/dL) dolaşım ve kardiyovasküler ölümler ile bağlantılıdır (Adikwu ve ark., 2013). Kurşun maruziyeti hipertansiyon,

serebrovasküler hastalıklar ve kardiovasküler hastalıkların görülme sıklıkları ile de bağlantılıdır (Fanning, 1988). Uzun süreli düşük düzeyde kurşuna maruziyetin hayvanlarda ve insanda hipertansiyona neden olabileceği gösterilmiştir (Sokas ve ark., 1997).

Kurşun Maruziyetinin Diğer Etkileri

Fabrikalarda kurşuna maruz kalan işçilerde ölü doğum, düşük, sperm sayısında ve hareketliliğinde azalma, doğurganlıkta düşüş, hipospermi, teratospermi oranında artış ve libidoda düşüş görülmektedir (Levin ve Goldberg, 2000). Eşleri kurşuna maruz kalan kadınlarda düşük oranı artmıştır (Anttila ve Sallmen, 1995). Kurşuna maruz kalan işçilerin çocuklarında kongenital epilepsi ve kardiovasküler hastalık görülme oranları artmaktadır (Hu ve ark., 1992). Kurşun maruziyeti mide, akciğer ve safra kesesi kanseri yanında tüm kanserlerin görülme sıklığındaki artış ile bağlantılıdır (Fu ve Boffetta, 1995). Yüksek tibial kemik kurşun seviyesine sahip erkeklerde yaşa bağlı katarakt görülme riski düşük tibial kemik kurşun seviyesine sahip erkeklere göre 2.5 kat daha fazladır (Schaumburg ve ark., 2004).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

En dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunduran kararsız yapıdaki oldukça reaktif olan atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Y aşam için vazgeçilmez bir element olan oksijenin belirli durumlarda insan vücudu üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir. Hücrede metabolizma süreçlerinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine genel olarak ROS veya nitrojen radikallerine ise reaktif nitrojen türleri (RNS) denilmektedir. Oksijen dışında azot, karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (Lobo ve ark., 2010) (Şekil 1). Serbest radikaller, ROS ve RNS, endojen veya eksojen kaynaklı olarak üretilir. Endojen olarak üretilen serbest radikaller, immün hücre aktivasyonu, enflamasyon, stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanmadan kaynaklıdır. Eksojen olarak üretilen serbest radikaller ise, hava ve su kirliliği, sigara, alkol, ağır metaller, bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus), endüstriyel çözücüler, pişirme ve radyasyondan kaynaklanmaktadır (Lobo ve ark., 2010; Kabel,

2014).

Şekil 1. Oksijen ve azot kaynaklı aktif bileşikler (Lobo ve ark., 2010)

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Hidroksil	HO	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Alkoksil	RO	Singlet oksijen	·O ₂
Peroksil	ROO	Ozon	O ₃
Süperoksit	O ₂ ·	Hipoklorid asit	HOCl
Nitrik oksit	NO·	Lipit hidroperoksit	LOOH
Azot dioksit	NO ₂ ·	Peroksinitrit	ONOO·

Mitokondride adenzin trifosfat (ATP) üretimi sürecinde serbest radikaller ortaya çıkar. Bu reaktif ürünler hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak ikili bir rol oynarlar. Düşük veya orta seviyelerde ROS, hücrese tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterirken yüksek konsantrasyonlarda, biyomoleküler yapılar zarar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur (Kabel, 2014).

Serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle, kararlılık kazanabilmek için diğer bileşiklerden elektron koparabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder, serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyonu kaskadını başlatmış olur (Phaniendra ve Babu, 2015). Reaktif özelliklerinden dolayı lipidlerden DNA'ya kadar birçok yerde oksidatif hasar oluşturabilen ROS ve diğer oksijen içermeyen serbest radikallerin önemli fizyolojik fonksiyonları da vardır. ROS hücreler arası sinyal mekanizmalarında görev alır. Örneğin ROS'den biri olan nitrik oksit, transkripsiyon faktör aktivitelerinde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde bir sinyal molekülü olarak görev yapar. Nitrik oksit gibi bazı radikaller de sitokinler, büyüme faktörleri ve nörotransmitter maddelerin hücre içi sinyal mekanizmalarında ikincil haberci olarak rol alırlar (Nordberg ve Arner, 2001; Kopáni ve ark., 2006).

2.3.2. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi bütün önemli biyomolekülleri üzerinde etkili olurlar. Bunlar arasında serbest radikallerin

olumsuz etkilerine en açık olan biyokimyasal moleküller lipidlerdir. Hücre zarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin çift bağları, radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Halliwell, 2007; Song ve ark., 2013; Phaniendra ve Babu, 2015).

Reaktif oksijen radikalleri ile hücre membran fosfolipidlerinin yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitleri reaksiyona girerek ve radikal zincir reaksiyonu ile ilerleyerek lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Bu olaya lipid peroksidasyonu denir. Lipid peroksidasyonundan dolayı alkanlar, malondialdehit ve izoprostanlar gibi birçok bileşik oluşur. Bu bileşikler nörojeneratif hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok hastalıkta lipid peroksidasyonu markırı olarak kullanılmaktadır (Lovell ve ark., 1995; Lobo ve ark., 2010).

Lipid peroksidasyonu, membran işlevinin kaybına, akışkanlığının bozulmasına, zara bağlı enzimlerin ve reseptörlerin etkisizleşmesine neden olur (Phaniendra ve Babu, 2015). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden etan ve pentan hidrokarbonları solunum sırasında vücuttan atılırlar. Oluşan ürünlerden en toksik olanı ise aldehitlerdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, peroksidasyonun derecesiyle en uygun korelasyonu ifade eden molekül malondialdehit (MDA)'tır (Rahal ve ark., 2014; Nimse ve Pal, 2015). Malondialdehit genellikle tiobarbiturik asitle reaksiyona sokularak ölçülür. Bu reaksiyon sonucunda tiobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) oluşur. TBARS ölçüm yöntemi MDA'ya özel olmasa da TBARS terimi lipid peroksidasyonunun genel belirteci olarak kabul edilen MDA ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır (Nimse ve Pal, 2015).

2.3.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Amino asitler de serbest radikallerin hedef moleküllerindendir. Protein oksidasyonu, singlet oksijen ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil, hidroperoksil gibi radikal türlerin yanı sıra, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), hipokloröz asit ($HOCl$), $O_2^{\cdot-}$, peroksinitrit ($OONO^{\cdot}$) gibi radikal olmayan türler tarafından indüklenebilir. ROS, proteinlerde bulunan farklı amino asitleri okside eder, protein-protein çapraz bağların oluşumuna neden olur, proteinlerin denatüre ve kaybına, enzim aktivitesinin kaybına ve reseptörlerin fonksiyon kaybına neden olur (Phaniendra ve Babu, 2015).

Proteinlerin oksidatif hasara uğraması sonucu, enzimlerin, reseptörlerin ve membran transportunun aktivitesi etkilenebilir. Oksidatif olarak hasar görmüş protein ürünleri, membrane ve birçok hücresel fonksiyona zarar verebilecek çok reaktif gruplar içerebilir. Peroksil radikalının proteinlerin oksidasyonu için serbest radikal tür olduğu düşünülmektedir. Proteindeki metiyonin, sistein, arginin ve histidin gibi amino asitler, oksidasyona en savunmasız bölgeler olarak görülmektedir. Sistein ve metiyonin kalıntıları, hemen hemen tüm ROS formları tarafından oksidasyona karşı özellikle duyarlıdır. Düşük ROS seviyelerinde bile sistein kalıntıları disülfidlere ve metiyonin kalıntıları metiyonin sülfoksit kalıntılarına dönüştürülür (Berlett ve Stadtman, 1997).

Protein oksidasyonu, sinyal iletim mekanizmasının, enzim aktivitesinin, ısı stabilitesinin ve yaşlanmaya neden olan proteoliz duyarlılığının değişmesine neden olur (Lobo ve ark., 2010). Proteinlerdeki karbonil gruplarının varlığı, ROS aracılı protein oksidasyonunun işareti olarak düşünülmüştür. Protein karbonil seviyelerindeki bu artış, alzheimer, parkinson, kas distrofisi, kataraktogenez, romatoid artrit, diyabet gibi patolojik durumlarda gözlenir (Chevion ve ark., 2000).

2.3.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin önemli bir diğer hedefi de DNA molekülüdür. Serbest radikallerin etkisiyle nükleik asit bazlarında modifikasyon ve DNA zincirinde kırılmalar ortaya çıkar. DNA'nın yapısında bulunan timin ve sitozin bazları hidroksil radikalının meydana getirdiği etkiye en duyarlı olanlarıdır (Gupta ve ark., 2014).

Serbest radikaller, DNA üzerine etki ederek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçer ve çekirdeğe ulaşır. Ardından DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Nimse ve Pal, 2015). ROS, nükleik asitlere oksidatif olarak zarar verebilir. Mitokondriyal DNA, ROS saldırısına nükleer DNA'dan daha savunmasızdır. Mitokondriyal DNA, reaktif oksijen türlerine yakınlığı, koruyucu histon eksikliği ve sınırlı onarım kapasitesi nedeniyle nükleer DNA'dan daha kolay okside olabilir. DNA'nın oksidasyonu iplik kopmalarına, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlanmasına, transkripsiyon ve protein translasyonunda değişikliklere yol açabilecek DNA baz modifikasyonuna neden olur (Markesbery ve Lovell, 2007). Hidroksil radikali, DNA molekülü hasarına neden olan en

önemli radikallerden birisidir. Hidroksil radikali, purin ve pirimidin bazları, deoksiriboz omurgası gibi tüm DNA bileşenleriyle doğrudan reaksiyona girer ve DNA'daki tek ve çift sarmallı kopmalar dahil olmak üzere bir dizi değişikliğe neden olur. Bu oksidatif hasar sonucunda meydana gelen genetik materyaldeki kalıcı değişiklikler mutagenesis, karsinogenesis ve yaşlanmanın ilk aşamalarını temsil etmektedir (Phaniendra ve Babu, 2015).

2.3.5. Oksidatif Stres

Oksijenli solunum yapan tüm organizmalarda normal fizyolojik koşullarda, endojen oksidanlar ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunur. Serbest radikallerin oluşum hızında artış veya serbest radikallerin yok edilme hızında azalma ile dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Meydana gelen dengesizlik sonucu, radikaller DNA'ya hasar verir ve bu da yaşlanma, tümör oluşumları ve diğer dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Tablo 1) (Kopani ve ark., 2006; Halliwell, 2007; Lobo ve ark., 2010).

Tablo 1. Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar (Kopani ve ark., 2006; Halliwell, 2007; Lobo ve ark., 2010)

Ateroskleroz	Radyasyon hasarı
Kanser	Enflamasyon
İskemi-reperfüzyon hasarı	Diabetes mellitus
Romatoid artrit	Merkezi sinir sistemi hastalıkları
Otoimmün hastalıklar	Böbrek bozuklukları
Akciğer hastalıkları	Göz bozuklukları
Kas hastalıkları	Cilt bozuklukları
Karaciğer bozuklukları	Gastrointestinal bozukluklar
Kan hastalıkları	Beslenme yetersizlikleri

Enfeksiyon, aşırı egzersiz, hipertrofi, toksinlere maruz kalma gibi nedenlerle meydana gelen oksidatif stres sonucu dokular yaralanabilir. Bu hasar gören dokular, ksantin oksidaz, lipogenaz gibi radikal üreten enzimlerin artması, fagositlerin aktivasyonu, demir ve bakır gibi bazı iyonlarının serbest bırakılması veya oksidatif fosforilasyonun elektron transport zincirlerinde meydana gelen bozulmayla aşırı ROS

üretir. Kanser tedavisinde uygulanan radyoterapi ve kemoterapinin yan etkileri sonucu aşırı üretilen ROS de, antioksidan savunma sistemi ile oksidanlar arasındaki dengeyi bozabilmektedir (Rao ve ark., 2007).

Oksidatif stres, kanserden otoimmün hastalıklara, kardiyovasküler hastalıklardan nörodejeneratif hastalıklara kadar bir çok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. İnsan vücudu, doğal olarak üretilen veya harici olarak gıdalar ya da takviyeler yoluyla tedarik edilen antioksidanlar ile meydana gelen oksidatif stresin etkilerini azaltmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROS'nin neden olduğu zararları önleyerek ve onararak serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görürler (Valko ve ark.,2007; Lobo ve ark., 2010; Kabel, 2014).

2.3.6. Malondialdehit

Reaktif oksijen türleri, membranın lipit katmanlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna ve nihayetinde oksidatif stresin toksik habercileri olarak kabul edilen aynı zamanda oksidatif hasarı daha da ilerlemesine neden olan aldehitlerin oluşumuna yol açar. Bu aldehitlerin başında MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gelmektedir (Barrera ve ark., 2018). MDA, farklı mekanizmalar tarafından üretilen üç karbonlu, düşük moleküler ağırlıklı bir aldehittir. MDA membran lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir (Grotto ve ark., 2009). Üç ve daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelen MDA lipid peroksidasyonunun başlıca ürünü ve peroksidasyonun derecesi ile korelasyon gösteren, yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açan bir moleküldür.

MDA hücre zarının geçirgenliğini arttırıp, membranın iyon alış verişini etkileyerek hücre içindeki iyon dengesini olumsuz yönde etkiler ve enzim aktivitelerinde bozukluklara, DNA'da ise kırılmalara neden olur. MDA seviyesindeki artış serbest radikal üretimini arttırarak ve antioksidan aktiviteyi azaltarak serbest radikal ve antioksidan aktivitesindeki dengesizliğin sonucu oluşan oksidatif strese neden olur (Erçin ve ark., 2019). Ayrıca membran akıcılığının azalmasına, membrane reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına neden olur

(Del Rio ve ark., 2005).

2.3.7. 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin

Genetik bilgi taşıyıcısı olarak DNA'nın kimyasal bütünlüğünü korumak, yaşam için çok önemlidir. DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğrayabilen bir moleküldür. Oksidatif hasara karşı DNA'nın tamir sistemleri olsa da ROS miktarındaki artış ile beraber antioksidan düzeylerindeki azalma veya DNA onarım sistemlerinin disfonksiyonu oksidatif DNA hasarında artışa sebep olmaktadır. Oksidatif hasar sonucu DNA'da, tek ve çift dal kırıkları meydana gelirken DNA ile protein arasında çapraz bağlanma ve baz modifikasyonları gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir (Lobo ve ark., 2010; Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).

DNA sarmalı, adenin, tiamin, sitozin ve guaninden oluşan dört farklı nükleobazdan oluşur. Guanin bazı en düşük iyonlaşma potansiyeline sahip olduğundan en sık rastlanan hasar guanozin biriminde gerçekleşir (Kroese ve Scheffer, 2014). Yani guanozin, bazlar içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşik olduğu için ROS'un başlıca hedefidir (Valko ve ark., 2006). Normal şartlar altında, ROS'un birçok geni düzenleyen hücre içi sinyal molekülleri olarak önemli bir rolü vardır. Bununla birlikte, enflamatuvar koşullar altında, artan ROS üretimi, DNA oksidasyonu gibi hücre molekülü hasarına yol açar. ROS tarafından oksidatif DNA modifikasyonlarının en belirgin ürünü 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OH dG)'dir. Mitokondriler ROS oluşumunun ana kaynağı olmasından dolayı mitokondriyal DNA'da 8-OH dG oldukça yüksek düzeylerde (Phaniendra ve Babu, 2015). Bu okside baz, sıklıkla kan, idrar, beyin omurilik sıvısı ve tükürük olmak üzere farklı numunelerde ölçülmüştür (Wu ve ark., 2004; Kroese ve Scheffer, 2014; Valavanidis ve Vlachogianni, 2017). Mutasyona yol açan deoksiguanozinin oksidasyonu ile üretilen ve oksidatif DNA hasarının biyolojik markırı olarak kabul edilen 8-OH dG, mutajenez, karsinogenez ve yaşlanma ile ilişkilidir (Barja, 2000; Phaniendra ve Babu, 2015). Sigara dumanı, asbestozis, x-ışınları, okside olmuş doymamış yağ asitleri, gama ışını, toksik kimyasallar, ultraviyole ışınlar, kısaca oksijen radikalleri üreten tüm ajanlar 8-OH dG miktarında artışa neden olabilirler (Valavanidis ve Vlachogianni, 2017). 8-OH dG, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), immünohistokimyasal yöntemler ve tek hücreli jel elektroforezi ile yüksek hassasiyetle tespit edilmektedir

(Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).

2.4. Enflamasyon

Enflamasyon, doğuştan gelen adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerinin hareketini, göçünü ve aktivasyonunu içeren eski ve gelişmiş bir süreçtir. İmmünolojik açıdan enflamasyon patojenlere karşı savunmada, doku onarımında, rejenarasyonunda ve yeniden şekillenmesinde, özetle doku homeostazisinde önemi büyüktür (Greten ve Grivennikov, 2019). Kimyasal medyatörlerin bir arada veya sırayla etki etmesi ile enflamatuvar yanıt oluşur. Enflamasyonun kimyasal medyatörleri arasında histamin, serotonin, kininler, prostaglandinler, lökotrienler, sitokinler ve nitrik oksit bulunur (Lordan ve ark., 2019).

2.4.1. Enflamasyon Biyobelirteçleri

Nitrik Oksit

Endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bilinen nitric oksit (NOx), ana damarlarda enflamasyonu ve adhezyonu baskılayarak trombozu inhibe eder ve kan akışını hızlandırır. Mikro ve kılcal damarlarda büyüme faktörleri ile birlikte anjiyogenez adı verilen yeni damar oluşumunu destekler (Ghimire ve ark., 2017). NOx birçok farklı dokulardaki çeşitli sinyal yollarını düzenler ve çeşitli fizyolojik rollere sahiptir. NOx'in en iyi bilinen fonksiyonları, bağışıklık, kardiyovasküler ve nöronal sistemdeki rolleri ile ilgilidir. NOx, başta makrofajlar olmak üzere farklı bağışıklık hücreleri tarafından üretilir. Bağışıklık ve iltihaplanmanın önemli bir düzenleyicisidir. Bulaşıcı hastalıklarda, bağışıklık hücreleri tarafından salınan NOx'in sitotoksik antimikrobiyal aktiviteleri vardır. Bunun yanında NOx, apoptozu destekleyip, sitokin ve kemokin üretimini inhibe ederek T hücre proliferasyonunu ve aktivitesini sınırlayan immünoşüpresif bir ajan olarak işlev görür (Keshet ve Erez, 2018).

L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS)'ın farklı izoenzimleri aracılığı ile sentezlenen NOx, çeşitli hastalık süreçlerinde hücresel ve vasküler seviyelerde hem zararlı hem de faydalı etkileri olan sepsis patogeneğinde anahtar rol oynayan bir moleküldür. NOx'in aşırı üretimi, aşırı vazodilatasyona, vasküler geçirgenlikte değişikliklere ve noradrenerjik sinir iletiminin inhibisyonuna ve sonuçta septik şoka

neden olmaktadır (Victor ve ark., 2005).

Önemli bir hücrel redoks regülatörü olan NO_x, vasküler düz kas tonusu kontrolörü olarak bilinir. NO_x proteinleri nitrozile ederek enzimatik aktiviteyi düzenleyen, kan basıncı regülasyonu, trombosit aktivasyonu, apoptoz, düz kas gevşemesi, nörotransmisyon, savunma mekanizmaları ve immün regülasyon gibi birçok biyolojik faaliyette rol alan bir moleküldür (Phaniendra ve Babu, 2015). Bilinen en küçük sinyal molekülü olan NO_x'in sentezini sağlayan NOS'ın, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) olmak üzere 3 izoformu vardır (Keshet ve Erez, 2018). Yarı esansiyel aminoasitlerden olan L-arjinini NOS'ın substrat olarak kullanması sonucunda NO_x ve L-sitrülin oluşmaktadır. NO_x oluştuktan sonra methemoglobin, nitrite (NO₂⁻) ve nitrate (NO₃⁻) dönüşerek inaktive olmaktadır. NO_x, O₂⁻ ile birleşerek ONOO⁻ dönüşür. Peroksinitrit, OH[•] ve tirozinle birleşerek nitrotirozini oluştururlar. NO_x, guanil siklaz aktivasyonu ile 3',5'-siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Förstermann ve Sessa, 2012).

Prostaglandinler

Prostaglandinler aktif siklik yağ asidi türevleri olup, ilk olarak Ulf von Euler tarafından 1930'larda prostat sıvısından izole edilerek elde edilmiştir. Prostat bezinden elde edildiği için prostaglandin ismini almışlardır. Fosfolipidler fosfolipaz A2 enzimi etkisi ile araşidonik aside dönüşür. Araşidonik asit ise lipooksijenaz enzimi etkisi ile lökotrienlere, siklooksijenaz enzimi etkisi ile prostaglandinlere dönüşür (Kayaalp, 2012). Prostaglandinlerin bulunmasından sonra prostasiklinler, lipoksinler, tromboksanlar ve lökotrienler bulunmuştur. Bu maddeler araşidonik asit metabolitleri olarak eikozanoidler adı altında toplanmıştır. Eikozanoidler ("eikoza" kelimesi yunanca 20 demektir), 20 karbonlu yağ asitlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkileri olan endojen maddelerdir. Prostaglandinlerin enflamasyon, bronko-dilatasyon/konstrüksiyon, vazodilatör, trombosit agregasyonu, uterus fonksiyonu (oksitosik) gibi görevleri vardır (Ricciotti ve Fitzgerald, 2011; Kayaalp, 2012).

2.5. Antioksidan Sistem

Antioksidanlar, vücudu serbest radikallerin neden olduğu kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan hasara karşı koruyan fizyolojik maddelerdir (Lobo ve ark., 2010). Bir antioksidan, oksitlenebilir, oksidasyonu geciktirebilir veya önleyebilir. Vücuttaki karbonhidratlar, yağlar, proteinler ve DNA oksitlenebilir. Antioksidanlar, serbest radikalleri, onlarla birleşmesi muhtemel olan moleküllerden uzaklaştıran maddelerdir (Kerr ve ark., 1996; Lobo ve ark., 2010). Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zincirleme reaksiyonu durdurarak, serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek, oluşumlarını önleyerek ve hücre yapısında oluşturdukları hasarı onararak etki gösterirler. Halen klinik çalışmalarda kullanılan çeşitli tiplerde antioksidanlar vardır: Vücutta doğal olarak meydana gelenler (alfa-tokoferol, redükte glutatyon veya süperoksit dismutaz), demir bağımlı serbest radikal bağlayanlar (probucol) veya diğer klinik uygulamalarda kullanılan antioksidan özelliklere sahip farmakolojik ajanlar (Kerr ve ark., 1996).

Geçiş metal iyonlarının varlığında H_2O_2 , süperoksit ile hidroksil radikallerine indirgenebilir. Süperoksit ve H_2O_2 , OH 'den çok daha az reaktiftir ve bu iki reaktifi üreten bir hücre, yüksek derecede reaktif hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olabilir. Bilinen bir hidroksil radikal temizleyicisi olmadığı için, bu radikaller sebebiyle oluşan oksidatif hasarı önlemenin tek yolu, hidroksil radikali oluşumuna yol açan reaksiyonları kontrol etmektir. Bu nedenle, hücrelerde süperoksit, H_2O_2 ile Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin yoğunluklarını kontrol altına almak gerekir (Apel ve Hirt, 2004). Enzimatik antioksidan savunma sistemleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rx), glutatyon S-transferaz (GST), tiyoredoksin redüktaz, katalaz, hemoksijenaz, peroksiredoksin (Prx) ve paraoksonaz 1 sayılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar; askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), redükte glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler, transferrin, albümin, bilirubin ve ürik asit ile temsil edilir (Şekil 2). Normal koşullar altında, bu moleküller, hücrelerde optimum etkinlik ve yoğunluk gösterdiklerinde hücre içi redoks dengesini korurlar. Bu denge hücrelerin hayatta kalması için esastır (Sánchez-Valle ve ark., 2012).

Şekil 2. Organizmada antioksidan sistem elemanları (Sánchez-Valle ve ark., 2012)

Enzimler	Suda Çözünen Radikal Tutucuları	Yağda Çözünen Radikal Tutucuları	Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler
Süperoksit dismutaz	Glutasyon	Vitamin E	Ferritin
Katalaz	Vitamin C	β -Karoten	Transferrin
Glutasyon peroksidaz	Ürik asit	Bilirubin	Haptoglobin
Glutasyon redüktaz	Glikoz	Ubikinol	Seruloplazmin
Glutasyon transferaz	Sistein	Flavonoidler	Albumin

2.5.1. Süperoksit Dismutaz

İlk olarak 1969'da keşfedilen SOD, vücutta hücresel sitoplazmada bulunan bakır/çinko SOD (SOD1), mitokondride yerleşmiş manganez Mn-SOD (SOD2) ve hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste bulunan ekstrasellüler SOD - (SOD3) olmak üzere üç formda üretilir. Her üç SOD formunun antioksidan özellikleri, dokunun iskemi periyodları sırasında üretilen oksijen kaynaklı serbest radikallerden zarar görmesini önler. SOD, süperoksit radikalini, H_2O_2 haline dönüştüren bir enzimdir (Kerr ve ark., 1996; Sánchez-Valle ve ark., 2012; Jung, 2014).

2.5.2. Katalaz

Katalaz demir içeren antioksidan bir enzim olup öncelikle peroksizomlarda bulunur. İki H_2O_2 molekülü arasındaki bir reaksiyonu katalize ederek H_2O_2 'yi detoksifiye eder. Reaksiyon su ve oksijen üretimi ile sonuçlanır (Sánchez-Valle ve ark., 2012).

2.5.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 'yi detoksifiye eden, bunun için GSH'ı organik ve lipit hidroperoksitlerini indirgeyici bir ajan olarak kullanan ve bu şekilde oksidatif strese karşı yardımcı koruma sağlayan antioksidan bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz, her biri aktif bölgesinde selenyum içeren dört protein alt biriminden oluşur. Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 'yi GSH'ın oksidasyonu ile uzaklaştırır. Özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum veya sitozolik CuZn SOD kaynaklı ortaya çıkan H_2O_2 'nin bertarafında GSH-Px etkilidir (Kühn ve Borchert, 2002).

2.5.4. Redükte Glutasyon

GSH, sırasıyla γ -glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri ile katalize edilen ardışık iki reaksiyonla glutamat, sistein ve glisin adı verilen üç prekürsör amino asitten sentezlenen bir antioksidandır. GSH, GSH-Px ile peroksitlerin detoksifikasyonunda serbest radikallerle reaksiyona girerek bir electron donörü olarak davranır. Bu reaksiyon sonucunda GSH, okside glutasyon (GSSG)'a dönüşürken, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) sayesinde GSH-Rx tarafından tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH, hücre dışına salındığında ise kendisini oluşturan aminoasitlere metabolize edilir (Morris ve ark., 2013; Carvalho ve ark., 2014).

GSH, protein yapılarının stabilizasyonu, katlanması, DNA transkripsiyon faktörünün bağlanması ve redoks reaksiyonları sonucu oluşan H_2O_2 'nin temizlenmesinde görev alır. Hücresel GSH'nin çoğu (% 85-90) sitozolde bulunur. GSH redoks döngüsünde yer alan GSH-Px ve GST için birincil bir substrattır (Ithayaraja, 2011). Bir tripeptit tiyol olan GSH, sayısız biyolojik fonksiyona sahip sülfhidril bileşiğidir. Bu tiyol, eksojen ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda ve hücre içi redoks durumunu korumada önemli bir rol oynar. Karaciğerde sentezlenen ve başlıca görevi hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünü engellemek olan GSH, proteinlerdeki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Bu sayede proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (Kerksick ve Willoughby, 2005). Hayvansal dokularda, selenyum içeren antioksidan bir enzim olan GSH-Px, GSH'ı GSSG'ye dönüştürerek hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesine aracılık eder. Buna karşılık, GSSG, esas olarak pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH varlığında GSH-Rx ile azaltılır (Adeoye ve ark., 2018).

GSH çok sayıda hücresel süreçte önemli bir rol oynar ve eksikliği, kardiyovasküler, bağışıklık, yaşlanma hastalıkları ve diyabet dahil olmak üzere bir dizi hastalığın etiyolojisi ve ilerlemesinde rol oynar. GSH, oksijen radikallerinin ve ilaçların detoksifikasyonunda rol oynayan birçok enzimin substratıdır. GSH eksikliği, insülin direnci ve diyabet de dahil olmak üzere kronik hastalıkların ilerlemesinde etkilidir (Jain ve Micinski, 2013). Çekirdekteki GSH, DNA onarımı ve ekspresyonu için gerekli olan kritik protein sülfhidrillerin redoks durumunu korur. Oksitlenmiş glutasyon, hücrelerin içinde biriktirilir ve GSH/GSSG oranı, bir organizmanın oksidatif stresinin iyi bir

ölçüsüdür. Çok yüksek GSSG konsantrasyonu oksidatif olarak birçok enzime zarar verir (Valko ve ark., 2007).

2.5.5. Paraoksonaz ve Arilesteraz

Paraoksonaz enzimi, karaciğerden sentezlenen parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile ilişkili kalsiyuma bağımlı bir serum esteraz proteinidir. Paraoksonaz (PON), PON1, PON2 ve PON3'ü içeren üç genli bir ailedir. PON1 ve PON3 öncelikle karaciğerde sentezlenir ve bir kısım yüksek yoğunluklu lipoproteinler ile ilişkili oldukları plazmada salgılanır. PON1 ve PON3'ün düşük seviyeleri, başta epitel olmak üzere birçok başka dokularda eksprese edilir. Buna karşılık, PON2, beyin de dahil olmak üzere çoğu doku ve organda eksprese edilen bir hücre içi enzimdir (Costa ve ark., 2017). PON1, paraokson gibi organofosfat bileşiklerini detoksifiye etme kabiliyetinden dolayı paraoksonaz aktivitesine sahiptir. PON2, bakteriyel virölansı azalttığı gösterilen belirgin laktonaz aktivitesi uygular. Bu şekilde PON2, konukçu savunma yanıtında önemli bir rol oynayabilir. PON3 paraoksonaz ve esteraz aktivitelerine sahiptir, ancak bunlar PON1'e kıyasla önemli ölçüde azdır. PON'lar için spesifik fizyolojik substratlar açıkça tanımlanmamıştır, ancak muhtemelen araşidonik asit ve dokosaheksaenoik asitin oksidasyon ürünlerini içerirler (White ve Anantharamaiah, 2017). PON ve arilesteraz (ARE) çoğunlukla iki ayrı enzim olarak algılansa da yapılan araştırmalarda insan serumunda tek gen ürünü olan olan enzimin hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Plazma PON1 ve ARE aktiviteleri patolojik şartlarda özellikle malign hastalıklarda ve kronik sistemik hastalıklarda azalmış olarak bulunmuştur. Ayrıca PON1'in, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Costa ve ark., 2017; Kılıç ve Yonar, 2017).

2.6. Kurşun Maruziyetinin Oksidatif Strese Etkileri

Yapılan son çalışmalar kurşun zehirlenmesinin biyokimyasal basamaklarının bilinmesi kurşunun hücrelerin antioksidan komponentlerine etki ederek, prooksidan/oksidan oranında bozulma ile oksidatif zedelenme oluşturduğunu düşündürmektedir. Kurşun nedenli oksidatif stresin mekanizmaları arasında kurşunun hücre membranlarına etkisi, DNA hasarı ve hücrelerdeki sülfidriilli antioksidan savunma sistemlerinin

tüketilmesi başrolü oynamaktadır (Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

2.6.1. Kurşunun Hücre Membranlarına Etkisi

Kurşunun membran yapısı ve fonksiyonları üzerine olan etkilerinin araştırılması için en çok eritrositler kullanılmıştır. Eritrositler üzerine olan etkileri, kurşuna bu hücrelerin yüksek afinite ile bağlanmaları ve kan dolaşımı esnasında daha fazla maruz kalmaları sonucu oluşmaktadır. Eritrositlerin membranlarındaki ozmotik mekanik geçirgenlik, kurşun toksikasyonunu arttırmakta; böylece deformite oranı artmakta ve proteinlerin kompozisyonu ile membrana bağlı enzimlerin aktiviteleri de değişmektedir. Kurşun, ROS ve membranlar üzerinde oksidatif stres sonucu direk bozucu etkileri arttırmaktadır (Levander ve ark., 1977).

Biyolojik membranların ana komponentleri lipid ve proteinlerdir. Lipid molekülleri membranlarda yağ asitlerinin hidrofobik yan zincirlerinde bulunur. İlk zincir reaksiyonu, membranlar ya da doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda ilk basamaktır. Bunu yağ asitlerinin bir metilen grubundan H^+ atomu çıkarılması izler. Yağ asitlerindeki çift bağın varlığı, komşu $-CH$ bağlarını zayıflatarak, H^+ atomunun ayrılmasını kolaylaştırır. Bu nedenle çift bağ içermeyen veya tek çift bağ içeren yağ asitleri oksidatif strese iki çift bağdan fazla çoklu doymamış yağ asidi içerenlere göre daha dirençlidir (Lawton ve Donaldson, 1991; Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

Kurşunun membranlar üzerine olan toksik etkilerine yönelik birçok araştırma yapılmış ve bu etkiler ile kurşunla artmış oksidatif hasar arasında bir korelasyon belirlenmiştir. Kurşun; linoleik, linolenik ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri ile inkübe edilmiş ve MDA konsantrasyonunun yağ asitlerinin çift bağ sayısı ile doğru orantılı arttığı gösterilmiştir. Yağ asitlerinin zincir uzunluğuna ve doymamışlığına bağlı olarak membranların peroksidasyonunda kurşuna bağlı artış meydana gelmektedir (Yiin ve Lin, 1995).

Diğer yandan kurşunun in vitro deneylerde fosfatidilkolin içeren membranlara kuvvetli bir şekilde bağlandığı da ortaya konulmuş ve eritrosit membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin miktarında bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca kurşuna maruz kalan ratların beyinlerinde fosfolipid ve lipid peroksidasyonu

oranında yükselme de tespit edilmiştir (Shafiq-Ur-Rehman, 1984; Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

2.6.2. Kurşunun DNA Üzerine Etkisi

Kurşun hem sentezinde δ -aminolevulinik asit (ALA) sentaz, ferroşelataz ve ALAD enzimlerinin aktivitesini engellemekte ve böylece Hem sentezini baskılamaktadır. Hem sentezinin baskılanması ise ALA üretiminin yükselmesine ve 2 ALA molekülünün birleşerek porfobilinojene dönüşümünün baskılanmasına; böylece kan dolaşımındaki ve idrardaki ALA miktarının yükselmesine neden olur (Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

ALA'nın ROS oluşumunu indüklemesi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. ALA, pH 7.0-8.0'de enolizasyona ve otooksidasyona uğrar. Keto-ALA formun enol forma dönüşümü, otooksidasyon reaksiyonları için gereklidir. Fakat ALA'nın amino grubunun enolizasyonunun oksidasyon reaksiyonlarında aktif olmadığı görülmüştür. Enolize ALA, daha sonra otookside olmakta ve ferrisitokrom C'nin indirgenmesi ile birlikte süperoksit anyonu oluşturarak; aynı zamanda elektron yörüngesi kaybetmektedir. ALA/oksihemoglobin (oksiHb) çiftinin ise oksidasyonu, ROS oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Buradaki basamaklarda sırasıyla tautoizomerizasyonu takiben enol formu oluşur; ALA, moleküler oksijene elektron vererek oksihb'in metHb'e dönüşümüne ve ALA radikali oluşumuna yol açar. ALA ve ALA/oksiHb otooksidasyon çifti etkileşerek, ROS bileşikleri içinde en yüksek reaksiyon kabiliyetine sahip OH^- ve O_2^- ile H_2O_2 'i oluştururlar. Bu bilgiyi SOD, katalaz ve mannitolün ALA/oksiHb çiftinin oksidasyonunu önlemesi sonucunda yukarıdaki radikallerin ortaya çıkmaması da desteklemektedir (Hermes-Lima ve ark., 1991; Costa ve ark., 1997; Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

Sonuç olarak, kurşun zehirlenmesinin patofizyolojisinde kabul edildiği gibi ALA birikiminin ROS oluşumu ve oksidatif hasarın kaynağı olduğu görüşüne varılmıştır. Buna ek olarak, ALA'nın bir oksidasyon ürünü olan 4,5-diokzovalelik asidin hem nükleozidde hemde izole edilmiş DNA içerisinde guanozini etkili bir şekilde alkilleyen ajan olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kronik olarak ALA verilmiş ratların DNA'larında; ALA'nın indüklediği DNA hasarına yol açan OH^- oluşumu

sonucunda 8-okzo-7,8- dihidro-29-deoksiguanozin ve 5-hidroksi-29-deoksisistidin düzeylerinin yükseldiği de rapor edilmiştir. Bu bulgular aynı zamanda ALA'nın genotoksik etkilerini de göstermektedir (Hermes-Lima ve ark., 1991).

2.6.3. Kurşunun Hücresel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkileri

Kurşun, civa ve kadmiyum gibi metaller; amino asitlerin az stabil yan zincirlerine, merkaptit, sülfidril gruplarına ve sisteinin -SH grubuna yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Kurşun, birçok enzimin -SH grubuna bağlanarak onları inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda kurşunla karşılaşmaya bırakılmış sıçanlarda ve insanlarda ALAD, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD), GSH, GSH-Rx, GST, GSH-Px, katalaz ve SOD gibi bazı enzimlerin antioksidan aktivitelerinin değiştiği gözlenmiştir (Costa ve ark., 1997).

G6PD, glukoz-6-fosfatı NADPH üzerinden okside ederek 6-fosfoglukonata dönüştüren ve pentoz fosfat yolunun ilk basamak enzimidir. G6PD, hücrenin mitokondri dışı reaksiyonlarının en önemli NADPH kaynağıdır. Bu NADPH, GSSG'ü, GSH'a indirgeyen GSH-Rx tarafından kullanılır. Lanchant ve ark. (1984), kurşunla inkübe etmeden önce G6PD'nin aktivitesini, GSH ve merkaptotanol gibi bazı tiyol bileşikleriyle ortadan kaldırarak, kurşunun -SH ve GSH ile etkileşimlerini incelemişlerdir. G6PD için, glukoz-6-fosfat ve NADP ile kurşunun kinetik çalışmaları sonucunda nonkompetitif inhibisyon ile yarıştıklarını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, pentoz fosfat yolunun inhibisyonunun kurşunla oluşan oksidatif hasara karşı eritrositleri daha da hassaslaştırdığı sonucuna varmışlardır. Fakat in vivo çalışmalar kurşunun G6PD üzerine etkilerinin daha karmaşık olduğunu göstermiştir. Vücuttaki pentoz fosfat yolu kritik NADPH düzeyini sağlamak için yüksek depo kapasitesine sahiptir. NADP/NADPH oranının düzenlenmesinde oksidatif stres şartlarında durum okside form lehinedir. Bu şartlar altında normalde fosforile glukozun pentoz fosfat yoluna girmesi %11 iken; oran %92'ye kadar çıkabilmektedir (Lanchant ve ark., 1984). Kurşuna maruz kalmış rat, hayvan ve insanlardaki eritrositlerde G6PD'nin artmasıyla ilgili yukarıdaki uyum mekanizması son çalışmalarla gösterilmiştir. Fakat Calderon-Salinas ve ark. (1993), aksine G6PD seviyesinin düştüğünü, Rogers ve ark. (1971) ise kurşuna maruz kalmayı takiben eritrositlerdeki G6PD aktivitesinin değişmediğini göstermiştir. Özetle G6PD seviyesi; kurşuna maruziyet, alınan konsantrasyon, maruz kalma süresi ve oksidatif stresin hücrelerin içine ulaşmasına göre artmakta veya azalmaktadır (Gurer ve Ercal,

2000).

GSH, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir ve vücuttaki dokulara bağlı olmayan sülfürün %90'ını sağlamaktadır. Bundan dolayı GSH hücreleri oksidatif strese karşı korumada hayati bir rol oynar. Bunu ya -SH grupları sayesinde ROS ile ilişkiye girerek enzimatik olmayan antioksidan etkiyle ya da ROS'un detoksifikasyonunda koenzim veya kofaktör olarak enzimatik yolla gerçekleştirir. GSH, $\text{OH}^\cdot$ ve singlet O_2 gibi ROS'ların temizleyicisidir. Metalleri bağlayacak bir amino grubu, bir sülfidril grubu, iki adet peptit bağı ile karboksilik asit grupları taşımaktadır. Kurşun, -SH grubuna bağlanarak, GSH'nın antioksidan aktivitesini ve düzeyini düşürmektedir (Gurer ve Ercal, 2000).

Diğer yandan; GSH-Px, katalaz ve SOD ise metalloproteinler olup, antioksidan etkilerini sırasıyla peroksitler, H_2O_2 ve $\text{O}_2^\cdot$ 'yi enzimatik olarak detoksifiye ederek gösterirler. Buraya kadar anlatılan enzimler aktiviteleri için eser elementlere ihtiyaç göstermekte; bu da kurşun toksisitesi için onların duyarlılıklarını arttırmaktadır (Gurer ve Ercal, 2000).

GSH-Px tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin redüksiyonu sırasında GSH'nın GSSG'a oksidasyonunu katalize eder; bu arada H_2O_2 'de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda kurşunun GSH-Px düzeylerini arttırdığı; bir çalışmada ise azalttığı belirlenmiştir (Mousa ve ark., 2002; Sivaprasad ve ark., 2004).

SOD, süperoksidi hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkisine karşı koruyan SOD enzimi, ayrıca fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda enzimin aktivitesi yüksek iken; hücre dışı alanda enzim aktivitesi oldukça düşüktür (Monteiro ve ark., 1985; Kasperczyk ve ark., 2004; Çaylak ve Halifeoglu, 2007).

Katalaz, peroksizomlarda lokalize olmuş ve her birinin yapısında hem grubu ile bir molekül NADPH bulunan dört alt üniteden meydana gelmiş bir antioksidan enzimdir.

Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşmuş olan H_2O_2 , OH^- radikalinin öncüsü olması nedeniyle vücudun antioksidan savunma sistemi için önemli bir tehdittir. Bu nedenle birçok ROS'dan daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz ortamda yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 bulunduğunda (K_m 'si milimolar değerlerdedir), onu iki aşamada su ve moleküler oksijene parçalar (Monteiro ve ark., 1985; Kasperczyk ve ark., 2004; Çaylak ve Halifeoglu, 2007).

2.7. Kurşun Maruziyetinin Tanısı

Açıklanamayan hipertansiyon, ensefalopati, periferik motor nöropati, gastrik kolit ve böbrek yetmezliği kurşun zehirlenmesi şüphesi uyandırır. Yüksek kan kurşun düzeylerini tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Mikroskop altında görülebilen kan hücrelerindeki değişikliklerin varlığı veya X ışını altında kemik yoğunluklarının izlenmesi kullanılan yöntemlerdendir. Kronik kurşun maruziyeti kemik röntgen floresans teknolojisi kullanılarak ölçülebilir. Bulgular bizmut, fosfat ve florür toksisitesi ile karıştırılabilir. Zehirlenme kan örneklerinde eritrosit protoporfirin düzeyi ölçülerek de değerlendirilebilir. Kandaki kurşun miktarının yüksek olduğu durumlarda eritrosit protoporfirin seviyesi yükselir. Ayrıca, kan ve idrar kurşun düzeyi de değerlendirilmelidir (Kasperczyk ve ark., 2004; Kutlu ve ark., 2005; Szostak ve Szostak Wegierek, 2006).

2.8. Kurşun Maruziyetinin Tedavisi

Metal zehirlenmesi akut, subakut veya kronik olabilir. Genellikle akut zehirlenmelerin teşhisi hızla konur ve acil tıbbi müdahale gerektirir. Bununla birlikte kronik toksisitelerin teşhisi daha zordur ve bunlar geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Zehirlenmelerin sağaltımında izlenen yollar; sistemik dolaşıma daha fazla metal geçişinin önlenmesi, metalin dolaşımdan elimine edilmesi ve sistemdeki metalin inaktivasyonu şeklindedir. Kana metal geçişinin önlenmesinde birincil yol maruziyetin kesilmesidir. Toksik metallerin alınması durumunda akut vakalarda, dört saat içinde mide yıkanmasına/boşaltılmasına veya mide boşalmasının mümkün olmadığı durumlarda midede metal inaktivasyonuna ihtiyaç duyulur. Aktif metaller için süt, yumurta akı, sodyum bikarbonat, sodyum veya magnezyum sülfat kullanılabilir (Szostak ve Szostak Wegierek, 2006; Vazquez ve ark., 2008).

Kelasyon tedavisi yüksek kan kurşun düzeyini etkili bir şekilde düşürür ancak düşük kurşun seviyeleri ile ilişkili kurşunla indüklenen bozuklukları önleyemeyebilir. Bu dokulardaki kurşunun yeterince arındırılmaması veya önceden varolan doku hasarının tersine çevrilemesinden kaynaklanabilir. Dimerkaprol, kalsiyum disodyum etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve süksimer kelatlama için primer olarak kullanılan üç ajandır. Kelasyon tedavisinin ilk birkaç günü içinde kan kurşun seviyelerinde hızlı bir düşüş olur. Dimerkaprol, ensefalopati olgularında veya hızlı tedavi için tercih edilen kelatördür. Dimerkaprol- metal kelat ayrışmasını müteakip, kurşun geri emilimini önlemeye yardımcı olmak için tedavi boyunca idrarın alkalileştirilmesi gerekir. Bu ilaçların çoğu doza bağlı ve geçici olarak mide bulantısı, kusma, baş ağrısı, hipertansiyon, taşikardi, hiperpireksi ve hafif- orta dereceli lökopeniye neden olur. Kalsiyum disodyum EDTA (CaNa_2EDTA) etkili kurşunu çözer. Ekstraselüler kurşunu kuvvetli bir şekilde bağlar ve metali hızla idrarla uzaklaştırır. İdrarda kadmiyum ve civa atılımının artışı da CaNa_2EDTA tedavisinden kaynaklanır. Bu kelatör metabolize edilmez ve çoğunlukla hücre dışı sıvıda dağılır. Kurşun zehirlenmesinin tedavisi sırasında gözlenen CaNa_2EDTA 'nın yan etkileri arasında baş ağrısı, miyalji, mide bulantısı ve kusma yer alır. EDTA, dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ve 2,3 dimerkaptopropan 1-sülfonat (DMPS)'dan daha fazla temel mineral kaybına (çinko, demir, kalsiyum ve magnezyum) neden olur. EDTA kelasyonunun bilinen diğer yan etkileri arasında glukozüri, hipotansiyon, lakrimasyon, burun tıkanıklığı ve mukokütanöz lezyonlardır (Mitre ve ark., 2005; Vazquez ve ark., 2008). DMSA, hafif veya asemptomatik kurşun toksisitesi vakaları için tercih edilen kelatlayıcıdır ve sadece oral kapsül formülasyonu mevcuttur. British Anti-Lewisite (BAL), kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan en eski ajanlardan biridir. Kan-beyin bariyerini hızla geçme yeteneği yüksektir. İkiye bölünmüş dozda günde 2.5 mg/kg miktarında kas içi uygulanır. Tedavi süresi en az üç gündür. BAL idrarla çinko atılımını hızlandırır. D- penisilamin redüktif bir kelatördür. Kurşun veya bakır katyonlarının proteinlere bağlanma oranını düşürür ve nihayetinde idrarda atılımını uyarır. D- penisilamin, Wilson hastalığının tedavisi için tercih edilen ilaçtır. Bununla birlikte, renal veya kemik iliği disfonksiyonu (lökopeni ve trombositopeniye yol açan) ve dermatolojik komplikasyonlar gibi yaşamı tehdit eden yan etkilerinden dolayı, kurşun zehirlenmesinin tedavisinde üçüncül ilaç olarak kabul edilir. DMSA esas olarak

böbreklerdeki kurşunu kelatlar. Hafif ve asemptomatik kurşun zehirlenmesinin tedavisinde ilk tercihtir. Kurşun seviyesini hızla düşürür ve sülfidril bağımlı enzimleri aktive eder. Genellikle iyi tolere edilir, ancak bazen klinik olarak önemli olumsuz etkilere neden olabilir. En sık görülen yan etkiler abdominal ağrı, geçici deri döküntüsü, artmış hepatosellüler enzim seviyesi ve nötropenidir. DMSA, özellikle, oral bir antidotun tercih edilmesi durumunda CaNa_2EDTA 'nın bir alternatifi olarak düşünülebilir (Cave, 1991; Hasle ve Rose, 1991).

2.8.1. Kurşun Maruziyetinin Tedavisinde Antioksidanların Kullanımı

Kurşuna maruz kalan dokularda ROS oluşumu artmakta ne hücredeki antioksidan mekanizmalarının tüketilmesi ile prooksidan-antioksidan denge bozulmakta ve hücredeki kritik moleküllerin oksidatif hasara uğraması ile de doku zedelenmesi oluşmaktadır. Kurşun zehirlenmesinde kullanılan antioksidanlar kurşunun bağlandığı bileşiklerde onun yerine bağlanarak, dokulardan kurşunu uzaklaştırırlar ya da vücutta endojen olarak kurşunun oluşturduğu oksidatif hasara karşı koyarlar. Tüm bunların ışığı altında antioksidan etkili bazı moleküllerin koruyucu ve tedavi edici olarak tek başlarına ya da şelatör maddelerle birlikte kullanılması üzerine hayvanlarda deneysel çalışmalar yapılmıştır (Ercal ve ark., 2000; Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001).

Vitamin B6 (Tiamin): Vitamin B6 'nın kurşun intoksikasyonunda verilmesinin ALAD aktivitesi inhibisyonunu ve çinko-protoporfirin düzeyini azalttığını gösterilmiştir. Ayrıca kan, böbrek ve karaciğer kurşun düzeylerinin düştüğü; beyin kurşun düzeyinde ise bir azalmanın olmadığı görülmüştür. Bu etkilerini vitaminin pirimidin halkasındaki nitrojen atomu ile amino grubu ya da tiyazol halkasındaki sülfür atomu ve yan zincirdeki hidroksil grubunun kurşun ile şelat oluşturması yoluyla veya kurşunun emilimini azaltarak yaptığı ileri sürülmüştür. Vitamin B6 ile yetersiz beslenen ve kurşunla karşılaşmaya bırakılmış sıçanlarda kontrole göre GSH düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Vitamin B6'nın bu durumu GSH metabolizmasındaki transsülfürasyon yolunda kofaktör olmasıyla açıklanmıştır. GSH 'nın prekürsörü olan sisteinin çoğu, diyetle alınan metiyoninden sentezlenmektedir. Bundan dolayı vitamin B6 alımındaki bir eksiklik metiyonine bağımlı sisteinden GSH sentezini önlemektedir. Bu sonuç kurşunla karşılaşan sıçanlarda maruz vitamin B6'nın GSH sentezini arttırarak dolaylı olarak antioksidan bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. CaNa_2EDTA ile birlikte tiamin verilmesi

beyinin de arasında bulunduğu dokulardan kurşunun ayrılarak, idrarla daha fazla atılmasına ve kurşunun oluşturduğu biyokimyasal parametrelerde düzelmeye neden olmuştur. Bu esnada tiaminin dokulardan kurşunu ayırıp, atılabilir bileşikler oluşturarak etkisini gösterdiği de düşünülmektedir (Tandon ve ark., 1987; McGowan, 1989).

Çinko: Kurşun in vivo olarak aktif bölgelere bağlanmada çinko ile yarışmaktadır. Deneysel olarak kurşunla birlikte çinko verilmesi, ALAD gibi çinkoya bağımlı enzimlerin aktivitesini geri döndürmekte ve idrarla ALA atılımını da azaltmaktadır. Düşük dozda alındığında kurşun zehirlenmesine karşı koruyucudur ve etkisini gastrointestinal kanaldan kurşun emilimini önleyerek göstermektedir. Ayrıca böbrek ve karaciğerde metallerin emilimini artırarak da kurşunun etkilerini azaltmaktadır. Çinkonun sıçanlarda kurşun zehirlenmesinin tedavisi ve önlenmesinde tek başına ya da metiyonin veya çinko ile birlikte kullanımının yararlı olduğu gösterilmiştir. Çinko, metiyonin, çinko ile metiyonin birlikte verilerek yapılan sıçan çalışmasında GSH 'nın prekürsörü olan metiyoninin tek başına ya da çinko ile birlikte karaciğer GSH düzeyini koruduğu belirlenmiştir. Çinkonun antioksidan etkisini; oksidasyona karşı sülfhidril gruplarını koruyarak ve geçiş metalleri ile ROS (OH ve O₂⁻) oluşumunu önleyerek gösterdiği belirtilmiştir (Bray ve Bettger, 1990).

Selenyum: Hücrelerin antioksidan savunma sistemlerinde anahtar bir rol alan GSH-Px, selenyuma kofaktör olarak ihtiyaç duyar. Selenyum ile kurşun arasında bir antagonizma vardır ve azalan selenyum alımı GSH-Px aktivitesini de düşürmektedir. Selenyumun kurşuna maruz kalma öncesi enjeksiyonu ile SOD, GSH-Rx aktivitesi ve GSH miktarını artırarak kurşuna karşı ratları koruduğu gösterilmiştir. Selenyum bu koruyucu etkisini; inaktif selenyum-kurşun bileşiği oluşturarak, süperoksit radikalinin temizlenmesinde görevli SOD'ı stimüle ederek ve yeterli miktarda GSH bulunduğunda glutatyon redüktazın antioksidan etkisini indirek olarak arttırarak gerçekleştirmektedir (Othman Al ve El Missiry, 1998).

Vitamin E (Alfa tokoferol): Yağda eriyen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunan E vitamini lipid peroksidasyonunu engelleyen esas antioksidandır. Hidrofobik kısmında -OH grubu olması nedeni ile lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alfoksil radikalleri

yağ asidi yerine alfa tokoferol ile birleşir ve böylece lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu kırılmış olur. Yapılan çalışmalarda vitamin E bakımından eksik beslenen ratlarda eritrositlerin filtrasyon süresi ile lipid peroksidasyonu arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar insanlarda kurşun maruziyetinde yüksek dozda vitamin E alınmasının eritrositlerin deformite ve oksidatif hasara karşı dayanıklılığını arttıracaklarını göstermiştir (Chao ve ark., 2002; Singh ve Jialal, 2004).

Vitamin C (Askorbik asit): Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidandır. Kurşuna karşı yararlı etkisini onunla bileşik oluşturması sayesinde göstermektedir. Kurşuna maruz kalmış ratlarda askorbik asidin tek başına veya tiaminle birlikte verilmesi kurşunun idrarla eliminasyonunu arttırmakta, karaciğer ve böbrekte kurşun düzeyini azaltmakta ve kan ALAD aktivitesinin inhibisyonunu önlemektedir. Askorbik asidin kurşunla bileşik oluşturabilmesi, bu yararlı etkisini açıklamaktadır (Chao ve ark., 2002; Kutlu ve ark., 2005).

Etoksikuin: Hayvan yemlerinde kullanılan koruyucu bir madde olan etoksikuininin kurşunun sistemik etkilerini ve lipid peroksidasyonunu normale çevirdiği bildirilmiştir. Kurşun toksisitesindeki peroksidatif olayları etoksikuinin güçlü bir şekilde inhibe ederek bunu gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (Donaldson, 1991).

S-adenozil-L-metiyonin (SAM): S-adenozil-L-metiyonin (SAM) metiyoninin bir metaboliti ve önemli bir metil vericisidir. Metiyonin gibi vücudun sülfür gerektiren birçok metabolik yolunda gereklidir. SAM, membranların akıcılığını sağlayan membran fosfolipidlerinin sentezindeki transmetilasyon reaksiyonunda metil vericisi olarak ana bir role sahiptir. SAM içeren diğer bir metabolik yol ise molekülden transsülfürasyonla bir metil grubunun ayrılması ile S-adenozil-homosistein oluşmasıdır. Bu bileşik homosisteine ve sonra glutatyonun öncülü olan sisteine dönüşür. GSH'nın prekürsörü olan SAM'in kurşun-etanol verilen ratlardaki yararı Flora ve ark. tarafından araştırılmıştır. SAM 'in beyin, kan ve karaciğerin kurşun+etanol maruziyeti süresince bazı biyokimyasal parametreleri (kan ALAD, GSH, beyin ve karaciğerdeki lipid peroksidasyonu ölçütleri, GSH miktarı) koruduğu görülmüştür. Bundan dolayı SAM'in, beyin ve karaciğerin kurşun+etanolla indüklenen oksidatif hasarın şelasyon tedavisinde, şelatör ilaçların adjuvantı olarak kullanılmasının yararlı olabileceği

bildirilmiştir (Flora ve Seth, 1999; Atmaca, 2004).

N-asetilsistein (NAC): Sülfür içeren amino asitlerden sisteinin glutatyonla dönüşümünde bir ara ürün olan NAC sistein gibi serbest radikalleri sülfidril grubuyla bağlar. NAC, yapısındaki tiyol bileşiği taşıyan bir antioksidan olmasından dolayı kurşunun yaptığı oksidatif strese karşı vücudu korumaktadır (Parcell, 2002; Atmaca, 2004).

Metiyonin: Protein sentezinde metiyonin önemli bir metil vericisidir. Biyolojik sistemlerdeki dinamik dengenin devamlılığı, özellikle de metiyonin rezidüsünün oksidasyon ve redüksiyon dengesi, proteinlerin regülasyonunda önemlidir. Metiyonin rezidüleri oksidatif stres altındaki proteinlerin oksidasyondan korunması için son şans antioksidan savunma sistemi olarak davranırlar. Her ne kadar kurşun zehirlenmesindeki koruyucu etkisi in vivo olarak reaktif oksijen türevlerini azaltan GSH sentezi için gerekli sisteine dönüşmesi olsa da tam olarak etki mekanizması bilinmemektedir. Metiyoninin yapısında sülfür grubu taşıması nedeniyle kurşun ile şelat oluşturabilme yeteneği de bulunmaktadır (Parcell, 2002; Atmaca, 2004). Patra ve ark.'nın (2001), sıçanlarda dört hafta boyunca kurşun asetat vermiş ve izleyen beşinci hafta boyunca oral yolla metiyonin vermişler; kan kurşun ve karaciğer, böbrek ve beyin MDA düzeylerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Patra ve ark., 2001). Çaylak ve arkadaşlarının sıçanlara oral yolla beş hafta süresince 2000 ppm kurşun asetat ile birlikte koruyucu etki için verdikleri metiyonin (oral 100 mg/kg/gün), kurşunla uyarılan oksidatif strese bağlı artmış serum MDA, eritrosit SOD ve GSH-Px ile karaciğer, böbrek ve beyin dokularına ait katalaz düzeylerini düşürmüş; kurşuna bağlı azalan plazma vitamin A ve E düzeyleri ile böbrek ve beyin total antioksidan kapasitesini ise yükseltmiştir (Çaylak ve ark., 2008).

Taurin: Taurin, yapısındaki serbest sülfhidril grubu ile ROS temizlenmesinde doğrudan etkili ve oksidatif zedelenmeler kaynaklanan membran geçirgenliğinin önlenmesinde ise dolaylı etkili bir antioksidandır. Taurin kurşunla indüklenen oksidatif zedelenme üzerine olan etkilerini lipid peroksidasyonunu azaltarak göstermektedir. İçme sularına beş hafta boyunca 2000 ppm kurşun verilerek oluşturulan oksidatif hasar sonrası, sıçanlara bir hafta 1.1 gr/kg/gün taurin verilmesi GSH miktarını arttırmakta; kurşunla artmış CAT, G6PD aktiviteleri ile MDA düzeylerini ise düşürmektedir (Gürer ve ark., 2001).

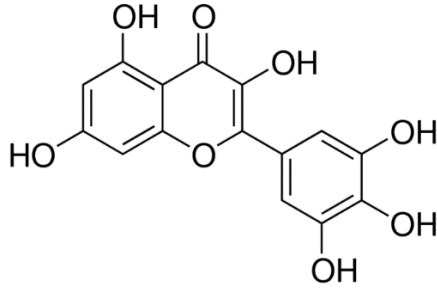
Alfa Lipoik Asit (Tiyoktik Asit): Mitokondride enerji ile ilgili pirüvat ve α -

ketoglutarat dehidrojenaz multienzim komplekslerinde kofaktör olarak rol alır. Terapötik olarak serbest radikallerin hücrelere vereceği zararların önlenmesinde, antioksidan etkisiyle oksidatif stresin azaltılmasında ve kan şekerinin düşürülmesinde yararlanılmaktadır. Antioksidan etkisi ile alfa lipoik asit, kurşunun bazı toksik etkilerini azaltmaktadır. İndirgenmiş formu olan dihidrolipoik asit iki adet serbest sülfidril grubu içermektedir. Alfa lipoik asit ve dihidrolipoik asitin ikisi de bazı ROS'ları temizleyebilir; vitamin E, vitamin C, GSH gibi bazı antioksidanları radikal ya da inaktif formundan yeniden oluşturur ve ağır metallerle şelat yapabilir (Packer ve ark., 1995).

Bu antioksidanların yanısıra çeşitli flavonoidler ve bitki ekstraktarı, endojen antioksidan artışı ile oksidatif stresi azaltarak ve endojen antioksidan savunma sistemini indükleyerek, çinko, selenyum, demir ve kalsiyum ayrıca Emilimi azaltıp kurşun yükünü düşürerek etkili olurlar (Pugliese ve ark., 1998).

2.9. Mirisetin

Mirisetin flavonoller alt grubuna ait bir flavonoiddir. Moleküler yapısı Şekil 3'de gösterilen mirisetin doğada hem besin olarak tüketilen hem de alternatif tıpta kullanılan çeşitli bitkilerin yapısında değişik oranlarda bulunur. Mirisetin ve diğer bazı flavonoidler (Kersetin, kamferol, apigenin vb.) çeşitli bitkilerde farklı konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Güney Asya kaynaklı, belli başlı bazı tropikal bitkilerin (tıbbi ve besin) flavonoid içeriklerinin incelendiği bir çalışmada semambu bitkisinin yaprakları ve sarımsak, çalışılan bitkiler arasında en yüksek mirisetin oranına (Sırasıyla 853 mg/kg ve 693 mg/kg) sahip bitkiler olarak tespit edilmiştir (Miean ve Mohamed, 2001). Bu çalışmada tespit edilen diğer bir mirisetin kaynağı da 303 mg/kg ile siyah çaydır. Hollanda'da yapılan bir başka çalışmada da, toplumda tüketilen mirisetin gibi bazı flavonoidlerin ana kaynağının çay ve soğan olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların ortaya çıkardığı sonuca göre besinler yoluyla aldığımız mirisetin'in ana kaynakları; soğan, sarımsak, çay, lahana, elma, kiraz, üzüm, kırmızı şarap gibi besinlerdir. Mirisetin bitkilerde çoğunlukla glikozid yapısında bulunur, aglikon formu daha nadirdir (Canada ve ark., 1990).



Şekil 3. Mirisetin'in moleküler yapısı (Ong ve Khoo, 1997)

Mirisetin metabolizması ile ilgili olarak literatürde insanlarla yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak sıçanlarla oral mirisetin verilerek idrar ve feçeste mirisetin metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmada mirisetin'in ana metabolitinin idrarla atılan 3-5-dihidroksifenil asetik asit olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca neomisin uygulanan sıçanlarda mirisetin metabolitlerinin tamamen kaybolmasıyla mirisetin'in barsak bakterileri tarafında metabolize edildiği sonucuna varılmıştır (Griffiths ve Smith, 1972).

Mirisetin, 1950'lerden beri çeşitli biyolojik özellikleri araştırılan bir moleküldür. İnsan sağlığına değişik açılardan faydalı olabileceği teorisi çeşitli araştırmacılar tarafından ispatlanmaya çalışılmıştır. Sağlıklı ve hastalık taşıyan insan ve hayvan hücrelerinde Mirisetin'in pek çok etkisi araştırılmıştır ve araştırılmaktadır. Antioksidan, antikarsinojen, antidiyabetik, antiviral ve bazı sağlığa yararlı olabilecek özellikleri bulunduğu savunulan mirisetin'in DNA hasarlayıcı, prooksidan, DNA tamirini engelleyici etkilerinin olduğunu da savunan çalışmalar da vardır (Griffiths ve Smith, 1972).

Mirisetin'in hem enzimatik hem de enzimatik olmayan sistemler yoluyla antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Mirisetin'in A ve B halkalarındaki OH ekleri, çift bağları ve 3-OH değişimlerinden dolayı antioksidan özelliğinin olduğu gösterilmiştir (Mustafa ve ark., 2010). İnsan lenfositleri ile yapılan bir çalışmada, lenfositler 30 dk. ve 18 saat çeşitli mirisetin konsantrasyonları ve ardından 5 dk H_2O_2 ile muamele edilmiş ve Komet yöntemi ile incelenmiştir. 30 dk mirisetin uygulamasının 100 μM konsantrasyonda H_2O_2 'nin oluşturduğu DNA hasarını engellediği tespit edilmiştir (Duthie ve ark., 1997). Çin Hamsteri akciğer fibroblastlarında yapılan bir çalışmada da mirisetin'le muamele edilmiş hücreler H_2O_2 ile oksidatif hasara maruz bırakılmış ve 24

saat sonar radikal temizleme aktivitesi, antioksidan enzimlerin ekspresyonu üzerine etkisi, hücrel DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ölçülmüştür. Sonuçta mirisetin'in 10 µg/ml konsantrasyonda ortamdaki radikallerin % 73'ünü temizlediği, H₂O₂ ile ekspresyonları azalan bakır-çinko SOD (CuZn SOD), manganez SOD (MnSOD), GSH-Px ve katalaz aktivitelerinin mirisetin uygulamasıyla yüksek oranda geri döndüğü tespit edilmiştir. Komet deneyi ile yapılan değerlendirmede ve lipid peroksidasyon değerlendirmesinde de mirisetin'in oksidasyon hasarından koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Wang ve ark., 2010).

Primer sıçan hepatositleri ile yapılan bir çalışmada DNA oksidasyonu için demir şelatı (Fe-NTA⁻, ferik nitrilo triasetat) kullanılmıştır. 100 µM konsantrasyonda mirisetin'in lipid peroksidasyonu ve oksitlenmiş DNA ürünlerini anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (Abalea ve ark., 1999). Caco ve Hep-G2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada;24 saatlik 200 µM mirisetinle inkübasyonu ve ardından H₂O₂ hasarı yapılmış hücreler Komet ile değerlendirildikten sonra mirisetin'in bu hücre serilerinde anlamlı derecede koruyucu olduğu bildirilmiştir (O'Brien ve ark., 2000). Oksidatif hasarı önleyici etkisini araştıran bu çalışmaların sonuçlarına göre, mirisetin, hücrede farklı etmenlerle ortaya çıkan oksidatif hasarı önlemede etkili bir ajan olarak görünmektedir.

Mirisetin'in kanserli ya da işlevi bozulmuş hücre ve dokulardaki etkilerini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Primer ve metastatik pankreas kanseri hücre serilerinde yapılan bir çalışmada da fosfatidil inositol-3 kinaz (PI3 kinaz) inhibisyonu yoluyla her iki hücre serisinde de apoptozu indüklediği saptanmıştır (Phillips ve ark., 2011).

Mirisetin ve mesane kanseri hücre serisi T24 ile çalışılan bir araştırmada ise, mirisetin'in bu hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği, hücreleri G2/M fazını geciktirerek apoptoza sürüklediği kanısına varılmıştır. Bu çalışmada ayrıca T24 inokülasyonu yapılan çıplak farelerde mirisetin verilen grupta (5 mg/gün) tümör gelişiminin yavaş olduğu ve yaşam süresinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2012).

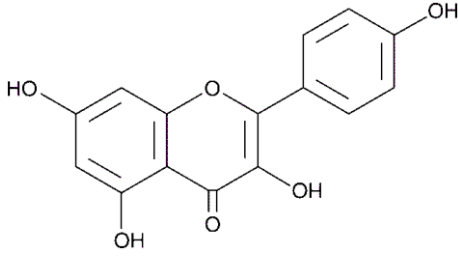
Mirisetin'in lösemi (HL-60) ve hepatoma (Hep-G2) hücrelerinde seçici apoptotik etkisinin incelendiği bir çalışmada mirisetin'in bu kanser hücrelerinden HL-60 serisinde apoptozu doza ve zamana bağlı olarak indüklediği, ancak Hep-G2 hücrelerinde böyle bir

etki göstermediği tespit edilmiştir (Morales ve Haza, 2012). Mirisetin'in ölümsüz hücreleri apoptoza sevkettiğine dair bir diğer bulgu da HaCat hücreleri ile yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur. Düşük doz, tamir edilebilecek düzeyde Ultraviyole-B'ye (UV-B) maruz bırakılan bu hücrelerde, mirisetin'in Akt ve Bad moleküllerinin aktivitesini düşürerek mitokondriyal apoptotik moleküllerin salınımını arttırdığı ve hücreyi p53'ten bağımsız bir yoldan apoptoza sürüklediği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2010).

Mirisetin diabet tedavisi ya da korunması için de aday bir molekül olarak düşünülmektedir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, streptozotosin (STZ) ile diyabet yapılmış hayvanlarda 10 günlük bir mirisetin (6 mg/gün, ip) uygulamasını takiben yapılan tetkiklerde Mirisetin'in oksitleyici aynı zamanda nitratlayıcı bir ajan olan peroksinitrin oluşturduğu DNA hasarından hücreyi koruduğu bildirilmektedir (Chen ve ark., 2011). Sıçan astrositleri ve plazmid DNA'sıyla yapılan bu deneylerde mirisetin'in radikal temizleyici etkisi sayesinde bu korumayı gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Zelus ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, mirisetin'in adacık hücrelerini (PC12) öldürerek tip II diabete neden olduğu düşünülen Islet Amiloid Polipeptid-Amilin agregasyonunu engellediği Tioflavin T (ThT) bağlanma testi ile gösterilmiştir (Zelus ve ark., 2012). Mirisetin'in anti-diabetik etkisini araştırmak için yapılan bir hayvan çalışmasında, streptozotosin ile diabetik yapılan hayvanlarda 6 mg/gün dozunda verilen mirisetin'in glomeruloskleroza azalttığı, kreatinin klirensini düşürdüğü, üreyi düşürdüğü ve antioksidan enzim aktivitelerini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Ozcan ve ark., 2012).

2.10. Kaemferol

Kaemferol (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on), birçok yenilebilir bitki (brokoli, lahana, fasulye, pırasa, soğan, domates, çilek ve üzüm) ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bitkilerde (*Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Equisetum arvense*, *Moringa oleifer* ve *Sophora japonica*) bulunan bir flavonoiddir (Şekil 4) (Calderón-Montaño ve ark., 2011; Alam ve ark., 2020).



Şekil 4. Kaemferolün moleküler yapısı (Alam ve ark., 2020)

Kaemferol difenil propan yapısına (C₆-C₃-C₆) sahiptir ve 4-koumaroil-CoA (C₆-C₃) 'un üç malonil-CoA (C₆) molekülü ile yoğunlaştırılmasıyla sentezlenir (Winkel-Shirley, 2002). Düşük molekül ağırlıklı (MA: 286.23 g/mol) ve sarı renkli bir bileşiktir (Calderón-Montaño ve ark., 2011). Doğada çoğunlukla glikozitleri şeklinde bulunan bileşiğe glikoz, ramnoz, galaktoz ve rutinoz gibi şekerler genellikle glikozitler oluşturmak üzere bağlanır. Kaemferolün yüksek glikozit polaritesi, emilimini engeller, ancak aglikonların ara polaritesi emilimi kolaylaştırır. Kaemferol esas olarak ince bağırsakta emilir. Kaemferolün lipofilikliği, pasif difüzyonla emilimini kolaylaştırır, ancak yapılan çalışmalar difüzyon ya da aktif taşımayla da absorbe olabileceğini göstermektedir (Crespy ve ark., 2003). Kaemferol, konjugasyon enzimleriyle ince bağırsakta metabolize edilebilir. Kolon mikroflorası tarafından da yoğun şekilde metabolize edilir. Kolonik bakteriler hem glikozitleri hem aglikonlara hidrolize edebilir. Emiliminden sonra, kaemferol, glukuronidasyon, sülfatlama veya metilasyona uğrayarak metabolize edilir (Oliveira ve Watson, 2000; Crespy ve ark., 2003).

Kaemferolün güvenliği ile ilgili çelişkili raporlar vardır. Bazı çalışmalar kaemferolün antitümör aktiviteyi indüklediğini göstermiş olmasına rağmen diğer çalışmalar da bu flavonoidin genotoksik etkileri indükleyebileceğini ortaya koymuştur (Francis ve ark., 1989; Silva ve ark., 1996; Edenharder ve Tang, 1997; Niering ve ark., 2005). Flavonoidler antioksidanlar olarak bilinmesine rağmen, bu bileşikler ayrıca spesifik koşullar altında pro-oksidan ajanlar olarak da hareket edebilirler. Kaemferolün de pro-oksidan aktivitesi genotoksik etkilerinin görülmesinde önemli bir rol oynayabilir (Mira ve ark., 2002). Çok sayıda in vitro çalışma kaemferolün genotoksik ve kanserojen olabileceğini gösterilmesine rağmen bu etkiler in vivo çalışmalarda gösterilmemiştir (Calderón-Montaño ve ark., 2011).

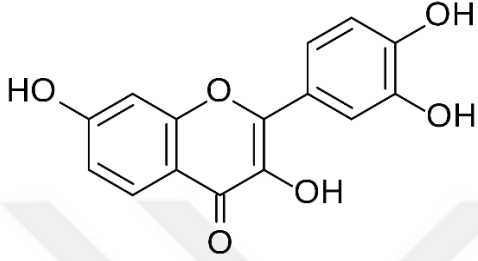
Çok sayıda preklinik çalışma, kaemferolün antioksidan, antikanser, antienflamatuar, antimikrobiyal, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antidiyabetik, antiosteoporotik ve östrojenik/antiöstrojenik etki gösterdiğini ispatlamıştır (Calderón-Montaño ve ark., 2011).

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri yaygın olarak kabul edilmektedir. Çok sayıda çalışmada kaemferol, bazı kaemferol glikozitleri ve birkaç kaemferol içeren bitkilerin sadece in vitro değil, in vivo olarak antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (Niering ve ark., 2005). Bazı çalışmalar, C₄'te bir okso grubuyla birlikte C₂-C₃'te bir çift bağ mevcudiyetinin ve C₃, C₅ ve C₄'de hidroksil gruplarının varlığının, kaemferolün antioksidan aktivitesinde yer alan önemli yapısal özellikler olduğunu göstermiştir. Kaemferol, ksantin oksidaz enzimi gibi ROB üreten enzimlerin aktivitesini inhibe edebilir (Özyürek ve ark., 2009). Diğer flavonoidler gibi kaemferolde, Fenton reaksiyonu ile demir veya bakır iyonlarını şelatlayarak hidroksil radikal oluşumunu azaltabilir (Calderón-Montaño ve ark., 2011). Kaemferol ayrıca, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu veya aktivitesini artırarak antioksidan etkilerin görülmesini sağlayabilir (Doronicheva ve ark., 2007). Kaemferolün antioksidan aktivitesi birçok in vivo çalışmada gözlenmiştir. Örneğin, kaemferolün hücre içi ROS birikimini azalttığı ve *Caenorhabditis elegans*'ın sağ kalımını arttırdığı bulunmuştur (Kampkötter ve ark., 2007). Kaemferol türevleri içeren *Capparis spinosa* ekstresi, sağlıklı gönüllülerde topikal olarak uygulandığında önemli antioksidan aktivite göstermiştir (Bonina ve ark., 2002).

Epidemiyolojik kanıtlar (vaka kontrol ve kohort çalışmaları), kaemferol bakımından zengin gıdaların tüketiminin mide, akciğer, yumurtalık ve pankreas kanseri de dâhil olmak üzere bazı kanser türlerinin gelişme riskini azaltabileceğini göstermiştir. Her ne kadar az sayıda çalışma kaemferolün in vivo hayvan modellerinde anti-kanserojen aktivitesini değerlendirmiş olsa da birçok preklinik çalışma bu flavonoidin kanseri önleyici ve tedavi edici özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (Calderón-Montaño ve ark., 2011). Bazı çalışmalar, düşük kaemferol konsantrasyonlarının DNA'yı farklı kanserojenlerin neden olduğu hasardan koruyabileceğini öne sürmektedir (Anderson ve ark., 1997).

2.11. Fisetin

Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) flavonoidlerin bir alt grubu olan flavonol bileşiklerindendir ve 2 ila 160 µg/g konsantrasyonlarında çilek, elma, Japon hurması, üzüm, soğan, salatalık gibi sebze ve meyve türlerinde bulunmaktadır. Fisetinin molekül formülü $C_{15}H_{10}O_6 \cdot xH_2O$ ve molekül ağırlığı 286,24 g/mol' dür (Şekil 5) (Lu ve ark., 2005).



Şekil 5. Fisetinin molekül yapısı (Lu ve ark., 2005)

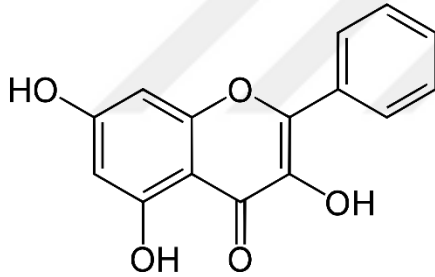
Fisetinin antikanser, anjiogenez inhibisyonu ve antiallerjik olmak üzere birçok farmakolojik özelliği tespit edilmiştir (Bhat ve ark., 2012; Goh ve ark., 2012). Aynı zamanda hem glikojenolizisi hem de glukoneogenezi baskılayarak antidiyabetik potansiyeli olduğu *in vitro* gösterilmiştir (Prasath ve Subramanian, 2011). Fisetin iskemi ve oksidatif stres gibi toksik uyarılardan sinir hücre kültürlerini korumaktadır. Direkt antioksidan kapasitesinin yanı sıra major intraselüler antioksidan olan GSH seviyesini de artırmaktadır. Diyabetik komplikasyonlardan makromoleküllerin reaktif dicarbonyl ve α -oxoaldehide metilglioksal (MG) ile glukasyona uğraması sorumludur. Glutasyon MG'nin uzaklaştırılmasında hız kısıtlayıcı enzim olan glyoxolase 1 için gerekli kofaktördür (Maher ve ark., 2011). Fisetin aynı zamanda GSH metabolizmasının upregülasyonundan sorumlu ve sinirlerin toksik stresten korunmaları ile ilişkili olan transkripsiyon faktör Nrf2'yi harekete geçirmektedir. Bunun ötesinde fisetin lipid peroksidasyonunu inhibe etmede ve demir şelasyonunda oldukça etkilidir (van Acker ve ark., 2011). Fisetin aynı zamanda yaşlanma ile seviyesi artan ve sinir hücre hasarlanması ile ilişkili peroksinitrit ilişkili glutasyon azalmasını da engellemektedir (Burdo ve ark., 2008).

Kemirgen ve insan kanser hücre hatlarıyla yapılan *in vitro* çalışmalarda fisetinin zamana ve doza bağlı olarak karaciğer (Constantin ve ark., 2011), akciğer (Touil ve ark., 2011), serviks (Ying ve ark., 2011), prostat (Haddad ve ark., 2010),

mesane (Li ve ark., 2010), lösemi (Kim ve ark., 2010), böbrek (Lee ve ark., 2008) gibi çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda fisetin'in farklı konsantrasyonlar da çeşitli tümör hücrelerinde genel olarak hücre döngüsünü durdurarak ve/veya değişik sinyal yolları üzerinden apoptoz mekanizmasını tetikleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2002; Lu ve ark., 2005).

2.12. Galangin

B halkasında hiç hidroksil taşımayan ve en fazla lipofilik özellik gösteren galangin (3.5.7-trihidroksiflavon) flavonol grubunda yer alır (Şekil 6). Galangin birçok sebze ve meyvede bulunmasına rağmen özellikle bal, bal arılarının ağaç reçinelerinden yaptığı propolis (1 gr propolis te 13 mg galangin vardır), kestane, zencefil ve hem baharat hem de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Alpinia officinarum* (havlıcan) ekstratının %10'u galanginden oluşur- oldukça fazla olduğu belirtilmektedir (Heo ve ark., 2001).



Şekil 6. Galanginin moleküler yapısı (Heo ve ark., 2001)

Galangin en etkili antioksidatif flavonoidlerden biridir ve birçok biyolojik aktivite rol almaktadır (Heo ve ark., 2001). Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda galanginin çeşitli mutajenlerin DNA'ya bağlanmasını veya DNA'yı metillemesini azaltarak antigenotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Dambros ve ark., 2005). Galanginin, menopoz sonrası dişilerde östrojen seviyesini modifiye ettiği ve östrojen-reseptör pozitif insan göğüs kanseri hücrelerinin çoğalmasını östrojen reseptörüne bağlanarak engellediği belirtilmektedir (So ve ark., 1997). Ayrıca çeşitli kanser türlerine neden olan polisiklikhidrokarbon ve heterosiklik amin gibi maddelerin aktivasyonunda temel rolü olan sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettiği belirtilmektedir (Guengerich, 1988). Galangin bakır iyonları yardımıyla gerçekleşen LDL)oksidasyonunun etkili bir

inhibitörüdür (Myara ve ark., 1993). Ayrıca NADPH varlığında süperoksit anyon radikallerinin oluşumunu engellediği belirtilmiştir (Imamura ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar galanginin antioksidatif ve serbest radikal süpürücü etkileriyle enzim aktivitelerini düzenleme ve kimyasalların genotoksik etkilerini baskılama gibi özellikler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Heo ve ark., 2001).

2.13. Çalışmanın Amacı

Literatürde gerek kurşuna gerekse diğer ağır metallere maruziyet sonucunda ortaya çıkan oksidatif stresin önlenmesi için çeşitli flavonoidler ve flavonoidlerce zengin bitki ekstraktları denenmiş ve bunlardan bazılarında olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak kurşun asetat intoksikasyonu sonucunda oluşan oksidatif strese karşı güçlü antioksidan özellikleri olduğu bilinen mirisetin, kaemferol, fisetin ve galanginin koruyucu etkileri araştırılmamıştır. Yaptığımız çalışmada bu flavonoidlerin kurşun asetat intoksikasyonu sonucu oluşan nefrotoksisiteye karşı koruyucu rolleri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamız, 25/06/2020 tarih ve 2020/06-03 karar sayılı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu alındıktan sonra, Nisan 2021’de Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü’nde gerçekleştirildi. Çalışmamızda Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğü’nden temin edilen 6-8 haftalık Wistar Albino cinsi, 70 adet erkek sıçan (250-300 g) kullanıldı. Sıçanlar, her grup ayrı kafeslerde yer alacak şekilde, özel kafesler içinde bakıldı ve standart sıçan yemi ile *ad libitum* olarak beslendi. Sıçanlar 12 saat ışık/karanlık periyodunda ve 18-22°C’de muamele edildi. Sıçanlar uygulama yapılmadan 10 gün önce adaptasyon amacıyla karantina altına alındı. Deney süresince gün aşırı içme suları değiştirildi ve kafes temizliği yapıldı.

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar

1-Butanol	Riedel de Haen
2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)	Sigma
5, 5’ dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)	Sigma
8-OH dG ELISA Kiti	Lifespan Biosciences
Amonyum Sülfat	Sigma
Asetik Asit	Merck
Bakır Klorür	Sigma
Bakır Sülfat Pentahidrat	Merck
Bisturi	Ribbel
Biyokimyasal Analiz Kitleri	Roche Diagnostics
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Distile Su	Polifarma
Enjektör (1-2-10 mL)	Ayset
Etil Alkol (Etanol)	Merck
Etil asetat	Merck
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Merck
Fenil asetat	Fluka

Fenol	Merck
Fisetin	Xi'an Natural Field
Folin Ciocalteu's Fenol Reagent	Sigma
Formaldehit	Merck
Galangin	Xi'an Natural Field
Glutasyon Redüktaz	Sigma
Guanidin HCl	Sigma
Hidrojen Peroksit	Merck
Kalsiyum klorür	Merck
Ketamin (Ketalar)	Pfizer
Ksalazin (Rompun)	Bayer
Ksantin Oksidaz	Sigma
Ksantin	Sigma
Kuersetin	Xi'an Natural Field
Kurşun asetat	Sigma
Laboratuvar Tüpleri	BD Vacutainer
Metafosforik asit	Sigma
Metanol	Merck
Mikropipet Seti	Gilson
Mirisetin	Xi'an Natural Field
N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	Sigma
Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT)	Sigma
Non-Steril Eldiven	Beybi
Numune Kapları	Ayset
GSSG	Sigma
Paraokson	Fluka
PGE ₂ ELISA Kiti	Lifespan Biosciences
Piridin	Riedel de Haen
P-nitrofenol	Fluka
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck
Potasyum Sodyum Tartarat	Merck
Redükte L-Glutasyon	Sigma
Redükte β -NADPH	Sigma
Sodyum Azid	Sigma
Sodyum Borhidrür (NaHB ₄)	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma
Sodyum Hidroksit	Merck

Sodyum Karbonat	Merck
Sodyum Klorür	Merck
Sülfanilamit	Sigma
Tetrametoksipropan	Aldrich
Tiobarbitürik Asit (TBA)	Merck
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck
Tris Baz	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Vanadium klorür	Merck

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	Regal
Çeker Ocak	Biolab
Derin Dondurucu (-20 °C)	Vestel
Derin dondurucu (-80 °C)	Elcold
Distile Su Cihazı	Millipore
ELISA mikropate okuyucu	VersaMax
Etüv	Binder
Hassas Terazı	Mettler Toledo
Homojenizatör	IKA
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Wisd
Mini santrifüj	Eppendorf
Otoanalizatör	Cobas Integra 800
pH Metre	Mettler Toledo
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Sigma,2-16K
Spektrofotometre	Analytikjena
Su Banyosu	GFL-Wasserbad
Ultrasonik Su Banyosu	Wisd
Vorteks	REAX

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvanlara Uygulanan Maddelerin Hazırlanması

Yapılan literatür taramasında oral yolla uygulanan kurşun asetatın 100 mg/kg/gün dozunun çalışmamızda kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu dozdaki kurşun asetat uygulamalarının sıçanlarda kayda değer miktarda ölümlere yol açmadığı

öte yandan istenilen ölçüde organ ve doku hasarı oluşturabildiği görülmüştür (Mokhtari ve Zanoori, 2011). Çalışmada kullanılacak olan kurşun asetat (LA), mirisetin (MYC) (Lai ve ark., 2020), kaemferol (KMP) (Al-Numair ve ark., 2015), fisetin (FST) (Kandhare ve ark., 2011) ve galangin (GLG) (Tomar ve ark., 2017) distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Kurşun asetat ve tüm fitokimyasallar 28 gün boyunca ve oral yolla uygulanmış olup ikinci uygulama birinciden en az 2 saat sonra yapılmıştır.

3.2.2. Hayvan Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar rastgele seçilerek 10 gruba ayrıldı. Grupların kendi içinde homojen olmasına ve gruplardaki sıçanların ağırlık toplamalarının yaklaşık aynı değerde olmasına dikkat edilerek gruplar oluşturuldu. Toplam 10 deney grubu şu şekilde oluşturulmuştur; **Kontrol grubu (n=7):** Herhangi bir ilaç uygulanmadan sadece 2 mL distile su gavaj yoluyla 28 gün boyunca uygulanmıştır.

LA grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL distile su gavaj yoluyla uygulanmıştır.

LA+MYC100 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL MYC (100 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+MYC200 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL MYC (200 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+KMP100 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL KMP (100 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+KMP200 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL KMP (200 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+FST100 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL FST (100 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+FST200 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL FST (200 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+GLG100 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL GLG (100 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

LA+GLG200 grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 1 mL kurşun asetat (100 mg/kg/gün) ve 1 mL GLG (200 mg/kg) oral yolla uygulanmıştır.

3.2.3. Hayvanların Anesteziye Alınması, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 29. günü, 10 mg/kg/i.p. ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 50 mg/kg/i.p. ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) anestezisi altında sıçanların kardiyak puncture ile kanları alınarak, böbrek dokuları çıkartıldı. Alınan kanlar vakit geçirilmeden santrifüj edilerek serum elde edildi. Çalışma günü serumlar doğrudan veya dilüe edilerek kullanıldı. Böbrek dokuları ise önce % 0.9'luk sodium klorür (NaCl) ile yıkanarak üzerindeki kanların gitmesi sağlandı, daha sonra kurutma kâğıdı ile ıslaklığı giderilerek çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.2.4. Böbrek Dokularının Homojenizasyonu

Derin dondurucuda (-20°C) bekletilen sıçanların böbrek dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak buz üzerinde çözülmeleri sağlandı. Ekstraksiyon için 1 mmol/L EDTA ve 50 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) (pH 7.4) içeren tampon kullanıldı (Dogan ve ark., 2018). 500 mg doku üzerine 5 mL soğuk tampon eklendi ve dokular cam bagetle iyice ezildi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16000 devir/dakika hızda 3 dakika süre ile mekanik homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Elde edilen homojenizat vakit geçirilmeden +4°C'de 30 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Böbrek dokusundan elde edilen süpernatantta oksidatif stres ve enflamatuvar parametrelerine bakıldı.

3.2.5. Serum Analizleri

Serum örneklerinin üre, kreatinin ve kan üre azotu düzeyleri Cobas Integra 800 otoanalizöründe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ticari kit kullanılarak enzimatik metotla ölçüldü.

3.2.6. Böbrek Dokusu Analizleri

Böbrek dokularında lipid peroksidasyon belirteci olarak MDA düzeyine, protein oksidasyon belirteci olarak protein karbonil grubu, toplam ve serbest tiyol düzeylerine, DNA oksidasyon belirteci olarak 8-OH dG düzeyine, antioksidan durumun belirlenebilmesi için SOD, katalaz, GSH-Px, GSH-Rx, PON, ARE aktiviteleri ile GSH düzeyine, enflamatuvar yanıtın gözlenmesi için ise NOx ve Prostaglandin E₂ (PGE₂) düzeylerine bakıldı.

3.2.7. Malondialdehit Düzeyi Tayini

Deneyin Prensibi

Lipit peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Ohkawa ve ark., 1979).

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Stok tetrametoksipropen çözeltisi:** 0.92 gr tetrametoksipropen 1 mL'de çözülür.
- 2) **Günlük tetrametoksipropen çözeltisi:** 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.
- 3) **SDS çözeltisi:** 8.1 gr sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve çözülür.
- 4) **Asetik Asit çözeltisi:** 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH'sı 3.5' e ayarlanır.
- 5) **TBA çözeltisi:** 0.8 gr TBA tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve ısıtılarak çözülür.
- 6) **N-butanol-piridin çözeltisi (15:1):** Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-butanol ile karıştırılır.

Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve örnek tüplerine aşağıdaki tabloya göre pipetleme yapılır (Tablo 2).

Tablo 2. MDA düzeyinin tayininde yapılan pipetleme

	Kör	Standart	Örnek
Standart (µL)	-	50	-
Homojenizat (µL)	-	-	50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
Distile su (µL)	400	350	350

Tüpler 95 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilir. Musluk suyunda soğutulur. 500 µL distile su eklenir. 2.5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak

karişımlar beyazlaşıncaya kadar vortekslenir. 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçölür (Ohkawa ve ark., 1979).

3.2.8. Protein Karbonil Düzeyi Tayini

Deneyin Prensibi

Levine ve ark. (1990) tarafından geliştirilen bir metot olup proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşan karbonil grupları ile 2,4-dinitrofenilhidrazinin reaksiyona girmesi ile oluşan hydrozone bileşiklerinin renginin spektrofotometrik olarak ölçölüne dayanan bir yöntemdir.

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **DNPH çözeltisi:** 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin 2 M’lık HCl içinde çözölerek hazırlanır.
- 2) **% 10 TCA çözeltisi:** 10 gr. TCA distile su ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlanır.
- 3) **Guanidin HCl çözeltisi:** 6 M guanidin HCl, 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH:2.3) içinde çözölerek hazırlanır.
- 4) **Etanol:** Etil asetat çözeltisi: 1:1 oranında etanol ve etil asetat kariştırılarak hazırlanır.

Yöntemin uygulanışı

15 µL serum, 0.5 mL DNPH çözeltisi ile kariştırılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 0.5 mL TCA çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve 15000 rpm’de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet 2 kez 1:1 oranında kariştırılmış etanol: etil asetat ile yıkanmıştır. Kalan pelet üzerine 0.6 mL Guanidin HCl çözeltisi ilave edilip 15 dk. 37°C’de inkübasyona bırakılarak peletin çözölmesi sağlanmış ve spektrofotometrede 365 nm’de absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri, absorbsiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{max}}=22000/\text{M}/\text{cm}$) ile çarpılarak sonuçları nmol/mg protein şeklinde hesaplanmıştır (Levine ve ark., 1990).

3.2.9. Toplam ve Serbest Tiyol Düzeylerinin Tayini

Deneyin Prensibi

İndirgenebilir disülfid bağları, ilk önce serbest fonksiyonel tiyol grupları oluşturmak üzere indirgendi. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrür tüketilip

formaldehitte uzaklaştırıldı. İndirgenmiş ve serbest olanları içeren tüm tiyol grupları, DTNB kullanılarak reaksiyon sonrasında tespit edildi (Forster ve ark., 2000).

Toplam Tiyol

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **R1:** NaBH₄ + 10 mM metanol- su solüsyonu, 50 v/v
- 2) **R2:** 6.715 mM formaldehit + 10 mM EDTA-Tris Buffer, 100 mM (pH: 8.2)
- 3) **R3:** 10 mM metanol içerisinde DTNB

Yöntem

R1'den 10 µL konuldu. Üzerine 10 µL doku homojenizatu ilavesinden sonra 110 µL R2 ve 10 µL R3'ten ilave edildi. Absorbanslar 412 nm dalga boyunda okundu. İlk absorbans R2 ve R3 karıştırılmadan önce alındı. Son absorbans ise reaksiyon izi plato çizdiğinde okundu ve zamana göre absorbans değişimi (ΔOD) değerleri hesaplandı. GSH standardı kullanılarak elde edilen standart eğri grafiğinden yararlanılarak toplam tiyol miktarı hesaplandı.

Serbest Tiyol

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **R1:** NaCl + 10 mM metanol- su solüsyonu, 50 v/v
- 2) **R2:** 6.715 mM formaldehit + 10 mM EDTA-Tris Buffer, 100 mM (pH: 8.2)
- 3) **R3:** 10 mM metanol içerisinde DTNB

Yöntem

R1'den 10 µL konuldu. Üzerine 10 µL doku homojenizatu ilavesinden sonra 110 µL R2 ve 10 µL R3'ten ilave edildi. Absorbanslar 412 nm dalga boyunda okundu. İlk absorbans R2 ve R3 karıştırılmadan önce alındı. Son absorbans ise reaksiyon izi plato çizdiğinde okundu ve ΔOD değerleri hesaplandı. GSH standardı kullanılarak elde edilen standart eğri grafiğinden yararlanılarak toplam tiyol miktarı hesaplandı.

3.2.10. 8-Hidroksi Deoksi Guanozin Düzeyi Tayini

Reaktiflerin hazırlanması

- 1) **8-OH dG standardı:** 50000 pg/mL 8-OH dG standart solüsyonu oda ısısına getirildi. 1'den 7'ye kadar numaralandırılmış yedi cam tüp hazırlandı. 1. tübe 1

mL, 2-7. tüplere de 500 µL standart dilüent konuldu (deney tamponu veya doku kültürü medyum). 1. tüpten 50 µL dilüent alındı ve yerine 50 µL 50000 pg/mL'lik 8-OH dG standart solüsyonundan eklendi. Tüp vortekslendi ve 1. tüpten 500 µL alınarak 2. tübe eklendi ve vortekslendi. 2. tüpten 500 µL alınarak 3. tübe eklendi ve vortekslendi ve bu işlem 7. tübe gelene kadar tekrarlandı.

- 2) **8-OH dG konjugatı:** Konjugat -20°C'den oda ısısına getirildi.
- 3) **Yıkama solüsyonu:** Deneye başlamadan önce 5 mL konsantre yıkama solüsyonu, 95 mL distile su ile sulandırıldı ve oda ısısında muhafaza edildi.

Deneyin Yapılışı

- 1) Deney düzeni tablosu hazırlandı ve deney kâğıdına işaretlendi.
- 2) Spesifik olmayan bağlanma (NSB) ve maksimum bağlanma (Bo) kuyucuklarına 100 µL standart dilüent koyuldu
- 3) Standart 1-7 işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
- 4) Her bir serum örneğinden 100 µL işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
- 5) NSB kuyucuğuna 50 µL deney tamponu koyuldu.
- 6) Toplam aktivite (TA) ve kör kuyucukları hariç diğer bütün kuyucuklara 50 µL konjugat koyuldu.
- 7) TA, NSB ve boş kuyucuklar hariç diğer bütün kuyucuklara antikor eklendi.
- 8) Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 2 saat çalkalayıcıda ~500 rpm'de inkübe edildi.
- 9) Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 10) Son yıkamadan sonra kuyucukların içindeki bütün yıkama solüsyonu aspire edildi ve hiç solüsyon kalmadığından emin olmak için temiz bir kurutma kâğıdının üzerine ters çevrildi.
- 11) TA kuyucuğuna 5 µL konjugat koyuldu.
- 12) Her kuyucuğa pNpp substratı koyulduktan sonra oda ısısında 45 dakika bekletildi.
- 13) Her kuyucuğa 50 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklar boşaltıldı.
- 14) Kuyucukların absorbanları 405 nm'de okutuldu.

3.2.11. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi

Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik

süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin NBT ile 560 nm’de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır (Sun ve ark., 1988).

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0.1 N):** 0.4 g NaOH bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- 2) **Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM):** 4.6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0.1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL’ye tamamlandı. Çözelti +4 °C’de bir hafta dayanıklıdır.
- 3) **Ksantin Çözeltisi (0.3 mM):** Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak bidistile su ile 10 mL’ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.
- 4) **Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0.6 mM):** 22.32 mg Na₂EDTA.2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- 5) **Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM):** 4.24 g Na₂CO₃ bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- 6) **BSA Çözeltisi (1 g/L):** 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL’ye tamamlandı.
- 7) **NBT Çözeltisi (0.15 mM):** 1.226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 mL ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.
- 8) **SOD Çalışma Reaktifi:** 10 mL 0.3 mM ksantin, 5 mL 0.6 mM Na₂EDTA, 3 mL 400 mM Na₂CO₃, 1.5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0.15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlandı.
- 9) **Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M):** 26.428 g (NH₄)₂SO₄ bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- 10) **Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L):** 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş (NH₄)₂SO₄ çözeltisinde çözülerek 1 mL’ye tamamlandı.
- 11) **Bakır Klorür Çözeltisi (0.8 mM):** 13.64 mg CuCl₂.2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

2.85 mL SOD reaktifi örnek tüpüne ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µL süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µL ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 °C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra tüplere 100 µL CuCl₂ çözeltisi eklendi. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µL süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör tüpünün ve örnek tüpünün 560 nm’de absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edildi. Spesifik

aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi (Sun ve ark., 1988).

3.2.12. Katalaz Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi

Katalaz aktivitesi tayini Aebi (1984) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Yöntemin esası, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240 nm de izlenmesidir.

Kullanılan   zeltiller

- 1) **Potasyum Dihidrojen Fosfat   zeltisi (A)** : 0.681 g KH₂PO₄ bidistile suda   z lerek 100 mL'ye tamamlandı.
- 2) **Disodyum Hidrojen Fosfat   zeltisi (B)**: 2.77 g Na₂HPO₄.12H₂O bidistile suda   z lerek 155 mL'ye tamamlandı.
- 3) **Fosfat Tamponu (50 mM pH 7,0)**: A/B oranı 1/1.55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7.0'ye ayarlandı.
- 4) **Hidrojen Peroksit   zeltisi (30 mM)**: 34  L %30 luk H₂O₂ 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kuvarz spektrofotometre küvetlerine 10  L 10000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990  L fosfat tamponu ilave edildi.  rnek küvetine 1 mL 30 mM H₂O₂ ilave edildi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma k re karşı 1 dakika boyunca 240 nm'de izlendi. Spesifik aktivitesi ünite/mg protein cinsinden hesaplandı (Aebi, 1984).

3.2.13. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi

GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonda GSH'nın H₂O₂ ile oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'nin GSH-Rx kataliziyle tekrar GSH'a dönüşmesi sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden 340 nm'de oluşan absorbans azalmasının 4 dakika boyunca izlenmesi prensibine dayanır (Paglia ve Valentine, 1967).

Kullanılan   zeltiller

- 1) **Fosfat tamponu**: 0.05 M (pH 6.8) (5mM EDTA içerir)

- 2) **Redükte L-Glutatyon çözeltisi:** 0.15 M
- 3) **NADPH çözeltisi:** 7.2 mM
- 4) **Glutatyon Redüktaz çözeltisi:** 100 U/mg protein/mL
- 5) **Sodyum Azid çözeltisi:** 2 M
- 6) **Hidrojen Peroksit çözeltisi:** 30 mM

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan çözeltiler Tablo 3’de göre pipetlendi.

Tablo 3. GSH-Px aktivitesinin tayininde yapılan pipetleme

Çözeltiler	Miktar (mL)
Fosfat tamponu	2.65 mL
GSH çözeltisi	0.1 mL
NADPH çözeltisi	0.1 mL
Glutatyon redüktaz çözeltisi	0.01 mL
Sodyum azid çözeltisi	0.01 mL
Doku homojenizatu	0.1 mL
Hidrojen peroksit çözeltisi	0.1 mL

Hazırlanan çözelti 25 °C’de 2 dakika inkübe edildikten sonra 340 nm’deki absorbansı ölçüldü ve bu değere karşı spektrofotometre sıfırlandı. Bu çözelti üzerine 0.1 mL H₂O₂ çözeltisi eklenerek 2 dakika boyunca enzim aktivitesindeki düşüş gözlemlendi.

Her numune ve kontrol tüpü için, 2. ve 4. dakikalarda zamana göre ΔOD değerleri kullanılarak, $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı. Daha sonra numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net $\Delta OD/dk$ değerleri elde edildi. Doku GSH-Px aktivitesi, miligram protein başına (U/mg protein) spesifik aktivite cinsinden verildi (Paglia ve Valentine, 1967).

3.2.14. Glutatyon Redüktaz Aktivitesi Tayini

Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi için Goldberg ve ark.’nın (1979) geliştirildiği tayin yöntemi kullanıldı.

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Stok Fosfat Tampon:** pH’sı 8.0 olan, 100 mM Na₂HPO₄ tamponu hazırlandı. 7.1 g

Na₂HPO₄, 400 mL bidistile su içerisinde eritildi, üzerine birkaç damla 1N NaOH ilave edildi, pH 8.0'e ayarlandı tekrar kalan 100 mL bidistile su ile toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

- 2) **Günlük Tampon:** 0.12 mM NADPH ve 1 mM GSSG'nin tampon içerisinde çözülmesi ile hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

- 1) Kör tüpüne 100 µL saf su ve 900 µL günlük tampon konuldu.
- 2) Örnek tüpüne ise, 900 µL günlük tampon ve 100 µL serum eklendi ve tüpler vortekslendi.
- 3) Tüpler, 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 4) 340 nm'de köre karşı 0. ve 5. dakikalarda absorbanslar okundu.

Hesaplama:

$$\text{Aktivite (U/mL)} = (\Delta\text{OD} / 6.22) \times (V_t / V_ö)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam hacim

$V_ö$ = Örnek hacmi

6,22= 1 nmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

3.2.15. Paraoksonaz Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi

PON enziminin paraoksonaz aktivitesi ölçümünde paraokson substrat olarak kullanılmıştır. PON enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir. Reaksiyon sonucunda oluşan *p*-nitrofenol 405 nm de görünür bölgede absorbans vermektedir. Bu ürünün absorpsiyonu ölçülerek enzimin aktivitesine bakılmıştır (Eckerson, 1983).

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Tris-HCl tamponu** (pH:8.0, 20 mM)
- 2) **CaCl₂ çözeltisi** (1 mM)
- 3) **Paraokson çözeltisi** (1 mM)
- 4) **p-nitrofenol çözeltisi** (0.1 mM)

Deneyin Yapılışı

0.1 mM *p*-nitrofenolden 0,5-50 µM final konsantrasyonu verecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerin optik dansiteleri okunarak grafik elde edilmiş ve grafiğin eğimi paraoksonaz aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Toplam 1 mL reaksiyon karışımında 20 mM tris-HCl (pH:8.0), 1 mM CaCl₂ ve 1 mM paraokson varlığında 10 µL suparnatan örneğinin aktivitesi ölçülmüştür. İlk ölçüm 10. dk' da, ikinci ölçüm 25. dk' da yapılmıştır. İlk ölçüm hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Sonuçlar bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak hesaplanmıştır (Eckerson, 1983).

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{Enzim Aktivitesi (mIU/mL)} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0103 \times 100 / 15$$

OD₂ : 25. dakika sonundaki optik dansite
OD₁ : 10. dakika sonundaki optik dansite
0.0103 : Standart eğrisinin eğimi
100 : Seyreltme faktörü
15 : Zaman aralığı (dk)

3.2.16. Aril Esteraz Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi

Aril esteraz aktivitesinin ölçümü için fenil asetat substrat olarak kullanılmıştır. Deneyin prensibi aril esterazın fenil asetatı fenol ve asetik aside parçalamasıyla oluşan fenolün 270 nm de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır (Eckerson, 1983).

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Tris-HCl tamponu** (pH:8.0, 20 mM)
- 2) **CaCl₂ çözeltisi** (1 mM)
- 3) **Fenil asetat çözeltisi** (1 mM)
- 4) **Fenol çözeltisi** (0.1 mM)

Deneyin Yapılışı

Aril esteraz aktivitesi için kalibrasyon eğrisi 1 mM fenol stoğundan 3-900 µM son konsantrasyon olacak şekilde 10 değişik konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltiler kullanılmıştır. Elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona göre grafiği çizilerek grafiğin eğimi bulunmuş ve enzim aktivitesini hesaplamak için kullanılmıştır. Reaksiyon toplam 3 mL hacimde 20 mM Tris-HCl (pH:8.0), 1 mM CaCl₂ ve 1 mM fenil asetat varlığında gerçekleşmiştir. 10 µL suparnatan reaksiyon tüpüne eklendikten 15 saniye

sonra 1. optik dansite ölçümü, 75. saniyede ikinci okuma yapılmıştır. Birinci optik dansite hesaplamalarda kör olarak kullanılmıştır. Okumalar quartz küvetlerde yapılmıştır (Eckerson, 1983).

Aril Esteraz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{Enzim Aktivitesi (IU/mL)} = (\text{OD}_2 - \text{OD}_1) / 0.0016 \times 300 / 1000$$

OD₂ : 75. saniye sonundaki optik dansite

OD₁ : 15. saniye sonundaki optik dansite

0,0016 : Standart eğrisinin eğimi

300 : Seyreltme faktörü

1000 : 1 mL deki ürün miktarı (μmol)

3.2.17. Redükte Glutasyon Düzeyi Tayini

Deneyin Prensibi

GSH analizi, Beutler ve ark.'nın (1963) bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemde homojenizatta -SH gruplarının 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asit (DTNB) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülmektedir.

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Prespitasyon çözeltisi** (3 hafta dayanıklı): 1.67 g Metafosforik asit + 0.2 g EDTA + 30 g NaCl 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.
- 2) **Fosfat tamponu** (1 yıl dayanıklı): 26.7 g Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) 500 mL'ye distile suyla tamamlanır.
- 3) **DTNB çözeltisi (Ellman's reaktifi)** (13 hafta dayanıklı): 40 mg DTNB %1 sodyum sitrat çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanır.
- 4) **GSH standardı** (taze hazırlanır): 40 mg GSH 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

- 1) **Kör**: 2 mL distile su + 3 mL prespitasyon çözeltisi
- 2) **Standart**: 0.2 mL GSH Standardı + 1.8 mL distile su + 3 mL prespitasyon çözeltisi iyice karıştırılır, 5 dk beklenir. Daha sonra adi süzgeç kağıdından süzülür ve 1 mL süpernatant alınarak başka bir tüpe konur. Bu tüpe 4 mL fosfat çözeltisi ve 0.5 mL

DTNB ayıracı katılır ve iyice karıştırıldıktan sonra distile suya karşı 412 nm dalga boyunda 10 dk içinde okunur.

- 3) Numune 0.2 mL EDTA'lı tam kan alınır. 1.8 mL distile su katılır ve karıştırılır 3 mL çöktürücü katılır, karıştırılır ve 5 dk beklenir. Bundan sonraki işlemler standarttaki gibidir (Beutler ve ark., 1963).

GSH Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{GSH düzeyi (\% mg)} = \frac{\text{Num. Absorbansı} \times 40 \text{ mg}}{\text{mg/dl kan} \times \text{St. Absorbansı}}$$

3.2.18. Nitrik Oksit Düzeyi Tayini

Nitrik oksit (azot monoksit), yarı ömrü çok kısa olan bir madde olup oksidasyon ile stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrite dönüşür. Bu mekanizma, NO_x seviyesinin dolaylı olarak ölçülmesine imkân sağlar ve genellikle bu metabolitlerin tespiti ile NO_x düzeyi değerlendirilir. Bu bağlamda NO_x miktarı Miranda ve ark.'nın (2001) "Vanadium-3-klorür-Gries Reaksiyonu" yöntemi ile belirlenmiştir.

Deneyin Prensipleri

Ölçüm, Vanadium klorür'ün, 37°C'lik ortamda nitratı nitrite dönüştürmesi ve Gries Reaksiyonu olarak tanımlanan, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **Vanadium klorür (VCl₃) çözeltisi:** 50 mL % 2'lik Hidroklorik asitte, 400 mg Vanadium klorür çözündürülmesiyle hazırlanır.
- 2) **Sülfanilamit çözeltisi:** 2 g Sülfanilamitin, % 2'lik Hidroklorik asit ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanır.
- 3) **NEDD çözeltisi:** Distile su ile hazırlanmış % 0.1'lik NEDD çözeltisidir.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenizatından alınan 100 µL örnek üzerine, 100 µL Vanadium klorür

çözeltilisinden eklenmiş, bunun üzerine seri halde 50 µL sülfanilamit ve 50 µL NEDD çözeltileri ilave edilmiştir. Örnekler, 37°C’de 30 dk inkübe edildikten sonra 550 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar, daha önce değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorbans değerlerine göre hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir (Miranda ve ark., 2001).

3.2.19. Prostaglandin E₂ Düzeyi Tayini

Kullanılan Çözeltiler

- 1) **PGE₂ standardı:** 50000 pg/mL PGE₂ standart solüsyonu oda ısısına getirildi. 1’den 7’ye kadar numaralandırılmış yedi cam tüp hazırlandı. 1. tübe 1 mL, 2-7. tüplere de 500 µL standart dilüent konuldu (deney tamponu veya doku kültürü medyumumu). 1. tüpten 50 µL dilüent alındı ve yerine 50 µL 50000 pg/mL’lik PGE₂ standart solüsyonundan eklendi. Tüp vortekslendi ve 1. tüpten 500 µL alınarak 2. tübe eklendi ve vortekslendi. 2. tüpten 500 µL alınarak 3. tübe eklendi ve vortekslendi ve bu işlem 7. tübe gelene kadar tekrarlandı.
- 2) **PGE₂ konjugatı:** Konjugat -20°C’den oda ısısına getirildi.
- 3) **Yıkama solüsyonu:** Deneye başlamadan önce 5 mL konsantre yıkama solüsyonu, 95 mL distile su ile sulandırıldı ve oda ısısında muhafaza edildi.

Deneyin Yapılışı

- 1) Deney düzeni tablosu hazırlandı ve deney kâğıdına işaretlendi.
- 2) NSB ve Bo kuyucuklarına 100 µL standart dilüent koyuldu
- 3) Standart 1-7 işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
- 4) Her bir serum örneğinden 100 µL işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
- 5) NSB kuyucuğuna 50 µL deney tamponu koyuldu.
- 6) TA ve kör kuyucukları hariç diğer bütün kuyucuklara 50 µL konjugat koyuldu.
- 7) TA, NSB ve boş kuyucuklar hariç diğer bütün kuyucuklara antikor eklendi.
- 8) Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 2 saat çalkalayıcıda ~500 rpm’de inkübe edildi.
- 9) Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 10) Son yıkamadan sonra kuyucukların içindeki bütün yıkama solüsyonu aspire edildi ve hiç solüsyon kalmadığından emin olmak için temiz bir kurutma kâğıdının üzerine ters çevrildi.
- 11) TA kuyucuğuna 5 µL konjugat koyuldu.
- 12) Her kuyucuğa pNpp substratı koyulduktan sonra oda ısısında 45 dakika bekletildi.

- 13) Her kuyucuğa 50 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklar boşaltıldı.
14) Kuyucukların absorbansları 405 nm’de okutuldu.

3.2.20. Doku Protein Düzeyi Tayini

Deneyin Prensibi

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır (Lowry ve ark., 1951). Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler

A Reaktifi: 0,1 N NaOH çözeltisi kullanılarak %2’lik Na₂CO₃ çözeltisi hazırlanır.

B₁ Reaktifi: %1’lik CuSO₄.5H₂O çözeltisi hazırlanır.

B₂ Reaktifi: %2’lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlanır.

B Reaktifi: B₁ ve B₂ eşit hacimde karıştırılır.

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1mL A reaktifi eklendi. Reaktif taze hazırlanmalı ve bekletilmeden kullanılmalıdır.

D Reaktifi: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile karıştırılır.

Protein standardı: 250 mg/100 mL. bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/mL. protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Kör, numune ve standart tüplerine aşağıdaki tabloya göre pipetleme yapılır (Tablo 4).

Tablo 4. Doku protein düzeyinin tayininde yapılan pipetleme

	Kör tüpü	Numune tüpü	Standart
Homojenizat (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dakika beklendi.			
D reaktifi(µL)	300	300	300

Tüpler vorteksenerek 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometrede 750 nm’de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okundu.

Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı mg olarak bulundu (Lowry ve ark., 1951).

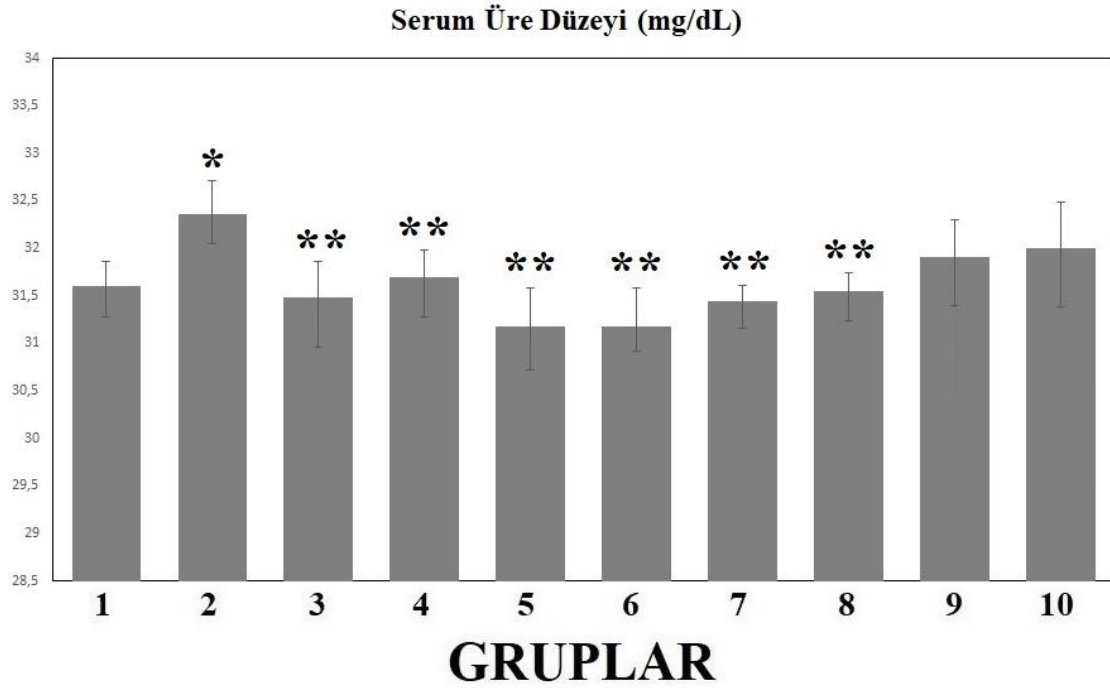
3.3. İstatistik Analiz

Çalışma sonunda elde edilen gruplara ait tüm veriler SPSS (versiyon 16.0) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde sunuldu. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Serum Üre Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların serum üre düzeyleri Şekil 7’de gösterilmiştir. Grup 2’nin serum üre düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8’in serum üre düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



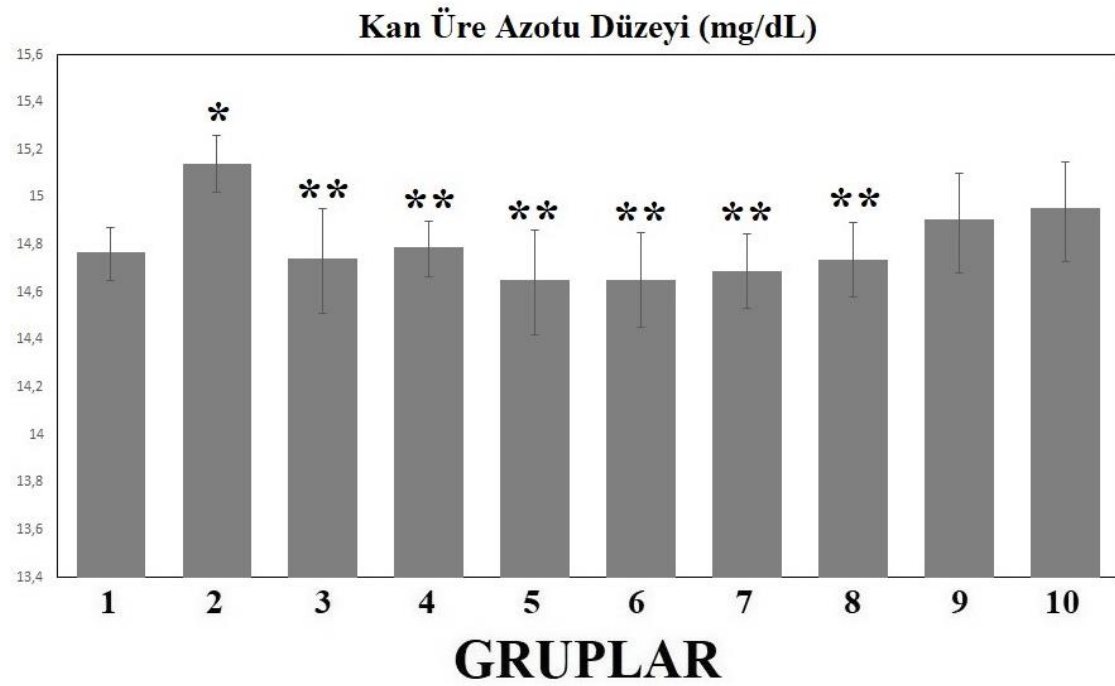
Şekil 7. Serum üre düzeyleri (mg/dL) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.2. Kan Üre Azotu Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların kan üre azotu düzeyleri Şekil 8’de gösterilmiştir. Grup 2’nin kan üre azotu düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8’in kan üre azotu düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



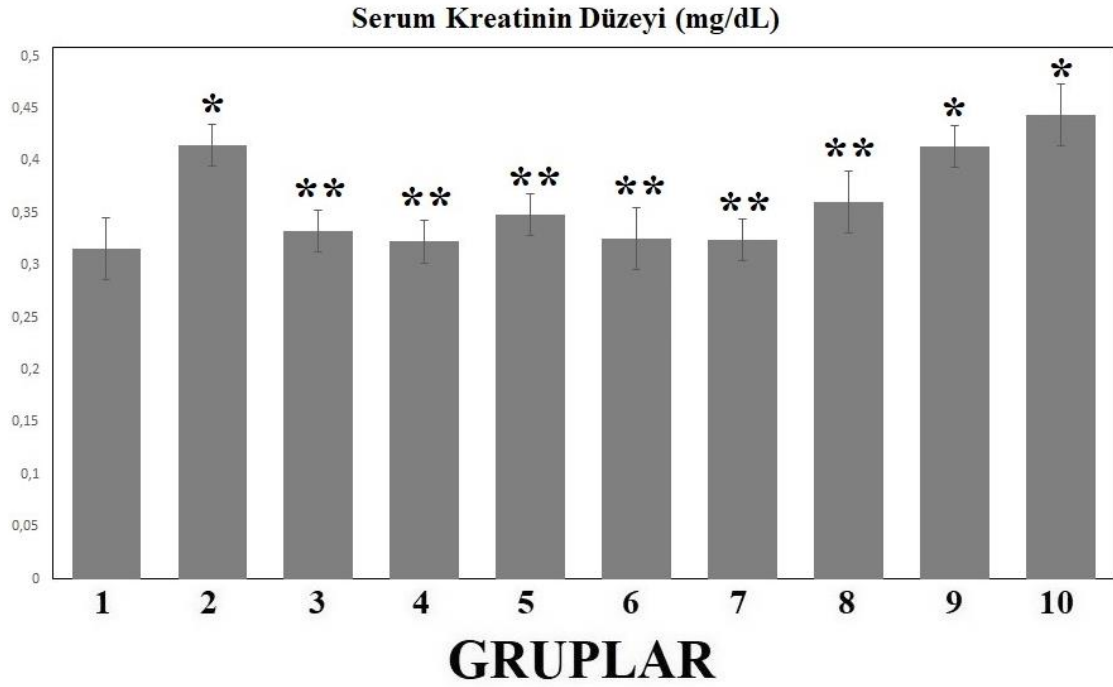
Şekil 8. Kan üre azotu düzeyleri (mg/dL) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.3. Serum Kreatinin Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların serum kreatinin düzeyleri Şekil 9’da gösterilmiştir. Grup 2’nin serum kreatinin düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8’in serum üre düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



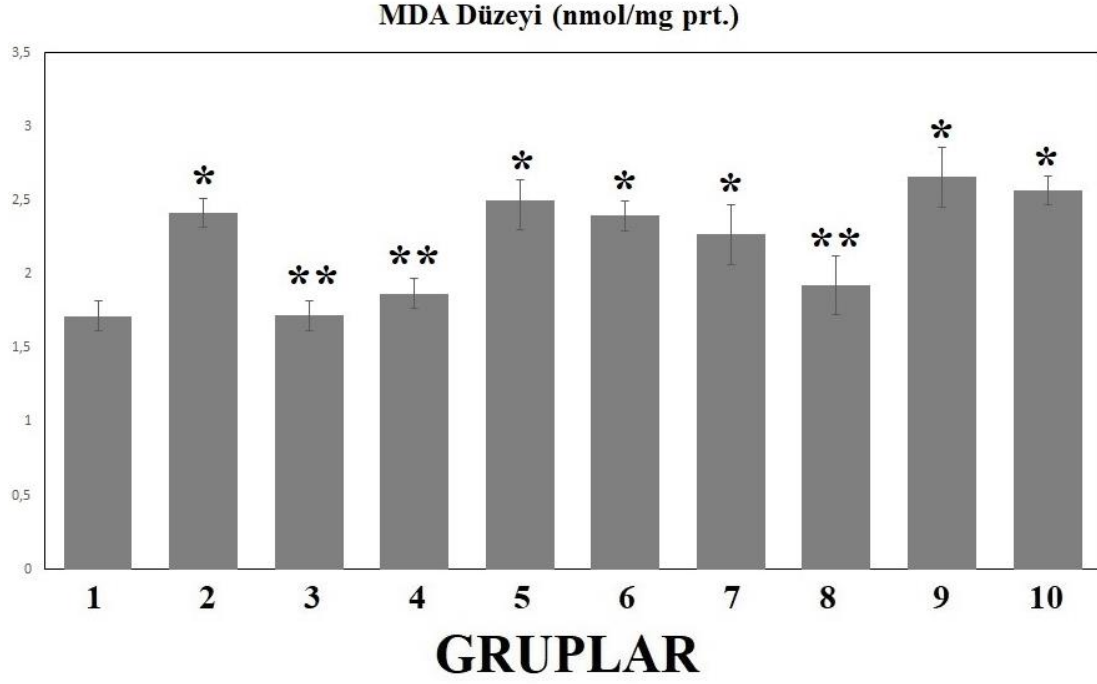
Şekil 9. Serum kreatinin düzeyleri (mg/dL) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.4. Böbrek Dokusu MDA Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu MDA düzeyleri Şekil 10’da gösterilmiştir. Grup 2’nin MDA düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4 ve Grup 8’in MDA düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



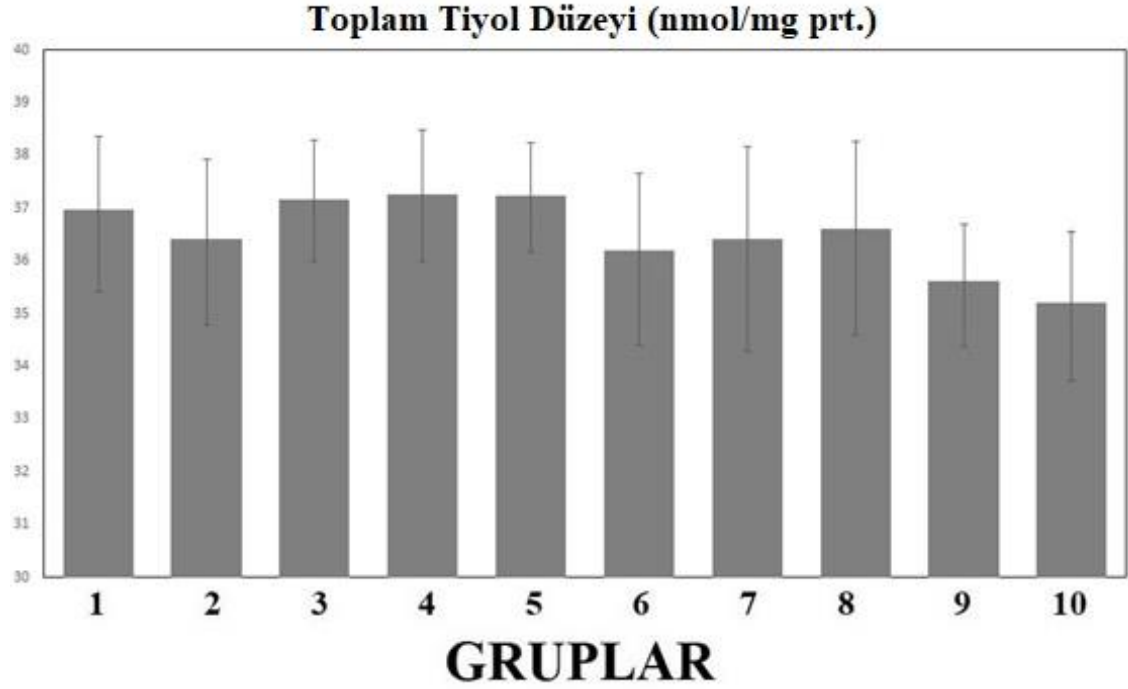
Şekil 10. Böbrek dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**MDA:** Malondialdehit; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.6. Böbrek Dokusu Toplam TiyoL Düzeyi Sonuçları

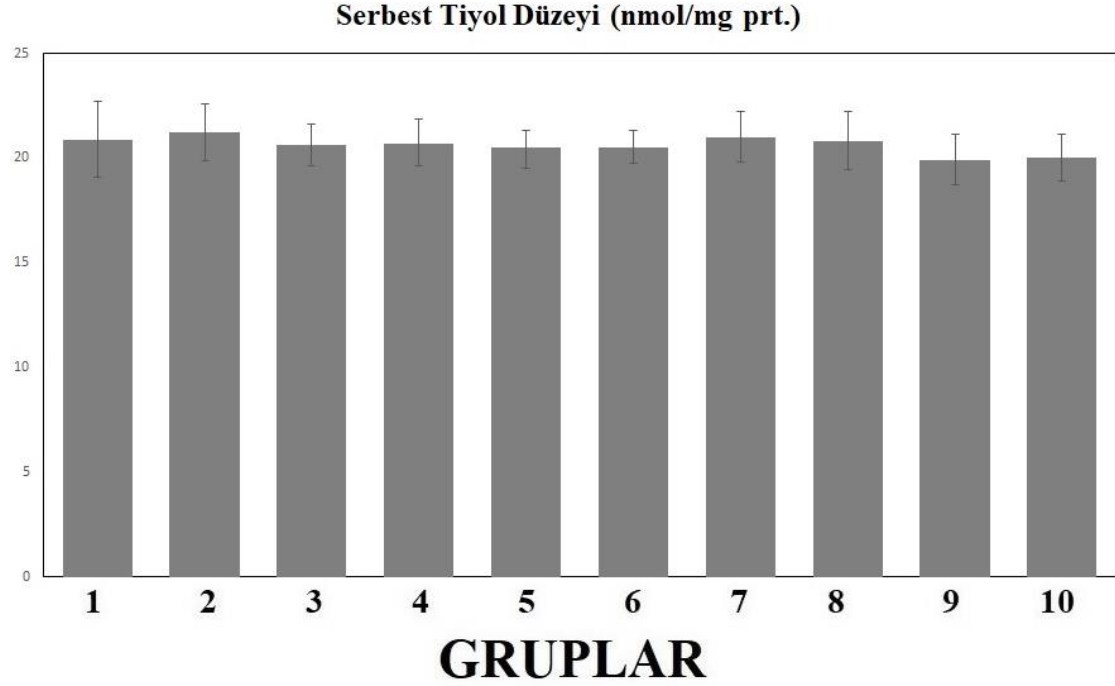
Tüm grupların böbrek dokusu toplam tiyoL düzeyleri Şekil 12’de gösterilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 12. Böbrek dokusu toplam tiyoL düzeyleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (LA: Kurşun asetat; MYC: Mirisetin; KMP: Kaemferol; FST: Fisetin; GLG: Galangin)

4.7. Böbrek Dokusu Serbest TiyoL Düzeyi Sonuçları

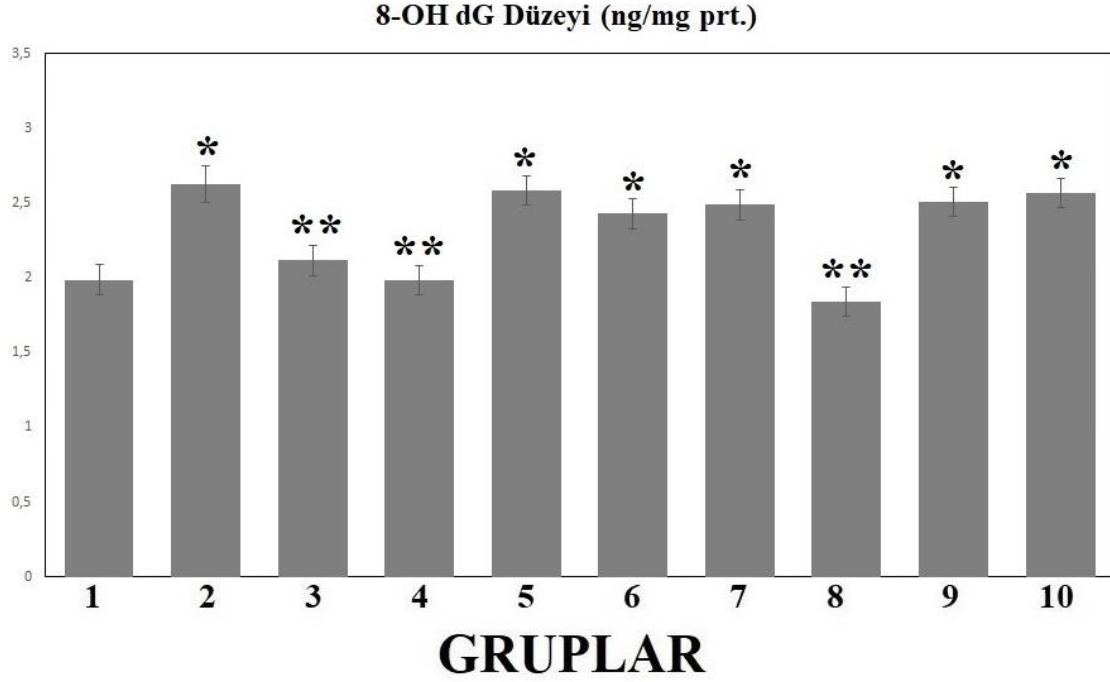
Tüm grupların böbrek dokusu serbest tiyoL düzeyleri Şekil 13’de gösterilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 13. Böbrek dokusu serbest tiyoL düzeyleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (LA: Kurşun asetat; MYC: Mirisetin; KMP: Kaemferol; FST: Fisetin; GLG: Galangin)

4.8. Böbrek Dokusu 8-OH dG Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu 8-OH dG düzeyleri Şekil 14’de gösterilmiştir. Grup 2’nin 8-OH dG düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4 ve Grup 8’in 8-OH dG düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



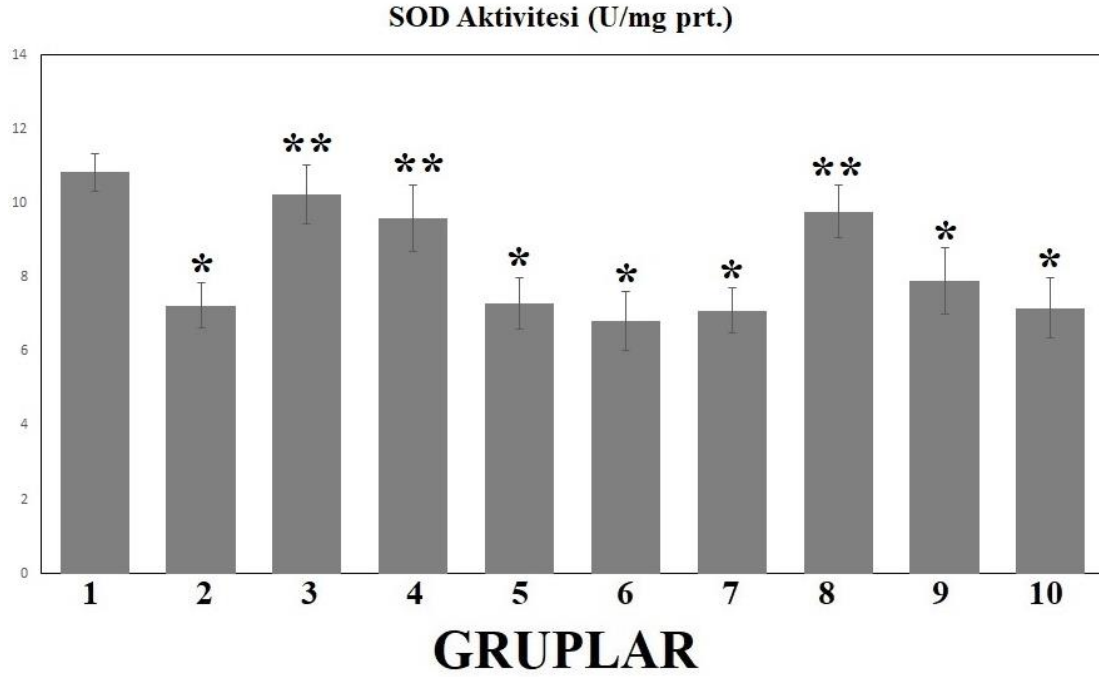
Şekil 14. Böbrek dokusu 8-OH dG düzeyleri (ng/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**8-OH dG**: 8-hidroksi deoksiguanozin; **LA**: Kurşun asetat; **MYC**: Mirisetin; **KMP**: Kaemferol; **FST**: Fisetin; **GLG**: Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.9. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu SOD aktiviteleri Şekil 15’de gösterilmiştir. Grup 2’nin SOD aktivitesi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4 ve Grup 8’in SOD aktiviteleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



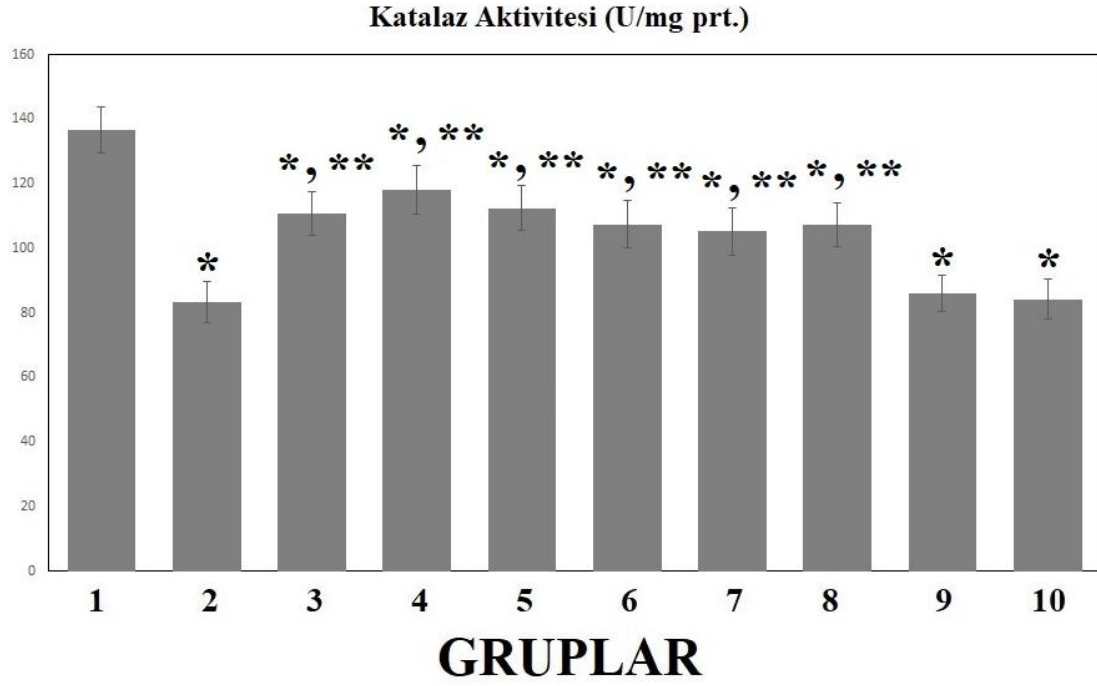
Şekil 15. Böbrek dokusu SOD aktiviteleri (U/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**SOD:** Süperoksit dismutaz; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

4.10. Böbrek Dokusu Katalaz Aktivitesi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu katalaz aktiviteleri Şekil 16’da gösterilmiştir. Grup 2’nin katalaz aktivitesi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8’in katalaz aktiviteleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



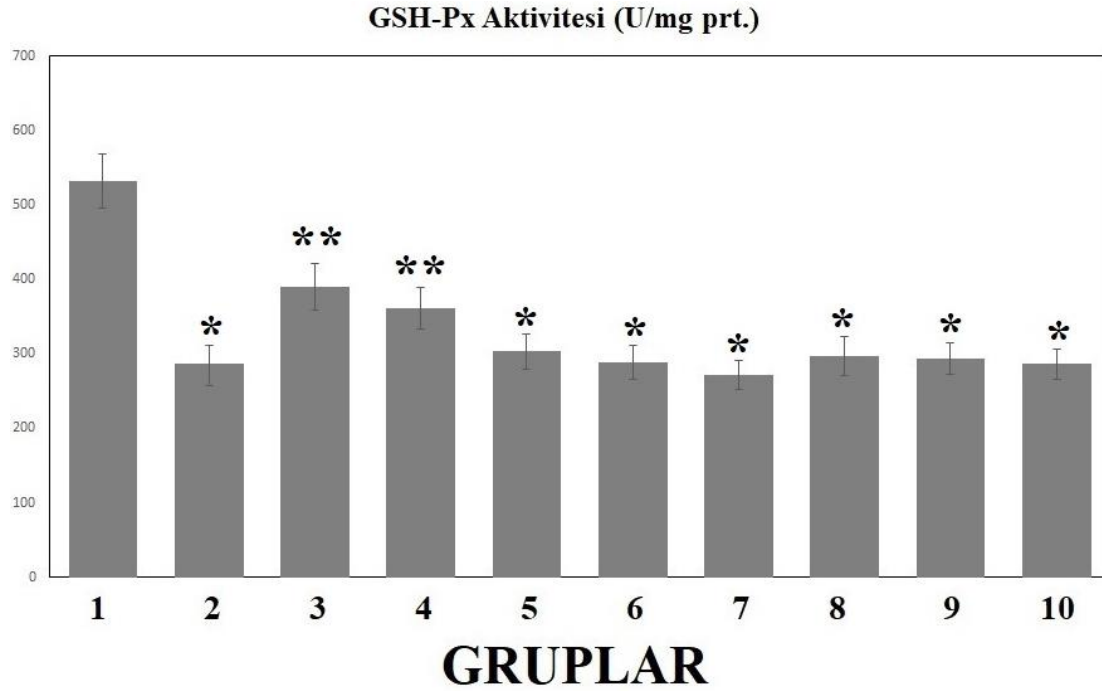
Şekil 16. Böbrek dokusu katalaz aktiviteleri (U/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

4.11. Böbrek Dokusu GSH-Px Aktivitesi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu GSH-Px aktiviteleri Şekil 17’de gösterilmiştir. Grup 2’nin GSH-Px aktivitesi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3 ve Grup 4’ün GSH-Px aktiviteleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



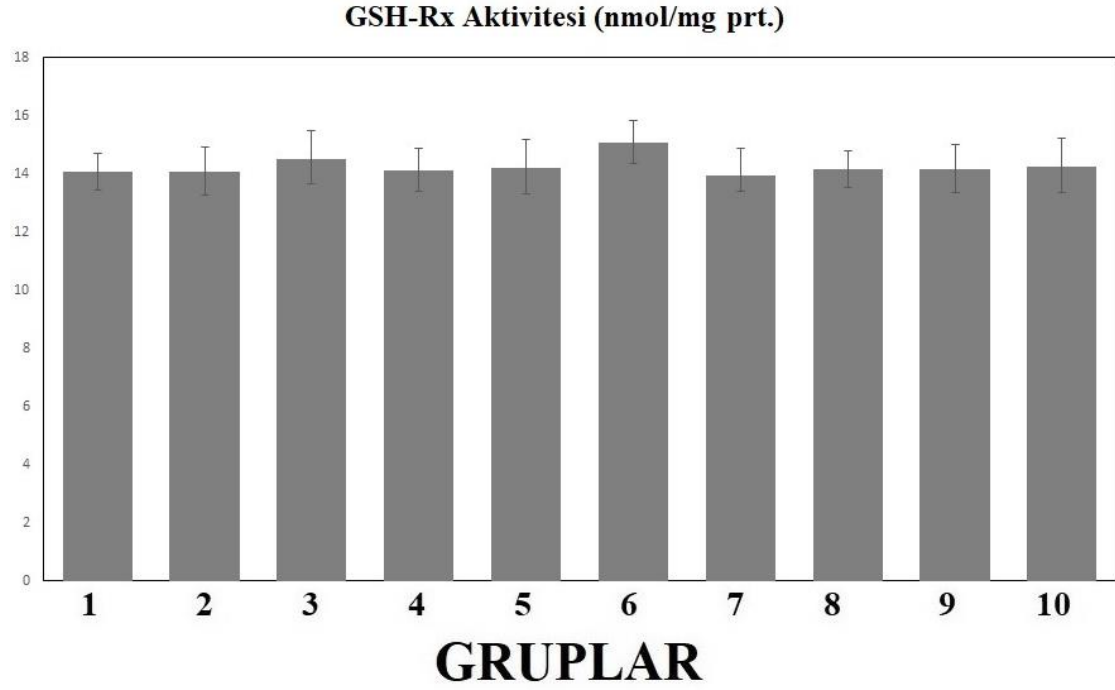
Şekil 17. Böbrek dokusu GSH-Px aktiviteleri (U/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**GSH-Px:** Glutasyon peroksidaz; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

4.12. Böbrek Dokusu GSH-Rx Aktivitesi Sonuçları

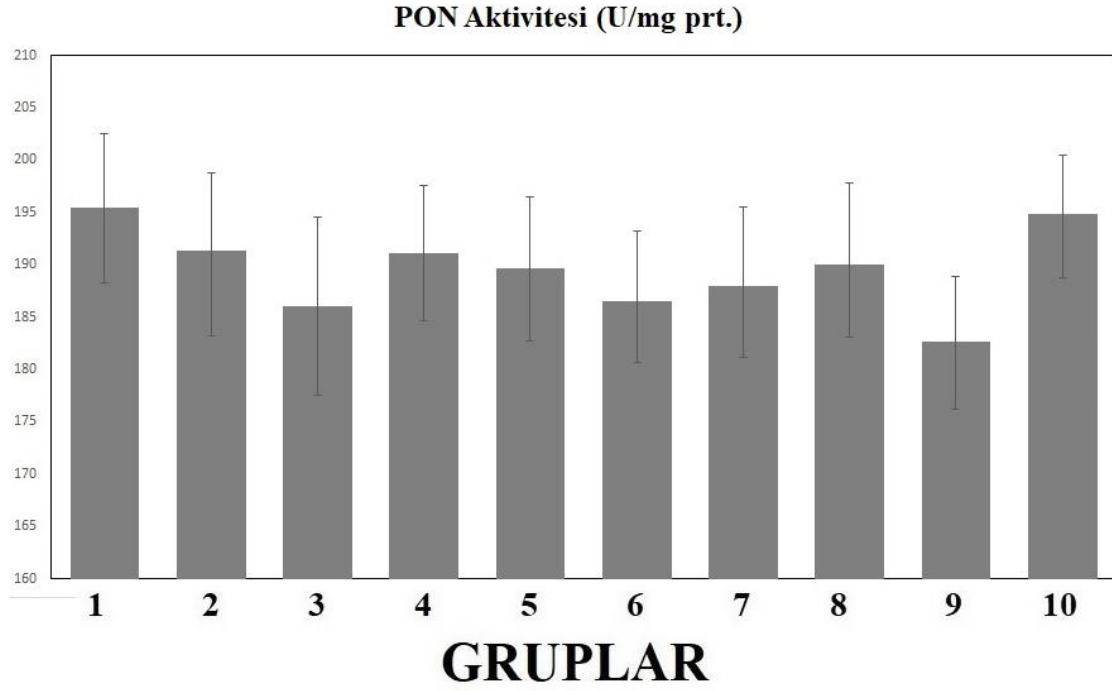
Tüm grupların böbrek dokusu GSH-Rx aktiviteleri Şekil 18’de gösterilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 18. Böbrek dokusu GSH-Rx aktiviteleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**GSH-Rx:** Glutasyon redüktaz; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

4.13. Böbrek Dokusu PON Aktivitesi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu PON aktiviteleri Şekil 19’da gösterilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



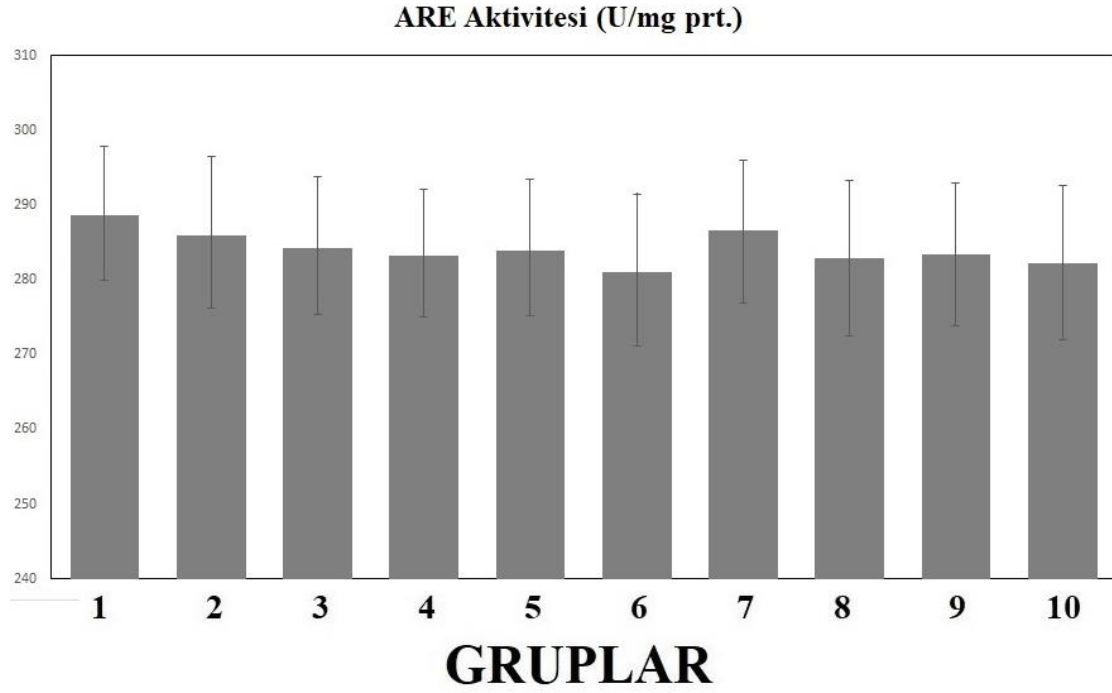
Şekil 19. Böbrek dokusu PON aktiviteleri (U/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**PON:** Paraoksonaz; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.14. Böbrek Dokusu ARE Aktivitesi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu ARE aktiviteleri Şekil 20’de gösterilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



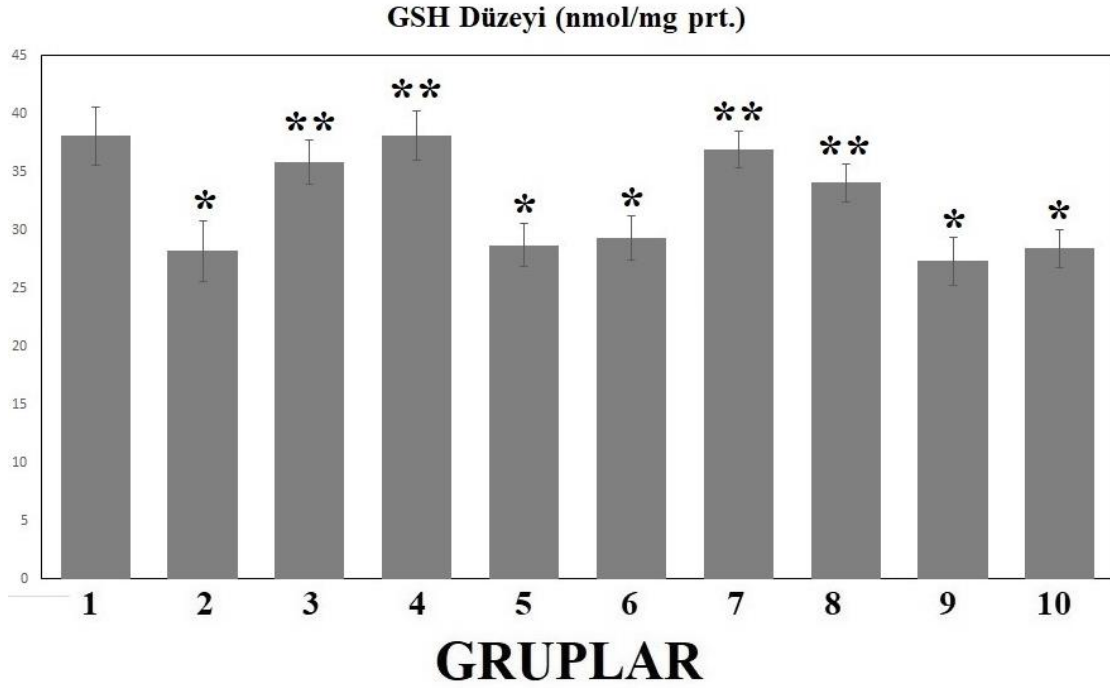
Şekil 20. Böbrek dokusu ARE aktiviteleri (U/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**ARE:** Arilesteraz; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin) ()

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.15. Böbrek Dokusu GSH Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu GSH düzeyleri Şekil 21’de gösterilmiştir. Grup 2’nin GSH düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 7 ve Grup 8’in GSH düzeyi ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



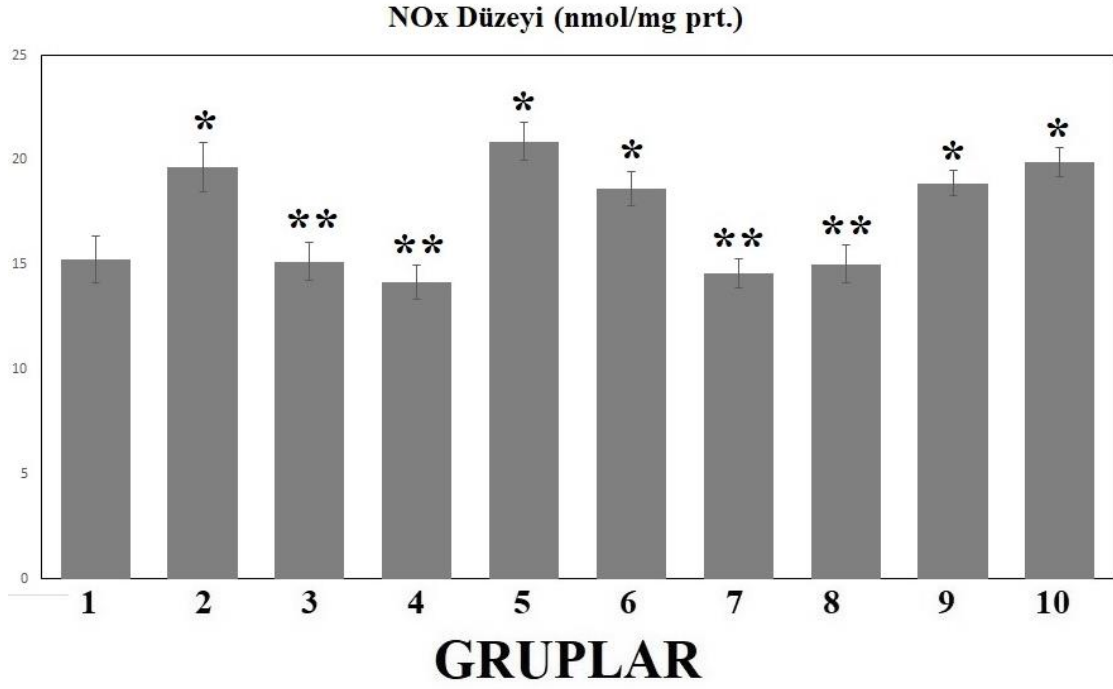
Şekil 21. Böbrek dokusu GSH düzeyleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**GSH:** Redükte glutatyon; **LA:** Kurşun asetat; **MYC:** Mirisetin; **KMP:** Kaemferol; **FST:** Fisetin; **GLG:** Galangin) ()

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

4.16. Böbrek Dokusu NOx Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu NOx düzeyleri Şekil 22’de gösterilmiştir. Grup 2’nin NOx düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4, Grup 7 ve Grup 8’in NOx düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



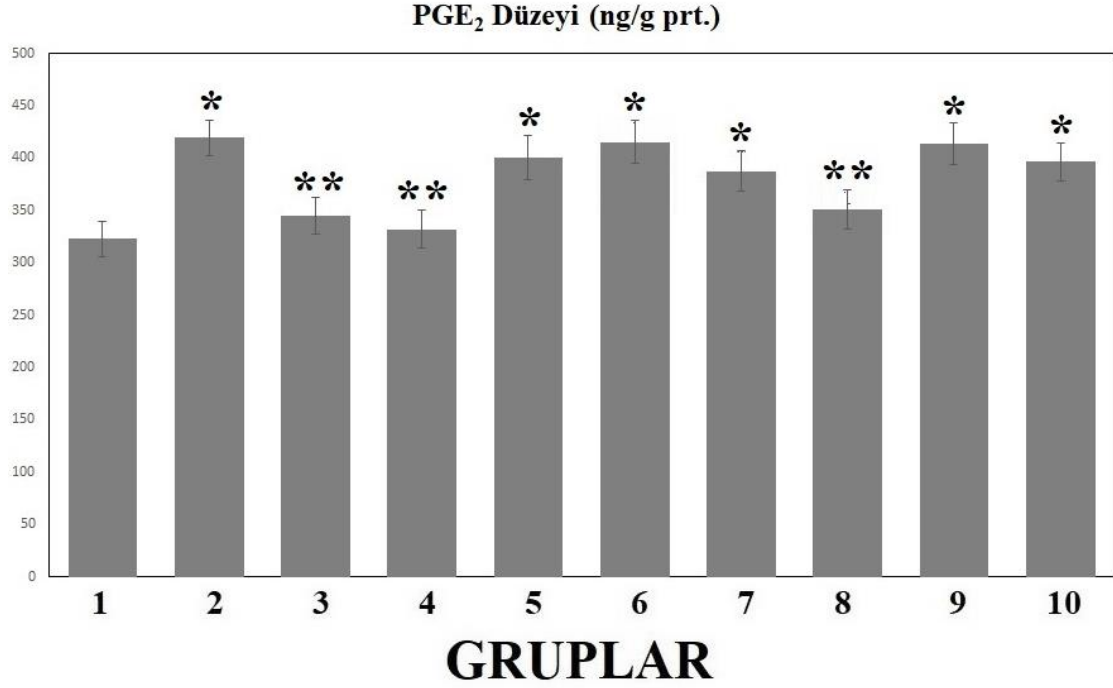
Şekil 22. Böbrek dokusu NOx düzeyleri (nmol/mg prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**NOx**: Nitrik oksit; **LA**: Kurşun asetat; **MYC**: Mirisetin; **KMP**: Kaemferol; **FST**: Fisetin; **GLG**: Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

4.17. Böbrek Dokusu PGE₂ Düzeyi Sonuçları

Tüm grupların böbrek dokusu PGE₂ düzeyleri Şekil 23’de gösterilmiştir. Grup 2’nin PGE₂ düzeyi, Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3, Grup 4 ve Grup 8’in PGE₂ düzeyleri ise Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 23. Böbrek dokusu PGE₂ düzeyleri (ng/g prt.) ($n=7$). Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: LA grubu; Grup 3: LA+MYC100 grubu; Grup 4: LA+MYC200 grubu; Grup 5: LA+KMP100 grubu; Grup 6: LA+KMP200 grubu; Grup 7: LA+FST100 grubu; Grup 8: LA+FST200 grubu; Grup 9: LA+GLG100 grubu, Grup 10: LA+GLG200 grubu (**PGE₂**: Prostaglandin E₂; **LA**: Kurşun asetat; **MYC**: Mirisetin; **KMP**: Kaemferol; **FST**: Fisetin; **GLG**: Galangin)

*Grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$)

**Grup 2’ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yüzyılda artan nüfus artışı ve bunun neticesinde toprak, hava ve suda meydana gelen kirlilik ekolojik sistemimizi olumsuz yönde etkilemekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. İnsanoğlunun çeşitli gereksinimleri ile endüstriyel gelişimin artması ile bu kirlilik düzeyi daha çok artmaktadır. Ağır metaller, çevre kirliliğinin artmasına neden olan etkenler içinde en önemlisidir. Teknolojik faaliyetler, sanayi faaliyetleri, gübre ve ilaç sektörü, kentsel atıklar, egzoz dumanı ve madencilik gibi birçok faaliyet neticesinde ağır metaller çevremizi kirletmektedir (Metryka ve ark., 2018). Kurşun, insanlar tarafından en çok kullanılan metallerden biri olması sebebiyle en fazla maruz kalınan ağır metallerin başında geldiği ifade edilmiştir (Ahmad ve Liu, 2020). Kurşunun kullanım alanları; kozmetik, boya sanayi, seramik, porselen, boru yapımında ve benzin katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Kurşunun benzine katkı maddesi olarak kullanılması neticesinde egzoz gazları ile havaya kurşun bileşiklerinin salınımı meydana geldiği vurgulanmıştır. Kurşun kaplı su depoları ve borularında içme suyunun saklanması sonucu sulara kurşun geçebildiği gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2020). Kurşun vücuda, solunum, deri ve sindirim yolu ile absorbe olmaktadır (Shakir ve ark., 2017). Kurşun kısa süre içerisinde kana geçtikten sonra diğer organlara yayıldığı tespit edilmiştir. Vücuda alınan kurşun atılım hızının yavaş olması sebebiyle ömür boyunca vücutta birikir (Li ve ark., 2020). Boyalarda ve seramiklerde kurşun kullanıldığı bilinmektedir. Bu boyalar ile boyanan saklama kaplarında ki yiyeceklerin tüketilmesi ile de kandaki kurşunun arttığı gözlenmiştir (Scammell ve ark., 2019). İş hayatındaki insanlar da sıklıkla kurşuna maruz kalmaktadır. Pil üretimi, silah sanayi, bazı cerrahi ürünler, levha yapımı, uçak yapımı gibi birçok sektörde rastlanmaktadır (Obeng-Gyasi ve ark., 2019).

Kurşunun patogeneze etkisi, enzimlerin aktivitesini doğrudan engellediği, önemli eser minerallerin emilimini rekabetçi bir şekilde inhibe ettiği, sülfidril proteinlerine bağlandığı, kalsiyum homeostazisini değiştirdiği ve antioksidan sülfidril rezervlerinin seviyesini düşürdüğü için multifaktöryeldir (Balali-Mood ve ark., 2021). Kurşun toksisitesinin iki ayrı yolla serbest radikal hasarına neden olduğu ortaya çıkmıştır; hidroperoksitler, tekli oksijen ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere ROS üretimi ve

antioksidan rezervlerinin doğrudan tükenmesi (Paithankar ve ark., 2021). Kurşun, biyosentezdeki enzimlerin sülfidril gruplarıyla yarışır ve bu enzimleri inhibe ederek biyokimyasal değişikliklere yol açar (Björklund ve ark., 2019). Ayrıca, kalsiyumu taklit ederek hücre içi ve hücrelerarası sinyal iletimini zayıflatır ve kasların aktivitesinde değişikliklere yol açar (Paithankar ve ark., 2021).

Kurşun maruziyeti sonucu, doza ve maruziyet süresine bağlı olarak sıklıkla baş ağrısı, uyuşukluk, abdominal ağrı ve kramp, kabızlık, anemi, davranış bozuklukları, böbrek hasarı, özellikle çocuklarda okul başarısında düşme ve zekâ seviyesinde azalma meydana gelir (Santa Maria ve ark., 2019). Günümüzde kurşunun, küçük miktarlarının bile insan ve diğer organizmalara zararlı olduğu, kanser dahil olmak üzere geniş bir yelpazede davranışsal, biyokimyasal ve fizyolojik bozukluklara neden olduğu kabul edilmektedir (Rehman ve ark., 2018).

Küçük miktarlardaki kurşunun bile insanlara ve diğer organizmalara zararlı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Obeng-Gyasi ve ark., 2019). Kurşun zehirlenmesi, çoklu organ sistemlerinin yapısal ve fonksiyonel anormalliklerinde yer alır (Rehman ve ark., 2018). Kurşunun hepatotoksik, nörotoksik, nefrotoksik, hematotoksik, immünolojik, kardiyotoksik, ayrıca solunum ve üreme sistemi üzerine etkileri olduğu iyi bilinmektedir (Singh ve ark., 2018). Kurşun asetat memelilerde fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal bozukluklara yol açarak toksik etkiye neden olmaktadır (Santa Maria ve ark., 2019).

Kurşun asetatın en fazla zarar verdiği dokuların başında karaciğer ve böbrek gelmektedir (Mazandaran ve Khodarahmi, 2021). Çünkü kurşunun genel olarak atılım yeri böbreklerdir. Böbrekler endotel harabiyet ve intravasküler volum değişikliklerinde diğer organlara göre daha hassas olmalarından dolayı kurşun asetat intoksikasyonu sonucunda olumsuz etkilenen organların başında yer almaktadır (Bhattacharjee ve ark., 2021). Böbreklerin yüksek oksijen tüketimi, metabolik aktivitesi ve tüm bunlara ek olarak infiltratif hücreler ile tübülün hücrelerinde reaktif oksijen türleri böbreğin kendi antioksidan koruma mekanizmasını aşmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak doku hasarı meydana gelmektedir. Yapılan birçok çalışmada da ROS'ların iskemik, toksisite ve immünolojik kaynaklı böbrek hasarına yol açtığı belirtilmiştir (Genchi ve ark., 2020). Bu nedenle yaptığımız çalışmada kurşun asetatın böbrek dokusunda meydana getirdiği

biyokimyasal değişimleri ve koruyucu olarak uygulanan mirisetin, kaemferol, fisetin ve galanginin etkilerini gözlemlemeyi hedefledik. Bu çalışmada mirisetin (Lai ve ark., 2020), kaemferol (Al-Numair ve ark., 2015), fisetin (Kandhare ve ark., 2011) ve galangin'in (Tomar ve ark., 2017) 100 ve 200 mg/kg olmak üzere iki farklı dozu kullanılmıştır. Kurşun asetatın sıçan için oral LD50 dozu 4665 mg/kg/gün'dür (Akanke ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında, kurşun asetatın LD50 dozunun yaklaşık 1/50'si olan 100 mg/kg/gün dozu 28 gün boyunca erkek sıçanlara oral olarak gavaj yoluyla verilmiştir (Barkaoui ve ark., 2020). Uygulama süresince sıçanların hiçbirinde ölüm meydana gelmemiştir.

Üre, kan üre azotu ve kreatinin miktarları böbreklerin fonksiyonları hakkında bilgi veren önemli parametrelerdir. Yapılan pek çok araştırma, kan üre ve kreatinin seviyelerinde yükselmenin renal disfonksiyonun bir kanıtı olduğunu göstermiştir (El-Demerdash ve ark., 2004; Husain ve ark., 2004; Morel ve ark., 2005). Al-Majed ve ark. (2002), yaptıkları bir çalışmada nefrotoksisitenin bir kanıtı olarak glomerular filtrasyonda azalmayı göstermişlerdir. Bunun da serum üre ve kreatinin seviyelerindeki artışla tespit edildiğini belirtmişlerdir. Serum kreatinin ve kan üre azotu düzeylerindeki artışların glomerular filtrasyonun iyi birer göstergeleri olmasıyla birlikte, nefronlarda aşırı hasarın göstergeleri olduğu ifade edilmiştir (Maden ve Aslan, 1999). Serum üre ve kreatininin artışı nefrotoksisiteyi göstermektedir. Kandaki üre miktarındaki artışın nedenlerinden biri de doku yıkımına bağlı olarak gelişmektedir (Senthilkumar ve ark., 2006). Kreatinin ise iskelet kasında kreatinden enzimatik dehidrasyon ile oluşmaktadır. Normal kişilerde serum kreatinin düzeyleri ve idrar ile kreatinin atılımı kas kütlesinin bir göstergesidir. Glomerullerde filtre olan kreatinin, böbrek tübüllerinde geri emilime uğramaktadır. Son idrarda bulunan az miktardaki kreatinin tübüler sekresyondan kaynaklanmaktadır (Maden ve Aslan, 1999). Ancak tübüllerde meydana gelen herhangi bir dejenerasyon serum kreatinin miktarında artışa neden olmaktadır. Yaptığımız çalışmada kurşun asetat intoksikasyonu sonucunda serum üre, kreatinin ve kan üre azotu düzeylerinde görülen artışın, böbrek dokusunda meydana gelen hasara bağlı olarak geliştiğini söylemek mümkündür. Mirisetin, kaemferol ve fisetin uygulamaları ise kurşun asetat uygulanan sıçanların serum üre, kreatinin ve kan üre azotu değerlerini azaltmaktaydı. Bu sonuç her üç fitokimyasalın da böbrek fonksiyonu üzerindeki olumlu etkisini göstermektedir. Galangin uygulaması ise serum üre, kreatinin ve kan üre azotu değerleri üzerinde

herhangi bir değişikliğe neden olmamiş olup galanginin böbrek fonksiyon testlerinde belirgin bir değişikliğe yol açabilmesi için daha uzun bir süreyle ve/veya daha yüksek konsantrasyonda uygulanması gerekebileceğini düşünmekteyiz.

Serbest radikaller, zincir reaksiyonları ile yeni ürünler oluşturabilen oldukça reaktif ve stabil olmayan maddelerdir. Serbest radikallerin vücutta normal metabolik süreçler esnasında oluşan reaktif kimyasal ürünler olduğu, vücutta ROT üretilmesinin ve yok edilmesinin, oksidan ve antioksidan sistemler denge halinde olduğu sürece kontrol altında olduğu bilinmektedir. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki var olan denge artan reaktif oksijen türlerine bağlı olarak veya antioksidanların azalmasıyla ilgili olarak bozulabilmekte ve sonuçta oksidatif hasar gözlenmektedir. Reaktif oksijen ürünlerinin oksidatif hasara yol açma mekanizmalarının başında poliansatüre yağ asitlerinin fosfolipid zincirlerinin lipid peroksidasyonu gelmektedir (Lawton ve Donaldson, 1991). Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA seviyesi bir biyomarker olarak bilinmektedir. Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olay lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Zincir reaksiyonunda kırııcı bir etki veya iki lipid peroksidinin birbiriyle etkileşmesi olmadıkça giderek artan bir şekilde lipid peroksidasyonu devam etmektedir. Lipid peroksidasyonu, direkt hasarını membran yapısında değişikliklere sebep olarak, indirekt hasarını da reaktif aldehidler oluşumuna yol açarak göstermektedir. Membran yapısındaki değişiklikler, membran permeabilitesinde artış, transmembran iyonik gradient ve membran sekretuar fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır (Levander ve ark., 1977; Shafiq-Ur-Rehman, 1984). MDA gibi, oluşan reaktif aldehidler membran bileşenlerinde çapraz bağlanmalar ve polimerizasyona neden olmaktadır. Sonuçta bu durum membran yapısında bozulma, iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi membran işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır (Maleeka ve ark., 2001). MDA, nonenzimatik oksidatif lipid peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden biridir (Ercal ve ark., 2001). MDA lipid peroksidasyonun derecesi ile iyi uyum gösterir ve oksidatif stresi belirlemede lipid oksidasyonunu yansıtmaktadır (Yiin ve Lin, 1995; Yu ve ark., 2016).

Kurşun maruziyeti sonucu gözlenen etkilerin kurşunun indüklediği oksidatif hasarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Flora ve ark., 2004; Liu ve ark., 2010). Kurşun

maruziyetine bağılı olarak reaktif oksijen türlerinin artışı, buna bağılı olarak hücrelerin antioksidan salınımının artması ve sonrasında tükenmesi, ayrıca kurşunun özellikle birçok G6PD, GSH, GSH-Px, SOD ve katalaz gibi bazı antioksidan enzimlerin tiyol grubuna bağlanarak onları inhibe etmesi sonucunda prooksidan/antioksidan oranında bozulma olmakta ve oksidatif hasar gözlenmekte ve oksidatif hasara bağılı olarak da doku zedelenmesi oluşmaktadır (Kim ve ark., 2019). Kurşun kaynaklı oksidatif hasarın belirlenmesinde de SOD, katalaz, GSH-Px gibi çeşitli antioksidan enzimler ve GSH gibi moleküllerin analizlerinden yararlanılmaktadır (Legget, 1993). Kurşunun lipid peroksidasyon oluşturunca etkilerinin aminoasitler ve proteinlerin tiyol gruplarına bağlanması, buralarda oksidatif hasar oluşturunca, reaktif oksijen türleri üretimini arttırması ve sonuçta hücre membranı bütünlüğünde bozulma ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001). Yapılan son çalışmalar kurşun, kadmiyum, civa, arsenik ve bakır gibi ağır metallerin serbest radikal üreterek membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (Kim ve ark., 2019).

Serbest radikal oluşumlarını veya oluşan ürünleri ve zararlı etkilerini önleyen sistem antioksidan savunma sistemi olarak tanımlanmaktadır. Başlıca antioksidan enzimler; süperoksidin hidrojen peroksida dönüşümünü katalizleyen ve oksiradikallere karşı primer koruyucu olan süperoksid dismutazdır. Süperoksid dismutazdan başka, glutasyon peroksidaz ve katalaz oksiradikallere karşı defans sisteminde rol alan enzimlerdir. GSH-Px ve katalaz, SOD tarafından oluşturunca hidrojen peroksidi dokulardan uzaklaştıran reaksiyonlarda rol alırlar. Bu nedenle antioksidan defansta önemli role sahiptirler. Özetle SOD enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipidlerin peroksidasyonunu inhibe eder. Normal koşullarda hücrelerde bulunan H_2O_2 'in detoksifikasyonundan sorumlu olan GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesini engelleyici bir enzimdir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in detoksifikasyonunu esas olarak katalaz üstlenmektedir (Hsu ve Guo, 2002; Patil ve ark., 2006; Hamed ve ark., 2010; Koskenkorva-Frank ve ark., 2013; Fan ve ark., 2020).

Yaptığımız çalışmada kurşun asetat uygulamasının sıçanların böbrek dokularındaki MDA düzeyini arttırdığı, SOD, katalaz, GSH ve GSH-Px düzeylerini azalttığı, GSH-Rx düzeylerini ise değıştirmedeği görülmüştür. Bu sonuçlar, kurşun asetat

intoksikasyonunun serbest radikal oluşumunu arttırarak ve antioksidan savunma mekanizmasını baskılayarak oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir.

Ratlara uygulanan kurşun sülfatın rat akciğerinde toksisite oluşturduğu akciğer alveollerinde patolojik değişiklikler meydana getirip, lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA seviyesinde artışa yol açtığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise yine ratlara uygulanan kurşunun rat böbreklerinde biyokimyasal parametrelerde bozulmalara yol açtığı, böbrek dokusunda dejenarasyona yol açtığı ve MDA seviyesinde yükselmeye neden olarak renal hasar oluşturduğu ifade edilmiştir (Wang ve ark., 2013). Kurşun kadmiyum karışımının ratlara uygulandığı bir çalışmada, ratların beyin dokularında oksidatif stres meydana geldiği ve histopatolojik değişiklikler gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmada antioksidan düzeylerinin düştüğü, lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA'nın seviyesinin arttığı ve sitokinlerin anti inflamatuvar yanıtında yükselme olduğu vurgulanmıştır (Anyanwu ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada dişi sığırlara uygulanan kurşun asetatın antioksidan aktivitelerde azalmaya yol açtığı, lipid peroksit düzeylerinde ise artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Kurşun asetatın aynı zamanda eritrositlerde toksik etki yarattığı, görülmüştür (Patra ve Swarup, 2000). Kadmiyumun ratlara uygulandığı bir çalışmada, kadmiyumun beyin dokusunda toksisite meydana getirdiği belirtilmiştir. Asetilkolinesterazın inhibe olduğu, serbest radikal düzeyinde artış meydana geldiği, antioksidan aktivitesinde azalma ve ATPaz düzeyinde düşme olduğu ifade edilmiştir (Pari ve Murugavel, 2007). Ratlara uygulanan kadmiyumun, rat beyinde biyokimyasal değişikliklere yol açtığı belirtilmiştir. Kadmiyumun lipid peroksidasyonunu arttırdığı, SOD, katalaz ve GST enzim düzeylerinde azalmaya yol açtığı aynı şekilde asetilkolinesterazın inhibe olmasına neden olarak asetilkolinin düzeyinde birikme oluşturduğu ve rat beyin dokusunda nörodejeneratif bozukluklar meydana getirdiği belirtilmiştir (Alnahdi ve Sharaf, 2019). Mousa ve ark. (2002), dişi keçilere iki hafta boyunca ağızdan 5.46 mg kurşun verdikleri çalışmalarında 7. günde eritrosit SOD, katalaz ve toplam tiyol miktarında azalma, 14. günde ise tüm parametrelerde azalma ve MDA düzeyinde zamana paralel olarak yükselme olduğunu, bu veriler ışığında keçilerde kurşun zehirlenmesinin patogenezinde serbest radikal oluşumunun önemli olduğu kanaatine varmışlardır (Mousa ve ark., 2002).

Chiba ve ark.'nın (1996) kurşuna maruz kalmış işçileri kan konsantrasyonları 10 µg/100 mL'nin altında, 10 ila 20 µg/100 mL arasında ve 20 µg/100 mL'nin üzerinde şeklinde gruplandıkları çalışmalarında, CAT aktivitesinin en son grupta ilk gruba

nazaran anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Chiba ve ark., 1996). Gürer-Orhan ve ark. (2004) ise kurşuna maruz kalmış akü fabrikası işçileri ile sağlıklı bireyler arasında yaptıkları analizlerde kurşuna maruz kalan işçilerde eritrosit CAT aktivitelerinde önemli yükselme olduğunu; bu yükselmeyi kurşuna bağlı olarak artmış H_2O_2 düzeylerine karşı eritrositlerin göstermiş olduğu bir savunma mekanizması olduğunu açıklamışlardır (Gürer-Orhan ve ark., 2004). Hermes-Lima ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada da kurşun zehirlenmesinde ALA'nın metal katalizli aerobik oksidasyonu ile artan reaktif oksijen türleri nedeniyle uyarılmış lipid peroksidasyon sonucu yükselmiş eritrosit SOD ve GSH-Px düzeyleri arasında korelasyon tespit edilmiştir (Hermes-Lima ve ark., 1991).

Yapılan çalışmalarda kurşun intoksikasyonu sonucunda meydana gelen organ hasarlarına karşı çeşitli koruyucu maddeler denenmiş ve bir kısmında olumlu sonuçlar alınmıştır (Çaylak, 2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, kurşun toksikasyonunda ROS oluşumunun artmasının ve hücredeki antiosidan maddelerin azalmasının tespit edilmesini takiben, kurşun ile indüklenen oksidatif hasara karşı antioksidanların kullanılması önerilmiştir (Wang ve ark., 2016). Kurşun toksikasyonunda kullanılan antioksidanlar, kurşunun bağlandığı bileşiklerde onun yerine bağlanarak, dokulardan kurşunu uzaklaştırırlar ya da vücutta endojen olarak kurşunun oluşturduğu oksidatif hasara karşı koyarlar. Kurşunun oluşturduğu oksidatif stresin azaltılmasında antioksidanlar tek başlarına veya şelatörlerele birlikte kullanılabilirler (Çaylak, 2010).

Kurşun toksikasyonuna bağlı olarak eritrositlerde MDA seviyesinin ve G6PDH aktivitesinin artarken, GSH seviyesinin düştüğü, koruyucu olarak N-asetilsistein ve süksimer (Gürer ve ark., 1998), lipoik asit (Gürer ve ark., 1999) ve taurin (Gürer ve ark., 2001) verilmesi ile birlikte artan MDA seviyesinin ve G6PDH aktivitesinin istatistik olarak anlam gösterecek şekilde düştüğü, GSH seviyesinin ise arttığı tespit edilmiştir. Lipoik asit ve taurin amino asidinin bir şelatör ile birlikte, kurşun zehirlenmesinde terapötik müdahale için iyi bir aday olabileceği belirtilmiştir (Gürer ve ark., 2001).

Ratlarda oluşturulan kurşun toksikasyonuna bağlı olarak serum MDA seviyesinin ve eritrosit GSH-Px aktivitesinin arttığı, metiyonin, α -lipoik asit, N-asetilsistein ve homosistein verilmesi ile birlikte bu yükselişin anlamlı şekilde düştüğü tespit edilmiştir (Çaylak ve ark., 2008). Lee ve ark. (2005), *Eucommia ulmoides* Oliv. bitki ekstraktının

kurşun toksikasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, toksikasyona bağlı olarak eritrositlerde lipid peroksidasyonu seviyesinin arttığını, bununla birlikte GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin düştüğünü, bitki ekstratının kurşun ile birlikte verilmesi ile antioksidan savunma sisteminin arttığını ve lipid peroksidasyonu seviyesinin düştüğünü bulmuşlardır.

Kurşun yarattığı oksidatif stres sonucu GSH ve total antioksidan kapasite (TAC) seviyesinin düştüğü, bununla birlikte lipid peroksidasyonunun arttığı, yeşil çayın verilmesi ile birlikte GSH ve TAC seviyesinin kontrol grubuna yaklaştığı, lipid peroksidasyonunun azaldığı tespit edilerek, sonuç olarak yeşil çayın oksidatif strese karşı eritrositleri koruyabileceği bildirilmiştir (Hamed ve ark., 2010). Likopen ve kateşin'in kurşun toksikasyonuna karşı etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, toksikasyon ile birlikte artan MDA seviyesinin düştüğü, azalan GSH seviyesinin ise yükseldiği, likopen ve kateşin'in birlikte verilmesi ile bu etkinliğin arttığı, MDA ve GSH seviyesinin kontrol grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir (Komousani ve Moselhy, 2011). Subkronik olarak geliştirilen kurşun toksikasyonuna mango çekirdeğinden elde edilen mangiferinin, farklı dozlarda koruyucu etkisinin çalışıldığı bir araştırmada, kurşun toksikasyonu sonucu artan plazma MDA seviyesinin azaldığı, azalan GSH seviyesi, GSH-Rx ve GSH-Px aktivitelerinin mangiferinin kullanılan dozuna paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2013).

Yalnız kurşun verilen grup ile kurşun ile birlikte vitamin C verilen grupların eritrositlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH-Px ve GSH-Rx aktivitelerinin önem gösterecek şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak kurşunun vitamin C'nin metabolizmasını değiştirebileceği belirtilerek, zehirlenme durumlarında vitamin C uygulanmasının bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde faydalı olabileceği belirtilmiştir (Eshginia ve Marjani, 2013). Kurşuna maruz kalan ratlardan izole edilen eritrositlerde, GSH miktarında dereceli olarak bir azalma, TBARS oluşumunda artış meydana geldiği, garlic ekstratının verilmesi ile bu değişimlerin düzeldiği belirlenmiştir (Sarkar ve ark., 2015).

Heidarian ve Rafieian-Kopaei (2013), altı hafta boyunca *ad libitum* kurşun verilen ratlarda, serum MDA seviyesinin arttığını, kurşun ile birlikte *Cynara scolymus* yaprak ekstratının oral olarak verilmesi ile MDA seviyesinin anlamlı şekilde düştüğünü

bulmuşlardır. Flora ve ark. (2004), yaptıkları araştırmalarda melatonin, N-asetilsistein ve DMSA'nın kurşun ile indüklenen oksidatif strese, şelat oluşturarak, artan MDA düzeyini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Kurşuna karşı *Ganoderma lucidum* türü mantar ekstraktının koruyucu olarak verildiği başka bir çalışmada, kurşun toksikasyonu ile eritrosit lipid peroksidasyonunun arttığı ve GSH seviyesinin azaldığı, oral *Ganoderma lucidum* uygulaması ile bu parametrelerin seviyelerinin düzeldiği, GSH seviyesinin kontrol grubundan daha yüksek çıktığı bildirilmiştir (Hossain ve ark., 2015).

Yaptığımız çalışmada, kurşun asetat uygulanan sıçanların böbrek dokularındaki MDA düzeylerinin mirisetin ve yüksek doz fisetin uygulanmasıyla birlikte azaldığı, SOD aktivitesinin mirisetin ve yüksek doz fisetin varlığında arttığı, katalaz aktivitesinin mirisetin, kaemferol ve fisetinin her iki dozunun da uygulanmasıyla birlikte arttığı, GSH-Px aktivitesinin sadece mirisetin uygulamasıyla birlikte arttığı, GSH düzeyinin ise mirisetin ve fisetinin her iki dozunun da uygulanması sonucunda arttığı, GSH-Rx aktivitesinin ise hiç bir fitokimyasal uygulamasından etkilenmediği görülmüştür. Bu sonuçlar özellikle mirisetinin ve fisetinin kurşun asetat intoksikasyonu sonucu oluşan oksidatif stresi azaltabileceğini göstermektedir.

PON1, hidrolazlar enzim ailesine ait, karaciğer tarafından sentezlenen, plazmada aromatik karboksilik asit esterlerini ve organofosfatları hidroliz edebilme kapasitesine sahip bir enzimdir. PON1 enziminin paraoksonaz ve arilesteraz olmak üzere iki önemli aktivitesi klinik ve deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca PON1 enziminin laktonaz aktivitesi de gösterilmiştir. PON1'in laktonaz aktivesi, homosistein tiyolaktonun toksisitesine karşı koruduğu bildirilmiştir. PON1'in ilk olarak PON aktivitesi bulunmuştur. PON'un insektisit zehirlenmesinde paraoksonun hidrolizini katalizlediği bildirilmiştir. Böylece ksenobiyotik toksisitesine karşı koruyucu rol oynadığı gözlenmiştir (Costa ve ark., 2005). PON'un en önemli görevi organofosfat bileşiklerini ve sinir gazlarını hidrolize ederek bu bileşiklerin toksik etkilerinin azalmasında etkin rol oynamasıdır. Organofosfat zehirlenmelerinde serum PON'un kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düştüğü belirtilmiştir. Düşük serum PON'un ise ROS seviyesinde artışa neden olabileceği belirtilmiştir (Sözmen ve ark., 2002). ARE ise fenil asetatın hidrolizini katalizleyen enzimdir. Kardiyak sendromu olan hastalarda serum ARE'nin PON ile birlikte oksidatif strese karşı koruyucu enzim olduğu bildirilmiştir (Gur ve ark., 2007). Yaptığımız çalışma kurşun asetat uygulamasının sıçan böbrek dokusundaki PON ve ARE

aktivitelerini değiştirmediğini, bunun yanı sıra uygulanan fitokimyasalların da hiç bir konsantrasyonun böbrek PON ve ARE aktivitelerini değiştirmediği görülmüştür. Bu sonuç bize kurşun asetat toksisitesi sonucunda böbrek dokusunun PON ve ARE aktivitelerindeki değişimin daha uzun bir sürede meydana gelebileceğini göstermektedir.

Bazı araştırmacılar, kimyasalların in vitro sitotoksik etkilerinin DNA ift sarmal kırıklarının oluşumundan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Opal ve Huber, 2002). Giri ve ark. (1978), kromozomal anormalliklerin, kimyasalların alkillenme özelliklerinden ortaya çıktığı ve bu alkillenmenin DNA hasarına sebep olduğunu raporlamışlardır. Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitesinin, moleküler yapılarında alkil ve fosforil gruplarını taşıyan elektrofilik kısmın nükleofilik bölümüne bağlanma kabiliyetlerinden dolayı olabileceği belirtilmiştir (Cohen, 1999). Serbest radikaller, DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletine, pürin ve pirimidin bazlarının spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmasına zarar vermektedir (Shigenaga ve Ames, 1991). Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu, baz salınımını ve DNA zinciri kırılmalarını indüklerken oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara yol açabilmektedir (Cheng ve ark., 1992). Yaptığız alışmada DNA oksidasyonunu gösteren en önemli parametrelerden birisi olan 8-OH dG düzeyine sıçanların böbrek dokusunda baktık. Böbrek dokusundaki 8-OH dG düzeyinin kurşun asetat uygulanması sonucunda arttığını, mirisetin ve yüksek doz fisetin varlığında ise düştüğünü tespit ettik. Bu sonuç, mirisetin ve fisetinin kurşun asetat uygulaması sonucunda oluşabilecek olan DNA hasarını önleyebileceğini göstermektedir.

Proteinlerin oksidatif modifikasyonları, direkt olarak reaktif oksijen türleri ile oluşturulabildiği gibi, indirekt olarak oksidatif stres reaksiyonlarının ikincil ürünleri olarak da oluşabilir (Berlett ve Stadman, 1997). Sistein ve metionin, hemen hemen bütün reaktif oksijen türleri tarafından oksidatif hasar oluşturulmasına eğilimli yapılardır. Protein modifikasyonları, hem lizin, arginin, prolin ve treonin üzerinden oluşabilir hem de reaktif karbonil grupları ile sistein, histidin ve lizinin ikincil reaksiyonları üzerinden oluşabilir ki, bu durumda aldehid veya keton gibi protein karbonil türevleri oluşabilir. Bu nedenle protein karbonil ve serbest ve toplam tiyol miktarlarının, protein oksidasyonunun belirlenmesinde en önemli parametreler olduğu söylenebilir (Beal, 2002). Yaptığımız çalışmada kurşun asetat uygulamasının sıçan böbreklerdeki protein karbonil düzeyini arttırdığı, serbest ve toplam tiyol düzeylerini ise değiştirmediği görülmüştür. Mirisetin,

kaemferol ve fisetinin her iki konsantrasyonu da böbrek dokusundaki protein karbonil düzeylerinin düşmesini sağlarken, toplam ve serbest tiyol düzeylerinde ise herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuç, kurşun asetat intoksikasyonunun böbrek dokusundaki protein oksidasyonunu arttığını, mirisetin, kaemferol ve fisetin profilaksisi sayesinde bunun engellenebileceğini göstermektedir. Her iki tiyol düzeyinde de değişiklik meydana gelmemesinin sebebi ise protein oksidasyonuna karşı koyan savunma mekanizmasının daha geç bir dönemde bu durumdan etkileniyor olmasından kaynaklanıyor olabilir.

NOx metabolizmasının, hem oksidatif stres kaynaklı hipertansiyon hem de kurşun kaynaklı hipertansiyonun patogenezinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Vaziri ve Sica, 2004). Endotel bağımlı vazodilatasyon, düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonu, trombosit agregasyonu ve monosit adezyonu için nitrik oksit seviyelerinin yeterli olması gerekmektedir (Böger ve Ron, 2005). Endotel gevşetici faktör olarak da bilinen NOx, ROS tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir (Vaziri ve Sica, 2004). ROS'un, vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksidi oksitlediği, bir nitrik oksit eksikliği yarattığı, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilecek oldukça aktif bir ROS olan peroksinitriti ürettiği gösterilmiştir (Imam ve ark., 2001). Glutasyon tükenmesi ve kurşun maruziyetinin bağımsız olarak nitrik oksidi baskıladığı ve hayvan modellerinde hipertansiyona neden olduğu gösterilmiştir (Vaziri ve Sica, 2004). Attri ve ark. (2003), ratlara verdikleri kurşunun kan basıncını, plazma lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA seviyelerini önemli derecede arttırdığını, NOx metabolitlerini ise önemli derecede azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca kurşun ile birlikte verdikleri vitamin C'nin ROS inaktivasyonu ile lipid peroksidasyonunu azalttığını, NOx salınımını ve böylece NOx'in etkisiyle artan hipertansiyonu ise normale çevirdiğini gözlemlemişlerdir (Attri ve ark., 2003). Küçükler ve ark. (2021), kurşun uygulamasının sıçanların böbrek nükleer faktör kappa-B (NF- κ B), interlökin-33 (IL-33), PGE₂, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve p53 düzeyleri ile siklooksijenaz-2 (COX-2) ve iNOS aktivitelerini arttırarak inflamasyona yol açtığını göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada kurşun asetat uygulamasının hem NOx hem de PGE₂ düzeylerinde artışa neden olduğu görülmüştür. NOx ve PGE₂ seviyelerindeki artışın her iki dozdaki mirisetin profilaksisi sonucunda azaldığı görülmüştür. Fisetinin ise her iki konsantrasyonun da NOx seviyesinde azalmaya neden olduğu, ancak sadece yüksek dozunun PGE₂ düzeyini azalttığı anlaşılmıştır. Bu sonuç, mirisetin ve fisetin

profilaksisinin kurşun asetat intoksikasyonu sonucu oluşan enflamasyonu baskılayabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, dört hafta boyunca kurşun uyguladığımız sıçanların böbrek dokularında oksidatif stresin ve enflamatuvar yanıtın arttığı, böbrek fonksiyonlarının ise bozulduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada ayrıca mirisetin, kaemferol, fisetin ve galangin profilaksisinin oluşan bu böbrek hasarını ne ölçüde engelleyebileceği araştırılmıştır. Özellikle miristein ve yüksek dozdaki fisetin uygulamalarının oluşabilecek nefrotoksisitenin önüne geçebileceği, kaemferol ve galanginin ise istenildiği kadar koruyucu bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ancak yine de kurşun kullanımı mümkün olduğunca sınırlandırılmalı, şayet kullanılacaksa azami ölçüde gerekli önlemler alınarak çevreye olan aşırı yayılımı asgari düzeye indirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, Morel I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(11-12):1457-66.
- Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22(1):61-6.
- Adikwu E, Deo O, Precious OBP, Enimeya DA. Lead organ and tissue toxicity: Roles of mitigating agents (Part 1). *Br J Pharmacol Toxicol*. 2013;4:232-40.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Ahmad F, Liu P. (Ascorb)ing Pb Neurotoxicity in the Developing Brain. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12):1311.
- Akande MG, Aliu YO, Ambali SF, Ayo JO. Taurine mitigates cognitive impairment induced by chronic co-exposure of male Wistar rats to chlorpyrifos and lead acetate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(1):315-25.
- Alam W, Khan H, Shah MA, Cauli O, Saso L. Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: Current Therapeutic Standing. *Molecules*. 2020;25(18):4073.
- Alissa EM, Ferns GA. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J Toxicol*. 2011;870125.
- Al-Majed AA, Mostafa AM, Al-Rikabi AC, Al-Shabanah OA. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2002;46(5):445-51.
- Alnahdi HS, Sharaf IA. Possible prophylactic effect of omega-3 fatty acids on cadmium-induced neurotoxicity in rats' brains. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(30):31254-62.
- Al-Numair KS, Chandramohan G, Veeramani C, Alsaif MA. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep*. 2015;20(5):198-209.
- Amadi CN, Offor SJ, Frazzoli C, Orisakwe OE. Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(18):18032-52.
- Anderson D, Basaran N, Dobrzyńska MM, Basaran AA, Yu TW. Modulating effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1997;17(2):45-58.
- Anttila A, Sallmén M. Effects of parental occupational exposure to lead and other metals on spontaneous abortion. *J Occup Environ Med*. 1995;37(8):915-21.
- Anyanwu BO, Orish CN, Ezejiofor AN, Nwaogazie IL, Orisakwe OE. Neuroprotective effect of *Costus afer* on low dose heavy metal mixture (lead, cadmium and mercury) induced neurotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory activities. *Toxicol Rep*. 2020;7:1032-8.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99.

Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J*. 2004;45:776-88.

Attri J, Dhawan V, Mahmood S, Pandhi P, Parwana HK, Nath R. Effect of vitamin C supplementation on oxidative DNA damage in an experimental model of lead-induced hypertension. *Ann Nutr Metab*. 2003;47:294-301.

Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021;12:643972.

Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021;12:643972.

Barja G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milano)*. 2000;12(5):342-55.

Barkaoui T, Hamimed S, Bellamine H, Bankaji I, Sleimi N, Landoulsi A. Alleviated Actions of Plantago albicans Extract on Lead Acetate-Produced Hepatic Damage in Rats Through Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities. *J Med Food*. 2020;23(11):1201-15.

Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Giordano G, Cucci MA, Graf M, Gentile F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(8):102.

Barry PS. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br J Ind Med*. 1975;32(2):119-39.

Baxter GP, Grover FL, Thorvaldson T. A Revision of the Atomic Weight of Lead: The Analysis of Lead Bromide and Chloride. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1915;1(2):71-7.

Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803.

Bergdahl IA, Skerfving S. Biomonitoring of lead exposure-alternatives to blood. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71:1235-43.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-6.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-6.

Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-8.

Bhat TA, Nambiar D, Pal A, Agarwal R, Singh RP. Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo--implications for angioprevention. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):385-93.

Bhattacharjee A, Kulkarni VH, Chakraborty M, Habbu PV, Ray A. Ellagic acid restored lead-induced nephrotoxicity by anti-inflammatory, anti-apoptotic and free radical scavenging activities. *Heliyon*. 2021;7(1):e05921.

Bjørklund G, Crisponi G, Nurchi VM, Cappai R, Buha Djordjevic A, Aaseth J. A Review

on Coordination Properties of Thiol-Containing Chelating Agents Towards Mercury, Cadmium, and Lead. *Molecules*. 2019;24(18):3247.

Bjørklund G, Crisponi G, Nurchi VM, Cappai R, Buha Djordjevic A, Aaseth J. A Review on Coordination Properties of Thiol-Containing Chelating Agents Towards Mercury, Cadmium, and Lead. *Molecules*. 2019;24(18):3247.

Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev*. 2005;10(1):14-23.

Bonina F, Puglia C, Ventura D, Aquino R, Tortora S, Sacchi A, Saija A, Tomaino A, Pellegrino ML, de Caprariis P. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L buds. *J Cosmet Sci*. 2002;53(6):321-35.

Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1990;8:281-91.

Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(4):479-84.

Buha A, Baralić K, Djukic-Cosic D, Bulat Z, Tinkov A, Panieri E, Saso L. The Role of Toxic Metals and Metalloids in Nrf2 Signaling. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5):630.

Burdo J, Schubert D, Maher P. Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical cultures. *Brain Res*. 2008;1189:12-22.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(4):298-344.

Calderon-Salinas JV, Hernandez-Luna C, Maldonado M, Saenz DR. Mechanisms of the toxic effect of lead. I. Free lead in erythrocyte. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 1993;3:153-64.

Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(5):441-9.

Cao Y, Skaug MA, Andersen O, Aaseth J. Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;31:188-92.

Carvalho AN, Lim JL, Nijland PG, Witte ME, Van Horssen J. Glutathione in multiple sclerosis: more than just an antioxidant? *Mult Scler*. 2014;20(11):1425-31.

Cave WT Jr. Dietary n-3 (omega-3) polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J*. 1991;5(8):2160-6.

Çaylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(4-5):289-94.

Çaylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60:289-94.

Çaylak E, Halifeoglu İ. Sülfür içeren antioksidanların kurşuna maruz kalmış ratlarda karaciğer, böbrek ve beyin MDA ve katalaz düzeylerine antioksidan etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2007;27:1-8.

Çaylak E. Çocuklarda kurşun zehirlenmesi, oksidatif stres ve tiyol bileşiklerin

antioksidan etkisi. *Çocuk Derg.* 2010;10(1):13-23.

Chandran L, Cataldo R. Lead poisoning: basics and new developments. *Pediatr Rev.* 2010; 31: 399-405.

Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, Lo PN: Effects of beta carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem.* 2002; 13: 427-434.

Cheema AI, Liu G, Yousaf B, Abbas Q, Zhou H. A comprehensive review of biogeochemical distribution and fractionation of lead isotopes for source tracing in distinct interactive environmental compartments. *Sci Total Environ.* 2020;719:135658.

Chen W, Li Y, Li J, Han Q, Ye L, Li A. Myricetin affords protection against peroxynitrite-mediated DNA damage and hydroxyl radical formation. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2439-44.

Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih CM, Yang LL. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol.* 2002;76(5-6):351-9.

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem.* 1992;267(1):166-72.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000;33:S99-S108.

Chia SE, Zhou HJ, Yap E, Tham MT, Dong NV, Hong Tu NT, Chia KS. Association of renal function and delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism among Vietnamese and Singapore workers exposed to inorganic lead. *Occup Environ Med.* 2006;63(3):180-6.

Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y. Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku J Exp Med.* 1996;178:49-62.

Cohen J. Adjunctive therapy in sepsis: a critical analysis of the clinical trial programme. *Br Med Bull.* 1999;55(1):212-25.

Constantin RP, Constantin J, Pagadigorria CL, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, de Castro CV, Yamamoto NS. Prooxidant activity of fisetin: effects on energy metabolism in the rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011;25(2):117-26.

Cory-Slechta DA, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT. Lead-induced changes in NMDA receptor complex binding: correlations with learning accuracy and with sensitivity to learning impairments caused by MK-801 and NMDA administration. *Behav Brain Res.* 1997;85(2):161-74.

Cory-Slechta DA. Relationships between Pb-induced changes in neurotransmitter system function and behavioral toxicity. *Neurotoxicology.* 1997;18(3):673-88.

Costa CA, Trivelato GC, Pinto AMP, Bechara EJ. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed

workers. Clin Chem. 1997;43:1196-202.

Costa LG, Cole TB, Garrick JM, Marsillach J, Furlong CE. Metals and Paraoxonases. Adv Neurobiol. 2017;18:85-111.

Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. Clin Chim Acta. 2005;352(1-2):37-47.

Crespy V, Morand C, Besson C, Cotellet N, Vézin H, Demigné C, Rémésy C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;284(6):G980-8.

Dambros M, de Jongh R, van Koeveeringe GA, Bast A, van Kerrebroeck PE. Galangin protects pig detrusor nerves from repetitive field stimulation and anoxia/glucopenia injury. Urology. 2005;66(6):1327-31.

Davis JM. Risk assessment of the developmental neurotoxicity of lead. Neurotoxicology. 1990;11(2):285-91.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2005;15(4):316-28.

Dogan A, Dalar A, Sadullahoglu C, Battal A, Uzun Y, Celik I. Investigation of the protective effects of horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. Mol Biol Rep. 2018;45(5):787-97.

Donaldson WE. Interaction of dietary lead with fish oil and antioxidant in chicks. Biol Trace Elem Res. 1991;31:215-22.

Doronicheva N, Yasui H, Sakurai H. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. Biol Pharm Bull. 2007;30(2):213-7.

Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. Mutat Res. 1997;393(3):223-31.

Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. Am J Hum Genet. 1983;35(2):214-27.

Edenharder R, Tang X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. Food Chem Toxicol. 1997;35(3-4):357-72.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. Food Chem Toxicol. 2004;42(10):1563-71.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem. 2001;1(6):529-39.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I:

mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001;1:529-39.

Ercal N, Neal R, Treeratphan P, Lutz PM, Hammond TC, Dennery PA, Spitz DR. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2000;39(2):251-6.

Erçin U, Bilgihan A, Erkan AF, Yücel H. Koroner arter hastalığında yeni parametreler: Oksidatif stres belirteçleri. *Türk Klin Biyokim Derg*. 2019;17:48-55.

Eshginia S, Marjani A. Effect of vitamin C on the erythrocyte antioxidant enzymes in intoxicated-lead rat offsprings. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(6):1078-81.

Fan Y, Zhao X, Yu J, Xie J, Li C, Liu D, Tang C, Wang C. Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol*. 2020;58:126443.

Fanning D. A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch Environ Health*. 1988;43(3):247-51.

Fioresi M, Furieri LB, Simões MR, Ribeiro RF Jr, Meira EF, Fernandes AA, Stefanon I, Vassallo DV. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(2):178-85.

Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol*. 2012;5:47-58.

Flora GJ, Seth PK. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice. *Alcohol*. 1999;18:103-8.

Flora SJ, Pande M, Kannan GM, Mehta A. Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50:543-51.

Forster MJ, Sohal BH, Sohal RS. Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxidative damage. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(11):B522-9.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37.

Francis AR, Shetty TK, Bhattacharya RK. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*. 1989;10(10):1953-5.

Fu H, Boffetta P. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup Environ Med*. 1995;52(2):73-81.

Fu Z, Xi S. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol Mech Methods*. 2020;30(3):167-76.

Furst A. Can nutrition affect chemical toxicity? *Int J Toxicol*. 2002;21:419-24.

Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(11):3782.

Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(3):C254-C262.

- Giri CP, West MH, Smulson M. Nuclear protein modification and chromatin substructure. 1. Differential poly-(adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal proteins in nuclei versus isolated nucleosomes. *Biochemistry*. 1978;17(17):3495-500.
- Goh FY, Upton N, Guan S, Cheng C, Shanmugam MK, Sethi G, Leung BP, Wong WS. Fisetin, a bioactive flavonol, attenuates allergic airway inflammation through negative regulation of NF- κ B. *Eur J Pharmacol*. 2012;15:109-16.
- Goldberg DM, Spooner RJ, Ellis G, Ward AM. Biochemical features of intrahepatic cholestasis. *Am J Clin Pathol*. 1979;71(5):557-63.
- Gonick HC. Lead-binding proteins: a review. *J Toxicol*. 2011;686050.
- Gottesfeld P, Pokhrel AK. Review: Lead exposure in battery manufacturing and recycling in developing countries and among children in nearby communities. *J Occup Environ Hyg*. 2011;8:520-32.
- Gracia RC, Snodgrass WR. Lead toxicity and chelation therapy. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64:45-53.
- Gracia RC, Snodgrass WR. Lead toxicity and chelation therapy. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64:45-53.
- Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
- Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J*. 1972;130(1):141-51.
- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia C. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nov*. 2009;32:169-74.
- Guengerich FP. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 1988;48(11):2946-54.
- Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4405-9.
- Gur M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Aslan M, Ozdogru I, Erel O. Paraoxonase and arylesterase activities in patients with cardiac syndrome X, and their relationship with oxidative stress markers. *Coron Artery Dis*. 2007;18(2):89-95.
- Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2000;29:927-45.
- Gürer H, Özgüneş H, Neal R, Spitz RD, Erçal N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicol*. 1998;128(3):181-9.
- Gürer H, Özgüneş H, Saygın E, Ercal N. Antioxidant effect of taurine against lead-Induced oxidative stress. *Environ Contam Toxicol*. 2001;41:397-402.
- Gürer-Orhan H, Sabir HU, Özgüneş H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 2004;195:147-54.

- Haddad AQ, Fleshner N, Nelson C, Saour B, Musquera M, Venkateswaran V, Klotz L. Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2,2'-dihydroxychalcone and fisetin in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer*. 2010;62(5):668-81.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1147-50.
- Hamed EA, Meki AR, Abd El-Mottaleb NA. Protective effect of green tea on lead-induced oxidative damage in rat's blood and brain tissue homogenates. *J Physiol Biochem*. 2010;66(2):143-51.
- Hasle H, Rose C. Shark liver oil (alkoxyglycerol) and cancer treatment. *Ugeskr Laeger*. 1991;153:343-6.
- Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharm Biol*. 2013;51(9):1104-9.
- Heo MY, Sohn SJ, Au WW. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res*. 2001;488(2):135-50.
- Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJ. Damage to rat liver mitochondria promoted by d-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphiria and lead poisoning. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1056:57-63.
- Hirsch HV, Possidente D, Possidente B. Pb²⁺: an endocrine disruptor in *Drosophila*? *Physiol Behav*. 2010;99:254-9.
- Holtzman D, DeVries C, Nguyen H, Olson J, Bensch K. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. *Neurotoxicology*. 1984;5(3):97-124.
- Hossain S, Bhowmick S, Islam S, Rozario L, Jahan S, Hassan M, Sarkar M, Choudhury BK, Ahmed S, Shahjalal H. Oral administration of ganoderma lucidum to lead-exposed rats protects erythrocytes against hemolysis: Implicates to anti-anemia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:1-8.
- Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. 2002;180:33-44.
- Hu WY, Wu SH, Wang LL, Wang GI, Fan H, Liu ZM. A toxicological and epidemiological study on reproductive functions of male workers exposed to lead. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1992;36(1):25-30.
- Husain K, Whitworth C, Rybak LP. Time response of carboplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004;50(3):291-300.
- Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Slikker W Jr, Ali SF. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:366-80.
- Imamura Y, Migita T, Uriu Y, Otagiri M, Okawara T. Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase. *J Biochem*. 2000;127(4):653-8.
- Ithayaraja CM. Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011;9:104-15.

- Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(1):7-11.
- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003;68:167-82.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283:65-87.
- Jung WW. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. *Int J Mol Med*. 2014;33(5):1327-34.
- Kabel AM. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World J Nutr Heal*. 2014;2:35-8.
- Kampkötter A, Gombitang Nkwonkam C, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol*. 2007;81(12):849-58.
- Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Bodhankar SL. The ameliorative effect of fisetin, a bioflavonoid, on ethanol-induced and pylorus ligation-induced gastric ulcer in rats. *Int J Green Pharm* 2011;5:236-43.
- Kasperczyk S, Kasperczyk A, Ostalowska A, Dziwisz M, Birkner E. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res*. 2004;102:61-72.
- Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji*. 13. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012.
- Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr*. 2005;2(2):38-44.
- Kerr ME, Bender CM, Monti EJ. An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung*. 1996;25(3):200-9.
- Keshet R, Erez A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech*. 2018;11(8):dmm033332.
- Kılıç T, Yonar ME. Malathionun pullu sazan (*Cyprinus carpio*)’da paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerine etkisinin araştırılması. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*. 2017;31(2):87-92.
- Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;54:226-31.
- Kim JY, Jeon YK, Jeon W, Nam MJ. Fisetin induces apoptosis in Huh-7 cells via downregulation of BIRC8 and Bcl2L2. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(8-9):2259-64.
- Kim W, Yang HJ, Youn H, Yun YJ, Seong KM, Youn B. Myricetin inhibits Akt survival signaling and induces Bad-mediated apoptosis in a low dose ultraviolet (UV)-B-irradiated HaCaT human immortalized keratinocytes. *J Radiat Res*. 2010;51(3):285-96.
- Komousani TA, Moselhy SS. Modulation of lead biohazards using a combination of epicatechin and lycopene in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2011;30(10):1674-81.
- Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin

resonance. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):61-6.

Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1174-94.

Krigman MR. Neuropathology of heavy metal intoxication. *Environ Health Perspect*. 1978;26:117-20.

Kroese LJ, Scheffer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(11):452.

Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, Gur C, Kandemir FM, Bengu AS, Ayna A, Caglayan C, Dortbudak MB. Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a Biochemical and Histopathological Approach. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(4):1501-14.

Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(2):154-72.

Kumar A, Scott Clark C. Lead loadings in household dust in Delhi, India. *Indoor Air*. 2009;19:414-20.

Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kükner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 2005;75:71-80.

Lachant NA, Tomoda A, Tanaka KR. Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood*. 1984;63:518-24.

Lai Y, Xi Y, Shao M, Cui X, Wei X, Li L, Wang Y, Fan H. Myricetin reduces the reproductive toxicity of cyclophosphamide in male mice. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2020;49(5):790-4.

Lamas GA, Navas-Acien A, Mark DB, Lee KL. Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:2411-8.

Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 1991;28:83-97.

Lee MK, Cho SY, Kim DJ, Jang JY, Shin KH, Park SA, Park EM, Lee JS, Choi MS, Lee JS, Kim MJ. Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex water extract alters heme biosynthesis and erythrocyte antioxidant defense system in lead administered rats. *J Med Food*. 2005;8(1):86-92.

Lee S, Kim YJ, Kwon S, Lee Y, Choi SY, Park J, Kwon HJ. Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep*. 2009;42(5):265-70.

Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect*. 1993;101(7):598-616.

Levander OA, Morris VC, Ferretti RJ. Filterability of erythrocytes from vitamin E deficient lead-poisoned rats. *J Nutr*. 1977;107:363-72.

Levin SM, Goldberg M. Clinical evaluation and management of lead-exposed

construction workers. *Am J Ind Med.* 2000;37(1):23-43.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.

Li C, Gao X, Li S, Bundschuh J. A review of the distribution, sources, genesis, and environmental concerns of salinity in groundwater. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(33):41157-41174.

Li J, Cheng Y, Qu W, Sun Y, Wang Z, Wang H, Tian B. Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108(2):84-93.

Li Q, Hu X, Bai Y, Alattar M, Ma D, Cao Y, Hao Y, Wang L, Jiang C. The oxidative damage and inflammatory response induced by lead sulfide nanoparticles in rat lung. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:213-7.

Liu CM, Zheng YL, Lu J, Zhang ZF, Fan SH, Wu DM, Ma JQ. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;29(2):158-66.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26.

Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. The Potential Role of Dietary Platelet-Activating Factor Inhibitors in Cancer Prevention and Treatment. *Adv Nutr.* 2019;10(1):148-64.

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995;45(8):1594-601.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Lu X, Jung Ji, Cho HJ, Lim DY, Lee HS, Chun HS, Kwon DY, Park JH. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr.* 2005;135(12):2884-90.

Maden M, Aslan V. Deneysel gentamisin nefrotoksisitesinde üriner enzim aktivitelerinin önemi. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences.* 1999;23:29-42.

Maher P, Dargusch R, Ehren JL, Okada S, Sharma K, Schubert D. Fisetin lowers methylglyoxal dependent protein glycation and limits the complications of diabetes. *PLoS One.* 2011;6(6):e21226.

Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim Pol.* 2001;48(3):687-98.

Markesbery WR, Lovell MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2007;64(7):954-6.

Marsden PA. Increased body lead burden--cause or consequence of chronic renal insufficiency? *N Engl J Med.* 2003;348(4):345-7.

Mathew BB, Jaishankar M, Biju VG, Krishnamurthy Nideghatta Beeregowda. Role of

Bioadsorbents in Reducing Toxic Metals. *J Toxicol*. 2016;2016:4369604.

Matovic V, Buha A, Đukic-Cosic D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol*. 2015;78:130-40.

Mazandaran AA, Khodarahmi P. The protective role of Coenzyme Q10 in metallothionein-3 expression in liver and kidney upon rats' exposure to lead acetate. *Mol Biol Rep*. 2021;48(4):3107-15.

McGowan C. Influence of vitamin B6 status on aspects of lead poisoning in rats. *Toxicol Lett*. 1989;47:87-93.

Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Lead (Pb) Exposure Enhances Expression of Factors Associated with Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1813.

Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem*. 2001;49(6):3106-12.

Miller GD, Massaro TF, Granlund RW, Massaro EJ. Tissue distribution of lead in the neonatal rat exposed to multiple doses of lead acetate. *J Toxicol Environ Health*. 1983;11:121-8.

Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 2002;36(11):1199-208.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.

Mirkov I, Stojković D, Aleksandrov AP, Ivanov M, Kostić M, Glamočlija J, Soković M. Plant Extracts and Isolated Compounds Reduce Parameters of Oxidative Stress Induced by Heavy Metals: An up-to-Date Review on Animal Studies. *Curr Pharm Des*. 2020;26(16):1799-815.

Mishra RK, Sharma V. Biotic Strategies for Toxic Heavy Metal Decontamination. *Recent Pat Biotechnol*. 2017;11(3):218-28.

Mitre R, Etienne M, Martinais S, Salmon H, Allaume P, Legrand P, Legrand AB. Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation. *Br J Nutr*. 2005;94(5):753-62.

Mokhtari M, Zanoori M. The effects of lead acetate on sexual behavior and the level of testosterone in adult male rats. *Int J Fertil Steril*. 2011;5(1):13-20.

Monteiro HP, Abdalla DS, Arcuri AS, Bechara EJ. Oxygen toxicity related to exposure to lead. *Clin Chem*. 1985;31:1673-6.

Morales P, Haza AI. Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J Appl Toxicol*. 2012;32(12):986-93.

Morel G, Ban M, Bonnet P, Zissu D, Brondeau MT. Effect of beta-naphthoflavone and phenobarbital on the nephrotoxicity of chlorotrifluoroethylene and 1,1-dichloro-2,2-difluoroethylene in the rat. *J Appl Toxicol*. 2005;25(2):153-65.

Morisi G, Menditto A, Spagnolo A, Patriarca M, Menotti A. Association of selected

social, environmental and constitutional factors to blood lead levels in men aged 55-75 years. *Sci Total Environ.* 1992;126(3):209-29.

Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, Gray D, Saviola B, Venketaraman V. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3329-49.

Mousa HM, Al-Qarawi AA, Ali BH, Abdel Rahman HA, ElMougy SA. Effect of lead exposure on the erythrocytic antioxidant levels in goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2002;49:531-4.

Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res.* 2007;126:518- 27.

Mulware SJ. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *Biotech.* 2013;3:85-96.

Muntner P, He J, Vupputuri S, Coresh J, Batuman V. Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. *Kidney Int.* 2003;63(3):1044-50.

Myara I, Pico I, Védie B, Moatti N. A method to screen for the antioxidant effect of compounds on low-density lipoprotein (LDL): illustration with flavonoids. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1993;30(2):69-73.

Needleman H. Lead poisoning. *Annu Rev Med.* 2004;55:209-22.

Niering P, Michels G, Wätjen W, Ohler S, Steffan B, Chovolou Y, Kampkötter A, Proksch P, Kahl R. Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: implication of oxidative stress and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;209(2):114-22.

Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015;5:27986-8006.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-312.

Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries. *Rev Environ Health.* 2019;34(1):25-34.

O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(2):22-6.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.

Oliveira EJ, Watson DG. In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes. *FEBS Lett.* 2000;471(1):1-6.

Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997;29(2):121-6.

Opal SM, Huber CE. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. *Crit Care.* 2002;6(2):125-36.

Osman K, Schütz A, Akesson B, Maciag A, Vahter M. Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice, Poland. *Clin Biochem.*

1998;31(8):657-65.

Othman AI, El Missiry MA. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 1998;12:345-9.

Ozcan F, Ozmen A, Akkaya B, Aliciguzel Y, Aslan M. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Med.* 2012;12(4):265-72.

Özyürek M, Bektaşoğlu B, Güçlü K, Apak R. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta.* 2009 Mar 16;636(1):42-50.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:227-50.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.

Paithankar JG, Saini S, Dwivedi S, Sharma A, Chowdhuri DK. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere.* 2021;262:128350.

Pan L, Wang Y, Ma J, Hu Y, Su B, Fang G, Wang L, Xiang B. A review of heavy metal pollution levels and health risk assessment of urban soils in Chinese cities. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(2):1055-69.

Panchal R, Singh A, Diwan H. Does circular economy performance lead to sustainable development? - A systematic literature review. *J Environ Manage.* 2021;293:112811.

Papanikolaou NC, Hatzidaki EG, Belivanis S, Tzanakakis GN, Tsatsakis AM. Lead toxicity update. A brief review. *Med Sci Monit.* 2005;11(10):329-36.

Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.* 2002;7:22-44.

Pari L, Murugavel P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology.* 2007;234(1-2):44-50.

Patil AJ, Bhagwat VR, Patil JA, Dongre NN, Ambekar JG, Jailkhani R, Das KK. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. *Int J Environ Res Public Health.* 2006;3(4):329-37.

Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology.* 2001;162:81-8.

Patra RC, Swarup D. Effect of lead on erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxide level and thiol groups in calves. *Res Vet Sci.* 2000;68(1):71-4.

Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev.* 2006;11(2):114-27.

Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006;11(1):2-22.

Patrick L. Lead Toxicity, A Review of the literature. Part I: Exposure, evaluation, and

treatment. *Altern Med Rev*. 2006;11:2-22.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11-26.

Philip AT, Gerson B. Lead poisoning--Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics. *Clin Lab Med*. 1994;14(2):423-44.

Philip AT, Gerson B. Lead poisoning--Part II. Effects and assay. *Clin Lab Med*. 1994;14(3):651-70.

Phillips PA, Sangwan V, Borja-Cacho D, Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Cancer Lett*. 2011;308(2):181-8.

Pollock CA, Ibels LS. Lead nephropathy--a preventable cause of renal failure. *Int J Artif Organs*. 1988;11(2):75-8.

Prasath GS, Subramanian SP. Modulatory effects of fisetin, a bioflavonoid, on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in hepatic and renal tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(3):492-6.

Pugliese PT, Jordan K, Cederberg H, Brohult J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *J Altern Complement Med*. 1998;4(1):87-99.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.

Rahman Z, Singh VP. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ Monit Assess*. 2019;191(7):419.

Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2007;18(1):109-15.

Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):157-84.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986-1000.

Rogers LE, Battles ND, Reimold EW, Sartain, P. Erythrocyte enzymes in experimental lead poisoning. *Arch Toxicol*. 1971;28:202-7.

Ros C, Mwanri L. Lead exposure, interactions and toxicity: Food for thought. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2003;12:388-95.

Rosin A. The long-term consequences of exposure to lead. *Isr Med Assoc J*. 2009;11:689-994.

Rusyniak DE, Arroyo A, Acciani J, et al. Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *EXS*. 2010;100:365-96.

Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health*. 2000;38:127-42.

- Sall ML, Diaw AKD, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(24):29927-42.
- Sanborn MD, Abelsohn A, Campbell M, Weir E. Identifying and managing adverse environmental health effects: 3. Lead exposure. *CMAJ*. 2002;166:1287-92.
- Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem*. 2012;19(28):4850-60.
- Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Rev Environ Health*. 2009;24:15-45.
- Santa Maria MP, Hill BD, Kline J. Lead (Pb) neurotoxicology and cognition. *Appl Neuropsychol Child*. 2019;8(3):272-93.
- Sarkar A, Sengupta D, Mandal S, Sen G, Dutta Chowdhury K, Chandra Sadhukhan G. Treatment with garlic restores membrane thiol content and ameliorates lead induced early death of erythrocytes in mice. *Environ Toxicol*. 2015;30(4):396-410.
- Scammell MK, Sennett CM, Petropoulos ZE, Kamal J, Kaufman JS. Environmental and Occupational Exposures in Kidney Disease. *Semin Nephrol*. 2019;39(3):230-243.
- Schaumberg DA, Mendes F, Balaram M, Dana MR, Sparrow D, Hu H. Accumulated lead exposure and risk of age-related cataract in men. *JAMA*. 2004;292(22):2750-4.
- Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):335-42.
- Shafiq-Ur-Rehman S. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett*. 1984;21:333-7.
- Shahid M, Pourrut B, Dumat C, Nadeem M, Aslam M, Pinelli E. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2014;232:1-44.
- Shakir SK, Azizullah A, Murad W, Daud MK, Nabeela F, Rahman H, Ur Rehman S, Häder DP. Toxic Metal Pollution in Pakistan and Its Possible Risks to Public Health. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2017;242:1-60.
- Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(3-4):211-6.
- Silva ID, Rodrigues A, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J. Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: the role of cytochromes P450. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1996;16(4):229-41.
- Singh N, Kumar A, Gupta VK, Sharma B. Biochemical and Molecular Bases of Lead-Induced Toxicity in Mammalian Systems and Possible Mitigations. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(10):1009-21.
- Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1031:195-203.
- Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi R. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr*

Biochem. 2004;15:18-23.

Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect.* 1995;103(3):248-53.

So FV, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* 1997;112(2):127-33.

Sokas RK, Simmens S, Sophar K, Welch LS, Liziewski T. Lead levels in Maryland construction workers. *Am J Ind Med.* 1997;31(2):188-94.

Song EJ, Gordon-Thomson C, Cole L, Stern H, Halliday GM, Damian DL, Reeve VE, Mason RS. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ reduces several types of UV-induced DNA damage and contributes to photoprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;136:131-8.

Sözmen EY, Mackness B, Sözmen B, Durrington P, Girgin FK, Aslan L, Mackness M. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum Exp Toxicol.* 2002;21(5):247-52.

Struzyńska L, Rafałowska U. The effect of lead on dopamine, GABA and histidine spontaneous and KCl-dependent releases from rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1994;54(3):201-7. PMID: 7817835.

Sun CC, Wong TT, Hwang YH, Chao KY, Jee SH, Wang JD. Percutaneous absorption of inorganic lead compounds. *AIHA J (Fairfax, Va).* 2002;63(5):641-6.

Sun F, Zheng XY, Ye J, Wu TT, Wang JL, Chen W. Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo. *Nutr Cancer.* 2012;64(4):599-606.

Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.

Szostak WB, Szostak Wegierek D. Health properties of shark oil. *Przegl Lekarski.* 2006;63:223-6.

Tandon SK, Flora SJ, Singh S. Influence of pyridoxine (vitamin B₆) on lead intoxication in rats. *Ind Health.* 1987;25:93-6.

Tomar A, Vasisth S, Khan SI, Malik S, Nag TC, Arya DS, Bhatia J. Galangin ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity in vivo by modulation of oxidative stress, apoptosis and inflammation through interplay of MAPK signaling cascade. *Phytomedicine.* 2017;34:154-61.

Touil YS, Seguin J, Scherman D, Chabot GG. Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(2):445-55.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-39.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell*

Biol. 2007;39(1):44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.

van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:33-42.

Vaziri ND, Sica DA. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep.* 2004;6(4):314-20.

Vazquez L, Fornari T, Senoran FJ, Reglero G, Torres CF. Supercritical carbondioxide fractionation of non-esterined alkoxy glycerols obtained from shark liver oil. *Przegl Lekarski.* 2008;56:1078-83.

Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(24):3141-58.

Wang L, Lin S, Li Z, Yang D, Wang Z. Protective effects of puerarin on experimental chronic lead nephrotoxicity in immature female rats. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(2):172-85.

Wang QM, Wang GL, Ma ZG. Protective effects of myricetin on chronic stress-induced cognitive deficits. *Neuroreport.* 2016;27(9):652-8.

Wang Z, Yan Y, Yu X, Li W, Li B, Qin C. Protective effects of chitosan and its water-soluble derivatives against lead-induced oxidative stress in mice. *Int J Biol Macromol.* 2016;83:442-9.

White CR, Anantharamaiah GM. Cholesterol reduction and macrophage function: role of paraoxonases. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(5):397-402.

Willers S, Schütz A, Attewell R, Skerfving S. Relation between lead and cadmium in blood and the involuntary smoking of children. *Scand J Work Environ Health.* 1988;14(6):385-9.

Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 2002;5(3):218-23.

Woźniak K, Blasiak J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res.* 2003;535(2):127-39.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004;339(1-2):1-9.

Wu S, Zheng Y, Li X, Han Y, Qu M, Ni Z, Tang F, Liu Y. Risk assessment and prediction for toxic heavy metals in chestnut and growth soil from China. *J Sci Food Agric.* 2019;99(8):4114-22.

Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(9):8244-59.

Yiin SJ, Lin TH. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol Trace Elem Res.* 1995;50:167-72.

Ying TH, Yang SF, Tsai SJ, Hsieh SC, Huang YC, Bau DT, Hsieh YH. Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8-/caspase-3-dependent pathway. Arch Toxicol. 2012;86(2):263-73.

Yu Y, Cui Y, Niedernhofer LJ, Wang Y. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. Chem Res Toxicol. 2016;29(12):2008-39.

Zelus C, Fox A, Calciano A, Faridian BS, Nogaj LA, Moffet DA. Myricetin Inhibits Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Aggregation and Rescues Living Mammalian Cells from IAPP Toxicity. Open Biochem J. 2012;6:66-70.



Ek 2. Tez Orijinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



YÜKSEK LİSANS TEZİ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Kurşun Asetat Maruziyeti Sonucu Oluşan Nefrotoksisiteye Karşı Mirisetin, Kaemferol, Fisetin ve Galanginin Koruyucu Rolünün Araştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
				67
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
Turnitin		12/07/2021	% 9	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Y.L. Öğrencisi Ayhan YİĞİT				

Öğrencinin Adı Soyadı	Ayhan YİĞİT
Anabilim Dalı	Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı
Öğrenci No	19930006008
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Dr. Öğretim Üyesi Mehmet BERKÖZ (Unvan, Ad Soyad, İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)
--	--