

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞUMDAN PUBERTE DÖNEMİNE KADAR 4-CPA' YA MARUZ
KALAN SIÇANLARDA KARACİĞER OKSİDAN VE
ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE TAŞTAN

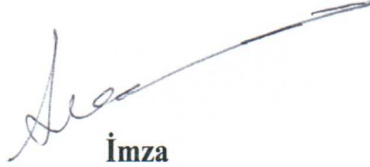
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aydan Babül

ANKARA
Eylül 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 02 / 09 / 2010



**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Aydan Baböl**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Nedret Kılıç**



**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Kazime Gonca Akbulut**



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Grafikler	V
Tablolar	VI
Semboller, Kısaltmalar	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ENDOKRİN BOZUCULAR	4
2.1.1. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları	5
2.1.2. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması	7
2.1.2.1. Doğal Endokrin Bozucular	7
2.1.2.1.1. Fitoöstrojenlerin Sınıflandırılması Ve Yapıları	8
2.1.2.2. Sentetik Endokrin Bozucular	10
2.1.2.3. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri	13
2.2. PESTİSİTLER	14
2.2.1. Etkili Madde Gruplarına Göre Pestisitler	14
2.2.2. Türkiye’de Ve Dünyada Pestisit Kullanımı	16
2.2.3. Pestisitlerin Etki Mekanizmaları	20
2.2.3.1. Nörotoksisite	20
2.2.3.2. İmmunotoksisite	21
2.2.3.3. Mutajenezis	21
2.2.3.4 Serbest radikaller	21
2.3. BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ	22
2.3.1. Oksinler	24
2.3.2. Giberillinler	25
2.3.3. Sitokininler	26
2.3.4 Etilen	26

2.3.5. Dorminler (absisik asit)	26
2.4. 4-KLOROFENOKSİASETİK ASİT (4-CPA)	27
2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	29
2.5.1. Singlet Oksijen	30
2.5.2. Süperoksit Radikali	31
2.5.3. Hidrojen Peroksit	31
2.5.4. Hidroksil Radikali	32
2.5.5. Reaktif Nitrojen Ürünleri	32
2.5.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	33
2.5.7. Serbest Radikallerin Hasar Yapıcı Etkileri	34
2.5.7.1. Lipid Peroksidasyonu	34
2.5.7.1.1. Lipid Peroksidasyonunun Patolojik Etkileri	35
2.5.7.2. Protein Oksidasyonu	35
2.5.7.3. DNA Oksidasyonu	36
2.5.7.4. Karbonhidrat Oksidasyonu	36
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	36
2.6.1Doğal (Endojen) Antioksidanlar	37
2.6.1.1. Enzimler	37
2.6.1.2.Enzim Olmayanlar	37
2.6.1.3. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)	37
2.6.2. Süperoksit Dismutaz	39
2.6.3. Katalaz	39
2.6.4. Glutatyon	40
2.6.5. Tiyol	41
2.6.5.1. Tiyol Grubu İçeren Antioksidan Bileşikler	44
3. GEREÇ ve YÖNTEM	45
3.1. Araç ve Gereçler	45
3.1.1Laboratuvar Cihazları	45
3.2. Uygulanan yöntemler	45
3.2.1. Deney Hayvanları ve Gruplar	45
3.2.2. Deneydeki Çalışma Grupları	46

3.3. Tayin Yöntemleri	47
3.3.1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi	47
3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi	48
3.3.3. Lowry Protein Tayini	48
3.3.3.1. Karaciğer Dokusu Tiyol Düzeylerinin Hesaplanması	50
3.3.3.2. Karaciğer Dokusu Total Tiyol Düzeylerinin Saptanması	51
3.3.3.3 Karaciğer Dokusu Non-Protein Tiyol Düzeylerinin Hesaplanması	51
3.3.3.4. Protein Tiyol Düzeylerinin Hesaplanması	52
3.3.4. Dokuda NOx Tayin Yöntemi	52
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	55
4. BULGULAR	56
4.1. Karaciğer Dokusu TBARS Düzeyleri	57
4.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri	58
4.3. Karaciğer Dokusu Protein Tiyol (P-SH) Düzeyleri	59
4.4. Karaciğer Dokusunda NOx Düzeyleri	61
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	67
7. ÖZET	68
8. SUMMARY	71
9. KAYNAKLAR	74
10. EKLER	89
10.1. Etik kurul onayı	89
10.2. Teşekkür	90
11. ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER, GRAFİKLER

Sayfa No

Şekil 1: 4-CPA' nın Kimyasal Formülü	27
Şekil 2. NOx Tayininde Standart Solusyonlara Karşılık Gelen Absorbansların Oluşturduğu Doğrusal Regresyon Grafiği	54
Grafik 1: Erkek ve Dişi Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri	55
Grafik 2: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri	56
Grafik 3: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda Protein Tiyol (P-SH) Düzeyleri	58
Grafik 4: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda NOx Düzeyleri	59

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1: Endokrin bozucular	6
Tablo 2: Endokrin bozucuların etki şekline göre sınıflandırılması	8
Tablo 3: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri indirgenme yarı reaksiyonu	42
Tablo 4: Karaciğer dokusu total tiyol düzeylerinin saptanması	49
Tablo 5: Karaciğer dokusu Non-protein tiyol düzeylerinin hesaplanması	51
Tablo 6: Tüm gruplara ait ortalama , standart hata değerleri	54
Tablo 7: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların MDA düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri	55
Tablo 8: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların GSH düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri	56
Tablo 9: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların Protein Tiyol (P-SH) Düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri	58
Tablo 10: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların NOx düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri	59

SEMBOLLER, KISALTMALAR

AA	Askorbik Asit
AOOP	Advanced Oxidation Protein Products
BBDH	Bitki Büyüme Düzenleyici Hormon
BHT	Bütilhidroksitoluen
BNOA	Betanaftoksiasit
BH₄	Tetrahidro Biopterin
DDT	Dipheynl – Trichloroethane
DES	Dietilstilbesterol
DTNB	Di Tiyobis Nitro Benzoik Asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
ER	Östrojen Reseptörü
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mononükleotid
GP-x	Glutasyon Peroksidaz
GR-x	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
G6PD	Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz
HMP	Hekzosmonofosfat şantı
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IAA	İndol Asetik Asit
ICAM	Intracelluler Adhesion Molecules
IgG	İmmünoglobülin G
IM	İntramusküler
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
L[•]	Lipid Radikali
LDL	Low Density Lipoproteins
LOO[•]	Lipid Peroksit Radikalleri
LOOH	Lipid Hidroperoksitleri
MDA	Malondialdehit

NAA-NAD	Naftalen Asetik Asit + Naftalen AsitAmid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
NEDD	1-NaphtylEthylenediamideDihidrochloride
nNOs	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
NO	Nitrik Oksit
N^o	Nitroksil Anyonu
N^o	Nitrosonyum Katyonu
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	Süperoksit Radikali
¹O₂	Singlet Oksijen Radikali
³O₂	Triplet Oksijen Molekülü
OF	Organik Fosfor
OH•	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit Anyonu
RNÜ	Reaktif Nitrojen Ürünleri
ROM	Reaktif Oksijen Metabolitleri
ROS	Reaktif Oxygen Species
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiobarbitürik Asit Reaktifi
TCA	Trikloroasetikasit
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
4-CPA	4- Klorofenoksi Asetik Asit

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde dünya nüfusunun hızla artışına karşın çeşitli nedenlerden dolayı tarım alanlarının azalması başta besin ihtiyacı olmak üzere bazı sorunları da beraberinde getirmiştir. Üreticiler bu ihtiyaçları karşılamak üzere hızla azalan tarım arazilerinin birim alanından daha fazla verim elde edebilmek ve alınan ürünün kalitesini arttırmak amacıyla uzun yıllardan beri çeşitli kimyasal maddeler kullanmaktadırlar.

Bu maddelerden bazıları endokrin sistem üzerine etkileri olan doğal veya sentetik kimyasallardır. Endokrin sistem üzerine kötü etkileri olan bu kimyasallar endokrin bozucular (EB) olarak adlandırılmaktadır. EB, etkilerini ilgili hormon reseptörlerine bağlanarak, hücre sinyal yollarını, santral sinir sistemini, nöroendokrin sistemini doğrudan etkileyerek, hormon sentezini baskılayarak ya da ilgili organ üzerine toksik etki yaparak gösterirler.

EB' ler, pestisitler ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir.

Pestisitler; bitkilere zarar veren hastalık etmenlerini, zararlıları ve yabancı otları yok eden kimyasal bileşikler olup kullanımlarının artması çevre üzerine ve insan sağlığına zararlı etkilerini de beraberinde getirmektedir. Özellikle pestisitlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir.

BBD doğal olarak bitkilerden sentezlenen, büyüme ve buna bağlı diğer fizyolojik olayları kontrol eden, meydana geldiği yerden bitkinin diğer kısımlarına taşınarak oralarda da etkin olabilen, çok az yoğunluklarda dahi etkisini gösterebilen organik maddelerdir. Dünyada bu gün bitki büyüme düzenleyicileri olarak bilinen bu maddelerin sentetik olarak hazırlanmış çok fazla sayıda preparatı bulunmaktadır. Ancak ülkemizde BBDH'ler yaygın bir şekilde ve bilinçsiz olarak kullanılmaktadır. Üretici ne kadar yüksek doz kullanır ve ne kadar çok sayıda uygulama yaparsa o kadar iyi sonuç alacağı inancındadır. Dolayısıyla insan sağlığı açısından toksik etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

BBDH'ler içinde, fenoksi ailesi üyesi olan 4-CPA(4-Klorofenoksi Asetik Asit) en sık kullanılan oksindir. Ülkemizde 4- CPA, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı' nın izniyle özellikle domates üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır 4-CPA ile ilgili çeşitli toksisite çalışmaları bulunmaktadır.

Günümüzde pek çok patolojik olayda serbest radikallerin rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Pestisitlerin neden olduğu toksisitede yer alan mekanizmalardan birisinin de lipid peroksidasyonu olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir araştırmada yeni ergen sıçanlara verilen 4-CPA'nın doza bağlı olarak MDA ve NOx düzeylerinde artış, GSH düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir¹³¹.

Literatürde 4-CPA ile oksidan olaylar arasındaki ilişkiyi gösteren yeterli sayıda araştırmaya rastlanmamıştır. Yaşamın başlangıcından itibaren 4-CPA'ya maruz kalanlarda oksidan olayların organizmada daha yıkıcı etkilerinin olması beklenebilir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda doğumdan hemen sonra ve puberte döneminde 4-CPA'ya maruz kalan sıçanların karaciğer dokusundaki oksidan ve antioksidan olayların incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDOKRİN BOZUCULAR

EB; sağlıklı bir organizmada veya onun gelecekteki neslinde endokrin sistemin çalışmasını değiştirerek, sağlık sorunlarına neden olan dışardan alınan madde veya madde karışımlarıdır.

Bunlar uzun süre içinde önce çevrede birikirler, sonra su, hava, gıda kaynakları, çalışma alanları ve ev ortamında kullanılan eşyalar aracılığı ile insan vücuduna alınırlar.

EB' nin etkileri; endokrin bozucu ile karşılaşma yaşına, süresine, miktarına, tek veya karışım madde ile karşılaşma durumuna göre değişebilmektedir. Kimyasal maddelerin ne kadar fazla olursa, ortaya çıkan bozuklukların derecesi de o kadar ağır olmaktadır. Örneğin gebelik döneminde karşılaşılan EB' ler; doğum ağırlığını, boyunu ve endokrin bezlerin çalışmasıyla ilgili eşik değerleri değiştirebilmektedir. Bu kimyasalların çoğu plasenta da etkisiz hale getirilemezler. EB' lerin plasenta aracılığı ile anneden fetüse, süt aracılığı ile anneden bebeğe geçtiği gösterilmiştir ¹²⁵.

2.1.1. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları

Endokrin bozucular; hormonun yapımını, taşınmasını, yıkımını ve atılımını değiştirebildikleri gibi, hedef hücredeki etkilerini de değiştirebilmektedirler. Klinikte ortaya çıkan bulgular, tüm etkilerin toplamına göre gerçekleşmektedir. Endokrin bozucuların başlıca etki mekanizmaları şunlardır:

1. Hormonların yapımı üzerine arttırıcı veya azaltıcı etki
2. Hormonların taşınması üzerine arttırıcı veya azaltıcı etki
3. Hormonların metabolizması üzerine arttırıcı veya azaltıcı etki
4. Hormonların atılımı üzerine arttırıcı veya azaltıcı etki
5. Hormonların hedef hücredeki etkisine benzer veya ters etki

EB' ler, endokrin sistem üzerine etkilerini daha çok hormon benzeri özellikleri sayesinde agonist ya da antagonist yolla gösterirler. Dolayısıyla ergenlikte östrojenik, antiöstrojenik, androjenik, antiandrojenik veya doğrudan GnRH sistemi üzerine olan etkileri görülür. Östrojenik etkilerini östrojen reseptörlerine direkt olarak bağlanarak, aromataz aktivitesini arttırarak, östrojene olan duyarlılığı arttırarak ya da GnRH sistemi üzerinden dolaylı olarak endojen östrojen üretimini arttırmak yolları ile gösterebilirler. Bunlar sonuçta erken ergenliğe yol açabilirler^{70, 88,107}.

Antiöstrojenik ve androjenik etkilerin aracısı daha çok aromataz enzim aktivitesinin inhibisyonu ve steroidojenik enzim üretimidir. Antiandrojenik etkilerin ortaya çıkışında ise testiküler steroidogenezi baskılamaları ve androjen reseptörlerini bloke etmeleri rol oynar. Sonuçta EB' ler, etki şekline göre erken ergenlik, gecikmiş ergenlik, cinsel farklılaşma bozuklukları oluşturabilirler^{70,88,107}.

Tablo1: Endokrin Bozucular ¹³¹

Fitoöstrojenler	Daidezein, Geniestein, Formononetin, Biokanin-A, Prunetin, Pratensein, Glisetein, Ekuol, Desmetilangolesin, Enterolakton, Enterodiol, Matairesinol, Zearalanon
Organohalojenler	Dioksinler, Furanlar, Poliklorinebifeniller, Hekzaklorobenzen, Pentaklorofenon
Pestisitler	BBDH (2-4-diklorofenoksi asetik asit [2,4-D], 4-CPA, Klormekuat), Alaklor, Aldikarb, Amitrol, Atrazin, Benomil, Karbaril, Klordan, Endosulfan, Etilparation, Heptaklor, Kepon, Ketokonazol, Lindan, Malation, Trifluralin, Vinklozolin, Metosiklor
Fitalatlar	Di-etilheksil fitalat, Butil benzil fitalat, Di-n-butil fitalat, Di-heksil fitalat, Di-propil fitalat, Di-kloroheksil fitalat, Di-etil fitalat
Ağır Metaller	Arsenik, Kadmiyum, Uranyum, Kurşun, Civa
İlaçlar	Doğum kontrol hapları, Dietilstilbesterol (DES), Simetidin
Diğerleri	Bisfenol A, B ve F, Etan dimetan, Sulfonat, Metanol, Benzofenol, N-butil benzen, 4- nitrotoluen, 2,4-diklorofenol

2.1.2. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması

EB' ler iki grup altında ele alınmaktadır;

a)Doğal endokrin bozucular (DEB)

b)Sentetik endokrin bozucular (SEB)

2.1.2.1.Doğal Endokrin Bozucular

Bunlar, cinsiyet gelişiminden sorumlu östrojen, testosteron gibi doğal hormon yapısındaki maddelerdir. Doğal hormon yapısında olduklarından; kolayca yıkılır, depolanmazlar. Soya fasulyesi, yonca filizi gibi bitkiler; fitoöstrojen denilen doğal östrojen içermektedirler ve vücutta doğal östrojen gibi etki etmektedirler. Bu gruptan en iyi bilineni fitoöstrojenlerdir. Fakat vücutta üretilen östrojene göre oldukça zayıf etkilidirler. Fitoöstrojenler ancak yoğun ve bol miktarda alındıklarında östrojeniktirler, düşük konsantrasyonlarda ise antiöstrojenik etki gösterirler^{107,115,145}.

Fitoöstrojenlerin, özellikle izoflavonların, antioksidan özellikleri in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Bunlar, serbest radikalleri doğrudan veya antioksidan-süpürücü enzimleri etkileyerek, oksidatif DNA hasarını önleyebilirler. Çalışmalar, diyetle alınan izoflavonların Low Density Lipoprotein'lerin (LDL) oksidasyonuna karşı direnci arttırdığını göstermektedir¹²⁹.

Toda ve Shirataki'nin yaptıkları bir araştırmada, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonuna dört farklı fitoöstrojenin etkileri incelenmiş ve izoflavonların kimyasal yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında ilişki gösterilmiştir^{79,129}.

Tablo 2: Endokrin bozucuların etki şekline göre sınıflandırılması¹⁰⁷.

Etki Türü	
Östrojenik	Diklorodifeniltrikloretan (DDT) ve metabolitleri, Metoksiklor, Metopren, Fitoöstrojenler (yüksek konsantrasyonda), Poliklorine bifeniller (PCBs) Bisfenol A, Endosulfan, Dioksinler
Antiöstrojenik	Fitoöstrojenler (düşük konsantrasyonda)
Androjenik	Testosteron, Trembolen asetat
Antiandrojenik	Fitalatlar, Diklorodifenildikloroetilen (DDE), Vincozolin

2.1.2.1.1. Fitoöstrojenlerin Sınıflandırılması ve Yapıları⁵¹

Fitoöstrojenler kimyasal yapılarına göre izoflavonlar, izoflavanlar, flavanonlar, kalkonlar, lignanlar, kumestanlar, makrolitler, stilbenler ve steroller olarak sınıflandırılır. Yapıda temel olarak bulunan fenolik grup östrojen agonisti veya antagonisti özelliklerini göstermede önemli rol oynar. Kimyasal olarak çok çeşitlilik gösteren fitoöstrojenler, bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenmektedir.

İzoflavon ve Kumestanlar bitkide kendiliğinden sentez edildikleri için, bazen intrinsik östrojen bileşenleri olarak da kabul edilmektedirler. Makrolit yapısında olan rezorsiklik asit laktonları tahıl ürünlerine bulaşan küfler tarafından üretildikleri için mikoöstrojenler olarak tanımlanır.

Etkisi nedeniyle üzerinde en çok çalışılan fitoöstrojenler izoflavonlardır. Diğerleriyle yapılan çalışma sayısı çok azdır. İzoflavonlar bitkilerde dört temel yapıda bulunabilir; aglikon, glikozit, malonil glikozit veya asetil glikozit yapı. Aglikon yapılar daidzein (7,4'-dihidroksi izoflavon), genistein (5,7,4'-trihidroksi izoflavon) ve glisitein (7,4'-dihidroksi 6-metoksi izoflavon) gibi konjuge olmamış yapıdadır. Glikozitleri arasında 7-O-glukozit (daidzin, genistin, glisitin); 6'-O-asetilglukozit (6'-O-asetildaizdin, 6'-Oasetilgenistin, 6'-O-asetilglisitin) ve 6'-O-malonilglukozit (6'-O-malonildaizdin, 6'-O-malonilgenistin, 6'-O-malonilglisitin) yer alır.

İzoflavonlar bitkilerde doğal olarak şekerlerle konjuge yapılar halinde, yani glikozit halde bulunurlar. 6'-O-asetilglukozit ve 6'-O-malonilglukozit yapılar ise, aglikona bağlanan şeker molekülü dışında, asetil veya malonil molekülü içerirler. Aglikon yapılar ise konjuge olmamış yapılardır.

Bitkilerden izole edilen izoflavonların bir çoğunun östrojenik etkisi olmadığı, etkili olanların da östrojenik etkilerinin aynı olmadığı saptanmıştır. Örneğin genistein en güçlü östrojenik etkiyi gösterirken, soya izoflavonlarının % 5-10'unu oluşturan glisitein diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir.

Kumestanlar yapısal olarak izoflavonlara benzerler. Bir çoğu Wong tarafından listelenen kumestanlar içinde en önemli östrojenik aktiviteye sahip olan bileşikler kumestrol ve 4-metoksi kumestrol'dür. Lignanlar 2,3 dibenzilbütan iskeleti ile tanımlanır ve bütün damarlı bitkilerde glikozit formda bulunurlar. Bitkilerde bulunan temel lignanlar matairesinol, sekoizolarisiresinol, larisiresinol ve izolarisiresinol olup, bunlar insanlarda östrojenik aktivite gösteren iki temel bileşiği, enterolakton ve enterodiolü vermektedirler. İzoflavonlar gibi enterolakton ve enterodiol de barsak mikroflorasının bitki lignan öncülleri üzerindeki

aktivitesi sonucunda oluşurlar. Enterolaktonun bunun dışında enterodiol'ün oksidasyonu ile de oluştuğu bilinir.

Makrolitler, özellikle uygun olmayan koşullarda depolanan tahıllar, yağlı tohumlar ve otlarda hızla çoğalan organizma olan *Fusarium* gibi mantarların ikincil metabolitleridir. Çoğunlukla tohumun kabuk kısmında konsantre olmuşlardır ve bilindiği gibi bu kısım genellikle besinin işlenme sürecinde bitkiden ayrılır. Zearalenon, α - ve β -zearalanol östrojenik aktiviteye sahip olduğu bilinen mikoöstrojenlerdir.

Fitoöstrojenlerin, her birinin yoğun olarak bulundukları besin kaynakları farklılık göstermektedir. İzoflavonların bilinen en iyi kaynağı kuru baklagiller (bezelye, fasulye, mercimek vb.), özellikle de soya fasulyesidir. Bugün en çok kullanılan izoflavon kaynakları soya fasulyesinin işlenmesi ile elde edilen çeşitli ürünler olup, bunların başında soya unu, soya protein izolatları, tofu, soya sütü, soya yoğurdu ve soya şehriyesi gelir. Çalışmalar kuş üzümü ve kuru üzüm gibi küçük taneli meyvelerin iyi fitoöstrojen kaynakları olduğunu göstermektedir.

Diyetin temel fitoöstrojen bileşikleri olan lignanlar, bitki hücre duvarı ligninlerin önemli bir kısmını oluşturduğu için pek çok bitkide, düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Lignanlar tahıl, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunurlar, en iyi kaynakları ise keten tohumudur.

2.1.2.2. Sentetik Endokrin Bozucular

Günlük yaşamda, sanayide, tarımda kullanılan birçok ürünün içinde bulunan EB'lerin en iyi ve eski bilineni güçlü östrojenik etkisi olan dietilstilbestrol (DES)'dur. İlk defa 1938 yılında üretilen ve tüm dünyada gebelik toksemisi, erken doğum tehdidi gibi nedenlerde yaygın olarak kullanılan bu maddeye maruz kalan annelerde, meme kanseri sıklığının 2

kat arttığı saptanmıştır. Bu annelerin kız bebeklerinde ise serviks kanseri, germ hücreli over kanseri, serviko-vajinal displazi, vajinal “clear-cell” adenokarsinomanın arttığı ve bu etkilerin östrojenik etkilerinden olduğu kanıtlanmıştır. Bu kimyasalın kullanımı yasaklanmıştır⁴⁶.

Tarımda kullanılan pestisitler, fungusitler, herbisitler ile günlük yaşamda sık kullanılan temizlik maddeleri, kozmetik ürünler, boyalar, plastik maddeler ve çözücüler gibi birçok kimyasalın endokrin bozucu olma ihtimali vardır. Bu maddelerin çoğu vücut tarafından yıkılıp zararsız hale getirilmeleri zor olduğu ve genelde yağ dokusunda birikmeleri nedeniyle vücutta uzun süre kalıp zararlı etkide bulunabilirler^{70,107}.

EB'lere yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı zararlı etkileri açısından önem taşır. Örneğin intrauterin yaşamda bir dioksin olan 2,3,7,8-tetraklorobenzo-p-dioksin(TCDD) ile karşılaşılacak erkek kemirgen hayvanların iç ve dış genital organlarının maskülinizasyonunda, testislerin inmesinde, androjen üretiminde ve spermatogenezde sorunlar yaşandığı saptanmıştır. Ancak TCDD ile postnatal karşılaşmada sadece spermatogenez, somatik ve genital büyümenin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir^{63,70,88}.

EB'lerin oluşturacağı olumsuz etkide, karşılaşılacak doz ve karşılaşma süresi de ortaya çıkacak sonuçlar için önem taşır. Etkilenme süresi ve dozu arttıkça ortaya çıkacak olumsuz etkiler daha şiddetli olabilmektedir^{63,70,88}.

Tarımda, evlerde, endüstride kullanılan pek çok madde endokrin bozucu içermektedir. EB'ler organizmada özellikle üreme sistemini, tiroid hormonlarının çalışmasını olumsuz etkilemektedir. İntrauterin yaşam üreme organlarının farklılaşması açısından kritik bir

dönem olduğundan, bu dönemde EB'lere maruz kalınması üreme organlarında ve reseptörlerinde geri dönüşümsüz, ciddi patolojilere neden olabilmektedir^{31,98}.

Pombo ve ark.; EB'lere maruz kalınan yaşa göre çocuklarda; erken veya geç ergenlik, vajen kanseri, kanser sıklığında artma, kriptorşidizm, hipospadias, sperm sayısında azalma, testosteron düzeyinde azalma, üreme sistemi gelişim sorunları, obezite, tiroid bozuklukları, SSS gelişim bozuklukları, düşük doğum ağırlığı, hiperaktivite, öğrenme problemleri, zeka düzeyinde azalma görülebildiğini, erişkinlerde ise meme kanseri, endometriyozis, embriyo ve fötal ölümler, malformasyonlu çocuklar, testis kanseri, prostat kanseri, sperm sayısında azalma, sperm kalitesinde azalma, testosteron düzeyinde azalma, tiroid hormon düzeylerinde değişiklikler görülebildiğini bildirmişlerdir^{25, 103, 131}.

2.1.2.3. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri ¹³¹

	Dişi ve Erkeklerde
Kanser	Kanser hücre çoğalmasının ve anjiyogenezisin azalması (fitoöstrojenler), iyi ve kötü huylu kanserlerde azalma (soyalı besinler) dışında endometrial hiperplazi, vajinal adenokarsinom, uterus kanseri, meme kanseri gelişme riski artışı, testis kanseri riskinin artması, prostat kanseri gelişme riskinin artması veya azalması
Teratojenik Etkileri	İskelet kalsifikasyonları, ventriküllerde genişleme, gebelerde yavru sıçan sayısının azalması, yaşayan yavru sıçan sayısının azalması, intaruterin ölüm, abortus, düşük doğum ağırlığı
Tiroid Fonksiyonları	Fetal tiroid hormon bozuklukları, tiroid hormonu konjugasyon bozukluğu, serum tiroksin seviyelerinde düşüklük.
Kardiyovasküler Etkiler	Kolesterol düşüklüğü ve antioksidan etkiler (fitoöstrojenler), trombosit agregasyon bozuklukları
Kemik	Kemik mineral dansitesi üzerine olumlu (fitoöstrojenler) ve olumsuz etkiler, epifizlerin erken ya da geç kapanması
Diğer	Postnatal büyüme bozuklukları, vücut ağırlığı azlığı, erkek/kız yavru oranının azalması

2.2. Pestisitler

Pestisitler; bitkilere zarar veren hastalık etmenlerini, zararlıları ve yabancı otları yok eden kimyasal bileşiklerdir. Pestisit yabancı kaynaklı bir kelime olup pest=zararlı, cide = öldürücü anlamına gelmektedir. Tarımlı ürünlerinin yetiştiriciliği, depolanması, taşınması, dağıtımı sırasında veya gıdaların, zirai ürünlerin işlenmesi sırasında istenmeyen zararlıları yok etmek ve kontrol etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu terim, BGD ile hasat zamanından önce veya sonra depolama ve taşıma sırasındaki bozulmadan korumak için kullanılan maddeleri de kapsamaktadır¹²⁶.

Pestisitler; formülasyon şekillerine, kullanma tekniğine, etki şekillerine, kimyasal yapılarına ve bileşimindeki etkili madde grubuna göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. En uygun olanı etkili madde gruplarına göre yapılan sınıflandırmadır¹²⁷.

2.2.3 Etkili Madde Gruplarına Göre Pestisitler¹³

I) İnsektisitler: Böceklerle karşı kullanılırlar.

- Klorlanmış Hidrokarbonlar (Organik Klorlular)
- Organik Fosforlular
- Karbamatlılar
- Sentetik Pyretroidler
- Benzoil Üreler
- Bakteriler
- Diğerleri

II) Akarisitler: Akarlara karşı kullanılırlar.

- Halojen ve Oksijenliler
- Amin ve Hidrazin Türevleri

- Dinitrofenol Esterler
- Kükürtlüler
- Organik Kalaylılar
- Diğerleri

III) Kış Mücadele İlaçları ve Yazlık Yağlar

IV) Nemasitler, Fumigantlar: Nematod (kurt) adı verilen toprak altı zararlılarına karşı kullanılırlar.

V) Rodentisitler ve Molluskisitler: Kemirgenlere karşı kullanılırlar.

VI) Fungisitler: Mantarlara karşı kullanılırlar.

- Koruyucu Fungisitler
- Sistemik Fungisitler

VII)Herbisitler: Yabani otlara karşı kullanılırlar.

- Fenoksi Bileşikler
- Karbamatlar
- Üre Bileşikleri
- Sülfonil Üreler
- Anilinler
- Amidler ve Anilidler
- Benzoik Asitler
- Pikolinik Asitler
- Organik Halojen Asitler
- Diazinler
- Triazinler
- Benzonitriller
- Siklohekzonlar
- İmidazolinonlar

- Triazoller
- Okzadiozoller
- Amino Fosfonatlar
- Diğerleri

VIII)Zirai Mücadelede kullanılan Diğer Maddeler

- Demirli Bileşikler
- Böcek Cezp edicileri

2.2.2. Türkiye’de Ve Dünyada Pestisit Kullanımı

Pestisitlerin en önemli kullanım alanları tarımsal savaşımdır. Bu bileşikler piyasada serbest olarak satıldığından dolayı kullanımları oldukça yaygındır. Günümüzde çoğunluğu organik bileşikler olmak üzere yaklaşık 1500 aktif pestisit maddesi 2000 tarım zararlısına karşı kullanılmaktadır ⁵.

Organofosforlu bileşikler gelişmekte olan ülkelerde kullanılan olan en önemli pestisit grubudur. Organoklorlu pestisitler ise çevrede daha uzun süre aktif halde kalmaları, bioakümüle olabilmeleri ve parçalanmalarının yavaş olması nedeniyle daha az kullanılmaktadır. Dünya çapında, yılda ortalama 2,5-3 milyon ton pestisit kullanıldığı ve bu bileşiklerin %46’sının herbisit, %31’inin insektisit, %18’inin fungusit olduğu tahmin edilmektedir. Pestisitlerin %80 gibi büyük bir bölümünün gelişmiş ülkelerde kullanılmasına karşın, zehirlenme olgularının çoğu gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü raporlarında, her yıl yaklaşık olarak 3 milyon pestisit zehirlenmesinin meydana geldiği ve bu zehirlenmelerin 220.000’inin ölümlle sonuçlandığı belirtilmektedir ⁵.

Ülkemizde zirai mücadele amacıyla 346 pestisit aktif maddesi içeren 1483 ilaç kullanılmaktadır. Türkiye’de tarım ilacı tüketimi, 1979’dan 2002 yılına kadar geçen sürede %45 oranında artış göstermiştir. Eldeki verilere göre ülkemizde yıllık pestisit tüketiminin %40’ı Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmaktadır ⁵.

Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır⁵.

Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturunca etkileri saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO “Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi”ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir ³⁸.

Pestisit doğrudan etkisi deri, solunum veya pestisit bulaşmış gıda maddelerinin alınması ile olmaktadır. Pestisit doğrudan toksik etkisi, onun toksisite düzeyine ve pestisit ile temas etme derecesine bağlıdır. İkincil türde etkiler pestisit kalıntılarını içeren bitki ve hayvan dokularının besin maddesi olarak değerlendirilmesi esnasında ortaya çıkar. Özellikle klorlanmış hidrokarbonlar vücut yağ dokusunda birikme özelliğindedirler. Bu tür besin almış olanlarda, ölüm veya fizyolojik

bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca pestisitlerin ikinci derecede kontamine olduğu canlıyı yiyen diğer türler de bundan etkilenmektedirler. Zira besin halkasının sonunda kalıntı konsantrasyonu fazla biriktiğinden predatör türler daha geniş ölçüde tehlikeye düşmektedirler. Pestisit uygulamalarında ayrıca hedef olarak seçilmeyen çeşitli toprak organizmalarının da etkilendiği bilinmektedir¹²⁶.

Pestisitler vücutta birikim yaparak toksisite göstermektedirler. Vücuda alındıklarında enzimler etkisiyle bozunarak bir kısmı vücuttan atılmaktadır⁵⁰.

İnsanlarda zehirlenmeler pestisitlerin vücuda deri, solunum veya sindirim yolları ile alınması ile gerçekleşmektedir. İlaçlı gıdaların yenmesi ile ortaya çıkanlar en yaygın olanlardır. Zehirlenme akut (bir defada tek bir dozdan) veya kronik (uzun sürede birikim sonucu) olarak iki şekilde gerçekleşir. Gıdalardaki pestisit kalıntılarının vücuda alımı ile oluşan kronik zehirlenme sonucu, akciğer hastalıkları, kanser, beyinde hasar, karaciğer ve böbrekte nekrozlar oluşabilir. Teratojen, mutajen ve allerjen etki gösteren pestisitler de vardır. İlaçlı gıdaların yenmesi ile ortaya çıkanlar en yaygın olanlardır³³.

Herbisitler ve fungusitler akut toksisitelerine oranla kronik toksisiteleri önemli olan pestisitlerdir. Kullanılan herbisitlerden biri 2,4 D'dir. Bu etkili maddenin sentezlenmesi aşamasında dioksinlerle bulaşma riski bulunmaktadır³³. Dioksinler hem çok zehirli hem de kanser yapıcı maddelerdir. Bu nedenle birçok ülke tüketilecek 2,4 D'li preparatların dioksinde arındırılmış olması koşulunu getirmiştir^{13,33}. Ancak ülkemizde böyle bir koşul yoktur. Bu nedenle tüketilen 2,4 D'li preparatların dioksinle kirlenmiş olabileceği şüphesi bulunmaktadır.

Bu preparatlardan olan Parathion-methy, chlorpyriphos-ethyl ve endosulfan gibi insektisitler insanlarda özellikle endokrin sistemi etkileme özelliğindedir ^{26,27}. Ayrıca Methamidophos'un kromozomlar üzerine etkisinin olabileceği belirtilmektedir ^{33,71}. Fungusitler kronik toksisite yönünden oldukça önemlidir. Mancozeb, propineb, thiram ve maneb gibi fungusitlerin kanser yapıcı ve teratojenik risklerinin bulunmasının yanı sıra endokrin sistemi ve sinir sistemi üzerinde olumsuz etkileri vardır ^{26,27,33,71}. Son yıllarda pestisitlerin endokrin sistemi bozucu etkileri üzerinde önemle durulmaktadır. Çünkü östrojen ve testosteron gibi cinsiyet hormonlarının sentezlerini azaltarak üreme ve gelişmeyi engelledikleri, immün sistemi ve merkezi sinir sistemini negatif yönde etkiledikleri, karaciğer ve böbrek yetmezliklerine neden oldukları bildirilmiştir ⁹⁵.

Pestisitlerin önemli bir kısmı sindirim sisteminden kolayca emilmektedir. Organofosforlu pestisitler lipofilik olup, iyonize olmadıkları için oral ve inhaler alım sonrası kolayca emilirken, organoklorlu pestisitler özellikle yağda çözünerek vücuda alındıkları için daha kolay emilir. Organoklorlu pestisitler, kimyasal olarak dayanıklı olmaları, yağda yüksek, suda düşük çözünürlüğe sahip olmaları, biyotransformasyonlarının, parçalanmalarının ve vücuttan atılımlarının yavaş olması nedeniyle çevrede ve canlılarda birikerek uzun süre etki göstermektedirler. Deri yolu ile emilim yavaş olmasına karşın uzun süreli maruziyetlerde ciddi zehirlenmeler görülebilmektedir ⁵.

Pestisitler, emildikten sonra sıklıkla yağ doku, karaciğer, böbrekler ve tükürük bezlerine geçerler. Sindirim sisteminden emilim lenfatik sistemden çok portal ven aracılığı ile karaciğerle taşınarak olmaktadır. Dokuya geçen pestisitler çeşitli şekillerde metabolize edilerek biyotransformasyona uğrarlar ve sonuçta bir kısmı detoksifiye olurken bir kısmı da daha toksik bileşiklere dönüşerek aktif hale gelirler ⁵

2.2.3. Pestisitlerin Etki Mekanizmaları

2.2.3.1. Nörotoksisite

Organoklorlu bileşikler; özellikle sinapsları etkileyerek sinir iletimini bozmakta ve sonuçta beyin üzerinde toksik etki göstermektedir. Örneğin Endosulfan, dieldrin ve endrin gibi bileşikler benzer bir etki ile GABA reseptör ionofor kompleksinin pikrotoksin bağlanma noktasına bağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda bağlanma derecesi ile akut toksik belirtiler ve konvülsiyon arasında korelasyon olabileceği belirtilmektedir. Endosulfan ayrıca serotonerjik sistemi etkileyerek saldırgan davranış özelliklerini arttırmaktadır. Kan basıncında artış, geçici hipotermi izlenebilen diğer bulgulardır ^{19,135}. Endosulfanın temel etki mekanizması, konvülsiyon oluşturan santral sinir sistemi stimulasyonudur.

Organofosforlu bileşikler ise; toksik etkilerini kolinesteraz ve psödokolinesteraz enzim inhibisyonu yaparak gerçekleştirirler. Bu bileşiklerin tiyoesterleri “okso” ($P=O$) haline dönüştükten sonra inhibitör özellik kazanırlar. Bu nedenle Tiyoester ($P=S$) bağı içeren ilaçlar etkin olabilmesi için $P=O$ 'ya dönüşmelidir. Bu nedenle organofosfatlı ajanların 2 tiptekileri gözlenir ¹³⁵.

a) Direk etkililer; $P=O$ yapısındadırlar, aktivasyona ihtiyaç duymadan doğrudan kolinesterazı inhibe eden sarin, tabun gibi sinir gazları ve tetraetil pirofosfat (TEPP), diklorvos (DDVP) gibi insektisitler bu gruptandır.

b) İndirek etkililer; $P=S$ içeren bileşiklerdir. Biyotransformasyon ile $P=O$ dönüşümü sonrasında aktive olarak asetilkolin esterazı inhibe ederler. Diazinon, bir oksijen analogu olan “diazoxon”a dönüştükten sonra kolinesteraz inhibisyonu yapabilen indirek etkili bir maddedir.

Bu aşamada sinaps aralığındaki asetilkolin yıkılamayacak ve postsinaptik aksiyon potansiyeli artmaya devam edecektir. Organofosfatlı bileşikler asetilkolinesteraz enziminin aktif kısmına karbamatlara göre daha kuvvetli bir şekilde bağlanırlar. Bu bağlanma irreversible olduğu için sinaptik fonksiyon ancak yeni asetilkolin yapımından -birkaç hafta- sonra düzelmektedir. Asetilkolinin aşırı birikimi; merkezi sinir sistemi kolinerjik iletimi, somatik sinirler, otonomik gangliyonlar, parasempatik sinir uçları ve yer yer sempatik sinirleri uyarır ve ilerleyen dönemde felce yol açar^{19, 93}.

2.2.3.2. İmmunotoksisite

Organofosforlu pestisitler asetilkolinesteraz' a ek olarak immün sistem ve kompleman aktivasyonunda önemli rol oynayan serin hidrolazları da inhibe edebilmekte dolayısıyla ikincil olarak immünotoksisite de meydana gelmektedir. Sonuçta immün sistem elemanlarında yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşmaktadır⁴¹.

2.2.3.3. Mutajenezis

Çalışmalarda pestisitlerin bir kısmının mutajenik etkileri ile kromozom bozukluklarına neden olduğu saptanmıştır. Endosulfanın CYP3A indüksiyonu yaparak DNA bozukluklarına sebep olabildiği fakat karsinojenik özelliğinin net bir şekilde açıklanamadığı ifade edilmektedir⁹³.

2.2.3.4. Serbest radikaller

Pestisidlerin toksisitelerinde önemli rol oynarlar. Pestisidler, oksidatif strese, serbest radikal üretimine, antioksidanlarda değişime yol açabilirler. Pestisit zehirlenmelerinde mekanizmalardan biri de lipid peroksidasyonudur⁷⁶. Bu mekanizmalarla açığa çıkan serbest radikallerle hücre zarları, DNA, RNA gibi yapılarda hasar meydana gelir. Bu durum,

pestisidlerin parankimatöz organlar, kaslar, sinirler ve benzeri yerlerde neden oldukları hasarın temel nedenleri arasında yer almaktadır ⁷³.

DDT ve metoksiklorun oksidatif stres ve lipid peroksidasyona neden olduğu bildirilmektedir. Metoksiklorun ayrıca erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkileri gösterilmiştir ve bu etkilerin spermelerde antioksidan koruyuculuğun azalmasına bağlı olduğu ifade edilmektedir ^{3,42}. Yapılan çalışmalarda DDT ve lindanın gibi bir takım pestisitlerin immunotoksik etkilerinde serbest radikallerin sorumlu olduğu gösterilmiştir ⁸⁵. Endosulfan ile dieldrinin de oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir. Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu sonucunda artan malondialdehit düzeyi endosulfan hasarının önemli bir göstergesidir. LD₅₀' nin altındaki dozlarda bile endosulfan, miyokard hücrelerini etkiler ^{2,68}.

2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri, bitkiler tarafından oluşturulan veya dışarıdan verilen, çok küçük miktarlarda dışarıdan verildiğinde bitkide büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olayları olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilen organik maddelerdir. Bunlar oluştukları dokularda etkin olabildikleri gibi diğer bitki kısımlarına taşınabilirler ve bu etkinliği diğer organlarda da gösterebilen organik maddelerdir ¹²⁶.

Bitki bünyesinde üretilen bu maddelere bitki hücrelerinde su ve iyon geçirgenliği, solunum reaksiyonları, protein sentezi gibi fizyolojik olayları kontrol edebildikleri için bitki hormonu ya da fitohormon denilmektedir. Bitkinin kök sürgün, yaprak, çiçek, meyve oluşumu ve gelişimi gibi yaşamsal olaylarda fitohormonlar önemli rol oynamaktadırlar ⁷⁴. Bitki büyüme düzenleyicileri doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Doğal olanlar bitkinin kendisi tarafından sentezlenmekte, yapay olanlar ise bitkilerden izole edilen ve kimya endüstrisi tarafından

geliştirilen değişik yapı ve özellikteki maddelerdir. Doğal BGD' lara oranla, sentetik BBD' ların bazı bitkilerde daha çok etkili oldukları ve ürünü daha çok artırdıkları tespit edilmiştir⁵⁸.

Elde edilen maddelerin bir kısmı büyümeyi teşvik ederken (oksin, sitokinin, gibberellin) diğer bir kısmı da engellemektedir (absisik asit, etilen...). Bitki büyüme ve gelişmesini başlatıp hızlandıranlara uyarıcı (stimülatör), büyüme ve gelişmeyi yavaşlatıp durduranlara da engelleyici (inhibitör) denilmektedir. BGD'leri gelişmeyi uyarıcı ve engelleyici maddeler olarak birbirinden kesin sınırlarla ayırmak pek mümkün değildir. Çünkü bitki büyümesinin değişik devrelerinde değişik bitki organlarına uygulanabilen BBD'ler konsantrasyona bağlı olarak farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin bir oksin olan Naftalen asetic acid (NAA) çiçeklenme sonrasında gelişecek olan ürünün seyreltilmesi amacıyla kullanılırken daha sonra aynı bitkinin hasat öncesinde meyve dökmesini önlemek amacıyla kullanılabilmektedir. Bu sebeple BGD' lerin kullanılmasında istenilen sonuçların alınması için uygulama zamanının ve konsantrasyonlarının iyi ayarlanması gerekir^{7,74}.

Hormonlar, önceleri yalnız tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesinde kullanılmıştır. Daha sonra tohumdan hasada kadar geçen ara dönemde de uygulanmaya başlanmıştır. Burada hedeflenen verim artışı, ürün kalitesinin yükseltilmesi ve bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın artırılması, tohum çimlenme gücünün artırılması, çiçeklerin tesvik edilmesi veya geciktirilmesi, soğuğa karşı dayanıklılığın artırılması, meyve tohumunun artırılması, meyve iriliğinin artırılması, periyodisitenin azaltılması, meyve olgunluğunun erkene alınması veya geciktirilmesi, meyve kalitesinin iyileştirilmesi, hasadın kolaylaştırılması, meyve muhafaza süresinin uzatılması, meyve renginin iyileştirilmesi, meyve ve yaprak dökümlerinin kontrolü, doku kültürü çalışmaları, ıslah çalışmaları, bitkilerin hastalık ve

zararlılara dayanıklılığının artırılması, yabancı ot kontrolü gibi sayısız amaçlardır ¹⁸.

Ancak, bunlara ulaşmak için sentetik BGD kullanılmaları esnasında dikkat edilmesi gereken bir takım önemli noktalar vardır. Bunlardan öncelikli olanları da bitkiye verilecek sentetik hormonun uygulanma zamanı ve dozudur. Çünkü insan sağlığı açısından olumsuz etkilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynar ¹⁴⁴.

Doğal BBD'ler 5 grupta incelenmektedir ¹³⁹.

1. Oksinler
2. Giberillinler
3. Sitokininler
4. Etilen
5. Dorminler (Absisik Asit)

Bitkide uyarıcı etki yapan hormonlar, oksinler, gibberellinler ve sitokininlerdir. Bitkide büyümeyi engelleyen hormonlar ise, absisik asit (ABA) ve etilendir.

2.3.1. Oksinler

Bitkilerde boyca büyümeyi sağlayan ve gelişmeyi etkileyen en önemli gruptur. Suni elde edilen oksinler genelde yabancı otların yok edilmesinde kullanılır. Bunlar bitki kökünde az bulunan, dolayısıyla bitkilerin büyüyen uç kısımlarından, geniş yapraklarından ve gelişmiş embriyolarından elde edilen hormonlardır. Hücre bölünmesi, büyümesi ve doku farklılaşmasını düzenler. Çok fazla salgılandığında veya dışarıdan fazla uygulanması halinde büyümeyi durdururken az salgılandığında bitki yaprakları dökülmeye başlar. Meyve vermede etkindir. Dölllenmiş çiçeğin

dökülmesini engeller. Ovaryumun gelişmesini ve çekirdeksiz meyve oluşumunu sağlar ¹¹⁷.

Domates, elma, salatalık gibi birçok bitkide döllenme olmaksızın (partenokarpi) meyve oluşumunu gerçekleştirirler.

Ayrıca oksin' in Bor elementi eksikliği gösteren bitki dokularında birikerek dokuda nekroza neden olduğu ve oksin metabolizması ile Bor eksikliği arasında yakın bir ilişkinin olduğu saptanmıştır ^{58,117}.

2.3.2 Giberillinler

İlk defa Japonya'da Gibberella fujikuroi mantarlarından izole edilmişlerdir, oksinler gibi hücre bölünme ve büyümelerini arttırarak boy uzamasını sağlamaktadırlar. En belirgin etkileri bitkinin hacimce büyümesi ve bölünmesidir. Ayrıca verim ve kalitenin arttırılmasıyla ilgili değişik fizyolojik gelişmelerde önemli etkinliklere sahiptir ⁷⁴.

Giberellinler oksinlere göre ışığa daha az duyarlı olup, yüksek dozlardaki uygulamalarda daha az depresif etki gösterirler ¹¹⁷.

Giberellinlerin tohumların dinlenme veya uyku halini (dormansi) kırarak çimlenmeyi teşvik ettikleri bilinmektedir. Bitkisel organlardaki dormansinin sona ermesi giberellin miktarındaki artış ile orantılı olmaktadır. Giberellinlerin oksinler gibi partenokarpik meyve oluşumunu arttırdıkları hatta bazen daha etkin oldukları bilinmektedir ¹³⁹.

2.3.3. Sitokininler

Sitokininler hücre bölünmesini artırarak, büyümenin düzenlenmesinde etkilidirler. Bitkilerde hücre bölünmesini hızlandırdığı, nükleik asitleri düzenlediği, uçlarda baskınlık ve dallanmayı teşvik ettiği, tomurcuk oluşumunu başlamasını uyardığı, tohumların filizlenme şansını artırdığı, besinlerin taşınmasına ve metabolizmaya etki ettiği çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların yaşlanmasını ve dökülmesini önlediği, köklenmeyi engellediği tespit edilmiştir ¹³⁹.

2.3.4. Etilen ¹¹⁷

Basit bir bileşik olan etilen (C_2H_4) bitkinin kendisi tarafından üretilen ve gaz formunda yüksek etkili bir BGD' dir. Tüm dokularda üretilmektedir, sentezi bir çok çevre faktörüne bağlı olarak artabilir.

Etilen, meyve olgunluğunu artırır, yaprak ve meyve dökümünü hızlandırır, çiçeklenmeyi düzenler, çelikten köklenmeyi teşvik eder, uyku halini kırar ve bitkinin boyuna uzamasını engeller.

Etilen çeşitli meyve ve sebzelerde olgunlaşmayı çabuklaştırır ve gaz formunda olduğundan sadece içinde bulunduğu bitkiyi değil, komşu bitkilere de yayılarak etkiler. Bu yönü ile etilen ekonomik açıdan önemlidir ve hasat sonrası olgunlaşmayı teşvik amacıyla da kullanılmaktadır

2.3.5. Dorminler (Absisik Asit) ¹³⁹

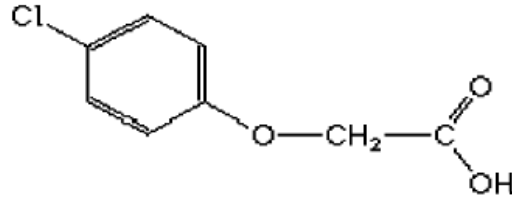
Genel bir bitki gelişim engelleyicisi olan absisik asit (ABA) bitkinin dinlenme fazına girişinden sorumlu bir düzenleyici olup, miktarı uyku halindeki tohum ve tomurcuklarda yüksektir. Bitkilerde uyku halini (dormansi) teşvik eder ve tohumun çimlenmesini engeller.

Büyüme ve gelişme döneminde büyümeyi destekleyen maddeler bitkide hakimken bu dönemin sonuna doğru absisik asit daha fazla artar ve büyüme kontrol altına alınır.

2.4. 4-Klorofenoksiasetik Asit (4-CPA)

Ülkemizde 4-CPA, Tarım Bakanlığı izni ile çeşitli formüllerde örtü altı sebzeçilikte, özellikle domates üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır^{74,126,144}.

Şekil 1: 4-CPA'nın kimyasal formülü



Bir bitki büyüme stimülatörü olan 4-CPA, indol asetik asit gibi davranan fenolik asit türevi yapay oksinlerdendir. IAA bitki gereksinimin her eversinde bitki büyümesinden sorumludur. Fakat ışıktta hızla okside olarak inaktif hale geçtiği için tarımda kullanımı yaygın değildir. Kapalı formülü $C_8H_7ClO_3$ olan 4-CPA'nın molekül ağırlığı 186.60 gram/mol ve erime derecesi $157-159^{\circ}C$ 'dir, etil alkol, aseton, sıcak su gibi çözücülerde çözünür¹³.

4-CPA hormon tabiatlı herbisit olarak kullanılmaktadır⁷⁶.Sadece çiçekler üzerinde etkilidir ve meyvenin normal olmasını sağlar, olgunlaşmayı arttırıcı etkisi de vardır¹³.

Günümüzde özellikle kültürde çiçek açma döneminde püskürtme metodu ile uygulanmakta, çiçeklerin meyveye dönüşmesini teşvik etmektedir^{74,126,144}. 4-CPA için gıdalarda bir üst sınır belirlenmiş olmasına rağmen, tüketiciler için toksik olmayan kalıntı miktarı 0.5 mg/kg seviyesi güvenli olarak kabul edilmiştir. 4-CPA'nın serumdaki toksik konsantrasyonu >400 mg/L'dir. 4-CPA'nın domatesteki 0.2 mg/kg altındaki kalıntısı güvenli, 0.5 mg/kg üzerindeki kalıntısı ise riskli olarak değerlendirilmiştir. Domatesin kabuğunun soyulması durumunda ise kalıntı miktarı %36 azalmaktadır. Bu nedenle, özellikle kış aylarında seralarda hormon kullanıldığından bu uygulama ile vücuda alınacak kalıntı miktarının azalacağı ifade edilmektedir¹³¹.

Klorofenoksi herbisitlerinin insanlarda deri ile temasta "klorakne" denilen şiddetli bir dermatite de neden olduğu, Tavşanlarda ise şiddetli göz irritasyonu yaptığı gözlenmiştir¹³¹.

Klorofenoksiasetik asitlerle akut zehirlenmelerde ölüm oranı yüksektir. Örneğin yapılan çalışmalarda 2703 mg/kg dozunda 4-CPA'nın sıçanların %50'sini öldürdüğü saptanmış, ayrıca yürüme bozukluğu, hipoaktivite, ağrı duyusu kaybı gibi klinik bulgular gözlenmiştir¹⁴⁴.

4-CPA'nın inhalasyon yoluyla verildiği başka çalışmada, 5.25 mg/L üstündeki dozlarda deneklerin yarısı kaybedilmiştir¹⁴⁴.

Klorofenoksiasetik asit grubu herbisitlerin başlıca akut toksik etkileri, kas sistemi ve merkezi sinir sistemi üzerinde olmaktadır. 2,4-D yüksek dozda hayvanların kaslarında zayıflık, vücut hareketlerinde düzensizlik yapar. Özellikle iskelet ve kalp kasında harabiyet gözlenir. Ayrıca böbrek yetmezliği, karaciğer harabiyeti ve pulmoner ödem de oluşabilir. İnsanlardaki akut zehirlenme belirtileri de hayvanlardakine benzemektedir. 2,4-D'ye, çalışma şartları nedeniyle maruz kalanlarda,

etkenin deri ve inhalasyon yolu ile girişi sonucunda nörolojik bozukluklar ortaya çıkabilir ¹²⁶.

Gebeliğın 6-15. gün aralığında oral olarak 0, 150, 300, 600 ve 1000 mg/kg/gün dozunda 4-CPA uygulanmasının gebelik üzerindeki etkleri incelendiğinde 300 mg/kg/gün uygulamalarında annede tremor, kilo kaybı, halsizlik gibi olumsuz etkilerin görüldüğü saptanmıştır. 1000mg/kg/gün dozunda mortalite gözlenmiştir. 600 ve 1000 mg/kg/gün dozlarındaki uygulamalarda fetüsün vücut ağırlığında azalma ve iskelet sisteminde bozukluklar tespit edilmiştir ¹²⁶.

Ergenlik dönemindeki etkileri incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada ise; 20 günlük dişi ve erkek sıçanlara oral yoldan 25, 50, 100 mg/kg/gün dozunda 4-CPA uygulanmış ve doza bağımlı olarak MDA ve NOx düzeylerinin arttığı, GSH düzeylerinde ise azalma saptanmıştır ¹³¹.

2.5. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri, dış orbitallerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir ¹³⁵. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliğı yüksek moleküllerdir ^{100,143}.

Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşmaktadır. Etki süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde, serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir¹³². Canlıların yaşamları için mutlak gerekli olan oksijen, hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüştürölürken hücre için

gerekli enerji de sağlanır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3' ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur ¹⁰⁶. Serbest radikaller radyasyon, oksijen toksisitesi, iskemi reperfüzyon hasarları, enfeksiyonlar, enflamasyonlar, yaşlanma, kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz gibi hastalık süreçlerinin yanı sıra bir çok nöropsikiyatrik bozuklukların açıklanmasında da karşımıza çıkmaktadır ^{31,124}. Dağılımları özellik nedeniyle, oksijenin elektronlardan ikisi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen diradikal olarakta değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini ve radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlar ⁹⁰.

Dolayısıyla biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Bunlar oksijenin kendisi, süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot -}$) dir ve serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynarlar ⁵².

2.5.1. Singlet Oksijen (O_2)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. İhtiva ettiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir veya kovalent tepkimelere girer. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir ¹²².

2.5.2 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir⁵³.

Süperoksit radikali, ksenobiyotikler gibi ajanlarla, ksantin oksidaz'ın rol aldığı enzimatik tepkimelerle, bazı oksidaz tepkimelerinde, fagositoz sırasında ve elektron transportu sistemi sırasında oluşur. Süperoksit radikali, SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyona girerek azalır⁵³.

2.5.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olur⁵³.

Biyolojik sistemlerde sıklıkla görülen süperoksidin üretimi yoluyla oluşmaktadır ve böylece iki süperoksit anyon radikali birbiriyle, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde reaksiyona girerler¹⁰³.

Süperoksit radikallerinin temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu reaksiyon SOD aracılığı ile veya spontan olarak oluşabilir. H_2O_2 bir oksidan olmakla birlikte serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı organik substratların çoğuyla yavaş reaksiyona girebilir.

2.5.4. Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir.

Son derece reaktif bir oksidan moleküldür. Serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarından en fazla sorumlu tutulandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasarlara neden olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına yol açar⁵³.

2.5.5. Reaktif Nitrojen Ürünleri

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanımlanan ve birçok biyolojik olayda önemli rolü olan çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. Vasküler sistemde endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak tanımlanan nitrik oksit ve diğer bir son ürün olan sitrülin, argininden NO sentaz enzimi aracılığı ile sentez edilir. Oluşan NO içinde bulunduğu mikro çevrede göre nitrosonyum katyonu, nitroksil anyonu ya da O₂ ile reaksiyona girerek oksidatif hasarda rol oynayan peroksinitrit (ONOO⁻) gibi reaktif nitrojen ürünlerine (RNÜ) dönüşebilir¹²³.

Bazı fizyolojik şartlarda ara form olan S nitrososistein ya da S-nitroso-glutasyon formunda bulunabilir³⁵.

NO fizyolojik konsantrasyonlarda hemen tüm organ sistemlerde değişik biyolojik etkilere sahiptir^{61,105}. Gastrointestinal sistem düz kası, hava yolları düz kası ve kavernoöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir aracıdır.

NO merkezi sinir sisteminde hafızanın şekillenmesi de dahil çeşitli fonksiyonları bir nörotransmitter olarak destekler ¹³⁸. Periferde ise gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistemle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenler¹³⁸. Konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da rolü vardır . Artmış NO, vazodilatasyona sebep olurken diğer taraftan trombosit adezyon ve agregasyonunun engellenmesi ile mikrosirkülasyonda rahatlamaya neden olur, dokuların oksijenlenmesini sağlar ^{29,114}.

Ancak yüksek konsantrasyonda savunma amacı ile sitotoksin gibi rol oynar ⁸⁹. NO aracılığıyla oluşan DNA hasarında çekirdek içinde poli (ADPriboz)polimeraz aktivasyonu olur. NAD₊ tükenir ve bu da hücre ölümüne yol açar ^{113,123}.

2.5.6 Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri ¹³²

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- a) DNA' nın tahrip olması,
- b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- g) Seroid ve yas pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması
- i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi
- j) Kollogen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde atrofik değişikliklerin oluşması
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı

2.5.7. Serbest Radikallerin Hasar Yapıcı Etkileri

2.5.7.1. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin en zarar verici etkisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı ve hücre ölümü meydana gelir^{37, 64,104}.

Çünkü membrandaki fosfolipidler lipid peroksidasyonu, zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır¹²⁸. Kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür⁶.

Hücre membranının iç ve dış taraflarında polar gliserofosfat grupları bulunurken orta bölgede lipid peroksidasyonun olduğu hidrofobik çoklu doymamış yağ asitleri uzanmaktadır⁹⁶. Lipid peroksidasyonu, lipid molekülünde iki doymamış bant arasında bulunan metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar ve lipid radikali oluşur. İlerleme fazında, oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksitleri veya lipid hidroperoksitleri oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer lipid, protein ve serbest radikallerle reaksiyona girebilir. Çeşitli zincir reaksiyonlar sonucunda yeni radikaller üretilir ve bu olayı sürekli hale getirir^{37, 96}.

Malondialdehit (MDA), dien konjugatları, lipid hidroperoksitler, alkanlar gibi ürünler, membranlardaki lipid

peroksidasyonun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Perokside membranlar tiyobarbitürik asit (TBA) ile renk reaksiyonu verir ve bu oluşum MDA ölçümünde tiyobarbitürik asit reaktif madde(TBARS) testinin temelidir ⁹⁶.

2.5.7.1.1. Lipid Peroksidasyonunun Patolojik Etkileri ⁹⁶

- I. Lipid peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığı azalır ve normalde hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.
- II. Lipid peroksitler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.
- III. Lipid peroksidasyonu sırasında aktiviteleri için süfhidril ve amino grubuna gereksinim duyan, özellikle hormonal uyarılara hücrenin cevap verme imkanı sağlayan yüzey reseptörlerini inhibe ederler.
- IV. Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipid peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz.
- V. Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.
- VI. MDA gibi aldehitler, LDL' yi modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilir.

2.5.7.2 Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir ⁴⁸. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları, enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış / azalmış yatkinlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir ^{6,32}.

2.5.7.3. DNA Oksidasyonu

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Bazı şartlarda oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır^{30,94}.

2.5.7.4. Karbonhidrat Oksidasyonu

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu; Hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin, inflamatuvar eklem hastalıklarında, sinovial sıvıda artmış olan H_2O_2 ve $O_2^{\bullet}$ ile parçalandığı gösterilmiştir⁵⁴.

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiğı hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler⁵².

2.6.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar^{52,104}

2.6.1.1. Enzimler

- Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi
- Süperoksit Dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon Peroksidaz
- Glutasyon-S-transferaz
- Hidroperoksidaz

2.6.1.2. Enzim Olmayanlar

a) Lipid fazda bulunanlar

- a - tokoferol (E vitamini)
- β- karoten

b) Sıvı fazda (Hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar

Askorbik asit, Melatonin, Ürat, Sistein, Serulplazmin, Transferin, Laktoferrin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Metionin, Albumin, Bilirubin, Glutasyon

Tüm bunların dışında sedanter yaşam, sters, yaşlanma, doku hasarları ve ateroskleroz, emilim bozuklukları, inflamasyon vb. hastalıklarda endojen faktörlere dahil edilmektedir.

2.6.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)^{52,104}

- Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Tungsten, Allopürinol, Oksipürinol, Folik asit, Pterin aldehyd.
- Soya Fasulyesi İnhibitörleri: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.

- NADPH Oksidaz İnhibitörleri: Adenozin, Lokal Anestezikler, Kalsiyum Kanal Blokerleri, Non-Steroid Antiinflatuar İlaçlar, Cetiedil, Difenilin İodonyum, Rekombinant Süperoksit Dismutaz, Trolox-C: E Vitamini Analodudur.
- Endojen Antioksidan Aktiviteyi Arttıran Maddeler: Glutasyon Peroksidaz aktivitesini arttıran Ebselen, Asetilsistein.
- Diğler Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcıları: Mannitol, Albumin, DMSO.
- Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri: Desferroksamin, Serulplazmin
- Nötrofil Adezyon İnhibitörleri
- Sitokinler: TNF ve İnterlökin-I
- Barbitüratlar
- Demir Şelatörleri

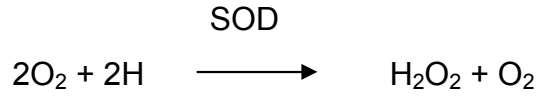
Ayrıca diyetssel faktörlerle (doymamış yağ asidi, hayvansal proteinlerden zengin gıda alımı gibi), çevresel faktörler (sigara dumanı, radyasyon ve hava kirliliğı) bu grupta ele alınmaktadır.

Organizmadaki bilinen en tanınmış reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan en önemli enzimler SOD, CAT ve GSH siklusu enzimleri (glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz) dir.

Organizmanın oksidan-antioksidan dengesi bir çok faktöre bağılıdır. Bunlar endojen ve eksojen olarak iki ana bölümde incelenebilir.

2.6.3 Süperoksit dismutaz

Bu enzim süperoksit anyonunu (O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Metabolik aşamalarda fizyolojik olarak üretimi fazla olan süperoksitin, hücre içi aktivitesini düşük tutarak hücreleri O_2^- radikalinin etkilerinden korumada görev alır.



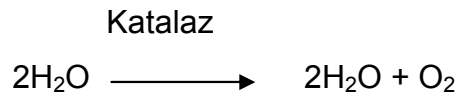
Spontan olarak da oluşabilen bu reaksiyon SOD katalizörlüğünde yaklaşık 4000 kez daha hızlı oluşur.

Üç büyük SOD tipi bildirilmiştir. Bunlardan Cu, Zn içeren enzim stoplazmada, Mg içeren enzim ise mitokondride bulunmaktadır.

SOD aktivitesi dokular arasında farklılıklar gösterir. Karaciğer, böbrek, dalak ve adrenal bezlerde yüksek seviyededir. Aktivite doku oksijenlenmesine duyarlı olan biyosentez yoluyla düzenlenmektedir.

2.6.4 Katalaz

Katalaz sitoplazma ve daha çok peroksizomlarda yerleşmiş olan ve yapısında demir bulunduran bir enzimdir. H_2O_2 'nin suya dönüştürülmesinden sorumludur.



İnsan eritrositlerinde önemli miktarda katalaz bulunmasına rağmen, hidrojen peroksitin buradan uzaklaştırılmasındaki temel mekanizmanın NADPH, glutatyon redüktaz / peroksidaz yolu olduğu düşünülmektedir¹³¹.

Fakat Katalaz reaksiyonu için “Michaelis Sabiti”(Km) nispeten yüksektir ve katalaz H₂O₂'in oluştuğu tüm komponentlerde bulunmaz, bu özellik katalazın oksijen radikali oluşumundan korunmada ikincil öneme sahip olduğunu düşündürmektedir. .

2.6.5. Glutasyon

Glutasyon (GSH) %90 ‘ karaciğerde sentezlenen oksidatif stresten korunmada rolü olan ve tiyol grubu içeren önemli bir endojen antioksidandır.. Suda çözünür ve indirgeyici bir ajandır ⁷⁸. Glutasyon (GSH), tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ-glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ-glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise glutasyon sentetaz, glisin ve γ-glutamil-sisteinden glutasyonu oluşturur.

GSH bağımlı antioksidan sistem Gp-x ve glutasyon redüktaz olarak iki enzimi ve GSH' nun okside (GSSG) ve redükte (GSH)formlarını içerir. Gp-x birçok hücrenin sitozol'ünde bulunur ve hidrojen peroksit ve yağ asidi hidroperoksitleri (eğer hücre zarı fosfolipaz tarafından fosfolipitlere parçalanırsa) üzerinde etkilidir ⁷⁸. En önemli özelliklerinden biri aktif bölgesinde selenyum taşımasıdır ¹¹⁶.

Gp-x tetramer yapıdadır ve 4 tane selenyum atomu içerir. Bu enzimin eritrositlerdeki temel işlevi H₂O₂' yi suya indirgemek, hücre zarı proteinlerinin ve enzimlerinin sülfidril gruplarını redükleyerek hücre bütünlüğünü sağlamaktır. Ayrıca prostaglandin ve lökotrien sentezinde ve katabolizmasında da rol oynar ³⁹. Gp-x, H₂O₂' yi suya indirgerken indirgeyici güç olarak 3 amino asitli bir polipeptid olan indirgenmiş GSH' ı kullanır ^{39,119}.

İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Tepkimeye giren GSH'lar okside olur ve bisülfidit bağlarıyla birbirlerine bağlanarak indirgeyici güçlerini yitirirler. Tepkimenin devam edebilmesi için okside glutatyonlar (GSSG) ve NADPH' ın kullanılması ve glutatyon redüktaz tarafından katalizör bir tepkiyle tekrar indirgenmiş glutatyon (yalnızca glutatyon olarak adlandırılmaktadır.)çevrilmesi gerekmektedir. Bu tepkide ko-faktör olarak kullanılan NADPH' ın tekrar sentezi için ise hekzosmonofosfat şantına ve şantı anahtarı olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimine gerksinim vardır⁴.

Canlıların yaşamı için glutatyonun redükte şeklinin GSH yüksek ve okside olan şeklinin (GSSG) ise düşük konsantrasyonda olması gerekir. Redükte form başlıca iki mekanizma ile oksidasyona karşı dokuyu korur. GSH, serbest radikaller için proteinlerin sülfhidril gruplarının oksidasyonu önlenir. Yüksek GSSG seviyesi, proteinleri inaktive edebilen glutatyon-protein-sülfhidril karışımını oluşturmak üzere reaksiyona girebilir, bu yüzden yüksek GSH ve düşük GSSG seviyesi önemlidir⁴.

2.6.6. Tiyol

Tiyoller, bunların aktif halleri olan sülfidril kalıntılarının (-SH) varlığıyla tanımlanmış organik sülfür türevleri sınıfıdır. Kimyasal olarak tiyoller merkaptanlardır (R-SH) ve biyolojik merkaptanlar çoğu zaman biyotiyoller olarak adlandırılırlar. Biyotiyoller, büyük molekül ağırlıklı protein tiyolleri ve düşük molekül ağırlıklı serbest tiyoller olarak sınıflandırılabilirler¹¹⁸.

Tiyoller, aerobik yaşam şekillerine dağılmıştır. Biyolojik sistemlerde bulunan tiyoller antioksidan savunma sistemlerinin

koordinasyonunda esas rolü oynaması dahil olmak üzere sayısız fonksiyona sahiptir ¹¹⁸.

Tiyol antioksidanlar çeşitli mekanizmalarda rol oynarlar ³⁴.

- Tiyol / disülfür redoks tamponu bileşeni olarak
- Metal kelatlayıcı olarak
- Radikal süpürücü olarak
- Özel redoks reaksiyonlarında substrat olarak (glutatyon gibi)
- Sadece proteinlerdeki disülfat bağlarının özel indirgeyicisi olarak (tiyoredoksin gibi)

Tiyollerin önemli bir karakteristik özelliği, indirgeme yeteneğine sahip olmalarıdır. Tiyoller indirgen özellikte olup negatif standart indirgeme potansiyeline sahiptir. Bu yüzden oksidan-tiyol etkileşiminde, oksidan tiyolün indirgeyici gücünün harcanmasıyla daha az toksik ilgili bir türe dönüşür, tiyolün kendisi ise disülfür haline (R-S-S-R) yükseltgenir. Bir tiyol (R-SH), -SH grubundan bir H atomu kaybıyla ve kükürtten bir elektron kaybıyla bir thiyl radikali (R-S•) oluşur. Fizyolojik pH'ta thiyl radikalleri kararsızdır ve disülfür haline dönüşebilir ¹³⁶.

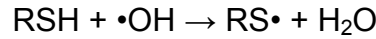
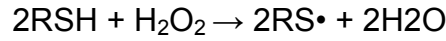
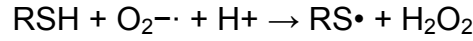
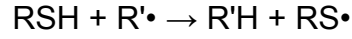
Tablo 3: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri
İndirgenme yarı reaksiyonu

	Standart redüksiyon potansiyeli /V
$1/2 O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0.816
$Fe^{3+} + 2e^- \rightarrow Fe^{2+}$	0.771
$Sistin + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2\text{ sistein}$	-0.220
$GSSG + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2\text{ GSH}$	-0.230
$Lipoik\ asit + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2\text{ dihidrolipoik asit}$	-0.290

Biyotiyoller, hücreleri reaktif oksijen türler sebebiyle oluşan oksidatif hasara karşı koruyan olağanüstü etkili antioksidanlardır. Bu antioksidan reaksiyonlarda tiyolün bir elektron kaybetmesiyle tiyl radikali oluşur ¹⁴².



Tiyollerin serbest radikaller ve hidrojen peroksitle reaksiyonu sonucu tiyl radikali oluşur .



Kükürt içeren bileşiklerin antioksidan aktiviteleri genel bir eğilim izler. Bileşiğin yapısındaki indirgenmiş form (-SH grubu) ne kadar fazla ise bileşik o kadar güçlü antioksidan etki gösterir ¹⁷.

Tiyol bileşikleri, glutatyon peroksidaz reaksiyonunda bir subtrat olan GSH gibi özel antioksidan fonksiyonlarına sahip olduğu kadar radikal süpürücü gibi genel antioksidan özelliklere de sahiptir ^{34,101}.

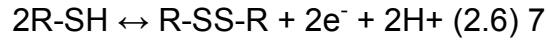
Antioksidan özelliklerinin yanı sıra tiyoller, protein sentezi ve yapısı, sinyal aktarımı, hücre büyümesi ve çoğalması, hücre ölümlerinin düzenlenmesi, ksenobiyotik metabolizma ve bağışıklığın düzenlenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir.

Canlı dokulardaki tiyol bileşiklerin önemli özelliklerinden bir diğeri de tiyol/disülfür bileşimini düzenleyici görev yapmalarıdır ^{43,44}.

Disülfür bağları, çözünebilir proteinlerin yapısal kararlılığının sağlanmasında temeldir. Disülfür bağlarının oluşumu ve kırılması, ortamın

redoks potansiyelini tayin eden elektron donör ve akseptörlerin varlığına bağlıdır. Böylece hücre içi veya hücre dışı ortama tiyol ilavesi protein yapı ve fonksiyonunda kuvvetli etkilere neden olabilir.

Tiyol ve disülfür arasındaki denge reaksiyonu denkleminde tanımlanmıştır¹².



2.6.6.1 Tiyol Grubu İçeren Antioksidan Bileşikler

Tiyol grubu içeren endojen bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH), sistein, homosistein, dihidrolipoik asit (DHLA) ve bunların disülfürleri olan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), sistin, homosistin, lipoik asit (LA) önemli antioksidanlardır. N-asetil sistein (NAC), sisteamin, 1,4-ditiyoeritritol (DTE), glutatyon etil ester (GSHEE) ve metiyonin diğer tiyol grubu antioksidanlarıdır³⁴.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Laboratuvar Cihazları

- Spektrofotometre (UV-1208 Shimadzu)
- Homojenizatör (Hiedolph Diax 900)
- Soğutmalı santrifüj (MPW - 350)
- Elektronik tartı (Sartorius basic)
- Su banyosu (Guft DBS 12734)
- Vorteks (Nüve NM 110-02488)
- Mikropipet (10-100 Transferpette 01 Z 2517, 100-1000 Genex Beta CR 59389)
- ELx 800 Bioelisa Reader

3.2. Uygulanan yöntemler

Bu çalışma tarih ve G.Ü.ET-09.049 kod numaralı etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.Deney Hayvanları ve Gruplar

Laboratuvar şartlarına uygun, kolay uyum göstermeleri, kısa sürede ve fazla sayıda yavru vermeleri, üretimlerinin kolay ve ucuz olması sebebiyle çalışma için sıçanlar tercih edildi. Çalışmada Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezinden temin edilen 12 erkek, 12 dişi adet Wistar Albino sıçan kullanıldı.

Deney süresince laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak ayarlandı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık

olacak şekilde aydınlatılma sağlandı. Hayvanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi. Bütün sıçanlar, %24 proteinli standart sıçan yemi ile sınırsız beslenmeye tabi tutuldu.

Çalışma, yeni doğmuş olan Wistar Albino cinsi erkek ve dişi sıçanlarda gerçekleştirildi. Doğumu takiben yavru sıçanlar anneleri ile beraber aynı kafeste tutuldu. Annelere 4-CPA' nın 25 mg/kg/gün dozu oral yoldan verildi ve yavru sıçanların süt emme döneminde (20 gün) anne sütü aracılığı ile 4-CPA'ya maruz kalmaları sağlandı. 20. günün sonunda (sütten kesilme dönemi)tüm yavru sıçanlar gruplarına ve cinsiyetlerine göre ayrı kafeslere alındı. Dişi ve erkek sıçanlar yapılan uygulamaya göre kendi içinde 2 gruba ayrıldı. Sadece süt emme döneminde 4-CPA uygulanan sıçanlar puberte dönemine kadar sınırsız beslenmeye tabi tutuldu ve normal içme suyu verildi. Doğumdan puberte dönemine (50 gün) kadar 4-CPA' nın 25 mg/kg/gün dozuna maruz kalan sıçanlara ise sütten kesildikten sonra da 4-CPA (25 mg/kg/gün dozu) oral yoldan günde tek doz olarak verildi.

3.2.2. Deneydeki çalışma grupları

E20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen erkek sıçanlar (Laktasyon)

E50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA' ya maruz kalan erkek sıçanlar(Laktasyon+ oral)

D20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen dişi sıçanlar(Laktasyon)

D50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA' ya maruz kalan dişi sıçanlar(Laktasyon+ oral)

Son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler (IM)Rompun+Ketamin (50+60-100mg/kg) anestezisiyle feda edilen deneklerin karaciğerleri alınarak sıvı nitrojende donduruldu, deney parametreleri çalışılincaya kadar -86°C de saklandı. Dokudaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen MDA düzeyi, TBARS madde oluşum yöntemi ile, antioksidan kapasitenin göstergesi olan GSH ve protein tiyol düzeyi spektrofotometrik yöntemle, nitrit nitrat toplamı olan NOx düzeyi ise Griess yöntemi ile ölçüldü.

3.3. Tayin Yöntemleri

3.3.1. Dokuda TBARS tayin yöntemi

Dokuda MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı.

Karaciğer doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile 100 mg doku + 9 ml serum fizyolojik içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4°C de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm'de 8 dk tekrar santrifüj edildi.

Kullanılan Reaktifler

- %10'luk TCA
- %0.67'lik TBA
- N- Bütanol

Örnekten 250 µl alınarak üzerine 1000 µl % 0.67'lik TBA ve 1000 µl %10'luk TCA eklendi. Vorteksle iyice karıştırılarak kaynayan su banyosunda 95°C' de 45 dk bekletildi ve daha sonra oda ısısına kadar soğutularak 2000 µl bütanol eklendi. 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Bütanol fazından 300 µl süpernatant alınarak numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm’de, köre karşı okundu.

3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Dokuda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler

- 0,3 M NaH₂PO₄
- DTNB (0,4 mg / ml %1’lik sodyum sitrat)

Karaciğer doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra 2 hacim süpernatant, 8 hacim NaH₂PO₄ ve 1 hacim DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda ısısında 5- 10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. GSH düzeyleri 13,600 mol⁻¹ cm⁻¹ katsayısı kullanılarak µmol / gr doku olarak ifade edildi.

3.3.3. Lowry protein tayini

Doku protei tayini Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi. Deney alkali ortamda (Cu⁺²), peptit bağı tarafından Cu⁺¹ forma dönüştürülmesi, Cu⁺¹, tirozin, sistein ve triptofan radikallerinin fenolik folin reaktifi ile kompleks oluşturarak, stabil olmayan indirgenmiş molibdenum/tungsten mavisini oluşturma prensibine dayanır.

Kullanılan Reaktifler

- % 2'lik Na_2CO_3 içinde 0.1 N' lik NaOH (A)
- % 2'lik Na-K tartarat (B1)
- % 1'lik CuSO_4 (B2)
- Folin ciocalteu's fenol reaktifi
- C reaktifi = 33 ml (A) + 1 ml (B1) + 1 ml (B2) karışımı olarak hazırlandı.

Standart olarak 1 mg/ml sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

	Kör	Standart 1	Standart 2	Numune
Homojenat		-		10 µl
BSA		50 µl	100 µl	-
Distile su	100 µl	50 µl		90 µl
C reaktifi	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Tüpler vorteks yapıldıktan sonra 15 dk karanlıkta bekletildi.				
Folin	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Folin reaktifi eklendikten sonra tüpler vorteks yapılır ve oda ısısında 1 saat karanlıkta bekletildikten sonra 750 nm' de köre karşı numuneler ve standartlar okutulur.

Protein miktarı hesaplanması:

Protein miktarı (mg/ml)= ($\text{Ab}_{\text{NUMUNE}}$ / $\text{Ab}_{\text{STANDART}}$)x Standart konsantrasyonu

3.3.3.1. Karaciğer dokusu tiyol düzeylerinin hesaplanması

Doku tiyol düzeyleri Sedlak ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemine göre tayin edildi.

Aynı dokularda protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi.

Karaciğer doku örnekleri 1/5 oranında (200 mg doku/ 800 ml) serum fizyolojik tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi.

Homojenitör soğutmalı santrifüjede 5000 g' de, 10 dakika, +4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant ile çalışıldı.

Kullanılan Reaktifler

- 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), (DTNB; Ellman's reagent) saf metanol içerisinde hazırlandı.
- 0.2 M Tris tamponu (pH: 8.2), (Tris EDTA); 12.1 gr Tris bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra üzerine 50 ml 0.2 M EDTA Na₂ ilave edilir. PH: 8.2' ye 1 N HCl ile ayarlandıktan sonra deiyonize su ile 500 ml' ye tamamlanır.
- 0.4 M Tris tamponu (pH: 8.9), (Tris EDTA); 24.2 gr Tris bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra üzerine 50 ml 0.4 M EDTA Na₂ ilave edilir. PH: 8.2' ye 1 N HCl ile ayarlandıktan sonra deiyonize su ile 500 ml' ye tamamlanır.
- %50' lik TCA

3.3.3.2. Karaciğer Dokusu Total TiyoL Düzeylerinin Saptanması

Tablo 4_Karaciğer Dokusu Total TiyoL Düzeylerinin Saptanması

	K�r	Numune
Homojenat	-	250 �l
Distile su	250 �l	-
Tris EDTA (pH: 8.2)	750 �l	750 �l
DTNB	50 �l	50 �l
Saf metanol	1950 �l	1950 �l

Numune ve k r  içeren tüpler 15 dk, karanlıkta ve her 5 dk' da vortekslenerek beklendi. Süre sonunda 15 dk, 3000 g' de santrifüj edilen tüpler 412 nm' de k re karşı okutulur.

3.3.3.3. Karaciğer Dokusu Non-Protein TiyoL Düzeylerinin Hesaplanması

Tablo 6 Karaciğer Dokusu Non-Protein TiyoL Düzeylerinin Hesaplanması

	K�r	Numune
Homojenat	-	250 �l
Distile su	450 �l	200 �l
TCA	50 �l	50 �l
Tüpler vortekslendikten sonra 15 dk 5000 g' de santrifüj edilir. S�pernat�n ile çalışılır.		
S�pernat�n	-	200 �l
Tris EDTA (pH: 8.9)	400 �l	400 �l
DTNB	10 �l	10 �l

Mikroküvette ayrışması sağlandıktan sonra homojenat içermeyen köre karşı 412 nm' de okutulur.

3.3.3.4. Protein TiyoL Düzeylerinin Hesaplanması

5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) için 412 nm' de absorpsiyon katsayısı $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Protein tiyoL (nmol/mg protein) = Total tiyoL (nmol/mg) – Non-protein tiyoL (nmol/mg) / protein (mg/l)

3.3.5. Dokuda NOx tayin yöntemi

Dokuda NO' in temsilcisi olarak nitrit+nitrat (NOx) düzeylerinin tayininde modifiye Griess yöntemi kullanıldı.96 Standart olarak deiyonize su ile hazırlanmış sodyum nitratın 0-50 µM dilasyonları kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler

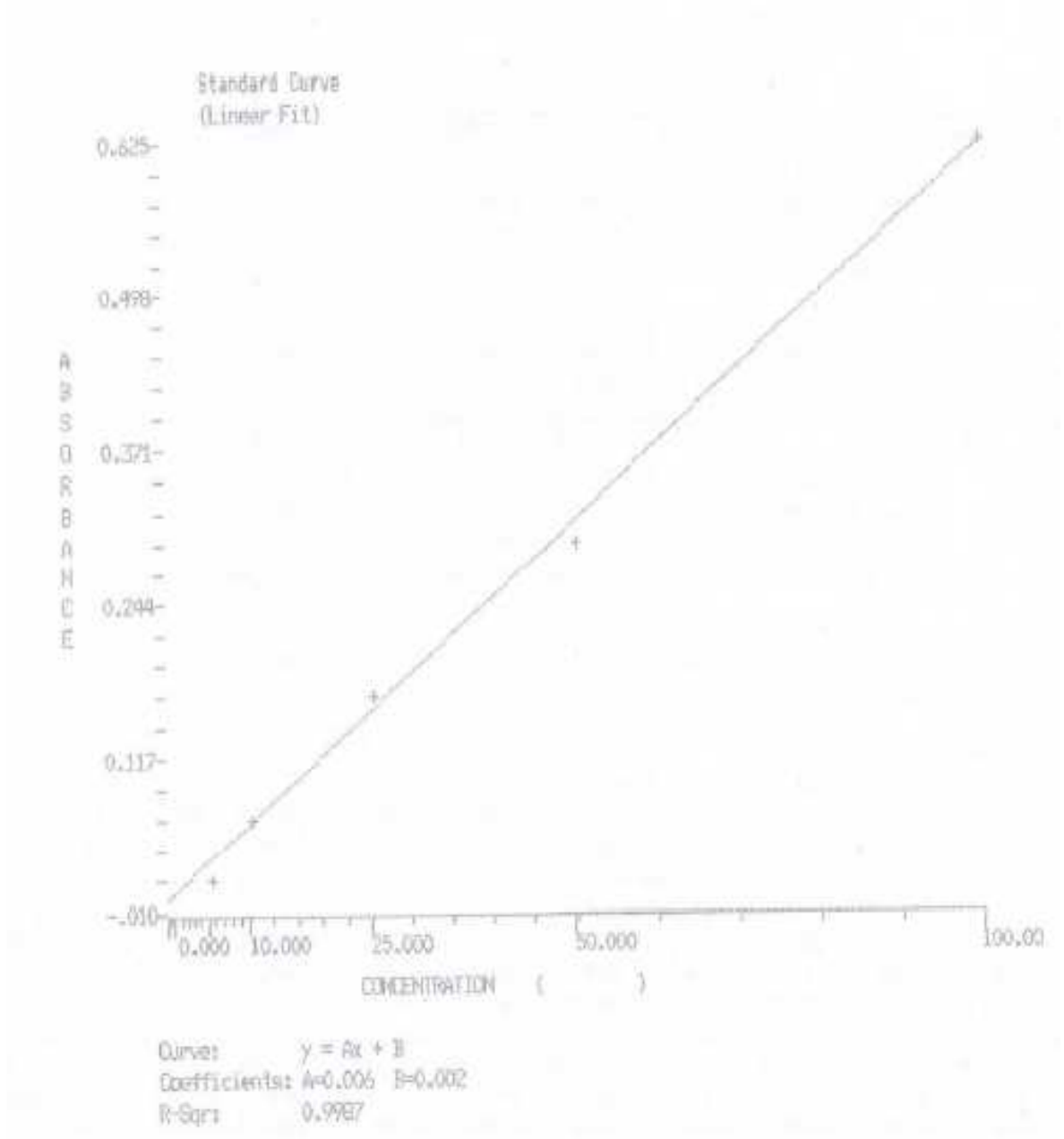
- Fosfat tamponu (pH 7,4)
- 0.3 N NaOH
- %10'luk ZnSO4
- VaCl_3
- Sülfanilamid
- NEDD

Doku örneklerini pH 7,4 olan fosfat tamponu ile 5:1 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenat +4 0C de $3000\times g$ de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. 0,5 ml süpernatant alınarak üzerine 250 µl 0.3 N NaOH ilave edildi. Oda ısısında 5 dk inhibisyonuna bırakıldı. Üstüne 250 mikrolitre %10'luk ZnSO4 ilave edildi. Vortekslenen karışım +4

0 C de 3000g de 5 dk santrifüj edildi. Üst fazın tamamı ayrılarak +4 0 C de 14000 rpm de 5 dk daha santrifüj edildi.

Doku örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlemlerinden sonra elde edilen üst fazlarından NOx tayini için 0,1 ml alınarak her bir örnekten çift tekrar olacak şekilde 96 çukurlu ELISA plağına yerleştirildi. Eş hacimde standart solüsyonları da ayrı çukurlara yerleştirildi. Standart solüsyonlar ve numunelerin üzerine 1 birim $VaCl_3$ (400 mg $VaCl_3$ tartılır, 1 molar HCl çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanarak karıştırılır.), 0,05 ml sülfanilamid ve ardından 0,05 ml NEDD eklendi. Plak $37^{\circ}C$ de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucusunda 540 nm de okundu

Şekil 2: NOx Tayininde Standart Solusyonlara Karşılık Gelen Absorbansların Oluşturduğu Doğrusal Regresyon Grafiği



3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS istatistik paket programı ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA varyans analizi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için denek sayısının az olması nedeniyle non parametrik "Mann Whitney U" testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama $\pm$ Standart Hata (SH) olarak verildi. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tablo 6 :Tüm gruplara ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri.

	E20	E50	D20	D50
MDA(nmol/mgprotein)	5.49 $\pm$ 0.50	6.78 $\pm$ 0.88	4.39 $\pm$ 0.60	4.45 $\pm$ 0.38
GSH (μ mol/gr doku)	0,27 $\pm$ 0.004	0,24 $\pm$ 0.024	0,29 $\pm$ 0.0097	0,28 $\pm$ 0.006
P-SH (nmol/mgprotein)	68.15 $\pm$ 2.48	47.86 $\pm$ 5.04	76.22 $\pm$ 8.56	60.29 $\pm$ 5.42
NOx (μ mol/gr doku)	6.86 $\pm$ 0.97	6.64 $\pm$ 1.10	5.995 $\pm$ 0.94	4.720 $\pm$ 1.23

E20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen erkek sıçanlar

E50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA' ya maruz kalan erkek sıçanlar

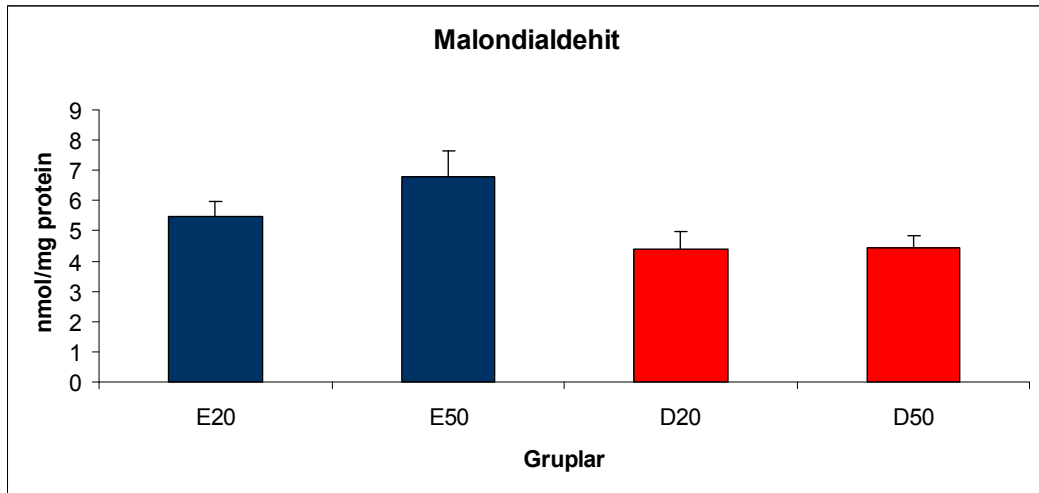
D20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen dişi sıçanlar

D50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA' ya maruz kalan dişi sıçanlar

4.1. Karaciğer Dokusu TBARS Düzeyleri

Karaciğer dokusu MDA seviyeleri için tüm gruplar karşılaştırıldığında doğumdan puberte dönemine kadar 4-CPA uygulanan erkek ve dişi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,028$; $p < 0.05$) (Tablo7). Ancak sadece süt emme döneminde 4-CPA uygulanan (20 gün) ve doğumdan puberte dönemine kadar 4-CPA uygulanan (50 gün) erkek ve dişi gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Garfik 1: Erkek ve Dişi Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri



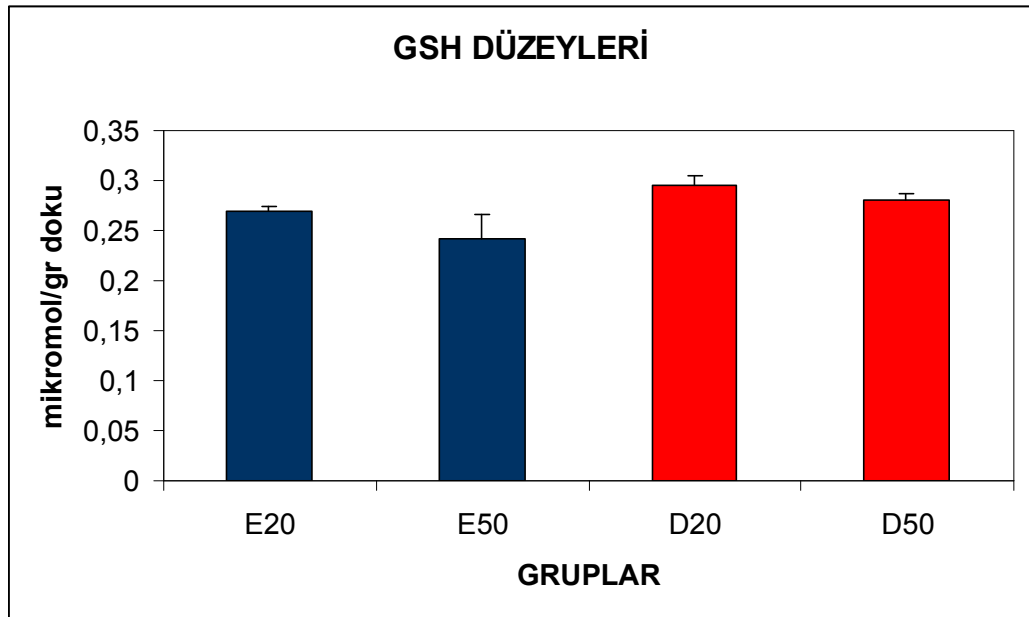
Tablo 7: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların MDA düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri

GRUPLAR	P değeri
E20 - E50	0.347
D20 - D50	0.630
E20 - D20	0.273
E50 - D50	0.028*

4.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri

Karaciğer dokusu GSH düzeyleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p > 0.05$) (Tablo 8).

Grafik 2: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri



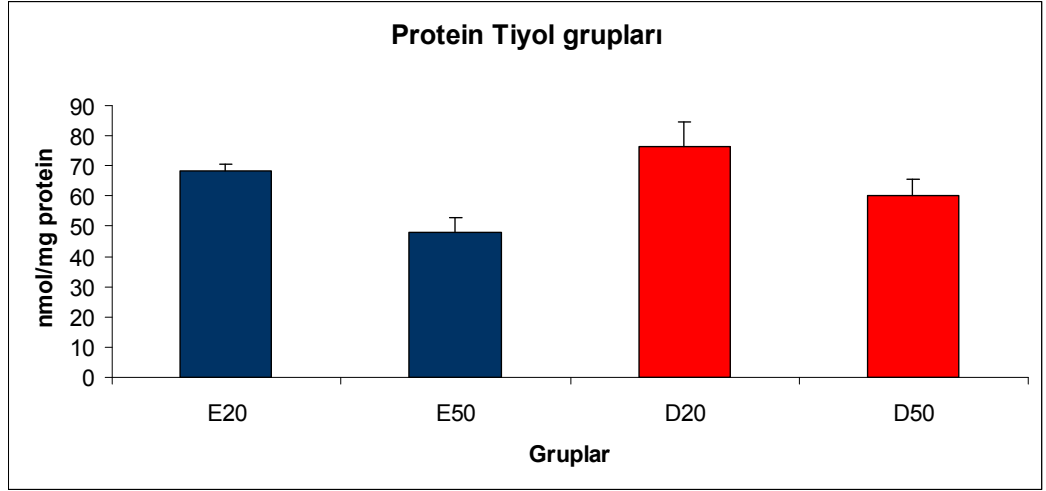
Tablo 8: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların GSH düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri

GRUPLAR	P değeri
E20 - E50	0.588
D20 - D50	0.132
E20 - D20	0.093
E50 - D50	0.484

4.3. Karaciğer Dokusu Protein Tiylol (P-SH) Düzeyleri

Karaciğer dokusu protein tiylol düzeyleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında süt emme döneminde (20 gün) ve doğumdan puberte dönemine kadar 4-CPA uygulanan (50 gün) erkek sıçan grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken($p=0.016$; $p<0.05$) (Tablo 9), süt emme döneminde (20 gün) ve doğumdan puberte dönemine kadar 4-CPA uygulanan (50 gün) dişi sıçan grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Yine dişi-erkek gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)

**Grafik 3: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda Protein Tiylol (P-SH)
Düzeyleri**



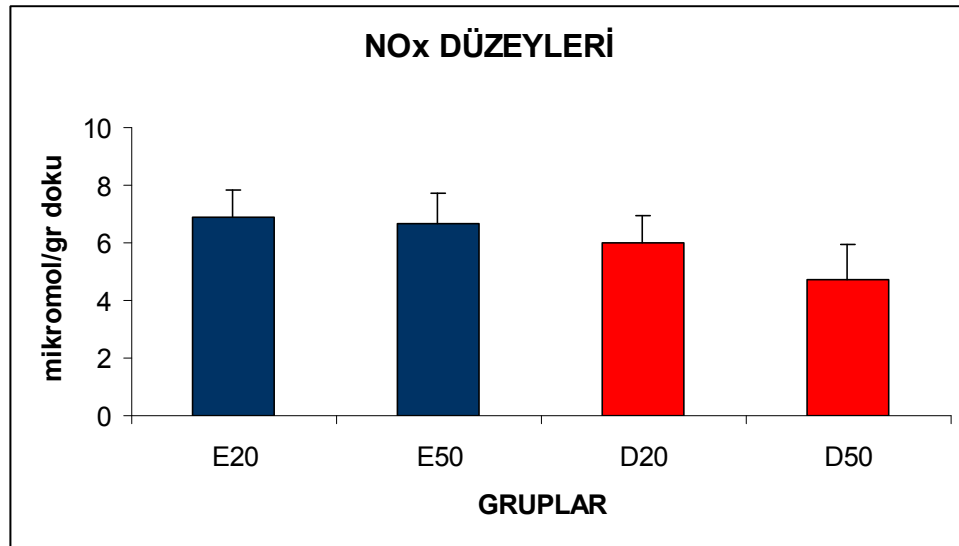
Tablo 9: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların Protein Tiylol (P-SH) Düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri

GRUPLAR	P değeri
E20 - E50	0.016*
D20 - D50	0.175
E20 - D20	0.465
E50 - D50	0.117

4.4. Karaciğer Dokusu NOx Düzeyleri

Karaciğer dokusu NOx düzeyleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p > 0.05$) (Tablo 10).

Grafik 4: 4-CPA Verilen Erkek ve Dişi Sıçanlarda NOx Düzeyleri



Tablo 10: 4-CPA uygulanan erkek ve dişi sıçanların NOx düzeylerinin karşılaştırmalarına ait p değerleri

GRUPLAR	P değeri
E20 - E50	0.937
D20 - D50	0.818
E20 - D20	0.588
E50 - D50	0.179

5. TARTIŞMA

Tarımsal verimin arttırılmasında veya tarım zararlıları ile mücadele kimyasalların kullanımı insanlarda ve diğer canlı türlerinde farklı uygulama süreçlerinde toksisite ve kalıcı bozukluklar gibi sorunların çıkmasında neden olmuştur.

Araştırmamız iki amaca göre planlanmıştır. Bunlardan ilki doğumdan sonra 4-CPA uygulanan annelerin sütü ile 20 gün boyunca beslenen yavruların karaciğerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesidir. Diğer ise hem anne sütü ile beslenme evresinde endirekt olarak, hem de ergenlik döneminde 30 gün süre ile direkt olarak 4-CPA' ya maruz kalan deneklerin karaciğerindeki bazı oksidan parametrelerin incelenmesidir.

Bu çalışmada uygulama yapılmamış denek grubu oluşturulmamıştır. Çünkü bölümümüzde daha önce 50 günlük ergen ratlarda yapılan paralel bir araştırmada MDA, GSH, NO' nun bizdeki 50 günlük uygulama dönemine uyan, 30 gün süreyle değişik dozda 4-CPA verilerek normal değerleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu ölçümler, bizim deneylerimizde de kontrol bulguları olarak kullanılmıştır.

Günümüzde yapılan çalışmalar çoğu patolojik olayda serbest radikallerin katkısı olduğunu kanıtlamaktadır.

Pestisitlerin toksik etkilerinde de lipid peroksidasyonun rolü olduğu gösterilmiştir. BBDH'lerin toksik etkilerine duyarlı olunan dönemin ise puberte öncesi dönem olduğu ifade edilmektedir ¹³¹.

Karaciğer metabolik aktivitenin en fazla olduğu organdır ve yüksek doz 4-CPA uygulamasının hepatoselüler nekroza neden olduğu bildirilmiştir ¹³¹.

Hepatositlerdeki mikromozal enzim sistemleri iç ve dış kaynaklı birçok bileşiğin oksidasyonunda sorumludur. Bunların amacı organizmada maddeleri inaktive ve aktive etme, steroid hormon sentezine katılma, yağ asidi ve türevlerini metabolize etme gibi koruyucu etkilerdir. Fakat sıklıkla metabolitleri yüksek derecede reaktif moleküllere dönüştürmek, istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi zararlı sonuçlara da neden olabilirler.

Pestisitlerin ve diğer çevresel kimyasalların toksik etkilerinde de radikallerin aracı olabileceği gözlenmiştir ⁷⁵.

Hücre içindeki sitokrom P450 enzimlerinin toksik ajanlarla etkinleşmesi sonucunda oluşan oksidatif hasar hücrede lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein değişikliklerine yol açmaktadır. MDA lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edildiği için bizim çalışmamızda da MDA'nın karaciğer doku düzeyleri incelenmiştir.

Bölümümüzde daha önce yapılmış olan benzer bir araştırmada ergenlik döneminde deneklerde normal karaciğer doku MDA düzeyi $4,5 \pm 0,22$ nmol/mg protein olarak ölçülmüştür ¹³¹. Bizim deney şartlarımızda 4-CPA uygulamalarının dişilerde karaciğer MDA'sını değiştirmedeği fakat erkek deneklerde arttırdığı söylenebilir.

Literatürde dişi ve erkek karaciğer dokusundaki lipid peroksidasyon kapasitesinin farklı olduğu bildirilmiştir. Benzer bulgu cyt-P450 izoenzimleri içinde saptanmıştır ¹⁴¹.

Araştırmacılar göre karaciğerdeki cyt-P450 izoenzim aktivitesi cinsiyete bağlı değişiklik göstermektedir ve bu açığa çıkan ROS miktarını etkilemektedir.

Araştırmamızda 4-CPA'ya maruz kalan erkek deneklerin hem 20 günlük süt emme süresi sonunda ve hem de 50 günlük ergenlik döneminde lipid peroksidasyon değerlerinin dişilerden daha yüksek olması dikkat çekti. Fakat sadece 50 günlük deneklerin cinsiyete bağlı MDA'ları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Lin ve ark.'ları toksik hepatik zedelenmelerde gelişimini tamamlamamış karaciğer dokusunun, erişkinlere kıyasla daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir ⁸³⁻⁸⁵. Bunun mekanizmasının da cyt-P450 sisteminin gelişimini tamamlamamış olması ve doku yenileme mekanizmalarının daha aktif olması ile açıklanmıştır ^{83 - 86}.

Karaciğerdeki enzimlerin yaşamın ilk dönemlerinde daha düşük miktarlarda olduğu ve puberte döneminde erişkinlerdeki seviyelerine ulaştığı, erkeklerde dişilere oranla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ⁶². Winzer ve ark. göre oksidatif stres cinsiyete bağlı olarak değişiklik göstermektedir ¹⁴¹.

Muhtemelen bizim erkek deneklerimizdeki yüksek MDA değerleri, 4-CPA'nın dişilere kıyasla erkeklerde daha yüksek indükleyici etki göstermesi veya erkeklerdeki daha düşük antioksidan kapasite ile açıklanabilir.

Çalışmamızda antioksidan sistemlerin etkisini tespit etmek amacıyla karaciğer dokularında total tiyol ve tiyol gruplarının bir bölümünü oluşturan GSH düzeyleri incelendiğinde GSH'nın cinsiyete ve uygulama süresine göre değişmediği gözlemlendi.

Total tiyol düzeylerinin ise dişilerde daha yüksek bulunması, bu deneklerdeki düşük MDA düzeyleri ile uyumlu bir bulgu olarak yorumlandı.

Tiyol düzeyleri 4-CPA'ya maruz kalma süresine göre karşılaştırıldığında; her iki cinsiyette de 20 günlük süt emme dönemindeki deneklerin karaciğer düzeylerinin, 50 gün uygulama yapılanlara kıyasla önemli derecede yüksek olduğu görüldü.

Ergen karaciğerdeki tiyol azalması muhtemelen oksin(4-CPA)'e maruz kalma süresine bağlı olarak bu indirgeyici ajanın daha fazla kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu 4-CPA'nın prooksidan etkisinden, başta sistein ve metiyonin aminoasitlerini içerenler olmak üzere proteinlerin ne kadar etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır^{60,120}.

GSH düzeylerinin değişmemiş olması dokuda öncelikli olarak kullanıldığını ve/veya karaciğerin gelişimini tamamlamamış olması nedeniyle GSH'ın yeterince tekrar üretilemediğini düşündürmektedir. Çünkü yeni doğan ratlarda GSH düzeyinin yetişkinlerdekinin %57'si kadar olduğu gösterilmiştir^{1, 120}. Ayrıca Duygu ve ark. ergenliğe ulaşmış kontrol ratlarda karaciğer GSH düzeyinin yüksek olduğunu ve bu dönemde 4-CPA verilenlerde değerlerin önemli dercede azaldığını göstermişlerdir.

Bu araştırıcıların 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen ergenlerinde ortalama karaciğer GSH değeri 4.7 ± 0.13 $\mu\text{mol/gr}$ doku olarak ölçülürken bizim doğumdan itibaren 4-CPA'ya maruz kalan ergenlerimizde 0.24 ± 0.024 $\mu\text{mol/gr}$ doku olduğu gözlenmiştir. Bu fark doğumdan sonra 4-CPA ile beslenen annenin sütü aracılığı ile yavrunun antioksidan sistemini etkileyebileceğini düşündürmektedir¹³¹.

Toksik zedelenmelerde yıkıcı veya koruyucu etkileri olabilecek moleküllerden biri de NO'dur. NO'nun süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmaları hepatotoksik etki yapabilir ²⁴. NO radikal temizleyici ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunun inhibe edici etkisi ile koruyucu rol oynar ¹⁴⁷. Sitokin aracılı hücre ölümünü engeller⁵⁶. Bu mekanizmada P13K/Akt sinyal yoluyla, Akt'nin eNOS aktivasyonu (fosforilasyonu) nu arttırdığı dolayısıyla NO yapımını sağladığı endotel hücre kültürlerinde gösterilmiştir ⁴⁰. P13K inhibitörleri ile yapılan deneylerde hepatik zedelenmenin önlenmesinde bulguları desteklemektedir.

Literatürde yeni doğan ratlarda eNOS mRNA aktivitesinin, yaşamın 20. gününe kadar artarak erişkin düzeyine ulaştığı bildirilmektedir ¹⁰⁸.

Bölümümüzde yapılan paralel çalışmada 50 günlük normal dişi ve erkek rat karaciğer dokusunda ortalama NO düzeyleri sırasıyla 14.1 ± 0.77 ve 13.9 ± 0.83 $\mu\text{mol/gr}$ doku bulunmuştur ¹³¹. Bizim çalışmamızda yaşamlarının ilk 20 veya 50 gününde 4-CPA'ya maruz kalanların NO'ları arasında fark olmaması, fakat değerlerin normal seviyenin yaklaşık yarısı düzeyinde ölçülmesi dikkat çekmiştir .

Düşük NO konsantrasyonlarında, hem oksidasyonunu, DNA'nın fenton tipi oksidasyonunun ve lipid peroksidasyonunun önlediği göz önüne alındığında bizim deney şartlarımızda koruyucu etkisinin olması beklenebilir ¹⁴⁶.

Diğer taraftan 4-CPA'ya maruz kalındığında hepatositlerdeki mikrozomal enzim sistemlerinin maturasyonlarının önlenme olasılığı da mevcuttur. Bu şartlarda ilaçlar, gıda katkıları, pestisitler, çevresel kirleticiler vb. kimyasalların dokularda birikmesi önem kazanır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda laktasyon döneminde 4-CPA verilen bir annenin sütü ile beslenen yavrularında karaciğer oksidan ve antioksidan sistemlerinin, ergenlik döneminde itibaren 4-CPA'ya maruz kalanlara kıyasla daha ileri derecede etkilendiği gösterilmiştir.

4-CPA etkilerinin daha iyi değerlendirilebilmesi için aynı deney şartlarında diğer organlardaki etkilerinin ve dokulardaki 4-CPA birikimlerinin inceleneceği yeni çalışmalara gereksinim olduğu anlaşılmıştır.

7. ÖZET

DOĞUMDAN PUBERTE DÖNEMİNE KADAR 4-CPA' YA MARUZ KALAN SIÇANLARDA KARACİĞER OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİNİN İNCELEMESİ

4-CPA , indol astik asit (IAA) gibi davranan, yapay, fenoksi asetik asit türevi oksinlerdendir. Özellikle domates üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde bıraktıkları kalıntılar nedeniyle istenmeyen etkilere neden olmaktadır.

Literatürde 4-CPA ile ilgili çeşitli toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Bunların çoğunluğu üreme ve endokrin sistem üzerine yoğunlaşmıştır. 4-CPA' nın uygun doz ve uygun zamanda kullanılmaması durumunda hepatoselüler nekroza neden olduğu ifade edilmektedir. Aynı zamanda puberte öncesi dönemde uygulanan 4-CPA' nın karaciğer dokusunda cinsiyete bağlı olmaksızın lipid peroksidasyonunu ve inflamatuvar reaksiyonları arttırdığını gösteren bir çalışma da mevcuttur.

Bu bilgiler ışığı altında çalışmamızda doğumdan puberte dönemine kadar 4-CPA' ya maruz kalan sıçanlarda karaciğer oksidan ve antioksidan olayları incelemeyi amaçladık.

Araştırmamızda, yeni doğmuş, Wistar Albino cinsi 12 erkek, 12 dişi sıçan kullanıldı. Bunlar 4 gruba ayrıldılar.

E20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen erkek sıçanlar

E50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA'ya maruz kalan erkek sıçanlar

D20 (n=6): Doğumdan sonraki süt emme döneminde (20 gün) annelerine 25 mg/kg/gün 4-CPA verilen dişi sıçanlar

D50 (n=6): Doğumdan puberte dönemine kadar (50 gün) 25 mg/kg/gün 4-CPA'ya maruz kalan dişi sıçanlar

D20 ve E20 grubundaki dişi ve erkek yavrular, laktasyon dönemindeki annelerinden, anne sütü aracılığı ile 20 gün boyunca bu oksini almış oldular. D50 ve E50 gruplarındaki deneklere ise süt emme döneminden itibaren sonra da 30 günlük puberte döneminde oral olarak 25 mg/kg/gün 4-CPA verilemeye devam edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler (IM)Rompun+Ketamin (50+60-100mg/kg) anestezisi ile denekler feda edildi. Dokudaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen MDA düzeyi, TBARS madde oluşum yöntemi ile, antioksidan kapasitenin göstergesi olan GSH ve protein tiyol düzeyi spektrofotmetrik yöntemle, nitrit nitrat toplamı olan NOx düzeyi ise Griess yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar Anova ve Mann- Whitney U testleri ile değerlendirildi. $P < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Araştırmamızda 4-CPA' ya maruz kalan erkek deneklerin hem 20 günlük süt emme döneminde hem de 50 günlük ergenlik döneminde lipid peroksidasyon değerlerinin dişilerden daha yüksek olduğu saptandı.

Karaciğer dokusu tiyol düzeylerinin ise dişilerde daha yüksek bulunması, bu deneklerdeki düşük MDA düzeyleri ile uyumlu bir bulgu olarak yorumlandı. Her iki cinsiyette de 20 günlük süt emme dönemindeki deneklerin karaciğer dokusu tiyol düzeylerinin 50 gün uygulama yapılanlara kıyasla önemli derecede yüksek olduğu görüldü.

20 gün ve 50 gün 4-CPA' ya maruz kalan deneklerin NOx düzeylerinde ise fark saptanmadı. Ancak değerlerin normal seviyenin yaklaşık yarısı düzeyinde olması dikkat çekmiştir.

Bu bulgular laktasyon döneminde 4-CPA verilen bir annenin sütü ile beslenen yavrularında karaciğer oksidan ve antioksidan sistemlerinin, ergenlik döneminden itibaren maruz kalanlara kıyasla daha ileri derecede etkilendiğini düşündürmektedir.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF LIVER'S ANTIOXIDANT AND OXIDANT SYSTEMS AT THE RATS, WERE EXPOSED TO 4-CPA FROM BIRTH UNTIL THE PUBERTY PERIODS

4-CPA is one of the artificial auxines derived from phenoxy acetic acid behaving like indole acetic acid (IAA). It is especially commonly used in the production of tomato. Furthermore are leading to undesired effects due to residues left on the plants.

There are various toxicity studies related to 4-CPA in the literature. Most of these have been focused on reproduction and endocrine system. In case 4-CPA is not used in convenient doses and at properly times, was expressed that leads to hepatocellular necrosis. Meanwhile there is a study showing that 4-CPA applied in the pre-puberty period is increasing the peroxidation of lipids and inflammatory reactions in the tissue of liver without being depending to gender.

In the light of these information in our study we aimed to analyze the oxidant and antioxidant events of liver at the rats exposed to 4-CPA from birth and until the puberty period.

In our study 12 male, 12 female new born Wistar Albino race rats have been used. They have been separated in 4 groups.

E20 (n=6): Male rats to which mothers 25mg/kg/day 4-CPA has been applied within the period of lactation (20 days) following the birth

E50 (n=6): Male rats exposed to 25mg/kg/day 4-CPA from the birth until puberty period (50 days)

D20 (n=6): Female rats to which mothers 25mg/kg/day 4-CPA has been applied within the period of lactation (20 days) following the birth

D50 (n=6): Female rats exposed to 25mg/kg/day 4-CPA from the birth until puberty period (50 days)

The female and male babies from D20 and E20 group have been taken this auxine during 20 days by means of milk of mother from their mothers within the lactation period. The subjects from D50 and E50 groups have been continued to be given with 25 mg/kg/day 4-CPA orally within the 30 days puberty period following the lactation period. 24 hours later following the last administration the subjects have been sacrificed with intramuscular (IM) (Rompun + Ketamine (50+60-100mg/kg) anesthesia. MDA level accepted as the indicator of lipid peroxidation from the tissue, has been measured with TBARS substance creation method, GSH which is the indicator of antioxidant capacity and thiol level spectrophotometric method, and the NOx level which is the total of nitrite nitrate has been measured with Griess method. The results have been evaluated with Anova and Mann-Whitney U tests. $P < 0.05$ values have been accepted as significant.

In our study it has been determined that lipid peroxidation values both within the 20 days lactation period and 50 days puberty period of the male subjects exposed to 4-CPA are higher than female subjects.

The higher values of thiol level in the liver tissue of female subjects have been commented as a finding consistent with lower MDA levels from these subjects. It has been seen that at the both genders the thiol levels from liver of the subjects within 20 days lactation period are significantly higher than the subjects exposed to 50 days administration.

Difference has not been determined in the NO_x levels of the subjects exposed for 20 and respectively 50 days to 4-CPA. However attention has been drawn by the values which were about the half level at the normal level.

These findings give rise to thought that oxidant and antioxidant systems of liver of the babies nourished with mother milk to which 4-CPA has been administrated within the lactation period, are affected on highest degree when compared to those exposed as of puberty period.

9. KAYNAKLAR

1. Abdolamir Allameh, Emelin Y. Vansoun and Afshin Zarghi Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mechanisms of Ageing and Development* Volume 95, Issues 1 2, 1997.
2. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafariet K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C.*:2003;135: 331-336.
3. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 141-147. 50.
4. Akbulut, K.G.: Melatoninin yaşlanma ile antioksidan mekanizmaların ve humoral immun sistem arasındaki ilişkiler üzerindeki etkileri, Uzmanlık Tezi. Ankara :Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi,Fizyoloji Anabilim Dalı; 1997.
5. Akçan R. Pestisit uygulanan tavşanlarda postmortem kan ve kemik iliğinde pestisit düzeylerinin araştırılması. Uzmanlık tezi. Adana: Çukurova üniversitesi; 2008.
6. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 1-16.
7. Aksglaede L, Juul A, Leffers H, Skakkebaek NE, Endersson AM.The sensivity of the child to sex steroids: Possible impact ofexogenous strogens. *Whom reprod Update*, 2006; 12: 341-349
8. Almeida MG, Fanini F, Davino SC, Aznar AE, Koch OR, Barros SB. Pro- and anti-oxidant parameters in rat liver after short-term exposure to hexachlorobenzene. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 257-261.
9. Alpöz, A.R., Tosun, N., Eronat, C., Delen,N., şen,B.H. Effects of 2,4 dichlorophenoxy acetic acid dimethyl amine salt o dental hand

- tissueformation in rats. Environmental International. 2001; 27 : 137-142.
10. Altuntas , Delibas N, Doguca DK, Özmen S, Gültekin F. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. Toxicology In Vitro, 2003; 17: 153-157.
 11. Altuntas I, Delibas N. The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: The possible protective role of vitamins E and C. Turk J Med Sci 2002; 32: 293-297.
 12. Anbar, M, Neta, P., A compilation of specific biomolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution, Int. J. Appl. Radiat. Isot, 18, 1967; 493-523.
 13. Anonymous. Ziraat Mücadele Teknik Talimatları, 4.cilt, Tarım Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Ankara; 1995b; 393s.
 14. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2006; 15:72- 77
 15. Atasoy, A. Erken çocukluk otizmi ve saçta eser elementler .Uzmanlık tezi. Ankara: Gazi üniversitesi tıp fakültesi;1986.
 16. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Pirincci I, Tasdemir B. The Effects of vitamin E and selenium on cypermethrin- induced oxidative stress in rats Turk. J Vet Anim Sci 2005; 29: 385-391.
 17. Atmaca, G., Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids, Yonsei Medical Journal, 45(5), 2004; 776-788.
 18. Aydoğdu M, Poyraz N. Plant growth regulators (hormone) and resistance to diseases. Bitkisel Araştırma Dergisi 2005;1: 35–40
 19. Baban N. Adli toksikoloji. Adli Tıp Kurumu Yayınları-8, İstanbul, 2003.

20. Bachowski S, Kolaja KL, Xu Y, Ketcham CA, Stevenson DE, Walborg EF, Klaunig JE. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997; 27: 196-209.
21. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticide. *Toxicology*. 1995; 104: 129-140.
22. Banerjee BD, Ray A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 1998; 36:395-398.
23. Banks D, Soliman MR. Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology* 1997; 116: 177-181.
24. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437, 1996.
25. Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller RT, vom Saal FS. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ Health Perspect.* 1999; 107: 613- 618.
26. Bucker F., DAVIS, F. Effect of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid*. 1998; 8: 827 – 856.
27. Calborn, T, Endocrine disruption from environmental toxicants. In *Environmental and Occupational Medicine*. Ed., Rom., W.N. Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1998.
28. Cheesman, K.H., Slater, T.F.: An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1999; 49(3):481- 493.
29. Cheung PY, Salas E, Schulz R, Radomski MW. Nitric oxide and platelet function: implications for neonatology. *Semin Perinatol.* 1997; 21:409- 417.

30. Cooke MS., Evans MD., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 17(10):1195-214, Review 2003.
31. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987; 107: 526-45.
32. Deby C. Pincemail J. Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökan (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer- Verlag, Berlin pp:57 -70, 1988.
33. Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. Türkiye’ de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalış sorunları. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3 – 7 Ocak 2005.; Cilt-2, s: 629 – 648.
34. Deneke, S.M., Thiol-based antioxidants, Current Topics in Cellular Regulation, 36, 2000;151-180.
35. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, Physiol Rev. 2002; 82, 47-95
36. Dwivedi PD, Das M, Khanna SK. Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. Food Chem Toxicol 1998; 36: 437-444.
37. Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen- derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions, 107(3), 397-418, 1982 .
38. FAO. Pesticide residues in food. 1993 FAO Plant Production Paper 1993; 122.
39. Fujii, S. The role of Gp-x in the antioxidant system of erythrocytes. BR.J.Haematol., 68:263-271, 1988.
40. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of

- endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597- 601.
41. Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology*, 2003; 12: 345- 363.
 42. Gangadharan B. Effect of methoxychlor on antioxidant system of goat epididymal sperm in vitro. *B. Asian J. Androl.*, 2001;3: 285-88.
 43. Gilbert H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990; 69-172.
 44. Gilbert H.F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability, *Methods Enzymol*, 1995;8-28.
 45. Giray B, Gurbay A, Hincal F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett* 2001; 118: 139 -146.
 46. Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: A review of the longterm health effects. *Ann Intern Med.* 1995; 122:778-788.
 47. Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine-disrupting chemicals: pre-pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30:135-196.
 48. Grisham MB., Mc Cord JM.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygenmetabolites. In: *Physiology of oxygen radicals*. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Phsiology Society, Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, 1986.
 49. Gültekin F, Öztürk M, Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifosethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch. Toxicol.*, 2000;74: 533-538..
 50. Gürçan T. Tarımsal İlaç Kalıntıları ve Önemi, *Dünya Gıda Dergisi*, 2001; 67-72.

51. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 25 / Sayı 2 / Temmuz 2005 ; 79-94.
52. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Lipid Peroxidation, Oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1984; 23: 1396-1397.
53. Halliwell B, Gutteridge J.M.C., Cross C.E. Free Radicals, Antioxidants And Human Disease: Where Are We Now? J Lab Clin Med 119: 1992; 598-620.
54. Halliwell B., Gutteridge JMC.: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, 2001.
55. Hincal F, Gurbay A, Giray B. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. Biol Trace Elem Res 1995; 47: 321- 326.
56. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? Ann N Y Acad Sci 962:275-295 , 2002.
57. <http://cevre.club.fatih.edu.tr/webyeni/konfreweb/konu25.pdf>
58. <http://ebkae.gov.tr/belgeler/bgd.htm>
59. [http://epa.gov/pesticides/REDs/2115red. pdf\)](http://epa.gov/pesticides/REDs/2115red.pdf)
60. Hu ML, Locie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. J Lab Clin Med 1993; 121: 257- 262.
61. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. J Cardiovasc Pharmacol. 1999;34: 879-886.
62. Inal, M.E., Akguen, A., Kahraman A., Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: Age- and gender-related changes in malodialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver Methods Find Exp Clin Pharmacol :2002; 24(4): 209
63. Ishihara K, Warita K, Tanida T, Sugawara T, Kitagawa H, Hoshi N. Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

- (TCDD) affect the sex ratio of offspring? J Vet Med Sci. 2007; 69:347- 352.
64. Jenkinson SG: Free radical effects on lung metabolism, Clin. Chest Med., 10(1), 37-47, 1989 .
65. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. J Nutr Biochem 2001; 12: 500 -504.
66. Junqueira VB, Simizu K, Videla LA, Barros SB. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. Toxicology 1986; 41: 193 -204.
67. Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alteration in antioxidant status in rat erythrocytes. A possible involvement of reactive oxygen species. Toxicol. Lett. 1995; 105: 197 -205
68. Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. Toxicology. 2002; 202: 227-235..
69. Kamboj A, Kiran R, Sandhir R. Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. Exp Brain Res 2006; 170: 567 -575.
70. Kandarakis ED, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS; Soto AM, Zooler RT, Gore AC. Endocrin-disrupting chemicals: an Endocrine society scientific statement. Endocrine Reviews. 2009; 30:293 -342.
71. Karabay, Ü. Bazı sinerjistik etkili pestisitlerin memeli sistemleri üzerine toksik etkisinin araştırılması. Doktora Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi; 2000.

72. Karataş A., Bahçeci Z, Cypermethrin'in *Drosophila melanogaster*'de ergin bireylerin morfolojisi ve eşey organına etkisi;.Dumlupınar Üni. Fen Bilimleri Ens. Dergisi say19:sf 1-14,2009.
73. Kaya S, Pirinççi, Bilgili A. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, Ankara, 1998.
74. Kaynak L, Ersoy N. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi.1997; 10: 223-236.
75. Kehrer J P; Paraidathathu T; Lund L G. Effects of oxygen deprivation on cardiac redox systems.Proceedings of the Western Pharmacology Society 1993;36:45-52.
76. Kehrer JP. Free radical as mediator of tissue injury and disease. Crit. Rew. Toxicol. 1997; 23: 21-48.
77. Kilian E, Delport R, Bornman MS, de Jager C. Simultaneous exposure to low concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane, deltanethrin, nonlphenol and phytoestrogens has negative effects on the reproductive parameters in male Spraque-Dawley rats. Andrologia. 2007; 39: 128-135
78. Kim DS, Jeon SE, Jeong YM, Kim YS, Kknown SB, Park KC. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase- induced apoptozis. FEBS Letters 2006; 580: 1439-1446.
79. Knight DC., Eden JA. A Review Of The Clinical Effects Of Phytoestrogens. Obstet Gynecol1996; 87:897-904
80. Koner BC, Banerjee BD, Ray A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. Indian J. Exp. Biol.1998; 36:395- 398.
81. Kumar SV, Rao LM. 4- Cholorophenoxy Acetic Acid. Department of Physics, Indian of Technology. 1982; 400-0076

82. Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of methoxychlor on the antioxidant system in mitochondrial and microsome-rich fractions of rat testis. *Toxicology* 2002; 176: 67-75.
83. Lin JK., Cai Z, Mehendale HM. Resiliency to amplification of carbon tetrachloride hepatotoxicity by chlordecone during postnatal development in rats. *Pediatr Res* 33:225-232 ; 1993
84. Lin JK., Sipes IG, Krishna G, Gillette JR. Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of cytochrome P-450. *Life Sci* 20:1541-1548 ; 1977
85. Lin JK., Dawkins MJ. Carbon tetrachloride poisoning in the liver of the newborn rats. *J Pathol Bacteriol* 85:189-196; 1963
86. Lin JK., Dalu A, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Mehendale HM. Age-related differences in TGF- α and proto-oncogene's expression in rat liver after a low dose of carbon tetrachloride. *J Biochem Toxicol* 10:259-264 ; 1995
87. Lora E. Rikans , Danny R. Moore and Cynthia D. Snowden ,Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* Volume 1074, Issue 1, 24 May 1991, Pages 195-200
88. Louis GM, Gray E, Marcus M, Ojeda SR, Pescovitz OH, Witchel SF et al. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. *Pediatrics*.2008; 121:192-207.
89. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: A physiologic messenger, *Ann Intern Med*. 1994; 120:227-237
90. Lunec J. Free radicals: their involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem*. 1990; 27: 173-182.
91. Maiti PK, Kor A, Gupta P, Chaurassia SS. Loss of membrane integrity and inhibition of type-1 iodothyronine 5-monoeiodinase activity by fenvalerate in female mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.1995; 214: 905-909.

92. Marrs CT, Ballantyne B. Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley & Sons Ltd, England, 2004.
93. Marrs CT, Ballantyne B. Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley & Sons Ltd, England, 2004.
94. Mathers J., Fraser JA., McMahon M., Saunders RD., Hayes JD., McLellan LI.: Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp.* (71):157-166, 2004.
95. Maxwell, L. B., Dutta, H. M., Diazinon-Induced Endocrine Disruption. 2003.
96. McCall, J.M., Braugher, J.M., Hall, E.D.: Lipid peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury, *Acta. Anaesth. Belg.*, 1987; 38:373-379,
97. McCord JM.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: *Physiology of oxygen radicals*. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Physiology Society, Bethesda, Maryland, USA, 1986; pp: 1-18,
98. McCay PB, Lai EK, Payer JL, Dubose CM, Janzen EG. Oxygen and carbon centered radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol.Chem.* 1998; 273: 2135-2143
99. McCord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652–659.
100. McGee, S.A., Wiggins, S.A., Pierce, J.D. What advanced practice nurses to know about free radicals. *The internet journal of advanced nursing practice*, 2003; 6:1-10.
101. Meister A., Anderson ME, Glutathione, *Annual Review Biochemistry*, 1983; 52, 711-760.
102. Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1095-1099.
103. Meltzer M, Pfeiffer E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds: The Handbook of

- Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1, Meltzer M(ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; S. 63-80.
104. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J: Importance of Se- Glutathione peroxidase, catalase and Cu / Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, 1994; 17(3), 235-248,
 105. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
 106. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996; 46: 15–32.
 107. Nebesio TD, Pescovitz OH, The rol of endocrine disruptors in pubertal development. In: Pescovitz OH, Walvoord EC, ed. When puberty is precocious: scientific and clinical aspects. New Jersey: Humanapress 2007;425-119.
 108. Nowicki MJ, Shi D, Cai Z, Bishop PR, May WL. Developmental expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the rat liver. *Pediatr Res* 2003 ; 54:732-738.
 109. Öztürk, S. Tarım İlaçları. İstanbul Ak Basımevi; 1997. 551
 110. Öztürkmen Ö. Pestisitlerin *Alcaligenes Denitrificans* Ve *Alcaligenes Xylosoxidans* İle Mikrobiyal Bozunmasının Spektrofotometrik Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi; 2005.
 111. Paglia,D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization o erythrocyte Gp-x.J.Lab. Clin.Med. 1967; 1;158-
 112. Prsamthi K, Muralidhara, Rajini PS. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 299-306.
 113. Radons J, Heller B, Bürkle A, Hartmann B, Rodriguez ML, Kroncke KD, Burkart V, Kolb H: Nitirc oxide toxicity in islet cell involves

- poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion, *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199: 1270-1277.
114. Roberts JD Jr, Fineman JR, Morin FCIII, et al. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N.Engl. J.Med.* 1997; 336:605-610.
115. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit.* 2009;15:137-145.
116. Sayal, A.: değişik kanser türlerinde plazma ve eritrositlerde Gp-x ve eser elementlerin düzeyleri doktora tezi. Ankara: Gata;1992.
117. Seçer, Doğan Büyüme düzenleyicilerin Bitkilerdeki Fizyolojik etkileri ve Bu Alanda Yapılan Araştırmalar. *Derim 6.* Antalya :1989; 109-124
118. Sen, C.K., Packer, L., 2000, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-669.
119. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 2005; 215: 173-181.
120. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997, 82: 291-295.
121. Soyöz M, Özçelik N. Cytogenetic effects of pesticides which use in agriculture. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;10-(1) / 6 - 9
122. Stahl W., SIES, H. Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 2002; 1-2.
123. Stamler JS, Singel D, Loscalzo J: Biochemistry, of nitric oxide and its redox activated forms, *Science.* 1992; 258:1898-1902.
124. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6: 205-28.
125. Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation

- and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupter. Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. Crit Rev Toxicol 2000;30:197.
126. Şeker D. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden Absisik asit, 4-Klorofenoksiasetikasit, Giberellik asit ve Maleik Hidrazidin Swiss-Albino farelerinin Karaciğer ve Kas Glikojeni Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Antalya : Akdeniz Üni. ; 2002.
127. Tatlı Ö. Ege bölgesine özgü bazı yaş meyve, sebze ve kurutulmuş gıda ürünlerinde pestisit kalıntı düzeylerinin tespiti. Yüksek lisans tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi; 2006.
128. Thomas J.A. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stres. 1999.
129. Toda N, Herman AG. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves. Pharmacol Rev. 2005; Sep;57:315-338.21.
130. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Juannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environ Health Perspect. 1996; 104: 741-803.
131. Tozcu D., Puberte dönemine Kadar 4-Cpa (4- Klorofenoksi Asetik Asit)'Ya maruz kalan sıçanların karaciğer dokusundaki oksidan olayların incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Ankara : G.Ü; 2008.
132. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksidleri organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen kosullar. Klinik gelisim.1998; 11: 336–341.
133. UzuN, K., Vural, H., Öztürk, T., Özer F., İmecik, İ. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. Eastern Journal of Medicine, 2000; 5(2):48-51.

134. Vos JG, Dybing E, Greim HA, et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 2000;30:71-133.
135. Vural N. Toksikoloji. A. Ü. Ecz. Fak. Yay. No 56, Ankara, 1998;s.179, 384, 464.
136. Wardman, P., VON, S.C., 1995, Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells, *Methods Enzymol*, 251, 31–45.
137. Ware, G.W., 1994. The pesticide book, 4th edition. Thomsan Publication, Colifornia, 1994; 386 pp.
138. Wass C, Archer T, Palsson E, et all. Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: Nitric oxide-dependent mechanisms. *Behav Brain Res.* 2006; issue 1:147- 153.
139. Westwood, hormones and growht regulators. *Temperate Zone Pomology: Phisiology and Culture.*1993; 97225 wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30:71-133.
140. Wim C. Mennes, Niels B. Lucas Luijckx, Heleen M. Wortelboer, Jan Noordhoek and Bas J. Blaauboer Differences in the effects of model inducers of cytochrome P450 on the biotransformation of scoparone in rat and hamster liver *Archives of Toxicology* Volume 67, Number 2, 92-97, DOI: 10.1007 /BF01973677
141. Winzer K.,Winston, W Becker, J.F Cornelis, V Noorden and A Koehler, Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.), *Aquatic Toxicol.* 52, 2001; 143–155.
142. Wlodek, L., 2002, Beneficial and harmful effects of thiols, *Polish Journal of Pharmacology*, 54, 215-223.
143. WU, D., Cederbaum, A.I. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 2003; 27(4):277-284.
144. www.aib.gov.tr/proje/sebzelerdehormon.pdf
145. Yeşilkaya E. Endokrin Bozucular. *Güncel Pediatri* 2008; 6: 76-82

146. Zhou JF, Zhou W, Zhang SM, Luo YE, Chen HH. Oxidative stress and free radical damage in patients with acute dipterex poisoning. Biomed. Environ. Sci. 2004; 17: 223-233.
147. Zhu W, Fung PC 2000 The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. Free Radic Biol Med 29:870-880

10. EKLER

10.1. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

22.12.2009

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 503 - 10662
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.E1-09.049 kod numaralı ve *"İntrauterin Hayattan Puberte Dönemine Kadar 4-Cpa'ya Maruz Kalan Sıçanlarda Karaciğer Oksidan ve Antioksidan Sistemlerinin İncelenmesi"* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu septanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.E1-09.049 and entitled *"Investigation of liver's antioxidant and oxidant systems of the rats, were exposed 4-CPA from intrauterine life until puberty periods"* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,


Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10.2. TEŞEKÜR

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ki yüksek lisans eğitimim süresince emeklerini, ilgilerini ve sevgilerini benden esirgemeyen sayın hocalarım; Prof. Dr. Aydan Babül' e, Prof. Dr. Deniz Erbaş' a, Prof. Dr. Bilge Gönül' e, Prof. Dr. Lamia Pınar' a, Prof. Dr. Sibel Dinçer' e, Prof. Dr. Kazime Gonca Akbulut' a ve Doç. Dr. Çiğdem Özer' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince ihtiyacım olan her konuda bilgi, deneyim ve ilgisini hiç esirgemeyen, her konuda bana destek olan, değerli hocalarım Prof. Dr. Aydan Babül' e ve Doç. Dr. Çiğdem Özer' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca, yardımlarını, emeklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Dr.O. Fuat Sönmez' e, Dr. Şevin Güney' e, Araş. Gör. A. Şebnem İlhan' a, Duygu Tozcu' ya ve Gazi Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Ahmet Cumaoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, yaşamımın her anında sonsuz sevgileri, emekleri ve destekleriyle yanımda olan çok değerli aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Ayşe

Soyadı : TAŞTAN

Doğum yeri ve tarihi : Ankara / 09. 07. 1982

Eğitimi:

2007–2010 :Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Fizyoloji Anabilim Dalı(Yüksek Lisans Eğitimi)

2003 – 2007 : Gazi Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu (Lisans eğitimi)

1997 – 2001 : Bahçelievler Deneme Lisesi (Ank)

1994 – 1997 : Atatürk Orta Okulu (Ank)

1989 – 1994 :Türkoğlu İlkokulu (Ank)

Yabancı Dili : İngilizce