

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

**AŞILARDA KULLANILAN KORUYUCU VE ADJUVAN
MADDELERİN OLASI TOKSİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Mehmet Evren ÖZTÜRK

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

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

**AŞILARDA KULLANILAN KORUYUCU VE ADJUVAN
MADDELERİN OLASI TOKSİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Mehmet Evren ÖZTÜRK

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AŞILARDA KULLANILAN KORUYUCU VE ADJUVAN MADDELERİN OLASI TOKSİK
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
Öğrenci: Mehmet Evren Öztürk
Danışman: Prof.Dr. Ü. Pınar Erkeköglü

Bu tez çalışması 31.01.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof.Dr. Terken Baydar*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof.Dr. Ü.Pınar Erkeköglü*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Gözde Girgin*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Suna Sabuncuoğlu*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Dr.Öğr. Üyesi Göksun Demirel*
(Çukurova Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

28 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .. ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

...../...../.....

Mehmet Evren ÖZTÜRK

1“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Mehmet Evren ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bilgisi, ileri görüşlülüğü ile ufkumu açan, desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanın Sayın Prof. Dr. Ülfet Pınar Erkekoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca destek veren Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tez çalışmalarımda bana desteği ile ve dostluğu ile her zaman yanımda olan Uzm. Ecz. Anıl Yirün, Dr. Ecz. Aylin Balcı Özyurt, Dr. Bio. Didem Oral, Uzm. Kim. Selinay Başak Erdemli Köse'ye ve Bio. Deniz Arca Çakır'a,

Tezimin TYL-2020-18729 proje koduyla desteklenmesi sebebiyle Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Fedakârlıkları, sevgileri ile ve bana olan inançlarını hiç kaybetmeden her zaman destek olan aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Öztürk, M.E., Aşıllarda kullanılan koruyucu ve adjuvan maddelerin olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Dünya Sağlık Örgütü aşıları “immün sistemimizin virüs ve bakteri gibi patojenleri tanıyıp onlarla savaşmasını sağlayan ve bunların oluşturduğu hastalıklara karşı vücudumuzu koruyan farmasötik ürünler” olarak tanımlamaktadır. Aşılarla her yıl milyonlarca hayat kurtulmaktadır. Ancak, aşı bileşenlerinin güvenliliği ile ilgili tartışmalar devam etmekte ve bu tartışmalar “aşı reddi” veya aşı kararsızlığına yol açmaktadır. Özellikle aşıllarda adjuvan olarak kullanılan alüminyum bileşikler ve koruyucu olarak kullanılan tiyomersalin güvenliliği ile ilgili ciddi endişeler vardır. Bu tezde, tiyomersalin ve alüminyumun olası toksik etkilerinin ayrı ayrı uygulanarak ve birarada uygulanarak SH-SY5Y hücre hattında kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Tiyomersal ve alüminyumun sitotoksik etkileri değerlendirilmiş; inhibitör konsantrasyon 20 (IC₂₀) tiyomersal için 1,15 µM, alüminyum için ise 362 µM olarak belirlenmiştir. Sonrasında tiyomersal ve alüminyum hücrelere ayrı ayrı ve birarada hücrelere IC₂₀ dozunda 24 saat boyunca uygulanmıştır. IC₂₀ konsantrasyonu 24 saat boyunca uygulanan hücrelerde oksidatif stres parametreleri, DNA hasarı, NRF2 protein düzeyleri, nörotransmitter düzeyleri (dopamin, norepinefrin) ve dopamin taşıyıcı protein (DAT) düzeyleri ölçülmüştür. Alüminyum ve alüminyum+tiyomersal uygulanan hücrelerde hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS)’un düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Alüminyum uygulanan grupta total GSH düzeyleri azalmıştır. Alüminyum uygulanan ve alüminyum+tiyomersal uygulanan gruplarda total antioksidan kapasite (TAOC) ve protein oksidasyon düzeyleri önemli derecede yükselmiştir. Alüminyum ve alüminyum+tiyomersal uygulanan gruplarda lipit peroksidasyonu istatistiksel önemli bir şekilde artmıştır. Tüm uygulama gruplarında NRF2 düzeyleri ve DNA hasarı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Dopamin düzeyleri, tiyomersal ve alüminyum+tiyomersal uygulanan hücrelerde önemli derecede artarken, DAT düzeyleri tüm deney gruplarında kontrole göre yüksek bulunmuştur. Norepinefrin düzeyleri deney gruplarında anlamlı derecede değişmemiştir. Bu bulgular hem tiyomersalin hem de alüminyumun nöroblastoma hücrelerinde oksidan/antioksidan statüyü değiştirebildiğini ve DNA hasarına yol açabildiğini göstermektedir. Ayrıca, tiyomersal ve/veya alüminyum nöroblastoma hücrelerinde dopamin ve DAT üzerinde önemli derecede modifiye edici etkiye sahiptir. Genel bir değerlendirme yapıldığında ise alüminyum+tiyomersal uygulanan hücrelerde görülen değişikliklerin daha belirgin olduğu ifade edilebilir. İnfluenza aşıları dahil bazı aşıllarda her iki bileşiğin bulunması nadiren de olsa söz konusu olmaktadır. Bu nedenle, özellikle bebekler ve çocuklar gibi hassas popülasyonların aşılanmasında dikkatli olunmalı ve gerek tiyomersal gerekse alüminyum bileşikleri yerine daha güvenli alternatifler geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: alüminyum, tiyomersal, oksidatif stres, nörotransmitter, dopamin

ABSTRACT

Öztürk, M.E., Evaluation of possible toxic effects of preservatives and adjuvants used in vaccines. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Toxicology Program Master Thesis, Ankara, 2022. The World Health Organization defines vaccines as “pharmaceutical products that enable our immune system to recognize and fight pathogens such as viruses and bacteria and protect our body against the diseases caused by them”. Vaccines save millions of lives each year. However, discussions about the safety of vaccine components continue, leading to "vaccine rejection" or “vaccine hesitancy”. There are serious concerns about the safety of aluminum compounds used as adjuvant and thiomersal used as preservative in vaccines. In this thesis, we aimed to evaluate the possible toxic effects of seperatedly or combined applied thiomersal and aluminum in SH-SY5Y cell line by comparing with the control group. The cytotoxic effects of thiomersal and aluminum were evaluated; inhibitory concentration 20 (IC₂₀) was determined as 1.15 μM for thiomersal and 362 μM for aluminum. Afterwards, thiomersal and aluminum were applied to the cells separately and together at the dose of IC₂₀ for 24 hours. Oxidative stress parameters, DNA damage, NRF2 protein levels, neurotransmitter levels (dopamine, norepinephrine) and dopamine transporter protein levels were measured after IC₂₀ concentration of these compounds were applied for 24 hours. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels increased significantly in cells treated with aluminum and aluminum+thiomersal. Total GSH levels decreased in the aluminum administered group. Total antioxidant capacity (TAOC) and protein oxidation levels increased significantly in the aluminum-treated and aluminum+thiomersal-administered groups. Lipid peroxidation increased in a statistically significant way in the groups treated with aluminum and aluminum+thiomersal. NRF2 levels and DNA damage were found to be significantly higher in all treatment groups. While dopamine levels increased significantly in cells treated with thiomersal and aluminum+thiomersal, DAT levels were found to be higher in all experimental groups compared to the control. Norepinephrine levels did not change significantly in the experimental groups. These findings show that both thiomersal and aluminum can change the oxidant/antioxidant status in neuroblastoma cells and cause DNA damage. In addition, thiomersal and/or aluminum have a significant modifying effect on dopamine and DAT in neuroblastoma cells. When a general evaluation is made, it can be stated that the changes observed in cells treated with aluminum + thiomersal are more pronounced. In some vaccines, including vaccines for influenza, both compounds are present although rarely. Therefore, care should be taken in vaccinations, especially in sensitive populations such as infants and children, and safer alternatives of thiomersal and aluminum compounds should be developed.

Key Words: aluminum, thiomersal, oxidative stress, neurotransmitter, dopamine

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiii |
| ŞEKİLLER | xv |
| TABLolar | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Aşılamanın Tarihçesi | 4 |
| 2.2. Aşı Türleri | 5 |
| 2.2. Aşıların Temel Bileşenleri | 7 |
| 2.3. Alüminyum Tuzları | 9 |
| 2.4. Koruyucular | 11 |
| 2.4.1. Tiyomersal | 11 |
| 2.5. Otizm | 12 |
| 2.5.1. Otizmin Etiyolojisi | 13 |
| 2.5.2. OSB'nin Patogenezi | 13 |
| 2.5.3. Aşılama ve Otizm Arasındaki Olası İlişkinin Değerlendirilmesi | 15 |
| 2.6. Nörotransmitterler | 17 |
| 2.6.1. Dopamin | 17 |
| 2.6.2. Norepinefrin | 18 |
| 2.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) | 19 |
| 2.8. Glutatyon | 19 |
| 2.9. TAOC | 20 |
| 2.10. Lipit Peroksidasyon | 21 |
| 2.11. Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2 (NRF2) Yolağı | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 23 |
| 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 23 |
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı | 24 |
| 3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması | 24 |
| 3.4.1. Tiyomersal Çözeltisinin Hazırlanışı | 24 |
| 3.4.2. Alüminyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması | 24 |
| 3.4.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler | 24 |
| 3.4.4. ROS Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 25 |
| 3.4.5. Hücrelerin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler | 25 |
| 3.4.6. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 26 |
| 3.4.7. Total GSH Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 26 |
| 3.4.8. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler | 27 |
| 3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 28 |
| 3.4.10. TAOC Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 28 |
| 3.4.11. DBH Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 29 |
| 3.4.12. DA Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler | 30 |
| 3.4.13. NE Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler | 30 |
| 3.4.14. DAT Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler | 30 |
| 3.4.15. NRF2 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 31 |
| 3.4.16. DNA Oksidatif Hasar Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 31 |
| 3.5. Hücreler ve Deney Grupları | 32 |
| 3.5.1. Deney Grupları | 32 |
| 3.5.2. Donmuş Hücrelerin Çözülme İşlemleri | 32 |
| 3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması | 33 |
| 3.5.4. Hücrelerin Besiyeri Değişimi | 33 |
| 3.5.5. Hücrelerin Dondurulma İşlemi | 34 |
| 3.5.6. Hücre Sayım İşlemi Basamakları | 34 |
| 3.6. Deneysel İşlemler | 35 |
| 3.6.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Ölçümü | 35 |
| 3.6.2. Hücre İçi ROS Tayini | 36 |
| 3.6.3. Protein Miktarının Ölçümü | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.4. Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü | 38 |
| 3.6.5. Total GSH Düzeylerinin Ölçümü | 39 |
| 3.6.6. TAOC Ölçümü | 40 |
| 3.6.7. Lipit peroksidasyonunun Tayini | 41 |
| 3.6.8. DA Düzeylerinin Tayini | 42 |
| 3.6.9. DAT Düzeylerinin Tayini | 43 |
| 3.6.10. DBH Düzeylerinin Ölçümü | 44 |
| 3.6.11. NE Düzeylerinin Tayini | 45 |
| 3.6.12. NRF2 Düzeylerinin Tayini | 46 |
| 3.6.13. DNA İzolasyonu | 47 |
| 3.6.14. DNA Oksidatif Hasar Düzeylerinin Ölçümü | 47 |
| 3.6.15. İstatistiksel Analiz | 48 |
| 4. BULGULAR | 50 |
| 4.1. Sitotoksisite | 50 |
| 4.2. Hücre içi ROS Üretimi | 52 |
| 4.3. Total GSH Düzeyleri | 53 |
| 4.4. TAOC Düzeyleri | 55 |
| 4.5. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri | 56 |
| 4.6. Protein Karbonil Düzeyleri | 58 |
| 4.7. NRF2 Düzeyleri | 59 |
| 4.8. DNA Hasarı | 60 |
| 4.9. DA Düzeyleri | 62 |
| 4.10. DAT Düzeyleri | 63 |
| 4.11. DBH Düzeyleri | 64 |
| 4.12. NE Düzeyleri | 65 |
| 5. TARTIŞMA | 67 |
| 5.1. Tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler | 68 |
| 5.2. Alüminyum maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler | 74 |
| 5.3. Alüminyum + tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler | 76 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 79 |
| 7. KAYNAKLAR | 81 |
| 8. EKLER | |

EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

EK 2. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------------------|---|
| •OH | : Hidroksil Radikali |
| ¹O₂ | : Singlet Oksijeni |
| 8-OHdG | : 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| ABTS | : 2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolin sülfonat) |
| ARE | : Antioksidan Yanıt Elementi |
| ATCC | : American Type Cell Collection |
| BSA | : Sığır Serum Albumini |
| CNC | : Cap 'n' Collar |
| DA | : Dopamin |
| DAT | : Dopamin Taşıyıcı Protein |
| DBH | : Dopamin beta hidroksilaz |
| DME | : İlaç Metabolize Edici Enzim |
| DMSO | : Dimetil Sülfoksit |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| DNPH | : 2,4-Dinitrofenilhidrazin |
| DPBS | : Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi |
| DPT | : Difteri-boğmaca-tetanoz |
| DT | : Difteri-Tetanoz |
| DTNB | : 5,5'- Ditiyo- Bis-(2- Nitrobenzoik asit) |
| EDTA | : Etilendiamin Tetra Asetik Asit |
| ELISA | : Enzim-Bağlı İmmünosorban Yöntemi |
| FBS | : Fötal Sığır Serumumu |
| FDA | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| GR | : Glutasyon Redüktaz |
| GSH | : Glutasyon |
| GSSG | : Glutasyon Disülfid |
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| HAV | : Hepatit A Virüsü |
| Hg | : Cıva |
| Hib | : <i>Haemophilus influenzae</i> Tip b |
| HO₂[•] | : Hidroperoksil Radikali |
| HPV | : İnsan Papilloma Virüsü |
| HRP | : Bayır Turpu Peroksidazı |

| | |
|-----------------------------------|---|
| IC₂₀ | : İnhibitör Konsantrasyon 20 |
| IC₃₀ | : İnhibitör Konsantrasyon 30 |
| IC₅₀ | : İnhibitör Konsantrasyon 50 |
| InsP3 | : İnositol Trifosfat Reseptörü 3 |
| KBB | : Kan-Beyin Bariyeri |
| KKK | : Kızamık-Kabakulak-Kızamıkçık |
| MDA | : Malondialdehit |
| MPL | : Monofosforil Lipid A |
| mRNA | : Mesajcı RNA |
| MSS | : Merkezi Sinir Sistemi |
| MTT | : 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür |
| NE | : Norepinefrin |
| NET | : Norepinefrin Taşıyıcı Protein |
| NFE2 | : Nükleer Faktör Eritroid 2 |
| NFκB | : Nükleer Faktör Kappa B |
| NRF2 | : Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2 |
| O₂^{-•} | : Süperoksit Radikali |
| OSB | : Otizm Spektrum Bozukluğu |
| PCB | : Poliklorlu Bifeniller |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| RNS | : Reaktif Nitrojen Türleri |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| SDS | : Sodyum Dodesil Sülfat |
| SH-SY5Y | : İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı |
| TAOC | : Total Antioksidan Kapasite |
| TBA | : Tiyobarbitürik Asit |
| TBARS | : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri |
| TCA | : Trikloroasetik asit |
| TH | : Tirozin Hidroksilaz |
| TNB | : 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit |
| VTA | : Ventral Tegmental Alan |

ŞEKİLLER

| Şekil | | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1. | Aşı türleri | 6 |
| 4.1. | Alüminyum için örnek bir sitotoksisite grafiği. | 51 |
| 4.2. | Tiyomersal için örnek bir sitotoksisite grafiği. | 52 |
| 4.3. | Deney gruplarında hücre içi ROS üretimi. | 53 |
| 4.4. | GSH standart grafiği. | 54 |
| 4.5. | Deney gruplarında toplam GSH düzeyleri. | 55 |
| 4.6. | TAOC standart grafiği. | 55 |
| 4.7. | Deney gruplarında Taoc düzeyleri. | 56 |
| 4.8. | MDA standart grafiği. | 57 |
| 4.9. | Deney gruplarında MDA düzeyleri. | 58 |
| 4.10. | Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri. | 59 |
| 4.11. | NRF2 standart grafiği. | 59 |
| 4.12. | Deney gruplarında NRF2 düzeyleri. | 60 |
| 4.13. | 8-OHdG standart grafiği. | 61 |
| 4.14. | Deney gruplarında 8-OHdG düzeyleri. | 62 |
| 4.15. | Deney gruplarında DA düzeyleri. | 63 |
| 4.16. | Deney gruplarında DAT düzeyleri. | 64 |
| 4.17. | Deney gruplarında DBH düzeyleri. | 65 |
| 4.18. | Deney gruplarında NE düzeyleri. | 66 |

TABLULAR

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|---|--------------|
| 4.1. | Alüminyum için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları. | 50 |
| 4.2. | Tiyomersal için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları. | 51 |
| 4.3. | Alüminyum ve tiyomersal için belirlenen ortalama IC ₅₀ , IC ₃₀ ve IC ₂₀ dozları. | 52 |
| 4.4. | Deney gruplarında hücre içi ROS üretimi. | 53 |
| 4.5. | Deney gruplarında toplam GSH düzeyleri. | 54 |
| 4.6. | Deney gruplarında TAOC düzeyleri. | 56 |
| 4.7. | Deney gruplarında MDA düzeyleri. | 57 |
| 4.8. | Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri. | 58 |
| 4.9. | Deney gruplarında NRF2 düzeyleri. | 60 |
| 4.10. | Deney gruplarında 8-OHdG düzeyleri. | 61 |
| 4.11. | Deney gruplarında DA düzeyleri. | 62 |
| 4.12. | Deney gruplarında DAT düzeyleri. | 63 |
| 4.13. | Deney gruplarında DBH düzeyleri. | 64 |
| 4.14. | Deney gruplarında NE düzeyleri. | 65 |

1. GİRİŞ

Aşılar enfeksiyon ajanlarına karşı hayvan ve insanları korumak için geliştirilen biyolojik ürünlerdir. Aşıların uygulanmasında temel amaç enfeksiyon ajanları nedeniyle oluşabilecek sakat kalmaları, hayat kalitesinde düşmeleri ve ölümleri engellemektir. Dünya genelinde aşı uygulanması ile birçok hastalık yeryüzünden silinmiş ve enfeksiyon hastalıkları nedeniyle görülen morbidite ve mortalitede ciddi düşüşler sağlanabilmiştir (1).

Aşı uygulanmasındaki temel amaç immün sistemi uyararak, bakteri ve virüs gibi enfeksiyon ajanlarına karşı koruma sağlayabilmektir. Aşılar canlı virüs ve bakterilerin attenüe (zayıflştırılmış) formlarını içerebilecekleri gibi inaktive virüs ve bakterileri de içerebilirler. Canlı attenüe aşılar en iyi bağışıklığı sağlarken, inaktive aşıların canlı aşılar kadar iyi bağışıklık sağlayamadığı bilinmektedir. Ancak, inaktif aşıların olası sağlık riskleri canlı attenüe aşılarla göre daha düşüktür. Bu iki tip aşıdan sonra toksoid aşılar, rekombinant aşılar, mesajcı RNA (mRNA) aşıları gibi yeni tip aşılar da geliştirilmiştir. Yeni aşıların oluşturduğu immünojenisite canlı ve inaktive aşılarından genelde düşük olmakla birlikte, yan etkileri azdır ve daha güvenlidirler. Ancak, bu yeni aşıların oluşturabileceği sağlık risklerini önceden belirlemek zordur ve aşığı temel alarak bireysel değerlendirme yapmak daha doğrudur (1,2). İdeal bir aşı güvenilir olan ve en uygun maliyetle üretilebilen aşıdır (3,4). Aşıların immünojenisitesi yüksek olmalı ve hem hücresel hem de humoral immüniteyi sağlamalıdır ve böylece enfeksiyon hastalıklarının eradike edilmesini hızlı bir şekilde sağlayabilmelidir (5-7). Aşılama sayesinde geçen yüzyılda insan hayatını ciddi anlamda tehdit edip, ağır morbidite ve mortaliteye yol açan enfeksiyonlar artık aşıyla önlenebilir hastalıklar halini almışlardır ve popülasyon bazında önemli başarılar elde edilmiştir (7-9).

Özellikle çiçek virüsüne karşı kazanılan başarı ile tüm dünyada aşıların önemi iyi bir şekilde anlaşılmıştır (9). Günümüzde aşılama sayesinde difteri, tetanoz, boğmaca, grip ve kızamık gibi hastalıklardan her yıl 2-3 milyon ölüm engellenmektedir. Özellikle çocuk ölümlerinin aşılar sayesinde önlenmesi aşı uygulama programlarının en büyük başarısıdır (10). Günümüzde aşılama programları kızamık, kabakulak, kızamıkçık, suçiçeği, boğmaca, difteri, tetanoz, invaziv *Haemophilus influenzae* Tip b (Hib) enfeksiyonları, hepatit A virüsü (HAV), viral

hepatit B, invaziv *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonları, influenza, insan papilloma virüsü (HPV), rotavirüs, invazif meningokok ve çocuk felci gibi aşıları içermektedir (11).

Aşılar stratejik biyolojik ürünler olmaları ve dünya genelinde su sanitasyonu ile birlikte insan ölümlerini engelleyen en önemli araç olmalarına rağmen içerdikleri bileşenlerin toksik etkileri yıllardır tartışma konusu olmuştur. Özellikle adjuvan olarak kullanılan alüminyum tuzları ve koruyucu olarak kullanılan tiyomersale, bilim dünyasının ilgisindeki artış bu bileşenlerin olası toksik etkilerinin yoğun olarak araştırılmasını beraberinde getirmiştir. Alüminyumun toksik etkileri yıllardır bilinmekle birlikte, aşılarda kullanılan dozları oldukça düşüktür. Diğer taraftan, tiyomersal bir organik cıva (Hg) bileşidir. Ancak, tiyomersalin de aşılarda kullanılan dozunun oldukça düşük olduğu, çoklu doz aşılarından bile maruziyetin çok yüksek olmadığı bilinmektedir. Ancak, her iki bileşeni de içeren aşıların güvenilirlik değerlendirmeleri yeterli değildir ve alüminyum ve Hg'ye bir arada maruziyet ile ortaya çıkabilecek olası toksisitenin değerlendirildiği bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, sunulan tez çalışmasında, alüminyum ve tiyomersalin ayrı ayrı ve birarada uygulanması ile nöroblastoma hücrelerinde oluşturabilecekleri olası oksidatif stres ve nörotransmitter değişiklikleri değerlendirilmiştir. Oksidatif stres göstergesi olarak total glutatyon (GSH), total antioksidan kapasite (TAOC), lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ölçülmüştür. Ayrıca, Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı değerlendirilmiştir. Diğer taraftan, nörotoksisitenin bir göstergesi olarak dopamin (DA), dopamin taşıyıcı protein (DAT) ve norepinefrin (NE) düzeyleri değerlendirilmiştir. Tez kapsamında elde edilen veriler, alüminyum ve tiyomersalin bir arada kullanıldığı aşı formülasyonlarının olası toksik etkilerinin daha iyi değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Aşılar patojenlere maruziyet sonucunda oluşabilecek hastalık ya da enfeksiyonlara karşı korunma amacıyla immün cevabı indükleyen biyolojik ürünlerdir. Bağışıklık sisteminde hastalıklara karşı güçlü bir direnç oluşturan aşılar, enfeksiyon hastalıklarına karşı en etkili korunma yollarıdır. Aşılar canlı ya da öldürülmüş virüsler, saflaştırılmış viral proteinler, bakteriyel polisakkaritler, inaktive bakteriyel toksinler gibi immünojenler içerebilir (1,2). Ayrıca aşılar sıkça bakteriyel ya da fungal kontaminasyonu önleyen koruyucular (örn. tiyomersal), antijene özgü bağışıklık yanıtını artırmak için adjuvanlar (örn. alüminyum tuzları), zayıflatılmış canlı virüsleri stabilize etmek için katkı maddeleri (örn. jelatin, insan serum albümini) içerebilir. Bunlardan başka üretim aşamasında kullanılan rezidüel miktarlarda formaldehit, yumurta proteinleri, maya proteinleri ve antibiyotikler de aşılarda eser düzeylerde bulunabilir (12).

Aşı yoluyla vücudun doğal bağışıklık sistemi antikor üretmekte ve bu yolla kazanılan direnç mikroorganizmaların hastalık yapma riskini azaltmaktadır (1,2). Aşılama sonucu aşı antijenine karşı oluşan immün yanıt ile enfeksiyona karşı tam korunma, hastalığın şiddetinde veya hastanede tedavi riskinde azalma gibi faydalar sağlanmaktadır (3). Aşılama (bağışıklama) temelde dışarıdan, belirli koşullar altında verilen bir maddeye karşı kişinin “bağışıklık yanıtı” ve bunun sonucunda “bağışıklık hafızası (bellek)” geliştirmesi sürecidir. Burada yapılan, hastalığa neden olan mikroorganizmanın bağışıklık sistemini uyuracak kısım(lar)ının (immünojen) belirlenerek kontrollü bir şekilde insan vücuduna verilmesi, böylelikle bağışıklık sisteminin bu mikroorganizmayı sonraki karşılaşmada tanımını sağlamaktır (1). Aşılama çocukların ve yetişkinlerin sağlığını korumada ve bulaşıcı hastalıkları önlemede en etkili, en güvenilir ve en uygun maliyetli uygulamadır (13). Aşılar modern tıp ve halk sağlığı için en büyük başarılarından biridir (14). Aşılama bulaşıcı hastalıkların önlemesi için en etkili stratejilerden biri olarak kabul edilir (5). Aşılar bağışıklık sistemini yönlendirerek vücutta bulaşıcı ajanların ve/veya toksik ürünlerin hızlıca yok edilmesini sağlayarak etki eder (6). Geçmişte yaygın olan ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar artık aşıyla önlenabilir hastalıklar halini almışlardır (7). Aşılar sadece aşılanan bireyleri korumakla kalmayıp hastalığın bir popülasyon içinde yayılmasını azaltarak toplum koruması da sağlayabilir (15). Aşıların yaygın şekilde

kullanılması milyonlarca kişide erken ölüm, körlük, felç ve nörolojik hasarı önlemiştir (8). Aşılamayla çiçek hastalığı ortadan kaldırılmıştır ve çocuk felci hastalığını bitirme çalışmaları son aşamalarda (9).

Günümüzde aşılama sayesinde difteri, tetanoz, boğmaca, grip ve kızamık gibi hastalıklar nedeniyle meydana gelebilecek her yıl 2-3 milyon ölüm engellenmektedir (10). Rutin uygulanan aşılar kızamık, kabakulak, kızamıkçık, suçiçeği, boğmaca, difteri, tetanoz, invaziv Hib enfeksiyonları, HAV, viral hepatit B, invaziv *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonları, influenza, HPV, rotavirüs, invazif meningokok ve çocuk felciden koruyabilen aşılar olarak sıralanabilir (11).

İdeal bir aşı şu özellikleri taşımalıdır (3,16).

- a. İmmünojenik olmalı, mukozal ve sistemik immüniteyi uyarabilmelidir.
- b. Birden fazla hastalığa aynı anda koruma sağlayabilmedir.
- c. Tek uygulama sonrasında uzun süreli koruma sağlayabilmelidir.
- d. Yan etkisi olmamalıdır.
- e. Sağlıklı olmayan bireylere de uygulanabilmedir.
- f. Kolay uygulanabilir olmalıdır.
- g. Raf ömrü uzun, kolay temin edilebilir ve ucuz olmalıdır.

2.1. Aşılamamın Tarihçesi

Tıp tarihinin en büyük global başarılarından biri olan aşının serüveni 1796 yılında Edward Jenner'in bulduğu ileride karşılaşılabilecek enfeksiyonlara karşı az miktardaki bulaşıcı çiçek hastalığı materyalinin deriye uygulanması olan varilasyon yöntemiyle uygulanan çiçek aşısıdır (17). Modern anlamda ilk aşı ise, Louis Pasteur tarafından geliştirilmiştir. Pasteur hastalığa neden olan aynı etkeni kullanarak laboratuvarında aşılar geliştirmiştir. İlk olarak 1879-1880'de tavuk kolera aşısını; bundan 5 yıl sonra da insan kuduz aşısını geliştirmiştir (18). Pasteur, canlı mikroorganizmaların profilaktik aşılar yapmak amacıyla virülansının nasıl azaltılabileceği ile ilgili yöntemler açıklamıştır (19). 19. yüzyıl mikrobiyolojinin babası Louis Pasteur ve tüberküloza sebep olan mikrobu bulan bilim adamı Robert Koch'un yaptığı keşiflere tanık olduğundan dolayı aşılar tarihi için önemli bir dönüm noktasıdır (20).

Birinci kuşak olarak da anılan tarihteki ilk aşular, Pasteur'ün izolasyon, inaktivasyon ve enjeksiyon prensibine dayanmaktadır. Bu uygulamadaki amaç doğal enfeksiyon taklit edilirken doğal bağışıklığa benzer bir yanıt oluşturulmasıdır (21). Aşı geliştirilmesi ile ilgili ilk çalışmalar, hastalık etkeni olan patojeni içeren canlı (atenüe) ya da ölü (inaktive) formlarda olması yönündedir. Bu aşular “konvansiyonel aşular” olarak tanımlanmıştır (22). Ancak bu metodun patojenin laboratuvarında üretilmesindeki güçlükler, bazı patojenlerin hücre içi faza sahip olmaları, bazı patojenlerin (hepatit C-HCV gibi virüsler) antijenik çeşitlilik göstermeleri ve bağışık yanıtta istenmeyen reaksiyonlar gibi nedenlerden dolayı konvansiyonel aşulara alternatif yeni aşuların geliştirilmesi gereksinimi duyulmuştur. Tıp ve biyolojideki ilerlemeler sonucunda “subünite aşı” olarak adlandırılan polisakkaritler veya protein antijenleri gibi saflaştırılmış mikrobiyal hücre bileşenlerinden oluşan “ikinci nesil aşular”, aşı gelişiminde çığır açmıştır (3).

İlerleyen dönemlerde konvansiyonel aşuların güvenilirliğini daha da artırma gereksinimi, çoklu dirençli bakteri türlerinin gelişimi, pekçok enfeksiyon için tedavinin yetersiz kalması gibi nedenlerle yeni aşı türlerinin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Buna paralel olarak proteomik, genomik ve immünomik gibi omik bilimlerin gelişmesiyle bakteri genomu sekanslama çalışmaları ağırlık kazanmış ve “tersine aşılama (reverse vaccination)” doğmuştur. Bu metotta patojenin genomu tarandıktan sonra immüno-informatik metoduyla aşı hedefi proteinleri kodlayan genler tanımlanmaktadır. Grup B meningokok (Men B) aşısı bu alanda bir ilktir. Bu yöntemin dezavantajı ise, özellikle polisakkaritler gibi aşılama önemli birçok protein dışı antijenlerin kullanılmaması, patojenler arasında genomik ve antijenik değişkenlik olması ve henüz yeni olması nedeniyle geliştirilmesi ihtiyacıdır (23,24).

2.2. Aşı Türleri

Aşular vücudun bağışıklık sistemini uyaran mikroorganizmayı veya mikroorganizmaya ait bir ajan içerir. Yani aşular, patojenin zayıflatılmış ya da inert şeklini, patojen tarafından üretilen toksinleri veya patojenin yüzey proteinlerini içerebilir (25). Aşı türleri şekil 2.1.'de gösterilmektedir.

Aşular biyolojik olarak hazırlanışlarına göre canlı (atenüe) ve ölü (inaktive) aşular olmak üzere iki gruba ayrılırlar.



Şekil 2.1. Aşı türleri

Canlı (attenüe) aşılar: Bu tür aşılar yabancı tipteki benzerlerine göre zayıflatılmış, değiştirilmiş veya daha az virülen olması için modifiye edilmiş patojenlerden oluşur. Canlı aşı laboratuvar ortamında hastalığa neden olan mikroorganizmanın yani virüsün veya bakterinin hastalık yapıcı özelliklerinin hastalık oluşturmayacak düzeylerde zayıflatılarak ancak bağışıklık oluşturacak düzeyde logaritmik olarak çoğalarak üretilmesi prensibine dayanmaktadır (26,27).

Canlı attenüe aşılar da sonraki bir enfeksiyonu önlemek amacıyla kuvvetli humoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkilerini uyarma imkanları vardır. Bu tür aşılar örnek olarak tüberküloz aşısı, oral polio aşısı, sarı humma aşısı, rotavirüs aşısı ve kızamık aşısı verilebilir (27,28).

İnaktif Aşılar: İnaktif aşılar tüm patojenlerin ısı, radyasyon ya da formalin veya formaldehit gibi kimyasallar ile inaktive edilmesi ile üretilir. İnaktive etme işlemi patojenin hastalık etme ya da çoğalma özelliğini yok eder; ancak, immünojenitesini korur. Bu nedenle bağışıklık sistemi patojeni hala tanıyabilir (26). Ancak, inaktif aşılar canlı attenüe aşılar göre daha büyük dozlarda verilmelidir ve bazen de daha sıkça uygulanmalıdır (29).

Subünite, rekombinant, polisakkarit ve konjuge aşılar: Subünite aşılar antijen olarak patojenin tamamını değil de patojenin belirli parçalarını içerir. Bu

parçalara örnek olarak polisakkaritler, proteinler ya da virüs benzeri parçacıklar oluşturabilen virüs parçaları verilebilir (26). Canlı attenüe aşılarla kıyasla daha iyi tolere edilebilirler ve sonraki enfeksiyon riskinden yoksundurlar. Ancak, ihtiyaç duyulan genişlik ve derinlikte bağışıklık yanıt oluşturmak açısından yeterince immünojenik etkileri yoktur (30).

Rekombinant aşılar: DNA rekombinasyon teknolojisiyle türetilir. Bu aşıların üretiminde iki önemli adım vardır. İlk olarak istenen antijenleri kodlayabilen DNA parçaları bakteri, maya veya memeli hücrelerine yerleştirilir. İkinci olarak antijenler hücrelerde eksprese edilir, ekstre edilir ve hücrelerden saflaştırılır (25).

Konjuge aşılar: Birçok bakteri için koruyucu bir dış katman görevi gören bakteriyel kapsüller polisakkaritlere karşı güçlü bir bağışıklık cevabı oluşturmak için geliştirilmişlerdir. Meningokok ve pnömokoklara karşı saflaştırılan polisakkaritlerden oluşan aşılar bu gruba örnek verilebilir (31).

Toksoid aşılar: *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* ya da *Corynebacterium diphtheriae* gibi bazı bakteriler hastalığa patojenik toksinlerini salgılayarak sebep olurlar. Bu tür hastalıklara karşı aşılar, toksinin ısı, kimyasallar (örn. formaldehit) veya ikisinin birden kullanılarak detoksifiye edilmesi yöntemiyle üretilir. İnaktive edilmiş toksinler artık patojenik değildir ve toksoidler olarak adlandırılır. Ancak, toksin nötralize edici antikorları indüklemeye yeteneklerini kaybetmezler (26).

Diğer bir sınıflandırma ise aşıların yapılarına göre yapılabilir. Buna göre aşılar fraksiyonel ve tam (whole-cell) aşılar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tam aşılarla polio, HAV, boğmaca aşıları örnek olarak verilebilir. Fraksiyonel aşılar protein yapılı ve polisakkarit yapılı olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Protein yapıda olan aşılarla hepatit B, influenza, difteri, tetanoz aşıları; polisakkarit yapıda olanlara ise pnömokok, meningokok ve *Hemophilus influenzae* Tip b aşıları örnek olarak verilebilir (27).

2.2. Aşıların Temel Bileşenleri

Aşıların temel bileşenleri şu şekilde sıralanabilir (32).

- a) Antijenler
- b) Adjuvanlar
- c) Süspansiyon sıvıları

- d) Stabilizatörler
- e) Koruyucular

a. Antijenler: İmmünolojik yanıtı açan aktif maddelerdir. Bir aşının immün yanıt oluşturabilmesi için patojenin bir ya da daha fazla antijenini içermesi gerekmektedir. Bu antijen ya patojenin kendi komponentlerinden ya da sentetik olarak üretilmiş benzer komponentlerinden elde edilir. Pek çok aşı bir veya daha fazla protein antijeni içerir. Ayrıca bakteriyel aşılarda polisakkarit antijenler de içerebilmektedir (32).

b. Adjuvanlar: Etkili bir aşı geliştirirken en önemli konulardan biri uygun adjuvanın seçimidir (33). Birlikte verildiği antijenlere karşı bağışık yanıtı güçlendiren ve aynı zamanda daha uzun süreli immünolojik yanıt oluşmasını sağlayan maddelerdir. Adjuvan kelimesi Latince “*adjuvare*” kelimesinden türetilmiştir ve yardım etmek anlamındadır(34). Adjuvanlar genel olarak kendileri immünojenik olmayıp aşı bileşenlerine karşı bağışıklık yanıtını güçlendirmeye hizmet eder (35). İnaktive aşılarda mikroorganizmanın tamamından ya da bir parçasından üretilen ve vücut içinde çoğalamayan aşılardan dolayı zayıf immünojenlerdir. Bundan dolayı antikorlara ve efektör T hücre işlevlerine dayalı koruyucu bağışıklığı uyarmaları için adjuvanlara ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, bağışıklık oluşturabilmesi için birden fazla doz ve rapel dozu gerekmektedir. Canlı (atenüe) aşılarda ise tek dozda bağışıklık yanıtı oluşturdukları için adjuvan maddelere ihtiyaç göstermezler. Aynı şekilde rekombinant alt birim aşılarda genellikle zayıf immünojenik olup adjuvan maddelerle birlikte verilirler. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı aşılarda genellikle kullanılan adjuvanlar alüminyum tuzları, su içinde yağ emülsiyonları (MF59 ve AS03), AS04 (3'-O-deasilatlanmış monofosforil lipid A (MPL) ve alüminyum tuzları), CpG ODN ve AS01 (MPL ve lipozomlarda formüle edilen saponin QS-21), sitokinler, mikroorganizma temelli adjuvanlar, polisakkaritler ve nükleik asit temelli adjuvanlar sayılabilir (36). En yaygın olarak kullanılan adjuvanlar alüminyum tuzlarıdır (alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ ve alüminyum fosfat $Al(PO)_4$) (37).

İdeal bir adjuvanın özellikleri şunlardır (38);

1. Ani ve uzun süreli yan etkiler içermeyecek şekilde güvenli olmalıdır.
2. Antijenin tek başına kullanılmasına göre antijenle birlikte uygulandığında daha güçlü koruyucu ya da terapötik bağışıklık cevabı göstermelidir.
3. Antijenin daha düşük doz ya da konsantrasyonu kullanılarak etkinlik elde edilmelidir.
4. Geç yan etki riskini azaltmak için, biyolojik olarak parçalanabilir ve etkisi sonlandıktan sonra vücuttan kolayca atılabilir olmalıdır.
5. Aşılarda tutarlı yanıt sağlanması ve lotlar arası farklılık olmaması için biyolojik ve kimyasal olarak tanımlanmalıdır.
6. Klinik ve ticari fayda için raf stabilitesi uzun olmalıdır.
7. Ekonomik açıdan uygun olmalıdır.

Aşı adjuvanlarının faydaları genel olarak şu şekilde sıralanabilir (39);

- a. Gereken antijen dozunu azaltır.
- b. Bebeklerde, yaşlılarda ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde aşı etkinliğini artırır.
- c. Daha hızlı ve uzun süreli bağışıklık cevabı sağlar.
- d. Gereken aşılama sayısını azaltır.
- e. Fonksiyonel antikor titresini artırır.
- f. Mukozal bağışıklığı kolaylaştırır.
- g. Geniş koruma sağlar (çapraz reaktivite).
- h. Güçlü hücre aracılı bağışıklığı indükler.
- i. Kombine aşılarla antijen yarışmasının üstesinden gelir.

2.3. Alüminyum Tuzları

Alüminyum çevrede en bol bulunan üçüncü element ve en çok bulunan metaldir. Birçok farmasötik üründe, insan gıda zincirinde ve çeşitli tüketici ürünlerinde bulunmaktadır (40). Böbrekler tarafından atılan alüminyum böbrek fonksiyon bozuklukları gibi durumlarda vücutta birikebilir ve toksik hale gelir. Alüminyum intoksikasyonu Alzheimer hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) ile ilişkilendirilmiştir (39). Alüminyum tuzu bazlı adjuvanlar genel olarak “alum” diye adlandırılır (41). Alum difteri-boğmaca-tetanoz (DPT), difteri-tetanoz (DT),

HAV, Hib, inaktive polio (IPV), hepatit B ile kombine DT, *Streptococcus pneumonia*, meningokok ve HPV gibi lisanslı insan aşlarının içeriğinde bulunur (42).

Alüminyum adjuvanı içeren aşlar geleneksel olarak 2 yöntemle hazırlanır: İlk yöntem alüminyum-çökeltmiş aşı yöntemi şeklinde adlandırılır. Antijen çözeltisine süspansiyon içeren alüminyum eklenmesi ve böylece antijen-alüminyum kompleksi oluşturmak amaçlanır. İkinci yöntem ise alüminyum adsorbe aşı yöntemi şeklinde adlandırılır. Bu yöntem önceden hazırlanmış alüminyum fosfat, alüminyum hidroksit, alüminyum hidroksit-alüminyum fosfat karışımı veya alüminaya antijen içeren bir çözeltinin eklenmesi şeklindedir. Böylece alüminyum adsorbe edilmiş aşı oluşturmak hedeflenmektedir (43). Alüminyumun etki mekanizmalarının şunlar olduğu düşünülmektedir (43);

1. Dendritik hücreler, B hücreleri ve makrofajlar gibi antijen sunan hücreler tarafından antijen fagositozunu destekleyen partikül yapı oluşumu
2. Majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II ekspresyonunu ve antijen sunumunu artırma
3. Sürekli antijen salınımını kolaylaştıran depo oluşumu

Alüminyum adjuvanlar yeni geliştirilecek adjuvanlar için karşılaştırılması gereken altın standarttır. Yeni adjuvanın alüminyum adjuvanlara göre daha iyi koruma sağlaması, daha güvenli olması veya daha tolere edilebilir olması istenir. Tercihen bu üçünü birden sağlaması gerekmektedir (44).

Alüminyum içeren adjuvanların neden olduğu istenmeyen etkiler şöyle sıralanabilir (43,45,46);

1. Alüminyum içeren adjuvanlar ara sıra uygulama bölgesinde kızarıklık ve şişliğe sebep olabilir.
2. Bazen ateş, halsizlik ve ağrılar gibi sistemik reaksiyonlar ortaya çıkabilir.
3. Adjuvan olarak alüminyum hidroksit içeren aşının uygulanması eritem, granülom, kontakt hipersensitivite ve deri altı nodüller gibi lokal advers reaksiyonlara neden olabilir.

2.4. Koruyucular

2.4.1. Tiyomersal

Tiyomersal (sodyum etil cıva salisiliat), aşılarında koruyucu olarak kullanılan, bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek amacıyla çoklu doz aşılarına eklenen bir maddedir. 1930'lerden itibaren aşılarında koruyucu olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (47,48).

Tiyomersal, ağırlıkça %49,6 Hg içeren organik bir bileşiktir (47). Vücutta hızlıca etil cıva ve tiyosalisilata ayrılır (49). Tiyomersal aşılar dışında topikal ilaçlar, immünoğlobülin preparatları, kontakt lensler için temizleme solüsyonları, intrakutanöz cilt testi için solüsyonlar gibi tıbbi kullanım için çeşitli ürünlere de koruyucu olarak eklenmektedir (50).

Tiyomersal aşılarında %0,01'lik konsantrasyonda bulunur ve geniş bir patojen spektrumuna sahiptir (51). Hg küresel bir çevre kirliliğine yol açan kuvvetli bir nörotoksik bir ağır metaldir (52). Yer kabuğunda, havada, toprakta ve suda doğal olarak bulunan bir elementtir (14). Doğada en çok bulunan organik Hg bileşiği metil cıvadır ve yağda depolanma özelliğine sahiptir (51). Hg'nin yarı ömrü kısadır. Etil cıvanın kanda ilk dağılımı ve atılımı metil cıva ile benzerdir. Tiyomersal içeren aşıların tekrarlayan düşük dozlar halinde özellikle prenatal ve postnatal dönemde verilmesi ile beyne ulaşabileceği ve nörotoksisite oluşturabileceği bilinmektedir. Tiyomersalin farmasötik ve biyolojik ürünlerde kullanılması olası istenmeyen yan etkileri ile ilgili kaygıları da beraberinde getirmiştir. Zira, etil cıva da metil cıva gibi lipofilik özelliktedir ve kan-beyin bariyeri (KBB)'ni kolaylıkla geçebilmektedir. Bundan dolayı tiyomersal içeren aşı ve otizm spektrum bozukluğu (OSB) arasındaki olası ilişkileri araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır (14,53-55).

Tiyomersal GSH ve enzimlerin sülfhidril bileşiklerine bağlanarak bu aktif bölgeyi inhibe eder. Yüksek oranda albümine bağlı olarak taşınır. İnterstisyel sıvıdaki tiyol gruplarına bağlanan etil cıva kapiller hücrelere taşınır. Endoplazmik retikulum membranı üzerindeki inositol trifosfat reseptörü 3 (InsP3) kalsiyum kanalını aktive ederek hücre içi kalsiyum salınımını indükler; kalsiyum sinyal yolağının tetiklenmesine ya da inhibisyonuna neden olabilir (55). Tiyomersalin yapısında metil cıva değil etil cıva bulunmaktadır. Etil cıva metil cıvaya göre çok daha hızlı şekilde

parçalanır ve vücuttan atılır. Bu nedenle vücutta birikme ve zarar verme potansiyeli çok daha azdır (14). 1999'da Halk Sağlığı Servisi ve Amerikan Pediatri Akademisi ortak bir açıklama yaparak tiyomersalin aşılarından kaldırılmasını istemiştir (56). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) sadece çok dozlu flakon influenza aşıları koruyucu miktarda (doz başına 25 µg) tiyomersal içerir. Tiyomersal içermeyen influenza aşıları da bulunmaktadır (14).

Stabilizatörler: Jelatin, insan serum albümini gibi stabilizatörler; canlı virüsler aşılarının sıcaklık ya da taşıma-depolama sırasında korunması amacıyla kullanılırlar.

İnaktive Edici Maddeler: Virüsleri ya da toksinleri inaktive etmek amacıyla kullanılırlar. Formaldehit yaygın olarak kullanılan inaktive edici maddelerdendir.

Antibiyotikler: Aşıların içerisinde bakteri kontaminasyonu ve üremesini önlemek için kullanılırlar. Örneğin; neomisin, gentamisin sıklıkla aşılarda kullanılan antibiyotiklerdir (51).

2.5. Otizm

Otizm, Asper (1938) ve Kanner (1943) tarafından tanımlanmış OSB'lere dahil olan ciddi bir nörolojik gelişim bozukluğudur. OSB, sosyal iletişim ve sosyal etkileşimde iletişimsel davranışlar ve ilişkileri geliştirme, sürdürme ve anlama becerileri dahil olmak üzere, kalıcı eksiklikler ve tekrarlayıcı davranışlar ile karakterizedir (49,57). OSB'nin sebebinin genetik, epigenetik ve çevresel gibi çok faktörlü olduğu düşünülmektedir (58).

OSB erken çocukluk döneminde bazı davranış değişiklikleri ile ortaya çıkar (59). Genellikle ömür boyu kalıcıdır; bazı tedavi ve psikolojik destek ile hasta daha sosyal ve normal hale gelebilir. Hastalık genelde ilk 3 yaş içinde teşhis edilir (60). Otizmde esas olarak üç davranışsal semptom görülür (61).

- a) Hastanın sosyal etkileşimleri düşüktür.
- b) Hastaların iletişimleri düşüktür
- c) Hastalarda tekrarlayan davranışlara eğilim görülebilir.

OSB erkeklerde kadınlardan 4 kat daha sık görülen bir hastalıktır (57). OSB'nin tedavisi olmamakla birlikte, zorlayıcı davranışları azaltmak, sosyal işlevi ve iletişimi güçlendirmek amacıyla tedavileri mevcuttur (62).

2.5.1. Otizmin Etiyolojisi

Son yıllarda otizm vakalarındaki artışla beraber çalışmalar, OSB'nin olası genetik ve epigenetik nedenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Çalışmalarda OSB'nin ancak %30-40'nının genetik nedeni olabileceği gösterilmiştir. Yine yapılan genetik çalışmalarda OSB'li çocukların %80'inin normal genomda olduğu, kromozomal anomaliliğe sahip olanların yalnızca %7'sinde OSB'ye neden olabilecek *de novo* mutasyonlar kromozomal mikroarray metoduyla gösterilmiştir (63). Öte yandan ikizlerle yapılan çalışmalarda OSB'nin tek yumurta ikizlerinde ayrı yumurta ikizlerine göre daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (3). Bununla beraber, OSB'den sorumlu olduğu düşünülen spesifik genlerle yapılan bir çalışmada birçok kromozom üzerindeki birçok gen incelenmiş ve OSB'ye ait spesifik gen mutasyonlarının az sayıda olduğu açığa çıkmıştır. Bundan dolayı OSB'nin genetik faktörlerin prenatal ve postnatal dönemdeki çevresel faktörlere etkileşim sonucu oluştuğu iddia edilmiştir (64). OSB'nin prenatal nedenleri; gebelik döneminde kullanılan ilaçlar ve maruz kalınan çevresel kimyasallar (valproik asit, talidomit, misoprostol, alkol, kokain ve ağır metaller), hava kirliliğine neden olan 2,5 µm çapından büyük partiküle materyaller (PM 2,5), gebelik sırasında geçirilen viral enfeksiyonlar (rubella, siklomegalovirüs vb.), maternal ve fetal enfeksiyonlar, diabetes mellitus, allerjik astım gibi maternal hastalıklar olarak sıralanabilir (65,66).

İlerlemiş anne ve baba yaşı da OSB'nin etiyolojisinde rol oynamaktadır. Aynı zamanda prematüre doğumun da OSB ile bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. (67-69).

2.5.2. OSB'nin Patogenezi

Son yıllarda artan OSB vakaları ile birlikte OSB patogenezisine dair çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Aynı zamanda genetik ve epigenetik araştırmalarla da bu çalışmalar desteklenmiştir (65).Yapılan çalışmalar sonucunda, beyni etkileyen genel immün ve metabolik hastalıklarında OSB'ye yol açabileceği gösterilmiş ve bununla ilgili pek çok mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalarından biri immün disregülasyon sonucu anormal sitokin ve büyüme faktörü düzeyleri ve fetal ve maternal antikör sayısında artış, mikroglyal aktivasyon, CD4 ve CD8 düzeyindeki anormallikler ve beyin dokusundaki antikör çeşitliliğidir (70-72). Öne sürülen diğer

bir mekanizma ise, mitokondriyal disfonksiyonun dahil olduğu veya mitokondriyal disfonksiyonsuz oksidatif streştir. Frye ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada OSB'li çocukların en az üçte birinin OSB de görülen metabolik sendromun bir göstergesi olan mitokondriyal disfonksiyona kısmen ya da tamamen sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu çocuklarda çeşitli oksidatif stres biyogöstergelerinin arttığı ve spesifik mitokondriyal DNA anomalilerine sahip oldukları bulunmuştur (71). Farklı görüntüleme teknikleriyle yapılan bir çalışmada ise, otizmin anormal beyaz cevher bağlantısı ve değişmiş sinapsların dahil olduğu beyinde meydana gelen anomali ile ilgili olabileceği gösterilmiştir. Difüzyon tensör görüntüleme ile OSB'li 22 çocukta yapılan çalışmada, Billeci ve ark. (2012) korpus kollosumun bazı alanlarında sinirlerin uzunluğunda artış, fraksiyonel anizotropide artış ve çeşitli bağlantısal modifikasyonlar tespit etmişlerdir (72). Farelerle yapılan çalışmalarda anksiyeteye, sosyal iletişimde ve sosyal beceride azalmaya yol açan beyinde serotonin düzeylerinde anormallik, çinko eksikliği ve bağırsak mikrobiyotası ve beyin arasındaki etkileşimlerde değişiklikler tespit edilmiştir (49) .

OSB'nin patogenezi üzerine yapılan pek çok çalışma özellikle beyinde belirgin kronik bir nöroinflamasyonun olduğunu göstermiştir. Nöroinflamasyon sonucunda, inflamasyonda görevli olan mikroglia ve astrosit sayısı ve aktivasyonunda artış, glial fibriler asidik protein yapımı gözlenmiştir. Kronik nöronal inflamasyonun bir sonucu olarak oksidatif streste belirgin artışın meydana geldiği çalışmalarda gösterilmiştir. Yine yapılan araştırmalarda, oksidatif stresin biyogöstergeleri olan nörotrofin-3, 3-nitrotirozin, proinflamatuvar sitokin düzeylerinde artış ve aynı zamanda aktif B hücrelerinde nükleer faktör kapp B (NFκB)'nin anormal ekspresyonu ve sonuç olarak nöronal hücre kaybı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (73).

Çevresel faktörlerin epigenetik mekanizmalarla mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir. Genetik sekansın değişmeden gen ekspresyonunun sayı ve yapısında değişimler meydana gelmesi olarak açıklanabilen bu epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon proteinlerinde değişme ve kodlamayan Ribonükleik asit (RNA) ekspresyonları olarak sıralanabilir. Bu yolla bu mutasyonlar gelecek nesillere de aktarılabilir (74). Sonuç olarak zararlı çevresel bileşenlere maruziyet embriyo oluşumunda kritik rol oynayan anahtar gelişimsel genlerin ekspresyonunda

değişimlere ve OSB gibi yanlış gen kodlanmasından kaynaklı hastalıklara neden olabilir (75).

Yapılan çalışmalar perinatal dönemde organofosfatlı ve organoklorlu insektistlere, ftalatlara, bisfenollere, poliklorlu bifenillere (PCB'ler), polisiklik aromatik hidrokarbonlara ve perflorokimyasallara maruziyetin otizm gelişimi ile bağlantılı olabileceğini göstermiştir. Toksik kimyasallar gelişmekte olan insan beyinde ya doğrudan toksisiteye ya da genomla etkileşimlerle hasara neden olabilirler. 2000 yılında Amerikan Ulusal Bilim Akademisi nörolojik davranış bozukluklarının %3'ünün direkt çevresel toksikantlara maruziyet sonucunda %25'nin ise genetik yatkınlıkla beraber çevresel faktörlerle genomun etkileşimi sonucunda meydana geldiğini açıklamışlardır (76) .

Grandjean ve Landrigan yaptıkları çalışmada kurşun, metil cıva, PCB'ler, arsenik ve toluenin OSB'nin patolojisinde rol oynayabileceğini iddia etmişlerdir (77).

2.5.3. Aşılama ve Otizm Arasındaki Olası İlişkinin Değerlendirilmesi

Çocukluk çağındaki aşılama oranları yüksek olsa da son yıllarda aşı ile otizm arasında bir ilişki olabileceği konusundaki kaygılar da yükselmiştir. Aşı ve otizm arasındaki bağlantı ile ilgili 3 hipotez ileri sürülmüştür (78):

- a. Kızamık-kabakulak-kızamıkçık (KKK) karma aşısının bağırsak duvarına hasar vererek ensefalopatik proteinlerin merkezi sinir sistemine (MSS) girişi.
- b. Bazı aşılarda MSS'ye toksik etkisi olduğu bilinen etil cıva tuzu olan tiyomersal içermesi.
- c. Çoklu aşılarda bir arada verilmesi sonucu immün sistemin aşırı uyarılması ya da zayıflaması.

Yaklaşık olarak son 30 yıldır çocukluk çağında aşılama ve otizmin arasındaki ilişki ile ilgili olarak çalışmalar bu hipotezler üzerinde yoğunlaşmıştır (5). 1990'lı yıllarda Hg ve OSB arasındaki ilişkiye yönelik çalışmalar başlarken, İngiltere'de çalışmalar, KKK karma aşısı ile otizm ilişkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak KKK aşılamasıyla OSB riski arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (78).

Madsen ve ark. 1991-1998 yılları arasında Danimarka'da doğan 500.000'den fazla çocukta yaptıkları bir çalışmada çocukların 43.500'ü KKK aşısıyla aşılanmış, geri kalan 6500 çocuk ise aşılanmamıştır. Araştırmacılar, 316 çocuğa otistik bozukluk

ve 422 çocuğa ise diğer OSB tipleri tanısı koymuşlardır. Çalışmanın sonucunda aşılanan ve aşılanmayan çocuklar arasında, otizm gelişimi ile ilgili bir bağlantı olmadığını bildirmişlerdir (79). Öte yandan yine Danimarka'da tiyomersal içeren aşılardan aşamalı olarak kullanılmadığı 2002-2004 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise 1994-1995 yıllarına oranla, OSB vakalarında bir düşüş meydana geldiği de bildirilmiştir (80).

Çoklu aşılardan otizm arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla ABD'de çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda çocuklarda Hg maruziyeti sonucu oluşan nörojenez bozuklukları, hipokampal hücre ölümünün akut Hg toksisitesinden kaynaklanabileceği ve bunun sonucu olarak öğrenme ve konuşma güçlüğü, dikkat ve bellek sorunları ile karşılaşılabilirliği bildirilmiştir. Çocuklarda KBB'nin erişkinlere göre daha geçirgen olmasından dolayı nöroinflamatuvar yanıt, oksidatif strese ve beyin dokusunda otoimmün yanıtı neden olabileceğini göstermiştir. Bunun sonucu olarak da otizmin gelişebileceği bildirilmiştir (81). OSB hastaları ile yapılan bir çalışmada; hastaların kan, eritrosit ve beyin dokularındaki Hg konsantrasyonlarının sağlıklı deneklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ancak saç analizlerinde ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bunun nedeninin santral sinir sistemi içinde Hg'nin birikmesinden kaynaklanabileceğini iddia etmişlerdir (80). Yine OSB'li hastalarla yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylere göre hastalarda Hg'nin daha yüksek oranda sekestre olduğu ve daha düşük oranda detoksifiye olduğu görülmüştür. Bu durum tiyol gruplarının sağlıklı bireylere göre OSB'li bireylerde daha düşük düzeylerde bulunması ile açıklanabileceği iddia edilmiştir. Yine aynı hastalarda Hg eliminasyonunun sağlıklı bireylere göre daha düşük olmasının eliminasyonda görev alan enzim ya da proteinlerden ya da mekanizmalardaki bir problemten kaynaklanabileceği iddia edilmiştir. (80,82).

Tiyomersal içeren aşılardan ve olası istenmeyen etkileriyle ilgili yapılan araştırmalarda tiyomersale bağlı olarak erişkinlerde gelişebilecek istenmeyen etkilerin, kabul edilebilir sınırlar içinde olmasına rağmen, bebek ve çocuklar hassas popülasyon olduğundan dolayı ve aşı formülasyonunun antijenlerinin ve bileşenlerinin çeşitliliği ve etkileşimleri dikkate alındığında düşük dozda bile olsa etil cıva maruziyeti ile ilgili riskleri değerlendirmek yüksek öneme sahiptir. Ayrıca bazı epidemiyolojik çalışmalar, tiyomersal maruziyetinin nörogelişimsel bozukluk

gelişime neden olabileceğini de göstermiştir (83). Japonya’da yapılan bir çalışmada ise, çocuklarda erken dönemde kombine KKK aşısı ve tiyomersal içeren aşılarda OSB gelişiminde bir etkisinin olmadığı iddia edilmiştir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri tarafından yapılan 2003-2004 yılları arasında yaşamın ilk 7 ayında tiyomersal içeren aşı uygulanan çocuklarda nöropsikolojik gelişim arasındaki ilişki değerlendirildiği çalışmada, motor bozukluk gelişimi ile tiyomersal arasında bir bağlantı olabileceği bildirilmiştir (84).

2.6. Nörotransmitterler

2.6.1. Dopamin

DA, kardiyovasküler ve MSS’de önemli rol oynayan nörotransmitterdir (85,86). DA’nın sentezi hız sınırlayıcı enzim tirozin hidroksilaz (TH) ve aromatik amino asit dekarboksilaz tarafından tirozinden iki basamakta gerçekleşir (87). Toplam nöron popülasyonunun %1’inden daha azını oluşturan dopaminerjik nöronların beyin fonksiyonu üzerinde etkileri büyüktür (88). Beyin dopaminerjik sistemi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde etkilidir. DA beyinde ödül ve hareket düzenlenmesinde de kritik göreve sahiptir (89,90). DA sisteminde sorunlar olduğunda vücut ve beyin açısından sonuçları ağır olmaktadır. Bu sonuçlar arasında Parkinson hastalığı, şizofreni, Huntington hastalığı, tardif diskinezi sayılabilir (91).

DA dopaminerjik, β -adrenerjik ve α -adrenerjik reseptöre doza bağlı biçimde etki eder (92). DA reseptörleri D1 benzeri ve D2 benzeri olarak iki alt sınıfa ayrılır. D1 benzeri reseptörler (D1 ve D5) adenilat siklazı aktive etme kapasiteleriyle ve D2 benzeri reseptörler (D2, D3 ve D4) adenilat siklazı inhibe etme kapasiteleriyle tanımlanır (93). D1 ve D2 DA reseptörlerinin rol aldığı beyin işlevleri daha sonra bulunan reseptörlerin (D3, D4 ve D5) yaptığı işlerden daha çok bilinir (94). DA reseptörleri MSS’de yaygın olarak bulunur. Ayrıca periferik olarak kan damarlarında, kalpte, retinada, böbreklerde ve katekolamin salınımını kontrol eden adrenallerde ve renin-angiotensin sisteminde bulunur (95).

Beyinde dört ana dopaminerjik yolak tanımlanmıştır. Bunlar tuberoinfundibular, mezolimbik, mezokortikal, nigrostriatal yoldur. Tuberoinfundibular yolak ön hipofizin bazı fonksiyonlarını düzenler. Mezolimbik yolak ventral tegmental alanda (VTA) ortaya çıkar ve ventral striatuma, stria

terminalinin yatak çekirdeğine, hipokampus ve septuma yansır. Mezokortikal yolak da VTA'dan çıkar. Ancak, mezolimbik yoldan farklıdır ve daha yaygın şekilde temporal ve frontal kortekslere uzanır (96). Nigrostriatal yolak substantia nigra pars kompakta'dan çıkar ve bazal ganglionlara uzanır (97).

DAT

DAT, Na⁺/Cl⁻ bağımlı nörotransmitter taşıyıcıları ailesine bağlıdır. DAT, hücre dışındaki boşluktan nörotransmitteri temizler ve dopaminerjik sinapslarda sinyal süresi ve genliğinin önemli düzenleyicilerindendir (98). DAT duygulanım, biliş ve motor işlevlerde rol oynar. DAT patolojilerinin dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu (ADHD), anhedoni, bağımlılık, Parkinson hastalığı gibi bozukluklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. DAT metilfenidat, psikostimulanlar, modafinil, d-amfetamin ve bupropion gibi birkaç ilaç için hedeftir (99).

2.6.2. Norepinefrin

NE (Norepinefrin) önemli bir nörotransmitterdir ve hormon işlevine sahiptir. NE merkezi ve sempatik sinir sistemindeki noradrenerjik nöronlardan salınır ve stres, uyku, anksiyete ve hafıza kaybı gibi süreçlerle ilişkilidir. İdrar ve plazmadaki uygun olmayan NE düzeyleri hipertansiyon, nöroblastoma ve feokromositoma gibi hastalıklar için bir biyobelirteçtir (100). Beyin noradrenerjik nöronlarının geneli beyin sapındaki *nukleus locus coeruleus* (LC)'ta bulunmaktadır (101). Hem α hem de β_1 reseptörlerinin alt tiplerini uyaran NE β_2 reseptörlerine çok az etkilidir (102). NE'nin asıl farmakolojik etkisi damarlardaki tonusu artırmak ve böylece organ perfüzyonunu artırmaktır (102).

Norepinefrin taşıyıcı protein (NET) Na⁺/Cl⁻ çözünen taşıyıcı aile 6 (SCL6) gen ailesinin bir üyesidir. Nöronal veya endokrin depolarından salınmasının ardından hücre dışı monoamin seviyelerinin aktif olarak sonlandırılması ve düzenlenmesinde kritik rol oynar (104). NET NE'nin sinaptik yarıktan çıkarılmasında temel mekanizmadır. NET'in işlevi transkripsiyonel ve ikinci haberci seviyelerindeki mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilir (105). NET serotonin, DA, glisin ve GABA'nın taşınmasında görevli Na⁺/Cl⁻ bağımlı taşıyıcı ailesinin bir üyesidir. Bu taşıyıcılar benzer aminoasid sekanslarına sahip benzer protein yapılarında ve pompa

mekanizmalarına sahiptirler. NET aracılığıyla, Na⁺'nın içe doğru gradyanından türetilen elektrokimyasal enerji, hücre içinde nörotransmitter birikimi sağlar. Noradrenerjik sinapsların geçişinde önemli rol oynayan NET Na⁺/Cl⁻ kanallarına bağlanan ilaçlarca inhibe edilebilir. Bu ilaçlara örnek olarak desipramin, imipramin gibi antidepressanlar verilebilir ve bu tür ilaçlar depresyon tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca ketamin, propofol, tiamilal ve diazepam gibi anestezipler de gene NET aracılığıyla NE'nin geri alınımı inhibe ederek etki gösterirler (106).

2.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ROS, enzimatik oksidazların ve mitokondriyal solunum yan ürünleri olan oksijenin radikal formlarıdır. ROS sinyal molekülü olarak hareket edebilir. Ancak, hücreli lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere de zarar verirler (107). ROS'a örnek olarak serbest radikal olan süperoksit radikali (O₂^{-•}), hidroksil radikali (•OH), hidroperoksil radikali (HO₂[•]) ve singlet oksijeni (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi radikal olmayanlar verilebilir (108). ROS üretimi ve antioksidan savunma arasındaki dengesizlik sonucu yaşlanma, kanser, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi çeşitli patofizyolojik süreçleri destekleyen oksidatif stres oluşur (109).

2.8. Glutatyon

GSH ya da diğer adı ile tripeptid-L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin bitki ve hayvanlarda bulunan 307 g/mol olan düşük moleküler ağırlıkta bir tiyol bileşiğidir. Üç amino asitten ve protein olmayan başlıca tiyolden oluşan basit bir kükürt bileşiği olan GSH birçok fonksiyona sahip olmakla beraber özellikle redoks-homeostatik dengesinin sağlanmasında etkin bir role sahiptir. GSH toksik ksenobiyotiklere karşı (ilaçlar, kirleticiler, karsinojenler) bir koruyucu ajan olarak tanımlanmıştır ve hücreleri ROS'a karşı (serbest radikaller, peroksitler, ağır metaller vd.) korumada görev alır. GSH aslında hem bir nükleofil hem de bir indirgeyicidir ve bu nedenle elektrofilik veya oksitleyici moleküller ile reaksiyona girebilir. Nükleofilik olan GSH nükleik asitler ve proteinler gibi daha kritik öneme sahip hücreli bileşenlerle etkileşime girer. Redoks dengesinin sağlanmasında, GSH hem kimyasal hem de enzimatik reaksiyonlarda yer alır ve GS-S-transferaz enziminin kofaktördür (110). Oksidatif stresi önlediği için hücre ve hücre bileşenlerinin işlevselliklerinin korunmasında büyük

öneme sahiptir. GSH düzeyleri, beslenme ve diğer faktörlerin yanı sıra oksidanlar tarafından modüle edilir ve tiyol-disülfid dengesindeki değişiklikler yoluyla protein yapısını ve aktivitesini etkileyebilir. Bu nedenlerle GSH, çevresel bilgiyi hücresele ağı entegre eden bir dönüştürücüdür (111). GSH tiyol/disülfid redoks potansiyelini korumak için sisteni belirli bir hücresele bir tiyol "redoks tamponu" olarak kullanır. GSH hücre, doku ve plazmada birkaç farklı formda bulunur. Glutasyon disülfid (GSSG), ya da diğer adı ile oksidize glutasyon, GSH'nin okside halidir. Diğer disülfid formu olan GSSR, proteinler üzerindeki GSH-sisteinil disülfidlerdir. Böylece, proteinler glutasyonile edilebilir veya bazen belirtildiği tiyollenebilir.

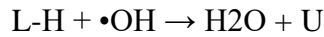
GSH'nin aynı zamanda sinyal iletiminde, gen ekspresyonunda ve apoptozda rolü vardır. Tiyol redoks dengesi, glutasyon-protein etkileşimleri ve hücre çoğalması birbirleriyle bağlantılı olup protein glutasyonilasyonunun bu süreçlerde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, fosforilaz, kreatin kinaz, karbonik anhidraz, ras, GSH transferaz, GAPDH ve diğer proteinlerin glutationillenmiş olduğu gösterilmiştir (112).

2.9. TAOC

Homeostaz, hücresele ve özellikle organizma düzeyindeki homeostaz, ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu ile antioksidanların uygun ROS seviyelerini koruyan ve hayati biyomoleküllerle spesifik olmayan reaksiyonlarını en aza indiren reaksiyonları arasındaki dengeyi içerir. Bu denge antioksidan adı verilen maddeler ve enzimler aracılığı ile sağlanır. Aerobik ortamda kararlı bir metabolit durumunu ve fonksiyonel bütünlüğü korumak için, antioksidan savunma 3 temel koruma seviyesinde düzenlenir: önleme, durdurma ve onarım. Prooksidanların çeşitliliğine uygun olarak, antioksidan silah deposu, yaygın bir dizi sistemden (antioksidan ağı) oluşur (113). Hücreler, dokular ve vücut sıvıları, oksidatif mücadeleye karşı koymaya yardımcı olan güçlü savunma sistemleriyle donatılmıştır. Organizmada bulunan toplam "spesifik olmayan" antioksidan havuzunun antioksidan aktivitelerinin toplamı, genellikle toplam antioksidan kapasite olarak adlandırılır (114).

2.10. Lipit Peroksidasyon

Serbest radikaller, basitçe, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, bağımsız oluşma yeteneğine sahip moleküllerdir. Serbest radikallere örnek olarak süperoksit (O) ve •OH, her ikisi de oksijen merkezli radikaller, triklorometil (CC13, karaciğerde CC14 metabolizması tarafından oluşturulan karbon merkezli bir radikal), ve nitrik oksit (eşleşmemiş elektronun her iki atom arasında delokalize olduğu NO) verilebilir. Bu serbest radikaller diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girebilirler (115). Böylece, iki radikal karşılaşırsa, ortak bir elektron çifti, yani bir kovalent bağ oluşturmak için eşleşmemiş elektronlarını birleştirebilirler. Çoğu biyolojik molekül radikal olmasına rağmen bir radikal bir elektron verdiğinde, bir elektron aldığı veya radikal olmayana basitçe ekleme yaptığında, o biyolojik molekül radikal haline gelir. Hidrojen atomunun bir protonu ve tek bir elektronu vardır, bu nedenle bir radikal olarak nitelendirilir. Bir biyolojik molekülden bir hidrojen atomunun çıkarılması, hidrojenin başlangıçta bağlı olduğu atom üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakır. •OH gibi yüksek oranda reaktif radikaller sıklıkla hidrojeni soyutlayarak biyolojik moleküllere (lipidler dahil) saldırır. Böylece, lipid peroksidasyonu başlar.



Artık, serbest radikaller (özellikle O) ve diğer ROS (H₂O₂ gibi) sürekli olarak meydana gelmektedir (116). Sonuç olarak, organizmalar sadece onlara karşı korunmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirmekle kalmamış, aynı zamanda oksidatif birikimi önleyen onarım sistemleri hasarlı molekülleri tamir etme yoluna da gitmiştir. Artmış oksidatif hasarın, başta karsinogenezis olmak üzere pekçok hastalığın gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Örneğin, peroksidasyon ateroskleroz, iskemik veya travmatik beyin hasarında önemli etken olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres başta DNA ve proteinler olmak üzere birçok biyolojik molekülde hasara neden olmaktadır (117). Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunun meydana gelmesi, membran işleyişinin bozulmasına, akışkanlığın değişmesine neden olur. Zara bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonu ve Ca² gibi iyonlara karşı artan spesifik olmayan geçirgenliği artar. Lipid hasarı ve lipid peroksidasyonu genellikle bu hasar sürecinin bir parçasıdır ve daha geç ortaya çıkar. Lipit peroksidasyonun ölçülmesi

uzun süreli oksidatif stresin ve bunun sonucunda meydana gelen hasarın tespitinde etkin bir metot olarak kullanılmaktadır (118,119).

2.11. Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2 (NRF2) Yolağı

ROS/RNS'nin zararlı etkilerinden hücreler indirgenmiş GSH ve sistein gibi diğer indirgenmiş tiyoller tarafından ve tioredoksin gibi endojen antioksidan savunma mekanizması ile korunurlar. Bu antioksidanlar birden fazla işleve hizmet eder, potansiyel olarak zararlı ajanların metabolizmasına katkıda bulunur ve hücreye indirgeme gücünü yeniden kazandırır. Bu doğuştan gelen antioksidanların birçoğunun biyosentezi Nükleer faktör eritroid 2 (NFE2) dahil olmak üzere Cap 'n' Collar (CNC) transkripsiyon faktör ailesi tarafından yönetilir. NRF2 proteinleri antioksidan yanıt elementi (ARE), dahil olmak üzere birçok kemoprotektif genin belirli bir DNA dizisinin promotörlerine oksidatif strese tepki olarak bağlanır (120,121). İşlevsel olarak, çeşitli sitoprotektif genlerin ekspresyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörü olan NRF2 hücrel antioksidan/detoksifikasyonun en önemli faktörlerinden biridir. NRF2, antioksidan tepkiler için en önemli transkripsiyon faktörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar hücreleri farklı stres faktörlerine karşı korumak için optimal bir NRF2 aktivitesinin gerekli olduğunu ve disfonksiyonunun oksidatif/kimyasal saldırılara karşı toleransı önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, NRF2 aktivitesindeki değişiklikler doğal yaşlanma süreciyle ilişkilendirilmiştir ve nörodejeneratif dahil olmak üzere birçok insan kronik hastalığının patogeneze, kardiyovasküler hastalıklara, fibrozise, inflamatuvar hastalıklara neden olabileceği öne sürülmüştür. Normal koşullar altında, NRF2 ve keap1 heterodimerik formda bulunur. Hücreler dış uyaranlara maruz kaldığında denge bozulur ve NRF2 ve keap1'in ayrılmasına yol açar. Daha sonra, NRF2 çekirdeğe girer ve antioksidan genler ve faz II detoksifikasyon enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Bu yolla da oksidatif stresin yıkıcı etkilerinden korunma sağlanır (122,123).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|---|---------------------|
| 3-(4,5- Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) | Sigma-Aldrich |
| Dimetil Sülfoksit (DMSO) | Duchefa Biochemical |
| Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu, F12 | Biowest |
| Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (DPBS) | Biowest |
| Etanol | JT Baker |
| Florometrik Hücre içi ROS Kiti | Sigma Aldrich |
| Fötal Sığır Serum (FBS) | Biowest |
| GSH Kiti | Cayman Chemical |
| Penisilin-Streptomisin karışımı | Biowest |
| Protein Karbonil Kiti | Cayman Chemical |
| Protein Miktar Tayini Kiti | Cayman Chemical |
| Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS, Lipid Peroksidasyon) Kiti | Cayman Chemical |
| TAOC Ölçümü Kiti | Cayman Chemical |
| Tripsin-EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) çözeltisi | Biowest |
| Human DA Enzim-Bağlı İmmünosorban Yöntemi (ELISA) Kiti | Cusabio |
| Human Dopamin Beta Hidroksilaz (DBH) ELISA Kiti | BT LAB |
| Human Norepinefrin ELISA Kiti | BT LAB |
| Human DAT ELISA Kiti | Elabscience |
| DNA/RNA Oksidatif Hasar ELISA Kiti | Cayman Chemical |
| İnsan NRF2 ELISA Kiti | BT LAB |

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| | |
|--|---|
| 96 kuyulu plak | Grenier Bio-One |
| Buzdolabı | Arçelik |
| Distile Su Cihazı | MES mp Minipure, mes08/Thermo Scienfitic |
| Biyolojik güvenlik kabini | Holten Lamin Air Model 1,2 |
| Hassas terazi | Mettler Toledo, XS105 |
| Kriyo tüp | Grenier Bio-One |
| Hücre kültür flaskları (25, 75 cm ²) | Corning, Isolab |
| İnkübatör (CO ₂ 'li) | Heraeus Instruments, Funvtion Line |
| Neubauer Lamı | Marienfeld |
| Lamel | Isolab |
| Santrifüj Cihazı | Heraeus, Hettich, Rotofix 32A |
| Su Banyosu | Memmert, Edelstaht Rostfrei |
| Vorteks | LMS, Mixer Uzusio VTX- 3000L |
| Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml) | Grenier Bio-One |
| Steril santrifüj tüpleri | Grenier Bio-One |
| Otoklav | Nüve NC40M |
| Laboratuvar tipi kırık buz yapma cihazı | Scotsman AF100 |
| Derin Dondurucu (-20 °C) | Arçelik |
| Derin Dondurucu (-80 °C) | Revco, Legaci |
| Işık Mikroskobu | Leica |
| Otomatik Pipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml) | Eppendorf, Isolab |
| Otomatik Pipet Uçları (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml) | Eppendorf, True-Line |
| Enjektör filtresi (0,22 Mikron por açıklığı) | Merck |

3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y ATCC CRL-2266TM) kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri American Type Cell Collection (ATCC)'den satın alındı. Hücreler 4 yaşında kız çocuktan alınan, kemik iliği dokusundan elde edilmiş epiteliyal morfolojide nöroblastoma hücreleridir. Hem adheren hem de süspanse hücreleri içerir. Orijinal olarak bir metastatik kemik tümörü biyopsisinden türetilmiş, SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266TM) hücreleri, ana SK-N-SH (ATCC® HTB-11TM) soyunun bir alt hücre hattıdır.

Hücreler DMEM/F-12 besiyeri içerisine %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin eklenerek flasklarda çoğaltılmıştır. Besiyeri 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. İnkübasyon işlemi 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde yapılmıştır. Besiyeri haftada 2-3 defa değiştirilmiştir.

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Tiyomersal Çözeltisinin Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 404,81 g olan tiyomersalden 4 mg tartılıp 5 ml besiyerinde çözülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiden ileri seyreltmeler yapılmıştır.

3.4.2. Alüminyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

Molekül ağırlığı 78 g/mol olan Alüminyum hidroksit bileşiğinin sulu çözeltisinden 312 µl alınmış ve besiyeri ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden ileri seyreltmeler yapılmıştır.

3.4.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

DMSO

DMSO özgül ağırlığı 1,1 g/cm³ olan uçucu bir sıvı olup kullanıma hazırdır.

MTT Çözeltisi

0,5 mg/ml konsantrasyona sahip MTT çözeltisi hazırlamak için 3 ml DPBS'de 15 mg MTT hassas terazide tartılıp toplam hacim olacak şekilde 30 ml besiyerine eklenmiştir .24 saat içinde kullanılmıştır.

3.4.4. ROS Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi

1 ml ROS lik tayin reakti ticari kiti kullanılmıştır.

DMSO

0,1 ml DMSO ticari kiti kullanılmıştır.

Deney Tamponu

20 ml deney tamponu ticari kiti kullanılmıştır.

Master Reaksiyon Karışımı

20 µl ROS tayin reaktifi ile 10 ml deney tamponu karıştırılarak hazırlanmış ve 2 sat içinde kullanılmıştır.

3.4.5. Hücrelerin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler

Lizis Tampon Çözeltisi

CellLytic™ MT lizis reaktifi kullanılmıştır. Proteinlerle minimum girişimi elde etmek amacıyla deterjan ve 150 nM NaCl ve düşük konsantrasyonlarda bisin, çözeltisi hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

Proteaz İnhibitörü

Pepstatin A, aprotinin, E-64, lökopeptin, bestatin içermektedir. Aspartik proteaz, serin, aminopeptidazları inhibe eder. -20 °C'de muhafaza edilmiştir

Proteaz İnhibitör Kokteyli

1 ml proteaz inhibitörü 100 ml lizis tampon çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.4.6. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Protein Belirleme Deney Reaktifi

7,5 ml deney reaktifi 50 ml deiyonize su ile dilüe edilmiştir

Protein Belirleme Sığır Serum Albumini (BSA) Standardı

%0.9 tuz çözeltisi ve %0.05 sodyum azid içerisinde 10 mg/ml stok konsantrasyonda olan BSA standardı, konsantrasyonu 40 µg/ml olacak şekilde 4 µl stok standart 996 µl deiyonize su ile dilüe edilmiştir

3.4.7. Total GSH Tayininde Kullanılan Çözeltiler

GSH MES Tamponu

0,4 M 2-(N-morfolin)etansülfonik asit, 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA'dan oluşur. (pH 6.0). 60 ml tampon 60 ml deiyonize su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır.

GSSG Standardı

25 µM 2 ml GSSG kullanıma hazır vial şeklindedir . 0-4 °C'de 1 yıl stabildir.

GSH Co-Faktör Karışımı

Liyofilize toz şeklinde NADP⁺ ve glukoz-6-fosfat içeren vial 0,5 ml su eklenmiştir. 0-4 °C'de 2 hafta stabildir.

GSH Enzim Karışımı

2 ml tampon içerisinde glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz bulunan vial 2 ml MES tamponundan eklenmiştir. 0-4 °C'de 2 hafta stabildir.

GSH 5,5'-Ditiyo-Bis- (2- Nitrobenzoik asit) (DTNB)

Liyofilize toz halde DTNB (Ellman's reaktifi) vialde 0,5 ml deiyonize su eklenir ve 10 dakika içinde kullanılır.

3.4.8. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik asit

12 M HCl içeren vialde 40 ml deiyonize su üzerine eklenerek 2,5 M HCl elde edilmiştir. 3 ay oda sıcaklığında dayanıklıdır.

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)

Deney tüpüne DNPH içeren vial ve 2,5 M 10 ml HCl eklenmiştir. 4 °C'de karanlıkta 1 hafta dayanıklıdır.

Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi

Kit 1 g/ml TCA çözeltisi içeren vial içerir. %20 TCA elde etmek için 12 ml TCA çözeltisi 48 ml deiyonize su ile dilüe edilir. Bu çözeltiden 20 ml alınarak 20 ml deiyonize su eklenip %10'luk TCA çözeltisi elde edilir.

Guanidin Hidroklorür

Kit kullanıma hazırdır.

Etanol

3 vialde 30'ar ml etanol kullanıma hazır ticari kit kullanılmıştır.

Etil Asetat

3 vialde 30'ar ml etanol kullanıma hazır ticari kit kullanılmıştır. Etanol ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir.

3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik asit (TBA)

2 g TBA vial şeklinde ticari kit kullanılmıştır.

TBA Asetik Asit

20ml konsantre asetik asiti içeren vial halinde ticari kit kullanılmıştır. 40 ml asetik asit 160 ml deiyonize su ile dilüe edilmiştir. 3 ay oda sıcaklığında dayanıklıdır.

TBA Sodyum Hidroksit

20 ml TBA sodyum hidroksit (NaOH) 180 ml deiyonize su ile dilüe edilmiştir 3 ay oda sıcaklığında dayanıklıdır

TBA Malondialdehit (MDA) Standardı

500 µM MDA vial şeklinde ticari kittir.

TBA Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

SDS çözeltisi içeren vial şeklinde ticari kittir

Renk Reaktifi

530 mg TBA üzerine 50 ml seyreltilmiş TBA asetik asit solüsyonu ,50 ml TBA seyreltilmiş sodyum hidroksit eklenerek hazırlanmıştır. 24 saat içinde kullanılmalıdır.

3.4.10. TAOC Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Antioksidan Deney Tamponu

pH'ı 7.4, 5 mM potasyum fosfat ve %0,9 sodyum klorür içerecek şekilde 3 ml konsantre deney tamponu 27 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. 4 °C'de saklandığında en azından 6 ay stabildir.

Antioksidan Deney Kromojen

2,2'-azino-di(3-etilbenztiyazolin sülfonat) (ABTS) liyofilize toz halde olan vialde 6 ml deiyonize su eklenerek vortekslenip çözülmüştür. 4 °C'de 24 saat stabildir.

Antioksidan Deney Metmiyoglobin

Liyofilize toz halindeki Metmiyoglobin içeren vialde 600 µl deney tamponu eklenerek vortekslenir. -20 °C'de saklanır 1 ay dayanıklıdır.

Antioksidan Deney Trolox

Liyofilize toz halde Trolox (6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) içeren vialde 1 ml deiyonize su eklenip vortekslenir. 4 °C'de 24 saat stabil halindedir.

Antioksidan Deney Hidrojen Peroksit

441 µM konsantrasyona sahip çalışma çözeltisi hazırlamak için, 8.82 M H₂O₂ içeren vialde 10 µl H₂O₂ 990 µl deiyonize su eklenip 20 µl alınmış ve üzerine 3.98 ml deiyonize su ilave edilmiştir.

3.4.11. DBH Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart

400 ng/ml standart stok çözeltisi hazırlamak için 800 ng/ml lık standarttan 120 µl alınıp 0 ng/ml olan 120 µl standart dilüent ile seyreltilmiştir . Dilüsyon öncesi 15 dak beklendi.. Bundan da 200 ng/ml ,100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml'lik çözeltiler hazırlanmıştır.

Yıkama Tamponu (25x)

(25x) deiyonize su ile 500 ml'ye seyreltilmiş konsantre yıkama tamponu kullanıldı.

3.4.12. DA Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu (20x)

15 ml olan konsantre yıkama 300 ml'ye deiyonize su ile tamamlanarak dilüe edildi.

3.4.13. NE Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltiler

Standart

2400 ng/L standart çözeltiden 120 µl ve 0 ng/ml' lik olan 120 µl standart dilüent ile seyreltilerek 1200 ng/L standart stok elde edildi. 15 dakika beklendi ve daha sonra 120 µl standart dilüentten klenerek 600 ng/<1300 ng/L, 150 ng/L, 75 ng/L'lik

Yıkama Tamponu (25x)

20 ml yıkama tamponu 500 ml'ye deiyonize su ile dilüe edildi.

3.4.14. DAT Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Tamponu (25x)

750 ml yıkama tamponu için 30 ml konsantre yıkama tamponu 720 ml deiyonize su ile seyreltildi.

Standart Çalışma Çözeltisi

10 ng/mL çalışma çözeltisi için, standart 1 dakika santrifüjlenip 1 ml referans standart&numune dilüenti ilave edildi. 10 dakika vial tersyüz ederek karışamsı sağlandı. 7 adet eppendorf tüpüne 500 µL referans standart&numune dilüenti eklenip 10 ng/mL çalışma çözeltisinden 500 µL ilk tüpe eklenip 5 ng/mL çalışma çözeltisi elde edilmiş, bir önceki tüpten sonraki tüpe 500 µL aktarılarak 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,63 ng/mL, 0,32 ng/mL, 0,16 ng/mL, 0 ng/mL'lik çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.. Son tüpe bir önceki tüpten aktarım yapılmamış ve kör tüp elde edilmiştir

Biyotinlenmiş Tespit Antikor Çalışma Çözeltisi

Konsantre halde biyotinlenmiş tespit antikorunu (100x) 1 dakika santrifüj edildikten sonra 1:99 olacak şekilde biyotinlenmiş tespit antikor dilüenti ile dilüe edilmiştir

Konsantre Bayır Turpu Peroksidazı (HRP) Konjuge Çalışma Çözeltisi

Konsantre HRP konjugatı (100x) 1 dakika santrifüj edilip 1:99 olacak şekilde HRP konjuge dilüenti eklenmiştir.

3.4.15. NRF2 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart

80 ng/ml standarttan 120 µl alınmış 120 µl'si ile standart dilüent eklenip 40 ng/ml'lik standart stok çözeltisi elde edilmiştir. 15 dakika beklenip standart stok çözeltisinden bir sonraki tüpe 120 µl eklenip 20 ng/, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2 ng/ml'lik çözeltiler elde edilmiştir.

Yıkama Tamponu (25x)

20 ml konsantre yıkama tamponu (25x) deiyonize su ile 500 ml'ye dilüe edilmiştir.

3.4.16. DNA Oksidatif Hasar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ELISA Tamponu

Konsantre ELISA tamponu (10x) 90 ml ultra saf su ile dilüe edilmiştir

Yıkama Tamponu

5 ml konsantre yıkama tamponu (400x) 2 litreye ultra saf su ile tamamlanarak seyreltilip 1 ml Polisorbat 20 ilave edildi.

3.5. Hücreler ve Deney Grupları

3.5.1. Deney Grupları

1. Kontrol Grubu: Bu ruba deneyler sırasında sadece besiyeri eklenip herhangi bir uygulama yapılmadı..

2. Tiyomersal Grubu: Yapılan sitotoksisite deneyleri sonrasında tespit edilen inhibitör konsantrasyon 20 (IC₂₀, 1,15 µM) tiyomersal 24 saat uygulanmıştır.

3. Alüminyum Hidroksit Grubu: Sitotoksisite deneyleri sonucu tespit edilen IC₂₀ (362 µM) alüminyum hidroksit 24 saat uygulanmıştır.

4. Tiyomersal + Alüminyum Hidroksit: Bu grupta bulunan hücelere 24 saat boyunca yapılan sitotoksisite deneyleri sonucu tespit edilen IC₂₀ dozunda tiyomersal (1,15 µM) ve alüminyum hidroksit (362 µM) uygulanmıştır.

3.5.2. Donmuş Hücrelerin Çözülme İşlemleri

1. Kullanılacak tüm malzemeler ve biyogüvenlik kabini içi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.

2. Su banyosunun 37 °C'ye kadar ısınması sağlanmıştır.

3. Besiyeri +4 °C'deki buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.

4. Hücrelerin bulunduğu kriyotüp -80 °C'den çıkarılıp buz üzerine alınmıştır.

5. Hücrelerin çözülmesi için kriyotüp su banyosunda dikkatli bir şekilde ısıtılmıştır.

6. Güvenlik kabinine alınan kriyotüpten hücreler santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine besiyeri eklenmiş olup pipetaj ile süspandeye hale getirilmiştir.

7. 1200 devirde 5 dk santrifüjlenmiştir.

8. Daha sonra süpernatant pipetle alınarak atılmıştır.

9. Pellet üzerine besiyeri eklenmiştir.

10. Pipetaj işlemiyle pellet ve besiyeri süspandeye hale getirilmiş oluşan karışım pipetle çekilerek flaska alınmıştır.

11. Flaskadaki hücreler mikroskopta incelenmiştir.

12. Flaskalar etüvde (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edilmiştir.

3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması

1. Kullanılacak tüm malzemeler ve biyogüvenlik kabini içi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.
2. Su banyosunun 37 °C'ye kadar ısınması sağlanmıştır.
3. Besiyeri, tripsin-EDTA ve DPBS buzdolabından alınıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Flasktaki hücrelerin durumu mikroskopta incelenmiştir.
5. Yeterli yoğunluğa sahip hücreler pasajlama işlemine alınmıştır.
6. Hücrelerin üzerinde olan besiyeri Pasteur pipeti ile alınmıştır.
7. Flaska tutunmuş hücreler 5 ml DPBS ile 2 defa yıkanmıştır.
8. Daha sonra hücrelerin flask tabanından kalkması için 4 ml tripsin-EDTA ilave edilerek 3-5 dk inkübatörde bekletilmiştir.
9. Işık mikroskopunda hücrelerin kalkması incelendikten sonra 8 ml besiyeri flaska eklenmiştir.
10. Flask içindeki hücre+tripsin-EDTA+besiyeri karışımı santrifüj tüpüne alınıp 1200 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir.
11. Daha sonra süpernatant atılmış pellet üzerine 10 ml besiyeri eklenerek süspande edilmiştir.
12. Tüpteki hücre ve besiyeri yeni flaska ekilmiştir.
13. Flasklara hücre tipi, pasaj sayısı, besiyeri bilgisi, tarih bilgileri yazılarak 37°C ve %5 CO₂'li etüve yerleştirilmiştir.

3.5.4. Hücrelerin Besiyeri Değişimi

1. Kullanılacak tüm malzemeler ve biyogüvenlik kabini içi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.
2. Su banyosunun 37 °C'ye kadar ısınması sağlanmıştır.
3. DPBS ve besiyeri +4 °C'deki buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Etüvde (37 °C ve %5 CO₂) inkübasyonda olan hücrelerin mikroskopta canlılıkları incelenmiştir.

5. Hücrelerin üzerindeki eski besiyeri Pasteur pipeti ile alınmıştır.
6. Flasktaki hücreler 5 ml DPBS ile 2 defa yıkanmıştır.
7. Flasklara 10 ml taze besiyeri eklenerek inkübatöre koyulmuştur.

3.5.5. Hücrelerin Dondurulma İşlemi

Flasktaki hücrelerin mikroskopta incelenmesi sonucu yeterli yoğunluğa ulaştığı tespit edildiğinde daha sonradan yapılacak deneylerde kullanılması amacıyla dondurularak -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

1. Kullanılacak tüm malzemeler ve biyogüvenlik kabini içi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.
2. Su banyosunun 37 °C'ye kadar ısınması sağlanmıştır.
3. Besiyeri, tripsin-EDTA ve DPBS buzdolabından alınıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. 700 µl besiyeri, 200 µl FBS ve 100 µl DMSO içeren dondurma vasatı hazırlanmıştır.
5. Flasklar inkübatörden alınmış olup pipet ile besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler DPBS ile yıkanarak geriye kalan besiyeri de uzaklaştırılmıştır.
6. Flaska 4 ml tripsin-EDTA ilave edilerek 3-5 dk inkübatörde bekletilmiştir.
7. Flask tabanından hücrelerin kalkıp kalkmadığı incelenerek flask üzerine 7-8 ml besiyeri eklenmiştir.
8. 1200 devirde 5 dk santrifüj işleminden sonra süpernantant uzaklaştırılmıştır.
9. Pellet üzerine önceden hazırlanan dondurma vasatı eklenerek pipetleme ile dağıtılmıştır.
10. Süspansiyon halindeki hücreler kriyotüpe alınmış olup tüp önce 24 saat -20 °C 'de bekletilmiştir. Daha sonra -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.5.6. Hücre Sayım İşlemi Basamakları

Hücre sayım işlemi tripan mavisi ile yapılmaktadır. Tripan mavisi canlı hücrelerin içine giremez ancak ölü hücrelerin içine kolayca girebilmektedir. Bu ayırmadan faydalanılarak sayım yapılabilmektedir.

1. Kullanılacak tüm malzemeler ve biyogüvenlik kabini içi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.

2. Su banyosunun 37 °C'ye kadar ısınması sağlanmıştır.
3. Besiyeri, tripsin-EDTA ve DPBS buzdolabından alınıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Flasktaki hücrelerin yoğunluğu mikroskop ile kontrol edilmiş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 2 defa 5 ml DPBS ile hücreler yıkanmıştır.
5. Daha sonra flask tabanındaki hücrelerin kalkması için 4 ml tripsin-EDTA ilave edilerek 3-5 dk inkübasyon için etüve yerleştirilmiştir.
6. Hücrelerin kalktığı mikroskopta görüldükten sonra 8 ml besiyeri flask üzerine ilave edilmiştir.
7. Flask steril santrifüj tüpüne aktarılarak 1200 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant atılıp pellet üzerine 10 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin homojen dağılması sağlanmıştır.
9. Daha sonra içerikten 50 µl ependorf tüpe aktarılarak üzerine 50 µl tripan mavisi çözeltisi eklenerek süspansiyon edilmiştir.
- 10-Hücre sayımı için Neubauer lamınının 2 bölmesine hücre süspansiyonundan 10 µl ilave edilmiş ve ışık mikroskopunda sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Lamdaki toplam 8 kare içinde bulunan hücreler sayılarak işlem sonunda sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır. Daha sonra ml'de bulunan hücre sayısı aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır;

$$\frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{\text{ml}} = \frac{(\text{sayılan toplam hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü})}{8} \times \frac{10000}{\text{ml}}$$

3.6. Deneysel İşlemler

3.6.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Ölçümü

Yöntem Esası

MTT hücre büyüme hızını ölçmede kullanılan en yaygın yöntemdir. Yöntemin esası canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenazın tetrazol halkalarını parçalayabilmesi böylece sarı ve suda çözünebilen MTT'nin, mor kristalli bir formazan üretmek için indirgenmesine dayanır. Bu madde DMSO'da çözünür. Oluşan kristallerin miktarı hücre sayısı ve ve aktivitesi ile doğru orantılıdır (124).

Yöntemin Uygulanışı

1- Hücreler 20000 hücre/kuyu konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve inkübatörde 24 saat bekletilmiştir.

2- 24 saatin sonunda hücrelerin bulunduğu kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 0-2500 μ M doz aralığında alüminyum hidroksit çözeltisi ve 0-4 μ M doz aralığında tiyomersal çözeltisi uygulanmıştır.

3- 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki çözeltiler uzaklaştırılmıştır.

4- 6,4 mg MTT tartılmış ve son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde 1 ml DPBS ve 11,8 ml besiyeri içerisinde çözündürülmüştür.

5- Hazırlanan MTT çözeltisinden 100 μ l eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda MTT uzaklaştırılmıştır.

6- Oluşan formazanı çözmek amacıyla 150 μ l DMSO eklenerek çalkalayıcıda 5-10 dk çalkalanmıştır.

7- Daha sonra absorbans 570 nm'de ölçülmüştür.

8- MTT çözeltisini ışıktan korumak amacıyla deney karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupta bulunan hücrelerin canlılığı kontrole göre % olarak hesaplanmıştır.

3.6.2. Hücre İçi ROS Tayini

Yöntemin Esası

ROS aerobik solunum esnasında oksijenin indirgenmesi ve hücre içindeki bazı enzimatik olaylar sonucu üretilir. ROS'un artması oksidatif stres ve hücre hasara sebep olabilir. Deneyde hücre içi ROS düzeyi ölçülür. ROS, sitoplazmada bulunan florojenik bir sensör ile reaksiyona girer böylece florometrik bir ürün oluşur. Oluşan ürün florometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı

1- 40 µl DMSO ile ROS tayin reaktifi karıştırılmış böylece ROS tayin reaktifi stok çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti -20 °C’de saklanmıştır.

2- Plağa SH-SY5Y hücreleri 90 µl besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3- Tiyomersal ve alüminyum hidroksitin IC₂₀ konsantrasyonlarının 10 katı çözeltiler hazırlanıp 10 µl eklenmiştir. Kontrol gruplarına sadece 10 µl besiyeri eklenmiştir.

4- Plak %5 CO₂, 37 °C inkübatörde 30 dakika inkübe edildi.

5- 20 µl ROS tayin reaktifi stok çözeltisi ve 10 ml deney tamponu karıştırılarak ana reaksiyon karışımı elde edilmiştir.

6- Ana reaksiyon karışımının 100 µl’si hücreleri içeren plaktaki kuyucuklara eklendi. Plak %5 CO₂, 37 °C inkübatörde 1 saat inkübe edildi.

7- Plak 37 °C %5 CO₂’li ortamda inkübatörde inkübe edilmiştir.

8- Kuyucukların floresansı leksitasyon: 640 nm ve λemisyon: 675 nm’de ölçülmüştür.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin ürettiği ROS miktarı %100 kabul edilmiş diğer hücreler tarafından üretilen ROS miktarı kontrolle karşılaştırılarak %100 olarak hesaplanmıştır.

3.6.3. Protein Miktarının Ölçümü

Yöntem Esası

Deney protein miktar tayininde sıkça kullanılan Bradford yöntemine dayanır. Bu yöntemde boyanın proteine asidik ortamda bağlanması sonucu renginin kahverengiden mavi renge dönüşmesinin ölçümü yapılır.

Yöntem Uygulanışı

1-Plakta standartlar için belirtilen kuyucuklara 100 µl protein belirleme BSA standardı eklenmiştir.

2-100 µl numune kuyucuklarına numune eklenmiştir.

3-Her bir kuyucuğa protein belirleme deney reaktifi eklenmiştir.

4-Plak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

5-Absorbans 595 nm’de ölçülmüştür.

Protein Miktarının Hesaplanması

Numuneler ve standartların absorbans ortalaması alınmıştır. Kör absorbans değeri numuneler ve standartların değerlerinden çıkarılmıştır. Standartların konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak eğri çizilmiştir. Numunelerin protein konsantrasyon değerleri µg/ml olarak ifade edilmiştir.

3.6.4. Protein Karbonil Düzeylerinin Ölçümü

Yöntem Esası

Protein karbonil içeriği protein oksidasyonun en açık göstegesidir. Deneyin esasında DNPH’nin protein karbonilleriyle reaksiyona girerek spektrofotometrik analiz edilebilen hidrazon üretmek için Schiff bazı oluşturması vardır.

Yöntemin Uygulanışı

1- 2 plastik tüpe 200 µl numune koyulmuştur. Bir tüp numune bir tüp kontrol tüpüdür.

2- DNPH’den 800 µl numune tüpüne, 2,5 M HCl’den 800 µl kontrol tüpüne eklenmiştir.

3- 1 saat boyunca iki tüpte inkübe edilmiştir

4- Daha sonra her bir tüpe %20 TCA’dan 1 ml eklenip vortekslenmiştir. Tüpler buz üzerine koyulup 5 dakika inkübe edilmiştir.

5- Tüpler 4 °C’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

6- Süpernatant ayrılıp pellet 1 ml %10 TCA’da yeniden süspande edildi. Tüpler 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

7- Tüpler 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

8- Sonra süpernatant ayrılıp pellet 1 ml etanol/etil asetat karışımında yeniden süspande edildi. Daha sonra 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Bu adım 3 defa gerçekleştirildi.

9- Son yıkamadan sonra protein pelletler 500 µl guanidin hidroklorür vorteksleyerek süspande edilmiştir.

10- Sonra tüpler 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

11- Süpernatantın 220 µl'si numune tüpünden 96 kuyucuklu plaka aktarıldı.

12- Süpernatantın 220 µl'si kontrol tüpünden 96 kuyucuklu plaka aktarıldı.

13- Plak okuyucu kullanılarak 360 nm'de absorban ölçümü yapıldı.

Protein Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması

Numune ve kontrolün ortalama absorbanları hesaplanmıştır. Kontrolün ortalama absorbanı numunenin ortalama absorbanından çıkartılarak düzeltilmiş absorban değeri bulunmuştur. Düzeltilmiş absorban değeri eklenerek aşağıdaki denklem ile karbonillerin konsantrasyonu bulunmuştur.

Protein Karbonil (nmol/ml) = [(Düzeltilmiş absorban) / (* 0.011 µM⁻¹)] x (500 µl/200 µl)

370 nm'de DNPH için gerçek ekstinksiyon katsayısı 22,000 M⁻¹cm⁻¹ (0.022 µM⁻¹cm⁻¹)'dir. Bu değer kuyucuktaki çözeltinin yol uzunluğu sebebiyle düzenlenmiştir.

3.6.5. Total GSH Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası

GSH hayvanlarda ve bitkilerde bulunan bir tripeptittir. GSH ksenobitikleri detoksifiye etmek için GSH transferaza nükleofilik bir kosubstrat olarak hizmet eder. GSH'ın sülfidril grupları DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) üretir. Oluşan disülfür GSTNB (GSH ve TNB arasında), daha fazla TNB üretmek ve GSH'ı geri dönüştürmek için GR tarafından indirgenir. Bu geri dönüşüm reaksiyonu TNB üretim hızı ile doğru orantılı olup bu da numunedeki GSH

konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 414 nm’de TNB absorbansını ölçerek GSH’ın numunedeki seviyesi belirlenir.

Yöntemin uygulanışı

- 1- Plaktaki kuyucuklara 50 µl standart eklenmiştir.
- 2- Daha sonra örnek kuyucuklarına kontrol, tiyomersal, alüminyum hidroksit, tiyomersal + alüminyum hidroksit muamele edilen SH-SY5Y hücre lizatı eklenmiştir.
- 3- Plak kapak ile kapatılmıştır.
- 4- 11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml kofaktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB birbiriyle karıştırılarak deney kokteyli hazırlanmıştır. Kokteyl hazırlandıktan sonra 10 dakika içinde kullanılmalıdır.
- 5- Kuyucukların herbirine 150 µl deney kokteyli eklenmiştir.
- 6- Plak karanlık olacak şekilde çalkalayıcıda 25 dakika inkübe edilmiştir.
- 7- 25 dakika geçtikten sonra 414 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Total GSH Düzeylerinin Hesaplanması

GSSG standart-absorbans eğrisi çizilmiştir. Buradan hareketle numunedeki total GSH konsantrasyonları hesaplanarak sonuçlar nmol/mg protein şeklinde verilmiştir.

3.6.6. TAOC Ölçümü

Yöntem Esası

Endojen ve besin kaynaklı antioksidanların toplamı total antioksidan aktiviteyi oluşturur. Deneyin esası numunedeki antioksidanların metmiyoglobin tarafından ABTS’nin ABTS^{•+}’ye oksidasyonunu engellemesine dayanır. Numunedeki antioksidanların ABTS’nin oksidasyonunu engelleme kapasitesi suda çözünür bir tokoferol analogu olan Trolox ile karşılaştırılır ve milimolar Trolox eşdeğerleri olarak ölçülür.

Yöntem Uygulanışı

1- Trolox standartları, trolox ve deney tamponu kullanılarak kitte belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

2- Hazırlanan trolox standartları standart kuyucuklarına 10 µl eklenmiştir daha sonra 10 µl methemoglobin ve 150 µl kromojen eklenmiştir.

3- Numune kuyucuklarına 10 µl numune, 10 µl methemoglobin ve 150 µl kromojen eklenmiştir.

4- 40 µl H₂O₂ çalışma çözeltisi bütün kuyucuklara 1 dakika içinde eklenmiştir.

5- Plak kapak ile kapatılıp oda sıcaklığında 5 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Sonra absorbans 750 nm'de ölçülmüştür.

TAOC Düzeylerinin Hesaplanması

Standart ve numunelerin ortalama absorbansları hesaplanmıştır. Standartların Trolox konsantrasyonuna karşı konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Daha sonra numunelerin absorbans değerleri grafikten elde edilen denklemde yerine koyularak numunelerin antioksidan konsantrasyonları bulunmuştur.

3.6.7. Lipit peroksidasyonunun Tayini

Yöntemin esası

MDA lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelir. Lipid peroksidasyon hücre ve dokulardaki oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılır. TBARS'ın ölçümü lipit peroksidasyonunu izlemek için iyi bilinen bir mekanizmadır. Deney MDA ve tiyübarbitürik asidin reaksiyona girmesi sonucu oluşan bileşiğin renk şiddetinin 530 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Yöntemin uygulanışı

1- 100 µl MDA standardı ve numune çözeltisi 5 ml tüplere 100'er µl eklendi. Daha sonra 100 µl SDS çözeltisi tüplere eklendi ve karıştırıldı.

2- Her tüpe renk reaktifinden 4 ml eklendi.

3- Tüpler 1 saat boyunca su banyosunda kaynatılmıştır. Daha sonra hızlıca buz üzerine koyulmuş 10 dakika burada bekletilmiştir.

4- Sonra 10 dakika 3500 devirde santrifüj edilmiştir.

5- Sonrasında 150 µl tüplerden şeffaf plaktaki kuyucuklara eklenmiş ve absorbands 530 nm'de ölçülmüştür.

MDA Düzeylerinin Hesaplanması

Standartların konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Buradan hareketle numunedeki MDA düzeyleri hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein şeklinde verilmiştir.

3.6.8. DA Düzeylerinin Tayini

Yöntem Esası

Kitte bulunan plaklar antikorla kaplanmıştır. Standart ve numuneler DA ve HRP konjuge DA için spesifik bir antikor ile uygun plak kuyucuklarına eklenir. HRP etiketli DA ile antikor etiketlenmemiş DA arasında yarışmacı inhibisyon reaksiyonu başlar. Plağa substrat solüyonu eklenmesiyle numunedeki DA miktarına ters olarak renk gelişir. Son olarak renk gelişimi durdurularak ölçüm yapılır.

Yöntem Uygulanışı

- 1- Kör kuyucuk belirlendi.
- 2- Her bir kuyucuğa 50 µl standart ve numune çözeltileri eklendi.
- 3- Kör hariç bütün kuyucuklara 50 µl HRP-konjugatı eklendi. Daha sonra her kuyucuğa 50 µl antikor eklendi. Karıştırılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- 4- Kuyucuklar aspire edilip 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez gerçekleştirildi. En son plak ters çevrilip kağıt havluya bastırıldı.
- 5- Her bir kuyucuğa 50 µl Substrat A ve Substrat B eklendi ve karıştırıldı. 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Plak karanlıkta bekletildi.
- 6- Her kuyucuğa 50 µl stop çözeltisi eklendi ve karışması için plağa hafifçe vuruldu.
- 7- Mikroplak okuyucuda 450 nm'de optik yoğunluk belirlendi.

DA Düzeylerinin Belirlenmesi

DA düzeylerinin hesaplanmasında Molecular Devices-Softmax® programından faydalanılmıştır. Numune, standart ve kontrol gruplarına ait absorbanslar programda yazılarak standart eğri elde edilmiştir. Numunelerin DA seviyeleri buradan elde edilen denkleme göre belirlenmiştir.

3.6.9. DAT Düzeylerinin Tayini

Yöntem Esası

Yöntem Sandviç ELISA esasına dayanır. Kitteki plak insan DAT'a özgü antikor ile kaplanmıştır. Numune veya standartlar eklenerek spesifik antikorlarla birleştirilir. Sonra insan DAT ve Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş bir antikor plak kuyularına eklenerek inkübe edilir. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra her kuyucuğa substrat solüsyonu eklenir. İnsan DAT, Avidin-HRP konjugatı ya da biyotinlenmiş saptama antikoruna olan kuyucuklar mavi renkte görünür. Durdurma çözeltisi eklenir ve renk sarıya dönüşür. Son olarak optik yoğunluk 450 nm'de ölçülür. Optik yoğunluk insan DAT'ı ile orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı

- 1- Standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenmiştir.
- 2- Numune kuyucuklarına 40 µl numune eklenmiş olup daha sonra 10 µl anti-DBH antikor eklenmiştir. Daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir (Kör kontrol kuyucuğa eklenmemiştir). Plak karıştırıldıktan sonra kapatılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3- Plak açıldıktan sonra yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Plak kağıt havlu ile kurulanmıştır.
- 4- Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve substrat çözeltisi B eklenmiştir. Plak üzeri kapatılıp karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 5- 50 µl stop çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Mavi rengin sarıya döndüğü gözlenmiştir.
- 6- Stop çözeltisi eklendikten sonraki 10 dakika içinde mikropalak okuyucuda 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

DAT Düzeylerinin Hesaplanması

DAT düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı aracılığıyla hesaplanmıştır. Numune, standart ve kontrol gruplarının absorbans değerleri programa girilerek standart eğri elde edilir. Numunedeki DAT seviyeleri buradan elde edilen denkleme göre belirlenir.

3.6.10. DBH Düzeylerinin Ölçümü

Yöntem Esası

Yöntem Sandviç ELISA esasına dayanır. Plak önceden insan DBH antikoru ile kaplanmıştır. Numunedeki DBH eklenir ve böylece kuyucukların üzerine kaplanan antikorlar ile bağlanır. Sonra biyotinlenmiş insan DBH antikoru eklenir ve numunedeki DBH'ye bağlanır. Daha sonra streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş DBH antikora bağlanır. Daha sonra inkübasyon ve yıkama işlemi gerçekleştirilip ilgili çözeltiler eklenir. 450 nm'de absorbans ölçülür.

Yöntem Uygulanışı

- 1- Standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenmiştir.
- 2- Numune kuyucuklarına 40 µl numune eklenmiş olup daha sonra 10 µl anti-DBH antikor eklenmiştir. Daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir (Kör kontrol kuyucuğa eklenmemiştir). Plak karıştırıldıktan sonra kapatılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3- Plak açıldıktan sonra yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Plak kağıt havlu ile kurulanmıştır.
- 4- Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve substrat çözeltisi B eklenmiştir. Plak üzeri kapatılıp karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 5- 50 µl stop çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Mavi rengin sarıya döndüğü gözlenmiştir.
- 6- Stop çözeltisi eklendikten sonraki 10 dakika içinde mikropalak okuyucuda 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

DBH Düzeylerinin Hesaplanması

DBH düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı aracılığıyla hesaplanmıştır. Numune, standart ve kontrol gruplarının absorbans değerleri programa girilerek standart eğri elde edilir. Numunedeki DBH seviyeleri buradan elde edilen denkleme göre belirlenir.

3.6.11. NE Düzeylerinin Tayini

Yöntem Esası

Yöntem Sandviç ELISA prensibine dayanmaktadır. Kitteki plak insan NE antikoruyla kaplanmıştır. Numunedeki NE eklenir ve kuyucukların üzerine kaplanan antikorlar ile bağlanır. Sonra biyotinlenmiş insan NE antikoru eklenir ve numunede bulunan NE ile bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş NE antikoruna bağlanır. Daha sonra inkübasyon ve yıkama işlemi gerçekleştirilip ilgili çözeltiler eklenir. Absorbans 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı

- 1- Standart kuyucuklarına 50 µl standart eklenmiştir.
- 2- Numune kuyucuklarına 40 µl numune eklenmiş olup sonra 10 µl anti-NE antikor eklenmiştir. Daha sonra 50 µl streptavidin-HRP hem numune hem de standart kuyucuklarına eklenmiştir (Kör kontrol kuyucuğuna eklenmemiştir). Plak iyice karıştırılıp üzeri kapatıldıktan sonra 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3- Yıkama tamponu ile plak 5 kere yıkanmıştır. Plak kağıt havlu ile kurulanmıştır.
- 4- Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve substrat çözeltisi B eklenmiştir. Plak karanlıkta üzeri kapatılıp 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 5- 50 µl stop çözeltisi her bir kuyucuğa eklenmiş olup mavi rengin sarı renge dönüştüğü gözlenmiştir.
- 6- Mikroplaka okuyucuda 450 nm’de ölçüm yapılmıştır.

NE Düzeylerinin Hesaplanması

NE düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı aracılığıyla hesaplanmıştır. Numune, standart ve kontrol gruplarının absorbans değerleri programa girilerek standart eğri elde edilir. Numunedeki DAT seviyeleri buradan elde edilen denkleme göre belirlenir.

3.6.12. NRF2 Düzeylerinin Tayini

Yöntem Esası

Yöntem Sandviç ELISA esasına dayanır. Plak insan NRF2 antikoru ile kaplanmıştır. Numunedeki NRF2 eklenir ve kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. Sonra biyotinlenmiş insan NRF2 antikoru eklenir ve numunedeki NRF2'ye bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve o da biyotinlenmiş NRF2'ye bağlanır. Daha sonra inkübasyon ve yıkama işlemi gerçekleştirilip ilgili çözeltiler eklenir. 450 nm'de absorbans ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı

- 1- Standart için belirlenen kuyucuklara 50 µl standart eklenmiştir.
- 2- Daha sonra numune kuyucuklarına 40 µl numune ve 10 µl insan İnsan NRF2 antikoru eklenmiştir. Standart ve numune kuyucuklarına ise 50 µl streptavidin-HRP ilave edilmiştir (Kör kontrol kuyucuklarına eklenmedi). Karıştırılıp plak üzeri kapatılıp 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir.
- 3- Daha sonra üzeri açılıp plak yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Plak kağıt havlu ile kurulandı.
- 4- Her kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A eklenip sonra 50 µl substrat çözeltisi B eklendi. Daha sonra plak üzeri kapatılıp 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 5- Her bir kuyucuğa 50 µl stop çözeltisi eklenmiştir. Mavi rengin sarıya döndüğü gözlenmiştir.
- 6- Stop çözeltisi eklendikten sonraki 10 dakika içinde 450 nm'de ölçüm yapıldı.

NRF2 Protein Düzeylerinin Hesaplanması

NRF2 protein düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı aracılığıyla hesaplanmıştır. Numune, standart ve kontrol gruplarının absorbans değerleri programa girilerek standart eğri elde edilir. Numunedeki NRF2 protein düzeyleri buradan elde edilen denkleme göre belirlenir.

3.6.13. DNA İzolasyonu

1-Hücreler kaldırılarak süpernatant atıldı. Daha sonra 500 µl genomik lizis tamponu (tampona son seyreltme %0,5 olacak şekilde beta-merkaptotanol eklendi) eklendi. Hücreler 4-6 saniye vortekslenerek yeniden süspand edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

2- Karışım toplama tüpü içerisinde Zymo-Spin™ IICR kolonuna transfer edildi. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

3- Kolon yeni toplama tüpüne alındı. 200 µl DNA ön yıkama tamponu eklenip 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

4- Sonra 500 µl g-DNA yıkama tamponu kolona eklenip 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

5- Daha sonra kolon temiz bir eppendorfa transfer edildi. En az 50 µl olacak şekilde DNA elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi. En yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi.

6-Eppendorfa alınan DNA -20 °C'de deneyde kullanılmak üzere saklandı.

3.6.14. DNA Oksidatif Hasar Düzeylerinin Ölçümü

Yöntem Esası

Deneyin esası yarışmalı ELISA yöntemine dayanmaktadır. DNA yaşlanma veya kanser sebebiyle oksidasyon yoluyla hasar görebilmektedir. DNA'da guaninin oksidasyonu sonucu hasarı düzeltmek için onarım işlemleri başlar ve bu aşamada 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin(8-OHdG) oluşur.

Yöntem Uygulanışı

1-100 µl ELISA tamponu spesifik bağlanma olmayan kuyucuklara eklendi. Sonra 50 µl ELISA tamponu maksimum bağlanma olan kuyucuklara eklendi.

2- Daha sonra hazırlanan standartlar kuyucuklarına eklenmiştir.

3- Her bir kuyucuğa 50 µl numune eklenmiştir.

4- Total aktivite ve kör kuyucukları hariç olmak üzere 50 µl DNA oksidatif hasar asetilkolinesteraz izleyici kuyucuklara eklenmiştir.

5- Her bir kuyucuğa 50 µl DNA oksidatif hasar ELISA monoklonal antikor eklenmiştir ancak total aktivite, kör ve spesifik olmayan bağlanma kuyucuklarına eklenmemiştir.

6- Plak kapatılıp 18 saat 4 °C'de inkübe edilmiştir.

7- Kitte bulunan Ellman's reaktifi 20 ml ultrasaf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

8-Kuyucuklar boşaltılıp 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

9-Her bir kuyucuğa 200 µl Elman reaktifi eklenmiştir.

10-Total aktivite kuyucuğuna izleyiciden 5 µl eklenmiştir.

11- Plak kapatılıp çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilmiştir.

12-Daha sonra plak açılıp 405 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

DNA Oksidatif Hasar Düzeyinin Hesaplanması

B0 ve NSB kuyucuklarına ait absorbans okumalarının ortalaması alınır. B0'dan NSB ortalaması çıkarılır. Bu şekilde elde edilen değer düzeltilmiş B0'dır. Kuyucuklar için absorbanslardan NSB ortalaması çıkarılarak ve çıkan sonuç B0'a bölünerek B/B0 (Örnek veya Standart Sınır/Maksimum Sınır) değerleri hesaplanır. Standart kuyucukların konsantrasyonlarına karşı B/B0 değerleri kullanılarak 4-parametre grafiği çizilir. Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak örnek konsantrasyonları belirlenir.

3.6.15. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi

kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksiste

Alüminyum ve tiyomersalin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle tayin edilmiş olup deneyler üç farklı günde ve günde 2 tekrar yaparak değerlendirilmiştir.

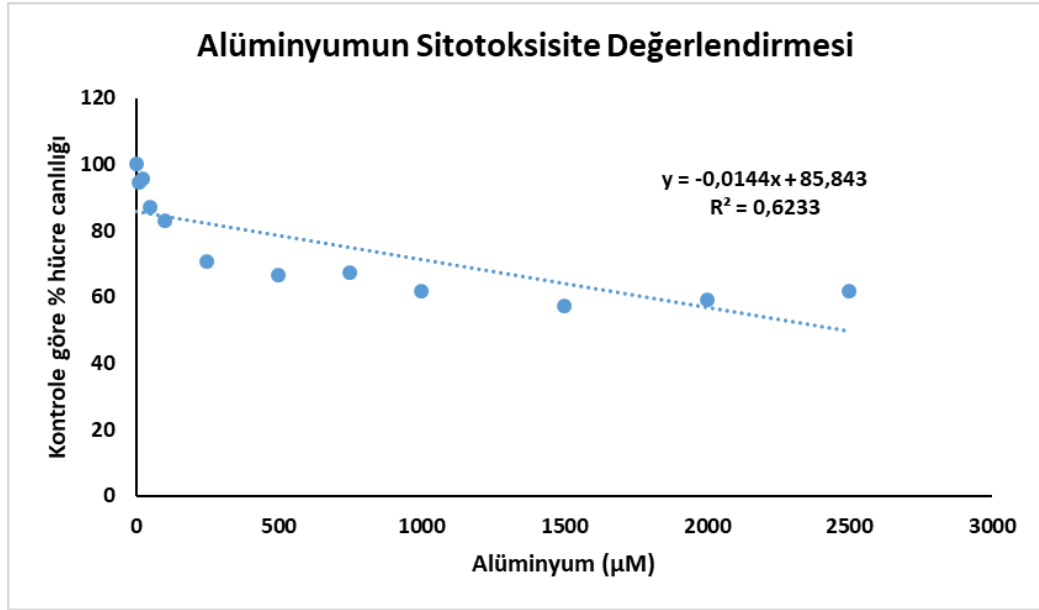
Deneylerin sonucunda günlük hayattaki maruziyet de değerlendirilerek deneyler için IC₂₀ konsantrasyonları kullanılmıştır.

Alüminyum için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları Tablo 4.1.'da verilmiştir.

Tablo 4.1. Alüminyum için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

| Alüminyum Konsantrasyonu (μM) | Hücre canlılığı (% kontrol) |
|--|-----------------------------|
| 0 | 100 \pm 0,055 |
| 10 | 94,417 \pm 0,035 |
| 25 | 95,801 \pm 0,077 |
| 50 | 87,004 \pm 0,027 |
| 100 | 82,970 \pm 0,054 |
| 250 | 70,561 \pm 0,029 |
| 500 | 66,573 \pm 0,061 |
| 750 | 67,488 \pm 0,055 |
| 1000 | 61,952 \pm 0,052 |
| 1500 | 57,237 \pm 0,044 |
| 2000 | 59,113 \pm 0,040 |
| 2500 | 61,881 \pm 0,028 |

Alüminyum için örnek bir sitotoksiste grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.



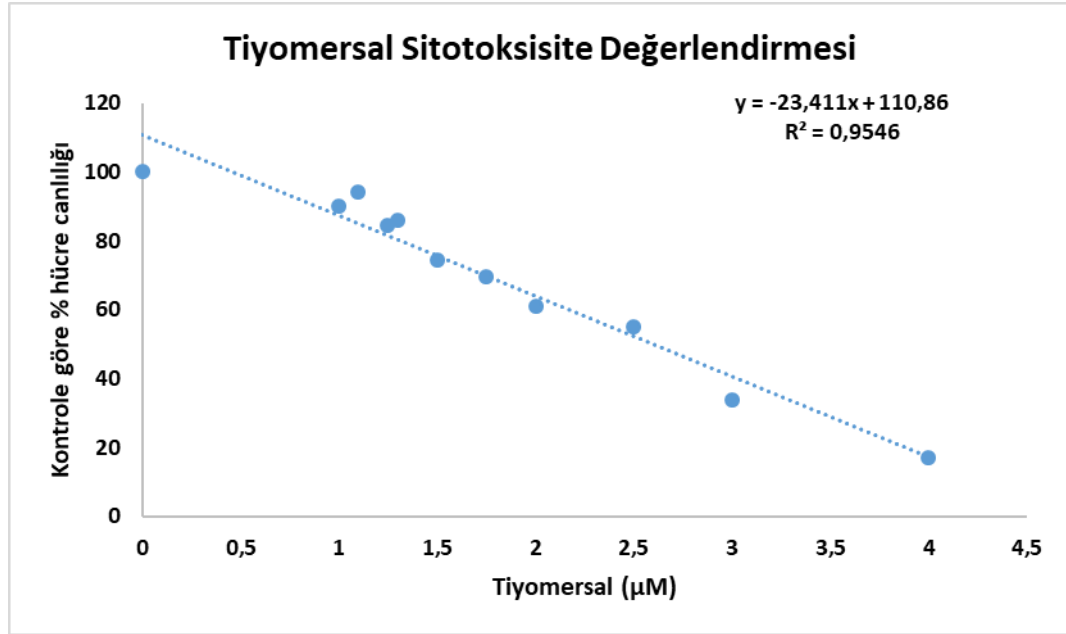
Şekil 4.1. Alüminyum için örnek bir sitotoksosite grafiği.

Tiyomersal için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Tiyomersal için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.

| Tiyomersal Konsantrasyonu (µM) | Hücre canlılığı (% kontrol) |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 100±0,079 |
| 1 | 87,265±0,069 |
| 1,1 | 85,448±0,067 |
| 1,25 | 79,377±0,054 |
| 1,3 | 70,782±0,055 |
| 1,5 | 64,026±0,017 |
| 1,75 | 61,824±0,041 |
| 2 | 45,156±0,020 |
| 2,5 | 35,143±0,020 |
| 3 | 17,282±0,009 |
| 4 | 15,516±0,009 |

Tiyomersal için örnek bir sitotoksosite grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Tiyomersal için örnek bir sitotoksosite grafiği.

Alüminyum ve tiyomersal için belirlenen ortalama inhibitör konsantrasyon (IC_{50}), inhibitör konsantrasyon (IC_{30}) ve IC_{20} dozları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Alüminyum ve tiyomersal için belirlenen ortalama IC_{50} , IC_{30} ve IC_{20} dozları.

| | IC_{50} (µM) | IC_{30} (µM) | IC_{20} (µM) |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| Alüminyum | 2812,89 | 889,81 | 362 |
| Tiyomersal | 2,59 | 1,75 | 1,15 |

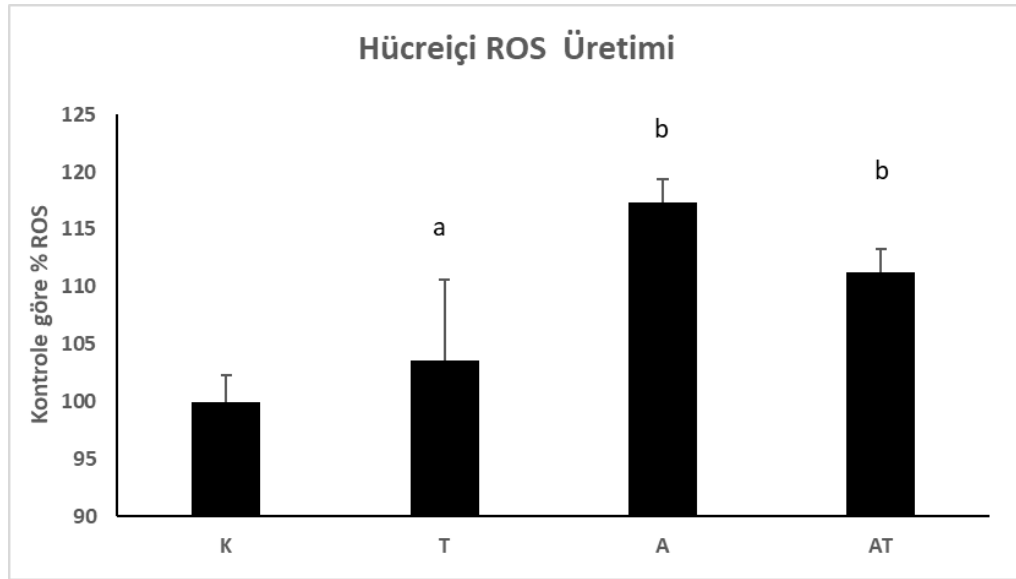
4.2. Hücre içi ROS Üretimi

Deney gruplarında hücre içi ROS üretimi Tablo 4.4. ve Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. T grubunda hücre içi ROS üretimi %5,67 artmışken, A grubunda bu artış %17,33 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). Alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanması hücre içi ROS üretimini %11,26 arttırmıştır ($p < 0,05$). AT grubunda A grubuna göre artışın daha az görülmesi, alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanmasıyla artan sitotoksositeye bağlanabilir.

Tablo 4.4. Deney gruplarında hücre içi ROS üretimi.

| Deney grubu | Hücre içi ROS üretimi (kontrolle göre%) |
|-------------|---|
| K | 100,000±2,348 ^a |
| T | 105,657±5,524 ^a |
| A | 117,336±1,985 ^b |
| AT | 111,257±1,985 ^b |

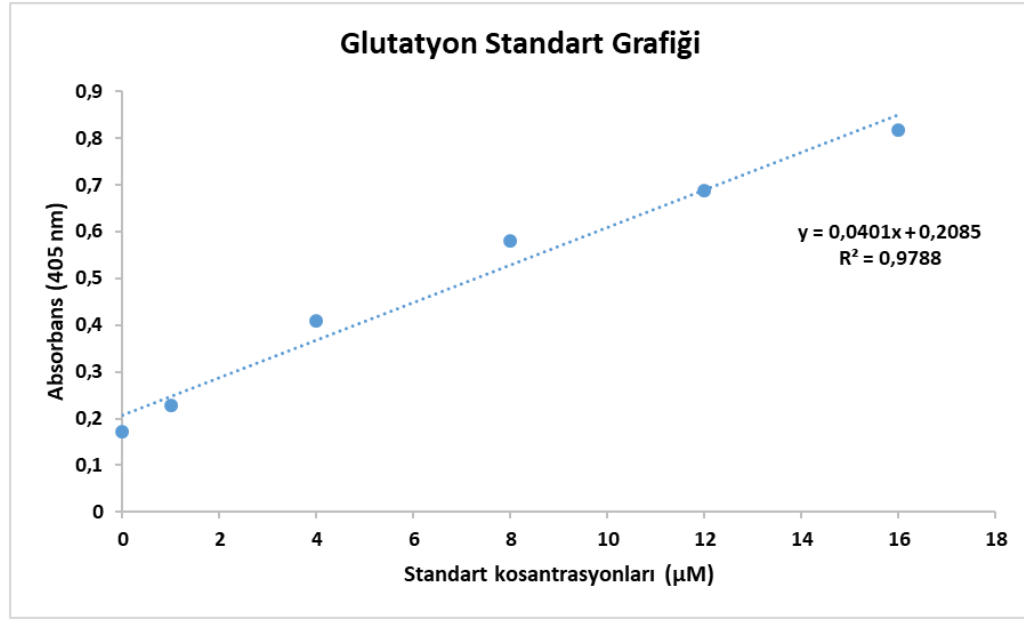
^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.3.** Deney gruplarında hücre içi ROS üretimi.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

4.3. Total GSH Düzeyleri

GSH standart grafiği Şekil 4.4.'de verilmiştir



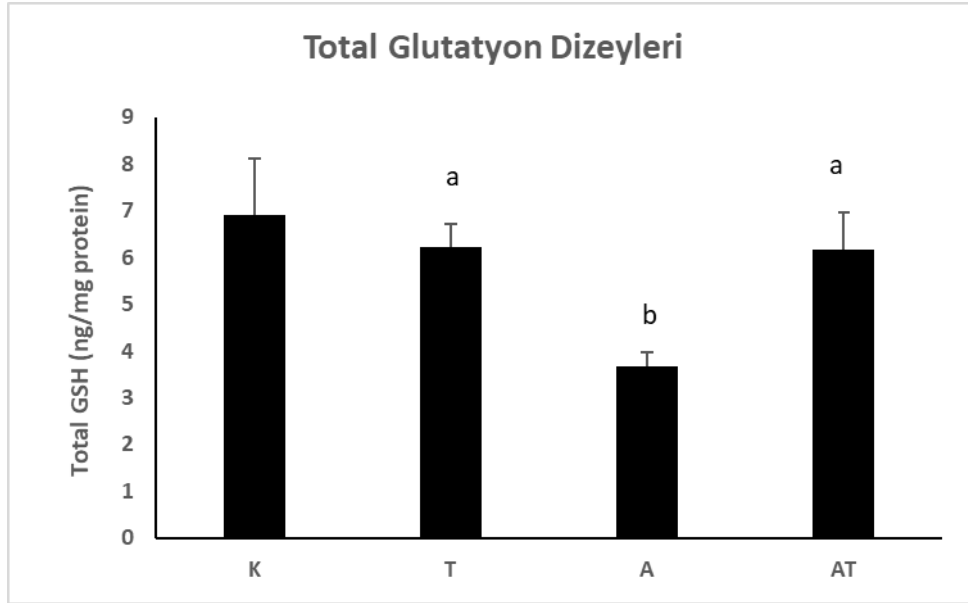
Şekil 4.4. GSH standart grafiği.

Deney gruplarında total GSH düzeyleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Alüminyum uygulanan grupta total GSH düzeyleri ~%47 azalırken ($p < 0,05$), diğer deney gruplarında total GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Tablo 4.5. Deney gruplarında toplam GSH düzeyleri.

| Deney grubu | Total GSH (ng/mg protein) |
|-------------|---------------------------|
| K | 6,907±1,197 ^a |
| T | 6,211±0,512 ^a |
| A | 3,674±0,299 ^b |
| AT | 6,163±0,791 ^a |

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

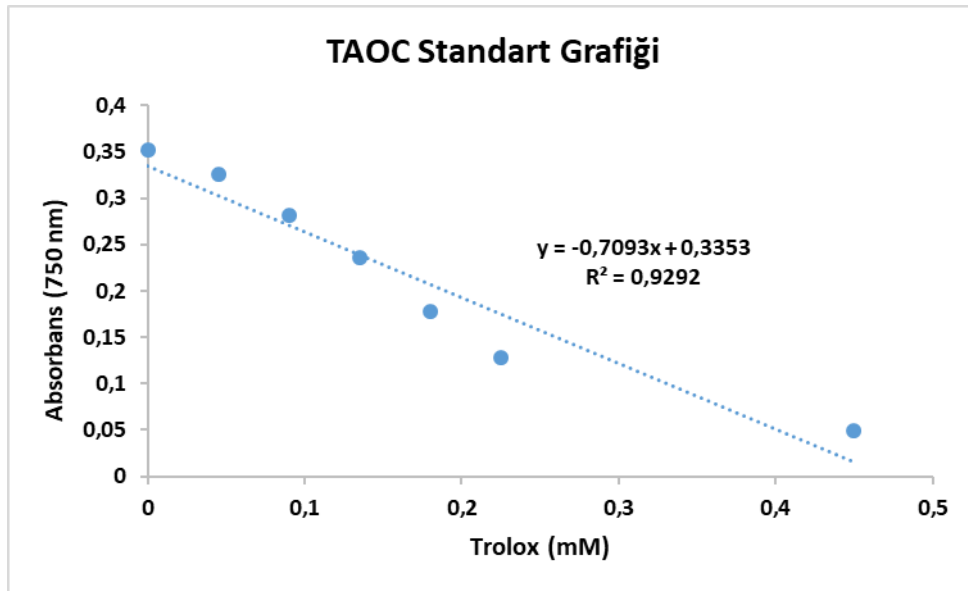


Şekil 4.5. Deney gruplarında toplam GSH düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

4.4. TAOC Düzeyleri

TAOC standart grafiği Şekil 4.6.'de verilmiştir.



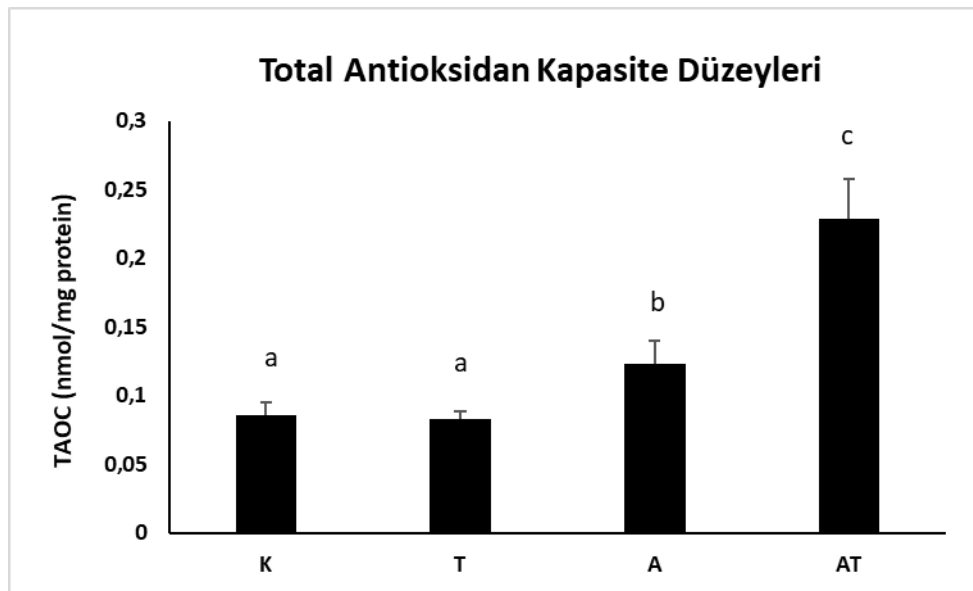
Şekil 4.6. TAOC standart grafiği.

Deney gruplarında TAOC düzeyleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Alüminyum uygulanan grupta TAOC düzeyleri ~%43 artarken ($p<0,05$), AT grubunda TAOC düzeyleri 2,66 kat yükselmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.6. Deney gruplarında TAOC düzeyleri.

| Deney grubu | TAOC (nmol/mg protein) |
|-------------|--------------------------|
| K | 0,086±0,009 ^a |
| T | 0,083±0,006 ^a |
| A | 0,123±0,017 ^b |
| AT | 0,229±0,028 ^c |

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

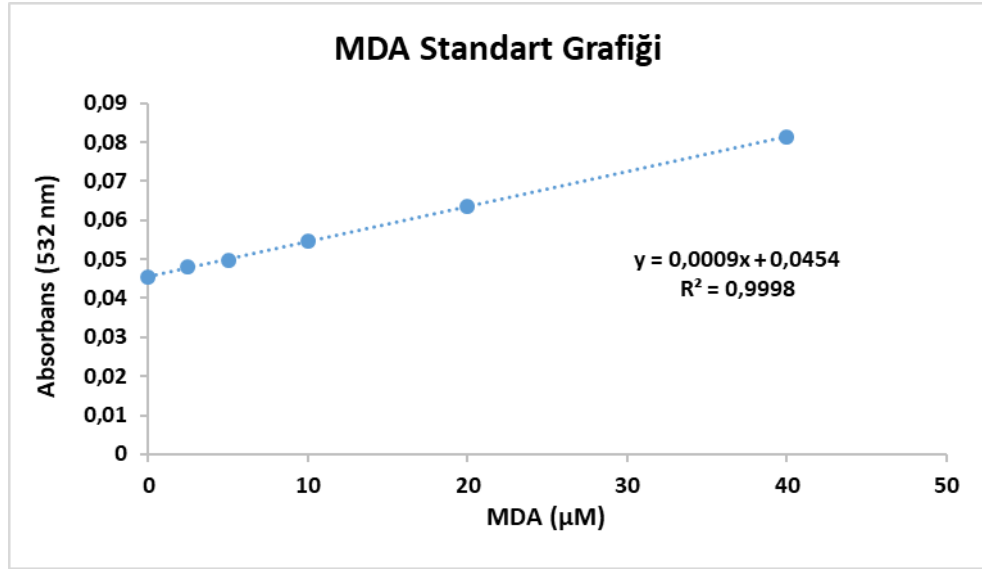


Şekil 4.7. Deney gruplarında Taoc düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

4.5. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

MDA standart grafiği Şekil 4.8.'de verilmiştir.



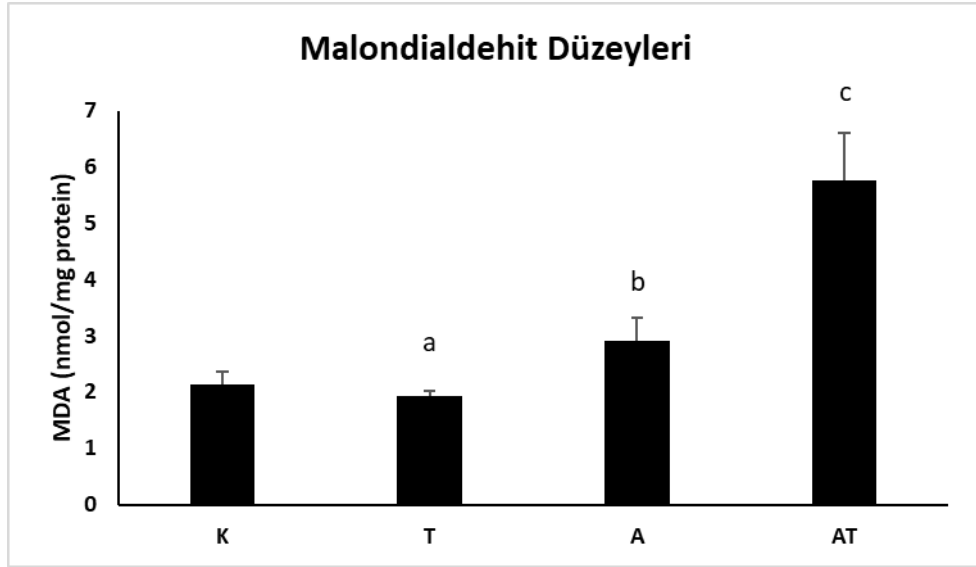
Şekil 4.8. MDA standart grafiği.

Deney gruplarında lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri Tablo 4.7. ve Şekil 4.9.'de gösterilmiştir. Alüminyum uygulanan grupta MDA düzeyleri ~%36 artarken ($p < 0,05$), AT grubunda MDA düzeyleri 2,71 kat yükselmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.7. Deney gruplarında MDA düzeyleri.

| Deney grubu | MDA (nmol/mg protein) |
|-------------|--------------------------|
| K | 2,128±0,230 ^a |
| T | 1,928±0,088 ^a |
| A | 2,900±0,422 ^b |
| AT | 5,762±0,854 ^c |

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.9. Deney gruplarında MDA düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

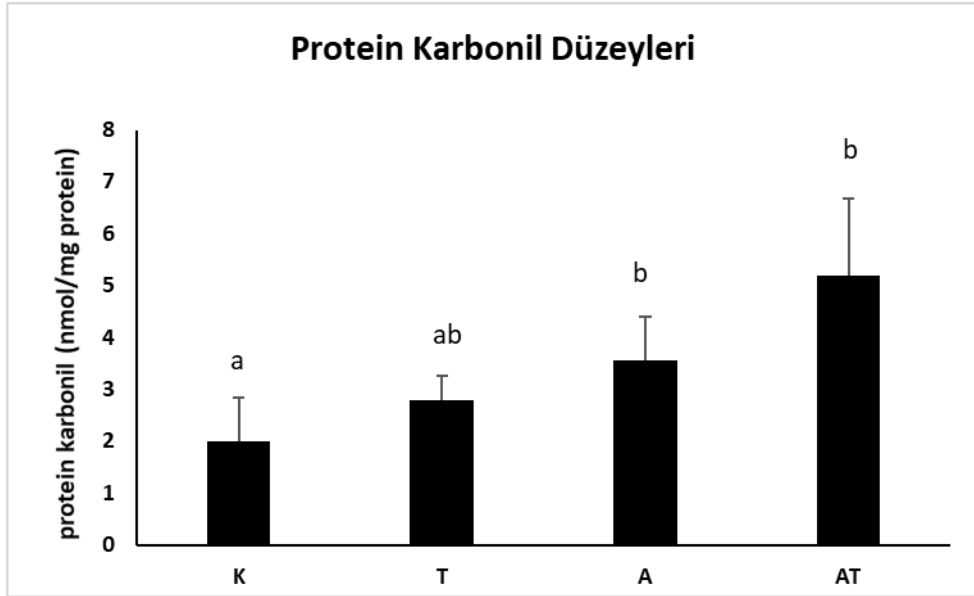
4.6. Protein Karbonil Düzeyleri

Deney gruplarında protein oksidasyonunun göstergesi olan protein karbonil düzeyleri Tablo 4.8. ve Şekil 4.10.'de gösterilmiştir. T grubunda protein karbonil düzeyleri %40 artarken ($p>0,05$), alüminyum uygulanan grupta protein karbonil düzeyleri ~%78 artmıştır ($p<0,05$). AT grubunda ise protein karbonil düzeyleri düzeyleri ~2,6 kat yükselmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.8. Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri.

| Deney grubu | Protein karbonil (nmol/mg protein) |
|-------------|------------------------------------|
| K | 1,996±0,855 ^a |
| T | 2,795±0,456 ^{ab} |
| A | 3,546± 0,863 ^b |
| AT | 5,182±1,504 ^b |

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

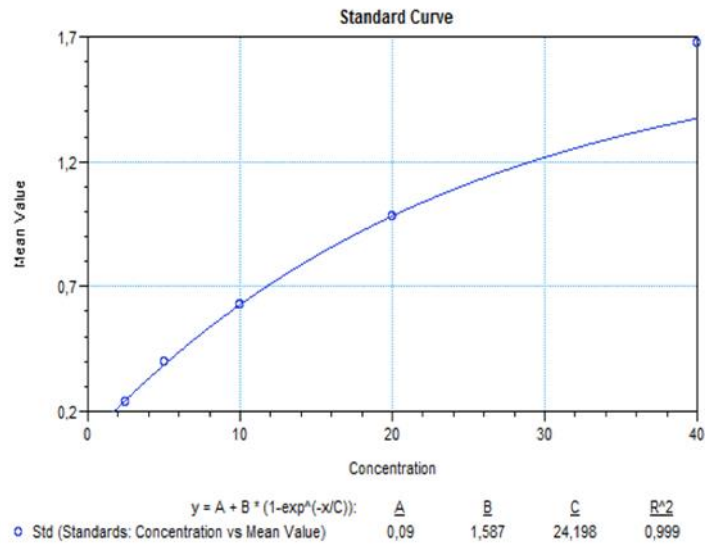


Şekil 4.10. Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

4.7. NRF2 Düzeyleri

NRF2 standart grafiği Şekil 4.11.'de verilmiştir.



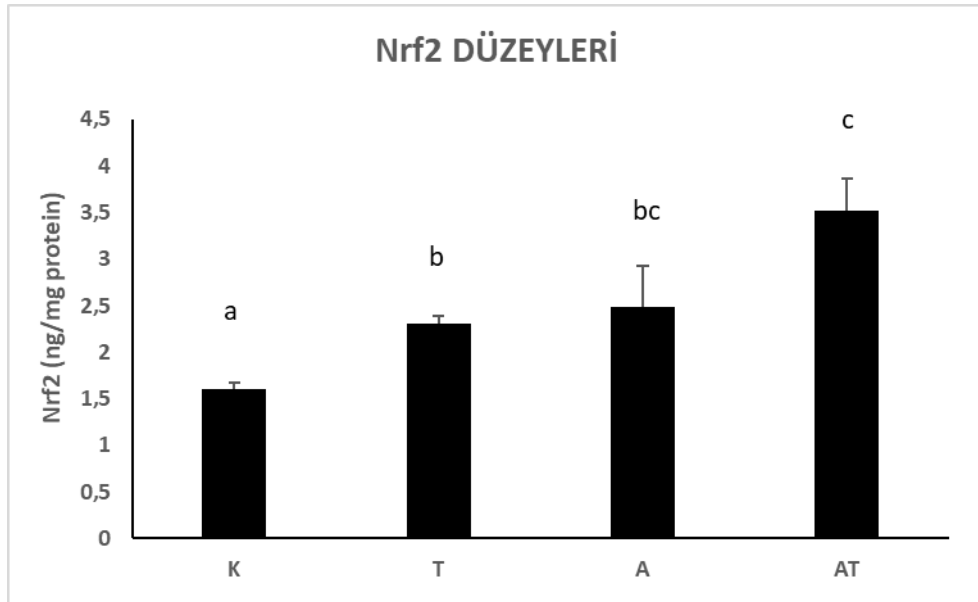
Şekil 4.11. NRF2 standart grafiği.

Deney gruplarında NRF2 protein düzeyleri Tablo 4.9. ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. T grubunda NRF2 düzeyleri ~%44 artarken ($p<0,05$), A grubunda ise artış %55'tir ($p<0,05$). AT grubunda NRF2 düzeyleri ~2,2 kat yükselmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.9. Deney gruplarında NRF2 düzeyleri.

| Deney grubu | NRF2 (ng/mg protein) |
|-------------|----------------------------|
| K | 1,605±0,067 ^a |
| T | 2,313±0,074 ^b |
| A | 2,493± 0,439 ^{bc} |
| AT | 3,519±0,348 ^c |

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

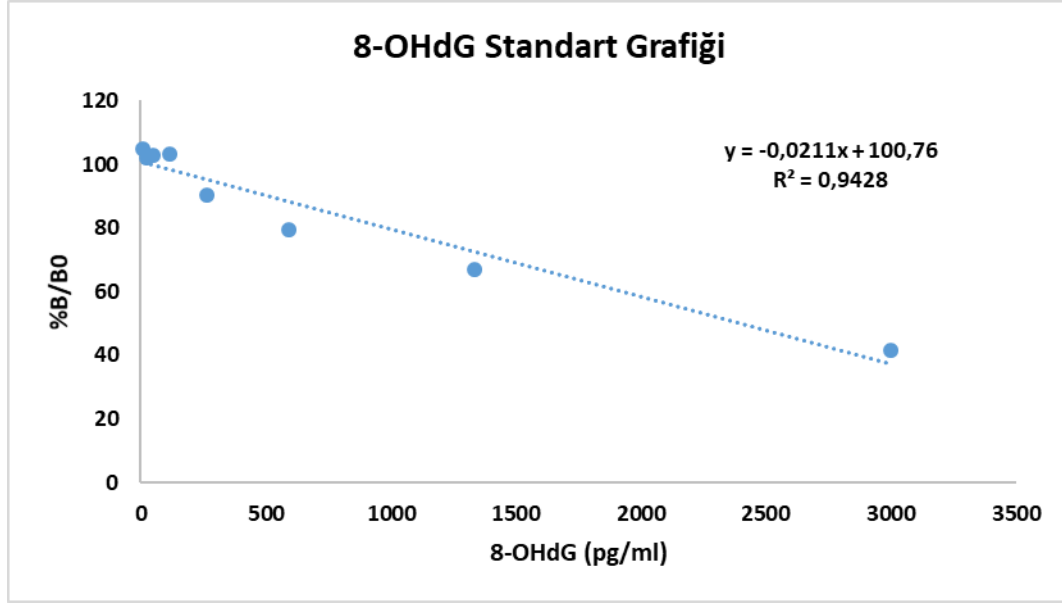


Şekil 4.12. Deney gruplarında NRF2 düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

4.8. DNA Hasarı

8-OHdG standart grafiği Şekil 4.13.'de verilmiştir.



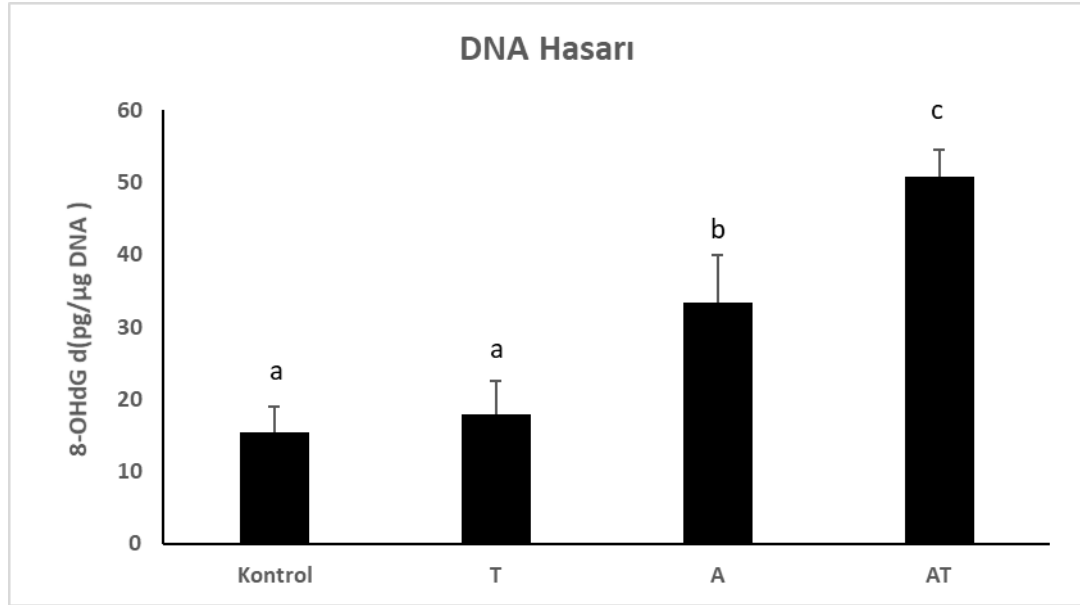
Şekil 4.13. 8-OHdG standart grafiği.

Deney gruplarında 8-OHdG düzeyleri Tablo 4.10.ve Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. T grubunda 8-OHdG düzeyleri ~%13 artarken ($p > 0,05$), A grubunda ise artış ~2,2 kattır ($p < 0,05$). AT grubunda OHdG düzeyleri ~3,3 kat yükselmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.10. Deney gruplarında 8-OHdG düzeyleri.

| Deney grubu | 8-OHdG (pg/ μ g DNA) |
|-------------|---------------------------------|
| K | 15,482 \pm 3,510 ^a |
| T | 17,883 \pm 4,635 ^a |
| A | 33,393 \pm 6,550 ^b |
| AT | 50,795 \pm 3,766 ^c |

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.14. Deney gruplarında 8-OHdG düzeyleri.

^{a,b,c}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

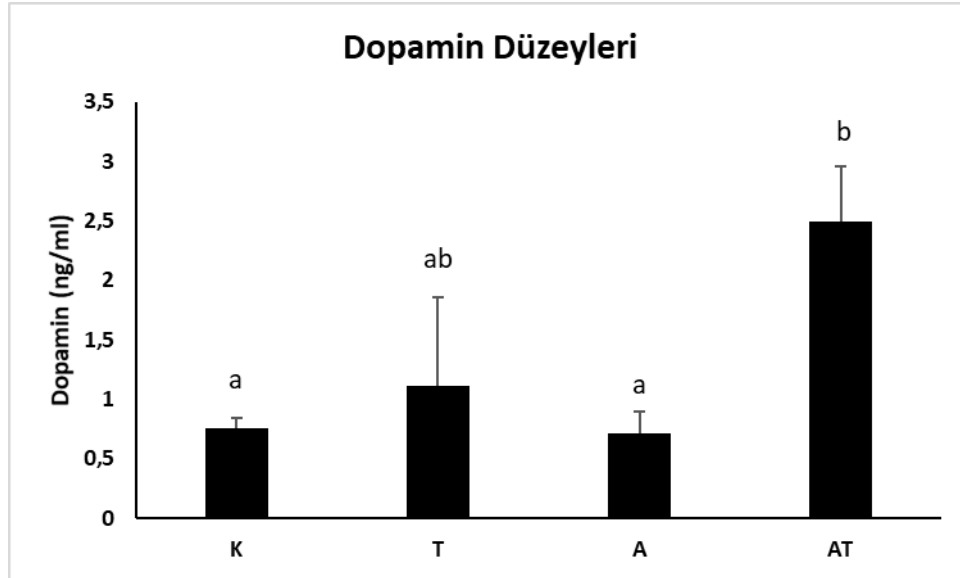
4.9. DA Düzeyleri

Deney gruplarında DA düzeyleri Tablo 4.11. ve Şekil 4.15.'te gösterilmiştir. T grubunda DA düzeyleri ~%47 artarken ($p > 0,05$), A grubunda ise %4,5 azalmıştır ($p > 0,05$). AT grubunda DA düzeyleri ~3,3 kat yükselmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.11. Deney gruplarında DA düzeyleri.

| Deney grubu | DA (ng/ml) |
|-------------|---------------------------|
| K | 0,754±0,093 ^a |
| T | 1,110±0,750 ^{ab} |
| A | 0,719± 0,180 ^a |
| AT | 2,492±0,465 ^b |

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.15. Deney gruplarında DA düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

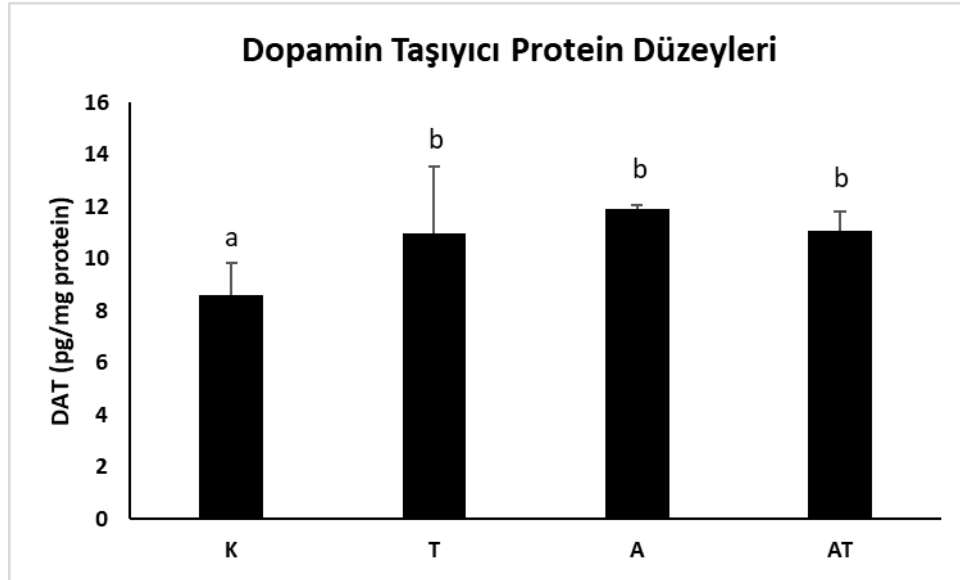
4.10. DAT Düzeyleri

Deney gruplarında DAT düzeyleri Tablo 4.12. ve Şekil 4.16.'de gösterilmiştir. T grubunda DAT düzeyleri ~%28 artarken ($p < 0,05$), A grubunda artış %38'dir ($p < 0,05$). AT grubunda DAT düzeyleri %29 yükselmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.12. Deney gruplarında DAT düzeyleri.

| Deney grubu | DAT (pg/mg protein) |
|-------------|----------------------------|
| K | 8,586±1,258 ^a |
| T | 10,984±2,558 ^b |
| A | 11,719± 0,152 ^b |
| AT | 11,087±0,711 ^b |

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.16. Deney gruplarında DAT düzeyleri.

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

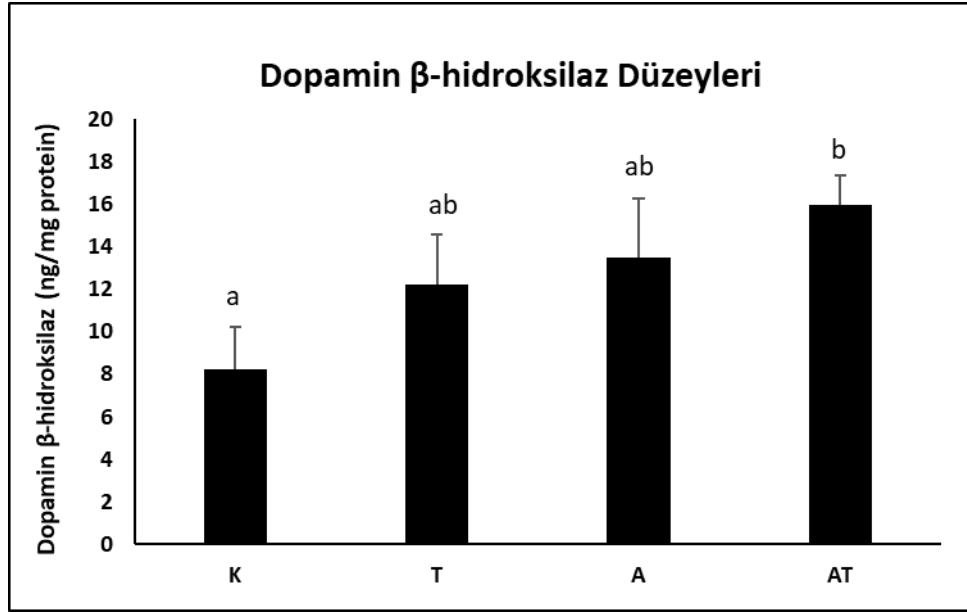
4.11. DBH Düzeyleri

Deney gruplarında DBH düzeyleri Tablo 4.13. ve Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. T grubunda DBH düzeyleri ~%48 artarken ($p > 0,05$), A grubunda artış ~%63'tir ($p < 0,05$). AT grubunda ise DBH düzeyleri ~%93 yükselmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.13. Deney gruplarında DBH düzeyleri.

| Deney grubu | DBH (ng/mg protein) |
|-------------|-----------------------------|
| K | 8,254±1,987 ^a |
| T | 12,234±2,347 ^{ab} |
| A | 13,466± 2,829 ^{ab} |
| AT | 15,949±1,383 ^b |

^{a,b}Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.17. Deney gruplarında DBH düzeyleri.

^aAynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

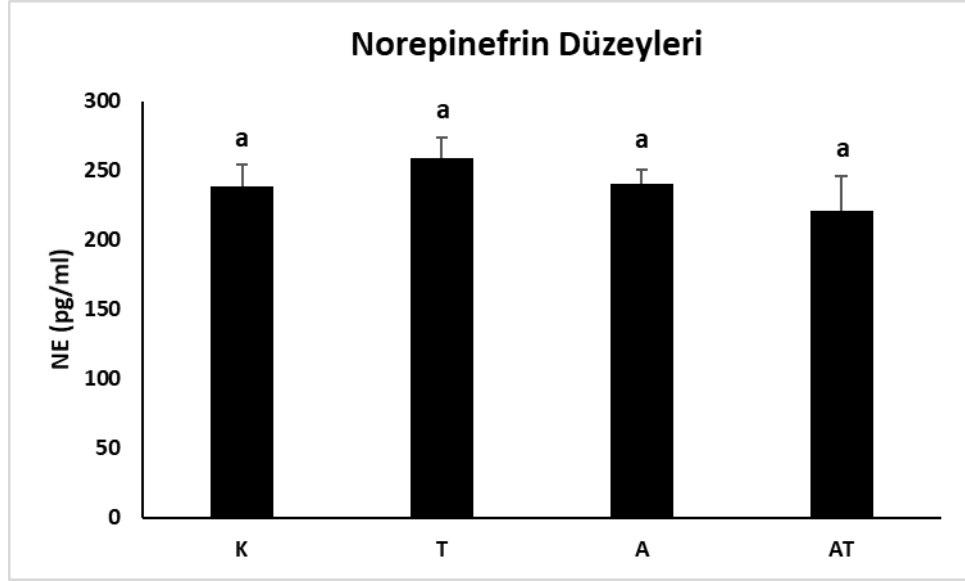
4.12. NE Düzeyleri

Deney gruplarında NE düzeyleri Tablo 4.13. ve Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. T grubunda NE düzeyleri ~%9 artarken ($p > 0,05$), A grubunda artış sadece %1'dir ($p > 0,05$). AT grubunda NE düzeyleri %7 azalmıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.14. Deney gruplarında NE düzeyleri.

| Deney grubu | NE (pg/ml) |
|-------------|-----------------------------|
| K | 238,083±16,321 ^a |
| T | 258,736±15,025 ^a |
| A | 240,720± 9,809 ^a |
| AT | 220,747±24,847 ^a |

^aAynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.18. Deney gruplarında NE düzeyleri.

^aAynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Aşılama ve su sanitasyonu küresel sağlığa en büyük katkı sağlayan olaylar olarak ifade edilmektedir. Halk sağlığının sağlanması ve korunması açısından hem aşılama hem de temiz suya ulaşım son derecede önemlidir (125).

Aşılar günümüzde toplumda her yaşta tüm bireylerin sağlığının ve iyilik halinin korunması için kullanılması zorunlu olan biyolojik ilaçlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ye göre "aşılar immün sistemimizin virüs ve bakteri gibi patojenleri tanıyıp onlarla savaşmasını sağlayan ve bunların oluşturduğu hastalıklara karşı vücudumuzu koruyan farmasötik ürünler"dir (126). Aşılamanın ana hedefi "genel sağlık halinin ölüm, kalıcı sakatlık, şiddetli hastalık ve hastalıkların önlenmesi yolu ile korunması" olarak ifade edilebilir. Aşılama, her yaşta hayatı tehdit eden enfeksiyon hastalıklarının engellenmesinde son derece güvenli, etkili ve ucuz bir yöntemdir (125).

İmmünizasyon (bağışıklama), DSÖ tarafından "bir aşının uygulanması ile bireyin bir enfeksiyon ajanına bağışık veya rezistan hale gelmesi" olarak tanımlanır ve dünya genelinde milyonlarca hayatın kurtulmasını sağlamıştır (126). İnsan aşılarının geliştirilmesinden ve yaygın olarak kullanıma girmesinden önce çiçek, kızamık, kabakulak, kızamıkçık, suçiçeği ve boğmaca gibi hastalıkları geçirmeden çocukluk çağını atlatabilen çok az birey olduğu bilinmektedir (127).

Enfeksiyon hastalıkları başta yenidoğanlar, bebekler ve çocuklar olmak üzere tüm hassas popülasyonlar için global sağlığı tehdit eden en önemli hastalıklardır. Enfeksiyon hastalıklarının çoğu günümüzde tedavi edilebilir olsa da buradaki en önemli unsur en başta "hastalanmamak" olmalıdır. Bunu için de doğru zamanda ve doğru dozda aşılama yapılması gereklidir. Her yıl aşılama ile önlenemez hastalıklar nedeniyle milyonlarca insan ölmekte veya sakat kalmaktadır. Buradaki en önemli unsur aşıya erişimdir. Diğer önemli unsurlar ise şöyle sıralanabilir (125):

- Yaşanan ülke/şehir
- Ebeveynlerin eğitim düzeyi
- Aşıların tekli veya çoklu doz olması
- Toplum genelinde etkin olan bireylerin açıklamaları, toplumun genel yargıları
- Advers reaksiyon endişeleri
- Sağlık personelinin aşılama yaklaşımı

Özellikle advers reaksiyon endişeleri ve toplumsal yargılar “aşı reddi” veya “aşı kararsızlığı”na yol açan en önemli faktörlerdir. Aşılarla görülen advers etkiler dışında, özellikle çoklu doz flakonlarda koruyucu olarak kullanılan tiyomersal ve en sık adjuvan olarak kullanılan bileşik olan alüminyumun nörotoksik olduklarına dair çalışmalar infant ve çocuk aşılmasında ciddi red ve kararsızlık nedeni olmaktadır (125,126).

Tiyomersalin içerdiği Hg ağır metal olarak kabul edilir. Ağır metaller, kimyasal özellikleri ve biyolojik işlevleri açısından oldukça farklılık gösteren heterojen bir element grubudur. Periyodik tabloda 4 ve üzeri periyodlardaki grup 3-16 arasındaki elementler, 5g/cm^3 ve üzeri yoğunluğa sahip olduklarından “ağır metaller” olarak tanımlanmaktadır. Ağır metaller dünyanın varoluş sürecinde oluştuklarından, çevremizde yaygın olarak bulunurlar. Alüminyum ise, düşük ağırlıklı bir metal kabul edilir (128). Taraflı olduğu sonradan belirlenen ve çoğu yayından çekilen birçok çalışma tiyomersalin çocuklarda otizm ile ilişkili olabileceğini iddia etmiştir (125,127). Diğer taraftan, alüminyumun nörotoksik etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Alüminyum özellikle nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Başta Alzheimer hastalığı olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın beyinde alüminyum ve Hg dahil ağır metal birikimiyle oluştuğu ifade edilmiştir (125,127,128). Ancak hem OSB, hem de Alzheimer hastalığı multi-faktöriyel hastalıklar olup, bunların etiolojisinde sadece maruziyetlerin değil, genetik yatkınlıkların da etkin olabileceği unutulmamalıdır.

Tez kapsamında elde edilen veriler 3 bölümde incelenecektir: tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler alüminyum maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler ve alüminyum + tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler.

5.1. Tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler

Hg, kurşun, arsenik, mangan ve kadmiyum gibi birçok ağır metalin insan ve çevre sağlığı üzerine etkileri birçok araştırmanın konusu olmuştur. Bu ağır metallere maruziyet genellikle oral yolla veya inhalasyonla gerçekleşir. Ağır metal maruziyetiyle ortaya çıkan toksik etkilerin türü ve hedef organlar, metalin ve maruz kalan organizma türüne, maruz kalınan süre ve zamana (prenatal, postnatal, ergenlik), etkilediği biyolojik yollara ve maruz kalma yoluna bağlıdır (79,129). Ağır

metallerin birçoğunun üreme, beyin gelişimi ve genel gelişim üzerinde olumsuz etkileri vardır. Prenatal temas ile doğum kusurları, fetal gelişim bozuklukları, nörolojik hasarlar, gelişim gecikmesi, öğrenme güçlükleri ve davranışsal anomaliler görülebilir. Ağır metallerin nörogelişimi olumsuz etkilediğine ve OSB riskini artırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır (130-134).

OSB genetik veya epigenetik temelli olabilir. Ancak, çevresel maruziyetlerin de OSB gelişiminde büyük etkisi olabilir. Genel olarak kabul edilen OSB gibi kompleks hastalıklarda genetik, epigenetik ve çevresel etkilerin kombine olarak etkin olabileceğidir. Yani, OSB’de birçok farklı mekanizmanın tek tek veya bir arada etkin olduğu ifade edilebilir. Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolağındaki değişiklikler OSB’ye yol açabileceği gibi, serotonerjik sistemde anomaliler, beyinde beyaz cevher yapısında anomaliler, farklılaşmış sinapslar, anormal sitokin düzeyleri ve büyüme faktörlerini içeren immün sistem disregülasyonu, beyin dokusuna karşı oluşan fetal-maternal antikolar ve mikrogliyal aktivasyon da OSB gelişiminde önemli etmenler olabilir (135). Diğer taraftan, bebeğin doğumu esnasındaki farklı faktörler de OSB’ye yol açabilir Yapılan çalışmalar, düşük doğum ağırlığı (<2500 g), 5. dakikada düşük Apgar skoru (<6-<7), 37 haftadan kısa gebelik süresi, sezaryen ve konjenital malformasyonların otizme ilişkili olduğu göstermiştir. Ayrıca, sorunlu geçen gebelikler, ailede OSB’li birey bulunması, sosyoekonomik durum, ebeveynlerin psikiyatrik öyküsü ve perinatal faktörler de otizme katkıda bulunabilir (136).

Prenatal dönem nörogelişim için hassas bir dönem olduğundan çocuğun maruz kalabileceği çevresel etkenler OSB için önemli bir risk faktörü olabilir. Prenatal valproik asit, antidepresan, ağır metal, kirli hava ve pestisite maruziyetlerinin OSB gelişimini etkileyebileceği ifade edilmiştir. Annenin sigara, alkol ve bağımlılık yapıcı madde kullanımıyla OSB arasında bir ilişki olabileceği de ifade edilmiştir (137). Diğer taraftan, gebelikte geçirilen enfeksiyonlar, oluşan IgG antikoları veya annenin immünokompromize olması gibi faktörler de OSB riskini artırabilir. Annenin Rubella, Epstein-Barr, Herpes simplex ve sitomegalovirüs gibi virüslerin oluşturduğu hastalıkları gebelikte geçirmesi OSB gelişimine katkıda bulunabilir. Annedeki maternal dengesizlikler, gestasyonel diyabet, tip II diyabet, hipertansiyon,

obezite/metabolik sendrom gibi metabolik hastalıklar ve hatta babanın yaşı da OSB'nin etiyolojisinde rol alabilir (138).

Son yıllarda OSB gelişiminde çevresel maruziyetlerin katkısını araştıran birçok çalışma yapılmış; prenatal ve postnatal çevresel maruziyetlerin OSB gelişimine katkısı olabileceği vurgulanmış; ancak bu maruziyetler ile nasıl OSB gelişebileceği altındaki primer toksisite mekanizmaları aydınlatılamamıştır (139,140). Çevresel faktörler, özellikle epigenetik mekanizmalar (histon proteinlerindeki değişiklikler, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, global metilasyon kalıbında değişiklikler ve kodlamayan RNA'ların ekspresyonlarında değişiklikler) aracılığıyla gen ekspresyonunun kalitesini ve miktarını etkileyebilir. Bu değişiklikler de aynı genetik mutasyonlar gibi transjenerasyonel etkilere yol açabilir (73). Diğer taraftan, çevresel maruziyetler embriyo oluşumunun kritik dönemlerinde ve organogenezde gelişimle ilgili kritik genlerin ekspresyonunu etkileyebilir ve OSB gelişimine yol açabilir (126). Son yıllarda yapılan çalışmaların temel odak noktası ise, doğum öncesi çevrenin fetal programlamayı nasıl etkilediğine yoğunlaşmıştır (139).

OSB'nin patolojisinde çeşitli ksenobiyotiklerin rolü birçok toksikolojik araştırmanın konusu olmuştur. Grandjean ve Landrigan tarafından 2006 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, epidemiyolojik veriler değerlendirilerek, beş endüstriyel kimyasal madde “gelişimsel nörotoksik madde” olarak tanımlanmıştır. Bu maddeler kurşun, metil cıva, PCB'ler, arsenik ve toluen olarak belirtilmiştir. Mount Sinai Çocuk Çevre Sağlığı Merkezi, Amerikan Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü (National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS) ve Autism Speaks'nın birlikte gerçekleştirdikleri bir çalışmada, OSB ve öğrenme güçlüğüne yol açtığından şüphelenilen çevresel kimyasal maddelerin en önemlileri olarak kurşun, metil cıva, PCB'ler, organofosfatlı pestisitler ve organoklorlu pestisitler sayılmıştır. Ayrıca ftalatlar, polibromlu difenil eterler (PBDE'ler) ve perflorooktanoik asit türevleri (PFOA türevleri) gibi endokrin bozucular, otomotiv egzozu ve PAH'lara da maruziyetin de, OSB gibi nörogelişimsel ve nöroendokrin bozukluklara yol açabileceğine dair veriler sunulmuştur (77).

Aşı içeren çok kullanımlı flakonlara, şırınga iğnesi aşı sıvısı ile birçok kez temas ettiğinden, mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için bir koruyucu eklenmesi mutlaka gerekmektedir ve tiyomersalin günümüzde hala en iyi koruyuculardan biri

olduğu düşünülmektedir. Tiyomersal, ağırlıkça %49,55 Hg içeren sodyum etil cıva tiyosalisilat bileşimidir ve biyotransformasyonla hızlıca etil cıva ve tiyosalisilata parçalanır. Etil cıva ve metil cıva gibi organik Hg bileşiklerinin nörotoksik özellikleri, lipofiliklikleri, KBB'deki taşıyıcıların varlığı ve bu taşıyıcıların substratlarına benzerliklerine bağlıdır ve hızla KBB'yi geçebilirler. Etil cıva da aynı metil cıva gibi, KBB'yi kolaylıkla geçebilen lipofilik bir maddedir. Bir etil cıva bileşiği olan tiyomersal de çeşitli enzimlerin sülfhidril içeren aktif bölgesini inhibe eder. Vucüttaki en önemli tiyol olan GSH'nın, sisteinin ve proteinlerdeki sülfhidril grupları dahil olmak üzere sülfhidril bileşiklerine bağlanma kapasitesi yüksektir. İnterstisyel sıvıdaki tiyol gruplarına bağlanan etil cıva önce kapiler hücrelere, daha sonra benzer kimyasal ve biyokimyasal yollarla ağırlıklı olarak albümine bağlı olarak taşınır. Ayrıca, tiyomersal endoplazmik retikulum membranı üzerindeki InsP3'e ait kalsiyum kanalını aktive eder ve böylece hücre içi kalsiyum salınımını tetikler. Bu nedenle, tiyomersal kalsiyum sinyallemesine bağlı olan çeşitli hücresel işlevleri indükleyebilir veya inhibe edebilir (53,76). Etil cıvanın yarı ömrü metil cıvaya (1,5 ay) oranla oldukça kısadır. Böbreklerde birikebilir; dağılımı ve feçesle atılımı metil cıva ile benzerdir. Ancak, metil ve etil cıvanın, dokularda birikme özellikleri ve inorganik Hg'ye biyotransformasyonları farklıdır. Metabolizmadaki bu değişiklikler metil cıva ile tiyomersalin risk değerlendirmesinin karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle, temel olarak metil cıva ile ilgili toksisite verilerinin tiyomersalin risk değerlendirilmesinde uygun bir referans olmadığı ifade edilmiştir (76).

Aşılardaki tiyomersal 1980'li yıllardan itibaren birçok araştırmanın ve tartışmanın konusu olmaya başlamıştır. 1990'ların sonunda FDA postnatal ilk altı ay boyunca "Amerikan Aşı Programı"na göre aşılanan bebeklerin kullanılan aşı formülasyonlarından Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın metil cıva için belirlediği limitleri (0,0001 mg/kg/gün) aşan miktarda etil cıvaya maruz kalabileceğini belirten bir açıklama yapılmıştır. Ancak, değerlendirme metil cıva ile etil cıva karşılaştırılarak yapıldığı için sonuçların yorumu tartışmalıdır (56). 1999'da ise, Amerikan Pediatri Akademisi ve İngiliz Halk Sağlığı Hizmeti, bebek ve çocuklara uygulanan tüm aşılarından Hg içeren koruyucuların en kısa sürede çıkarılmasını isteyen ortak bir bildiri yayınlamış ve bu iki kuruluş tiyomersal içeren aşılarından etil cıva maruziyeti ile ilişkili potansiyel riskleri araştıran çalışmaların yapılması konusunda fikir birliğine varmıştır

(141). Immunization Safety Review Committee of Institute of Medicine (Tıp Enstitüsü İmmünizasyon Güvenlilik Değerlendirme Komitesi, ISR) Hg'ye maruz kalmanın otizm gibi nörogelişimsel bozukluklar için bir risk faktörü olmasının biyolojik olarak mümkün olabileceğini belirtmiştir (142).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, metil cıva ve etil cıvanın, insan vücudundaki yarı ömürleri, farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle aynı toksikolojik profili ortaya koymadıklarına ilişkin veriler elde edilmiştir (79,143,144). Metil cıva ve etil cıvadan kaynaklanan nörolojik etki eşiklerinin sırasıyla yaklaşık 200 µg/L ve 1000-2000 µg/L olduğu tahmin edilmektedir (76). Tiyomersal içeren aşılı alan 2-6 aylık bebeklerin kan, idrar ve dışkılarındaki Hg konsantrasyonlarını ölçmeyi amaçlayan araştırmalarda, kan Hg konsantrasyonlarının yaygın olarak kabul edilen güvenli değerlerin üzerine çıkmadığı gösterilmiştir. Etil cıvanın insanlarda eliminasyonunun çok iyi olduğu ve kandaki yarı ömrünün 4- 10 gün arasında değiştiği bildirilmiştir (143). Ancak, daha sonraki yıllarda etil cıvanın KBB'den geçişi hakkında yeterli veriye sahip olunmadığı için hala şüpheler olabileceği de ifade edilmiştir (143).

Çocukluk çağında organik Hg bileşiklerine ve de özellikle metil cıvaya maruz kalmanın, dil, dikkat ve bellekteki nörofizyolojik anomaliler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, hipokampal hücre ölümünün, nörojenezdeki bozuklukların ve ciddi öğrenme eksikliklerinin, gelişim sürecinde metil cıvaya akut maruziyetten kaynaklandığını göstermiştir (145). Çocuklarda KBB'nin geçirgenliği erişkinlere göre daha yüksek olduğu için Hg'nin beyinde birikebileceği, nöro-inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres sürecini başlatabileceği, aynı zamanda beyin dokusu oto-antikorlarının düzeylerini arttırabileceği belirtilmektedir. Bu mekanizmaların otizmin patofizyolojisinde ve diğer nörogelişimsel bozukluklarda çok önemli rol oynadığı bilinmektedir (146). Hg zehirlenmesinde karakteristik motor bulgular ataksi ve dizartridir. Akut veya kronik nispeten yüksek dozlara maruz kalındığında, titreme, kaslarda ağrı ve zayıflama görülebilir. Fungusitlerin içindeki etil cıvaya maruz kalınmasıyla da aynı belirtilerin görüldüğünü ifade eden vaka raporları vardır (147).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda tiyomersalin nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres oluşturuucu etkisi hücre içi ROS, total GSH, TAOC, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı düzeyleri değerlendirilerek

belirlenmiştir. Tiyomersal uygulana hücrelerde hücre içi ROS üretimi %5,67 artmıştır. Tiyomersal total GSH, TAOC ve MDA düzeylerini anlamlı ölçüde değiştirmeyen, protein karbonil düzeylerini %40 artırmıştır ($p>0,05$). Yapılan bir çalışmada, prenatal tiyomersal maruziyetinin serebellar oksidatif stresi tetikleyebildiği belirlenmiştir (148). Nöroblastoma hücrelerinde tiyomersal ve metil cıva maruziyetlerinin değerlendirildiği ve estradiol/testosteron konsantrasyonları ayarlanarak erkek ve dişi beyin modellemesinin yapıldığı bir çalışmada, SH-SY5Y hücrelerinde total GSH düzeylerinde sadece metil cıva uygulanan grupta anlamlı azalma görölürken, dişi hücre modelinde bu düşüş görölmemiştir. Sadece yüksek testosteron uygulanan grupta T grubunda önemli bir artış tespit edildi. Testosteronun baskın olduğu ve metil cıva uygulanan grupta protein karbonil düzeylerinde bir artış gözlenmiştir. Tiyomersal DNA hasarını arttırmazken, metil cıvanın DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir (149). Diğer taraftan, tiyomersalin NRF2 düzeylerini de arttırdığı sunulan tez çalışmasında bulunmuştur. Bu artışın nedeni, NRF2 yolağının yüksek oksidatif stres varlığında tetiklenmesi olabilir.

Dopaminerjik sistemde görölün bozukluklar, şizofreni, bağımlılık ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynar (150,151). Dopaminerjik tonusu düzenlemede rol oynayan anahtar proteinlerden biri DAT'tır. DAT, dopaminerjik nöronların hücre zarı üzerinde yer alır ve DA'yı hücre dışı boşluktan presinaptik nörona hızla alma işlevi görür. DAT, yalnızca hücre dışı DA sinyalinin büyüklüğünü ve süresini kontrol etmez; aynı zamanda hücre içi DA düzeylerini korumak için de hareket eder. DAT nakavt (DAT-KO) farelerde, depolanan DA seviyeleri, DA sentezi oranındaki artışa rağmen %95 oranında azalır (152, 153). DA doku içeriğindeki bu çarpıcı düşüş büyük ölçüde dokudaki alımın düşüşüyle ilgilir. Zira, DAT-KO farelerinde dopaminerjik nöronların sayısı çoğunlukla korunur (152,153). DAT-KO hayvanlarından elde edilen bu bulgular, DAT'ın önemli fizyolojik işlevlerinden biri olan presinaptik nöronun DA ile yüklenmesindeki kritik rolünü vurgulamaktadır.

Nörotransmitterlerdeki değişiklikler değerlendirildiğinde ise, tiyomersal grubunda DA düzeyleri ~%47 artarken, DAT düzeylerindeki artış ~%28 olarak belirlenmiştir. DBH düzeyleri ise %48 artmıştır. NE düzeyleri ise değişmemiştir. Bu

konuda daha önce yapılan bir çalışma bulunmadığından elde edilen verileri literatür ile karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

5.2. Alüminyum maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler

Alüminyum, yer kabuğunda en bol bulunan üçüncü elementtir ve bileşikleri, ev eşyaları, ilaçlar ve terlemeyi önleyici olarak kullanılır. Alüminyum nörotoksik bir ağır metaldir. Özellikle +3 değerlikteki alüminyumun, nörorodejeneratif hastalıklar ve özellikle de Alzheimer hastalığı ile olası ilişkisi post-mortem çalışmalarda incelenmiş, Alzheimer hastalığında beyinde alüminyum miktarının artışı gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmalarda alüminyumun nöropati, nörofibriler dejenerasyon, oksidatif stres ve inflamatuvara yol açabileceği belirlenmiştir (154). Alüminyumun *in vitro* A β oligomerleşmesinde çapraz bağlayıcı olarak davrandığı belirlenmiştir; ancak Alzheimer hastalığı patogenezindeki bağımsız rolü hala tartışmalıdır (155). İçme suyundan alüminyuma kronik maruziyetle Alzheimer hastalığı ile ilişkili senil plak oluşumları gözlenmiştir (156,157).

Mirza ve ark. (2017), ailevi Alzheimer hastalığı teşhisi konan 12 kişinin post-mortem beyin dokusu örneklerinde alüminyum değerlerinin oldukça yüksek olduğu; 5 kişide alüminyumun >10 g/g (kuru dokuda) olduğunu belirlemişlerdir. Bir donörün beyinde odaksal yoğun alüminyum birikimi tespit edilmiştir. Diğer bir araştırmada, beyinde aynı bölgelerde A β plaklarının ve alüminyumun birlikte lokalizasyonları tespit edilmiştir. Bu veriler, Alzheimer hastalığında genetik yatkınlık nedeniyle beyinde alüminyum tutma/biriktirme eğiliminin arttırdığını düşündürmektedir. Bu birikimin ise, A β 'nin artışına bağlı olarak gerçekleştiği öne sürülmektedir (158).

Yapılan bu tez çalışmasında, alüminyum uygulanan nöroblastoma hücrelerinde ROS üretiminin %17,33 arttığı, total GSH düzeylerinin değişmediği, TAOC düzeylerinin %43, MDA düzeylerinin %36 arttığı ve protein karbonil düzeylerinin ~%78 yükseldiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar alüminyum uygulamasının nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stresi belirgin bir şekilde arttırdığının bir göstergesidir.

Yapılan bir çalışmada alüminyumun (100 μ M - 600 μ M; 1, 3 ve 6 saat uygulama, alüminyum maltolat şeklinde) nöroblastoma hücrelerinde hücre içi GSH düzeylerinin tükenmesi ile birlikte ROS üretimini ve hücre içi kalsiyum düzeylerini

artırarak oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. Alüminyumun etkileri doz ve süre bağımlı olarak belirlenmiştir (159). Bu çalışmada GSH düzeylerinin azalması ancak tez çalışması kapsamında artışı uygulama süre farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Alüminyum uygulaması başta total GSH düzeylerini baskılayabilir; ancak sonrasında hücre savunma mekanizmaları devreye girerek total GSH düzeyleri artabilir. Diğer taraftan, aynı çalışmada araştırmacılar alüminyum uygulamasının kaspaz 9, kaspaz 12 ve kaspaz 3 aktivitelerini arttırdığını belirlemişlerdir. Ancak, spesifik kaspazların ve pan-kaspazların inhibitörlerinin kullanılması ile kaspaz 12 inhibisyonu gerçekleştiren araştırmacılar, bu yolla nöronal hücre ölümünün önlenebileceğini gösterilmiştir. Diğer taraftan, bu uygulamayla gösterilen bu koruyucu etki sayesinde alüminyum toksisitesinde endoplazmik retikulum stresinin de önemini olduğunu belirlediğini ifade etmişlerdir. Çalışmanın sonunda araştırmacılar genel olarak bulgularının alüminyumun nöronal hücrelerin antioksidan savunmasını tehlikeye atan endoplazmik retikulum stresini ve ROS oluşumunu indüklediğini ve böylece p53 bağımsız yolunda nöronal apoptozu teşvik ettiğini gösterdiği sonucuna varmışlardır (159). Alüminyum uygulaması ile artan 8-OHdG düzeyleri, alüminyumun DNA hasarı oluşturabileceğini göstermiştir. Diğer taraftan yapılan bir çalışmada da alüminyum maltolat uygulamasının nöroblastoma hücrelerinde DNA hasarına yol açabileceği belirtilmiştir (160).

NRF2, oksidanlara karşı hücre sel direncin önemli bir düzenleyicisidir. NRF2, oksidan maruziyetinin fizyolojik ve patofizyolojik sonuçlarını düzenlemek için bir dizi ARE'ye bağlı genin bazal ve uyarılmış ekspresyonunu kontrol eder. NRF2, temel bölge lörin fermuar (bZip) transkripsiyon faktörlerinin CNC alt ailesinin bir üyesidir. NRF2, eritropoez ve trombosit gelişimi için gerekli olan β -globin lokus kontrol bölgesinde bir cis düzenleyici sekans olan NFE2-bağlama motifine bağlanması sayesinde klonlanmıştır (161). NRF2 kan hücrelerinin farklılaşması için elzem değildir. Ancak GSH S-transferaz ve NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) gibi bir dizi ilaç metabolize edici enzim (DME'ler)'in antioksidanlar ve elektrofiller tarafından indüksiyonuna aracılık ettiği bulunmuştur. İndüksiyon, NFE2-bağlama motifine benzeyen ARE adı verilen ortak bir DNA dizisi gerektirir. DME'lerin uyarılması, artan detoksifikasyona ve çok sayıda eksojen ve bazı endojen kimyasalların ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu durumda NRF2, oksidanlara ve

elektrofillere karşı adaptif yanıtı düzenlemek için ksenobiyotikle aktive olan bir reseptör (XAR) olarak işlev görür. NRF2'nin son on yılda yapılan çalışmalardan ortaya çıkan önemli bir işlevi, oksidan strese karşı dirençteki rolüdür. Farelerde NRF2'nin knockout'u (NRF2 KO), farelerin geniş bir kimyasal toksisite ve oksidatif patoloji ile bağlantılı hastalık koşullarına duyarlılığını önemli ölçüde arttırmıştır. NRF2 aktivitesinin kemoprotektif ajanlarla farmakolojik olarak güçlendirilmesi, hayvanları oksidatif hasardan korumaktadır (162-165).

Bu tez çalışmasında NRF2 düzeyleri alüminyum uygulanan grupta %55 artmıştır. Bunun nedeni, nöroblastoma hücrelerinin oluşan oksidatif hasara karşı kendilerini korumak amacıyla verdikleri bir yanıt olarak yorumlanabilir. Yukarıda sözü edilen çalışmada ise, NRF2 düzeylerinin nöroblastoma hücrelerine alüminyum uygulaması ile 24 saat sonra azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedeni, uygulanan alüminyum bileşiğinin farklı olması olabilir. Araştırmacılar, antioksidan enzimlerin transkripsiyonuyla hücrelerdeki koruyucu mekanizmayı oksidatif strese karşı düzenleyen NRF2 seviyelerinin alüminyum uygulaması ile azalmasının farklı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilebileceğini ifade etmişlerdir (159).

Tez kapsamında alüminyumun olası nörotoksik etkileri DA, DAT ve NE düzeylerinin değerlendirilmesiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Alüminyum uygulaması DA ve NE düzeylerini anlamlı derecede değiştirmezken, DAT düzeyleri artmıştır. Diğer taraftan, DBH düzeyleri ise %63 yükselmiştir. DAT düzeylerindeki artış, zamanla DA üreten nöronların kaybına ve oksidatif strese yol açabilir (166).

5.3. Alüminyum + tiyomersal maruziyetiyle ortaya çıkan etkiler

Bebek ve çocuklarda alüminyum ve Hg'ye maruziyet kaynakları farklıdır. Ancak, ikisine kombine halde aşılarından maruz kalınması mümkündür. İki metal absorpsiyon, dağılım (beyin erişimi) ve metabolizma profilleri açısından farklılık gösterir. Tiyomersal içeren aşılarında tiyomersalin kullanım miktarları bellidir (genelde 25 µg/doz). Az gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde yaşayan ve aşı olan bireylerin tiyomersal ve alüminyuma aynı anda maruz kalmaları mümkündür. Çevresel olarak özellikle metil cıvaya maruziyetin nörotoksitesisi çocuklarda nörodavranışsal sonuçlarla ilişkilendirilmişse de, çevresel olarak alüminyuma maruziyetin özellikle çocuklardaki nörotoksik etkilerinin detaylı bir şekilde

değerlendirildiği epidemiyolojik çalışmalar yoktur. Tam bir aşılama programı nedeniyle oluşan vücut alüminyum yükünün, emzirmeden veya yüksek alüminyum soya bazlı formüllerden kaynaklanarlardan daha yüksek seviyelere ulaştığı tahmin edilmektedir. Hem alüminyum hem de Hg'ye (inorganik Hg, metil cıva, etil cıva [tiyomersal kaynaklı veya çevresel kaynaklı]) dünya çapında tüm popülasyonun farklı oranlarda maruz kalmasına rağmen, kombine maruziyet hakkındaki bilgimiz, bunların birleşik nörotoksik etkilerini ve de daha önemlisi diğer nörotoksik maddelerle birlikte alüminyum ve Hg'ye maruz kalınması sonrası ortaya çıkan nörotoksisiteyi tahmin etmek için yetersizdir (167).

Bu tez kapsamında, SH-SY5Y hücrelerinde görülen en dramatik değişiklikler alüminyum+tiyomersal uygulamasının birlikte uygulandığı hücrelerde olmuştur. Alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanması hücre içi ROS üretimini %11,26 arttırmıştır ($p<0,05$). AT grubunda A grubuna göre artışın daha az görülmesi, alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanmasıyla artan sitotoksisiteye bağlanabilir. AT grubunda total GSH düzeylerinin azalmaması, yüksek oksidasyona bağlı olarak hücrelerin GSH sentezinde bir artışa gitmesi olarak yorumlanabilir. Ancak, GSH sentez yolağı ve GSH ile ilgili enzimlerin aktivite ve düzeyleri ölçülerek kesin bir yoruma varmak mümkün olabilir. Yapılan bir çalışmada hücrelerin kurşun, arsenik, alüminyum, Hg veya etil cıva içeren koruyucu tiyomersale maruz bırakılması, GSH sentezi için hız sınırlayıcı olan bir aşama olan sistein alımını alzararak GSH düzeylerini düşürmüş ve metiyonin sentaz aktivitesini inhibe etmiştir (168). AT grubunda TAOC düzeyleri 2,66 kat ve NRF2 düzeyleri ~2,2 kat yükselmiştir. Bunun nedeni de aynı GSH'ta olduğu gibi hücrelerin aşırı oksidatif strese karşı verdiği yanıtta kaynaklanabilir. Lipit peroksidasyon, protein oksidasyonu ve DNA hasarında görülen değişikliklerle bu sonuca varmak mümkündür. Zira AT grubunda MDA düzeyleri 2,71 kat yükselirken, protein karbonil düzeyleri ~2,6 kat artmıştır ve 8-OHdG düzeyleri ~3,3 kat yükselmiştir ($p<0,05$).

Alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanması DA düzeylerini ~3,3 kat arttırmıştır ve DAT düzeyleri %29 yükselmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, DBH düzeyleri %93 artmıştır. Bu değişiklikler AT uygulamasının özellikle dopaminerjik sistem üzerindeki olumsuz etkilerini yansıtmaktadır. AT grubunda noepinefrin düzeyleri %7 azalmıştır. Ancak, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak, AT grubundan

elde edilen sonuçlar her iki metalin bir arada uygulanması ile oksidatif stresin önemli ölçüde tetiklendiğini ve dopaminerjik sistem üzerine iki metalin bir arada uygulanmasının ciddi olumsuz etkileri olabileceğini kanıtlar niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında tiyomersal, alüminyum ve alüminyum ve tiyomersalin birlikte uygulanması ile SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres biyogöstergelerinde ve nörotransmitter ve nörotransmitter taşıyıcı sistemde görülen değişiklikler değerlendirilmiştir. Hücelere tiyomersal ve alüminyumun IC₂₀ konsantrasyonları 24 saat boyunca uygulanmış ve ortaya çıkan değişiklikler hücre pelleti veya medyumda ölçülmüştür.

Bu tezin sonunda varılan son noktalar ve hedefler şunlardır:

- a. Kontrol grubuna göre tekli maruziyet gruplarında veya kombine maruziyet grubunda tiyomersal ve alüminyum hidroksitin sitotoksik potansiyelleri belirlenmiştir.
- b. Kontrol grubuna göre tekli maruziyet gruplarında veya kombine maruziyet grubunda tiyomersal ve alüminyum hidroksitin ROS düzeyleri üzerine etkileri belirlenmiştir.
- c. Oksidatif strese karşı en önemli yolaklardan biri olan NRF2 yolağının tiyomersal ve/veya alüminyum hidroksit maruziyeti ile ne derecede aktive olduğu belirlenmiştir.
- d. En önemli oksidatif stres biyogöstergeleri olan lipid peroksidasyon, taoc, protein oksidasyonu ve total GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre tekli maruziyet gruplarında veya kombine maruziyet grubunda nasıl değiştiği değerlendirilmiştir.
- e. Tekli ve kombine maruziyette DNA baz hasarlarındaki olası değişimler belirlenmiştir.
- f. Norötoksitite biyomarkörleri (DBH, DA, DAT ve nörepinefrin düzeyleri) ölçülecek ve özellikle kombine maruziyet grubundaki değişimler belirlenmiştir.

Tiyomersal ve alüminyumun ayrı ayrı belirli oksidatif stres biyomarkörlerini etkiledikleri gözlenmiştir. Her iki metalinde nörotoksiteleri uzun zamandır birçok araştırmanın konusu olmakla birlikte, SH-SY5Y hücrelerindeki olası toksisitelerini karşılaştırmalı olarak değerlendiren bir başka çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Her ne kadar ülkemizde kullanılan çocukluk çağı aşılarının formülasyonlarından tiyomersal çıkartılmış olsa da, tiyomersal hala gelişmekte olan ülkelerde kullanılan çoklu doz aşılarda ve özellikle de influenza aşılarda hala

kullanılmaktadır. Bu nedenle, özellikle bebekler ve çocuklar gibi hassas popülasyonlarda tiyomersalin maruziyetinin özellikle bebek ve çocuklarda dikkatli değerlendirilmesi gerekir. Diğer taraftan, alüminyum da yol açabileceği oksidatif stres ve dopaminerjik sistem bozuklukların yaşamın erken evrelerinde farklı nörotoksik etkilere yol açabileceği öngörülebilir. Alüminyuma tiyomersal ile birlikte maruziyetin ise daha dramatik etkilerinin olabileceği, oksidatif stresin kombine maruziyet ile daha fazla tetiklenebileceği ve dopaminerjik sistemin çok daha fazla etkilenebileceği ifade edilebilir. Gün içinde, farklı kaynaklarla da organik Hg bileşiklerine ve alüminyum bileşiklerine de maruz kalındığı düşünülürse, kümülatif maruziyetin etkilerinin özellikle yaşamın erken yıllarında gelişmekte olan nöronlara toksik etkisinin daha belirgin bir şekilde ortaya çıkabileceği göz ardı edilmemelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. 2021; 21: 83-100.
2. Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S. *Epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases*. 13th ed. Washington: Public Health Foundation; 2015.
3. Plotkin SA. Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection. *Vaccine*. 2020; 38: 2250–2257.
4. Laupèze B, Hervé C, Di Pasquale A, Tavares Da Silva F. Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 2019; 37: 5670-5680.
5. Apostólico JdeS, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of Immunology Research*. 2016; 2016: 1-16.
6. O'Hagan, DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2: 727-735.
7. Gellin BG, Salisbury DM. Communicating the role and value of vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2015: 335; B44-B46.
8. Halsey NA. *Vaccine safety: real and perceived issues*. San Diego, Academic Press. 2003. 371-389.
9. Piot P, Larson HJ, O'Brien KL, N'kengasong J, Ng E, Sow S ve ark. Immunization: vital progress, unfinished agenda. *Nature*. 2019; 519: 119-129.
10. Vaccines and immunization [İnternet]. Erişim Tarihi: 12.07.2021. Erişim adresi: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1.
11. Miller L, Reynolds J. Autism and vaccination-the current evidence. *Journal for Specialists in Pediatric Nursing*. 2009; 14(3) 166-172.
12. Offit PA, Jew RK, Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals?. *PEDIATRICS*. 2003; 112(6): 1394-1401.
13. Arısoy ES, Çiftçi E, Hacımustafaoğlu M, Kara A, Kuyucu N, Somer A ve ark. Clinical Practical Recommendations for Turkish National Vaccination Schedule for Previously Healthy Children (National Vaccination Schedule) and Vaccines not Included in the Schedule – 2015. *J Pediatr Inf*. 2015; 9 :1-11.
14. DeStefano F, Bodenstab HM, Offit PA. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019; 69(4): 726-31.
15. Orenstein W.A., Ahmed R. Simply put: Vaccination saves lives. *Pnas*. 2017; 114(16) : 4031-4033.
16. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM. *Plotkin's Vaccine*. 7th ed. E-Book: Elsevier Health Sciences; 2017.

17. Kılıç SG, Dolapçı İ. Aşıların Tarihçesi ve Yeni Aşı Stratejileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2021; 74(1): 1-10.
18. Iwasaki A, Omer SB, Why and How Vaccines Work. Cell. 2020; 183: 290–95.
19. Smith KA. Louis Pasteur, the father of immunology?. Frontiers in immunology. 2012; 3(68): 1-10.
20. Hussein IH , Chams N, Chams S, El Sayegh S, Badran R, Raad M ve ark. Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health. Frontiers in public health. 2015;3(269): 1-16.
21. Bragazzi NL, Gianfredi V, Villarini M, Rosselli R, Nasr A, Hussein A ve ark. Vaccines Meet Big Data: State of-the-Art and Future Prospects. From the Classical 3Is (“Isolate-Inactivate-Inject”) Vaccinology 1.0 to Vaccinology 3.0, Vaccinomics, and Beyond: A Historical Overview. Front Public Health. 2018; 6(62): 1-9.
22. Rhee JH. Towards Vaccine 3.0: new era opened in vaccine research and industry. Clin Exp Vaccine Res. 2014; 3: 1-4.
23. Loomis RJ, Johnson PR. Emerging Vaccine Technologies. Vaccines (Basel). 2015; 3: 429-447.
24. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. Clin Microbiol Infect. 2012;18:109-116.
25. Dumpa N, Goel K, Guo Y, McFall H, Pillai AR, Shukla A ve ark. Stability of vaccines. Aaps Pharmscitech. 2019; 20(42): 1-11.
26. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan, J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. Annals of medicine. 2018; 50(2), 110-120.
27. World Health Organization. Vaccine safety basics learning manual. Geneva, Switzerland: WHO. 2013
28. Ada G. Vaccines and vaccination. New England Journal of Medicine. 2001; 345(14): 1042-1053.
29. Tahamtan A, Charostad J, Hoseini Shokouh SJ, Barati M. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. Journal of Archives in Military Medicine. 2017; 5(e12315) : 1-7.
30. Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh, CR, Prusik T, Volkin DB. Vaccine instability in the cold chain: mechanisms, analysis and formulation strategies. Biologicals. 2014; 42(5): 237-259.
31. Rappuoli R, De Gregorio E, Costantino P. On the mechanisms of conjugate vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019; 116(1): 14-16.
32. Keser M, Hatipoglu N. Bagisiklik antijenleri ve asi icerigi. Journal of Pediatric Infection. 2008 ; 2 (1): 15-24.
33. Martiñón S, Cisneros A, Villicaña S, Hernández-Miramontes R, Mixcoha E, Calderón-Vargas P. Chemical and immunological characteristics of aluminum-

- based, oil-water emulsion, and bacterial-origin adjuvants. *Journal of immunology research*. 2019; 3974127: 1-9.
34. Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine*. 2002; 20: S7-S12.
 35. Nicholls EF, Madera L, Hancock REW. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1213: 46-61.
 36. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvant activity. *Vaccine*. 2019; 37(24): 3167-3178.
 37. HogenEsch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines*. 2018; 3(51), 1-11.
 38. Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. *Molecular biotechnology*. 2002; 21(2): 129-148.
 39. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*. 2004; 82: 488-496.
 40. Geoghegan S, O'Callaghan, KP, Offit PA. Vaccine safety: myths and misinformation. *Frontiers in microbiology*. 2020; 11(372):1-7.
 41. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*. 2008; 30(1): 23-32.
 42. Carter D, Reed SG. Role of adjuvants in modeling the immune response. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010; 5(5): 409-413.
 43. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015; 11(2): 477-488.
 44. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug safety*. 2015; 38: 1059-1074.
 45. Wang ZB, Xu J. Better adjuvants for better vaccines: Progress in adjuvant delivery systems, modifications, and adjuvant-antigen codelivery. *Vaccines*. 2020; 8(1): 1-20.
 46. O'Hagan DT, Rappuoli R. The safety of vaccines. *Drug Discovery Today*. 2004; 9(19): 846 – 854.
 47. MacIntyre CR, Leask J. Immunization myths and realities: responding to arguments against immunization. *Journal of paediatrics and child health*. 2003; 39: 487-491.
 48. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. *JAMA*. 2003; 290:1763–66.
 49. Erdemli Köse, SB, Balcı A, Yirün A, Erkekoğlu P. Tiyomersal Maruziyeti ve Otizm Spektrum Bozuklukları Arasındaki Olası İlişkinin Değerlendirilmesi. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*. 2020; 9(3): 304-18.

50. Möller, H. All these positive tests to thimerosal. *Contact dermatitis*. 1994; 31: 209-213.
51. Yurdakök K. Thiomersal ve aşılar. *Hacettepe Tıp Derg*. 2006; 37:35-42.
52. Rothenberg SE, Windham-Myers L, Creswell JE. Rice methylmercury exposure and mitigation: a comprehensive review. *Environmental research*. 2014; 133: 407-423.
53. Dórea JG, Farina M, Rocha JBT. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 2013; 33(8):700-11.
54. Marques RC, Dórea JG, Fonseca MF, Bastos WR, Malm O. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. *Eur. J. Pediatr*. 2007; 166: 935–941.
55. Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Umido V, Clarkson T, Cernichiari E. Mercury Levels in Newborns and Infants After Receipt of Thimerosal-Containing Vaccines. *Pediatrics*. 2008; 121(2): e208-e214.
56. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Thimerosal in vaccines: a joint statement of the American Academy of Pediatrics and the Public Health Service. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1999; 48(26): 563-565.
57. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 3rd ed. Washington: American Psychiatric Association;1980.
58. Anagnostou E, Zwaigenbaum L, Szatmari P, Fombonne E, Fernandez BA, Woodbury-Smith M ve ark. Autism spectrum disorder: advances in evidence-based practice. *Cmaj*. 2014; 186(7): 509-519.
59. Ergaz Z, Weinstein-Fudim L, Ornoy A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*. 2016; 64: 116-140.
60. Klauck, S. M. Genetics of autism spectrum disorder. *European Journal of Human Genetics*. 2006; 14: 714-720.
61. Miles JH. Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genetics in Medicine*. 2011; 13(4): 278-294.
62. Accordino RE, Lucarelli J, Yan AC. Cutaneous disease in autism spectrum disorder: a review. *Pediatric dermatology*. 2015; 32(4): 455-460.
63. Tchaconas A, Adesman A. Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update. *Curr Opin Pediatr*. 2013; 25(1): 130–43.
64. Fox E, Amaral D, Van de Water J. Maternal and fetal antibrain antibodies in development and disease. *Dev Neurobiol* 2012; 72: 1327–34.
65. Croen LA, Grether JK, Yoshida CK, Odouli R, Van de Water J. Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case–control study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159:151–7.
66. Sandin S, Hultman CM, Kolevzon A, Gross R, MacCabe JH, Reichenberg A. Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012;51 (5):477–86.e1.

67. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009; 195: 7–14.
68. Buchmayer S, Johansson S, Johansson A, Hultman CM, Spare'n P, Cnattingius S. Can association between preterm birth and autism be explained by maternal or neonatal morbidity?. *Pediatrics*. 2009;124 (5): e817–e825.
69. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol*. 2015; 56: 155-69.
70. Rossignol DA, Frye RE. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Molecular psychiatry*. 2012; 17: 389-401.
71. Frye RE, Delatorre R, Taylor H, Slattery J, Melnyk S, Chowdhury N ve ark. Redox metabolism abnormalities in autistic children associated with mitochondrial disease. *Transl Psychiatry* 2013;3: 1-12.
72. Billeci L, Calderoni S, Tosetti M, Catani M, Muratori F. White matter connectivity in children with autism spectrum disorders: a tract-based spatial statistics study. *BMC Neurol*. 2012; 12: 1-16.
73. Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*. 2011; 31(3): 363-73.
74. Karimi P, Kamali E, Mousavi SM, Karahmadi M. Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci*. 2017; 22(27): 1-12.
75. Landrigan PJ, Lambertini L, Birnbaum LS. A research strategy to discover the environmental causes of autism and neurodevelopmental disabilities. *Environmental Health Perspectives*. 2012;120(7): a258-a60.
76. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006; 36(8):609-62.
77. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 2006; 368(9553): 2167-78.
78. Gerber JS, Offit PA. Vaccines and autism: a tale of shifting hypotheses. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48: 456-461.
79. Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt j, Thorsen P, ve ark. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med*. 2002; 347(19): 1477-1482.
80. Grønberg TK, Schendel DE, Parner ET. Recurrence of autism spectrum disorders in full-and half-siblings and trends over time: a population-based cohort study. *JAMA Pediatr*. 2013; 167(10): 947-53.
81. Flaherty DK. The vaccine-autism connection: a public health crisis caused by unethical medical practices and fraudulent science. *Annals of Pharmacotherapy*. 2011; 45(10): 1302-1304.
82. Jafari T, Rostampour N, Fallah AA, Hesami A. The association between mercury levels and autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017; 44: 289-297.

83. Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. *Int J Toxicol.* 2003; 22(4): 277-285.
84. Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL et al. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. *N Engl J Med.* 2007; 357(13): 1281- 92.
85. Lakard S, Pavel IA, Lakard B. Electrochemical Biosensing of Dopamine Neurotransmitter: A Review. *Biosensors.* 2021; 11(6): 1-23.
86. Prins I, Plötz FB, Uiterwaal CSPM, van Vught HJ. Low-dose dopamine in neonatal and pediatric intensive care: a systematic review. *Intensive care medicine.* 2001; 27: 206-210.
87. Reif A, Lesch KP. Toward a molecular architecture of personality. *Behavioural brain research.* 2003; 139(1-2): 1-20.
88. Narvaes R, Martins de Almeida RM. Aggressive behavior and three neurotransmitters: dopamine, GABA, and serotonin—A review of the last 10 years. *Psychology & Neuroscience.* 2014; 7(4): 601-607.
89. Mravec, B. Salsolinol, a derivative of dopamine, is a possible modulator of catecholaminergic transmission: a review of recent developments. 2006; *Physiological research*, 55(4): 353-364.
90. Olguín HJ, Guzmán DC, García EH, Mejía GB. The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016; 2016: 1-13.
91. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Documenta ophthalmologica.* 2004; 108: 17-40.
92. Vasu TS, Cavallazzi R, Hirani A, Kaplan G, Leiby B, Marik PE. Norepinephrine or dopamine for septic shock: a systematic review of randomized clinical trials. *Journal of intensive care medicine.* 2012; 27(3): 172-178.
93. Aperia AC. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annual review of physiology.* 2000; 62: 621-647.
94. Beytollahi, A. Biochemical Hormones and Financial Behaviours: A Mini Review on Dopamine and Oxytocin (2015-2019). *Chemical Methodologies.* 2021; 5(2): 114-134.
95. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology.* 2019; 39: 31-59.
96. Cousins DA, Butts K, Young AH. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar disorders.* 2009; 11(8): 787-806.
97. Seamans JK, Yang CR. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in neurobiology.* 2004; 74(1): 1-57.
98. Mortensen OV, Amara SG. Dynamic regulation of the dopamine transporter. *European journal of pharmacology.* 2003; 479(1-3): 159-170.

99. Schmitt KC, Reith MEA. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1187(1): 316-340.
100. Pradhan T, Jung HS, Jang JH, Kim TW, Kang C, Kim JS. Chemical sensing of neurotransmitters. *Chemical Society Reviews*. 2014; 43: 4684-4713.
101. Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus– noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev*. 2003; 42(1): 33–84.
102. Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Annales d'Endocrinologie*. 2021; 82(3-4): 193-197.
103. Ruslan MA, Baharuddin KA, Noor NM, Yazid MB, Noh AYM, Rahman A. Norepinephrine in Septic Shock: A Systematic Review and Meta-analysis. *Western Journal of Emergency Medicine*. 2021; 22(2): 196-203.
104. Cleary S, Phillips JK. The norepinephrine transporter and pheochromocytoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1073(1): 263-269.
105. Robertson D, Flattem N, Tellioglu T, Carson R, Garland E, Shannon JR ve ark. Familial orthostatic tachycardia due to norepinephrine transporter deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001; 940(1): 527-544.
106. Mandela P, Ordway GA. The norepinephrine transporter and its regulation. *Journal of neurochemistry*. 2006; 97(2): 310-333.
107. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440: 944-948.
108. Fernández-Castro P, Vallejo M, Román MFS, Ortiz I. Insight on the fundamentals of advanced oxidation processes. Role and review of the determination methods of reactive oxygen species. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2015; 90(5): 796-820.
109. Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free radical research*. 2017; 51(4): 413-427.
110. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 66 (8): 1499–1503.
111. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual review of biochemistry*. 1983; 52(1): 711-760.
112. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 27(9-10): 916-921.
113. Sies H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137(6): 1493–1495.

114. Bartosz G. Total Antioxidant Capacity. *Advances In Clinical Chemistry*. 2003; 37: 219-292.
115. Sies H, Oxidative stress, oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997; 82: 291-295.
116. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. 1989.
117. Richards DMC, Dean RT, Jessup W. Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 946(2): 281-88.
118. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*. 1984; 222: 1-15.
119. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1993; 57: 715S–725S.
120. Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94 (10): 5361–5366.
121. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress, *J. Biol. Chem*. 2009; 284(20) 13291–13295.
122. Paladino S, Conte A, Caggiano R, Pierantoni GM, Faraonio R. Nrf2 Pathway in Age-Related Neurological Disorders: Insights into MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(5):1951-1976.
123. Jia ZL, Cen J, Wang JB, Zhang F, Xia Q, Wang X ve ark. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae: Activation of ROS-mediated ERS, apoptosis and the Nrf2 pathway. *Chemosphere*. 2019; 227: 541-550.
124. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). *BIOMEDICAL REPORTS*. 2015; 3: 617-620.
125. Erkeoğlu P, Erdemli Köse SB, Balcı A, Yürün A. Aşı Kararsızlığı ve COVID-19'un Etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*. 2020; 9(2): 208-20.
126. Erişim Tarihi: 19.8.2020. Erişim adresi: <https://www.who.int/topics/immunization/en/>.
127. Schuchat A. Human vaccines and their importance to public health. *Procedia in Vaccinology*. 2011; 5: 120-6.
128. Sharma RK, Agrawal M. Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol*. 2005; 26: 301-13.
129. Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM ve ark. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*. 2009; 207(1-2): 111-6.
130. Martin S, Griswold W. Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens*. 2009;15: 1-6.
131. Mohod CV, Dhote J. Review of heavy metals in drinking water and their effect on human health. *IJRSET*. 2013; 2(7): 2992-6.

132. Hill DS, Cabrera R, Wallis Schultz D, Zhu H, Lu W, Finnell RH ve ark. Autism-like behavior and epigenetic changes associated with autism as consequences of in utero exposure to environmental pollutants in a mouse model. *Behav Neurol*. 2015; 2015: 1-10.
133. Blaurock-Busch E, Amin OR, Rabah T. Heavy metals and trace elements in hair and urine of a sample of Arab children with autistic spectrum disorder. *Maedica (Buchar)*. 2011; 6(4): 247-57.
134. Blaurock-Busch E, Amin OR, Dessoki HH, Rabah T. Toxic metals and essential elements in hair and severity of symptoms among children with autism. *Maedica (Buchar)*. 2012; 7(1): 38-48.
135. Yassa HA. Autism: a form of lead and mercury toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 38(3): 1016-24.
136. Mohamed FEB, Zaky EA, El-Sayed AB, Elhossieny RM, Zahra SS, Salah Eldin W ve ark. Assessment of hair aluminum, lead, and mercury in a sample of autistic Egyptian children: environmental risk factors of heavy metals in autism. *Behav Neurol*. 2015; 2015(1): 1-9.
137. Erden S, Nalbant K. Autism Spectrum Disorder and Prenatal Risk Factors. *Selçuk Med J*. 2019; 35(4): 282-90.
138. Özbaran B. Otizm spektrum bozukluklarında çevresel faktörler etkili midir? *Pediatr Res*. 2014; 1(4): 170-3.
139. Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci*. 2011; 15(9): 409-16.
140. Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E ve ark. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol*. 2005; 161(10): 916-25.
141. Thimerosal in vaccines--An interim report to clinicians. *Pediatrics*. 1999; 104(3): 570-4.
142. McLellan F. IOM reviews evidence on thimerosal link to autism. *Lancet*. 2001; 358(9277).
143. Hurley AM, Tadrous M, Miller ES. Thimerosal-containing vaccines and autism: a review of recent epidemiologic studies. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2010; 15(3): 173-81.
144. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP ve ark. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010; 86(5): 749-64.
145. Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Transande L, Callan R, Droller D. Early Environmental Origins of Neurodegenerative Disease in Later Life. *Environmental Health Perspectives*. 2005; 113(9): 1230-1233.
146. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Haley BE, Geier MR. The relationship between mercury and autism: A comprehensive review and discussion. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016; 37: 8-24.

147. Cinca I, Dumitrescu I, Onaca P, Serbănescu A, Nestorescu B. Accidental ethyl mercury poisoning with nervous system, skeletal muscle, and myocardium injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1979; 43(2): 143-9.
148. Sulkowski ZL, Chen T, Midha S, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Maternal thimerosal exposure results in aberrant cerebellar oxidative stress, thyroid hormone metabolism, and motor behavior in rat pups; sex- and strain-dependent effects. *Cerebellum*. 2012; 11(2): 575-86.
149. Erdemli-Köse SB, Yirün A, Balci-Özyurt A, Erkekoğlu P. Modification of the toxic effects of methylmercury and thimerosal by testosterone and estradiol in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *J Appl Toxicol*. 2021; 1-14.
150. Howes OD, Kapur S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophr Bull*. 2009; 35(3): 549–62.
151. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM, Telang F. Dopamine in Drug Abuse and Addiction: Results of Imaging Studies and Treatment Implications. *Arch Neurol*. 2007; 64(11): 1575–9.
152. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996; 379(6566): 606–12.
153. Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(7): 4029–34.
154. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*. 2011:1-17.
155. Campbell A. The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrol Dialysis Transplan*. 2002; 17(2): 17-20.
156. Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-Gadda H, Dartigues JF. Relation between Aluminum Concentrations in Drinking Water and Alzheimer's Disease: An 8-year Follow-up Study. *Am J Epidemiol*. 2000; 152(1): 59-66.
157. Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF. Aluminum and Silica in Drinking Water and the Risk of Alzheimer's Disease or Cognitive Decline: Findings From 15-Year Follow-up of the PAQUID Cohort. *Am J Epidemiol*. 2009; 169(4): 489-96.
158. Mirza A, King A, Troakes C, Exley C. Aluminium in Brain Tissue in Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017; 40: 30-6.
159. Mustafa Rizvi SH, Parveen A, Verma AK, Ahmad I, Arshad M, Mahdi AA. Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. *PLoS One*. 2014; 9(5): 1-13.
160. Rather MA, Thenmozhi AJ, Manivasagam T, Nataraj J, Essa MM, Chidambaram SB. Asiatic acid nullified aluminium toxicity in in vitro model of Alzheimer's disease. *Front Biosci*. 2018; 10: 287-299.

161. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 9926–30
162. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y ve ark. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;236 (2): 313–22.
163. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase₁ gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 14960–65.
164. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43: 233–60.
165. Ma Q. Xenobiotic-activated receptors: from transcription to drug metabolism to disease. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 1651–71.
166. Masoud ST, Vecchio LM, Bergeron Y, Hossain MM, Nguyen LT, Bermejo MK ve ark. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and l-DOPA reversible motor deficits. *Neurobiol Dis.* 2015; 74: 66-75.
167. Dórea JG. Neurotoxic effects of combined exposures to aluminum and mercury in early life (infancy). *Environ Res.* 2020; 188: 1-10.
168. Waly M, Power-Charnitsky VA, Hodgson N, Sharma A, Audhya T, Zhang Y ve ark. Alternatively Spliced Methionine Synthase in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Cobalamin and GSH Dependence and Inhibitory Effects of Neurotoxic Metals and Thimerosal. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;1-11.

8. EKLER

EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

Aşılarda Kullanılan Koruyucu ve Adjuvan Maddelerin Olası Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

ORJİNALLİK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % 16 | % 15 | % 2 | % 3 |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|--|-------------|
| 1 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | % 9 |
| 2 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | % 1 |
| 3 | www.acarindex.com İnternet Kaynağı | % 1 |
| 4 | openaccess.lokmanhekim.edu.tr İnternet Kaynağı | % 1 |
| 5 | Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 6 | acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 7 | cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 8 | www.birgun.net İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 9 | Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE, Aylin BALCI, Pınar ERKEKOĞLU. "The Endocrine Disrupting | <% 1 |

EK 2. Dijital Makbuz

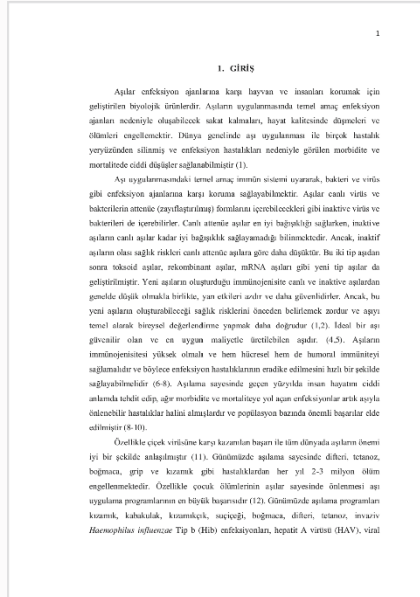


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Mehmet Evren Öztürk
 Ödev başlığı: Aşılarda Kullanılan Koruyucu ve Adjuvan Maddelerin Olası T...
 Gönderi Başlığı: Aşılarda Kullanılan Koruyucu ve Adjuvan Maddelerin Olası T...
 Dosya adı: EVREN_TEZ_EN_SON2502-kaynaks_z.docx
 Dosya boyutu: 540.62K
 Sayfa sayısı: 80
 Kelime sayısı: 15,696
 Karakter sayısı: 109,729
 Gönderim Tarihi: 25-Şub-2022 02:52ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1770627849



9. ÖZGEÇMİŞ