



**SODYUM FLORÜR İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA
BETANİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Damla ARSLAN ACARÖZ

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Zeki GÜRLER

Tez No: 2022-011

Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**SODYUM FLORÜR İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA
BETANİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Damla ARSLAN ACARÖZ

Danışman
Prof.Dr. Zeki GÜRLER

Tez No: 2022-011

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: “20.SAĞ.BİL.14”**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda** Damla ARSLAN ACARÖZ tarafından hazırlanan “Sodyum florür ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda betaninin muhtemel koruyucu etkisinin araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Zeki GÜRLER

İmza

Üye

Prof. Dr. Sinan İNCE

İmza

Üye

Prof. Dr. Recep KARA

İmza

Üye

Doç. Dr. Halil YALÇIN

İmza

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Tuncer ÇAKMAK

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

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

Damla ARSLAN ACARÖZ

ÖZET

SODYUM FLORÜR İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA BETANİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada sodyum florür ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda antioksidan özelliği bilinen betaninin olası koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla; deney süresince tüm gruplara standart rodent yemi ve su ad libitum olarak verildi. I. Grup: kontrol grubundaki erkek ratlara, standart rat yemi ve su, II. Grup: sodyum florür grubundakilere distile suda çözödürölen 100 ppm sodyum florür içme suyu ile verildi. III., IV. ve V. gruplara sodyum florür ile birlikte 25; 50 ve 100 mg/kg betanin (suda çözödürölerö) gastrik gavaj yoluyla 21 gün boyunca her gün uygulandı. Çalışma sonunda hayvanlardan alınan kan, karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokularında malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri belirlendi. Ratlardan alınan karaciğer ve böbrek dokularında IFN- γ , TNF- α ve NF κ B genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri moleküler olarak araştırıldı ve bunlara ilaveten dokularda histopatolojik incelemeler de gerçekleştirildi. Sodyum florür uygulaması rat dokularında lipid peroksidasyonu uyararak SOD ve CAT enzim aktivitesini ve GSH düzeylerini azalttığı belirlendi. Buna karşın sodyum florür uygulaması sonucu dokularda MDA düzeylerinin ve IFN- γ , TNF- α ile NF- κ B gen ekspresyon düzeylerinin artırdığı belirlendi. Ayrıca sodyum florür uygulamasının dokularda histopatolojik değışiklikler meydana getirdiğı gözlemlendi. Sodyum florür uygulamasından sonra MDA düzeyinin en yüksek kan dokuda ($34,47 \pm 8,83$) olduğı belirlenmiştir. Betanin uygulamasının ise GSH düzeyini, SOD ve CAT aktivitelerini kontrol grubuna yaklaştırdığı ve azalan antioksidan enzim aktivite düzeylerini tersine çevirdiğı tespit edildi. Buna karşın sodyum florürle birlikte betanin uygulamasının MDA düzeyini azalttığı belirlendi. Çalışma sonucunda sodyum florür uygulamasının oksidatif strese neden olduğı, betanin uygulamasının ise bu olumsuz etkileri azalttığı belirlendi. Bu sonuca göre betanin uygulamasının sodyum florür maruziyeti sonucu oluşın oksidatif strese bağılı doku ve organ hasarlarının önlenmesinde faydalı etkilere sahip olduğı ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Betanin, gen ekspresyonu, oksidatif stres, rat, sodyum florür

SUMMARY

POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF BETANINE AGAINST SODIUM FLUORIDE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RATS

In this study, it was aimed to determine the possible protective effect of betanin, which is known to have antioxidant properties, against sodium fluoride-induced oxidative stress. During the experiment, all groups were given a standard rodent diet and water *ad libitum*. Group I: the control group, standard rodent diet and water were given to male rats, II. Group: 100 ppm sodium fluoride dissolved in distilled water given by drinking water, III., IV. and V. groups sodium fluoride with 25; 50 and 100 mg/kg betanin (dissolved in water) were administered daily for 21 days by gastric gavage. At the end of the experiment, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) values and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were analyzed in blood, liver, lung, kidney, heart, testes and brain tissue of rats. Molecular analysis of liver and kidney IFN- γ , TNF- α and NFkB inflammatory genes and histopathological examinations of tissues were performed. Sodium fluoride administration stimulated lipid peroxidation in all tissues of rats, decreased GSH levels, SOD and CAT activities. However, sodium fluoride administration increased MDA levels and IFN- γ , TNF- α and NF-kB gene expressions. In addition, it was observed that sodium fluoride administration caused histopathological changes in the tissues. It was determined that MDA level was the highest in blood tissue (34.47 ± 8.83) after sodium fluoride administration. It was also determined that betanin administration brought the GSH level, SOD and CAT activities closer to the control group and reversed the decreased antioxidant enzyme activity levels. On the other hand, it was determined that the administration of betanin with sodium fluoride decreased the MDA level.

Consequently, it was concluded that betanin showed a protective effect against sodium fluoride-induced oxidative stress and decreased its negative effects. According to this result, it has been revealed that betanin has beneficial effects in the prevention of tissue and organ damage due to sodium fluoride induced oxidative stress.

Keywords: Betanine, gene expression, oxidative stress, rat, sodium fluoride

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Zeki GÜRLER'e, tez izleme komitemdeki saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sinan İNCE ve Doç. Dr. Recep KARA'ya, tezim boyunca sonsuz sabır gösteren ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle. Tez çalışmam Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 20.SAĞ.BİL.14 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Verilen desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Damla ARSLAN ACARÖZ

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ SAYFASI	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	VIII
RESİMLER	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Flor ve Sağlık Üzerine Etkileri	1
2.2. Betanin	4
2.3. Oksidatif Stres	9
3. MATERYAL ve METOT	12
3.1. Deney Hayvanı Materyali	12
3.2. Deneysel Aşama	12
3.3. Deney Hayvanlarının Anestezi ve Sakrifikasyonu	12
3.4. Doku Homojenizasyonu	13
3.5. Malondialdehit (MDA) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	14
3.6. Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	14
3.7. Histopatolojik Değerlendirme	14
3.8. Moleküler Analizler	15
3.8. İstatiksel Analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. Kanda ve Dokularda Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	18
4.2. Kanda ve Dokularda Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri	19
4.3. Eritrositlerde ve Dokularda Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktiviteleri	20
4.4. Eritrositlerde ve Dokularda Katalaz (CAT) Aktivite Düzeyleri	21
4.5. Karaciğer ve Böbrekte Değişen Gen Ekspresyonları	22
4.6. Histopolojik Bulgular	25

5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR	33
8. EKLER	47
8.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	47
ÖZGEÇMİŞ	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

CAT: Katalaz

cDNA Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

GSH: Redükte Glutasyon

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

LPO: Lipid Peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

mRNA Mesajcı Ribonükleik Asit

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa Beta

PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türler

SOD: Süperoksit Dismutaz

TBA: Tiyobarbütirik Asit

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Betalain Kullanım Alanları	7
Şekil 2.2. Serbest radikallerin hücre saldırısı ve oksidatif stres	9
Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS)/reaktif nitrojen türlerinin (RNS) ve hastalıkların eksojen ve endojen kaynakları	11
Şekil 4.1. Uygulamaların karaciğer dokusu IFN-gamma mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	28
Şekil 4.2. Uygulamaların böbrek dokusu IFN-gamma mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	28
Şekil 4.3. Uygulamaların karaciğer dokusu NF-kB mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	29
Şekil 4.4. Uygulamaların böbrek dokusu NF-kB mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	29
Şekil 4.5. Uygulamaların karaciğer dokusu TNF-alfa mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	30
Şekil 4.6. Uygulamaların böbrek dokusu TNF-alfa mRNA ekspresyon düzeyine etkisi	30

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri	16
Çizelge 4.1. Kanda ve Dokularda MDA düzeyleri	18
Çizelge 4.2. Kanda ve dokularda GSH düzeyleri	19
Çizelge 4.3. Eritrositlerde ve dokularda SOD aktiviteleri	20
Çizelge 4.4. Eritrositlerde ve dokularda CAT aktiviteleri	21

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Beyin dokularının histopatolojik görünümleri	31
Resim 4. 2. Akciğer dokularının histopatolojik görünümleri	32
Resim 4.3. Kalp dokularının histopatolojik görünümleri	32
Resim 4.4. Karaciğer dokularının histopatolojik görünümleri	32
Resim 4.5. Böbrek dokularının histopatolojik görünümleri	33
Resim 4.6. Testis dokularının histopatolojik görünümleri	33

1. GİRİŞ

Florür formundaki flor, yerkabuğunda bulunan minerallerin %0.06-0.09'unu temsil etmektedir. Flor, insan vücudu için gerekli olan eser elementler arasında yer almaktadır (Avvannavar, 2007; Song vd., 2014; Kashyap vd., 2021). Flor, atom numarası 9 ve atom ağırlığı 19 olan bir elementir. Halojenler grubunda yer alır ve yüksek kimyasal reaktiviteye sahiptir. Oda sıcaklığında flor gaz halinde bulunur ve birçok elementle reaksiyona girer. Kimyasal reaktivitesi sayesinde flor tüm elementlerle ve asal gazlarla kolayca bileşikler oluşturabilir. Düşük stabilitesi nedeniyle flor doğada elemental halde bulunmaz. Bunun yerine flor, ya bir kompleks olarak ya da iyonize florür formunda bulunur (Atkins vd., 2010; Song vd., 2014; Johnston ve Strobel, 2020). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) geçmişten günümüze neredeyse tüm iklim koşullarında yetişebilen, Amaranthaceae ailesinde bulunan çiçekli bir bitkidir. Günümüzde pancar, dünyanın birçok ülkesinde özellikle Amerika, Avrupa ve Hindistan gibi geniş bir coğrafyada yetiştirilebilmektedir (Farooqi vd., 2007; Chawla vd., 2016; da Silva vd, 2020; Fu vd., 2020). Türkiye’de kırmızı pancar en fazla Ege ve Marmara bölgelerinde, az da olsa Akdeniz bölgesinde yetiştirilebilmektedir (Chawla vd., 2016; da Silva vd, 2020). Bu çalışmada florür ile indüklenen oksidatif strese karşı betaninin muhtemel koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Flor ve Sağlık Üzerine Etkileri

İnorganik bir bileşik olan sodyum florür (NaF), içme sularının florlanması, diş macunlarında ve diş bakımlarında, metalürjide, radyografik görüntülemelerde, pestisit ve fare zehirlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurtdeve vd., 2017; Wimalawansa, 2020). Suda kolay bir şekilde çözünen katı formulu bir bileşiktir. Ancak uzun süre ve yüksek konsantrasyonlarda maruz kalındığı zaman dişlerde, kemiklerde ve farklı dokularda çeşitli hasarlara sebep olmaktadır. Florür iyonları genellikle magnezyum ve diğer metal iyonları ile kompleksler oluşturarak çeşitli enzimleri inhibe eder (İbrahim vd., 2011; Johnston ve Strobel, 2020; Wimalawansa, 2020).

Florür iyonları, bir enzimin aktif merkezini çevreleyen fonksiyonel amino asit gruplarına bağlanarak, florür tarafından inhibisyona duyarlı olan glikolitik yol ve Krebs

döngüsü enzimlerine benzer şekilde, inhibitör bir etki oluşturabilir. Bu nedenle, florür iyonları hücresel solunumu engeller ve adenozin trifosfat (ATP) üretiminin azalmasına yol açar (Adamek vd., 2005; Barbier vd., 2010; Qin vd., 2019). Na/K-ATPazlar inhibe edilir, bu durumda da ATP'nin tükenmesine ve hücre membran potansiyelinde bozulmaya sebep olur. Aşırı flor maruziyeti sonucunda glukoz metabolizmasında hasar ve kan glukoz düzeyinde artış meydana geldiği belirlenmiştir (Adamek vd., 2005; Barbier vd., 2010; Qin vd., 2019; Nagendra vd., 2021).

Florür zehirlenmesinin ana nedeni içme sularıdır ve yüksek konsantrasyondaki flor genelde yumuşak, alkali ve kalsiyum eksikliği bulunan sularla ilişkilendirilir. Flor veya florürün vücuda alındığı diğer yollar ise gıda, ilaç, kozmetik ve endüstriyel maruziyettir. Flor, tıpta, anestezikler, antibiyotikler, anti-kanser ve anti-inflamatuar ajan olarak yaygın kullanım alanına sahiptir (Hagmann, 2008; Ozsvath, 2009; Pan, 2019; Maity vd., 2021; Vandana vd., 2021). Sodyum florür, metalürjide çeşitli özel kimyasal uygulamalarda da yer almaktadır. Asil klorürler, fosfor klorürler ve kükürt klorürler olmak üzere elektrofilik klorürler ile çeşitli reaksiyonlara girerler. Sodyum florür, Finkelstein reaksiyonu ile florokarbonlar meydana getirmek için kullanılabilir (Halpern, 2001; Piero, 2013).

İnsanlarda florür maruziyetinin ana sebebi olarak içme suları kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2011), su florür konsantrasyonlarının 1,5 mg/L'nin altında olmasını tavsiye etmektedir. Bunun yanı sıra, dünya nüfusunun %32'sinin tavsiye edilen seviyenin üstünde florür konsantrasyonuna sahip su tüketmektedir (WHO, 2011; Kumar vd., 2020; Skorka-Majewicz vd., 2020). Florür maruziyeti alınan besinlere göre değişebilmektedir, tüm gıdalar florür içermektedir. Ancak en yüksek flor konsantrasyonuna sahip bazı bitkiler: domates, ıspanak, üzüm, çay ve mürverdir (Johnston ve Strobel, 2020). Akut florür toksisitesi sadece yüksek florür konsantrasyonuna maruz kalan bireylerde rapor edilmiştir. Tipik olarak semptomlar mide bulantısı, ishal, baş ağrısı ve mide bulantısıdır (Ullah vd., 2017).

Florozis, flor toksisitesinin sebep olduğu çok ciddi bir hastalıktır. Yüksek florür maruziyeti genelde flor ile kontamine suların içilmesi ile meydana gelir (Li vd., 2013; Cao vd., 2014). Florozis yalnızca iskelet dokusuna ve dişlere değil aynı zamanda beyin, karaciğer, böbrek, pankreas ve omurilik gibi yumuşak dokularda da hasar

oluşturabilmektedir. Aşırı florür alınması, iskelet, sinir, sindirim, solunum ve genitoüriner sistemler de dahil olmak üzere çeşitli organ ve dokularda hasarlara neden olabilmektedir (Mohapatra vd., 2009; Piero, 2013; Skorka-Majewicz vd., 2020; Lacson vd., 2021). Dünya çapında birçok ülkede endemik florozis, gıda, içme suyu, kontamine toz ve duman yoluyla aşırı dozda florür alımı nedeniyle bir dizi sağlık sorununa neden olmaktadır (Ni vd., 2018). Bunun yanı sıra birkaç çalışma da yüksek flor maruziyetinin testosteron üretimini ve folikül uyarıcı hormonların üretimini azalttığı gösterilmiş ve endokrin sisteme de etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Ortiz-Perez vd., 2003; Skorka-Majewicz vd., 2020). Flor maruziyetinin rat, fare ve tavşanlarda etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda üreme hormon düzeylerinin değiştiği ve üreme sistemi dokularında da değişimler gözlenmiştir (Collins vd., 2001; Elbetieha vd., 2000; Das, 2021).

Flora maruz kalan hayvanlarda yapılan bazı çalışmalarda, hepatomegali, nefroz, miyokardiyal mineralizasyon, gastrointestinal sistem ile üreme organlarının morfolojinde ve fonksiyonlarında olumsuz etkiler belirlenmiştir (Avvannavar, 2007). Florun üreme sistemi üzerinde de önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Ramezani vd., 2004). Florun, spermatogenezis inhibisyonuna, sperm aktivitesinin azalmasına, sperm hücre zarında hasara ve testiküler oksidatif strese yol açmaktığı bildirilmiştir (Öncü vd., 2007). Hayvanlarda yapılan bazı araştırmalar neticesinde, bireylerde üreme problemlerinin yüksek flor konsantrasyonlarına maruziyet ile ilişki olduğu gösterilmiştir. Flora maruz kalan erkek ratlarda ve farelerde azalmış sperm kalitesi (sperm sayısı, sperm hareketliliği, sperm canlılığı ve sperm anormallikleri) gözlenmiştir (Dhar ve Bhatnagar, 2009; Flora vd., 2009; Barbier vd., 2010). Florür, diş minesinin doğal bileşeni olan fluorapatit ile dişlere katkı sağlamaktadır (Selwitz vd., 2007; Pajor vd., 2019). Flor, iskelet dokularının ve dişlerin hidroksiapatit matrisini güçlendirmek için eser miktarlarda ihtiyaç duyulan temel bir elementtir. Diş çürükleri, yetersiz flor alımının yaygın olduğu popülasyonlarda önemli bir sorundur (Rafique vd., 2015). Güçlü elektronegatifliği nedeniyle, florür dişlerde ve kemiklerde pozitif yüklü kalsiyum tarafından çekilir. Aşırı florür maruziyeti sonucunda diş florozu, dişlerde beneklenme, iskelet florozu ve kemiklerin deformasyonu şekillenebilir. Çok düşük dozlarda florür (<0,6 mg/l) diş çürümelerini engeller ancak yüksek dozlarda (>1.5 mg/l) alındığında diş florozu veya dişlerde beneklenme aşırı yüksek konsantrasyonlarda (>3.0 mg/l) ise

iskelet florozuna yol açabilir (İbrahim vd., 2011; Chandrajith vd., 2020). Florür, besin ve sularla alındıktan sonra gastrointestinal sisteme ve plazmaya geçer. Zamanla, florür dalak, böbrek ve kemik gibi dokularda birikim gösterir. Böbrekler, florun atılmasında başlıca görevli organdır. Böbreklerden atılımı etkileyen faktörler; kalsiyum alımı, yaş, cinsiyet, flor alımının miktarı ve süresidir. İdrar içeriğinde artan flor miktarı kemikteki flor içeriğinin artışını ve flor toksisitesini işaret etmektedir (Bai vd., 2010; Perumal vd., 2013; Johnson vd., 2019; Johnston ve Strobel, 2020). Aşırı florür maruziyeti gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerde insan sağlığı üzerine ciddi etkiler göstermektedir (Kashyap vd., 2021). Flor maruziyeti Hindistan, Çin, Pakistan, Sri Lanka, Türkiye, İran, Cezayir, Libya, Irak, ABD, Kanada, Tayland, Yeni Zelanda ve Japonya dahil 28 gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede yaklaşık 200 milyon insanı etkileyen sessiz bir jeojenik hastalık olan florozise yol açmaktadır (Rafique vd., 2015).

2. 2. Betanin

Betanin (betanidin 5-O- β -D-glukozit) en yaygın bulunan betasiyanindir ve gıda ürünlerinde, kozmetiklerde ve farmasötiklerde doğal renklendirici olarak kullanımı onaylanmıştır (Nemzer vd., 2011; SCCS, 2015; Vieira Teixeira da Silva vd., 2019). Kırmızı pancarın kendine has rengini içerdiği betalain (yaklaşık 200 mg/100 g taze ağırlık) vermektedir. Son yıllarda sentetik gıda boyalarının sağlığa olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasıyla doğal renk veren bitkiler, mantarlar, bakteriler ve alglerin kullanımı artış göstermiştir. Bugün, doğal gıda renklendiricileri olarak suda çözünebilen betalain, antosiyanin ve karminik asit, yağda çözünebilen karotenoidler ve klorofiller de yaygın kullanım alanına sahiptir. Kırmızı pancar da bu doğal renk maddeleri arasında yer almaktadır (Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Esatbeyoglu vd., 2015; Martins vd., 2017; Lima vd., 2020). Kırmızı pancarın yapısında yer alan betalainler yoğurt, şekerleme, dondurma, puding, tatlılar, reçeller, şekerler, çorbalar, soslar, içecekler, süt ve fırın ürünlerinde doğal renklendirici madde olarak yaygın bir kullanıma sahiptir (Şekil 1) (Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Martins vd., 2017). Betanin, gıda sektöründe kullanılan güçlü bir antioksidan olup serbest radikal süpürücüdür ve doğal bir pigmenttir. Yaygın olarak tüketilen kırmızı pancar gıda üretiminde kullanılan doğal renklendiricilerdendir (Khan, 2016; Fu vd., 2020; Ramirez-Velasquez vd., 2022). Betalainler oldukça hassas yapıdaki pigmentlerdir ve ekstraksiyon esnasında pH,

oksijen, su aktivitesi, sıcaklık, ışık, gibi çeşitli faktörlerden kolayca etkilenmektedirler (Paciulli vd., 2016; Carreón-Hidalgo vd., 2022). Betalainler, suda çözünebilen ve azot bulunduran, betalamik asit benzeri şeklinde tanınan renk pigmentleridir. Genelde betasiyanin ve betaksantin olarak iki grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bu iki pigment birbirlerinden farklı kimyasal yapıda olduklarından dolayı renk özellikleri birbirlerinden farklı özellik göstermektedirler. Betaksantinler sarı renkli, betasiyaninler kırmızı renklidirler. Bu iki formun absorbands spektrumlarının dalga boyu (λ_m) sırası ile 480 ve 536 nm olarak tespit edilmiştir (Schaefer vd., 2004; Leonard ve Papaj, 2011; Khan ve Giridhar, 2015; Martins vd., 2017; Celli ve Brooks, 2017). Betalainler zayıf asidik ortamlarda (pH 3-7) antosiyaninlere göre stabil ve suda çözünürlüklerinin yüksek olması nedeniyle betalainlere yönelim her geçen gün artmakta ve antosiyaninlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Özellikle pH'sı 3-7 aralığında stabil bir yapıda bulunan betalainler, asidik ve nötr gıda ürünlerinde doğal renklendirici madde olarak tercih edilmektedir (Azeredo vd., 2007; Stintzing ve Carle, 2007).

Betalainlerin ekstraksiyonunda en fazla verimin alınması için betalain stabilitesine negatif yönde etki eden olayların engellenmesi gereklidir. Bu nedenle ekstraksiyondan önce enzim inaktivasyonu yapılması tavsiye edilmekte ve bunun için kısa zamanlı sıcaklık uygulamaları sıkça yapılmaktadır. Fakat bu teknik betalainlerin stabilitesini yükseltse de pigment ve önemli bileşenlerin kayıplarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, sıcaklık uygulamalarının yerine çeşitli alternatif teknikler de denenmektedir (de Azeredo vd., 2009; Swamy vd., 2014; Paciulli vd., 2016; Celli ve Brooks, 2017).

Sulu ekstraksiyon haricinde uygulanan, ultrases ve yüksek elektriksel kuvvet teknikleri de kırmızı pancar betalainlerinin ekstraksiyonunun verimini önemli ölçüde artırabilen teknikler arasında yer almaktadırlar (Zvitov ve Nussinovitch, 2005; Sivakumar vd., 2009; Suganyadevi vd., 2010; Sturzoiu vd., 2011).

Betalainin stabilitesi, pigmente özgü etkenlerden ve dış etkenlerden etkilenmektedir. pH'nın ve su aktivitesinin stabilizeye önemli düzeyde etkisi vardır. Betalain bulunduran gıdalarda en uygun pigmentin sağlanmasında gıda üretimi esnasında sıcaklık ve zaman şartları dikkat edilmesi gereken diğer faktörler arasında yer almaktadırlar. Bunun yanı sıra, ışık ve oksijen gibi dış etkenlere de dikkat edilmelidir. Betalain stabilitesi ile su aktivitesi ters bir orantıya sahiptir. Su aktivitesinin düşmesi ile birlikte betalain

stabilitesi yükselmektedir. Hidrojen peroksit betalain stabilitesini düşürücü role sahiptir buna karşın azot betalain stabilitesinin artmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Oksijensiz ve azot içeren ortamlar, betalain stabilitesinin artmasını sağlamaktadır (Herbach vd., 2006; Martins vd., 2017; Rodriguez-Amaya, 2019). Betalain, aerobik şartlarda pH 5,5-5,8 aralığında, anaerobik şartlardaysa pH 4-5 aralığında optimum stabilitededir. Işık mevcudiyetinde ise renkte degradasyon ve oksidasyon tepkimeleri gerçekleşmektedir. Aynı şekilde, ışık yoğunluğu (2200-4400 Lux) ve betalain stabilitesi arasında ters bir orantı mevcuttur. Ultraviyole (UV) ve görünür aralıktaki ışığın dağılması, moleküllerin reaktivitesini yükselterek ya da aktivasyon enerjisini azaltarak betalain kromoforunun elektronlarını aktive etmektedir (Chhikara vd., 2019; Ravichandran vd., 2014). Sıcaklık, betalain stabilitesini değiştiren en kritik etkenler arasında yer almaktadır. Betalainin, mikrodalga ile 60 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda degradasyona maruz kaldığı görülmüştür (Gonalves vd., 2012; Cejudo-Bastante vd., 2015; Martins vd., 2017; Slavov vd., 2013). Ayrıca doğal pigmentlerde meydana gelen renk değişimleri gıdanın kalitesini izlemeye de yardımcı olmaktadır (Golasz vd., 2013).

Pancarlar vitaminler (C vitamini, tiamin, B6 vitamini, β -karoten, vitamin A, K vitamini ve E vitamini), mineraller (kalsiyum, demir, magnezyum, potasyum, selenyum ve çinko), karotenoid, fenolikler, askorbik asit ve betalainler bakımından zengin bir gıda maddesi olması nedeniyle fonksiyonel bir gıda olarak da kabul edilmektedir. Ayrıca pancar yüksek sakkaroz içeriğine sahip bir besin olup katma değeri yüksek, biyofonksiyonel gıda olarak tanımlanmaktadır (Chhikara vd., 2019; Fu vd., 2020). Son zamanlarda, bilinçli tüketiciler güvenli gıdanın üzerinde durmaya başlamıştır. Bundan dolayı, gıda üreticileri gıda güvenliğini sağlamak amacıyla çeşitli formülasyonlarda sentetik renklendiricilerin kullanılmasının yerine doğal renklendiricilerin kullanılmasına önem vermektedir. Alternatif doğal renklendirici elde edilmesi önemli bir konuya dönüşmüştür. Doğal gıda renklendiricileri daha sağlıklı olmaları nedeniyle sentetik gıda renklendiricilere göre daha çok tercih edilmektedir (Stintzing ve Carle, 2007; Esatbeyoglu vd., 2015; Kumar vd., 2015a; Martins vd., 2016, Martins vd., 2017).

Betalain kullanım alanları



Şekil 2.1. Betalain kullanım alanları

Betalainler, hidrofilik yapıda ve yeterli renk verme özelliği bulunduran alternatif gıda renklendiricilerinden birisidir (Stintzing ve Carle, 2007; Kumar vd., 2015a; Martins vd., 2016, Martins vd., 2017).

Kırmızı pancarda bulunan betalainlerin ve diğer fenolik maddelerin lipid oksidasyonu azalttığı ve betalainlerin DNA zincir kırılmalarını engellediği tespit edilmiştir. Yapısında yer alan nitrit ve nitratların indirgenmesi ile meydana gelen nitrozaminler nedeniyle hücre mutasyonlarını engelleme potansiyeli bulunmakta ve antioksidan etkisi ile kalp-damar hastalıklarını azalttığı görülmüştür (Gengatharan vd., 2015; Albasher vd., 2019). Betalainlerin, kardiyoprotektif, antienflematuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antilipidemik ve antiproliferatif etkileri de mevcuttur (Hobbs vd., 2013; Ravichandran vd., 2013; Vulić vd., 2013; Naselli vd., 2014; Vidal vd., 2014; Albano vd., 2015; Faridah vd., 2015; Kumar vd., 2015b). Ayrıca betanin, hücrelerde antiinflamatuvar ve hepatik koruyucu fonksiyonlarından dolayı ilgi odağı olmuştur. Bu bileşiğin, in vitro endotel hücrelerinde redoks aracılı sinyal iletim yollarını modüle ettiği

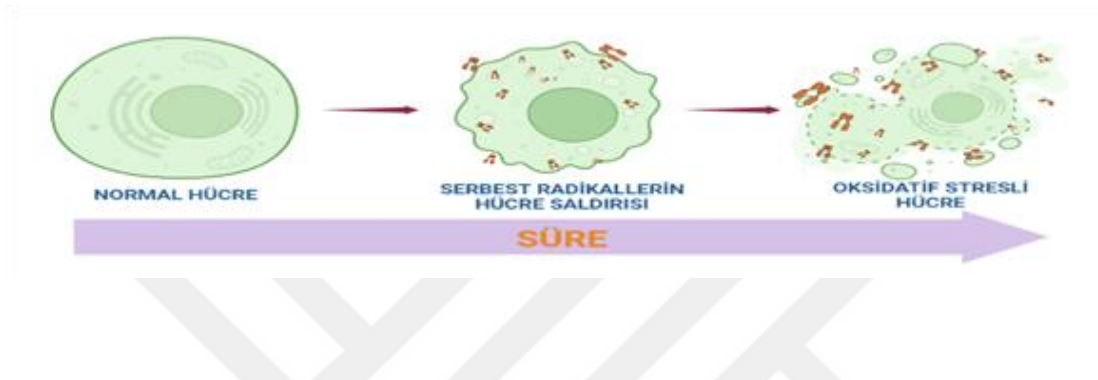
ve insan tümör hücre dizilerinde antiproliferatif etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Gentile vd., 2004; Kapadia vd., 2012). Yapılan çalışmalar betaninin serbest radikal oluşumunu engellemesi nedeniyle, in vitro hücre hatlarında ve deney hayvanlarında oksidatif stresi azaltma yeteneğine odaklanmıştır (Ahmadian vd., 2018; Song vd., 2019).

Yapılan çalışmalar sonucunda betaninin MCF-7 (meme), HCT-116 (kolon), AGS (mide), SF-268 (merkezi sinir sistemi) ve NCI-H460 (akciğer) kanser hücre hatlarında hücre gelişimini inhibe ettiği ve IC50 değerleri sırasıyla 162, 142, 158, 164 ve 147 µg/mL olarak belirlendi (Reddy vd., 2005).

HepG2 hücrelerine 200 µg/mL uygulanan betanin hücre proliferasyonunu %49 inhibe ettiği, 800 µg/mL uygulandığında ise %25 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Lee vd., 2014).

2.3. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, en az bir eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu eşleşmemiş elektron nedeniyle, serbest radikaller oldukça reaktiftir. Örneğin, OH radikali ($\cdot\text{OH}$), şimdiye kadar bulunan en aktif reaktif türlerdendir. Hemen hemen tüm organik bileşikleri hızlı ve etkili bir şekilde oksitleyebilir (Żukowski vd., 2018; Pan vd., 2019).



Şekil 2.2. Serbest radikallerin hücre saldırısı ve oksidatif stres

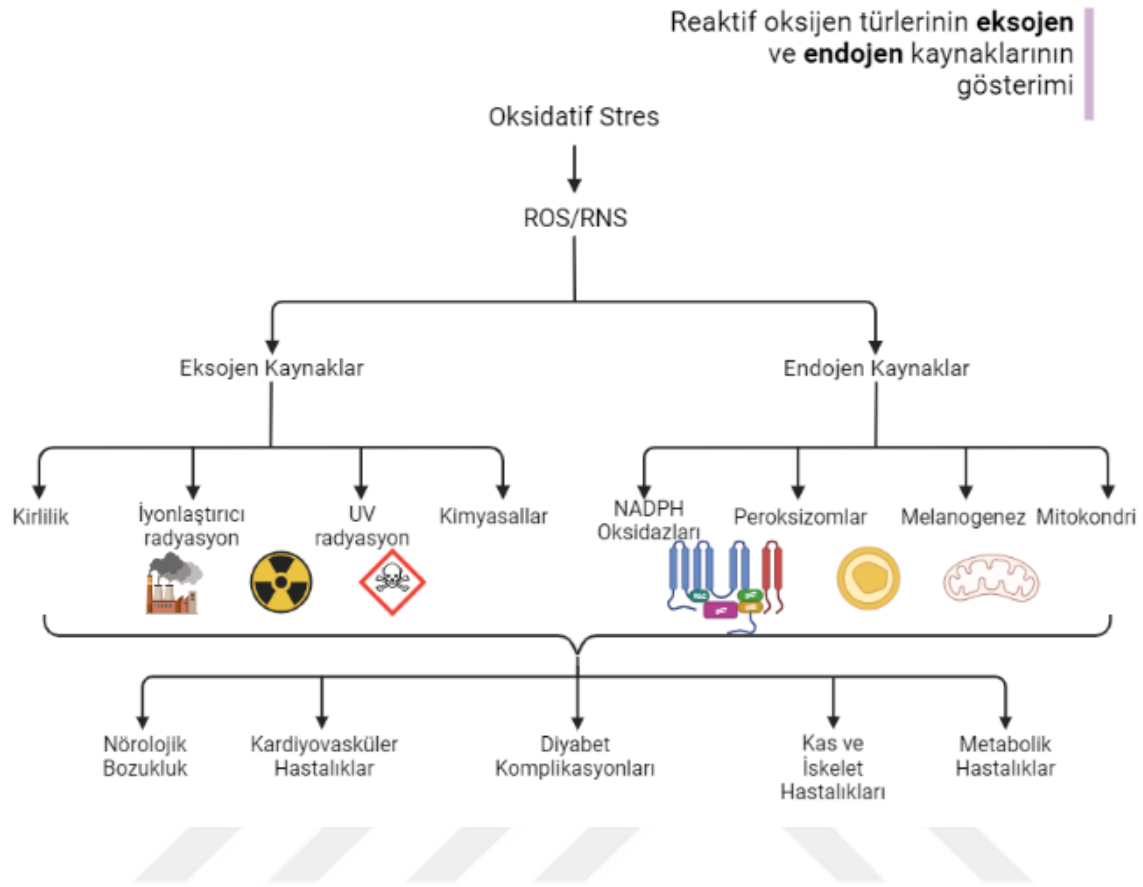
Metabolizmada yiyecekleri sindirme, alkol ve ilaçları metabolize etme, yağları enerjiye çevirme gibi birçok doğal biyolojik süreç sırasında serbest radikal adı verilen zararlı bileşikler de üretilmektedir. Serbest radikallerin etkileri metabolizmada antioksidan savunma sistemi tarafından engellenmeye çalışılmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin kapasitesinden fazla serbest radikal mevcut olduğu durumlarda, serbest radikaller vücutta negatif zincir reaksiyonunu tetikleyebilir, hücre zarını tahrip edebilir (Şekil 2.2.), enzimlerin etkisini bloke edebilir, hücresel süreçleri olumsuz olarak engelleyebilir ve DNA'ya hasar verebilir (Kurutas, 2016; Srinivas vd., 2019).

Serbest radikaller, çoğunlukla kararsız ve reaktif olan eşleşmemiş elektronları bulunan atomlar veya moleküllerdir. Redoks regülasyonu eaktif oksijen radikalleri (ROS) ve nitrojen radikalleri (RNS) olmak üzere iki tür serbest radikal içermektedir (Krumova ve Cosa, 2016). Oksidatif stres (OS), biyolojik bir sistemde yer alan oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin olmamasından dolayı şekillenen bir durumdur. Oksidatif stres ROS seviyesinin aşırı veya antioksidan sistemin yetersiz ve/veya düzgün çalışmadığı durumlarda ortaya çıkmaktadır (Sing vd., 2019; Pisoschi vd., 2021).

Kimyasal özelliklerinden dolayı, ROS/RNS lipid peroksidasyonunu başlatabilir. DNA zincirinin kırılmasına sebep olabilir, biyolojik zar ve dokularda hasarlara yol açabilir. Ancak ROS'un önemli fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için vücutta belirli bir seviyede bulunması da gerekmektedir (Finkel ve Holbrook, 2000; McCord, 2000; Mittler, 2002; Turrens, 2003; Singh vd., 2019). ROS üretimi, sinyal iletim yolları, mikroorganizmalara karşı savunma, apoptoziste ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere hücre fonksiyonlarda sorumlu olan aerobik yaşamın doğal bir parçasıdır. Örneğin, fiziksel egzersiz ve iskemi de biyolojik savunma mekanizmalarını güçlendirebilir, doğum kanalını doğuma hazırlar ve apoptozu indükleyebilir. Bunun yanı sıra, yüksek seviyelerde ROS ve oksidatif stres, nekrotik ve/veya apoptotik mekanizmalar vasıtasıyla hücre ölümünü indükleyerek hücre ve doku hasarına sebep olabilmektedir (Apel ve Hirt, 2004; Finkel ve Holbrook, 2000; McCord, 2000; Mittler, 2002).

Moleküler oksijenin biyolojideki kritik rolü, hücre fonksiyonu ve tüm organizmaların yaşamı için gereklidir. Oksijen yaşamın devamı için çok önemlidir; sinyal iletim, gen transkripsiyonu ve çeşitli hücre fonksiyonlarında rol olmasına rağmen, serbest radikal ve ROS formundayken biyomoleküllerin üzerinde olumsuz bir etkiye yol açmaktadır. Diğer önemli tür ise nitrik oksittir (NO). Bu vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi, lökosit adezyonu, anjiyogenez, trombosit agregasyonu, tromboz, vasküler tonus ve hemodinamik gibi düzenleyici işlevlere sahiptir (Bandyopadhyay vd., 1999; Zheng ve Storz, 2000; Kroemer ve Reed, 2000). ROS'a karşı glutatyon, taurin, kreatin, çinko, E vitamini, C vitamini, A vitamini ve polifenoller gibi çeşitli antioksidanlar etkiye sahiptir (Bandyopadhyay vd., 1999; Fang vd., 2002).

ROS, biyomoleküllerin işlevini modüle ederek nöronal hücrelerde ciddi hasarlara neden olmaktadır. Hücrelerdeki farklı biyomoleküller (DNA, RNA, lipidler ve proteinler) ve süreçleri (nükleik asit oksidasyonu, lipid peroksidasyonu) olumsuz etkilemektedir. Nörodejenerasyona katılan ROS, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-) ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikalini ($HO\bullet$) bulundurur. Nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) de nöronlar üzerinde olumsuz etkiye sahiptir (Wang ve Michaelis, 2010). Şekil 2.3.'te, ROS/RNS'nin yol açtığı ekzojen ve endojen kaynaklar ve hastalıklar gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS)/reaktif nitrojen türlerinin (RNS) ve hastalıkların eksojen ve endojen kaynakları

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanı Materyali

Wistar albino türü erkek ratlar (200-300 g) hayvan materyali olarak kullanıldı. Ratlar deney hayvanları ünitesindeki kafeslerinde; 12 saat ışık/karanlık, 24±1 °C derece sıcaklıkta ve düzenli havalandırılan ortamda bulunduruldu ve beslenmelerinde standart rat yemi kullanıldı. Çalışmada uygulanan sodyum florür (Atmaca vd., 2014) ve betaninin (Han vd., 2015; Motawi vd., 2019) verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak belirlendi. Çalışma öncesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (AKUHAYDEK) çalışma için Etik izni alındı (49533702-230).

3. 2. Deneyisel Aşama

Erkek ratlar her grupta 7'şer adet olacak şekilde, I. Grup: Kontrol grubuna, sadece diyet ve su verildi; II. Grup: sodyum florür grubuna, 21 gün boyunca içme suyu ile 100 ppm dozda sodyum florür verildi. III, IV ve V., gruplara ise 21 gün boyunca içme suyu ile 100 ppm dozda sodyum florür ile 25; 50 ve 100 mg/kg dozlarında betanin gastrik gavaj yoluyla uygulandı. Bu çalışmada sodyum florür ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda antioksidan özelliği bilinen betaninin olası koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

3.3. Deney Hayvanlarının Anestezi ve Sakrifikasyonu

Deney hayvanlarına gerçekleştirilen son uygulamalardan itibaren 24 saat geçtikten Wistar Albino ratlara sonra ksilazin ve ketamin anestezisi altında intrakardiyak olarak kan ve ayrıca karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokuları alınacak, hızlı bir şekilde laboratuvarı ön işlemleri gerçekleştirildi. Anestezi bitiminde intrakardiyal olarak EDTA'lı enjektörle 3-5 cc kan almak için göğüs kafesi açıldı. Ardından zaman kaybetmeden servikal dislokasyon yapıldı ve böylelikle sakrifikasyon işlemi de tamamlandı. 10 dakikada 3000 devir/dk'da kan örneklerinin plazmaları santrifüj edilerek ayrıldı, 1,5'lik ependorf tüplere ayrılan plazmalar -80°C 'de analizleri yapılncaya kadar saklandı. Ratların sakrifiye işleminden sonra önceden açılmış olan göğüs kafesinin yanındaki batın bölgesi de cerrahi yöntemlerle açıldı ve ratların karaciğerleri alındı. Dokulardan birer parça biyokimyasal ve moleküler incelemeler

amacıyla -80 °C de saklandı, diğer kısımlar histopatolojik olarak takip edilmek üzere alındı.

3.4. Doku Homojenizasyonu

Eritrositler daha önce bildirilen metoda göre hazırlandı (Winterbourn vd., 1975). Kısaca, kan numunelerine santrifüj işlemi uygulandı (3500 rpm, 15 dakika, 4 °C) ve akabinde eritrosiler 3 defa izotonik tuzlu su (pH 7.4) ile yıkandı. Elde edilen eritrositler izotonik tampon solüsyonu ile Eppendorf tüplerine aktararak (-20 °C) analize kadar saklandı. Analiz için, soğuk deiyonize su ile eritrosit süspansiyonu ölçüm için hazır hale getirildi. Doku örnekleri daha önce bildirildiği şekilde hazırlandı (İnce vd., 2014). Bu amaçla kurban edilen deney hayvanlarından alınan karaciğer, böbrek, beyin, kalp, testis ve akciğer doku örnekleri soğuk izotonik tuzlu su tampon solüsyonu ile yıkandı. Dokular dış dokularından temizlenerek soğutulmuş 0.15 M Tris-HCl tamponu (pH 7.4) ile durulandı. Dokuların %10, w/v homojenatlarının hazırlanmasında Tris-HCl tamponu kullanıldı. Homojenize edilen doku örnekleri santrifüj edildi (10 dakika, 3500 rpm, 4 °C) ve ölçüm işlemine kadar -20 °C'de saklandı. MDA, GSH, antioksidan enzim aktiviteleri (CAT ve SOD) dahil olmak üzere lipid peroksidasyon parametrelerinin ölçümü doku homojenatları ve eritrositlerde gerçekleştirildi.

3.5. Malondialdehit (MDA) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Çalışmada lipid peroksidasyon belirtici olarak malondialdehit (MDA) seviyesi kullanıldı. Tam kan numuneleri (Draper ve Hardley, 1990) ve doku homojenatları (Ohkawa vd., 1979) için MDA seviyelerinin belirlenmesi daha önce bildirildiği gibi gerçekleştirildi. Bu yöntemler MDA ve tiyobarbitürik asit reaksiyonunun sonucunda oluşan rengin fotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır. MDA seviyesi, MDA-tiyobarbitürik asit kompleksinin (dokuda nmol/g ve kanda nmol/ml) absorpsiyon katsayısı aracılığıyla ve 532 nm'de çift ışınlı UV-spektrofotometre (Shimadzu 1601, Tokyo, Japonya) ile belirlendi.

Glutasyon (GSH), tüketimi oksidatif stres tarafından indüklenebilen, reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan savunma sisteminin bileşenidir (Guerin vd., 2001). GSH konsantrasyonu, kan ve doku numunelerinde daha önce tarif edildiği gibi belirlendi (Beutler vd., 1963). Bu amaçla, 0,2 ml örnek ve damıtılmış su (1,8 ml) ile

karıştırıldı ve 3 ml çöktürme solüsyonu (1,67 g HPO_3 , 30 g NaCl, 0,2 g EDTA, 100 ml distile suda) örneğe eklendi. Yaklaşık 5 dakika sonra bu numune süzüldü (Whatman No. 42). Daha sonra elde edilen süzüntüden 2ml başka bir tüpte 1 ml hacminde 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) ve 8 ml hacminde 0.3 M Na_2HPO_4 ile karıştırıldı. 412 nm'de optik yoğunluğun spektrofotometrik olarak belirlendi (Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometre, Tokyo, Japonya). Elde edilen sonuçlar nmol/g ıslak doku ve nmol/ml kan olarak ifade edildi.

3.6. Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında antioksidan enzimler olan CAT ve SOD rol oynar (Guerin vd., 2001; Acaröz vd., 2018). SOD aktivitesi doku homojenatı ve eritrosit lizatında daha önce tarif edildiği gibi belirlendi (Sun vd., 1988). Bu yöntem, süperoksitin bir göstergesi olarak ksantin ve ksantin oksidaz arasındaki reaksiyonun sonucu olarak nitroblue tetrazolyumun (NBT) mavi formazon'a indirgenmesine dayanmaktadır. SOD aktivitesinin belirlenmesi 560 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi ve dokuda g protein başına U ve eritrositte U/gHb ve olarak ifade edildi. CAT aktivitesinin doku homojenatı ve eritrosit lizatında belirlenmesi Aebi (1974) ve Luck (1955) tarafından bildirilen yöntemlere göre gerçekleştirildi. Bu yöntemler prensip olarak H_2O_2 'nin katalaz enzimi ile oksijen ve suya ayrışması yoluyla çalışır. H_2O_2 , 240 nm'de ultraviyole spektrumunda maksimum absorpsiyon gösterir. İndirgeme hızı, 240 nm'de, oda sıcaklığında 45 saniye boyunca ölçüldü ve dokuda k/ μg protein ve eritrositte k/gHb (k; nmol/dk) olarak ifade edildi. Eritrositlerdeki hemoglobin ve dokulardaki protein içeriği spektrofotometrik olarak sırasıyla Drabkin ve Austin (1935) ve Lowry vd (1951) göre belirlendi.

3.7. Histopatolojik Değerlendirme

Wistar Albino ratlara ait dokuların (beyin, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer, kalp) sabitlenmesi %10'luk formaldehit solüsyonu ile gerçekleştirildi. Akabinde doku örnekleri küçültülerek doku takip kasetlerine alındı. Doku örnekleri yıkanma işleminden sonra 50, 70, 80, 96'lık ve absöüt alkol ve ksilol, ksilollü parafin daha sonrasında 58 °C'de erimiş parafinde 2'şer saat süre ile bekletildi ve sonrasında parafinle bloklandı. Parafin blokları mikrotom (Leica, RM 2245) ile 5 mikron kalınlığında kesildi ve

örnekler su banyosu (Leica, HI 1210) üzerinden lamellere aktarıldı. Etüvde kurutma işlemi gerçekleştirildikten sonra histopatolojik yöntemlerde analiz edildi. Kesitlerin hepsi hematoksilin-eosin boyama yöntemi (HE) ile boyandı (Luna, 1968). Boyamaları yapılan örneklerin incelemesi ışık mikroskopunda (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japonya) gerçekleştirilerek örneklerin mikroskopik resimleri çekildi (Nikon DS Fİ3, mikroskopik dijital kamera sistem, Tokyo, Japonya).

3.8. Moleküler Analizler

Alınan karaciğer ve böbrek örneklerinde IFN- γ , TNF- α ve NFkB ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Doku örnekleri RNAlater Solusyonuna (Thermo Fisher Scientific, USA) alınarak -80°C’de uygulama gerçekleştirilene kadar saklandı. RNA izolasyonu için Gene Jet RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika) kullanıldı ve izole edilen RNA’ların kalite ve miktarı A260/A280 UV dalga boylarında Multiskan TM FC Mikroplate Fotometre (Thermo Fisher Scientific, Amerika) cihazında ölçüldü. İzole edilen RNA’lardan DNA uzaklaştırıldı. DNaz I uygulanan RNA’dan kit (RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit Thermo Fisher Scientific, Amerika) yardımıyla cDNA sentez edildi. Deneyde kullanılan primerler için NCBI web sitesinden Rattus norvegicus’a özgü β -aktin, NFkB, TNF- α , ve IFN- γ genlerine ait mRNA dizileri kullanılarak ve Fast PCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar paket programından yararlanıldı. Primer dizileri ve gen bankası numaraları Çizelge 3.1.’de gösterildi. Gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları belirlemek için real-time PCR yapıldı. IFN- γ , TNF- α ve NFkB genlerinin ve housekeeping gen (β -Aktin) ekspresyonu Bio RAD real-time PCR cihazında ölçüldü ve sonuçlarının analizi Bio RAD CFX Manager 3.1 yazılımı ile yapıldı. PCR karışımını hazırlamak için forward ve revers primerler (1 μ l, 10 pmol), SybrGreen karışımı (10 μ l, Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu, (Thermo Fisher Scientific, USA), cDNA (1 μ l) ve su (7 μ l) eklenerek toplam hacim 20 μ l’ye tamamlandı. Amplifikasyon eğrilerine ait olan döngü eşiği (Ct) parametrelerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri daha önce bildirilen method ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Endojen kontrol geni olarak β -aktin geni kullanıldı ve diğer genlerin ekspresyon seviyeleri için her bir örneğe ait β -aktin gen düzeyine göre normalizasyon uygulandı.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Oligonükleotit Dizisi		Gen Bankası No
β -Aktin	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	
NF κ B	F	TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC	NM_199267.2
	R	GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC	
TNF- α	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	NM_012675.3
	R	GGATGAACACGCCAGTCGCC	
IFN- γ	F	AAGACAACCAGGCCATCAGCA	NM_138880.3
	R	TTCACCTCGAACTTGGCGATGC	

3.9. İstatiksel Analiz

Çalışmada, gruplar arasındaki farklılık ve ortalamalar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Duncan testi ile SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda oluşturulan deneme ve kontrol gurubundan alınan kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, testis doku ve kan örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktivileri tayin edilmiştir. Araştırma süresi sonunda dokulardaki MDA, GSH, SOD ve CAT'a ait bulguların istatistiksel değerleri ve karşılaştırması tablo ve grafiklerle aşağıda sunulmuştur.



4.1. Kanda ve Dokularda Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Pozitif kontrol gruplarının MDA düzeylerinde betanin uygulanan gruplara kıyasla artış görüldü. Bununla birlikte farklı dozlarda betanin uygulaması MDA düzeylerini NaF grubuna kıyasla kontrole yaklaştırdığı belirlendi. MDA seviyelerinin, doku ve kandaki değişimi Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Kanda ve dokularda MDA düzeyleri

MDA	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/gdoku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	18,35±7,61 ^c	16,62±6,05 ^b	11,02±3,14 ^c	3,36±1,2 ^c	5,5±2,33 ^c	7,82±2,4 ^b	2,62±0,99 ^b
SF	34,47±8,83 ^a	25,29±7,52 ^a	20,44±5,39 ^a	11,21±3,38 ^a	15,54±6,36 ^a	16,42±5,52 ^a	6,55±2,6 ^a
SF + Betanin 25	28,91±11,31 ^{ab}	21,86±6,8 ^{ab}	19,04±5,14 ^a	8,27±2,23 ^b	11,61±3,91 ^{ab}	14,76±6 ^a	5,22±1,79 ^a
SF + Betanin 50	25,06±5,78 ^{bc}	19,01±5,05 ^{ab}	16,37±4,22 ^{ab}	5,84±2,19 ^{bc}	10,28±3,69 ^b	13,15±3,41 ^a	4,62±1,67 ^{ab}
SF + Betanin 100	23,14±5,68 ^{bc}	17,68±5,93 ^b	13,47±2,5 ^{bc}	4,53±1,89 ^c	8,67±2,18 ^{bc}	11,99±4,23 ^{ab}	3,14±1,34 ^b

4.2. Kanda ve Dokularda GSH düzeyi

Betanin uygulanan gruplarda GSH değerlerinin kan, beyin, karaciğer, akciğer, böbrek, kalp ve testis dokularında kontrol grubuna kıyasla yükseldiği gözlemlendi. Sadece NaF verilen pozitif kontrol grubun GSH düzeyleri negatif kontrol gruplarına göre düştüğü belirlendi. GSH düzeylerinin değişimi Çizelge 4.2’de ifade edildi.

Çizelge 4.2. Kanda ve dokularda GSH düzeyleri

GSH	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	83,72±14,53a	19,81±6,56a	26,05±8,1a	7,99±2,97a	15,39±2,39a	13,25±3,12a	5,96±1,69a
SF	38,69±6,5c	9,78±2c	11,68±3,23c	2,28±0,98c	10,09±3,16b	3,66±1,42c	2,34±1c
SF + Betanin 25	44,08±7,59bc	11,74±3,42bc	16,68±5,69bc	3,14±1,14c	12,07±4,92ab	5,38±1,98bc	2,82±0,86c
SF + Betanin 50	55,97±14,35b	15,2±3,48ab	18,53±6,76bc	4,1±1,72bc	12,84±2,65ab	6,42±2,57b	3,77±0,63bc
SF + Betanin 100	70,97±17,13a	16,87±5,83ab	22,01±6,81ab	5,39±1,9b	14,71±6,05ab	7,67±2,44b	4,94±2,05ab

4.3. Eritrositlerde ve Dokularda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktiviteleri

NaF uygulaması eritrosit ve dokularda ve SOD enzim aktivitesinde negatif kontrol ve betanin uygulanan gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu. Betanin uygulaması ile SOD aktivitesinde artışlar belirlendi. SOD aktivitelerinin tüm dokulardaki değişimi Çizelge 4.3'te ifade edildi.

Çizelge 4.3. Eritrositlerde ve dokularda SOD aktiviteleri

SOD	Eritrosit (U/gHb)	Böbrek (U/μg protein)	Karaciğer (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Akciğer (U/μg protein)	Testis (U/μg protein)
Kontrol	105,33±39,39 ^a	21,79±4,5 ^a	17,26±5,07 ^a	12,52±5,39 ^a	13,96±3,67 ^a	15,25±6,48 ^a	10,67±2,26 ^a
SF	53,92±4,61 ^c	12,6±5,24 ^c	7,51±1,69 ^c	7,2±2,73 ^b	6,95±2,25 ^c	6,91±2,27 ^c	6,39±2,23 ^b
SF + Betanin 25	63,6±16,46 ^{bc}	13,05±4,18 ^{bc}	10,78±3,98 ^{bc}	7,72±1,63 ^b	8,91±2,34 ^{bc}	7,34±2,69 ^c	8,49±1,86 ^{ab}
SF + Betanin 50	82,79±34,26 ^{abc}	14,94±5,22 ^{bc}	12,31±4,29 ^{bc}	8,01±1,6 ^b	10,39±2,12 ^{abc}	9,47±2,51 ^{bc}	8,81±1,98 ^{ab}
SF + Betanin 100	92,94±25,02 ^{ab}	19,35±7,99 ^{ab}	14,61±5,41 ^{ab}	9,54±2,97 ^{ab}	11,81±4,55 ^{ab}	13,46±5,09 ^{ab}	9,44±2,92 ^a

4.4. Eritrositlerde ve Dokularda Katalaz (CAT) Aktiviteleri

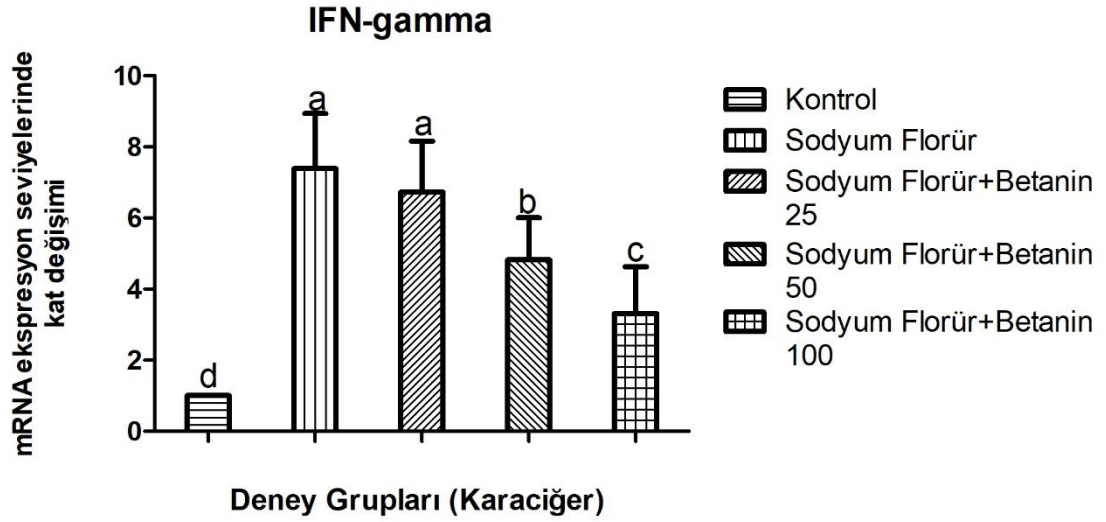
NaF uygulaması eritrosit ve dokularda CAT enzim aktivitesinde düşüşe neden oldu. Bununla birlikte, betanin uygulaması ile enzim aktivitesinin olumlu yönde yükseldiği belirlendi. Eritrosit ve dokulardaki CAT aktivite değerleri Çizelge 4.4’de ifade edildi.

Çizelge 4.4. Eritrositlerde ve dokularda CAT aktiviteleri

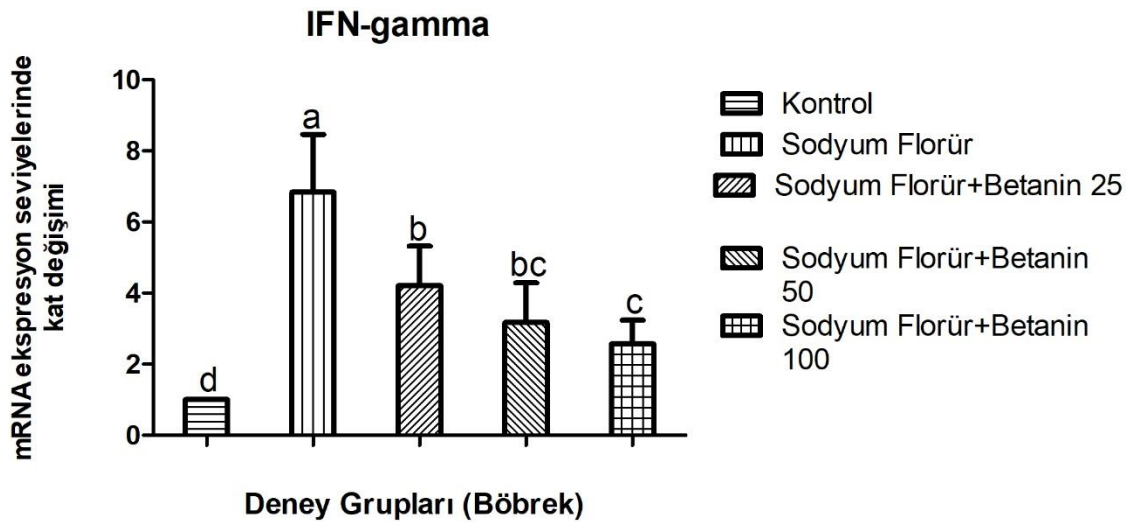
Katalaz	Eritrosit (k/gHb)	Böbrek (k/μg protein)	Karaciğer (k/μg protein)	Kalp (k/μg protein)	Beyin (k/μg protein)	Akciğer (k/μg protein)	Testis (k/μg protein)
Kontrol	94,93±36,84 ^a	26,61±9,68 ^a	19,45±6,43 ^a	11,69±3,35 ^a	10,21±3,46 ^a	15,87±5,04 ^a	8,16±2,71 ^a
SF	34,1±10,39 ^c	7,94±2,61 ^c	8,7±3,59 ^c	7,15±2,27 ^b	4,02±1,26 ^c	6,6±2,3 ^c	3,67±1,46 ^c
SF + Betanin 25	53,69±18,69 ^{bc}	10,24±4 ^c	10,95±3,6 ^{bc}	7,36±2,12 ^b	6,79±1,71 ^b	8,58±3,56 ^{bc}	4,11±1,66 ^c
SF + Betanin 50	66,17±22,13 ^b	12,31±4,88 ^{bc}	13,67±4,56 ^{bc}	7,97±1,65 ^b	6,77±1,99 ^b	9,68±3,67 ^{bc}	5,38±1,99 ^{bc}
SF + Betanin 100	73,54±19,96 ^{ab}	17,3±6,81 ^b	15,87±4,52 ^{ab}	9,25±3,79 ^{ab}	8,75±2,73 ^{ab}	11,21±4,33 ^b	6,8±2,18 ^{ab}

4.5. Karaciğer ve Böbrekte Gen Ekspresyonları

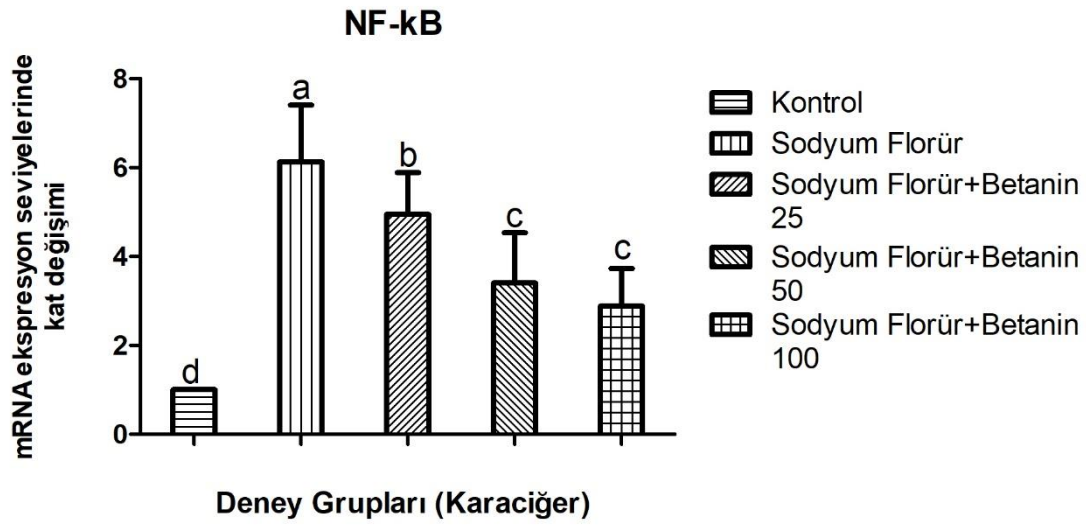
Ratlardaki karaciğer ve böbrek dokularında NaF ve betanin uygulamasının IFN- γ , TNF- α ve NFkB gen ekspresyon düzeyleri üstündeki etkisi değerlendirildi. Her iki dokudaki gen üzerine NaF olumsuz etki gösterirken, artan dozlardaki betanin anlamlı derecede kontrole yaklaştırdı (Şekil 4.1-Şekil 4.6).



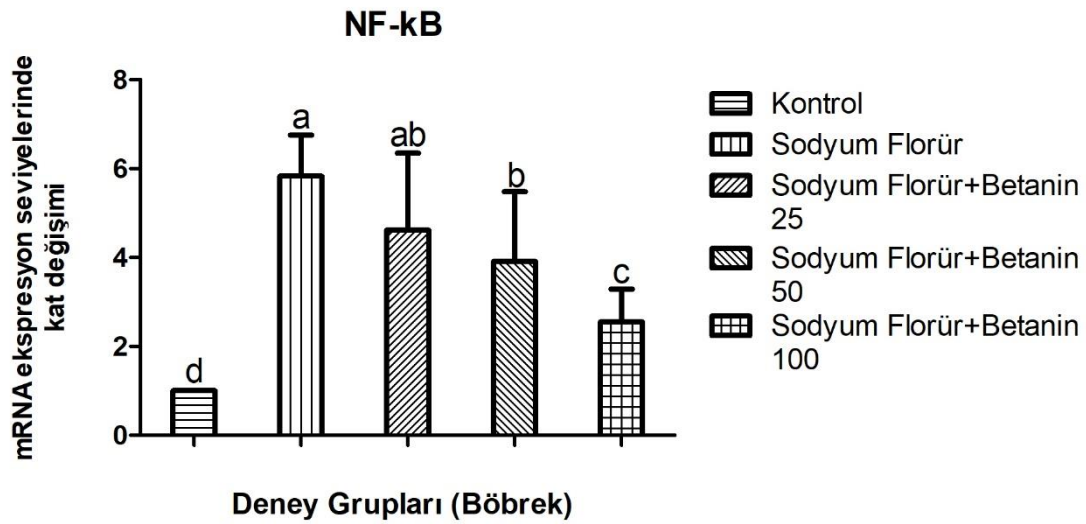
Şekil 4.1. Uygulamaların karaciğer dokusu IFN-gamma mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel istatistiksel farklılıklar gösterir ($p < 0.05$).



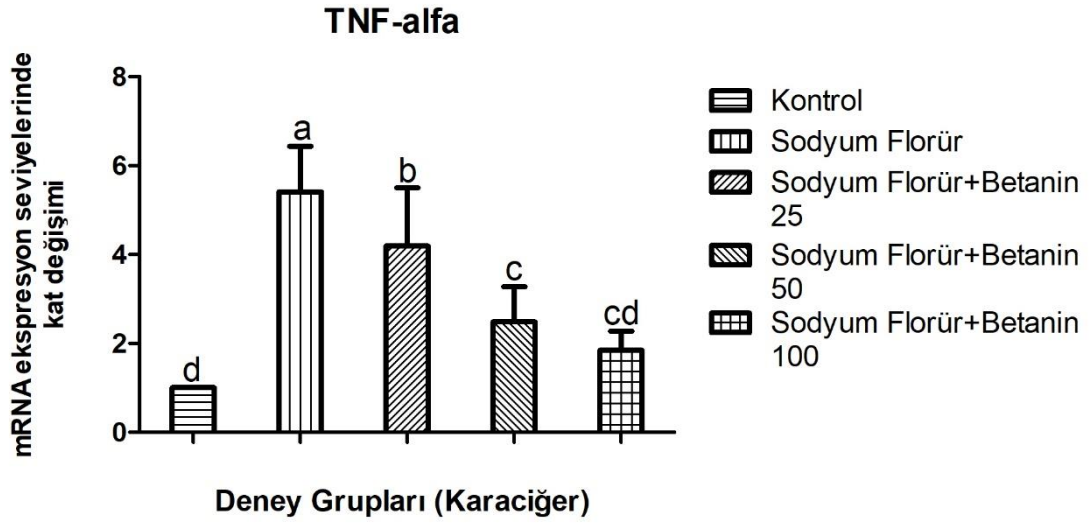
Şekil 4.2. Uygulamaların böbrek dokusu IFN-gamma mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel istatistiksel farklılıklar gösterir ($p < 0.05$).



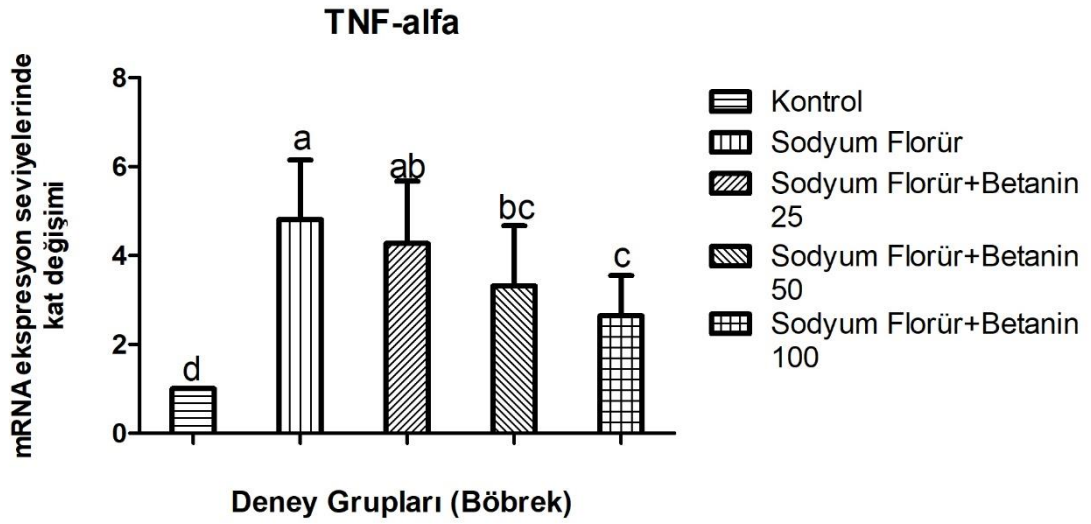
Şekil 4.3. Uygulamaların karaciğer dokusu NF-kB mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel farklılıklar gösterir ($p<0.05$).



Şekil 4.4. Uygulamaların böbrek dokusu NF-kB mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel önemli farklılıkla gösterir ($p<0.05$).



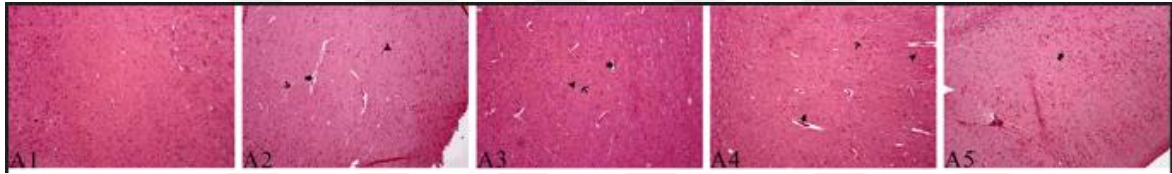
Şekil 4.5. Uygulamaların karaciğer dokusu TNF-alfa mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel önemli farklılıklar gösterir ($p<0.05$).



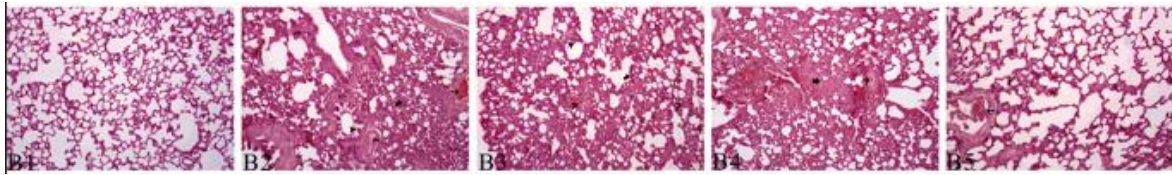
Şekil 4.6. Uygulamaların böbrek dokusu TNF-alfa mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. (a, b, c, d) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel önemli farklılıklar gösterir ($p<0.05$).

4. 6. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemelerin sonuçlarına göre sodyum florür gruplarına ait beyinde damarlarda hiperemi, nöronlarda vakuolizasyon oluşumları, fokal glia hücre infiltrasyonu alanları görüldü. Akciğerde interalveoler septal dokuda kalınlaşma, damarlarda hiperemi, bronşiyol lümeninde ödem oluşumu, bronşiyal epitel hücrelerinde hiperplazik görünüm tespit edildi. Kalp dokusunda miyokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu alanları, miyokardda hafif hyalin dejenerasyonu görüldü. Karaciğerde periportal bölgelerde hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, Kupffer hücre sayısında artış görüldü. Böbrek dokusunda glomeruluslarda Bowman boşluğunda genişleme, tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları görüldü. Testis dokusunda TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, intersitisyel bölgede hyalinizasyon oluşumu görüldü.



Resim 4.1. Beyin dokularının histopatolojik görünümleri. Kalın ok (damarlarda hiperemi), ince ok (nöronlarda vakuolizasyon oluşumları), ok başı (fokal glia hücre infiltrasyonu alanları)'ı göstermektedir.



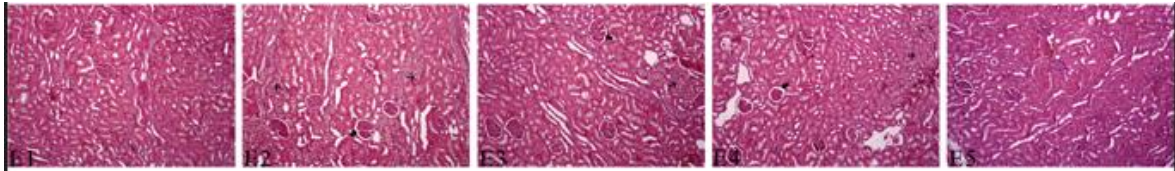
Resim 4.2. Akciğer dokularının histopatolojik görünümleri. Kalın ok (interalveoler septal dokuda kalınlaşma), ince ok (damarlarda hiperemi), kıvrımlı ok (bronşiyol lümeninde ödem oluşumu), ok başı (bronşiyal epitel hücrelerinde hiperplazik görünüm)'ü göstermektedir.



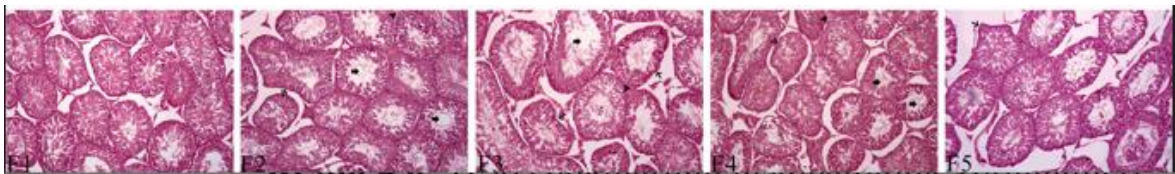
Resim 4.3. Kalp dokularının histopatolojik görünümü. Kalın ok (miyokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu alanları), Ok (miyokardda hafif hyalin dejenerasyonu)’u göstermektedir.



Resim 4.4. Karaciğer dokularının histopatolojik görünümü. Kalın ok (periportal bölgelerde hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları), İnce ok (Kupffer hücre sayısında artış)’ı göstermektedir.



Resim 4.5. Böbrek dokularının histopatolojik görünümü. Kalın ok (glomeruluslarda bowman boşluğunda genişleme), ince ok (tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları)’ı göstermektedir.



Resim 4.6. Testis dokularının histopatolojik görünümü. Kalın ok (TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma), İnce ok (düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları), Ok başı (intersitisyel bölgede hyalinizasyon oluşumu)’nu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Ray vd. (2020) yılında yaptıkları çalışmada ratlarda sodyum florür (NaF) tarafından indüklenen oksidatif hasarda ve üreme toksisite azalmasında *Camellia (C.) Sinensis*'in etkisini incelemişlerdir. 24 yetişkin erkek Wistar rat her grupta 6 rat olacak şekilde 4 gruba ayrılmış. Grup 1 (kontrol grubu)'e günlük olarak distile su (1 mL/100 g vücut ağırlığı) oral yolla verilmiş, grup 2'ye 100 ppm sodyum florürlü içme suyu verilmiş, grup 3'e *C. sinensis* 100 mg/kg dozunda gavaj ile verilmiş ve grup 4'e 100 ppm sodyum florür ve 100 mg/kg vücut ağırlığında *C. sinensis* içeren içme suyu verilmiştir. Uygulama sonunda MDA üretiminde oldukça önemli bir artış olurken ($P<0.05$), SOD, CAT aktiviteleri ile GSH seviyesinde ise önemli bir düşüş ($P<0.05$) meydana gelmiştir.

Nabavi vd., (2012) yılında yapmış oldukları çalışmada quercetin'in NaF kaynaklı oksidatif strese karşı *in vivo* olarak Wistar ratlarda nöroprotektif etkilerini değerlendirmişlerdir. Uygulama sonucunda quercetin uygulanan ratlarda MDA'da azalma gerçekleşti. Ayrıca, SOD ve katalaz aktiviteleri kontrole yaklaşmış olarak belirlendi ($p>0.05$).

Kiran Kumar vd., (2018) yılında yaptıkları çalışmada ratların beyin dokusunda NaF ile indüklenen oksidatif strese karşı kurkuminin etkilerini incelemişlerdir. Ratları sırasıyla, kontrol grubu, NaF (20 mg/kg) uygulanan grup, NaF + Kurkumin (20 mg/kg) uygulanan grup ve Kurkumin (20 mg/kg) uygulanan gruplara ayrılmıştır. 60 günlük uygulama sonucunda NaF uygulamasının LPO içeriğini önemli ölçüde artırdığını ancak kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarının beyindeki GSH, SOD, GPx ve CAT aktivitelerini azaltmış olduğu belirlendi. NaF'a maruz bırakılmış olan bu ratlara kurkumin uygulamasından sonra GSH, SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin normal düzeye döndüğü belirlenmiştir. Böylece, kurkuminin uygulamasının rat beyin dokusunda NaF'nin neden olduğu oksidatif hasarı önleme potansiyeline sahip olduğu ve kurkumin, beyindeki nörodejenerasyona karşı etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Yu vd., (2006) yılında gerçekleştirdikleri çalışmada selenyum ve çinkonun florür tarafından indüklenen oksidatif strese, rat böbreklerinde apoptoz ve hücre döngüsünde etkilerini incelemişlerdir. Wistar ratları 4 grup ve her grupta 8 hayvan (4 erkek ve 4 dişi olacak şekilde) sodyum florür (50 mg/L NaF) içeren damıtılmış su verilmiş ve altı ay süresince farklı dozlarda selenyum-çinko preparasyonu uygulanmıştır. Birinci grup

kontrol, II. grup 50 mg/L NaF, III. grup düşük doz selenyum-çinko (0,1 mg/kg Na₂SeO₃ ve 14,8 mg/kg ZnSO₄·7H₂O) ile 50 mg/L NaF ve IV. gruba yüksek doz selenyum-çinko (0,2 mg/kg Na₂SeO₃ ve 29,6 mg/kg ZnSO₄·7H₂O) ile 50 mg/L NaF uygulanmıştır. Sonuçlarda ise 50 mg/L dozunda uygulanan NaF, idrarda florür atılımını artırmış, GSH, GPx SOD aktivitesini inhibe etmiş, böbrek GSH düzeyinde düşüş ve MDA düzeyinde artış belirlemişlerdir.

Dec vd., (2020) yılında yaptıkları çalışmada doğum öncesi ve sonrasında NaF (50 mg/L)'e maruz kalan ratların beyinlerinde, kazalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon aktivitesini incelemişlerdir. Florürlere maruz kalan ratların beyincik ve hipokampusta NOX4 aktivitesinde bir artış, prefrontal korteks ve hipokampustaki aktivitesinde bir azalma ve hipokampusta NOX4 ekspresyonunda artış belirlemişler. GSH miktarında, SOD ve CAT aktiviterinde verilerinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. NOX4, beyin fonksiyonunun bozulmasına yol açan kan-beyin bariyeri hasarına, mikrogial aktivasyona ve nöron kaybına neden olmuştur. Florür kaynaklı oksidatif stres, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olmuş ve bu da proinflatuar sitokinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırmıştır.

Banala ve Karnati, (2015) yılında yavru Wistar ratlarda NaF'nin etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, gebeliğin birinci gününden yavruların 30. gününe kadar 20 ppm NaF uygulamışlardır. Gelişmekte olan rat yavrularından düzenli aralıklarla (14., 21., 30. gün) serum alarak A vitamini seviyeleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile analiz edilmişlerdir. Sonuçlar, ratların vücut ağırlıkları ve SOD düzeyinde düşüş meydana gelmiştir. Kontrol örneklerine kıyasla florür ile indüklenen örneklerde A vitamininde önemli bir düşüş ($p < 0.001$) belirlenmiş, bu da azalan vitamin A seviyelerinin florür kaynaklı toksisite çalışmalarında bir belirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Balaha vd., (2021) yılında yaptıkları çalışmada ratlarda fraxetinin (fraxetin, 7,8-dihidroksi-6-metoksi kumarin) florür kaynaklı kronik pankreatiti önleme potansiyelini değerlendirmişlerdir. Dokuz haftalık erkek Wistar ratlarda, kronik pankreatiti indüklemek için 60 gün boyunca 500 ppm NaF içeren damıtılmış su verilmiş ve kronik pankreatit gelişimini önlemek için oral fraxetin (20, 40 ve 80 mg/kg/gün) eş zamanlı olarak verilmiştir. Fraxetin doza bağlı bir şekilde NaF'nin neden olduğu kronik pankreatiti hafifletmiş, (vücut ağırlığını ve kilo alma oranını artırmış) yüksek serum amilaz ve lipaz

aktivitelerini düşürmüş, pankreatik IL-6, TNF- α , MDA, kaspaz-3 ve hidroksiprolin seviyeleri azalmıştır. Pankreas CAT ve SOD aktiviteleri, GSH seviyelerinin arttığını ve bu verilere bakıldığında, fraxetinin endemik bölgelerde florür kaynaklı kronik pankreatitin önlenmesi için umut verici bir ajan olabileceği ifade edilmiştir.

Shashi ve Thakur (2022) yaptıkları bir çalışmada NaF'ün dalakta toksik etkilerini biyokimyasal ve moleküler düzeyde değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Wistar albino ratları rastgele 3 gruba ayırmış, kontrol grubundaki ratlara 40 gün boyunca oral yolla 1 ml deiyonize su verilmiş, Grup II ve III'e 300 ve 600 mg NaF/kg uygulanmıştır. Florür uygulanan ratların dalağında GSH içeriği önemli ölçüde azalmış, ($P < 0.0001$) MDA seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ($P < 0.0001$). Antioksidan enzimlerin aktivitelerini; Cu/Zn SOD, GPx ve CAT, kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($P < 0.0001$). Flor intoksikasyonunun oksidatif stresin gelişmesine ve hücrel metabolizmaya zarar vererek serbest radikal süpürücü yeteneklerinin azalmasına ve bunun yanında MDA seviyesinin artmasına, antioksidan genlerin ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Pal ve Mukhopadhyay (2021) yılında diş ve kemik gelişiminde florüre aşırı maruz kalınmanın sonuçlarına yönelik yaptıkları çalışmada, 4 gruba ayırdıkları 24 yetişkin Wistar ratta farklı dozlarda NaF'nin 30 gün boyunca uygulamanın etkilerini incelemişlerdir. NaF dozu arttıkça testiküler yapıda bozulma kaydedilmiştir. Kontrol grubundaki ratlardan alınan histolojik örnekler, testis parankimi içerisinde yuvarlak ve/veya oval seminifer tübüllerin kompakt yönelimini ve seminifer tübülleri örten sağlam bazal membrana rastlamışlardır. Her bir seminifer tübül içindeki germinal tabakanın ve spermatogonyal hücrelerin gelişim aşamalarında olduğu ve seminifer tübüllerin interstisyel boşluğunun sağlam Leydig hücreleri tarafından işgal edildiği görülmüştür. Ratlarda deorganize seminifer tübüller, bozuk bazal membran ve spermatogonyal hücre gelişim evrelerinin olmaması gibi histopatolojik değişiklikler kaydedilmiştir. Parçalanmış Leydig hücreleri ise florür toksisitesinin etkisini göstermiştir. En yüksek dozda uygulanan florür grubunda bu değişikliklerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Alhusaini vd., (2018) yılında yaptıkları çalışmada, NaF'ün neden olduğu akut böbrek hasarına karşı N-asetilsistein (NAC) ve/veya timokinonun (THQ) koruyucu etkilerini incelemişler. Hayvanları kontrol, 10mg/kg NaF (i.p.), 10mg THQ/kg, 20mg NAC/kg ve

THQ ve NAC kombinasyonu olarak 5 gruba ayırdıkları ratlar üzerinde çalışmışlar ve aldıkları sonuçlar ise; NaF'nin glomerüler korpüskül ve distal kıvrımlı tübüllerde vakuolizasyona ve fokal nekroza neden olduğunu ortaya koymuşlardır. THQ ve NAC uygulamasının, renal GSH ve SOD'da artışa neden olduğu ve NaF'nin neden olduğu nefrotoksisiteyi önlediğini belirlemişlerdir. NAC ve/veya THQ ile tedavi edilen gruplardan alınan böbrek kesitlerinde, normal glomeruluslu renal korteks görülmüştür..

Chaithra vd., (2020)'nin yılında gerçekleştirdikleri bu çalışmada, NaF ve florür (F) ile kontamine yeraltı suyunun erkek ratlarda erkek üreme sistemi üzerine toksik etkilerini araştırmışlardır. Yetişkin erkek ratlar, 52 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda NaF- (1 mg, 5 mg ve 10 mg/kg) ve F (5 mg/ml) ile kontamine yeraltı suyunu oral yoldan vermişlerdir. Bunun sonucunda, toplam sperm sayısında, sperm hareketliliğinde, serum testosteron konsantrasyonunda, testis 3 β -HSDH aktivitelerinde önemli düşüslere neden olmuştur. Çekirdekleri belirgin olan seminifer tübüller arasında polihedral Leydig hücreleri gözlemlenmiştir.

Caglayan vd., (2021) yılında gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, yüksek doz florür alımının, karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki toksik etkilerin üstesinden gelmek için doğal antioksidanları takviye olarak kullanmışlardır. Wistar albino ratlarında hesperidin'in (HSP) sodyum florür (NaF) ile indüklenen hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye karşı iyileştirici etkilerini değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda hepatorenal dokularda NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β seviyeleri değerlendirilmiştir; NaF uygulanan ratların hepatorenal dokularında NF- κ B, IL-1 β ve TNF- α seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p < 0.05$) artarken, HSP ile birlikte uygulanan ratlarda ise NF-KB, IL-1 β ve TNF- α , her iki dokuda da NaF uygulanan ratlara kıyasla açıkça azaldığını gözlemlemişlerdir ($p < 0.05$).

Zhang vd., (2011) yılında yaptıkları çalışmada rat hipokampusunda içme suyu florozunun nörotoksisitesini araştırmışlardır. Yeni sütten kesilen erkek Sprague Dawley (SD) ratlarına 9 ay boyunca 15, 30, 60 mg/L NaF solüsyonu ve musluk suyu verilmiştir. Uygulama sonrasında, CA3 bölgesindeki NF- κ B p65 ekspresyon seviyesi üzerinde florürün etkisi incelenmiştir. Işık mikroskobu altında immünohistokimyasal boyamada NF- κ B p65 pozitif hücrelerin sitoplazmada yer alan kahverengi partiküller görmüşlerdir. NF- κ B p65 alt birimi çekirdeğe hareket ettiğinde, pozitif hücreler çekirdek lekeli kahverengi veya kahverengi sarı parçacık birikimi olarak tespti edilmiştir.

Kuang vd., (2017) yılında uyguladıkları araştırmada, NaF'nin farelerin dalak gelişimi üzerindeki toksik etkilerini in vivo değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Toplam 240 ICR faresi, 42 gün boyunca kontrol grubunda intragastrik distile su ve deney gruplarında 12, 24, 48 mg/kg NaF solüsyonu verilerek dört gruba eşit olarak ayırmışlardır. Sonuçlar, 12 mg/kg ve üzerindeki NaF'nin, beyaz ve kırmızı pulpa histopatolojik büyüme indeksini ve lenfositleri düşürmesi ve hücre yüzdelerini düşürmesi ile karakterize edilen dalak gelişimi üzerinde toksik etkilere neden olduğunu göstermiştir. Kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında, T hücreleri ve B hücrelerinin yanı sıra IgA, IgG ve IgM içeriklerinin azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda interlökin-2 (IL-2), TGF- β , TNF- α ve IFN- γ protein ekspresyon seviyeleri, NaF uygulanan üç grupta önemli ölçüde azalmış ($p < 0.05$ veya $P < 0.01$) ve interlökin-10 (IL-10) protein ekspresyon seviyeleri ise önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$ ve $P < 0.01$).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmada sodyum florürün kan, beyin, kalp, karaciğer, akciğer, testis ve böbrek dokusu üzerinde oluşturmuş olduğu oksidatif stres kaynaklı doku hasarına karşı uygulanan betaninin koruyucu etkileri histolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak incelendi.

Çalışmamız doğrultusunda, 21 gün boyunca içme suyu ile 100 ppm dozda sodyum florür (NaF) ve betanin gastrik gavaj ile 25; 50 ve 100 mg/kg dozlarında ratlara verildi. NaF uygulaması antioksidan sistemi baskıladığı ve antioksidan enzim aktivitesinde (CAT ve SOD) azalmaya yol açtığı belirlendi.

NaF uygulaması ratların dokularında MDA seviyelerinde artışa neden oldu. Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA'nın artışı antioksidan savunmanın aşırı oluşan serbest radikalleri önleyememesine ve doku hasarına neden olmaktadır. NaF uygulaması ile antioksidan savunma mekanizmasından GSH düzeyinde ve enzimatik aktivitede azalma nedeniyle antioksidan kapasite de azalmıştır.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, NaF uygulamasıyla dokularda ve gen ekspresyonlarında oluşan değişimlerde oksidatif stresin rol aldığını ve betanin uygulamasıyla bu hasarların azalttığı ifade edilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Zhu, K. (2018). The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and chemical toxicology*, 118, 745-752.
- Adamek, E., Pawłowska-Góral, K., Bober, K. (2005). In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin*, 51(2): 69-8.
- Aebi, H. (1974). Catalase in vitro. In: Bergmeyer, U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York and London, 673-677.
- Ahmadian, E., Khosroushahi, A.Y., Eghbal, M.A., Eftekhari, A. (2018). Betanin reduces organophosphate induced cytotoxicity in primary hepatocyte via an anti-oxidative and mitochondrial dependent pathway. *Pestic Biochem Phys*, 144: 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.009>
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., de Bellis, L., Blando, F. (2015). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 4(2): 269-280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Albasher, G., Almeer, R., Al-Otibi, F.O., Al-Kubaisi, N., Mahmoud, A.M. (2019). Ameliorative effect of *Beta vulgaris* root extract on chlorpyrifos-induced oxidative stress, inflammation and liver injury in rats. *Biomolecules*, 9(7): 261.
- Alhusaini, A.M., Faddah, L.M., el Orabi, N.F., Hasan, I.H. (2018). Role of Some Natural Antioxidants in the Modulation of Some Proteins Expressions against Sodium Fluoride-Induced Renal Injury. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2018/5614803>
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Atkins, P.W., Overton, T.L., Rourke, J.P., Weller, M.T., Armstrong, F.A. (2010). The Group 17 Elements In "Inorganic Chemistry", Ed, PW Atkins, TL Overton, JP Rourke, MT Weller, FA Armstrong, 5th ed, Publisher Great Britain by Oxford University Press, W.H. Freeman and Company, 41 Madison Avenue, New York.

- Atmaca, N., Atmaca, H.T., Kanici, A., Anteplioglu, T. (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 70: 191-197.
- Avvannavar, S.M. (2007). J. Fawell, K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell and Y. Magara, Fluoride in drinking-water, WHO, IWA Publishers, London (2006) ISBN: 1900222965, 141 pp. *Science of The Total Environment*, 382(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.03.038>
- Azeredo, H.M.C., Santos, A.N., Souza, A.C.R., Mendes, K.C.B., Andrade, M.I.R. (2007). Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract. *Am J Food Technol*, 2(4): 307-312. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.307.312>
- Bai, C., Chen, T., Cui, Y., Gong, T., Peng, X., Cui, H.M. (2010). Effect of high fluorine on the cell cycle and apoptosis of renal cells in chickens. *Biol Trace Elem Res*, 138(1): 173-180.
- Balaha, M., Ahmed, N., Geddawy, A., Kandeel, S. (2021). Fraxetin prevented sodium fluoride-induced chronic pancreatitis in rats: Role of anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic and anti-apoptotic activities. *Int Immunopharmacology*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107372>
- Banala, R.R., Karnati, P.R. (2015). Vitamin A deficiency: An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. *Int J Dev Neuroscience*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.08.010>
- Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*, 77(5): 658-666.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., del Razo, L.M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem-Biol Interact*, 188(2): 319-333. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61: 882–888.
- Caglayan, C., Kandemir, F.M., Darendelioğlu, E., Küçükler, S., Ayna, A. (2021). Hesperidin protects liver and kidney against sodium fluoride-induced toxicity through anti-apoptotic and anti-autophagic mechanisms. *Life Sci*, 281: 119730. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119730>

- Chaithra, B., Sarjan, H.N., Shivabasavaiah. (2020). A Comparative Analysis of Fluoride-Contaminated Groundwater and Sodium Fluoride-Induced Reproductive Toxicity and Its Reversibility in Male Rats. *Biol Trace Elem Res*, 197(2): 507-521. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01994-y>
- Carreón-Hidalgo, J.P., Franco-Vásquez, D.C., Gómez-Linton, D.R., Pérez-Flores, L.J. (2022). Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. *Food Res Int*, 151: 110821.
- Cao, A., Guo, M., Yan, D., Mao, L., Wang, Q., Li, Y., Duan, X., Wang, P. (2014). Evaluation of sulfuryl fluoride as a soil fumigant in China. *Pest Manag Sci*, 70(2): 219-227. <https://doi.org/10.1002/ps.3535>
- Cejudo-Bastante, M.J., Hurtado, N., Heredia, F.J. (2015). Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. *Food Res Int*, 71: 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.011>
- Celli, G.B., Brooks, M.S.L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins-A current review. *Food Res Int*, 100: 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.034>
- Chandrajith, R., Diyabalanage, S., Dissanayake, C.B. (2020). Geogenic fluoride and arsenic in groundwater of Sri Lanka and its implications to community health. *Groundw Sustain Dev*, 10: 100359.
- Chawla, H., Parle, M., Sharma, K., Yadav, M. (2016). Beetroot: A Health Promoting Functional Food. *Inventi Rapid : Nutraceuticals*, 1(1): 0976-3872.
- Chhikara, N., Kushwaha, K., Sharma, P., Gat, Y., Panghal, A. (2019). Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chem*, 272: 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.022>
- Collins, T.F.X., Sprando, R.L., Black, T.N., Shackelford, M.E., Olejnik, N., Ames, M. J., Rorie, J.I., Ruggles, D.I. (2001). Developmental toxicity of sodium fluoride measured during multiple generations. *Food Chem Toxicol*, 39(8): 867-876. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00033-3)
- da Silva, L.G.S., Morelli, A.P., Pavan, I.C.B., Tavares, M.R., Pestana, N.F., Rostagno, M.A., Bezerra, R.M.N. (2020). Protective effects of beet (*Beta vulgaris*) leaves extract against oxidative stress in endothelial cells in vitro. *Phytotherapy Res*, 34(6): 1385-1396.

- Das, P. (2021). Fluorine: Risk assessment, environmental, and health hazard. *Hazard Gases*, 153-167.
- de Azeredo, H.M.C., Pereira, A.C., de Souza, A.C.R., Gouveia, S.T., Mendes, K.C.B. (2009). Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots. *Int J Food Sci Technol*, 44(12): 2464-2469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02037.x>
- Dec, K., Łukomska, A., Skonieczna-żydecka, K., Jakubczyk, K., Tarnowski, M., Lubkowska, A., Baranowska-Bosiacka, I., Styburski, D., Skórka-Majewicz, M., Maciejewska, D., Gutowska, I. (2020). Chronic exposure to fluoride affects GSH level and NOX4 expression in rat model of this element of neurotoxicity. *Biomolecules*, 10(3): 422. <https://doi.org/10.3390/biom10030422>
- Dhar, V., Bhatnagar, M. (2009). Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res*, 20(3): 350. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.57379>
- Drabkin, D.L., Austin, J.H. (1935). Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem*, 112: 51–65.
- Draper, H.H., Hardley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421–431.
- Elbetieha, A., Darmani, H., Al-Hiyasat, A.S. (2000). Fertility effects of sodium fluoride in male mice. *Fluoride*, 33(3): 128-134.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V.B., Rimbach, G. (2015). Betanin-A food colorant with biological activity. *Mol Nutrit Food Res*, 59(1): 36-47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-878. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Faridah, A., Holinesti, R., Syukri, D. (2015). Betalains from Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*): Extraction, Spectrophotometric and HPLC-DAD identification, bioactivity and toxicity screening. *Pak J Nutr*, 14(12): 976-982. <https://doi.org/10.3923/pjn.2015.976.982>
- Farooqi, A., Masuda, H., Firdous, N. (2007). Toxic fluoride and arsenic contaminated groundwater in the Lahore and Kasur districts, Punjab, Pakistan and possible contaminant sources. *Environ Pollut*, 145(3): 839-849. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.007>

- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809): 239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *J Neurol Sci*, 285(1–2): 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.001>
- Fu, Y., Shi, J., Xie, S.Y., Zhang, T.Y., Soladoye, O. P., Aluko, R.E. (2020). Red beetroot betalains: Perspectives on extraction, processing, and potential health benefits. *J Agri Food Chem*, 68(42): 11595-11611.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., Choo, W.S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT Food Sci Technol*, 64(2): 645-649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M.A., D'Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.057>
- Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H., Malinowska, P. (2006). Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Addit Contam*, 23(11): 1079-1087. <https://doi.org/10.1080/02652030600986032>
- Gonalves, L.C.P., Trassi, M.A.D. S., Lopes, N.B., Dörr, F.A., Santos, M.T. dos, Baader, W.J., Oliveira, V.X., Bastos, E.L. (2012). A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem*, 131(1): 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.067>
- Golasz, L.B., Silva, J. D., Silva, S.B.D. (2013). Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. *Food Sci Technol*, 33: 155-162.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Repro Update*, 7(2): 175-189.
- Hagmann, W.K. (2008). The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J Med Chem*, 51(15): 4359-4369. <https://doi.org/10.1021/jm800219f>
- Halpern, D.F. (2001). Sodium Fluoride. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rs071>

- Han, J., Tan, C., Wang, Y., Yang, S., Tan, D. (2015). Betanin reduces the accumulation and cross- links of collagen in high-fructosefed rat heart through inhibiting non-enzymatic glycation. *Chemico-Biol Inter*, 227: 37-44.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J Food Sci*, 71(4): R41-R50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>
- Hobbs, D.A., Goulding, M.G., Nguyen, A., Malaver, T., Walker, C.F., George, T.W., Methven, L., Lovegrove, J.A. (2013). Acute ingestion of beetroot bread increases endothelium-independent vasodilation and lowers diastolic blood pressure in healthymen: A randomized controlled trial. *J Nutr*, 143(9): 1399-1405. <https://doi.org/10.3945/jn.113.175778>
- Ibrahim, M., Asimrasheed, M., Sumalatha, M., Prabhakar, P. (2011). Effects of fluoride contents in ground water: A review. *Int J Pharm Appl*, 2(2): 128-134.
- Johnson, W.J., Taves, D.R., Jowsey, J. (2019). Fluoridation and bone disease in renal patients. In Continuing evaluation of the use of fluorides (pp. 275-293). CRC Press.
- Johnston, N.R., Strobel, S.A. (2020). Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Arch Toxicol*, 94(4): 1051-1069.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2009) FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1):1–14
- Kapadia, J., Azuine, G.A., Subba Rao, M., Arai, G., Iida, A., Tokuda, H. (2012). Cytotoxic Effect of the Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extract Compared to Doxorubicin (Adriamycin) in the Human Prostate (PC-3) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 11(3): 280-284. <https://doi.org/10.2174/187152011795347504>
- Kashyap, S.J., Sankannavar, R., Madhu, G.M. (2021). Fluoride sources, toxicity and fluorosis management techniques-A brief review. *J Hazard Materials Lett*, 2: 100033.
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15(2): 316-330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Khan, M.I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochem*, 117: 267-295. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.008>
- Kiran Kumar, N., Nageshwar, M., Pratap Reddy, K. (2018). Curcumin Reduce Sodium Fluoride-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Biosci, Biotechnol Res Asia*, 15(1): 71-77. <https://doi.org/10.13005/bbra/2609>

- Kuang, P., Deng, H., Cui, H., Chen, L., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X., Zhao, L. (2017). Sodium fluoride (NaF) causes toxic effects on splenic development in mice. *Oncotarget*, 8(3), 4703–4717. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13971>
- Kroemer, G., Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Med*, 6(5): 513-519. <https://doi.org/10.1038/74994>
- Kumar, S.S., Manoj, P., Giridhar, P. (2015a). A method for red-violet pigments extraction from fruits of Malabar spinach (*Basella rubra*) with enhanced antioxidant potential under fermentation. *J Food Sci Technol*, 52(5): 3037-3043.
- Kumar, S.S., Manoj, P., Shetty, N.P., Prakash, M., Giridhar, P. (2015b). Characterization of major betalain pigments-gomphrenin, betanin and isobetanin from *Basella rubra* L. fruit and evaluation of efficacy as a natural colourant in product (ice cream) development. *J Food Sci Technol*, 52(8): 4994-5002.
- Kumar, M., Goswami, R., Patel, A.K., Srivastava, M., Das, N., 2020. Scenario, perspectives and mechanism of arsenic and fluoride co-occurrence in the groundwater: A review. *Chemosphere*, 249: 12612.
- Krumova, K., Cosa, G. (2016). Overview of Reactive Oxygen Species, in *Singlet Oxygen. Applications Biosci Nanosci*, 1: 1-21
- Kurtdede, E., Pekcan, M., Karagül, H. (2017). Türkiye’de florozis sorunu ve florun biyokimyasal etkileşimi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 12(3): 320-326.
- Kurutas, E.B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutri J*, 15(1): 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
- Lacson, C.F.Z., Lu, M.C., Huang, Y.H. (2021). Fluoride containing water: a global perspective and a pursuit to sustainable water defluoridation management-an overview. *J Clean Prod*, 280: 124236.
- Lee, E.J., An, D., Nguyen, C.T.T., Patil, B.S., Kim, J., Yoo, K.S. (2014) Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris* L.) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *J Agric Food Chem*, 62: 1324-1331.
- Leonard, A.S., Papaj, D.R. (2011). “X” marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Funct Ecol*, 25(6): 1293-1301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01885.x>
- Li, P., Xue, Y., Zhang, W., Yu, Q., Sun, Y., Qu, T., Chen, X., Cheng, X., Song, B., Luo, W., Teng, F. (2013). Sodium fluoride induces apoptosis in odontoblasts via a JNK-

- dependent mechanism. *Toxicology*, 308: 138-145.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.03.016>
- Lima, A.C.V., de Dionisio, A.P., Abreu, F.A.P., de Silva, G.S., da Lima Junior, R.D., Magalhães, H.C.R., Zocolo, G.J. (2020). Microfiltered red–purple pitaya colorant: UPLC-ESI-QTOF-MSE-based metabolic profile and its potential application as a natural food ingredient. *Food Chem*, 330: 127222.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265–275.
- Luck, H. (1955). Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods in Analysis*. Academy Press, London.
- Luna, L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology*. 3rd Ed, McGraw-Hill Book Company, New York; 1-253.
- Maity, J., Vithanage, M., Kumar, M., Ghosh, A., Mohan, D., Ahmad, A., Bhattacharya, P. (2021). Seven 21st century challenges of arsenic-fluoride contamination and remediation. *Groundwater Sustain Dev*, 12: 10053.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I.C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci Technol*, 52: 1-15.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I.C. (2017). Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. *Food Function* 8(4): .
<https://doi.org/10.1039/c7fo00144d>
- McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8). [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9): 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- Mohapatra, M., Anand, S., Mishra, B.K., Giles, D.E., Singh, P. (2009). Review of fluoride removal from drinking water. *J Environ Manage*, 91: 67–77.
- Motawi, T.K., Ahmed, S.A., El-Boghdady, N.A., Metwally, N.S., Nasr, N.N. (2019). Protective effects of betanin against paracetamol and diclofenac induced neurotoxicity and endocrine disruption in rats. *Biomarkers*, 24(7): 645-651.
- Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Latifi, A.M., Mirzaei, M., Habtemariam, S., Moghaddam, A.H. (2012). Mitigating role of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative

- stress in the rat brain. *Pharmaceutical Biol*, 50(11).
<https://doi.org/10.3109/13880209.2012.675341>
- Nagendra, A. H., Bose, B., Shenoy P, S. (2021). Recent advances in cellular effects of fluoride: an update on its signalling pathway and targeted therapeutic approaches. *Mol Biol Rep*, 48(7): 5661-5673.
- Naselli, F., Tesoriere, L., Caradonna, F., Bellavia, D., Attanzio, A., Gentile, C., Livrea, M. A. (2014). Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(1): 652-658. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.029>
- Nemzer, B., Pietrzkowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michałowski, T., Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem*, 127(1).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.081>
- Ni, J., Li, Y., Zhang, W., Shu, R., Zhong, Z. (2018). Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in cementoblasts. *Chemico-Biological Interactions*, 294, 34-39.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95: 351–358.
- Ortiz-Perez, D., Rodríguez-Martínez, M., Martínez, F., Borja-Aburto, V., Castelo, J., Grimaldo, J., De la Cruz, E., Carrizales, L., Díaz-Barriga, F. (2003). Fluoride-induced disruption of reproductive hormones in men. *Environ Res*, 93: 20-30.
- Ozsvath, D.L. (2009). Fluoride and environmental health: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8(1): 59-79. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9136-9>
- Öncü, M., Kocak, A., Karaoz, E., Darici, H., Savik, E., Gultekin, F. (2007). Effect of long-term fluoride exposure on lipid peroxidation and histology of testes in first- and second-generation rats. *Biol Trace Elem Res*, 118(3): 260-268.
<https://doi.org/10.1007/s12011-007-0036-6>
- Paciulli, M., Medina-Meza, I.G., Chiavaro, E., Barbosa-Cánovas, G.V. (2016). Impact of thermal and high pressure processing on quality parameters of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *LWT-Food Sci and Technol*, 68: 98-104.
- Pal, P., Mukhopadhyay, P.K. (2021). Fluoride induced testicular toxicities in adult Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*, 31(5): 383-392.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1891489>

- Pan, Y. (2019). The dark side of fluorine. *ACS Med Chem Lett*, 10(7): 1016-1019.
- Pan, B., Li, H., Lang, D., Xing, B. (2019). Environmentally persistent free radicals: occurrence, formation mechanisms and implications. *Environ Pollut*, 248: 320-331.
- Pajor, K., Pajchel, L., Kolmas, J. (2019). Hydroxyapatite and fluorapatite in conservative dentistry and oral implantology—A review. *Materials*, 12(17): 2683.
- Perumal, E., Paul, V., Govindarajan, V., Panneerselvam, L. (2013). A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol Lett*, 223(2): 236–251. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.09.005>
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9): e45.
- Piero, S. (2013). Letters to the Editor. *Environ Toxicol Chem*, 32(6): 1215–1215. <https://doi.org/10.1002/etc.2224>
- Qin, W., Zhang, M., Chen, L., Zhang, M., Ren, H., Zhong, J. (2019). Effects of excessive fluoride on osteocalcin and glucose metabolism in mice. *Chinese J Endemiol*, 8-11.
- Rafique, T., Naseem, S., Ozsvath, D., Hussain, R., Bhanger, M.I., Usmani, T.H. (2015). Geochemical controls of high fluoride groundwater in Umarkot sub-district, Thar Desert, Pakistan. *Sci Total Environ*, 530: 271-278.
- Ramezani, G. H., Valaei, N., Eikani, H. (2004). Prevalence of DMFT and fluorosis in the students of Dayer city (Iran). *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 22(2): 49-53.
- Ramirez-Velasquez, I. M., Velez, E., Bedoya-Calle, A. ve Caro-Lopera, F.J. (2022). Mechanism of Antioxidant Activity of Betanin, Betanidin and Respective C15 Epimers via Shape Theory, Molecular Dynamics, Density Functional Theory and Infrared Spectroscopy. *Molecules*, 27(6): 2003.
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N.M., Gabr, A.M.M., Ahmed, A.R., Knorr, D., Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *J Food Sci Technol*, 51(9): 2216-2221. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0728-6>
- Ravichandran, K., Saw, N.M., Mohdaly, A.A., Gabr, A.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res Int*, 50(2): 670-675. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.002>
- Ray, D., Roy, S., Panda, P., Nandi, P., Mukherjee, S., Ghosh, S. (2020). The leaf extracts of *Camellia sinensis* (green tea) ameliorate sodium fluoride-induced oxidative stress

- and testicular dysfunction in rats. *Asian Pacific J Repro*, 9(6).
<https://doi.org/10.4103/2305-0500.298774>
- Reddy, M.K., Alexander-Lindo, R.L., Nair, M.G. (2005) Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem*, 53: 9268-9273.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., Serban, A.I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem*, 209: 112891.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2019). Natural food pigments and colorants. In *Bioactive molecules in food* (pp. 867-901). Springer, Cham.
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2015). Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on Methylisothiazolinone (MI) (P94) Submission III (Sensitisation only). Scs/1557/15, March.
- Schaefer, H.M., Schaefer, V., Levey, D.J. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends Ecol Evol*, 19: 11.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.08.003>
- Shashi, A., Thakur, S. (2022). Gene expression and alterations of antioxidant enzymes in spleen of rats exposed to fluoride. *J Trace Elem Med Biol*, 72: 126966.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126966>
- Selwitz, R.H., Ismail, A.I., Pitts, N.B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555): 51-59.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Sivakumar, V., Anna, J.L., Vijayeeswarri, J., Swaminathan, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochem*, 16(6): 782-789.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.03.009>
- Slavov, A., Karagyozev, V., Denev, P., Kratchanova, M., Kratchanov, C. (2013). Antioxidant activity of red beet juices obtained after microwave and thermal pretreatments. *Czech J Food Sci*, 31(2): 139-147. <https://doi.org/10.17221/61/2012-cjfs>
- Song, G.H., Gao, J.P., Wang, C.F., Chen, C.Y., Yan, X.Y., Guo, M., Huang, F.B. (2014). Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage. *J Physiol Biochem*, 70(3): 857-868.

- Song, F., Zuo, X., Zhao, Y., Li, Q., Tian, Z., Yang, Y. (2019). Betanin-enriched red beet extract attenuated platelet activation and aggregation by suppressing Akt and P38 Mitogen-activated protein kinases phosphorylation. *J Funct Foods*, 61: 857-868. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103491>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8): 1583.
- Skorka-Majewicz, M., Goschorska, M., Zwierello, W., Baranowska-Bosiacka, I., Styburski, D., Kapczuk, P., Gutowska, I. (2020). Effect of fluoride on endocrine tissues and their secretory functions – review. *Chemosphere*, 260: 127565.
- Srinivas, U.S., Tan, B.W., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 25: 101084.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2007). Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends Food Sci Technol*, 18(10): 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012>
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Stoica, A., Dobre, T. (2011). Betanine extraction from Beta vulgaris - Experimental research and statistical modeling. *UPB Sci Bull, B: Chem Mater Sci*, 73(1): 145-156.
- Suganyadevi, P., Saravanakumar, M., Aravinthan, K.M., Arunkumar, A., Krishna, R. K., Karthikeyani, S. (2010). Extraction of betacyanin from red beet root (Beta vulgaris L.) and to evaluate its antioxidant potential. *J Pharm Res*, 3(11): 2693-2696.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34: 497–500.
- Swamy, G.J., Sangamithra, A., Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from Beta vulgaris using Box-Behnken design of experiments. *Dyes Pigments*, 111:64-74. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.05.028>
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(2): 335-344.
- Ullah, R., Zafar, M.S., Shahani N. (2017). Potential fluoride toxicity from oral medicaments: A review. *Iran J Basic Med Sci*, 20: 841–848.
- Vandana, K., Srishti Raj, B., Desai, R. (2021). Dental fluorosis and periodontium: an original research report of in vitro and in vivo institutional studies. *Biol Trace Elem Res*, 199(10): 3579-3592.

- Vidal, P.J., López-Nicolás, J.M., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. (2014). Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem*, 154: 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.014>
- Vieira Teixeira da Silva, D., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., Mere Del Aguila, E., Flosi Paschoalin, V. (2019). Betanin, a natural food additive: Stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments. *Molecules*, 24(3): 458.
- Vulić, J.J., Čebović, T.N., Čanadanović, V.M., Četković, G.S., Djilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M., Velićanski, A.S., Cvetković, D.D., Tumbas, V.T. (2013). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food Function*, 4(5): 713-721 . <https://doi.org/10.1039/c3fo30315b>
- Wang, X., Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*, 2: 12.
- WHO, (2011). Guidelines for Drinking-water Quality. *World Health*, 1(3). [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6)
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M., Carrell, R.W. (1975). The estimation of free cell superoxide activity. *J Lab Clin Med*, 55: 337–341.
- Wimalawansa, S. (2020). Does fluoride cause the mysterious chronic kidney disease of multifactorial origin? *Environ Geochem Health*, 42: 3035–3057.
- Wroblewska, M., Juskiewicz, J., Wiczowski, W. (2011). Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids Health Dis*, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-178>
- Yu, R.A., Xia, T., Wang, A.G., Chen, X.M. (2006). Effects of selenium and zinc on renal oxidative stress and apoptosis induced by fluoride in rats. *Biomed Environ Sci*, 19(6): 439.
- Zhang, J., Zhu, W.J., Xu, X.H., Zhang, Z.G. (2011). Effect of fluoride on calcium ion concentration and expression of nuclear transcription factor kappa-B p65 in rat hippocampus. *Experim Toxicol Pathol*, 63(5): 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.02.01>
- Zheng, M., Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, 59(1). [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00289-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00289-0)

Żukowski, P., Maciejczyk, M., Waszkiel, D. (2018). Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol*, 92: 8-17.

Zvitov, R., Nussinovitch, A. (2005). Low DC electrification of gel-plant tissue “sandwiches” facilitates extraction and separation of substances from Beta vulgaris beetroots. *Food Hydrocol*, 19(6): 997-1004.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.009>

