

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Kronik Alüminyum İntoksikasyonu Oluşturulan Sıçanlarda Doğal Balın
Beyinde Oksidatif Stres Üzerine ve Hipokampal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Proje No: TSA- 2013- 4209

N. Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Farmakoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı

Soner BİTİKTAŞ

Arş.Gör. Şehrazat KAVRAAL

Prof.Dr. Eser KILIÇ

Büşra KARACA

Arş.Gör. Mehmet KARA

Arş.Gör. Özlem ERÇAL

Öğr.Gör. Ahmet İNAL

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Farmakoloji Anabilim Dalı

Nisan 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan değerli danışmanım Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY' a, deneylerdeki yardımlarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr. Mehmet KARA, Dr. Özlem ERÇAL ve yüksek lisans öğrencisi Ecz. Kenan ÇALIŞKAN' a, davranış deneylerimde ve LTP deneyinde yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cem SÜER ve doktora öğrencisi Soner BİTİKTAŞ' a, biyokimya deneylerimde yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Eser KILIÇ' a, biyoistatistiksel değerlendirmede yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr. Serkan YILDIZ, Dr. Hasan DURMUŞ ve Dr. Sabri KARACA' ya ve Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya DEKAM' da yardımcı olan A. Celil ÜNVER ve Hasan YÜCE' ye teşekkür ederim.

Bu araştırmayı (TSA-2013-4209) destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Diyet ile maruz kalınan alüminyumun Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğuna dair bulgular olsa da aksi yönde bulgular ortaya koyan çalışmalar az değildir. Sunulan bu çalışmada, bir insanın yaklaşık olarak bir ömür boyu diyet ve içme suyu ile maruz kalabileceği miktarda ve kronik olarak uygulanan alüminyumun oksidatif stres ve hipokampal fonksiyonlar üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada Wistar Albino türü dişi yetişkin sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 5 gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubudur. İkinci gruba sadece alüminyum klorür, üçüncü gruba alüminyum klorür ve doğal bal (0,1 g/kg), dördüncü gruba alüminyum klorür ve doğal bal (1 g/kg) ve beşinci gruba alüminyum klorür ve doğal bal (10 g/kg) uygulanmıştır. Üç ayın sonunda deney hayvanları sakrifiye edilerek beyinde oksidatif stres parametrelerine bakılmıştır. Ayrıca deney hayvanları sakrifiye edilmeden önce hipokampal LTP (long term potentiation, uzun dönemli güçlendirme) ölçümü yapılmıştır.

Oksidatif stres parametreleri (Total antioksidan status (TAS), total oksidan status (TOS), thiol seviyesi ve ksantin oksidaz enzim aktivitesi) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diğer yandan LTP parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bozulmalar tesbit edilmiştir. Ama doğal bal uygulaması bu bozulmaları önleyememiştir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmanın bulguları alüminyumun Alzheimer hastalığına yol açan faktörlerden biri olduğu yönündeki görüşleri desteklemekte, ama diyet ve içme suyu ile maruz kalınan alüminyumun önemli bir derecede nörolojik hasara yol açamayacağını düşündürmektedir.

ABSTRACT

Although there are evidences indicating that dietary exposure to aluminium is associated with Alzheimer' s disease, the studies which report opposite findings are not less. In this study, effect of aluminium by chronic administration, in an amount of a approximately lifetime exposure of a human being with diet and tap water on oxidative stress of brain and hippocampal function was investigated.

In this study, Wistar Albino female adult rats were used. The rats were divided into five groups. The first group is the control group. Only aluminium chloride was administered to the second group, aluminum chloride and natural honey (0.1 g / kg) were administered to the third group, aluminum chloride and natural honey (1 g / kg) were administered to the fourth group and aluminum chloride and natural honey (10 g / kg) were administered to the fifth group.

At the end of three months, rats were sacrificed and brain oxidative stress parameters were measured. In addition, prior to sacrificiation, hippocampal LTP (long term potentiation) measurement was made.

There were no statistically significant difference among groups in terms of oxidative stress parameters (total antioxidant status (TAS) , total oxidant status (TOS), thiol levels, and xanthine oxidase enzyme activity). On the other hand, statistically significant deteriorations in LTP parameters were found. However, application of natural honey did not prevent the these deteriorations. As a result, findings of the current study support the opionions that aluminium is one of the cause of Alzheimer' s disease. However, it seems that aluminium that is exposed with diet and tap water does not cause a significant degree of neurological damage.

İÇİNDEKİLER

Kronik Alüminyum İntoksikasyonu Oluşturulan Sıçanlarda Doğal Balın Beinde Oksidatif Stres Üzerine ve Hipokampal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı	2
2.2. Alüminyum	2
2.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres.....	7
2.4. Bal.....	9
3. MATERYAL VE METOD.....	12
3. 1. MATERYAL.....	12
3. 2. METOD.....	18
3. 2. 1. Elektrofizyolojik Kayıt.....	18
3. 2. 2. Biyokimya Tayinleri.....	20
3. 2. 3. Alüminyum Düzeylerinin Ölçümü.....	23
4. BULGULAR.....	24
4. 1. LTP Sonuçları.....	24
4. 2. Biyokimya Sonuçları.....	26
4. 3. Alüminyum Düzeyi Sonuçları.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR	

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yirminci yüzyılda, bilim ve teknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak dünya nüfusundaki artış hızlanmış, 1900 yılında 1,6 milyar olan dünya nüfusu, 1950’de 2,5 milyara ulaşmıştır. Birleşmiş Milletler’in istatistiklerine göre 2050 yılında Türkiye nüfusu yaklaşık 100 milyon olacaktır (1,2). Bu arada ortalama yaşam süresi uzamıştır. Yaşam süresinin uzaması daha çok sayıda bireyin nörodejeneratif hastalıklar yönünden araştırılmasına yol açmıştır. Geriatrik olgulardaki ölümlerin sebepleri arasında nörodejeneratif hastalıklar ve demans ön sıralarda yer almaktadır. Yapılan çalışmalar kognitif bozuklukların yaşam kalitesini düşürdüğü ve mortaliteye zemin hazırlamakta olduğunu göstermektedir. Ekonomik olarak demanslı bir hastanın bakımı hem aileye hem de devlet bütçesine ağır bir yük getirmektedir (3).

Türkiye’de 65 yaş üstü nüfus 2000 verilerine göre %5.4’ dür ve ülkemizde yaklaşık 4 milyon 65 yaş üstü yaşlının olduğu bilinmektedir. Demansa yol açan bir durum olan Alzheimer Hastalığı (AH) 65 yaş üstü kişilerde %10-15 sıklıkla görülmektedir. Ülkemizde yaklaşık 300.000 Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir.

AH risk faktörlerinin ortaya konması üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda artmıştır. Bu risk faktörlerinden birisi de alüminyum nörotoksisitesidir. Alüminyum gibi bazı metallerin AH ile ilişkili olduğuna dair bulgular vardır (4, 5, 6, 7). Deney hayvanlarına alüminyum uygulanması Alzheimer hastalığında görülen belirtilere yol açmaktadır (8, 9). Ancak aksi yönde bulgular ortaya koyan çalışmalar da az değildir. Sunulan bu çalışmada alüminyumun beyinde oksidatif stres ve hipokampal fonksiyonlar üzerine etkisi araştırılacaktır. Ayrıca doğal balın alüminyumun oluşturabileceği hasarlar üzerine etkisi araştırılacaktır.

Doğal bal kompleks bir karbonhidrat karışımıdır, çeşitli proteinler, enzimler, organik asidler, lipidler, vitaminler, fenolik asidler, flavanoidler ve mineraller gibi diğer maddeleri de içerir. Antimikrobiyal, antitümör, antiinflamatuar ve antioksidan etki gibi çeşitli etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (10, 11). Alzheimer hastalığının patogeneğinde oksidatif stresin önemli olduğuna dair bulgular vardır (12). Doğal bal antioksidan etkisiyle ya da başka bir mekanizmayla Alzheimer hastalığında etkili olabilir.

Araştırmanın sonuçları alüminyum toksisitesinin beyinde oksidatif stres ve hipokampal fonksiyonlar üzerine etkisi ve özellikle Alzheimer hastalığı ile ilişkisi ile ilgili bilgilere katkı

sağlayacaktır. Bu çalışma bu konudaki literatürdeki bilgi boşluğunu dolduracaktır. Doğal bal alüminyumun intoksikasyonua karşı etkili bulunursa, bu gıda maddesinin Alzheimer hastalığında koruyucu etkisini araştırarak diğer çalışmaların yapılması önerilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

İleri yaşlarda ortaya çıkan Alzheimer hastalığı konuşma, hafıza, yer ve yön bulma, insanları tanıma gibi günlük hayatta birçok kez karşılaştığımız olayların zamanla zayıflaması ve bundan dolayı günlük işleri yerine getirme becerisinde azalma ve davranış bozuklukları ile birlikte ortaya çıkan nörodejeneratif bir bozukluktur.

Alzheimer hastalığı (AH) en sık demans nedeni olup, tüm demans vakalarının %50-70'ini oluşturmaktadır. Hastalığın erken başlangıçlı formları otozomal dominant genetik geçiş özelliğine sahip olup olguların ancak % 3-5'ini oluşturur. Kesin tanı, progresif demans bulguları olan vakalarda biyopsi ya da otopsi ile Alzheimer hastalığına özgü patolojik bulguların saptanması ile konulabilir. Bu patoloji bulguları, nörofibriller yumaklar, nörotik plaklar, sinaps kaybı, nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon ve Meynert bazal nükleus'unda kolinerjik hücre kaybı ve arterosklerotik değişikliklerdir.

Alzheimer hastalığı, dünya nüfusunun yaşlanmasıyla giderek artan sıklıkta tanı konulan ve toplumsal sağlık sorunu haline gelen bir hastalıktır. Yaşlanan toplumumuzda Alzheimer hastalığının erken ve doğru tanısı zorunlu hale gelmiştir. Tanıda hastalığın en belirgin özelliği kognitif kapasitede azalmadır. Bunun yanında davranış bozuklukları, erken tanı ile tedavideki güçlükler ve klasikleşmiş yanlış bilgilenmeler, bakım ve bakıcı yükü ile maliyeti, tedavi zorlukları ile maliyeti gibi nedenler tüm dünya ülkelerini etkilemektedir. Demans, dünyada, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar ile birlikte son 10 yılda üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıkların başında gelmektedir (13).

Alzheimer hastalığının yıllık ekonomik maliyeti olarak sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 300 milyar dolar harcandığı bildirilmektedir (14).

2.2. Alüminyum

Alüminyum yer kabuğunun %8 ini oluşturan metalik bir elementtir. Oksijen ve silikondan sonra doğada en çok bulunan elementtir. Alüminyum genellikle tek başına değil hidroksit, silisat, sülfat, fosfat gibi elementler ile toprakta, kilde, mineralde, kayalarda, su ve yiyeceklerde bulunur. İnsan ve hayvan biyokimyasında alüminyumun bilinen hiçbir rolü yoktur. Yiyeceklerde kullanılan koruyucu maddeler, renk maddeleri, maya gibi yiyecekler alüminyum içermektedir. Alüminyum doğada her tarafta mevcuttur. Diyetle içilen suya,

kullanılan ilaçlara ve çevreye ya da mesleğe bağlı olarak insanlar alüminyuma maruz kalır. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki insanlar havadan, sudan ve yiyeceklerden günlük yaklaşık olarak 2 ile 160 mg alüminyum alırlar. Günlük alınan yiyeceklerin bileşenlerine bağlı olarak bu miktarlar değişiklik gösterir. Ayrıca alüminyum içeren antasid ve analjezik tamponların kullanımı, günlük emilimi 5 gr ın üstüne çıkarabilir. Gastrointestinal sistemde alüminyum absorpsiyonu kısıtlıdır. Alüminyum ve onun bileşenleri insanda çok düşük miktarda absorbe edilir. Bununla birlikte başta beyin olmak üzere, kalp kası, kemikler ve akciğerler dahil tüm vücutta birikerek toksik etkiler oluşturabilir. Alüminyum normal insan böbrekleri ile kolayca ekstrekte edilir.

Alüminyum ve bileşenlerine maruz kalanlarda alüminyumun özellikle nörotoksisite başta olmak üzere tehlikeli etkilere neden olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

Biyosferde oldukça yüksek oranlarda bulunan Al^{+3} ün bilinen fizyolojik rolü olmayıp insanlar için oldukça toksik olan bir elementtir. Buna rağmen alüminyumun uzun yıllar boyunca insan sağlığı için zararsız bir element olduğu sanılıyordu. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla alüminyumun toksisitesi tespit edilmiş ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalıklara neden olduğu anlaşılmıştır (15, 16). Alüminyum gastrointestinal sistem (GİS) ile ya da solunum yolu ile insan organizmasına girer (17). GIS den ve renal yol ile dışarı atılır. Bununla birlikte başta beyin olmak üzere, kalp kası, kemikler ve akciğerler dahil tüm vücutta birikerek toksik etkiler oluşturabilir. Sağlıklı insanlarda absorbe edilen alüminyum miktarı idrardan çıkan miktara bağlı olup bu şekilde bu elementin normal seviyeleri korunur.

Yüksek miktarda alüminyum içeren diyet santral sinir sisteminde (özellikle beyin ve sipinal kordta) alüminyum konsantrasyonunu artırır (18). Alüminyum eser elementler olan mangan ve demirin santral sinir sistemindeki konsantrasyonunu değiştirir ve orada lipid peroksidasyonunun oluşmasına neden olur. Ayrıca alüminyum tuzları DNA ve RNA ya bağlanarak heksokinaz, asit ve alkalın fosfataz, fosfodiesteraz ve fosfoooksidaz gibi enzimleri inhibe eder (19). Bununla birlikte alüminyum reaktif oksijen türlerini üreterek lipid, protein ve DNA oksidasyonuna neden olmaktadır (17).

2.2.1. Alüminyumun Vücuda Girmesi

Alüminyumun vücuttaki absorpsiyonu çok düşüktür. Fakat başka birçok faktör absorpsiyonu artırabilir. Alüminyumun kendiliğinden intestinal absorpsiyonu %1 kadar düşüktür fakat birçok organik diyet bileşenleri alüminyum absorpsiyonunu artırabilirler (20). Alüminyumun intestinal absorpsiyonunun artması aynı zamanda patolojik durumları da artırır. Alzheimer hastalarında alüminyumun gastrointestinal kanaldan atılımının azalmış olduğu görülmektedir.

Alüminyum absorpsiyonunun hem aktif transportla hem de pasif transportla olduğu kabul edilmektedir. Madenciler, dökümcüler ve diğer metal işçileri alüminyuma büyük ölçüde maruz kalırlar. Bunlarda alüminyum inhalasyon yoluyla ve gastrointestinal sistem yolu ile absorbe edilir (20).

Kozmetik ürünler, ter önleyiciler ve deriye uygulanan ilaçlarda bulunan alüminyum un deriden önemli miktarda emilmediği bildirilmiştir (21).

2.2.2. Vücutta Alüminyumun Dağılımı

Sağlıklı bir insanda toplam alüminyum miktarı yaklaşık 30-50 mg dır (21). Alüminyuma maruz kalmış insanlarda ve alüminyum tedavisi görmüş deney hayvanlarında alüminyumun çeşitli dokularda eşit olmayan dağılımı rapor edilmiştir (22). Genelde insanlarda vücudun total alüminyum miktarının yarısı iskelette, dörtte biri de akciğerlerde bulunur. Ancak Şekil 3 de görüldüğü gibi vücutta alüminyumun biriktiği önemli bir yer de beyindir (23) Deney hayvanlarında yapılan çalışmada kemikten sonra artmış alüminyum seviyelerinin farklı organlarda ki sırası korteks > böbrek medulla > karaciğer > testis > iskelet kası> kalp > beyin dir. Yaş ilerledikçe akciğerler, böbrekler ve beyinde alüminyum konsantrasyonun arttığı gözlenmiştir (24).

Alüminyum kanda transferin gibi proteinlere veya daha düşük molekül ağırlıklı ligandlara; küçük peptidlere, nükleotidlere, nükleik asitlere, sitrat, fosfat ve silisik aside bağlanır. Beyin intertisyel sıvısı içinde alüminyum glutamat veya GABA gibi nörotransmitterlere bağlanır. Alüminyum kan beyin bariyerinde ise glia hücreleri ve nöronlarla ilişkilidir. Alüminyum burada fosfat gruplarına bağlanarak toplanır daha sonra alüminyum ATP, Golgi cisimciği ya da endoplazmik retikulum'a bağlanarak nükleus'a yaklaşır. Alüminyum burada nükleer kromatinleri bulur.

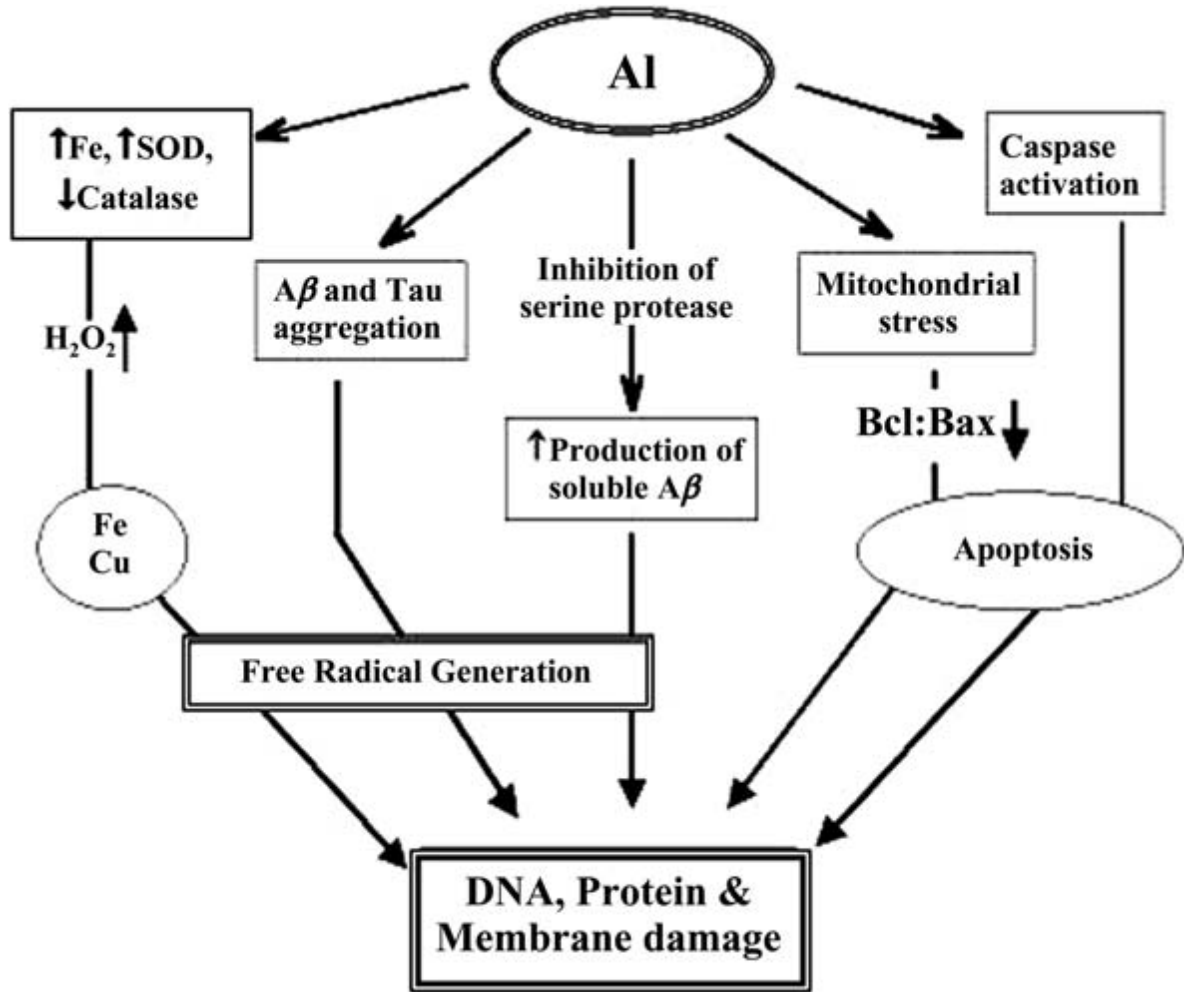
2.2.3. Alüminyumun Hücrelere Katılımı

Hedef organlarda birikmiş alüminyum hücre içerisinde düzgün bir şekilde dağılmamıştır. Alüminyum lizozom, hücre çekirdeği ve kromatinde birikir. Çekirdek içerisindeki intranükleer alüminyum ve nörofibriler yumağın oluşumu (alüminyum nörotoksitesinin bir işaretidir) arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir (25). Alüminyum sitozolik, mitokondriyal, lizozomal ve çekirdek bileşenlerinde bulunmaktadır. Nöronal hücrelerde alüminyumun çekirdekte biriktiği gözlenmiştir.

2.2.4. Patofizyolojik Değişiklerin Oluşumunda Alüminyumun Rolü

Şekil 1 de görüldüğü üzere; Alüminyumun toksisitesi tam olarak ortaya çıkarılmasına rağmen işlevsel mekanizması yeterince anlaşılmamıştır. Alüminyumun beyin, karaciğer, kemik

kasları ve kemik iliği üzerindeki toksik etkileri ortaya konulmuştur (26). Böbreklerde alüminyumun intralizozomal birikim mekanizması metallerin atılmasını sağlar. Fakat diğer dokularda bazı spesifik toksik etkiler bulunmaktadır. External dokularda alüminyumun yavaş yavaş birikmesi büyük çökeltilerin oluşumuna neden olarak hücrelerin işlevini bozabilir veya onları öldürebilir.



Şekil 1: Alüminyum toksisitesinin götürdüğü olası yol; serbest radikal oluşumu nöronal hücre ölümüne yol açar (27).

2.2.5. Alüminyum Birikiminin Nöropatolojilerle İlişkisi

Alüminyum çevrede geniş dağılımı olan nörotoksik bir madde olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar alüminyumun Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozuklukların oluşumunda bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (28, 29, 30). Alzheimer hastalığının patogenezi ile alüminyum arasında bir bağlantının olabileceği uzun yıllardır tartışılmaktadır (31, 32). Alzheimer hastası olmayan yaşlılarla Alzheimer hastalığı olanlar karşılaştırıldığında

aynı yaştaki Alzheimer hastası olan yaşlılarda alüminyum içeriği daha fazladır (33). "Alüminyum hipotezi " olarak adlandırılan çeşitli nörotoksikolojik, analitik ve epidemiyolojik bulgulara dayanan bir hipotez 1960 yılında önerilmiştir. Alüminyum ve Alzheimer hastalığı arasındaki bağlantı Klatzo ve ark.'nın bulguları ile ilk 1965 yılında görülmüştür (31). Çeşitli çalışmalarda Alzheimer hastalarının beynindeki nörofibriler yumaklarda (NFY) ve senil plaklarda alüminyum varlığı rapor edilmiştir (34). Deney hayvanlarında intraserebral alüminyum uygulaması sonrası görülen nörofibrilerde jenerasyon ile Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunan NFT' ler arasında benzerlikler görülmüştür. 1970' lerde, diyaliz çözeltileri veya farmakolojik bileşiklerdeki alüminyumun, diyaliz hastalarında demansa neden olduğu bulunmuştur. Yumoto ve ark. larının detaylı analizlerinde (transmisyon elektron mikroskobu ile kombine enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi- TEMEDX) senil plaklarda alüminyum varlığı tespit edilmiştir (31). Alzheimer hastalarının beyinde oluşan lezyonlar serbest radikallerin saldırısıyla ilişkilidir ve alüminyumun serbest radikal oluşumunda katalitik aktivitesi olduğu gösterilmiştir (35). Alüminyum, membrandaki voltaj bağımlı iyon kanallarında, nörotransmitter salımında ve glutamat metabolizmasında değişiklikliğe yol açarak nöral hücrelere zarar verebilir (36, 37).

İnsanlarda gelişen bazı nörolojik hastalıklar alüminyum intoksikasyonuna yorulmaktadır. Bunlar hafıza kaybı, titreme, irkilme, denge bozukluğu, merak kaybı, ataxia, myoklonik irkilme ve kusma ile kendini gösterir (38). Son yapılan epidemiolojik, nöropatolojik ve biyokimyasal çalışmalar da Alzheimer hastalığının patogenezi ile alüminyumun nörotoksitesitesi arasında önemli bir bağlantı olduğu ileri sürülmektedir.

Alüminyum farklı yollarla sinir sistemini etkiliyor olabilir. Bu yollar: 1) glukoz metabolizması ile interfere olarak asetilkolinin prekürsörünü indirgenmiş forma dönüştürüp ve katekolaminin katekol kısmı ile bağlanmasını sağlıyor olabilir 2) Na^+ - K^+ - ATPaz ve Ca^{+2} - Mg^{+2} - ATPaz' ın presneptik nöronal membran ile nörotransmitterlerin salınmasındaki değişikliklerden etkilenmesi olabilir 3) Kanalların üzerine veya içine kompetitif inhibitör faktör olarak bağlanıp intrasellüler homeostazisin düzenlemesini sağlıyor olabilir 4) cAMPnin artması olabilir 5) Fosforilasyonun değişimi, proteolizis, transport ve sentezin sitoskeletal proteinlerde değişimlerin etkisi ile olabilir 6) Genomik yapıların genel olarak etkilenmesi olabilir 7) Oksidatif hasar dahil beyin fosfolipitlerinin lipid peroksidasyonu olabilir (39).

Alüminyum ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki araştırılırken alüminyumun toksitesitesi, alüminyumun Alzheimer hastalarının beyinlerinde yüksek oranda bulunması ve içme suyunda yüksek alüminyum düzeyleri olan bölgelerde daha sık Alzheimer hastasının saptanması dikkat

çekmiştir (40). Alüminyum'un demir, bakır ve çinkonun yanı sıra plaklarda gösterilmesi ve nörotoksik olduğunun bilinmesi bu vurguyu artırmaktadır. Diğer yandan alüminyumun Alzheimer hastalığı ile doğrudan ilişkili olmayabileceğine dair bulgular vardır, Örneğin: Alüminyum toksisitesinin sebep olduğu plaklar Alzheimer'den farklı olarak nörofibriler demetlerden oluşur. Diyalizde görülen alüminyum ensefalopatisiyle Alzheimer kliniği birbirine benzememektedir (41).

İn vitro bir çalışmada alüminyum asetilasetatin hücre membranlarında bulunan lipidlerin moleküler yapılarını ve biyofiziksel ve fizyolojik yapısını değiştirdiği görülmektedir (42). β -amiloidin oluşumu ve birikmesi alüminyum tarafından etkilenmektedir. Alüminyum aynı zamanda tau proteinlerinin ve diğer nörofibriler proteinlerin agregasyonunu tetikler.

Aminerjik nörotransmitterler ve aminoasit nörotransmitterlerde meydana gelen bölgesel hasarlar alüminyuma bağlı nörotoksitenin oluşumunda önemli katkı sağlamaktadır (43). İçme suyundaki alüminyumun ratlara kronik olarak verilmesi beyinde farklı morfolojik değişimlere neden olabilir. Çalışmalarda nöronal yoğunluğun pyknosis gibi dejeneratif değişimlerin, vakuolizasyon, kromatin kondensasyon ve diğer iskelet-kas ve serebrovasküler anormalliklerin oluşumunun kanıtlanmasını sağladılar (44). Mikroskobik olarak demyelinizasyon ve alüminyumun aynı zamanda fosfor bileşenlerinin varlığını tespit etmişler. Beyin ve spinal kord nöronların dentritlerinde ve perikardiya da nöroflamentlerin birikmesi normal gibi görünmektedir (45). Alüminyum intoksikasyonu aksonal şişkinliklere neden olur. Alüminyum intoksikasyonunda purkinje hücrelerinin bozulmasıyla serebral atrofi rapor edilmiştir. Çok yaşlı insan beyinde serebellar purkinje hücrelerinde alüminyumun neden olduğu benzer durumlar gözlenmiştir (46).

Alüminyum konsantrasyonu litrede 100 μ g (mikrogram)'ın üstünde ise Alzheimer hastalığı riski 2,5 kat artar şeklinde yayınlar vardır ve özellikle içme suyuyla ilgili olarak 13 epidemiyolojik çalışmanın 9 (dokuz)'unda bu ilişki vurgulanmıştır (40).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu kolaylaştıran, antioksidan eksikliğine yol açan ve amiloid beta agregasyonunu artıran metallerden demir, alüminyum, bakır ve çinko düzeyleri yüksek bulunmuştur. (47).

2.3. Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini

arttırmırlar. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stress yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrenel serbest radikalleri oluşturmırlar (48). Bu serbest radikalleri sınıflayacak olursak; Reaktif oksijen türleri olarak: 1.Süperoksit Radikalleri($O_2^{\cdot-}$), 2.Hidroksil Radikalleri ($OH^{\cdot}$), 3.Hidrojen Peroksit (H_2O_2), 4.Hipoklorik Asit ($HOCL$), 5.Singlet O_2 ($O_2^{\uparrow\downarrow}$) sıralanabilir bir de Reaktif Nitrojen Türleri (NO , NO^2 , NO^+ , NO^-) örnek gösterilebilir.

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksil ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanmaya neden olurlar (49).

Serbest radikallerin DNA atakları; mutasyonlara ve hücre ölümüne yol açarlar. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür.

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerleri, kontrolsüz baz dizilimini, zincir kırılmalarını ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagezise, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır.

2.3.1. Serbest Radikallerin Beyin Dokusu Üzerine Etkileri

Alzheimer hastalığının etiyopatogenezi ile ilişkili hipotezlerden biri de oksidatif stres hipotezidir (50). Alzheimer hastalığının başlangıcında ve ilerlemesinde oksidatif stresin önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

Alzheimer hastalığında oksidatif stres kendini; artan okside olmuş protein seviyesi, artan glikasyon son ürünleri, lipid peroksidasyon son ürünleri, peroksitler, alkoller, aldehitler, serbest karboniller, ketonlar gibi toksik türlerin oluşumu, moleküler ve mitokondrial DNA daki oksidatif değişiklikler ile göstermektedir (51).

Alzheimer hastalığında reaktif oksijen türlerinin birikmesinin nedenleri; mitokondriyal disfonksiyon, solunum zincirindeki kusur sonucu serbest oksijen türlerinin aşırı oluşumu ve ekstraselüler A β agregasyonu gibi faktörler sıralanabilir. Buna ek olarak, A β plaklar hidrojen

peroksit oluşumunu doğrudan da uyarabilirler. Dolayısıyla serbest radikaller mitokondriyal biyokimyasal reaksiyonlar, mikrogial aktivasyon ve A β plakları tarafından üretilebilir (51).

Beyin dokusu hücre membranlarındaki fazla miktardaki doymamış yağ asitleri, fazla oksijen tüketmesi, yüksek demir içeriği ve düşük anti-oksidatif enzim aktiviteleri sebebiyle oksidatif hasara çok duyarlıdır (51, 52). Bu bağlamda hafif kognitif bozukluğu olanların ve Alzheimer hastalarının santral sinir sistemlerinde ve periferel dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyesinin yüksek olduğu, antioksidan enzimlerden özellikle glutatyon peroksidaz ve süperoksid dismutas aktivitelerinin azaldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (51).

Serbest oksijen radikallerin üretimindeki artış; antioksidan kullanımını artırır ve antioksidan kapasitesinin düşmesine neden olur. Bu kısır döngü vücudun oksidatif atağa karşı korunmasını azaltır (52).

Yaşa bağlı hafıza bozukluklulukları beyindeki ve plazmadaki antioksidan savunma mekanizmasının azalmasıyla ilişkilidir. Serbest oksijen radikallerini (ROS) temizleyen glutatyon (GSH) , antioksidan savunma sisteminin önemli bir unsurudur. Yaşla birlikte azalan GSH seviyesi oluşan ROS temizlenmesine yeterli gelmez ve oksidatif strese yol açar (51).

2.4. Bal

Bal; “bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların ya da bitkilerin canlı kısımları ile bazı eşkanatlı böceklerin salgıladığı tatlı maddelerin bal arıları (*Apis mellifera*, *Apis mellifica*) tarafından toplanması, organizmalarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucu meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür” şeklinde tanımlanmaktadır (53).

Bal; bileşiminde bulunan çeşitli vitaminler, mineraller, organik asitler ve enzimler nedeniyle sindirimi kolay, besleyici ve pek çok hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici özellik gösteren fonksiyonel bir gıdadır.

2.4.1. Balın Bileşimi

Balın bileşimi arının nektarını aldığı çiçeklerin türüne, iklim koşullarına, arının cinsi ve yaşına bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama olarak balın bileşimi Tablo-2 deki çizelgedeki gibidir (53).

2.4.1.1. Balın Kimyasal Bileşimi

Tablo 1: Balın Kimyasal Bileşimi (54).

Bileşim Maddeleri	Ortalama Miktarı (g/100 g)	Bileşim Maddeleri	Ortalama Miktarı (mg/100 g)
Su	17.10	Riboflavin (B2)	0.04
Fruktoz	38.50	B6 vitamini	0.02
Glukoz	31.00	Potasyum	52.00
Maltoz	7.20	Kalsiyum	6.00
Sakkaroz	1.50	Sodyum	4.00
Diğer karbonhidratlar	4.00	Fosfor	4.00
Toplam Protein	0.30	Mağnezyum	2.00
Kül	0.20	Selenyum	0.80
C vitamini	0.50 mg	Demir	0.42
Niasin	0.12 mg	Manganez	0.08
Pantotenikasit	0.07 mg	Bakır	0.04
Kalori (kkal.)	304		

Tablo 1 deki verileri ayrıntılı olarak ele alacak olursak: Nem; Nektarın arılarca olgunlaştırıldıktan sonra kalan kısmıdır. %16-22 oranında değişir. Bal daki nem içeriği balın muhafazası için önemli rol oynar. Balın nem oranı; nektarın kompozisyonu, üretim aşamasındaki dış etkenler (sıcaklık, nem gibi), süzme gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Karbonhidratlar; balın vizkosite, tatlılık, enerji değeri gibi özelliklerini belirler ve kuru maddenin %90-95 ini oluşturur. Monosakkaritler, disakkaritler, trisakkaritler ve yüksek şekerlerden oluşur. Monosakkaritlere örnek olarak glukoz ve fruktoz söylenebilir. Baldaki fruktoz oranı glukoz oranından yüksektir. Disakkaritlere örnek olarak maltoz, sukroz, izomaltoz, nigeroz ve turanoz verilebilir. Trisakkaritlere ise melezitoz, erloz, panoz, maltotrioz, kestoz, izopanoz, sentoz örnek verilebilir. Yüksek şekerlere ise izomaltotetroz, izomaltopentoz, dekstrantioz örnek verilebilir. Organik asitler; bala ait olan tadını ve aromasını verirler. Glukonik asit, formik asit, laktik asit, sitrik asit, maleik asit, malik asit, butirik asit, oksalik asit gibi. Mineraller; ortalama % 0,17 oranındadır. K, Cl, S, Na, Ca, P, Mg, Si, Cu, Mn ve Fe gibi. Enzimler; bala herhangi bir besleyici katkıları yoktur ama balın

kalitesi hakkında bize bilgi verir. Çünkü ısıtma işleme uğrayan baldaki enzimler yapısal bozunmalara uğrarlar. Diyastaz, intervaz gibi. Amino asit ve proteinler; Prolin, fenilalanin gibi. Baldaki prolin kaynağı nektar değil, bal arısının kendi katkısıdır. Vitaminler; tiamin, riboflavin, biotin, niasin, folik asit gibi. Antioksidan aktivite açısından önemlidirler. Aroma verici olarak da aldehit, keton ve alkollerdir. Bunun yanı sıra lipidler, polifenoller, toksik maddeler, partiküler yapılar da balın yapısına girer.

2.4.1.2. Balın Fiziksel Özellikleri

Tablo 1 de görüldüğü gibi balın %17.10'unu su, kalanını katı madde oluşturmaktadır. Katı madde içinde fruktoz, glukoz, maltoz ve sakkaroz olmak üzere şekerler önemli bir paya sahiptir. Ayrıca az miktarda protein, bazı B grubu vitaminler, C vitamini ve çeşitli mineraller de bulunmaktadır (54). Bal, içerdiği başta glukonik asit olmak üzere bütirik, asetik, formik, laktik, süksinik, malik, sitrik ve okzalik asitler gibi organik asitler nedeniyle asidik bir gıdadır. Ortalama olarak asitliği %0.57 (%0.017–1.17) olup, pH'sı 3,9 (3.4–6.1)'dur (54).

2.4.1.3. Balın Antioksidatif Etkisi

Balın bir diğer özelliği de antioksidatif etkisidir. Balın bu etkisi sayesinde insanları, oksidatif olaylar sonucunda oluşabilecek bir takım rahatsızlıklara özellikle kansere, kardiyovasküler kollapsa ve şeker hastalığına karşı koruduğu bildirilmektedir (55).

Bala antioksidan özelliğini veren maddeler: Flavonoidler (apigenin, pinobanksin, pinosembrian, kaempferol, galangin, luteolin, hesperetin vb.) ve fenolik asitler (kafeik, ferulik, ellagik, klorogenik asit vb.) gibi polifenoller, 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), tiamin, riboflavin, α - tokoferol, askorbik asit gibi vitaminler, salisilik asit, sülfidril grupları, karotenoid türevleri, glukoz oksidaz, katalaz, peroksidaz gibi enzimler, organik asitler (glukonik, sitrik, malik asit), amino asitler ve proteinlerdir (56, 57, 58). Fenolik asit miktarına bağlı olarak değişen balın rengi de antioksidan özellik hakkında bilgi verebilir. Fenolik asit düzeyi arttıkça balın rengi koyulaşır ve dolayısıyla antioksidan özelliği artar (58, 50).

Polifenollerin peroksil radikallerini temizlemesi molekül yapısındaki yüksek hidrojen hareketliliğine bağlı olduğu düşünülmektedir (57).

Bal tüketimi plazma antioksidan seviyesini artırır. Antioksidan düzeyinin artması insan sağlığı için koruyucu bir faktör olarak değerlendirilebilir (59).

Mohamed M. Ve ark.(2011) sıçanlarda sigara dumanına bağlı testiküler hasar ve oksidatif strese karşı balın etkisini araştırmışlar ve balın testiküler hasar ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (60).

N.M. Effendy ve ark. (2012) yaptığı çalışmada Tualang balının antioksidan ve antiinflamatuvar etkisine bağlı olarak postmenapozal osteoporozda fayda sağladığını göstermişler ve Tualang balının bu hastalıkta alternatif bir tedavi olabileceğini söylemişlerdir (61).

R. M. Galal ve ark. (2012) çalışmalarında parasetamol ile indüklenen oksidatif strese karşı bal kullanılarak hepatoprotektif etki sağlanmışlardır (62).

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. MATERYAL

Doğal çiçek balı (Şemdinli, Türkiye) (Gıda tebliğine uygunluğu Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarında yapılan analizle ispatlandı.)

Çalışmamızda kullandığımız balı (Şemdinli, Türkiye) Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ankara Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde analiz edildi ve çıkan sonuçlar Tablo 2 de özetlendi. Tablo 3 deki Türk Gıda Kodeksi Bal tebliğine uygunluğu teyit edildi.

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Çiçek Balı Numune Analizi

Yapılan Analizler	Sonuçlar	Ölçüm limiti	Analiz Metodu	Değerlendirme
Suda çözünmeyen madde(%)	0,003		TS 3036	U
Nem oranı (%)	17,4		TS 13365	U
Diastaz Sayısı (DS)	15,0		TS 13364	U
HMF (HPLC) (mg/kg)	14,8		Harmonised Methods of IHC 2002 p;25-77	U
Elektriksel iletkenlik (ms/cm)	0,2		Harmonised Methods of IHC 2002 pp 15-17	U
Prolin tayini(mg/kg)	552,8		Harmonised Methods of IHC 2002 pp 58-59	U

Fruktoz/Glikoz (F/G)	1,3		DIN 10758	U
Fruktoz+Glikoz (F/G) (%m/m)	61,7		DIN10758	U
Serbest Asistlik(meq/kg)	14,0		TS 13360	U
Sakkaroz (%m/m)	TEDB		DIN 10758	
C13 bal (binde)	-24,89		AOC official Method 998:12,2007	DY
C13 protein	-24,58		AOC official Method 998:12,2007	DY
C4 şeker (%)	0		AOC official Method 998:12,2007	U
Protein bal farkı (binde)	0,31		AOC official Method 998:12,2007	U
Naftalin (ug/kg(ppb))	TEDB	2,00	İn House Method D8 iç standart kul. SPME metodu ile GC/MS DE yapılmıştır.	U

Kısaltmalar: U: Uygun, UD: Uygun değil, DY: Değerlendirme yapılamadı, T.E.D.B:Tespit edilebilir düzeyde bulunamadı. Değerlendirmeler Türk Gıda Kodeksi Bal tebliğine (Tebliğ no: 2012/58) göre yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz bal çiçek balı olup (Şemdinli, Türkiye) Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının 27 Temmuz 2012 yılında Resmi Gazete de (sayı: 28366)

yayınlanmış olduğu Tablo 3 deki Türk Gıda Kodeksi Bal tebliğine (Tebliğ no: 2012/58) uygundur (63).

Tablo 3: Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (63)

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
Nem (en fazla)	% 20	% 20	% 20	% 23
	% 23 Püren (<i>Calluna</i>) ballarında			% 25 Püren (<i>Calluna</i>) kaynaklı fırıncılık ballarında
Sakaroz (en fazla)	5 g/100 g	5 g/100 g	5 g/100 g	5 g/100 g
	10g/100g (Yalancı akasya (Robina psedoacacia) Adi yonca (Medicago sativa) Menzies Banksia (Banksia meziesii) Tatlı yonca (Hedysarum) Kırmızı okaliptüs (Eucalyptus camadulensis) Meşin ağacı (Eucryhia lucida, Eucyrphia milliganii) ve Narenciye ballarında)	10g/100g (Kızıl çam (Pinus brutia) ve Fıstık çamlarından (Pinus pinea) elde edilen salgı ballarında)		
	15 g/100 g Lavanta çiçeği (Lavandula spp., Boraga officinalis) ballarında			
Fruktoz +Glukoz (en az)	100 g'da 60 g	100 g'da 45 g	100 g'da 45 g	-

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
Fruktoz / Glukoz	0,9 - 1,4	1,0-1,4	1,0-1,4	-
	1,0-1,85			
	Kestane (Castanea sativa)			
	1,2-1,85			
	Akasya (Robinia pseudoacacia)			
	1,0-1,65			
	Kekik (Thymus spp.)			
Suda çözünmeyen madde (en fazla)*	0,1 g/100 g	0,1 g/100 g	0,1 g/100 g	0,1 g/100 g
Serbest asitlik (en fazla)	50 meq/kg	50 meq/kg	50 meq/kg	80 meq/kg
Elektrik iletkenliği	En fazla 0,8 mS/cm	En az 0,8 mS/cm	En fazla 0,8 mS/cm	En fazla 0,8 mS/cm
	(Kocayemiş (Arbutus unedo), Çanotu (Erica), Okaliptus, İhlamur (Tilia spp.), Süpürgeçalı (Calluna vulgaris), Okyanus mersini (leptospermum) Çay ağacı (Melaleuca spp), ve Pamuk (Gossipium spp.'dan elde edilenler hariç)			
	En az 0,8 mS/cm (Kestane balında)		En az 0,8 mS/cm (Kestane balı	

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
			ve salgı balı karışımlarında)	
Diastaz sayısı (en az)	8	8	8	-
	3 (Narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim bulunan ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda)			
HMF (en fazla)**	40 mg/kg	40 mg/kg	40 mg/kg	-
Balda protein ve ham bal delta Cl3 değerleri arasındaki fark	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif
Balda protein ve ham bal delta Cl3 değerlerinden hesaplanan C4 şekerleri oranı (en fazla)	%7	%7	%7	%7
Prolin miktarı (en az)	300 mg/kg	300 mg/kg	300 mg/kg	180 mg/kg
	180 mg/kg (Kanola, ıhlamur, narenciye, lavanta, okaliptüs ballarında)			
	120 mg/kg (Biberiye, akasya ballarında)			

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
Naftalin miktarı (en fazla)***	10 ppb	10 ppb	10 ppb	10 ppb

* Pres balında suda çözünmeyen madde miktarı 0, 5 g/100 g'ı geçemez.

** Üretildiği bölge etiketinde belirtilmek koşulu ile tropikal ülke kaynaklı ballarda HMF miktarı en çok 80 mg/kg olur.

*** Balmumunda naftalin miktarı 10 ppb'den fazla olamaz.

Wistar Albino suşu ratlar (22 hafta üzeri) Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi tarafından BAP destekli olarak temin edildi.

Aluminiyum Chloride Hexahidrat emprove 1kg Merck 101084 veya muadili intraperitoneal enjeksiyon için kullanıldı.

Biyokimyasal ölçümlerde, Sigma ve Merck marka analitik saflıkta kimyasal maddeler, Total Oxidant Status (TOS) assay kit (Product code: RL0024 Mega Tıp San ve Tic Ltd Sti) ve Antioxidant assay kit (İtem No. 709001 Cayman Chemical Company) kullanıldı.

Çalışmalarda, spektrofotometre (Shumadzu U.V. Visible 1601), analitik terazi (A&D GR-200), pH metre (WTW pH 330 i), hava soğutmalı santrifüj (NF 800 Nüve), değişik ölçü ve markalarda otomatik pipetler, cam pipetler, balon jojeler, mezür, polistren tüpler ve beherler kullanıldı.

Çalışmalarda kullanılan çözeltiler tridistile su ile hazırlandı. Çalışmalarda kullanılan tüm cam malzemeler deiyonize su ile yıkandıktan sonra 1 gün boyunca % 20'lik HNO₃ içerisinde bekletildi ve sonrasında tekrar deiyonize su ile yıkandı.

3. 1. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan Wistar Albino suşu 22 haftalık dişi sıçanlar (150-200 g) Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneyler süresince 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngü içerisinde sıcaklığı sabit tutulan (21 ± 3°C) hayvan saklama odasında, her kafeste 4 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Tüm deneyler günün aydınlık periyodunda, sessiz ve sıcaklığı 22-24°C olan odada gerçekleştirilmiştir.

3. 1. 1. 2. Kullanılan Modeller

Hayvanlar her bir grupta 12 sıçan olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Grup 1: 3 ay boyunca günlük intra peritoneal (i.p) serum fizyolojik uygulandı.

Grup 2: 3 ay boyunca günlük intra peritoneal (i.p) 4.2mg/kg alüminyum klorür çözeltisi uygulandı.

Grup 3: 3 ay boyunca günlük intra peritoneal (i.p) 4.2mg/kg alüminyum klorür çözeltisi uygulandı ve içme suları ile birlikte yaklaşık 0,1g/kg olacak şekilde doğal bal verildi.

Grup 4: 3 ay boyunca günlük intra peritoneal (i.p) 4.2mg/kg alüminyum klorür çözeltisi uygulandı ve içme suları ile birlikte yaklaşık 1g/kg olacak şekilde doğal bal verildi.

Grup 5: 3 ay boyunca günlük intra peritoneal (i.p) 4.2mg/kg alüminyum klorür çözeltisi uygulandı ve içme suları ile birlikte yaklaşık 10 g/kg olacak şekilde doğal bal verildi.

3. 2. METOD

3. 2. 1. Elektrofizyolojik Kayıt

3. 2. 1. 1. Uyarı ve Kayıt

Sıçanlar ürethan (1.2 g / kg, ip) ile anestezi altına alınıp, stereotaksik çerçeveye (Kopf Instruments, Tujunga, CA, ABD) yerleştirildi. Beyin sağ yarım kürenin medial perforan yolunu (Bregmadan mm olarak AP: -6.8, ML: 3.8, DV: 2.2 dura altında) uyarmak için bipolar tungsten elektrot (paslanmaz çelik, 127µm çaplı, teflon kaplamalı, uçları hariç izole edilmiş) kullanılmıştır. Uyarı elektrotu stimülatöre bağlı olarak izolatörün çıkışına bağlandı (World Precision Instruments, ABD). Dikey ölçmeler (P30, Sutter Instrument, ABD) mikroelettronlar yapmak için kullanıldı. 3M NaCl (uç direnci 2-10 MΩ) ile doldurulmuş bir cam mikropipet (Borosilicate, o. d.: 1,5 mm, 10 cm uzunluk, katalog no: BT150-10, Sutter Instruments) eksitator postsinaptik potansiyel alanlarının (fEPSPs) kaydını almak için ipsilateral dentat girusun (mm olarak: AP: 3.5, ML: 2.15, DV: 2.5 duradan aşağı) granül hücre bariyerine sokuldu. Bir Ag-AgCl disk elektrot, referans elektrot olarak boyun derisinin altına yerleştirildi. Kaydedici elektrot dentat hilusta maksimum eğimin fEPSP' si pozitif olana kadar yavaşça dorsal hipokampüse indirildi. Kaydedici ve referans elektrotlar head-stage (Physiological Instruments, VCC600) kullanılarak amplifiyere (VCC600 tek kanallı epitelyal

voltage/current clamp system, Physiological Instruments) bağlandı. Bütün system bir Faraday kafesi kullanılarak korundu. Uyarı ve kaydı kontrol için ‘Scope’ (ADInstruments, Colorado Springs, CO, ABD) programı kullanılmıştır. Monofazik 10V ve 0.175ms’ lik uyarılar bir bilgisayarın A/D boardı (Powerlab/8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, ABD) tarafından üretildi ve izolatörle bağıntılı bir stimülatörü tetikledi. Biyolojik sinyaller 0.1-10 kHz bant genişliğinde bir pre-amplifiyerde yükseltildi (1000x). Dalga biçimi 20ms’ de 40 kHz oranında on-line olarak sayısallaştırıldı, bilgisayar monitöründe gösterildi ve offline analiz için ‘Scope’ kullanılarak saklandı.

3. 2. 1. 2. Input- Output (I/O) Eğrisi

Bazal kayıttan önce, bir input-output (I/O) eğrisi elde etmek için her 20 saniyede bir 175µs devam eden 100-1500 µA aralığında (200 µA adımla) uyarı ve monofazik elektrik akımları verildi. Her akım değeri için üç uyarı cevabın ortalaması alındı. Uyarı şiddeti ve fEPSP eğimi veya PS amplitüdü arasındaki ilişki sigmoidal bir eğri ile tanımlandı. Bu eğriden maksimal yanıtın yarısını oluşturan uyarı şiddeti (test uyaran şiddeti) belirlendi ve tüm deneyde kullanıldı.

3. 2. 1. 3. Uyarı Çifti Kolaylaşması

Uyarı çifti kolaylaşması 20 ila 1000 ms strok arası aralıklar ile verilen uyarı çiftlerine (PP) karşı oluşan cevap alınarak ölçüldü. PP oranı (PPR) ikinci PS amplitüdün birinciye oranı olarak tanımlanır. Uyarı çiftleri 0.033 Hz verildi ve her çift için üç yanıtın ortalaması alındı.

3. 2. 1. 4. LTP İndüksiyonu

Ltp indüksiyonu için tetanik stimülasyonunun iki paradigması uygulandı. LTP paradigmaları 5 dakika ara ile 100 Hz frekansında 100 uyarının dört tetanik dizisidir.

3. 2. 1. 5. Veri Analizi

Bazal periyot (HFS verilmeden önceki ilk 10 dk’lık kayıt) süresince EPSP eğimlerin ve PS genliklerin ortalama değeri her sıçan için %100 olarak değerlendirildi. Bundan sonraki her EPSP eğimi ve PS genliği hesaplanan bu değerin yüzdesi olarak ifade edildi. Sonraki veriler bazal süreye göre yüzde değişim olarak ifade edildi. fEPSP’nin eğimi, PS’nin başlangıcındaki fEPSP ve dalga biçiminin başlangıcı arasındaki voltaj farkının %20-80’indeki amplitüd değişimi olarak hesaplandı. PS amplitüdü, pozitif pikten negatif pike doğru ölçüldü. Eğim ve amplitüd verilerini gruplar arasında karşılaştırmak için ANOVA testi kullanıldı. Uygun

olduğu takdirde post hoc LSD testi çoklu karşılaştırmalar için düzeltilmiştir. Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve 0.05'ten düşük olasılık değerleri anlamlı olarak değerlendirildi.

3. 2. 2. Biyokimya Tayinleri

3. 2. 2. 1. Total Antioksidan Düzeyi (TAS) Tayini

Numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli 2-21-Azino-bis [3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt (ABTS) radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirir. 595 nm absorbansdaki değişim total antioksidan miktarıyla alakalıdır. Kitin kalibrasyonu E vitamini benzeri Trolox Equivalent adı verilen stabil antioksidan standardı ile yapılır. Sonuçlar mmol trolox Equiv./L olarak verilmektedir.

3. 2. 2. 2. Total Oksidan Düzeyi (TOS) Tayini

Deney prensibi, numunedeki oksidanların demir iyonunu okside etmesine dayanır. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda mevcut olan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Demir iyonu, bir asidik ortam içinde kromojen ile renkli bir kompleks yapar. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede mevcut olan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve elde edilen sonuçlar litre (H_2O_2 Equiv./L) başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir.

Kullanılan Reaktifler ve Standartlar

Reaktif 1: Test tamponu

Reaktif 2: Prokromojen solüsyonu

Standart 1: Kör Solüsyonu (deiyonize su)

Standart 2: Stabilize edilmiş standart stok solüsyonu (SSSS) (800 mM H_2O_2 Equiv./L)

Metot

500 µl reaktif 1 ve 75µl standart 2 eklenerek 530 nm' de ilk absorbans okunur. Daha sonra üzerine 25 µl reaktif 2 eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika ya da 37°C' de 5 dakika inkübe edildikten sonra 530 nm' de ikinci absorbans okunur.

Örnek için de yine aynı şekilde 500 µl reaktif 1 ve 75µl örneğin 530 nm’ de ilk absorbans okunur. Daha sonra üzerine 25 µl reaktif 2 eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika ya da 37°C’ de 5 dakika inkübe edildikten sonra 530 nm’ de ikinci absorbans okunur.

Sonuçların Hesaplanması

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs Örnek} / \Delta\text{Abs Standart2}) \times 20 \text{ (Standart2 değeri)}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = \text{Örneğin ikinci absorbansı} - \text{Örneğin ilk absorbansı}$$

$$\Delta\text{Abs Standart2} = \text{Standart2’ nin ikinci absorbansı} - \text{Standart2’ nin ilk absorbansı}$$

$$\text{Standart2 değeri} = 20 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$$

3. 2. 2. 3. Tiyol Tayini

Tiyol seviyelerinin tayini, Hu ML ve arkadaşlarının (64) geliştirdiği metodla gerçekleştirildi. Yöntemin prensibi, “DTNB + 2R–SH → R–S–S–R + 2TNB” reaksiyonunda görüldüğü gibi serbest tiyol gruplarının 5,5-ditiyo bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oksitlenmesi sırasında oluşan koyu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)’in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır.

Çözeltiler

- _ 0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2 (10 mM EDTA içerir)
- _ 10 mM DTNB (metanolde hazırlanır)
- _ 1.0 mM GSH (stok standart)

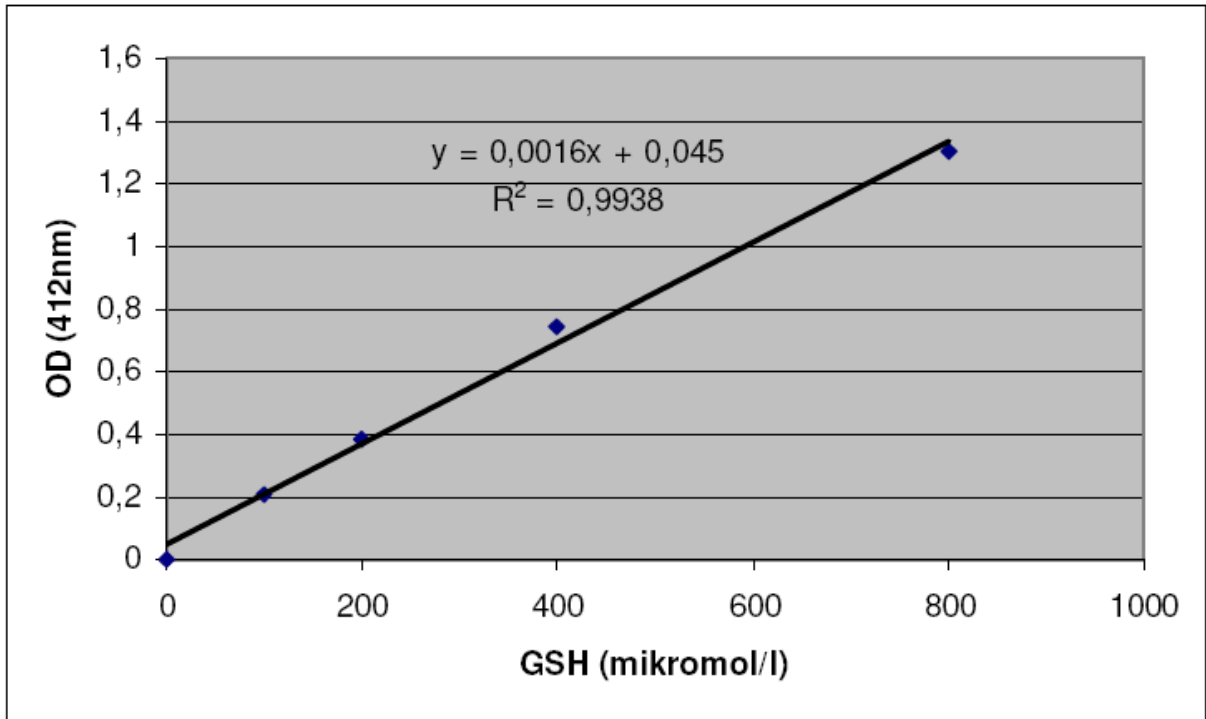
Çalışma

	Kör	Kontrol	Numune
Tris-HCl	1.05 ml	1.0 ml	1.0 ml
Metanol	-	0.05 ml	-
Numune	-	0.05 ml	0.05 ml
DTNB	0.05 ml	-	0.05 ml

DTNB ilavesiyle inkübasyon süresi başlatıldı. Kör, kontrol ve numune tüpleri 25 oC’ de 15 dakika inkübe edildi. Kör tüpüne karşı, kontrol ve numune tüplerinin absorbansı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

Standart Serinin Hazırlanması

Stok GSH (1.0 mM) çözeltisi, 0, 100, 200, 400 ve 800 µmol/L konsantrasyonlarında standart seri oluşturacak şekilde Tip-I su ile dilüe edildi ve her bir standart, numune gibi çalışılarak GSH (µmol/L) konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değeriyle standart grafik çizildi (Şekil 2). Standart grafikten bulunan plazma tiyol seviyeleri, µmol/L olarak verildi.



Şekil 2: Tiyol standart grafiği

3. 2. 2. 4. Ksantin Oksidaz Aktivitesi Tayini

XO, aktivitesi için Prajda ve Weber (65) tarafından geliştirilen metod kullanılmıştır. Bu metod ksantinden ürik asit oluşumu esnasında 293 nm’de absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Çözeltiler

- _ Fosfat tamponu (50mM fosfat; pH 7.5; 0,5 mM EDTA)
- _ 4mM Ksantin (tampon içinde hazırlandı)
- _ %100 TCA (trikloro asetik asit)

Çalışma

	Numune	Kör
Distile su	-	50µL
Numune	50µL	-
Tampon	3mL	3mL
_ 37 oC’de 30 dakika inkubasyon		
TCA	100µL	100µL

- _ 6000 g’de 20 dakika santrifüj

Santrifüj işlemi sonunda üstte kalan süpernatantların absorbansı köre karşı 293 nm dalga boyunda ölçüldü. 1 ünite ksantin oksidaz, 37 oC’de pH 7.5’te 1 dakikada oluşan µmol ürik asit olarak tarif edilip;

$$\text{Abs-kör} = A$$

$$A \times 5121,9 = B$$

$$B/1000 = XO$$

formülüyle hesaplanıp, U/ml olarak hesaplandı.

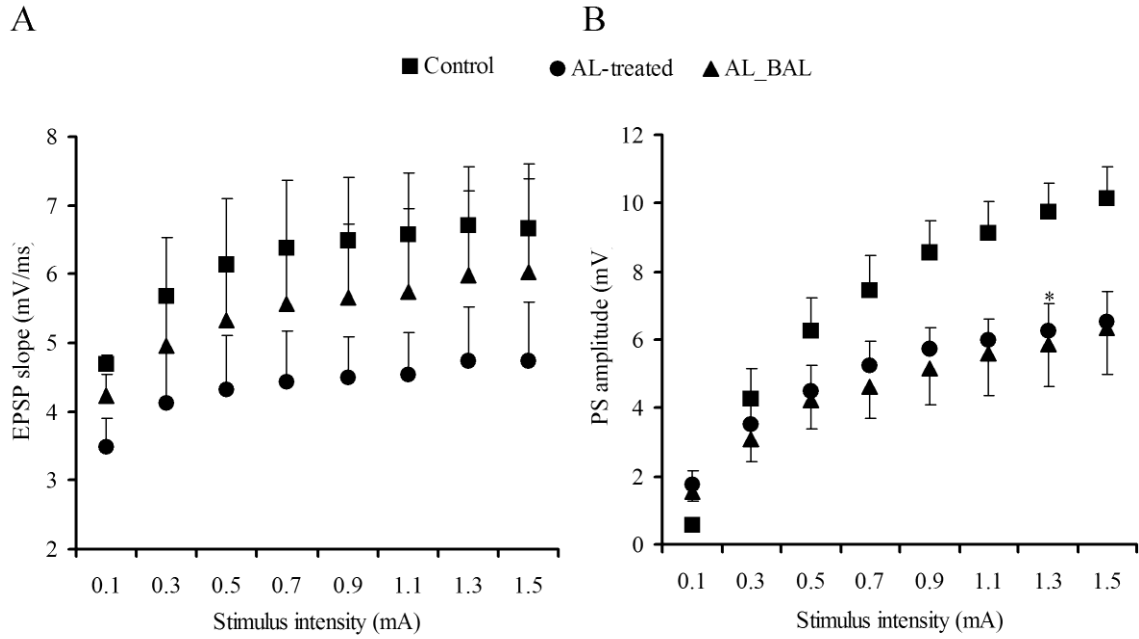
3. 2. 3. Alüminyum Düzeylerinin Ölçümü

Her bir gruptan 6 şar adet olmak üzere beyin ve hipokampus alüminyum düzeyi ICP-MS (indüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi) cihazı ile ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4. 1. LTP Sonuçları

Kontrol, Alüminyum ve Alüminyum+Bal (1g/kg) (her grup için 6 rat değerlendirilmiştir) gruplarında LTP indüksiyonundan önce dentate gyrus (DG) bölgesinde EPSP eğrisi (A) ve PS amplitüdü (B) ölçülerek şekil 3’ de I/O eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 3

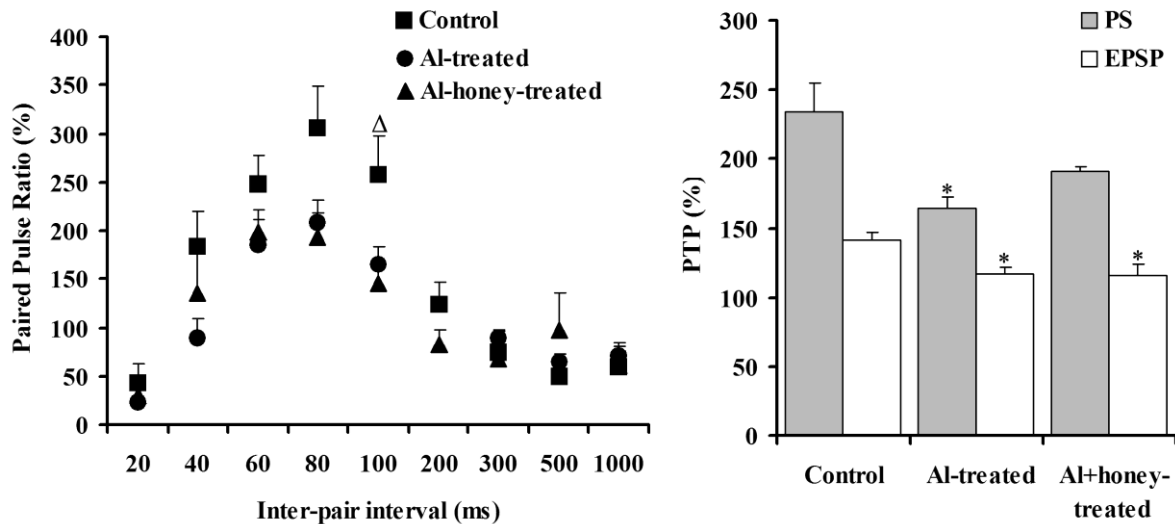
Tek yönlü ANOVA testinde uyarı şiddetlerinin hiçbirinde fEPSP eğrisinde uygulamalara bağlı anlamlı farklılık gösterilmemiştir ($F_{2,15}=0.870 - 1.245$, $P_s>0.05$). fEPSP için I/O eğrisi birçok sebepten dolayı değişebilir, örneğin populasyon içindeki bireysel sinapsların gücünün değişmesi yada sinaptik yoğunluktaki farklılıklardan dolayı olabilir. Kontrol ve Alüminyum grupları arasında fark olmaması; bu üç populasyonun DG’ deki sinaps yoğunluğunun yaklaşık aynı olduğunu ve populasyon olarak bu sinapsların tek uyarıya cevapta eşit olarak işlev gördüğünü göstermektedir.

Ancak, PS amplitüdlerinin I/O eğrisi paralel olarak aktive olan eksitasyon ve inhibisyon arasındaki etkileşimin ölçülmesini sağlar. I/O eğrileri kullanılarak PS amplitüdlerinin analizi uyarı şiddeti 1.3 mA olduğu zaman PS üzerine önemli uygulama etkisini onaylamaktadır ($F_{2,15} = 3.975$; $P = 0.041$).

Post-hoc LSD analizi alüminyum verilen gruplarda (6.3 ± 0.8 and 5.9 ± 1.2 mV) kontrol grubuna göre (9.7 ± 0.9 ; $P_s = 0.037$ and 0.021), P_s amplitüdünün daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum, bu uyarı şiddetinde alüminyum alan popülasyonda bireysel sinapsların uyarılma hızındaki azalmayı gösterir (bal uygulaması bu durumu grubunda anlamlı olarak değiştirmemiştir). 0.1 mA ($p=0.051$), 0.9 mA ($p=0.059$), 1.1 mA ($p=0.054$) ve 1.5 mA ($p=0.087$) şiddetinde de hedeflenen düzeyde uygulamanın anlamlı etkisi bulunamamıştır.

Bal, Al ile oluşturulan kısa dönem plastisite bozukluğunu tamamen önleyememiştir.

Uyarı çifti kolaylaşması ve post-tetanik potensiyasyon (her ikisi de presinaptik olaydır) kısa dönem hafıza depolanmasının mediyatörüdür ve Ca^{+2} alınımindaki artışla yansılır.



Şekil 4

Şekil 4 kısa dönem hafızanın elektrofizyolojik indikatörleri (PPF ve PTP) üzerine Al uygulamasının etkisini göstermektedir. Tek yönlü ANOVA' lar 100 msec deki trend haricinde PPR deki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir ($F_{2,13}=3.443$; $P=0.063$). Post hoc LSD testi Alüminyum+Bal (1g/kg) grubunda ($P=0.031$) kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük PPR' yi ve Al grubu ile kontrol grubu ($P=0.065$) arasında bir trendi göstermektedir. Bu bulgulara benzer olarak tek yönlü ANOVA 3 gruptaki PTP' deki farkı göstermektedir ($F_{2,13}=4.775$ ve 4.697 ; $P_s=0.028$ ve 0.029).

Kontrolle kıyaslandığında, Al grubunda ($P=0.022$) ve Al+Bal (1g/kg) ($p=0.021$) grubunda fEPSP' nin PTP' sinin anlamlı derecede düşük olduğu ve Al grubunda ($P=0.009$) PS' nin

PTP' sinin anlamlı derecede düşük olduğu post hoc LSD testinde gösterilmiştir. Bu sonuçlar Al verilmesinin kısa dönem hafızayı bozduğunu ve bal ile bunun önlenemediğini göstermektedir.

Bal, alüminyum ile oluşturulan LTP indksiyondaki bozukluğu önleyememiştir.

Tek yönlü ANOVA kullanılarak yapılan karşılaştırmalar 5 ila 10 uncu dakikalarda (LTP indüksiyonu), PS amplitüdü ($F_{S2,13}=7.016$; $P=0.009$) ve EPSP eğrisi ($F_{S2,13}=4.11$; $p=0.028$) zerine anlamlı uygulama etkisini göstermektedir.

Post hoc LSD testi, EPSP eğrisi ve PS amplitüdü ($277.7\pm29.9\%$ v.s. $184.0\pm4.0\%$ and $175.5\pm12.3\%$; $P_s < 0.05$) lldğnde, Bal ile Al ($21.8\pm8.9\%$) yada balsız Al ($117.5\pm7.3\%$) uygulana grupların kontrol grubuna göre ($145.8\pm4.7\%$; $P_s < 0.05$) bozulmuş LTP indüksiyonuna sahip olduğunu işaret etmektedir.

4. 2. Biyokimya Sonuçları

3 ayın sonunda ratların beyinleri çıkarılmış ve TOS, TAS, THİOL ve XO aktiviteleri değerlendirilmiştir. TOS lmleri Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.813$).

TAS, THİOL ve XO aktivite lmleri ANOVA testi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.488$, $p=0.577$, $p=0.249$).

4.3 Alüminyum Düzeyi Sonuçları

Hem korteks hem de hipokampüs alüminyum düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın prosedürleri proje önerisinde de belirtildiği şekilde yerine getirilmiştir. Deney hayvanlarına 3 ay süreyle alüminyum ve doğal bal, önemli sayıda deney hayvanı kaybı olmadan (sadece bir sıçan çalışmanın tamamlanmasından önce ölmüştür) yapılabilmiş, LTP ölçümleri yapılmış, beyin dokusu başarı ile alınıp biyokimyasal çalışmalar ve alüminyum konsantrasyonu ölçümü başarı ile tamamlanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular kronik alüminyum uygulamasının hipokampal fonksiyonları azalttığını göstermektedir. Bu değerli bir bulgudur. Çünkü her ne kadar alüminyumun Alzheimer hastalığına yol açtığına dair yayınlar olsa da bu durum açık değildir. Hipokampus Alzheimer hastalığından en çok etkilenen beyin kısımlarından biridir. Bundan dolayı bu çalışmanın bulguları alüminyumun Alzheimer hastalığının nedenlerinden biri olduğuna dair görüşleri desteklemektedir.

Diğer yandan alüminyum ön görülenin aksine, sunulan bu çalışmada oksidatif strese yol açmamıştır. Bu durum alüminyumun nispeten düşük dozda uygulanmasına bağlanabilir. Bu çalışmada alüminyum dozu diyet ve içme suyu ile maruz kalınabilecek miktarlara eş değer olarak belirlenmişti. Daha yüksek miktarlarda alüminyum maruziyeti mümkündür. Alüminyum endüstrisi çalışanları ve diyalize giren hastalar (bir dönem yüksek miktarda alüminyum içeren diyaliz sıvıları kullanılıyordu) örnek olarak verilebilir. Dolayısıyla literatürde daha yüksek dozda alüminyumun kullanıldığı ve alüminyumun oksidatif stres ile ilişkilendirildiği çalışmalara rastlamak mümkündür. Ancak proje önerisinde de belirtildiği gibi diyet ve içme suyundaki alüminyumun Alzheimer hastalığına yol açtığı konusunda çelişkili bilgiler vardır. Bu durumun aydınlatılması amacıyla bu çalışmada nispeten düşük doz alüminyum uygulaması seçilmiştir.

Kronik bal uygulaması ise hipokampus fonksiyonlarındaki azalmayı önleyememiştir. Diğer yandan sunulan bu çalışma balın muhtemel toksik etkilerinin değerlendirilmesi bakımından önemlidir. Bal yaygın olarak tüketilen bir gıda maddesidir. Ama gıda bile olsa her maddenin tüketilen miktarı arttıkça zararlı etkileri söz konusu olabilir. Çalışmada bal kullanılan deney gruplarına sırasıyla 0,1 g/kg, 1g/kg ve 10g/kg bal verilmiştir. En son doz 70 kg'lık bir insan için günlük 700 gr bala eşdeğerdir. Bu kadar yüksek miktarda bal alan deney grubunda bile oksidatif hasarın olmaması ve hipokampus fonksiyonunu azaltmaması önemli bir bulgudur.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmanın bulguları alüminyumun Alzheimer hastalığına yol açan faktörlerden biri olduğu yönündeki görüşleri desteklemekte, ama diyet ve içme suyu ile maruz

kalınan alüminyumun önemli bir derecede nörolojik hasara yol açamayacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. United Nations, Population Division, Department of Economic and Social Affairs, Ageing: <http://www.who.int/whosis>.
2. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Başkanlığı, <http://www.die.gov.tr>.
3. Green RC. Alzheimer's disease and other dementing disorders in adults. Clinical Neurology, RJ Joynt (Ed), Lippincot-Raven, Philadelphia, s.1-83,1995.
4. Karaman Y. Alzheimer hastalığı ve diğer demanslar. 1. Baskı. Ankara, Lebib Yalkın Matbaası, 2002.
5. Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS. Alzheimer hastalığı. Çeviri editörü İ. Hakan Gürvit. Yelkovan Yayıncılık, İstanbul, 2001
6. Yamada M. Prevalance and risk of dementia in the japanese population. REFR adult heath study. JAGS 1999; 47: 189-195
7. Launer LJ. Rates and risk for dementia and Alzheimer disease. Resaults from EURODEM pooled analysis. Neurology 1999; 78-84
8. C. STRUYS-PONSAR, A. KERKHOF, and et al. Effects of Aluminum Exposure on Behavioral Parameters in the Rat, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1997, Vol. 56, No. 4, pp. 643–648.
9. Obulesu M, Rao DM. Animal models of Alzheimer's disease: an understanding of pathology and therapeutic avenues. Int J Neurosci. 2010 Aug;120(8):531-7.
10. Bogdanov S, Jurendic T et al. Honey for nutrition and health: a review. J Am Coll Nutr. 2008 Dec;27(6):677-89.
11. Blasa M, Candiracci M, et al. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. FoodChem, 2006, 97:217–222.
12. Axelsen PH, Komatsu H, Murray IV. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Physiology (Bethesda). 2011 Feb;26(1):54-69. Review.
13. Park HL, O'Connell JE, Thomson RG. A systematic review of cognitive decline in the general elderly population. Int J Geriatr Psychiatry 18, 1121-1134, 2004.
14. Kawas CH. Clinical practice. Early Alzheimer's disease. N Eng J Med, 349, 1056 1063,2003.

15. Alfrey AC. Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 1994; 23: 183–87.
16. Anthony J, Fadl S, Mason C, Davidson A, Berry J. Absorption, deposition and distribution of dietary aluminum in immature rats: Effects of dietary vitamin D3 and food-borne chelating agent. *J. Environ. Sci. Health B* 1986; 21: 191–205 pp.
17. Baydar T, Aydin A, Duru S, Isimer A and Sahin G. Aluminum in enteral nutrition formulas and parenteral solutions. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997; 35: 277–81 pp.
18. Blundell G, Henderson W J, and Price EW. Soil particles in the tissues of the foot in endemic elephantiasis of the lower legs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1989; 83: 381– 85 pp.
19. Bolla KI, Briefel G, Spector D, Schwartz BS, Wieler L, Herron J, and Gimenez L. Neurocognitive effects of aluminum. *Arch. Neurol.* 1992;49: 1021–26 pp.
20. Greger JL, and Sutherland JE. Aluminum exposure and metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1997; 34: 439–74 pp.
21. Goetz JL, and Sullivan D. Aluminum levels in foods cooked and stored in aluminum pans, trays and foil. *J. Food Prot.* 1985; 48: 772–7 pp.
22. Han J, and Dunn MA. Effect of dietary aluminum on tissue nonheme iron and ferritin levels in the chick. *Toxicology* 2000; 142: 97–109 pp.
23. Harris WR, Berthon G, Day JP, Exley C, Flaten TP, Forbes W F, Kiss T, Orvig C, And Zatta PF. Speciation of aluminum in biological system. *J. Toxicol. Environ. Health* 1996; 48: 543–68 pp.
24. Hirschberg R, Herrath D, von, Voss R, Bossaller W, Mauelshagen U, Pauls A, and Schaefer K. Organ distribution of aluminum in uremic rats: Influence of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Miner. Electrolyte Metab.* 1985; 11: 106– 10 pp.
25. Jeffery EH, Jansen HT, and Dellinger JA. In vivo interaction of aluminum with hepatic cytochrome P450 and metallothionein. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1987; 8: 541– 8 pp.
26. Jogetti V, Lopez BD, Caorsi H, Ferreira A, Palma A, Menendez P, Douthat W, Olaizola I, Ribeiro S, Jarava C, Moreira E, and Cannata J. Different patterns of renal osteodystrophy in Iberoamerica. *Am. J. Med. Sci.* 2000 320: 76–80 pp.
27. Veer Bala Guptaa, S. Anithaa, M. L. Hegdea, L. Zeccab, R. M. Garrutoc, R. Ravidd, S. K. Shankare, R. Steinf, P. Shanmugavelu g and K. S. Jagannatha Raoa, Aluminium in

Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 143–158.

28. Pricilla C.F. , Kamila de. P et. al. , ALUMINUM AS A RISK FACTOR FOR ALZHEIMER'S DISEASE. *Rev Latino-am Enfermagem* 2008 janeiro-fevereiro; 16(1):151-7.

29. Stephen C. B. , The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue, *Neurotoxicology*. 2010, 31(5): 575–581.

30. L. MARTAĆ1, J. PODGORAC1, and S. SEKULIĆ2, EVALUATION OF THE NEUROTOXICAL EFFECT OF ALUMINUM ON THE WISTAR RAT. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 2010, 62 (3), 585-588.

31. Masahiro K. , Midori K. N. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 17 pages.

32. Tania G., Diana R. , et. al. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease. *Toxicology*, 265, 2009, 49–55.

33. Chia-Yi Y. , Guoo-Shyng Wang H. , Yih-Jing L. Aluminum alters NMDA receptor 1A and 2A/B expression on neonatal hippocampal neurons in rats. *Journal of Biomedical Science*, 2011, 18, 81-90.

34. Anil K. , Atish P. , Samrita D. Neuroprotective effect of carvedilol against aluminium induced toxicity: possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Pharmacological Reports*, 2011, 63, 915-923.

35. Chia-Yi Y. , Yih-Jing L., Guoo-Shyng W. H. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. Yuan et al. *Journal of Biomedical Science* 2012, 19, 51-60.

36. Ďurfinová M., Brechtlová M., et. al. Influence of Some Mineral Ions on Lipid Peroxidation in Vitro. *Prague Medical Report*, 2012, 3, 181–188.

37. Prasunpriya N. , Ajay K. C. Dietary protein restriction causes modification in aluminum-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. *BMC Neuroscience*, 2012, 4, 8 pages.

38. Kamboj VP, and Kar AB. Antitesticular effect of metabolic and rare earth salts. *J. Reprod. Fert.* 1964; 7: 21–28 pp.

39. Carl A. Edward R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3 edition 1999.

40. Kurt GS. Alzheimer hastalığında genetik dışı etyolojik faktörler. *Türkiye klinikleri Nöroloji Dergisi* 2003; 1(1): 38-44.

41. Munoz DG. Is exposure to aluminium a risk factor for the development of Alzheimer disease? *Arch Neurol* 1998; 55(5): 737-739.
42. Klein GL. The possible adverse effect of the use of aluminum hydroxide in chronic diarrhoea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1984. 31: 6-47 pp.
43. Klein GL, Herndon DN, Rutan TC, Barnett JR, Miller NL, and Alfrey AC. Risk of aluminum accumulation in patients with burns and ways to reduce it. *J. Burn Care Rehab.* 1994; 15: 354–8 pp.
44. Kausz AT, Antonsen JE, Hercz G, Pei Y, Weiss NS, Emerson S. and Sherrard DJ. Screening plasma aluminum levels in relation to aluminum bone disease among asymptomatic dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1999; 34: 688–93 pp.
45. Kavoussi LR, Gelstein LD, and Andriole GL. Encephalopathy and an elevated serum aluminum level in patients receiving intravesical alum irrigation for severe urinary hemorrhage. *J. Urol.* 1986; 136: 665–7 pp.
46. Kerr DN, Ward MK, Ellis HA, Simpson W, and Parkinson IS. Aluminium intoxication in renal disease. *Ciba Found. Symp.* 1992; 169: 123–35 pp.
47. Perry G, Cash AD, Srinivas R, et al. Metals and oxidative homeostasis in Alzheimer's disease. *Drug Dev Res* 2002; 56: 293-299.
48. Birnboim HC: DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter phorbol myristate acetate. *Science* 1982; 215:1247–9pp.
49. Moraes EC, Keyse SM, Tyrell RM; Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 1990; 31: 283–93pp.
50. Md. Ibrahim K. , Mohammed M., et al. Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Molecules* 2012, 17, 11199-11215.
51. Alejandro G., Nuria D. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration* 2009, 3, 88-93.
52. Manuela P. , Alin C. , et al. THE OXIDATIVE STRESS HYPOTHESIS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Psychiatria Danubina* 2013; Vol. 25, No. 4, pp 401-409.
53. Hıslı, Y. , N. Bökçioğlu 1986. Balın Bileşimi ve Bala Yapılan Hileler. *Gıda, Gıda Teknolojisi Dergisi Yayın Organı*, 2: S.79–82.
54. Anonim 2003a. Honey-Health and Therapeutic Qualities. National Honey Board.
55. Takeshi, N. , Mizuho, S., Reiji, I., Hachiro, I., Nobutaka, S. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food Chemistry*. 237- 240.

56. Stefan B. , Tomislav J. Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 2008, 27(6), 677–689.
57. Lee Suan C. , Norul Liza A. R. , et. al. Antioxidant Activity of Three Honey Samples in relation with Their Biochemical Components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 8 pages.
58. Mohammed M., Siti Amrah S. Et al. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 2013, 7, 138-150.
59. Asiful I., Ibrahim K. , et al. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12, 177-187.
60. Mahaneem M., Siti Amrah S. , et al. Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 5508-5521.
61. NadiaMohd E. , NorazlinaM. , et al. The Effects of Tualang Honey on Bone Metabolism of Postmenopausal Women. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 7 pages.
62. Galal RM, Zaki HF, et. al. Potential protective effect of honey against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Arch Iran Med.* 2012; 15(11): 674 – 680.
63. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği, T.C. Resmi Gazete, 27 Temmuz 2012, Sayı 28366.
64. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidat protection against hypochlorus acid in human plasma. *J. Lab. Clin. Med* 1993, 121, 257-262.
65. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-liked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975, 59, 245-249.

