

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

**ARSENİKLE LİPİD PEROKSİDASYON OLUŞTURULAN
RATLARDA ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞININ ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Zafer KAYA**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Gökhan ERASLAN**

**Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2010
KAYSERİ**

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

**ARSENİKLE LİPİD PEROKSİDASYON OLUŞTURULAN
RATLARDA ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞININ ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Zafer KAYA**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Gökhan ERASLAN**

**Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-09-752 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2010
KAYSERİ**

II

Doç. Dr. Gökhan ERASLAN danışmanlığında Zafer KAYA tarafından hazırlanan “**Arsenikle Lipid Peroksidasyon Oluşturulan Ratlarda Çuha Çiçeği Yağının Etkileri**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

17/09/2010

JÜRİ

İmza

Üye : Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

Üye : Doç. Dr. Gökhan ERASLAN (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Murat KANBUR

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıŐmasının planlanması ve yürütölmesi süresinde beni yönlendiren, benden desteğini ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve hoŐgörülerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Gökhan ERASLAN'a teŐekkürü bir borç bilirim. Tez çalıŐmalarım sırasında yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm, Doç. Dr. Murat KANBUR'a teşekkür ederim. Bana bu çalışma olanağını sağlayan Farmakoloji ve Toksikoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN'a; Yrd. Doç. Dr. Mürsel KARABACAK, Veteriner Hekim Zeynep SOYER SARICA ve Veteriner Hekim Mikail SUNGUR'a deneysel çalışma sırasındaki yardımları, göstermiŐ olduğu ilgi ve sıcak davranıŐları için teşekkür ederim. Ayrıca tez aŐamasında yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Safiye Ergin KAYA'ya da teşekkür ederim.

ARSENİKLE LİPİD PEROKSİDASYON OLUŞTURULAN RATLARDA ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞININ ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışma ile arsenikli içme suyu verilen ratlarda Çuha Çiçeği Yağının oksidan-tioksiidan sistem üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada kontrol, çuha çiçeği, arsenik ve arsenikle ile çuha çiçeği yağı verilen 4 grup oluşturuldu. Her grupta 12 rat olmak üzere toplam 48 adet Wistar Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Grup 2, 3 ve 4'e sırasıyla çuha çiçeği yağı sondayla mideye 0,1 ml/hayvan/gün dozunda; Na-arsenit içme suyunda 100 ppm dozunda *ad libitum* olarak; çuha çiçeği yağı (soda ile 0,1 ml/hayvan/gün dozda) ile Na-arsenit (100 ppm dozunda içme suyunda) *ad libitum* olarak birlikte 30 gün süreyle verildi. Otuzuncu günün sonunda, bütün gruplardan doku (karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, kalp, dalak, testis) ve kan numuneleri alındı. Numunelerde malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite analizleri gerçekleştirildi.

Çuha çiçeği yağı ile arseniğin birlikte verildiği grupta (Grup 4), yalnızca arsenik verilen gruba göre (Grup 3), MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş bulundu. SOD aktivitesinde karaciğer, böbrek, testis ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş tespit edildi. CAT aktivitesinde karaciğer, akciğer ve testis dokusunda önemli bir artış; böbrek, beyin, kalp ve dalak dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş gözlemlendi. GSH-Px aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş gerçekleşti. NO düzeyinde karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş vardı.

Sonuç olarak, ratlarda arsenik maruziyetinin lipid peroksidasyonunu artırarak (MDA ve NO düzeyindeki artış) ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek oksidatif stres oluşturduğu; belirtilen doz ve sürede çuha çiçeği yağı verilen ratlarda bu bileşiğin herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı; arsenik ve çuha çiçeği yağının birlikte verilmesinin oksidatif stres ve lipid peroksidasyonun şiddetinde azalmaya yol açtığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Arsenik, Çuha Çiçeği Yağı, Lipid Peroksidasyon, Rat

THE EFFECTS OF EVENING PRIMROSE OIL ON LIPID PEROXIDATION INDUCED WITH ARSENIC IN RAT

ABSTRACT

With this research, it was investigated that the effects of evening primrose oil on oxidant-antioxidant system to be given arsenic with drinking water in rat.

In this study, it was designed four groups as control (Group 1), evening primrose oil (Group 2), arsenic alone (Group 3), arsenic plus evening primrose oil (Group 4). It was used 48 Wistar Albino race male rat and kept 12 rats in each group. It was given evening primrose oil at 0.1 ml/rat/day into the stomach via gavage, Na-arsenide 100 ppm via drinking water as *ad-libitum* and evening primrose oil at 0.1 ml/rat/day into the stomach via gavage plus Na-arsenide 100 ppm via drinking water as *ad-libitum* during 30 days for Groups 2-4, respectively. At the end of the 30th day, tissues (liver, lung, kidney, brain, heart, spleen and testis) and blood samples of all groups were taken. In the samples, the levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels/activities were analyzed.

When compared to arsenic plus evening primrose oil treated group (Group 4), Na-arsenic alone group (Group 3), a significant increase in liver, lung, kidney, spleen, testis, brain and heart tissues were found for MDA levels. A significant reduction in liver, kidney, testes and heart tissues and erythrocytes were detected for SOD activity. A significant increase in liver, lung and testes tissues; a significant decrease in the kidney, brain, heart and spleen tissues and erythrocytes has been found for CAT activity. Significant decrease in liver, lung, kidney, spleen and heart tissues and erythrocytes for GSH-Px activities was seen. A significant decrease in liver, kidney, spleen, brain and heart tissues NO levels were found.

As a result, it was determined that exposure to arsenic in rats causes oxidative stress by increasing lipid peroxidation (increasing of MDA and NO levels) and changing the activity of antioxidant enzymes; evening primrose oil given mentioned dose and duration has not any adverse effects; giving arsenic with evening primrose oil reduces the severity of oxidative stress and lipid peroxidation.

Key words: Arsenic, Evening Primrose Oil, Lipid Peroxidation, Rat

VI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
KISALTMALAR.....	IX
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ARSENİK.....	3
2.1.1. Arseniğin Doğada Bulunuşu ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Arseniğin Kinetiği ve Metabolizması.....	4
2.1.3. Arseniğin Etki Mekanizması ve Zehirliliği.....	6
2.1.4. Arseniğin Kronik Etkileri.....	7
2.1.5. Hayvanlarda Bağışıklık Sistem Cevabı.....	8
2.1.6. Klinik Belirti ve Lezyonlar.....	9
2.1.6.1. Otopsi.....	9
2.1.7. Tanı.....	10
2.1.8. Sağaltım.....	10
2.2. ÇUHA ÇİÇEĞİ.....	11
2.2.1. Çuha Çiçeğinin Genel Özellikleri.....	11
2.2.2. Çuha Çiçeği Yağı.....	12
2.2.2.1. Farmakolojik Etkileri.....	12
2.2.2.1.1. γ -Linoleik Asit (GLA).....	13

	<u>Sayfa No</u>
2.2.2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	14
2.2.2.2. Kullanım Alanları.....	14
2.3. SERBEST RADİKALLER.....	14
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	15
2.3.1.1. Süperoksit Radikali.....	15
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit.....	15
2.3.1.3. Hidroksil Radikali.....	15
2.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Hücresel Hasarlar.....	16
2.4. OKSİDATİF STRES.....	16
2.4.1. Oksidanların Üretimi ve Tüketimi.....	17
2.5. ANTİOKSİDANLAR.....	17
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	18
2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. KULLANILAN CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR.....	21
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	21
3.1.2. Kimyasallar.....	22
3.2. YÖNTEM.....	23
3.2.1. Hayvan Materyali.....	23
3.2.2. Gruplar.....	24
3.2.3. Örneklerin Toplanması.....	24
3.2.4. Eritrositlerin Yıkınması ve Hemolizatların Hazırlanması.....	24
3.2.5. Doku Homojenatının Hazırlanması.....	25
3.2.6. Biyokimyasal Analizler.....	25
3.2.6.1. Eritrosit ve Doku MDA Ölçümü.....	25
3.2.6.2. Eritrosit Hemoglobin Düzeyinin Ölçümü.....	26

VIII

	<u>Sayfa No</u>
3.2.6.3. Doku Protein Düzeyinin Belirlenmesi.....	26
3.2.6.4. Eritrosit ve Doku CAT Aktivitesi Ölçümü.....	26
3.2.6.5. Eritrosit ve Doku SOD Aktivitesi Ölçümü.....	27
3.2.6.6. Eritrosit ve Doku GSH-Px Aktivitesi Ölçümü.....	27
3.2.6.7. Plazma ve Doku NO Düzeyinin Ölçümü.....	28
3.3. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI.....	29
4.2. ARSENİK.....	29
4.3. ARSENİK İLE ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
5.1. ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI.....	41
5.2. ARSENİK.....	41
5.3. ARSENİK VE ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI.....	43
6. KAYNAKLAR.....	45
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

IX

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Difosfat
As	: Arsenik
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAL	: British Anti Lewisite
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
CO ₂	: Karbondioksit
ÇÇY	: Çuha Çiçeği Yağı
DGLA	: Dihomo Gama Linoleik Asit
DMAA	: Dimetilarsinik Asit
DNA	: Deoksiribonükleikasit
GLA	: Gama Linoleik Asit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HO ₂ '	: Hidroperoksi Radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
LA	: Linoleik Asit
LPO	: Lipit Reroksidasyonu
LOO·	: Lipit Reroksit Radikali
MDA	: Malondialdehit
MMAA	: Monometilarsinik Asit
NADP ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen Fosfat
NO [·]	: Nitrikoksit Radikali
NO ₂	: Azot Dioksit
NO ₂ [·]	: Azot Dioksit Radikali
NOS	: Nitrit Oksit Sentetaz
O ₂	: Moleküler Oksijen
ONOO [·]	: Peroksinitrit Radikali
OS	: Oksidatif Stress
PUFA	: Poliansatüre (çoklu doymamış) Yağ Asitleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TMAO	: Trimetilarsin Oksit
6-OHDA	: 6-Hidroksi Dopamin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Doğadaki arsenik formları.....	4
Tablo 4.1. Kontrol ve deneme grubu karaciğer dokusu oksidatif stres parametreleri.....	31
Tablo 4.2. Kontrol ve deneme grubu akciğer dokusu oksidatif stres parametreleri.....	32
Tablo 4.3. Kontrol ve deneme grubu böbrek dokusu oksidatif stres parametreleri.....	33
Tablo 4.4. Kontrol ve deneme grubu beyin dokusu oksidatif stres parametreleri.....	34
Tablo 4.5. Kontrol ve deneme grubu kalp dokusu oksidatif stres parametreleri.....	35
Tablo 4.6. Kontrol ve deneme grubu dalak dokusu oksidatif stres parametreleri.....	36
Tablo 4.7. Kontrol ve deneme grubu testis dokusu oksidatif stres parametreleri.....	37
Tablo 4.8. Kontrol ve deneme grubu eritrosit oksidatif stres parametreleri.....	38
Şekil 2.1. uha ieği.....	12
Şekil 2.2. GLA ve LA.....	14
Şekil 2.3. Reaktif oksijen metabolitlerinin açığa çıkışı ve antioksidan metabolizmalar...	20

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Arsenik insan ve evcil hayvanlarda zehirlenmelere sebep olabilen önemli metallere birisidir. Arseniğin çevreye başlıca yayılma ve taşınma yolu doğal sulardır. Arseniğin su aracılığıyla ekolojik sistemde dağılımı canlı yapılarda birikimine neden olmaktadır. Ayrıca endüstriyel atıkların arıtılmadan çevreye bırakılması, halk sağlığı açısından önemli sorunlara yol açmaktadır. Halk sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle içme sularında bulunan arsenik düzeylerine belirli sınırlamalar getirilmiştir. Arsenik doğada bulunduğu bu yollar dışında aynı zamanda ilaç, tarım, hayvancılık, elektronik, metalürji, boya vb. alanlarda kullanılmaktadır. Arseniğe maruz kalınması durumunda hücrede hasar meydana gelmekte ve bunun neticesinde reaktif oksijen türlerinin üretiminde artma görülmektedir. Arsenik zehirlenmelerinde oksidatif stresin rolü ile ilgili bulgular, laboratuvar hayvanlarında akut ve kronik arsenik zehirlenmesinde çoğunlukla besinsel önemi olan (askorbik asit, α -tokoferol, metionin, tiamin ve sistein gibi) antioksidanların tedavi edici ve koruyucu etkileri ile ilgilidir.

Çuha çiçeği yağı, *Oenothera biennis* bitkisinin tohumlarından elde edilen, esansiyel yağ asitleri (linoleik asit, gama linoleik asit) ile bazı fenolik karakterdeki bileşikleri yüksek oranda içeren bir üründür. Günümüzde kalp-damar sistemi, solunum sistemi, bağışıklık sistemi, sinir sistemi, üro-genital sistem hastalıkları gibi olgularda geniş ölçekte kullanım alanı bulmaktadır.

Bu güne kadar yapılan bilimsel çalışmalarda deney hayvanlarında hedef organların arseniğe sürekli maruz kalması durumunda oluşacak hücresel oksidatif savunmada, çuha çiçeği yağının etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple mevcut çalışma ile ratlarda arsenikle oluşan oksidatif stres etkilerine karşı çuha çiçeği yağının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ARSENİK

2.1.1. Arseniğin Doğada Bulunuşu ve Genel Özellikleri

Arsenik doğada geniş bir yayılım alanı gösterir. Düşük miktarlarda, kayalarda, toprakta, suda ve havada bulunur. Bulunuşuna göre yer kabuğunda 20., deniz suyunda 14. ve insan vücudunda 12. sırada olan bir elementtir (1-3).

Arsenik en çok üç değerlikli halde bulunur. Bunlar (-3), (+3) ve (+5) değerlikli durumlardır. Trivalen arsenik (As^{+3}) ve pentavalen arsenik (As^{+5}) çoğunlukla doğal sulara bulunur ve çok geniş bir pH yelpazesinde çözünebilir. Oksidasyona sebep olan çevre şartlarında As^{+5} türleri daha dayanıklı ve baskın durumdadır. İndirgeyici çevre şartlarında ise As^{+3} türleri daha baskın durumdadır. Anaerobik koşullarda, arsenit topraktaki mikroorganizmalar tarafından arsine indirgenir. Arsenik maden alaşımlarının katılaştırılmasında, yarı-iletkenlerin, pigmentlerin (boyaların), camların, pestisitlerin, rodentisit ve fungusitlerin üretiminde kullanılır. Aynı zamanda bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların bileşeni (uyku hastalığı, kronik miyeloid lösemi gibi) olarak da yer alır (2-4).

Arsenik, azot ailesinden metaloit özellik gösteren bir elementtir. Genellikle toprakta, suda ve havada bulunur. En çok ise içme sularında mevcuttur. Arseniğin organik ve inorganik formları vardır (Tablo 2.1). Arsenik nadiren saf halde bulunur (4-9).

Tablo 2.1. Doğadaki arsenik formları (6).

Arsenik Formları	Kimyasal Formül	Diğer Adları
Kırmızı Arsenik	As ₂ S ₂	Realgar, sandaraca
Sarı Arsenik	As ₂ S ₃	Arsenikon, aurum pigmentum, orpiment
Beyaz Arsenik	As ₂ O ₃	
Fenilarsin Oksit	C ₆ H ₅ AsO	

2.1.2. Arseniğin Kinetiği ve Metabolizması

Arsenik türleri, mikroorganizmalar tarafından monometilarsenik asit (MMAA), dimetilarsinik asit (DMAA) ve trimetilarsin oksit (TMAO)'e metilasyon ile dönüştürülebilir (2, 6). Bu metilasyon insanlar ve hayvanlar tarafından da meydana getirilir. Genellikle trivalen bileşikler, pentavalen bileşiklere göre daha zehirlidir. Bu bileşiklerden en zehirli olanı arsin (AsH₃) gazıdır. Organik arsenik bileşikleri de vardır, fakat bunlar genellikle zehirsizdirler (2, 10).

Arseniğin metabolizması çok hızlıdır. Arseniğin (As₂O₃) uygulanmasını takiben yaklaşık 2-4 saat sonra idrarda en fazla düzeyde trivalen inorganik arsenit bulunur. Yirmi dört saat sonra ise pentavalen metabolitler monometilarsenik ve dimetilarsinik asitler baskın duruma geçmektedir (2, 10, 11).

Arsenik bileşikleri organik ve inorganik formda ve iki farklı oksidasyon durumunda bulunurlar (6, 12). Bunlar arsenit (+3) ve arsenat (+5)'dir. Oksidasyon (+3) durumunda bulunan bileşikler +5 oksidasyon durumunda bulunanlardan daha zehirlidirler (13). İnorganik arsenik türleri, organik arsenik türlerinden daha zehirlidir. As⁺⁵ türleri oksidasyon durumunda bulunanlardan daha zehirlidir (14). As⁺⁵ türleri okside çevrelerde daha baskındırlar. As⁺³ türleri ise daha dayanıklıdırlar ve daha fazla miktarlarda bulunurlar. Anaerobik şartlarda arsenit topraktaki mikroorganizmalar tarafından arsine indirgenir (12).

Sindirim yoluyla alınan arsenik az zehirli olarak değerlendirilir. Büyük bir kısmı değişmeden atılır ve az bir kısmı emilir. Bununla beraber, çözünebilir arsenik bileşikleri mide bağırsak kanalından emilebilirler ve böbrek yoluyla atılırlar (örneğin As⁺⁵ ve organik arsenik). Trivalen arsenik (As⁺³) metilasyonlu veya metilasyonsuz yolla (As⁺⁵ ve As⁺³) idrarla atılır. Metilli arsenik türleri As⁺³ ve As⁺⁵'in inorganik formlarıdır. İn-

vivo olarak sırasıyla indirgenirler. Bunlar karaciğerde monometilarsenik asit ve dimetilarsenik aside dönüştürülerek zehirsiz hale getirilirler. İn-vivo ve in-vitro çalışmalarda zehirsizleştirilmiş MMAA ve DMAA'nın insan ve hayvanlar için zehirli olduğu görülmüştür (15).

Yıllarca arseniğin metilasyonunun bir zehirsizleştirme mekanizması olduğu düşünülürdü. Böyle düşünülmesinin sebebi pentavalen metile arseniklerin ve diğer arsenat veya arsenitlerden akut olarak daha az zehirli olması ve bu metile metabolitlerin, memeliler tarafından hızla dışarı atılmasıdır (15). Bunun istisnası ratlardır. Ratlara uygulanan arsenik, vücutlarında kalır ve hemoglobini DMAs (III)'e bağlanırlar. Aynı zamanda ratlarda trivalen metile arsenikler, MAs(III) ve DMAs(III), in-vitro veya in-vivo olarak hiçbir zaman tespit edilememiştir (10).

Çalışmalar, arseniğe maruz kalanların idrar örneklerinde trivalen metile arseniklerin (MMAA ve DMAA gibi) bulunduğunu göstermiştir (2, 6). Hayvanlarda ve in vitro şartlarda insan hücrelerinde yapılan çalışmalar, bu metilasyona uğramış bileşiklerin, onlara tekabül eden inorganik bileşiklerden (As^3 gibi) daha zehirli olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar, metilasyonun sadece bir zehirsizleştirme süreci olmayabileceğini aynı zamanda zehirliliğini ve/veya kan serojenik etkisini arttırabileceğini akla getirmektedir. Arseniğe maruziyet kesildiğinde bile arseniğin % 40-60'ı vücutta kalmaktadır. Bu durumda arsenik deride, saçta, tırnaklarda, kaslarda ve az miktarda dişler ve kemiklerde birikebilmektedir (2). Bu dokularda kalan arsenik de arseniğin teşvik ettiği zehirliliğin ve kanserojen etkinin sürmesine katkıda bulunmaktadır. Tüm sürecin en önemli noktası şudur; arseniğin metabolizma şekli ne olursa olsun, arseniğin veya metabolitlerinin alınması ve vücuttan atılması arasındaki denge vücuttaki arsenik yükünü metabolik sürecin son ürününden bağımsız bir şekilde belirler. Bu arsenik yükü bireyin genetik yapısıyla birleşerek, arsenik zehirliliğinde bireysel bir hassasiyet olup olmadığını belirler (12).

Arseniğin metilasyonunun bir zehirsizleştirme mekanizması olduğuna dair görüş yaklaşık 10 yıl önce değişmiştir (10, 11). Bu değişiklik manometilarsenoz asidin (MAs(III)) kemirgenlerde ve hücre kültürlerinde arsenitten (iAs(III)) daha güçlü akut zehirli etki oluşturduğu tespit edildikten sonra olmuştur. Trivalen dimetilarsenik aynı zamanda in-vitro olarak güçlü zehirli etkiye sahiptir. Sonuç olarak daha gelişmiş analiz metotlarının kullanılması ile inorganik arseniğe maruz kalan insanların idrarında

MAs(III) ve DMAs(III) tespit edilmiş ve böylece arsenik türlerinin in-vivo olarak oluştuğuna dair kanıt elde edilmiştir. Daha yakın bir geçmişte arsenik (+3 oksidasyon durumu) metil-transferaz (AS_3MT) bu metilasyonu katalize eden ve iAs(III)'ü başlangıç substratı olarak kullanan bir enzim olarak tanımlanmıştır (10). Biyometilasyonu katalize eden enzim, arsenit metiltransferaz adıyla tanımlanmıştır ve kromozomlara yerleştiği tespit edilmiştir (11).

İnsanlar arseniğe maruz kaldıklarında önemli miktarda MMA'yı dışarı atarlar. (idrardaki toplam arseniğin % 10-20'si). Memelilerde DMA arsenik metabolizmasının son noktasıdır ve bu noktadan öteye bir metilasyon nadiren gerçekleşir. DMA memeliler tarafından de-metile edilemiyor gibi görünse de bağırsaktaki bakterilerde ve mantarlarda de-metile edildiği kanıtlanmıştır (2, 12).

Birçok organizmada bu metaloite karşı direnç olduğu tespit edilmiştir. Arseniğin her yerde (toprak, su ve havada) bulunması ve zehirliliğine birden fazla genin etki etmesi nedeniyle bu direncin evrimsel bir süreç sonucunda gelişmiş olması muhtemeldir (15). Arseniğin bu zehirli yükünü azaltmak için organizmalar bu metaloitin vücuda daha az girmesini veya etkili bir şekilde atılmasını sağlayacak etkili taşıma sistemleri geliştirmişlerdir. Arsenik metabolizmasının yolları ve bunun modifikasyonları bira mayasında, bakterilerde, kemirgenlerde ve insanlarda çalışılmıştır. Bu metabolizmadaki herhangi bir engelleme bu metaloitin vücutta birikmesine sebep olabilir. Bunu takiben de zehirli etkiler ortaya çıkar ve genlerde değişiklikler olur (12).

2.1.3. Arseniğin Etki Mekanizması ve Zehirliliği

Arsenik, (örneğin As^{+3}), proteinlerin ve enzimlerin sülfidril gruplarıyla etkileşime girmek suretiyle protein ve enzimleri hücre içinde denatüre ederek ve hücrede reaktif oksijen türlerini arttırıp buna bağlı olarak hücre hasarına sebebiyet vererek zehirli etki gösterir (16). Arsenik hücrede esansiyel enzimatik fonksiyonları ve gen kopyalanması ile ilgili olayları engelleyebilir. Bu da sonuçta "ortaya çıkabilecek çok sistemli kanser yapıcı olmayan etkilerin" çokluğuna öncülük eder. Örneğin, trivalen metile edilmiş arseniklerin indüklediği oksidatif stres, glutasyon (GSH) redüktazı ve tioredoksin redüktazı inhibe eder. Bunun sonucunda hücrede oksidasyona karşı koruyucu mekanizmalar bozulur. Hücredeki GSH azalması, hücreleri arseniğe duyarlı hale getirir. Aynı zamanda hücrenin transformasyonuna katkıda bulunabilir. Tioredoksin maddesinin gen transkripsiyonunda görevli bazı faktörlerin DNA'ya bağlanma

aktivitesini değiştirdiği için bu maddenin azalması gen ekspresyonunu etkiler. Arsenitin vücutta 200'den fazla enzimi inhibe ettiği bilinmektedir. Arsenat fosfor ile benzer yapıdadır. Bu benzerlik nedeniyle vücutta fosforun yerine geçebilmektedir ve bu durum kemiklerde yıllarca devam edebilmektedir. Arsenik hücrede kolayca hidrolize edilebilmektedir. Bu da fosfatın, adenozin trifosfat (ATP) oluşturmak üzere, adenozin difosfata (ADP) geçişini engellemektedir ve hücrede enerji tükenmektedir. Arsenik bileşiklerinin en zehirlisi olan arsinin kırmızı kan hücrelerinin hemolizine sebep olduğu bilinmektedir. Bu durum hemolitik anemiye öncülük etmektedir. Bu da oligo-üri ve renal yetersizliğe sebep olmaktadır. Arsin maddesinin, protein ve enzimlerin sülfidril gruplarıyla etkileşim halinde olması, eritrositlerin sodyum-potasyum pompasının etkisizleştirilmesinden sorumlu olabilir. Aynı zamanda arseniğin DNA'nın onarım süreçlerini zayıflattığı bilinmektedir ve böylece kansere (örneğin cilt kanseri) ve arsenikle ilgili diğer hastalıklara duyarlılık artmaktadır (2, 3).

Arsenik bileşiklerinin zehirliliği hayvanın türü ve maruz kalma şekline, arseniğin değerliliğine, partikül büyüklüğü ve çözünabilirliğine göre önemli ölçüde değişir. Bazı arsenik bileşiklerinin sıçanlarda ağızdan ÖD₅₀ miktarları mg/kg olarak şöyledir: Sodyum arsenit 10-50; arsenik asit 48-50; arsenik trioksit 138; bakır asetoarsenit 22; monosodyum metanearsonat 700-900; disodyum metanearsonat 1000-1800 (13-17).

Çoğu hayvan türünde sodyum arsenitin ağızdan öldürücü olabilen miktarları 1-25 mg/kg arasında (at 6,5 mg/kg, sığır 7,5 mg/kg, koyun > 10,0 mg/kg, domuz 2,0 mg/kg) değişir. Arsenik trioksit ise bundan 3-10 kez daha az (sığır, koyun ve atlarda zehirli miktarları 30-55 mg/kg) zehirlidir (16, 17).

2.1.4. Arseniğin Kronik Etkileri

Arseniğin zehirli etkileri insanların da içinde bulunduğu geniş bir canlı kesimini etkilemektedir. Arsenikten en çok etkilenen organ ve dokular; oksidatif enzimlerin yoğun olarak bulunduğu mide bağırsak sistemi, dolaşım sistemi, karaciğer, böbrek ve deridir. Bu organ ve dokular arseniğe karşı çok hassastırlar. Kalp gibi diğer bazı organlar ise ikincil olarak etkilenirler. Kronik arsenik zehirlenmesinin belirtileri, hiperpigmentasyon, hiperkeratozis, deskuamasyon ve saç kaybı, periferal nöropatiler, cilt kanseri ve periferal vasküler hastalıklardır (1, 2, 14-16, 18). Bu belirtiler daha çok arsenik içeren suları içme suyu olarak kullanan popülasyonlarda görülür. Bu lezyonlar arasında, deri lezyonları en baskın olanlarıdır ve beş yıllık bir zaman diliminde

oluştukları bilinmektedir. Deride yüksek oranda keratin bulunduğu için arsenik burada yerleşir ve depolanır. Deride As^{+3} 'ün bağlanabileceği çok sayıda sülfidril grubu bulunur ve bu durum deriyi arsenik zehirlenmesine karşı hassas kılar. İn-situ hücre karsinoması (*Bowen* hastalığı), invaziv hücre karsinoması ve multipl bazal hücre karsinomasını da içeren cilt kanserlerinin hepsinin, arseniğe kronik olarak maruz kalınması ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Arseniğin uzun bir süre ağız yoluyla alınması ile hipertansiyon ve serebro-vasküler hastalıklar arasında bağlantı olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer etkiler, hematopietik depresyon, kandan dokulara ve mide bağırsak kanalına doğru sıvı kaybının olması nedeniyle (anhidremi), sarılıkla karakterize karaciğer hasarı, portal siroz ve asites, duyuşal bozukluklar ve periferal nöritis, anoreksi ve kilo kaybıdır (1, 4-15, 18-19).

Arseniğe maruz kalan farelerin karaciğerinde pro-hiperenflamatuvar duruma karşı bağışıklık cevabı oluşur. Arter duvarlarında artan bir enflamasyon vardır. Arseniğin sebep olduğu oksidadif sinyale cevaben karaciğerin sinüzoidal endotellerinde değişimler olur. Bu değişimler damar yoluyla beslenmeyi ve atılımı sınırlandırır. Arsenik yüksek düzeyde ise (yüzey sularında) hipertansiyon, damarsal kaynaklı kalp hastalıkları ve diğer damarsal hastalıklar görülür. Yaygın damar daralması ile arsenik arasında sıkı bir ilişki vardır. Ancak bu ilişki tam açıklanamamıştır. İnorganik arseniğin uzun bir süre ağız yoluyla alınması, solunum sisteminde problemlere sebep olmaktadır. Bunlar, öksürük, göğüste patolojik sesler, bronşit ve nefes almada güçlük olarak sıralanabilir. Yapılan araştırmalarda kronik olarak arseniğe maruz kalan ve bu nedenle deride lezyonlar bulunan hastaların büyük çoğunluğunda öksürük şikayetinin de var olduğu tespit edilmiştir (19).

Arseniğin etkileri nedeniyle farklı hastalıklar oluşmasına rağmen, bu durum immün sistem üzerinde olumsuz bir etki yapabilir. Bu da kişiyi bakteriyel/viral enfeksiyonlara karşı duyarlı kılar. İmmunolojik cevaplardaki değişikliklerden ileri gelen bu hastalıkların arseniğe bağlı olup olmadıkları tam olarak bilinmemektedir. Vücutta düşük düzeyde karoten alınması veya vücuttaki karotenin herhangi bir sebepten ötürü düşmesi arseniğe bağlı kalp-damar sistemi hastalıklarını arttırmaktadır (19).

2.1.5. Hayvanlarda Bağışıklık Sistem Cevabı

Arsenik trioksiti solunum yoluyla alanlarda alveolar makrofajlarda oluşan hasar nedeniyle solunum sistemi bakteriyel patojenlere (örneğin, *Klebsiella pneumonia*) karşı

hassasiyet artmaktadır. Bu koşullar altında, trake içi enjeksiyon yoluyla sodyum arsenat verilmesi durumunda ölüm oranı yükselir. Viral infeksiyonlardan önce sodyum arsenit uygulanması interferon faaliyetini engellemektedir. İçme sularındaki düşük düzeydeki arsenit (0,5-10 ppm) bağışık sisteminde baskılaya sebep olur. Arsenik birçok enfeksiyona karşı duyarlılığı arttırır. Ayrıca merkezi sinir sisteminde, hormonal sistemde (özellikle glukokortikoidler), kan, kemik ve böbreklerde bozukluklara sebep olur (2).

2.1.6. Klinik Belirti ve Lezyonlar

Arsenikle olan zehirlenmelerde hayvanlarda karşılaşılan klinik belirtiler birbirlerine çok benzer. Perakut zehirlenmelerde hiçbir belirti görülmeyebilir ve hayvan genellikle ölü olarak bulunur. Bu olaylarda ani başlayan şiddetli karın sancısı, sendeleme, şok, felç dikkati çekebilir. Akut olaylarda şiddetli sancı, sendeleme, güçsüzlük, bitkinlik, tükürük salgısı artışı, kusma, susama, bazen kanlı olabilen sürgün, nabız sayısında artış ve zayıflama, bacaklarda felç, yere uzanma, vücut ısısının normal olması veya normalin altına inmesi ile 1-3 gün içinde ölüm görülür. Subakut zehirlenme hallerinde hayvanlar birkaç gün yaşayabilir. Bunlarda sancı, sendeleme, güçsüzlük, durgunluk, kanlı sürgün ve dışkıda mukoza parçalarının bulunması, idrar çıkarılmasında önce artış sonra azalma, susama, bacaklarda kısmi felç ve soğukluk, uyuşukluk, vücut ısısında düşme, idrarda kan bulunması ve ara sıra çırpınmalar söz konusudur. Hayvanlarda kronik arsenik zehirlenmesi seyrek olarak şekillenir; bu durum susama, mukoz zarların tuğla kırmızısı renk alması, nabızda hafif düzensizlik ve zayıflamayla karakterizedir (16, 17).

2.1.6.1. Otopsi

Arsenik zehirlenmesi ile ölen hayvanların doku ve organlarında çok belirgin belirtiler bulunur. Mide bağırsak sisteminde ödem ve kan damarlarında yırtılmalar olur. Sindirim kanalı mukozası gül kırmızısı renkte, ödemli ve kanamalıdır. Dokulardaki nekroz neticesinde mukozalar şişmiş ve kolay soyulabilir durumdadırlar. Bağırsak içeriği sulu, kötü kokulu ve kanlıdır; içinde mukoza döküntüleri bulunur. Karaciğer yumuşak ve sararmıştır. Akciğer ödemli ve kanlıdır. Karaciğer, böbrek, kalp ve karın zarı kanamalıdır; bu organlarda yağlı dejenerasyon görülebilir (16, 17).

2.1.7. Tanı

Zehirlenme olayında ani başlayan sancı, kanlı ve mukoz döküntüleri de içeren sulu sürgün görülür. Otopside kanamalı mide-bağırsak yangısı, böbrek, karaciğer ve diğer bazı organ ve dokulardaki dejenerasyon öncelikle arsenik şüphesi uyandırmalıdır. Zira talyum dışında, arsenik kadar hızlı seyreden mide-bağırsak hasarı yapan başka bir metal yoktur. Yeteri kadar şiddetli olduğunda, kurşunla zehirlenme belirtileri de arsenikte görülenlere benzer; ama kurşunla zehirlenmelerde sinirsel belirtiler de bulunur. Arseniğin dokularda (böbrek veya karaciğer) veya midede bulunması kesin bir kanıt değildir. Çünkü normal hayvanların karaciğer ve böbrekleri nadiren de olsa 1 ppm'den az miktarda arsenik içerebilmektedir. Zehirlenme olduğunu söyleyebilmek için arsenik miktarının 3 ppm'den fazla olması gerekir. Arseniğin ağız yoluyla alınmasını takip eden ilk 24- 48 saatte mide içeriğinde arsenik tespit edilmesi tanı açısından önemli bir bulgudur. İdrardaki arsenik miktarının ölçülmesi de tanıya yardımcı olur (16, 17).

2.1.8. Sağaltım

Akut arsenik zehirlenmesinde yapılacak ilk iş kusabilen hayvanların kusturulmasıdır. Kusma olsun veya olmasın ılık su ile mide yıkanması yapılarak, mideden henüz emilmemiş olan arseniğin uzaklaştırılmasına çalışılır. Bağırsak hareketlerini artıran bir maddeden sonra tıbbi kömür verilebilir. Sindirim kanalının boşaltılmasını tamamlamak için köpeklerde sabunlu suyla kalın bağırsağın yıkanması çok yararlıdır. Tuzlu sürgütler ve irkiltilmiş mide-bağırsak mukozasını korumak için sarıcı-örtücü-koruyucu etkisi olan kaolin gibi maddeler kullanılır (17). Küçük hayvanlarda koruyucular (kaolin, pektin) tıbbi kömürden 1-2 saat sonra verilmelidir. Arsenik zehirlenmesinde kullanılacak antidot dimerkaproldür. Bu madde British Anti Lewisite (BAL) olarak da bilinir. İnorganik arsenik bileşikleriyle olan zehirlenmelerin sağaltımında etkinliği zayıftır. Yüksek dozlarda kendisi de zehirli olabilmektedir. Dimerkaprol 3 mg/kg dozda Kİ yolla, ilk 2 günde 6 kez, üçüncü gün 4 kez ve iyileşene kadar sonraki 10 gün süreyle günde 2 kez olmak üzere toplam 13 gün uygulanır. Parenteral olarak 1 mg/kg dozda dimerkaptosüksinat veya dimerkaptopropan sülfonat da yararlı olmaktadır. Büyük hayvanlarda tioktik asit (lipoik asit veya α -lipoik asit) yalnız başına veya dimerkaprolle birlikte kullanılabilir. Dimerkaprolun suda çözünebilen türevleri olan 2,3 dimerkaptopropan-1-sülfonat (DMPS) ve dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ağızdan verilebilir. Ayrıca hazırlanmış demir-3 hidroksitin ağızdan verilmesi yararlı olabilir.

Sodyum tiyosülfat da kullanılabilir; bu madde at ve sığırlara ağızdan 60-80 mg/kg dozlarda ve % 10-20 çözeltileri şeklinde, günde 2-3 kez olmak üzere, iyileşene kadar verilebilir. Bu dozun $\frac{1}{4}$ 'ü koyun ve keçilere uygulanabilmekle birlikte akut arsenik zehirlenmesinin sağaltımında yararı azdır (16, 17).

2.2. ÇUHA ÇİÇEĞİ

2.2.1. Çuha Çiçeğinin Genel Özellikleri

Çuha çiçeği (*Oenothera biennis*) *Onagraceae* ailesine bağlı iki yıllık bir bitkidir. Anavatanı Kuzey Amerika'dır. Asya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde de bulunur. Sarı renkli ve güzel kokulu çiçekleri vardır. Bu çiçekler akşamları açar ve tüm akşam boyunca açık kalırlar. Olumsuz iklim şartlarında, kumlu topraklarda, yollarda, meralarda veya açık alanlarda yetişir. Bitkinin tüm kısımları yenilebilir. Çiçekleri salatalara katılır, yaprakları diğer yeşil salatalar gibi yenilebilir. Kökleri patates gibi tüketilebilir. Ancak bu bitki öncelikle tohumlarından yağ çıkarılmak için kullanılır. Bu yağ da gıda takviyesi olarak kullanılır (Şekil 2.1) (20).

Oenothera biennis'in yaygın isimleri şunlardır: Gecesevası, yabancı gecesevası, kır çuha çiçeği, ateş bitkisi, gece yakı otu, kralların panzehiri ve geniş çan çiçeği. Bu bitkinin çiçekleri gündüz açmaz, sadece geceleri açar. Kuvvetli yapısı olan, dikine büyüyen bir bitkidir. Bir ayak ile 5 ayak (feet) yüksekliğe ulaşır. Yapraklarının uzunluğu 1-6 inç arasındadır. Yaprakları mızrak şeklindedir ve üst kısmı keskindir. Yaprakların kenarında dalgalı bir biçimde dişler vardır. Bunlar yaprağın kaidesine doğru daralır. Bitkinin ana kaidesine yakın olanlar haricinde yapraklar genellikle sapsızdır. Sülfür sarısı renginde güzel kokulu çiçekleri hazirandan ocak ayına kadar açar ve isminden de anlaşılacağı üzere (gecesevası) gece açar. Her bir çiçeğin dört adet taç yaprağı vardır. Bunlar yaklaşık 1-2 inç genişliğindedir. Tohum kapsülleri dikdörtgen şeklinde ve tüylüdür. Yaklaşık 1 inç genişliğindedir. Üst kısmı dardır (21).

Çuha çiçeği 30'dan fazla ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir. Kuzey Amerika'da bu bitki en fazla Kanada'da (*Nova Scotia* ve *Ontario*) ve Birleşik Devletlerin doğusunda yüksek miktarda yağış alan ılıman bölgelerde ticari olarak yetiştirilmektedir. Çuha çiçeği yağı üretimi ise en fazla Çin'de yapılmaktadır. Tohumlardan yağ elde edilirken basınçlı baskılarda soğuk-baskı yöntemi veya hekzanla özütleme yöntemi kullanılır. Ham çuha çiçeği yağı özütü yüksek miktarda antioksidan içerir (22). Bunlar arasında tokoferoller de bulunur. Tokoferoller damıtma sürecinde ayrılır. Son ürüne

paketlemeden önce vitamin E ve/veya diğer antioksidanlar ilave edilerek oksidasyona karşı dayanıklılığı artırılabilir (20, 22).



Şekil 2.1. Çuha Çiçeği (20)

2.2.2. Çuha Çiçeği Yağı

Çuha çiçeği yağı, yüksek miktarda gama linoleik asit (GLA) içerir. GLA etkin bir esansiyel yağ asididir ve prostaglandin E ve türevlerinin ön maddesi olması nedeniyle klinik ve farmakoloji alanında çok talep görmektedir (20, 22, 23). Romatoid artrit, ekzema, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, multipl skleroz'un da aralarında olduğu birçok enflamatuvar hastalık prostaglandinlerle alakalıdır. Çuha çiçeği yağı yoluyla GLA uygulaması bu hastalıklarda etkili olmaktadır. Yiyeceklerle alınan GLA'nın dalaktaki lenfosit çoğalmasını bastırır (23, 24). Çuha çiçeği yağı, öksürük, astım ve deri hastalıklarında da kullanılmaktadır (21, 25).

Bu bitkinin yağı elde edildikten sonra kalan posası, hayvan beslenmesinde (yemlerde) protein kaynağı olarak kullanılmaktadır (26, 27). Çuha çiçeği protein özütü metioninin de aralarında olduğu sülfür amino asitler bakımından zengindir. Ancak lizin bakımından fakirdir (28). Farelerde yapılan bir çalışmada LD₅₀ dozu 31,2 mg/kg olarak bildirilmiştir (20).

2.2.2.1. Farmakolojik Etkileri

Esansiyel yağ asitleri enflamatuvar hücre fonksiyonlarında kimyasal düzenleyici prekürsör moleküller olarak özgün bir rol oynarlar. Bu düzenleyici moleküller, prostaglandinler ve lökotrienlerdir. Bu maddeler vücutta hemen hemen tüm dokulardan sentezlenirler ve salınırlar. Enflamatuvar ve immun süreçler de dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyona katılırlar. Gıdalarda bulunan esansiyel yağ asitlerinin içeriğini

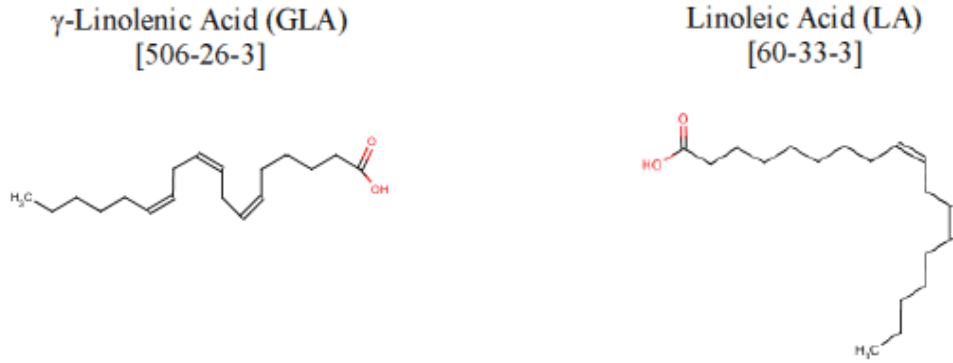
değiştirmek veya takviye olarak farklı yağ asitleri vermek, farklı prostaglandin ve lökotrienlerin üretimine yol açabilir. Çuha çiçeği yağı bakımından zengin bir diyet δ -linoleik asit açısından da zengindir. Bu durumda serumda dihomo- δ -linoleik asit yoğunluğu artar. Bu artış, prostaglandin E_1 seviyesinde artışa sebep olur. Prostaglandin E_1 kronik enflamasyonlarda negatif geri bildirim rolü oynar. Başlangıçta prostaglandin E_1 enflamasyonun belli başlı belirtilerinin oluşmasına sebep olur. Ancak daha sonra enflamasyonu baskılar. Dolayısıyla çuha çiçeği yağı romatoid artrit gibi enflamasyonla karakterize hastalıklarda faydalı olabilir (29).

2.2.2.1.1. γ -Linoleik Asit (GLA)

GLA membran bütünlüğü ve akışkanlığında rol oynar. GLA'ya atfedilen diğer fizyolojik roller, derinin su geçirgenliğinin kontrolü ve diğer membranların potansiyel geçirgenliği ile kolesterol sentezi ve taşınmasının kontrolüdür. GLA reğetesiz olarak satılmaktadır ve deri hastalıkları, diyabetik komplikasyonlar, otoimmün hastalıklar, kronik halsizlik sendrom ve depresyon gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılır. Ağırlıklı olarak romatoid artrit, akut solunum ağrısı sendromu ve diyabetik nöropati vakalarında yararlıdır. Aynı zamanda göğüs kanseri tedavisinde tamoksifen ile beraber kullanılmaktadır. LA'nın GLA'ya dönüşümü için gerekli olan $\Delta 6$ -desaturaz, enflamatuvar hastalıklarda, stres durumlarında, yaşlılıkta, diyabet hastalığında, alkol tüketimi olduğunda (insan ve hayvan) azalmaktadır. Bu da değişik hastalıklara yol açmaktadır. Teorik olarak çuha çiçeği yağı ve diğer GLA içeren yağların gıda takviyesi olarak kullanılması, $\Delta 6$ -desaturazın azalmasına bağlı durumlarda faydalı olabilmektedir (Şekil 2.2) (20, 25, 26, 30, 31).

Esansiyel yağ asitlerinin insan ve hayvanlardaki metabolizma süreci GLA ve LA'dan başlayarak bir desaturasyon ve elongasyon reaksiyonları dizisidir. LA, $\Delta 6$ -desaturaz tarafından GLA'ya dönüştürülür. Daha sonra GLA, elongaz tarafından dihomo-GLA (DGLA)'ya çevrilir. Bundan sonra oluşan DGLA, siklooksijenaz COX1 ve COX2 tarafından 1. seri prostoglandinlere veya 3. seri lökotrienlere; veya 15-lipooksijenaz ile 15-hidroksi DGLA'ya veya $\Delta 5$ -desaturaz ile araşidonik aside; veya başka bir sınırlandırıcı adıma dönüştürülür. Araşidonik asit daha sonra COX1 tarafından pro-enflamatuvar 2. seri prostoglandinlere veya 5-lipoksijenaz tarafından 4. seri lökotrienlere çevrilebilir (20, 32).

GLA, genellikle zehirsiz olarak değerlendirilir. İzlenen birçok klinik olayda yan etkiler görülmemiştir. İnsanlarda 18 haftadan daha fazla uygulandığında tolere edilir. 400-800 mg/kg/gün dozlarında uygulandığında zehirli bir etki gözlenmemiştir (20).



Şekil 2.2. GLA ve LA (20)

2.2.2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Çuha çiçeği yağı çeşitli yağ asitlerinden oluşur. Bunlar, non-esansiyel ω -6 doymamış yağ asidi γ -linoleik asit (GLA), esansiyel ω -6 doymamış yağ asidi linoleik asit (LA), oleik asit, palmitik asit ve stearik asit. Asıl bileşenleri, LA (~%75) ve GLA (~%9) olarak bilinir (20, 33).

2.2.2.2. Kullanım Alanları

Çuha çiçeği yağı birçok durumda kullanılmaktadır. Pre-menstrual sendrom, meme ağrısı, sıcak basması (menapozda), atopik ekzema, sedef hastalığı, akne, ülserler, osteoporoz, raynaud sendromu, multipleskleroz, kanser, hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalıkları, çocuk dispraksisi, nükseden topallık, alkolizm, osteoporoz (balık yağı ile kombine edilerek), fenil ketonüri, skleroderma, Alzheimer hastalığı, şizofreni, kronik yorgunluk sendromu, astım, diyabetik nöropati, nörodermatitis, dikkat eksikliği-hiperaktivite hastalığı, miyalji, dismenore, depresyon, alerjiler, boğmaca, enflamasyon, astım, otoimmün durumlar, obezite ile doğumu uyarma-kısaltmada ve erken doğumu önlemede kullanılmaktadır. Kozmetik ürün ve sabun üretiminde, ayrıca esansiyel yağ asitleri diyet kaynağı olarak da kullanılmaktadır (20, 25, 32-34).

2. 3. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Ancak Fe^{+3} ,

Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat serbest radikal oluşumunda rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (35-37).

2. 3. 1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

2.3.1.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali (O_2^-) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Ayrıca, indirgenmiş geçiş metallerin otoksidasyonu da bu radikali oluşturabilir. Süperoksit radikali farklı etmenlerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla süperoksit radikallerinin birikmesi ile ilişkilidir. Süperoksit grubu asidik pH'da katyon, nötral ve alkali pH'da anyon şeklinde bulunur; bu sebeple, vücut sıvılarında süperoksit anyon grubu şeklindedir (17, 36).

Süperoksit gruplarının oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarındaki yapılarla tepkimeye girerek alkoller, aldehitler, peroksitler hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur (37).

2.3.1.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur. Bu tepkime radikal olmayan ürünleri oluşturduğundan dismutasyon tepkimesi olarak bilinir ya kendiliğinden gerçekleşir ya da SOD tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir fakat reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol alır. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerin varlığında Fenton reaksiyonu; süperoksit radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşturur (36).

2.3.1.3. Hidroksil Radikali

En etkin radikal hidroksil radikaldir (35, 36). Süperoksit radikalının yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu, özellikle mitokondri içinde bir diğer serbest radikal olan hidroksil radikali (OH^\cdot) meydana gelir. Ayrıca, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (38).

2.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Hücresel Hasarlar

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas biyomoleküllerdir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyon olarak tanımlanır. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyona ‘‘nonenzimatik lipid peroksidasyon’’ denir. Lipid peroksidasyon yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra ortamda kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi boyutlarda etkileyebilir. Lipid radikali (L^*) dayanıksız bir bileşiktir. Lipid radikallerinin (L^*) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO^*) oluşur. Bu radikal de membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu zaman biyolojik anlamda aktif olan aldehitler oluşur. Ayrıca, serbest oksijen radikalleri yapısında triptofan, tirozin, metionin, histidin, sistein ve sistin gibi amino asitler bulunan proteinlerde hasar oluştururlar. Serbest oksijen radikalleri ve özellikle $OH\cdot$ DNA yapısındaki bazların oksidasyonu ile DNA hasarı yapmaktadır (35-40).

2.4. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin üretimi ile biyolojik sistemlerin reaktif ara ürünleri detoksifiye etme veya bunların sebep olduğu hasarı tamir etme arasındaki dengesizliğin ortaya çıkardığı bir durumdur. Tüm canlı formlarının hücrelerinde bir indirgeyici ortam mevcuttur. Bu indirgeyici ortam enzimler tarafından korunur. Enzimler metabolik enerjiyi sabit bir düzeyde tutarak bu indirgeme (redoks) durumunun devamlılığını sağlarlar. Peroksitlerin ve serbest radikallerin oluşması sonucunda meydana gelen redoks durumundaki bozulmalar, proteinler, lipitler ve DNA da dahil olmak üzere hücrenin tüm bölümlerinde hasara sebep olur. İnsanlarda oksidatif stres birçok hastalıkla yakından bağlantılıdır. Bunlar arasında ateroskleroz, Parkinson hastalığı, kalp rahatsızlıkları, kalp kası enfarktüsleri ve Alzheimer hastalığı yer alır. Kısa süreli oksidatif stres yaşlanmanın önlenmesi konusunda önemli olabilir. Reaktif oksijen türleri faydalı da olabilir. Bağışıklık sistemi tarafından patojenlere saldırmak ve

onları öldürmek amacıyla kullanılabilirler. ROS aynı zamanda hücre sinyalizasyonunda da görev alır (41, 42).

Oksidatif stresin yıkıcı yönü reaktif oksijen türlerinin üretimidir. Serbest radikaller ve peroksitler bunlara dahildir. Süperoksit gibi daha az reaktif olan türler, oksiredüksiyon tepkimeleri ile geçiş metallerine veya diğer redox siklusu bileşenlerine (kuinon dahil) çevrilebilir. Bunlar daha yıkıcı etkiye sahip radikal türleridir ve yaygın hücre hasarına sebep olabilirler (43). En önemli etkileri, DNA hasarıdır (44). Bu oksijen türevi türlerin çoğu, normal aerobik metabolizmalarda düşük seviyelerde üretilirler ve sebep oldukları hücre hasarları hemen tamir edilir. Bununla beraber şiddetli oksidatif stres olgularında nekrozlar oluşabilir. Bu hasar, ATP tüketimine, hücre ölümünün kontrolünün engellenmesine ve hücrenin ölümüne neden olur (45, 46).

2.4.1. Oksidanların Üretimi ve Tüketimi

İnsanlarda normal şartlarda reaktif oksijenin bir kaynağı oksidatif fosforilasyon boyunca mitokondriden aktive edilmiş oksijen sızmasıdır. Ancak transport zincirinde bir elektron kaybetmiş olan *E. coli* mutantları da hidrojen peroksit üretirler. Bir diğer ihtimal de çoklu redoks-aktif flavoproteinlerin normal şartlarda oksidan üretimine katkıda bulunmasıdır. Süperoksit üretebilen diğer enzimler ksantin oksidaz, NADPH oksidazlar ve sitokrom P450'dir. Hidrojen peroksit, birçok oksidazın da dâhil olduğu çok çeşitli enzimler tarafından üretilirler. Reaktif oksijen türleri, hücresel iletimde önemli roller oynarlar. Bu sürece redoks iletimi adı verilir. Hücredeki dengenin devam ettirilmesi için reaktif oksijen üretimi ve tüketimi arasında bir dengenin olması gerekir (47-51).

2.5. ANTIOKSİDANLAR

Oksijen zehirli etkiye sahip bir maddedir. Aerob organizmalar yaşamlarını sadece antioksidan savunma sistemleri olduğu için sürdürebilmektedirler. Antioksidanlar, oksidatif stresin şiddetini azaltmaya yardımcı olan maddeler olarak tanımlanabilir. Bu etkilerini daha az aktif bir radikal oluşturmak veya proteinler, lipidler, karbonhidratlar veya DNA gibi substratlar üzerindeki serbest radikal zincir tepkimesi zararını ortadan kaldırmak suretiyle gösterirler (52, 53).

Vücutta enzimatik (endojen) ve enzimatik olmayan (özellikle gıdalarla alınanlar) bir dizi antioksidan etkin durumdadır. Bunların tamamı hücre içi veya hücre dışı antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidan enzimler arasında SOD, CAT ve GSH-Px

bulunur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında çeşitli serbest radikaller bulunur. Vitamin A (retinol), vitamin C (askorbik asit), vitamin E (tokoferol), flavonoidler, tioller (glutasyon), ubideseranon, ürik asit, bilirubin, ferritin ve enzimatik ko-faktör benzeri etki eden mikrobeseinler (demir, bakır, çinko, selenyum, manganez) bu grup içinde yer alır. Antioksidan sistemlerin etkinliği beslenmeyle vücuda alınanlara (vitaminler ve mikrobeseinler) ve endojen antioksidan enzim üretimine bağlıdır. Endojen antioksidan enzim sentezi egzersiz, antreman, beslenme ve yaşlanma durumuna bağlı olarak değişebilir (53-55).

Antioksidan savunma sistemlerinde bulunan birçok enzim prooksidanlar ile antioksidanlar arasında dengeyi sağlamaktadır (56). Antioksidan enzimler, elementlerin indüklediği zehirlenme durumları da dahil patolojik durumlarda hücrelerin ortak savunma mekanizmaları olarak görülmektedirler (56, 57).

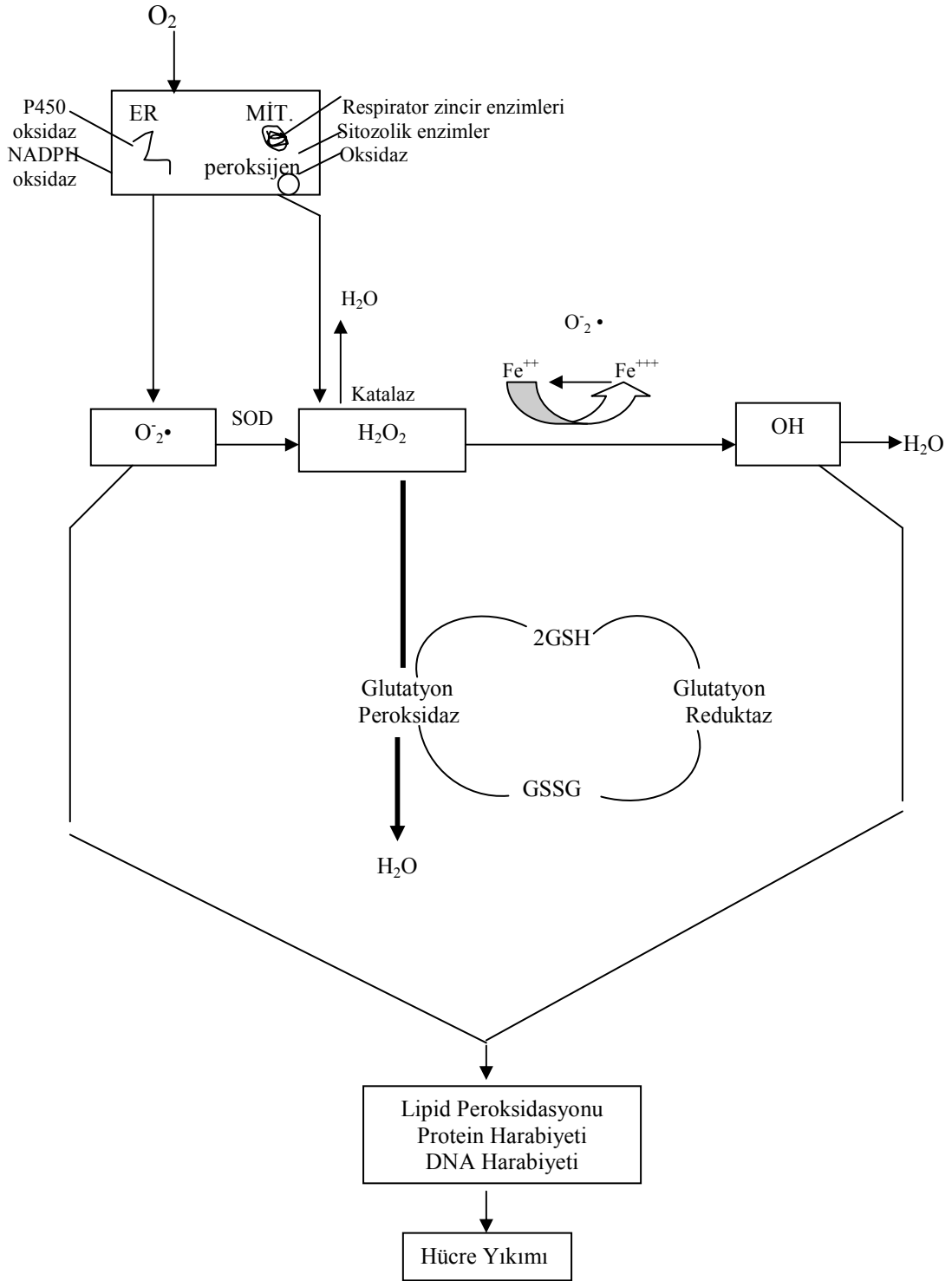
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

SOD süperoksit radikallerine karşı en önemli savunmadır. Ayrıca oksidatif strese ilk savunma basamağıdır. SOD enzim sistemi $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ve H_2O_2 'nin oluşumunu katalize eden bir grup enzimi içine alır. Zira, vücutta SOD'un farklı formları vardır. Manganez, MnSOD'un bir ko-faktörüdür ve mitokondrilere yerleşmiştir. Aynı şekilde demir ve bakır da CuZnSOD'un ko-faktörleridir ve sitosolde bulunur. CAT tüm hücrelerde yer alır. Özellikle peroksizomlarda zehirli maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanan ve H_2O_2 üreten hücre kültürlerinde bulunur. CAT H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürür. CAT aynı zamanda bazı zehirli maddeleri peroksidaz tepkimesi aracılığı ile detoksifiye etmek için H_2O_2 'yi kullanılır. Bu tepkime, fenol, alkol (etanol) veya formik asit gibi bir substratlara gereksinim gösterir. GSH-Px hücre sitozolünde ve mitokondrilere bulunur; H_2O_2 'yi suya dönüştürür. Bu tepkimede GSH kullanılır ve okside glutasyona çevrilir (GSSG). GSH-Px ve CAT'ın her ikisi de H_2O_2 üzerinde etkili olmakla birlikte; reaktif oksijen türleri yüksek seviyede olduğunda GSH-Px daha etkilidir. Daha düşük H_2O_2 yoğunluğunda ise CAT önemli etkinliğe sahiptir (Şekil 2.3) (53).

2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

GSH enzimatik olmayan bir antioksidandır ve sülfidril grupları içeren bir tripeptittir. Serbest radikalleri etkisiz kılar. Aynı zamanda enzimleri ve aktif proteinleri korumak amacıyla kendi sülfidril gruplarını da verebilmektedir. Ayrıca, peroksidaz reaktif

oksijen türlerinin inhibisyonunda GSH-Px için bir substrat gibi görev alır. Vitamin-E yağda çözünebilen bir vitamindir; hücrelerde ve mitokondrial membranlarda çok miktarda bulunması ve doğrudan ROS üzerinde etkili olabilmesi nedeniyle, en önemli zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Vit C ekstraselüler sıvının önde gelen antioksidanıdır. Fakat aynı zamanda sitozolde de etkilidir. ROS'ları [OH \cdot , O $_2\cdot$, yağ asidi peroksil radikali (LOO \cdot) ve alkoksil radikali (RO \cdot)] nötralize etme yeteneğine sahiptir. Vit A yağda çözünebilen bir vitamindir ve birçok yağın yapısında bulunur. Karoten hücre membranında bulunur ve vücutta ihtiyaç olduğunda Vit A'ya dönüştürülür. Karotenin reaktif oksijen türlerini (özellikle tek oksijen ve lipid radikalleri) çalışmaz duruma getirdiği ve lipid peroksidasyonun şiddetini azalttığı düşünülmektedir. Flavonoidler (F1-OH) fenolik bileşiklerdir. Flavonoidler antioksidan etkilerini prooksidan enzimleri inhibe ederek veya Fe $^{+2}$, Fe $^{+3}$ veya Cu $^{+2}$ gibi prooksidan iyonlarla bileşik oluşturarak gösterirler. Flavonoidler aynı zamanda hidrojen atomu vererek bazı reaktif oksijen türlerini yakalayabilme özelliğine de sahiptirler. Tioller aktif bölgelerinde sülfidril kalıntısı (-SH) bulundurmakla karakterize moleküllerdir. Tioller bir sistein prekürsörü olan metionin ve sistein sülfür amino asitlerinden sentezlenirler. Koenzim Q $_{10}$ (CoQ $_{10}$) ATP sentezi için gerekli olan endojen bir moleküldür. Özellikle mitokondri membranında bulunur. Bu bileşik antioksidan etkisini doğrudan peroksil radikallerine etki ederek ya da dolaylı olarak Vit C ve Vit E'yi tekrar oluşturmak suretiyle gösterir (53). Ürik asit insanlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Plazma ve kaslarda bulunan ürik asit tekli oksijene, HOCL'ye, peroksil radikallerine, peroksinitrite ve ozona doğrudan etkiyen önemli antioksidanlardan biridir. Sıcak şok proteinleri (HS) farklı stres türlerine karşı koruyucu olduğu bilinen bir grup proteindir. Bu yapılar antioksidan olarak kabul edilirler çünkü hücreleri ve hücre içi proteinleri serbest radikallerin yol açtığı hasarlardan korurlar. Demir metabolizmasının başlıca proteinlerinden olan ferritin serbest radikal hasarını önler. Albümin, seruloplazmin ve bilirubin serbest radikallere elektron vererek zincir kırıcı antioksidanlar olarak etki gösterirler (Şekil 2.3) (53, 57, 58).



Şekil 2.3. Reaktif oksijen metabolitlerinin açığa çıkışı ve ilgili antioksidan metabolizmalar (20)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

1. UV-VIS Spektrofometre (Thermo Helios α)
2. Su banyosu (Nüve BM402)
3. Vorteks (Heidolph Reaxtop)
4. Santrifüj (Nüve NF 800R)
5. Santrifüj (Sigma 3K30)
6. pH metre (Metler Toledo)
7. Derin dondurucu Nofrost (Beko -20 °C)
8. Derin dondurucu (Sanyo Ultra- MDF-U3086S -80 °C)
9. Hassas terazi (Sartorius)
10. Homojenizatör (Heidolph Silient Crusher M)
11. Hassas terazi (Sartorius TE3102S)
12. Manyetik karıştırıcı (Elektro Mag-M21)
13. Buz Makinesi (Kale Buzzbar)
14. Deiyonize su cihazı (Millipore)

15. Antikoagulantlı ve antikoagulantsız cam tüp

16. Kanül

3.1.2. Kimyasallar

1. Tiyobarbitürük asit (TBA) (Merck 108180)
2. n-Butanol (Merck 100988)
3. Triklorasetik asit (TCAA) (Merck100810)
4. Folin fenol (Merck 109001)
5. Potasyum sodyum tartarat tetrahidrate ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4 H_2O$) (Merck 108087)
6. Bakır sülfat ($CuSO_4$) (Merck 102791)
7. Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck 106392)
8. N-naftiletilendiamin dihidroklorür (NED) (Merck 106237)
9. Sülfanilamid ($C_6H_8N_2O_2S$) (Merck 11799)
10. Sodyum nitrit ($NaNO_2$) (Merck 106549)
11. Orto-fosforik asit (Merck 100563)
12. Potasyum hekzo siyano ferrat ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Merck 104971)
13. Sodyum di hidrojenfosfat dihidrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$) (Merck 106345)
14. Sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$) (Merck 106329)
15. Di-sodyum hidrojen dodesahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$) (Merck 106573)
16. Potasyum siyanid (KCN) (Merck 104965)
17. Sodyum hidroksit (NaOH) (Carlo Erba 480507)
18. Redükte glutasyon ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) (Merck 104090)
19. Sodyum azid (NaN_3) (Merck 106688)
20. Etilendiamin tetraasetik asit potasyum (EDTA) (Merck 814696)
21. Nikotinamid adenin di nükleotid fosfat tetrasodyum NADPH+H(Sigma N6505)
22. Glutasyon redüktaz (NAD(P)H) (Sigma G3664-2.5KU)
23. t-bütil hidroperoksit (t-BOOH) (Fluka 19995)

24. Potasyum di hidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck 104873)
25. Dodesil sulfat sodyum salt ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_2\text{ONa}$) (Merck 113760)
26. Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 108600)
27. Pridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) (Merck 107462)
28. Glasiyel asetik asit (CH_3COOH) (Merck 100056)
29. 2-Tiyo barbitürük asit ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) (Merck 108180)
30. Nitro blue tetrazolium ($\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_6 \cdot 2\text{Cl}$) (Sigma N6876)
31. Ksantin ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$) (Sigma X0626)
32. Ksantin oksidaz (Sigma X1875)
33. Sığır albümini (Sigma A4503)
34. Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Merck 101217)
35. Bakır klorit di hidrate ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck 102733)
36. Sodyum klorür (Merck 116224)
37. Hemoglobün (Sigma H-2500)
38. 1.1.3.3. tetraetoksipropan (Sigma, T 9889).
39. Sodyum Arsenit (Merck 1.06277)
40. Çuha Çiçeği Yağı (Solgar)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada sağlıklı, 48 adet 150-200 g ağırlığında Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır ve her bir grupta 12 rat olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda tutulmuştur. Her kafeste 4 hayvan bulunduran polietilenden yapılmış rat kafeslerine yerleştirilmiştir. Yemleri ve suyu *ad libium* olarak önlerinde bulundurulmuştur. Barındıkları ortamın ısısı 20-22 °C'de tutulmuştur. Deneme süresi boyunca % 23 ham protein, % 7 ham selüloz ve 3100 Kcal/kg metabolik enerji içeren rat pellet yemi ile beslenmiştir.

3.2.2. Gruplar

Birinci Grup: Kontrol olarak tutulmuştur. Hayvanlara yem ve su dışında herhangi bir bileşik verilmemiştir.

İkinci Grup: Hayvanlara ağızdan sonda ile 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı sonda ile ağızdan 30 gün süreyle verilmiştir.

Üçüncü Grup: Hayvanlara, içme suyu ile 100 ppm Na-arsenit 30 gün süreyle *ad libitum* olarak verilmiştir.

Dördüncü Grup: Hayvanlara, içme suyu ile 100 ppm Na-arsenit *ad libitum* verilirken, eş zamanlı olarak 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı sonda ile ağızdan 30 gün süreyle verilmiştir.

3.2.3. Örneklerin Toplanması

Otuzuncu günün sonunda bütün gruptaki hayvanlardan hafif eter anestezisi altında heparinli tüplere kan alınmıştır. Hayvanların kan alma sonunda ölümünü takiben karaciğer, akciğer, kalp, böbrek, dalak, beyin ve testis dokuları çıkarılmıştır

3.2.4. Eritrositlerin Yıkınması ve Hemolizatların Hazırlanması

Plazma ayrıldıktan sonra kanın şekilli elemanlarını oluşturan kısma eşit miktarda tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ilave edilmiştir. Tüpler hafifçe çalkalanarak ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte toplanan eritrosit ve lökosit tabakası uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. En son aşamada yıkanmış eritrosit tabakasından 0,5 ml alınarak üzerine aynı hacimde tuzlu fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiştir ve hafifçe karıştırılmıştır (59). Numuneler analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklanmıştır. Analize hazırlanan numunelerden alınarak 1/5 oranında buz soğukluğunda su ilave edilmiş ve eritrositlerin hemolizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hemolizat hemoglobin düzeyi ile CAT ve GSH-Px aktivitesi; hemolizattan kloroform/etanol ile ekstrakte edilmiş olan faz ise SOD aktivitesi ölçümü için kullanılmıştır.

3.2.5. Doku Homojenatının Hazırlanması

Çıkarılan dokular buz soğukluğunda deiyonize su ile yıkanarak kan ile yağ ve bağ dokuları uzaklaştırılmıştır. Dokulardan 1 g alınarak 1/5 oranında hazırlanan tampon (140 mM KCl, 10mM NaHCO₃, 3mM KH₂PO₄ and 2mM K₂HPO₄/L; 950 ml deiyonize

suda çözdürülerek 5 N NaOH ile pH'sı 7.2'ye ayarlanmış ve 1000 ml'ye tamamlanmıştır) ilave edilmiş ve homojenizatör kullanılarak 20000 rpm'de 15 sn homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Homojenat soğutmalı (+4 °C) santrifüje yerleştirilerek 15000 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edilmiştir ve üst faz ayrı bir ependorfa alınmıştır.

3.2.6. Biyokimyasal Analizler

3.2.6.1. Eritrosit ve Doku MDA Ölçümü

Ölçümlerde Yoshioka ve ark (60)'nın bildirdiği yöntem esas alınmıştır. Yöntemin prensibi asit koşullar altında tiyobarbitürik asit ile MDA'nın pembe renkli bir ürün oluşturmasına dayanır. Tüplere 0,5 ml plazma alınmış ve sırasıyla üzerine 2,5 ml % 20'lik triklorasetik asit ve 0,5 ml % 0,67'lik tiyobarbitürik asit ilave edilmiştir. Aynı işlem plazmasız olan kör tüplerinde de tekrarlanmıştır. Tüpler kaynar su banyosunda 30 dakika tutulmuştur ve ardından hızla soğutulularak üzerine 4 ml n-butanol ilave edilmiştir. Vorteksde 30 saniye kadar vortekslenmiş ve 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben üstte kalan n-butanol tabakası alınarak 535 nm'de n-butanol körüne karşı ölçülmüştür. Numune ölçümü sonucu elde edilen absorbanslar önceden 1.1.3.3. tetraetoksipropanda hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak nmol/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Doku yönteminin prensibi de plazma MDA ölçümünde olduğu gibi MDA'nın tiyobarbitürik asit ile asit ortamda verdiği pembe renkli kompleksin renk şiddetinin 535 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Doku MDA analizleri, Ohkawa ve ark (61)'nin metodu esas alınarak yapılmıştır. Buna göre vida kapaklı tüplere sırasıyla 0,2 ml doku homojenatı, 200 µl sodyum loril sülfat (% 8,1), 1,5 ml asetat tamponu, 1,5 ml TBA çözeltisi (% 0,8) ve 600 µl deiyonize su konulmuş ve kapakları sıkıca kapatılmıştır. Karışım, 95 °C'ye ayarlanan su banyosunda 60 dakika süre ile beklemeye bırakılmıştır. Soğutulan tüplere 1 ml deiyonize su ve 5 ml n-butanol/piridin (15:1) çözeltisi ilavesi ile 30 sn vortekslenmiştir. Ardından 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pembe renkli üst fazın absorbansı 535 nm'de köre karşı okunmuştur. Elde edilen absorbanslar daha önce 1.1.3.3. tetraetoksipropan ile hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak sonuçlar nmol/mg-protein cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Eritrosit Hemoglobin Düzeyi Ölçümü

Ölçümlerde, Fairbanks ve Klee (62)'in bildirdiği yöntem kullanılmıştır. Yöntemin esası siyanomethemoglobin oluşumunun ölçümüne dayanır. Drabkin reaktifinden [0,2 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 g KCN ve 1,0 g $NaHCO_3$ tartıldı ve hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı] 6 ml alınmış ve üzerine 40 µl hemolizat ilave edilmiştir ve 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Drabkin reaktifine karşı 540 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar mgHb/ml hemolizat olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.3. Doku Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Doku protein düzeyinin belirlenmesinde Lowry (63)'nin tanımladığı ve Miller (64) tarafından modifiye edilmiş metot kullanılmıştır. Yöntemin esası, tirozin ve triptofan artıkları ile alkali bakır ve fenol reaktifinin verdiği mavi renkli oluşumun renk şiddetinin 540 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için homojenize edilmiş dokuların süpernatantından 100 µl alınarak deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Üzerine 1 ml bakır reaktifi eklenerek tüpler 30 sn vortekslenmiştir. Oda ısısında 10 dakika beklemeye bırakılmıştır. Ardından 3 ml folin fenol reaktifi (1/10) eklenerek tüpler 30 sn vortekslenmiştir. Karışım 50 °C'ye ayarlanan su banyosunda 10 dakika beklemeye bırakılmıştır. Oluşan mavi renkli bileşimin absorbansı 540 nm'de köre karşı okunmuştur. Elde edilen absorbanslar daha önceden sıgır albümini ile aynı işlemler tekrarlanarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisine göre mg-protein/ml homojenat cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.4. Eritrosit ve Doku CAT Aktivitesi Ölçümü

Ölçümlerde, Luck (65) tarafından geliştirilen yöntem esas alınmıştır. Metodun prensibi hidrojen peroksitin numunede bulunan katalaz ile yıkımlanması esasına dayanmaktadır.

Kör küvetine 2,95 ml 50 mmol'lük pH 7'de fosfat tampon (3,522 g KH_2PO_4 ve 5,796 g Na_2HPO_4 eklenmiş ve hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı) konulmuş ve üzerine 50 µl hemolizat veya doku süpernatantı ilave edilmiştir. Numune küvetine ise fosfat tamponda hazırlanmış 10 mmol/L'lik hidrojen peroksit (100 ml fosfat tamponu üzerine 0,13 ml % 35'lik H_2O_2 çözeltisi ilave edildi ve 240 nm'de fosfat tampona karşı okunan absorbansı 0,500'e ayarlandı) çözeltisinden 2,95 ml konulmuş ve üzerine 50 µl hemolizat ilave edilmiştir. Ölçümler 240 nm'de kör küvete göre (45 saniyedeki düşüş) yapılmıştır. Sonuçlar, k/mgHb ve k/mg-protein cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.5. Eritrosit ve Doku SOD Aktivitesi Ölçümü

Sun ve ark (66)'nın bildirdiği yöntem kullanılmıştır. Yöntemin esası süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitroblue tetrazoliumu indirgememesinin numunede bulunan süperoksit dismutaz tarafından engellenmesine dayanır. Renksiz NBT iyonu, süperoksit radikali ile indirgendiğinde maksimum absorbanı 560 nm'de veren mavi renkli formazona dönüşür. Bu reaksiyon sırasında, numunedeki SOD aktivitesi ile orantılı olarak bir absorban düşmesi gözlenir.

Cam tüplere alınan 0,5 ml eritrosit hemolizatu veya doku süpernatantı üzerine 0,5 ml kloroform/etanol (3/5 v/v) karışımı ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. Ardından tüpler 3000 devirde, +4 °C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan berrak kısım analiz için kullanılmıştır. Tüplere sırasıyla 0,5 ml numune ekstraktı, 2,45 ml SOD reaktif karışımı [SOD reaktifi için 100 ml balon joje içerisinde 20 ml ksantin çözeltisi (3 mmol/L), 10 ml EDTA (0,6 mmol/L) çözeltisi, 10 ml NBT (0,15 mmol/L) çözeltisi, 6 ml amonyum sülfat (2 mol/L) çözeltisi ve 3 ml sığır albümini (1 g/L)] ilave edilmiştir. Daha sonra da, 50 µl ksantin oksidaz çözeltisi (50 U/4,7 ml'lik ksantin oksidazdan 83 µl alınarak 2 ml 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisi içine katıldı) eklenmiştir. Tüpler 20 dakika 25 °C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda, 1,0 ml CuCl₂ (0,8 mmol)'den ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve ölçümler 560 nm'de gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, U/mgHb ve U/mg-protein cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6.6. Eritrosit ve Doku GSH-Px Aktivitesi Ölçümü

Ölçümler için Paglie ve Valentie (67)'nin yöntemi kullanılmıştır. Metodun prensibi NADPH aracılığı ile glutasyon redüktaz kullanılarak indirgenmiş glutasyonun oksidasyonu esasına dayanır.

Analizde kör ve numune tüplerine 1 ml fosfat tampon (pH 7,0 ve 100 mmol/L), 0,1 ml EDTA (10 mmol/L), 0,1 ml NaN₃ (20 mmol/L), 0,1 ml NADPH+H⁺ (3 mmol/L), 0,1 ml redükte glutasyon (20 mmol/L) ve 0,2 ml aktivitesi ayarlanmış glutasyon redüktaz (2 U/numune) katılmıştır. Numune tüplerine 0,05 ml hemolizat ve doku süpernatantı, kör tüpüne 0,05 ml fosfat tampon ilave edilmiştir. Ardından tüpler 2-3 dakika 37°C'de bekletilmiştir. Üzerine 0,2 ml distile suda yoğunluğu ayarlanmış t-BOOH çözeltisi ilave edilerek 1 dakika süredeki 366 nm'deki absorban düşüşü kaydedilmiştir. Sonuçlar µmol NADPH⁺/gHb ve µmol NADPH⁺/g-protein cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.6.7. Plazma ve Doku NO Düzeyinin Ölçümü

Nitrik oksit ölçümleri Griess yöntemi esasına göre, Tracey ve ark (68)'nin bildirdikleri metoda göre yapılmıştır. Ependorf tüpleri içine sırasıyla 25 µl plazma veya doku süpernatantı, 8 µl NADPH (200 mikromol/L), 1 µl FAD (10 mikromol/L), 20 mMol'lük 126 µl fosfat tampon ile 40 µl nitrat redüktaz (1 U/ml) ilave edilmiş ardından vortekslenmiştir. Numuneler 37 °C'de 20 dakika su banyosunda bekletilmiş ve üzerine 10 µl çinko sülfat çözeltisi (300 mg/L) ilave edilmiştir. Ardından 10000 g'de 5 dakika soğutmalı santrifüjde (+4 °C) santrifüj edilmiş ve üstte kalan fazdan 50 µl ELISA mikropleytlere konulmuştur. Üzerine 50 µl Griess Reaktifi [NEDD (1 mg/ml) ve sülfanilamid (20 mg/10 ml fosforik asit çözeltileri) 1:1] ilave edilmiştir; ışısız ortamda 10 dakika bekletilmiş ve ELISA okuyucuda 540 nm'de köre karşı okunmuştur. Sonuçlar, µmol/mgHb ve µmol/mg-protein şeklinde hesaplanmıştır.

3.3. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR

İstatistiksel hesaplamalarda SPSS 13,0 istatistik programı kullanılmıştır. Çalışmada veriler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans (ANOVA) analiziyle yapılmıştır. Farklılık gösteren gruplar ise DUNCAN testi ile tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI

Kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve testis dokusunda önemli bir düşüş tespit edilmiştir. SOD aktivitesinde beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş, eritrositte önemli bir artış bulunmuştur. CAT aktivitesinde dalak, testis ve karaciğer dokusunda önemli bir düşüş, akciğer ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir artış gözlenmiştir. GSH-Px aktivitesinde ise dalak ve beyin dokusunda önemli bir düşüş, eritrositte önemli bir artış söz konusu olmuştur. Kontrol grubuna göre MDA düzeyinde beyin ve kalp dokusu ile eritrositte; SOD aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve testis dokusunda; CAT aktivitesi için böbrek ve beyin dokusunda; GSH-Px aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek, kalp ve testis dokusunda; NO düzeyinde plazma ve bütün dokulardaki değişimler önemsiz bulunmuştur (Tablo 4.1-4.8).

4.2. ARSENİK

Kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir artış bulunmuştur. SOD aktivitesinde akciğer, böbrek, dalak, testis ve kalp ile eritrositte önemli bir artış varken, beyinde önemli bir düşüş mevcuttur. CAT aktivitesinde ise karaciğer, akciğer ve testis dokusunda önemli bir düşüş gözlenmişken, böbrek, dalak, beyin ve kalp dokusu ile eritrositte artış tespit edilmiştir. GSH-Px aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek ve dalak dokusu ile

eritrositte önemli bir artış, testis ve beyin dokusunda önemli bir düşüş vardır. NO düzeyinde, karaciğer, akciğer, böbrek, testis, beyin ve kalp ile eritrositte önemli bir artış mevcuttur. Kontrol grubuna göre, SOD aktivitesinde karaciğer dokusunda; GSH-Px aktivitesinde kalp dokusunda; NO düzeyinde dalak dokusunda önemli bir fark yoktur (Tablo 4.1-4.8).

4.3. ARSENİK İLE ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI

Kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde, akciğer ve beyin dokusunda önemli bir artış bulunmuştur. SOD aktivitesinde karaciğer ve beyin dokusunda önemli bir düşüş varken akciğer, böbrek ve dalak dokusu ile eritrositte önemli bir artış tespit edilmiştir. CAT aktivitesinde dalak ve testis dokusunda önemli bir düşüş, eritrositte önemli bir artış gözlenmiştir. GSH-Px aktivitesinde beyin dokusunda düşüş, eritrositte ise artış yönünde önemli bir değişim gerçekleşmiştir. NO düzeyinde akciğer, testis, kalp ve beyin dokusu ile plazmada önemli bir artış varken, dalak dokusunda önemli bir düşüş söz konusudur (Tablo 4.1-4.8).

Değerlendirme yalnızca arsenik verilen gruba göre yapıldığında, MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş bulunmuştur. SOD aktivitesindeki değişimler, karaciğer, böbrek, testis ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş şeklindedir. CAT aktivitesinde karaciğer, akciğer ve testis dokusunda önemli bir artış; böbrek, beyin, kalp ve dalak dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş mevcuttur. GSH-Px aktivitesindeki değişimler karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş şeklinde gerçekleşmiştir. NO düzeyindeki değişimler karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş tarzındadır (Tablo 4.1-4.8).

Kontrol grubuna göre, MDA düzeyinde karaciğer, böbrek, kalp, dalak ve testis dokusu ile eritrositte önemli bir değişim yoktur. Aynı durum SOD aktivitesinde testis ve dokusunda; CAT aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek, beyin ve kalp dokusunda; GSH-Px aktivesinde karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, dalak ve testis dokusunda; NO düzeyinde karaciğer ve böbrek dokusu değerlerinde de söz konusudur (Tablo 4.1-4.8).

Tablo 4.1. Kontrol ve deneme grubu karaciğer dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	1,84±0,43b	0,83±0,16c	2,92±0,47a	2,10±0,79b
SOD (U/mg-protein)	1,37±0,63a	1,76±1,09a	1,94±0,46a	0,71±0,36b
CAT (k/g-protein)	868,92±243,61a	597,88±195,07bc	540,32±201,94c	746,054±182,13ab
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	49,10±18,72a	63,27±20,41a	306,90±132,64b	98,84±29,10a
NO (µmol/mg-protein)	0,34±0,07a	0,32±0,08a	0,45±0,04b	0,37±0,12a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.2. Kontrol ve deneme grubu akciğer dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	2,09±0,29a	1,40±0,38b	3,78±1,17c	3,15±0,61d
SOD (U/mg-protein)	2,73±1,32a	2,22±0,88a	4,06±1,20b	4,97±1,53b
CAT (k/g-protein)	57,70±10,34a	73,89±17,75b	38,73±20,35c	54,50±18,89a
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	80,66±20,89a	105,89±38,28a	186,99±47,69b	92,05±50,40a
NO (µmol/mg-protein)	0,45±0,19a	0,43±0,10a	0,66±0,13b	0,63±0,15b

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.3. Kontrol ve deneme grubu böbrek dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	2,28±0,40a	1,16±0,29b	4,38±1,09c	1,96±0,40a
SOD (U/mg-protein)	2,09±1,07a	2,63±1,54ab	4,09±0,37c	3,26±0,46b
CAT (k/g-protein)	195,48±67,65a	252,00±146,45a	465,26±148,24b	156,97±32,28a
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	72,94±21,68a	92,09±36,86a	167,70±38,88b	78,43±37,19a
NO (µmol/mg-protein)	0,34±0,10a	0,30±0,06a	0,55±0,19b	0,30±0,06a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.4. Kontrol ve deneme grubu beyin dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	2,57±0,60a	3,55±0,97a	8,19±1,46b	5,65±2,06c
SOD (U/mg-protein)	10,18±3,32a	4,75±2,68b	4,56±3,96b	6,82±2,26b
CAT (k/g-protein)	25,51±8,76a	20,06±10,39a	61,92±24,73b	26,25±11,39a
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	65,53±14,88a	31,95±14,35b	38,77±14,41b	36,69±21,47b
NO (µmol/mg-protein)	0,06±0,03a	0,07±0,04a	0,22±0,05b	0,16±0,06c

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 4.5. Kontrol ve deneme grubu kalp dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	2,16±0,72a	1,69±0,36a	3,62±1,10b	1,88±0,81a
SOD (U/mg-protein)	3,77±0,73b	2,59±0,67c	4,79±1,55a	3,45±1,25bc
CAT (k/g-protein)	41,80±20,61a	61,99±22,19b	74,77±14,41b	39,89±19,57a
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	87,85±23,42ab	76,56±32,56a	110,62±38,78b	75,41±34,01a
NO (µmol/mg-protein)	0,19±0,05a	0,22±0,05a	0,64±0,12b	0,40±0,12c

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.6. Kontrol ve deneme grubu dalak dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	3,25±0,74a	2,16±0,70b	4,00±0,85c	2,69±0,62ab
SOD (U/mg-protein)	1,68±0,74a	1,67±0,54a	3,04±0,60b	2,71±0,48b
CAT (k/g-protein)	71,60±17,82a	49,81±16,57b	118,80±23,24c	36,62±16,00b
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	70,08±18,85a	44,91±23,51b	113,33±26,48c	76,95±39,19a
NO (µmol/mg-protein)	0,55±0,15a	0,64±0,06a	0,64±0,12a	0,43±0,13b

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.7. Kontrol ve deneme grubu testis dokusu oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	3,19±0,82a	1,11±2,27b	6,88±1,23c	3,81±1,16a
SOD (U/mg-protein)	2,05±1,35a	3,02±1,74a	7,34±1,26b	3,28±1,46a
CAT (k/g-protein)	81,51±18,28a	56,42±19,30bc	42,80±,13,11c	60,09±18,29b
GSH-Px ($\mu\text{mol NADPH}^+/\text{g-protein}$)	67,95±26,72a	63,47±18,28a	36,48±12,32b	52,13±21,39ab
NO ($\mu\text{mol/mg-protein}$)	0,14±0,05a	0,16±0,05a	0,34±0,10b	0,30±0,09b

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4.8. Kontrol ve deneme grubu eritrosit oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup			
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Çuha Çiçeği Yağı)	Grup 3 (Arsenik)	Grup 4 (Arsenik+Çuha Çiçeği Yağı)
MDA (nmol/mg-protein)	0,27±0,06a	0,30±0,09a	0,40±0,17b	0,34±0,07ab
SOD (U/mg-protein)	1,35±0,29a	2,01±0,29b	3,46±0,66c	1,74±0,30b
CAT (k/g-protein)	32,60±9,48a	57,68±12,78b	84,09±15,01c	66,10±16,46b
GSH-Px (µmol NADPH ⁺ /g-protein)	30,45±7,22a	41,23±6,03b	70,17±17,56c	54,56±8,08d
NO (µmol/mg-protein)	2,20±0,76a	0,97±0,33a	3,67±1,33b	2,77±0,92b

a,b,c,d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arsenik ROS üretimini indükleyen ve oksidatif strese neden olan metaller hakkında en çok çalışma yapılanlardan biridir. Arseniğin, oksidasyona duyarlı metabolik yolları aktive ederek hücre hasarına ve ölümüne öncülük eden serbest radikalleri oluşturduğuna dair pek çok kanıt sunulmuştur. Arseniğin sadece reaktif oksijen türlerini değil, aynı zamanda süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), tekli oksijen (1O_2), peroksil radikali (ROO^{\cdot}), nitrit oksit (NO^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), dimetilarsinik peroksil radikalleri ($(CH_3)_2As^{\cdot}$) de ürettiği bilinmektedir. Bununla beraber bu reaktif türlerin oluşumundan sorumlu mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat bazı çalışmalar intermedier arsin türlerinin oluşumu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Arsenik sadece reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olmaz. Aynı zamanda lipid membranlar ve DNA'ya hasar vermek suretiyle reaktif nitrojen türlerinin de oluşmasına sebep olmaktadır (RNS: Reaktif Nitrojen Species). Arsenik aynı zamanda biyolojik sistemlerde NO üretimi alanında hakkında en fazla araştırma yapılmış olan ağır metaldir. Arsenik reaktif oksijen türleri oluşturarak lipid peroksit üretimine, glutasyon (GSH) düzeyinin azalmasına ve oksijenaz 1 (HO-1) ile peroksiredoksin-1 (Prx1) gibi oksidan protein seviyesinin artmasına yol açarak oksidatif strese sebep olmaktadır. Arseniğin sebep olduğu sitotoksitenin bu metaloidin hücrelerde fazla miktarda birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (54, 56, 57).

Bitkisel özütlerin antioksidan etkileri yapılarında bulunan fenolik bileşiklere atfedilir. Bu fenolik bileşenler, hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi oksidasyon zincirini

başlatan serbest radikallere bir hidrojen atomu vererek lipid oksidasyona engel olmaktadır. Bu yapılar aynı zamanda yağ asidi serbest radikalleri ve alkoksi radikalleri gibi substrat meydana getiren serbest radikalleri de etkisiz kılarlar. Bitkilerdeki bu bileşenler bir elektron veya hidrojen atomu vermek suretiyle, tokoferol α -tokoferole dönüşür. Bitki özütlerinde bulunan bazı fenolik bileşenler; demir, bakır ve manganez gibi metal iyonlarını şelasyona uğratarak lipid oksidasyonu geciktirmektedir. Doğal antioksidanlardan bir tanesi de çuha çiçeği tohumlarından elde edilen yağdır. Ayrıca, doğrudan lipid peroksidasyon tepkimesinin inhibisyonu ile glutasyon bağımlı antioksidan sistemin ve bazı enzimlerin aktivasyonu da bu mekanizmalar arasında yer alır. Lipid peroksidasyonu inhibe etme mekanizması ise hidrojen peroksiti ve oksijen kaynaklı serbest radikalleri bağlaması esasına da dayanır (22-28). Çuha çiçeği yağının antioksidan etkisinden de yapısında yüksek oranda bulunan fenolik bileşikler sorumludur. Diğer taraftan antioksidan özelliği bulunan vitamin E düzeyi de bu bileşiklerde oldukça yüksektir. Ayrıca pek çok etkisi bulunan esansiyel yağ asitleri (palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, δ -linoleik asit) bu bitki yağında çokça yer alır (20, 23). δ -lineoleik asit, enzimatik tepkimelerle dihom- δ -linoleik asite dönüştürülür. Dihom- δ -linoleik asit, oksidatif enzimler için araşidonat ile yarışır ve böylece araşidonat türevi siklojenaz ürünleri azalır. Bu mekanizma antienflamatuvar etkinin ilk basamağını oluşturur. Siklooksijenaz yolağının baskılanması da lipid peroksidasyonu baskılayacağından, dolaylı yoldan antioksidan etki oluşturur (29, 35-38).

Oksidatif stresin kan ve dokularda değerlendirilmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunların arasında lipid peroksidasyon ara ve son ürünlerin ölçümü ile antioksidan enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi kullanılan yöntemler arasındadır. MDA ve NO lipid peroksidasyon sırasında oluşan ürünler arasında yer almaktadır. Her iki ürün de hücredeki oksidatif hasarı yansıtır. Ayrıca hücresel enzimatik antioksidan savunma sistemlerinin durumu da oksidatif gerilimi yansıtan unsurlar içinde yer alır. Bu antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px yine sıklıkla biyolojik materyallerde analizleri gerçekleştirilen enzimlerdendir (35, 47-51, 69). Bu sebeple de arseniğin farelerde oluşturabileceği oksidatif stresin boyutu ile çuha çiçeği yağının tek başına ve arsenikle birlikte verilmesi durumunda oksidan/antioksidan sistemdeki değişimlerin değerlendirilmesinde bu beş parametreden faydalanılmıştır.

5.1. ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI

Çalışmada belirtilen süreyle çuha çiçeği yağı uygulanan grupların MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bazı dokularda (karaciğer, akciğer, böbrek, testis ve dalak) önemli bir düşüş görülmüştür. Bu durum bu bileşiğin verilen süre içinde antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği ve vücudun serbest radikalleri kompanze etme potansiyellerini artırdığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda antioksidan enzimlerden CAT, SOD ve GSH-Px'de iki yönlü değişimlerin görülmesi bu tezi destekler nitelikte bulunmuştur. Zira CAT için kalp, eritrosit, dalak, testis ve karaciğer dokusunda önemli bir düşüş, akciğer ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir artış; GSH-Px aktivitesinde dalak ve beyin dokusunda önemli bir düşüş, eritrositte önemli bir artış tespit edilmiştir. Çuha çiçeği yağının antioksidan etki oluşturma mekanizması yukarıda da ayrıntısıyla belirtildiği gibi farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu etki özetle serbest radikal oluşumunun engellenmesi veya oluşan serbest radikallerin etkisiz kılınması şeklinde açıklanabilir. Etkisiz kılma yolağı doğrudan serbest radikalleri yakalayıcı etkiden kaynaklanabileceği gibi aynı zamanda antioksidan enzim aktivitelerinin artırılmasında ileri gelebilir (22-29).

5.2. ARSENİK

Belirtilen süre ve dozda içme suyu ile verilen arseniğin ratlarda oksidatif strese sebep olduğu anlaşılmıştır. NO ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre gözlenen önemli artışlar bu durumu ortaya koymaktadır. MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin, kalp ve eritrositte önemli bir artış varken; benzer şekilde, NO düzeyinde de karaciğer, akciğer, böbrek, testis, beyin, kalp ile plazmada önemli bir artış söz konusu olmuştur. Bu durum, arseniğin farklı mekanizmalarla serbest radikallerde artışa sebep olduğunu; sonuçta da lipid peroksitlerin şekillendiğini göstermektedir. Arseniğin birikici karakterde olması canlı doku ve organlarda serbest radikal oluşturma potansiyelini de artırmaktadır. Zira vücutta şekillenen metaboliti olan arsinin bu etkideki rolü oldukça fazladır. Enzimatik olmayan antioksidan sistemdeki bazı biyolojik bileşiklerin (GSH gibi) düzeyini azaltması, oksidatif stres ürünlerinin artışı da beraberinde getirmektedir. Ayrıca peroksidasyon yolağında önemli rol olan özel protein miktarını artırması da yine önemli unsurlardandır (43, 56, 57).

Antioksidan enzimlerde kontrol grubuna göre artış ya da azalış yönünde değişimlerin tespit edilmesi zira SOD için akciğer, böbrek, dalak, testis, kalp ve eritrositte önemli bir

artış, beyinde önemli bir düşüş; CAT için karaciğer, akciğer ve testiste düşüş, böbrek, dalakta, beyin ve eritrositte önemli bir artış; GSH-Px için karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve eritrositte artış, testis ve beyinde önemli bir düşüş gözlenmesi hücrel savunma sisteminin yüksek düzeyde şekillenen serbest radikalleri etkisiz kılmaya yönelik biyolojik tepki olarak yorumlanabilir. Şöyle ki üretilen serbest radikaller bir taraftan antioksidan enzimlerce parçalanarak daha az zararlı veya zararsız bileşiklere dönüştürülme sırasında tükenme sonucu enzim aktivitesinde düşüş söz konusu olurken; diğer taraftan da normal koşulların üzerinde serbest radikal üretimi yeni antioksidan enzim sentezini beraberinde getirmekte ve sonuçta enzim aktivitesi artmaktadır.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalardan, Nandi ve ark (70)'nın ratlarda gerçekleştirdikleri ve 10 ppm dozunda 12 hafta süreyle arsenik verdikleri çalışmalarında dönemle ilişkili olarak, MDA düzeyinde eritrosit ve dokularda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış; SOD ve CAT aktivitelerinde ise iki yönlü bir değişim gözlemişlerdir. Rios ve ark (71) tarafında, 3 ppm dozunda dört hafta boyunca içme suyu ile verilen arsenikten NO ve lipid peroksit düzeyinde önemli oranda değişimler tespit etmişlerdir. Bashir ve ark (72)'nin ratlara 60 gün boyunca 0,5 ppm, 2,5 ppm ve 5 ppm dozunda verdikleri arsenik doz ile ilişkili olarak karaciğer MDA düzeyinde artışa; SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde göreceli bir düşüşe sebep olmuştur. Allen ve Rana (73), 4 mg/100 g dozunda arsenik trioksiti 30 gün boyunca hayvanlara tuzlu su içinde ağızdan uygulamış ve karaciğer ile böbrek dokusu MDA düzeyinde önemli oranda bir artış tespit etmiştir. Mishra ve Flora (74) ratlara 50 ppm dozunda 10 ay boyunca verdikleri arseniğin beyin ve kanda lipid peroksit düzeyini önemli oranda arttırdığı kanısına varmışlardır. Zarazu'a ve ark (75) 3-4 mg/kg/gün dozunda ratlara 10 gün süreyle verdikleri arseniğin beyinde NO ve lipid peroksit düzeyini önemli oranda arttırdığını vurgulamışlardır. Elde edilen sonuçlardan, farklı dozlarda ve farklı dönemlerde uygulanan arseniğin ratlarda oksidatif stres belirteçlerinde olumsuz etkilere sebep olduğu anlaşılmıştır. Mevcut çalışmada da bu yönüyle belirtilen doz ve sürede incelenen materyallerdeki oksidatif stres parametreleri ile daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında benzerlik olduğu anlaşılmıştır.

5.3. ARSENİK VE ÇUHA ÇİÇEĞİ YAĞI

Arsenik ile çuha çiçeği yağının beraber verildiği grupta MDA ve NO düzeyleri ile antioksidan enzim (SOD, CAT, GSH-Px) aktivitelerinin pozitif yönde değişim gösterdiği yani değerlerin kontrol grubu değerlerine doğru yaklaştığı anlaşılmıştır. Bu durum metalin kullanılan bileşik tarafından doğrudan bağlanması ile açıklanabileceği daha kuvvetle muhtemel, arsenik tarafından üretilen serbest radikallerin çuha çiçeği yağının bileşiminde yer alan flavanoid kaynaklı bileşiklerle bağlanması (22, 23) sonucu peroksidasyonun geriletilmesi şeklinde de açıklanabilir. Ya da yukarıda değinildiği gibi arseniğin serbest radikal oluşturma potansiyelini azaltmaya (20, 22, 23) yönelik bir mekanizmada etkin rol oynamış olabilir. Ayrıca antioksidan enzimlerin etkinliğini artıran yolak da benzer sonucu beraberinde getirebilir (22, 23). Zira yalnızca arsenik verilen gruba göre yapılan değerlendirmede MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş; NO düzeyinde karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş gözlenmiştir.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, Rana ve ark (76) ratlara 20 ppm 12 hafta süreyle uyguladıkları arseniğin eritrosit NO ve MDA düzeyinde artışa, SOD ve GSH-Px aktivitesinde ise düşüşe sebep olduğunu; koruyucu olarak verilen askorbik asitin ise analizleri gerçekleştirilen parametreleri kontrol değerlerine yaklaştırdığını ortaya koymuşlardır. Shila ve ark (77) 100 ppm dozunda 2 ay boyunca verilen sodyum arsenitin beyinin çeşitli bölümlerindeki MDA düzeyini artırırken eş zamanlı olarak SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesini düşürmüştür. Diğer taraftan aynı çalışmada uygulanan 70 mg/kg dozunda alfa-lipoik asit değerleri kontrol grubu değerlerine doğru yaklaşmıştır. Kannan ve ark (78)'nın ratlara 10 ppm dozunda 6 ay süreyle verdikleri sodyum arsenit, karaciğer, böbrek ve beyin TBARS düzeyinde artışa sebep olmuş; eş zamanlı Vit E, Vit C ve suksimer verilen gruplarda ise incelenen parametrelerde iyileşme gözlenmiştir. Srivastava ve ark (79), 50 ppm dozunda 3 hafta süreyle sodyum arsenit verdikleri ratlarda, karaciğer ve böbrek dokusu TBARS düzeyinin arttığını; fakat selenyum ve kalsiyumla birlikte verilen gruplarda ise değerlerin düzeldiğini tespit etmişlerdir. Diğer hayvan türlerinde gerçekleştirilen çalışmalardan, Sinha ve ark (80), tarafından farelere 50, 250 ve 500 µg/L dozunda 22 gün süreyle uygulanan arsenik trioksit lipid peroksit seviyesinde artışa sebep olurken, SOD, CAT, GSH-Px aktivitelerini ise düşürmüştür. Aynı çalışmada, çeşitli çay örnekleriyle gerçekleştirilen

detoksifikasyon denemelerinde ise parametrelerde olumlu değişimler söz konusu olmuştur. Das ve ark (81), ratlara ağızdan 2-14 mg/kg dozunda 2 gün süreyle verdikleri arsenik trioksitin beyindeki oksidatif parametreler üzerine etkilerini incelemişler, MDA düzeyinde artış gözlerlerken, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde ise düşüş bulmuşlardır. Arsenikle birlikte taurin ve Vit C uygulanan gruplarda ise değerler kontrol grubu değerlerine yaklaştırmıştır. Sharma ve ark (82), farelere 4 mg/kg dozunda periton içi 30 gün süreyle verdikleri arseniğin karaciğer MDA düzeyinde artışa SOD ve CAT aktivitesinde ise düşüşe sebep olduğunu tespit etmişler; *Emblica officinalis* verilen hayvanlarda ise değerlerde düzelme bulmuşlardır. Flora ve ark (83)'nın, farelere periton içi 6 hafta süreyle 2,5 mg/kg dozda verdikleri arsenik karaciğer TBARS'da artışa; SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde düşüşe yol açmıştır. Diğer taraftan aynı çalışmada 250-500 mg/kg dozunda uyguladıkları sarımsak ekstrelerinin doz ile ilişkili olarak değerleri düzelttiği anlaşılmıştır. Bu çalışmaların genelinde, antioksidant özelliği incelenen bileşiklerde değerlerin kontrol grubu değerlerine doğru yaklaştığı tespit edilmiştir. Benzer durum mevcut çalışma içinde söz konusudur.

Sonuç olarak, arsenik belirtilen doz ve sürede oksidatif strese sebep olmuştur. Kullanılan çuha çiçeği yağı olumsuz bir etkiye yol açmazken, arsenikle birlikte verilen grupta oksidatif stresi geriletici bir etki oluşturmuştur. Dolayısıyla zehirlenme veya zehirlenme riski bulunan durumlarda kullanılacak dozu ve kullanım süresi iyi ayarlamak koşuluyla sağaltıcı olarak esas sağaltım yöntemlerinin yanında tedaviyi destekleyici amaçla ya da koruyucu olarak doğrudan veya gıda katkı maddesi şeklinde kullanılabilereği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Brinkel J, Khan MH, Kraemer A. A Systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to bangladesh. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6: 1609-1619.
2. Duker AA, Carranza EJ, Hale M. Arsenic geochemistry and health. *Environ Int* 2005; 31: 631-641
3. Marcus S. Arsenic. Department of Preventive Medicine and Community Health, Toxicity. <http://emedicine.medscape.com>. Erişim tarihi: 10.05.2010.
4. Dopp E, Von Recklinghausen U, Diaz-Bone R, Hirner AV, Rettenmeier AW. Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. *Environ Res* 2010; 110: 435-442.
5. Yağmur F, Hancı H. Arsenik. *STED* 2002; 11, 250-251.
6. Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research* 2002; 62: 3893-3903.
7. Rahman MM, Naidu R. Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. *Environ Geochem Health* 2009; 31: 189-200.
8. Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12: 509-524.
9. Abernathy CO, Thomas DJ, Calderon RL. Health effects and risk assessment of arsenic. *J Nutr* 2003; 133: 1536-1538

10. Hughes MF. Arsenic methylation, oxidative stress and cancer-is there a link? *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1660-1661.
11. Nicolis I, Curis E, Deschamps P, Bénazeth S. Arsenite medicinal use, metabolism, pharmacokinetics and monitoring in human hair. *Biochimie* 2009; 91: 1260-1267.
12. Ghosh P, Banerjee M, Giri AK, Ray K. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutat Res* 2008; 659: 293-301.
13. Steinnes E. Soils and geomedicine. *Environ Geochem Health* 2009; 31: 523-535.
14. Sharma VK, Sohn M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int* 2009; 35: 743-759.
15. WHO. Arsenic. Environmental Health Criteria. 18. World Health Organization, Geneva, 1-174, 1990.
16. Khan SA. Arsenic Poisoning. A.S.P.C.A. Animal Poison Control Center, Urbana.
17. Kaya S, Akar F. Metaller ve Diğer İnorganik ve Radyoetkin Maddeler. İçinde: Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Ed), Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Medisan Yayınları, 2002; ss: 207-250.
18. De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat Res* 2009; 674: 85-92.
19. States JC, Srivastava S, Chen Y et al. Arsenic and cardiovascular disease. *Toxicol Sci* 2009; 107: 312-323.
20. NTP. Chemical information review document for evening primrose oil (*Oenothera biennis* L.) 2009; CAS No: 90028-66-3, 1-37.
21. Alice H. American medicinal leaves and herbs, U.S. Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry-Bulletin No: 219-1911.
22. Jennifer M, Moody W, Heywood JS. Pollination limitation to reproductive success in the missouri evening primrose, *Oenothera macrocarpa* (Onagraceae). *Am J Bot* 2001; 88: 1615-1622.
23. Birch AE, Fenner GP, Watkins R, Boyd LC. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4502-4507.
24. Ismail MF, EL-Maraghy SA, Sadik NAH. Study of the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of evening primrose oil in adjuvant arthritis. *AJBR* 2008; 2: 74-80.

25. Hederos CA, Berg A. Epogam evening primrose oil treatment in atopic dermatitis and asthma. *Arch Dis Child* 1996; 75: 494-497.
26. Favati F, King JW, Mazzati M. Supercritical carbon dioxide extraction of evening primrose oil. *JAOCS*, 1991; 68: 422-427.
27. Riaz A, Khan RA, Ahmed SP. Assessment of anticoagulant effect of evening primrose oil. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22: 355-359.
28. Golabczak J, Strakowska J, Stan A. Modification of proteins from evening primrose by transglutaminase. *Chem Pap* 2004; 58: 415-417.
29. Ammar NM, Soroor KHA, Mohammed, DA. Impact of natural oils supplements on disease activity and antioxidant state of Egyptian patients with rheumatoid arthritis. *MJIAS* 2000; 13: 161-171.
30. Kerscher MJ, Korting HC. Treatment of atopic eczema with evening primrose oil: rationale and clinical results. *Clin Investig* 1992; 70: 167-171.
31. Yoon S, Lee J, Lee S. The Therapeutic effect of evening primrose oil in atopic dermatitis patients with dry scaly skin lesions is associated with the normalization of serum gamma-interferon levels. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15: 20-25.
32. Belch JJF, Hill A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 352-356.
33. Cerolini S, Surai PF, Speake BK, Sparks NH. Sparks, dietary fish and evening primrose oil with vitamin E effects on semen variables in cockerels. *Brit Poultry Sci* 2005; 46: 214-222.
34. Darlington LG, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 2001; 85: 251-269.
35. Filiz Ş. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 1999; 8: 42-47.
36. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya ABD Ders Notları, Aydın, 2000
37. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Van YYU Vet Fak Derg* 2004; 15: 91-96.
38. Kavas Özelçi G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1989; 9: 1-8.

39. Üstdal KM, Haspaylan H, Saraymen R, Kılıç E. Lityum Tedavisi Gören Ve Görmeyen Bipolar Affektif Bozukluktanısı Konulmuş Hastaların Eritrositlerinde Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Düzeylerinin İncelenmesi. EÜ Journal of Health Sciences 2004; 13: 16-20.
40. Leung WS, Watts RJ, Miller GC. Degradation of Perchloroethylene by Fenton 's Reagent: Speciation on Pathway. J Environ Qual 1992; 21: 377-381.
41. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. Postgrad Med J 2003;79: 391-396.
42. Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: that which does not kill us makes us stronger. Cell Metab. 2008; 7: 200-203.
43. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem 2005; 12: 1161-1208.
44. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bioessays 2004; 26: 533-542.
45. Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells Free Radic Biol Med 1998; 25: 694-702
46. Lee YJ, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cell. J Biol Chem 1999; 274: 19792-19798.
47. Zádák Z, Hyšpler R, Tichá A, et al. Antioxidants and Vitamins in Clinical Conditions, Physiol Res 2009; 58: 13-17.
48. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In Sies H (Ed). Oxidative Stress. Academic Press, 1985; pp 1-7.
49. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. Annu Rev Microbiol 2003; 57: 395-418.
50. Docampo R. Antioxidant mechanisms. In: Marr J and Müller M (Eds). Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. London, Academic Press, 1995; pp 147-160.
51. Rice-Evans CA, Gopinathan V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. Essays Biochem 1995; 29: 39-63.
52. Kavas Özelçi G. Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. Ankara Tıp Mecmuası 1994; 47: 579-592.

53. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36: 327-358.
54. Dragsted LO. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur J Nutr* 2008; 47: 3-18.
55. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem* 2006; 31: 51-56.
56. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 2008; 128: 501-523.
57. Kitchin KT, Conolly R. Arsenic-induced Carcinogenesis Oxidative Stress as a Possible Mode of Action and Future Research Needs for More Biologically Based Risk Assessment. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 327-335
58. Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharm* 2008; 233: 92-99.
59. Witterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrel W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 55: 337-341.
60. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135, 372-376.
61. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res* 1978; 19, 1053-1057.
62. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspect of haematology. In: Tietz NW (Eds), *Fundamentals of Clinical Chemistry*, WB Saunders, Philadelphia 1987; pp 803-806.
63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
64. Miller GL. Protein determination for large numbers of samples. *Anal Chem* 1959; 31: 964.
65. Luck H. Catalase. In: Bergmeyer H (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1965; pp 885–894.
66. Sun Y, Oberley LW, Li Y. Simple for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
67. Paglie DE, Valentie WN. Studies on the qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Med* 1967; 70: 158-169.

68. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 1011-1015.
69. Messner KR, Imlay JA. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase *J Biol Chem* 2002; 277: 42563-42571.
70. Nandi D, Patra RC, Swarup D. Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food Chem Tox* 2006; 44: 1579-1584.
71. Ríos R, Zarazúa S, Santoyo ME et al. Decreased nitric oxide markers and morphological changes in the brain of arsenic-exposed rats. *Toxicology* 2009; 261: 68-75.
72. Bashir S, Sharma Y, Irshad M et al. Arsenic induced apoptosis in rat liver following repeated 60 days exposure. *Toxicology* 2006; 217: 63-70.
73. Allen T, Rana SV. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 135: 157-162.
74. Mishra D, Flora SJ. Differential oxidative stress and DNA damage in rat brain regions and blood following chronic arsenic exposure. *Toxicol Ind Health* 2008; 24: 247-256.
75. Zarazúa S, Pérez-Severiano F, Delgado JM, et al. Decreased nitric oxide production in the rat brain after chronic arsenic exposure. *Neurochem Res* 2006; 31: 1069-1077.
76. Rana T, Bera AK, Das S et al. Effect of ascorbic acid on blood oxidative stress in experimental chronic arsenicosis in rodents. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1072-1077.
77. Shila S, Kokilavani V, Subathra M et al. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 2005; 210: 25-36
78. Kannan GM, Flora SJS. Chronic arsenic poisoning in the rat: treatment with combined administration of succimers and an antioxidant *Ecotox Environ Safe* 2004; 58: 37-43.
79. Srivastava D, Subramanian RB, Madamwar D, Flora SJ. Protective effects of selenium, calcium, and magnesium against arsenic-induced oxidative stress in male rats. *Arh Hig Rada Toksicol* 2010; 61: 153-159.
80. Sinha D, Roy S, Roy M. Antioxidant potential of tea reduces arsenite induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1032-9.

81. Das J, Ghosh J, Manna P, Sinha M, Sil PC. Arsenic-induced oxidative cerebral disorders: protection by taurine. *Drug Chem Toxicol* 2009; 32: 93-102.
82. Sharma A, Sharma MK, Kumar M. Modulatory role of *Emblica officinalis* fruit extract against arsenic induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Chem Biol Interact* 2009; 180: 20-30.
83. Flora SJ, Mehta A, Gupta R. Prevention of arsenic-induced hepatic apoptosis by concomitant administration of garlic extracts in mice. *Chem Biol Interact* 2009; 177: 227-33.

ÖZGEÇMİŞ

Zafer KAYA 1974 yılında Bingöl'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bingöl'de tamamladı. 1991 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı. 1996 yılında Fakülteden mezun oldu ve aynı yıl göreve başladı. Halen Bingöl İl Tarım Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şubesinde Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır. 2007 yılından beri Elazığ Bölge Veteriner Hekimler Odasına bağlı olarak Bingöl İl Temsilciliği görevini sürdürmektedir. Evlidir ve 1 çocuk babasıdır.

Adres: Bingöl İl Tarım Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şubesi/BİNGÖL

e-mail: zaferkaya12@hotmail.com