

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

**PUBERTE DÖNEMİNE KADAR 4-CPA (4- KLOROFENOKSİ ASETİK ASİT)'YA
MARUZ KALAN SIÇANLARIN KARACİĞER DOKUSUNDAKİ
OKSİDAN OLAYLARIN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU TOZCU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. ÇİĞDEM ÖZER

ANKARA
Ağustos 2008

Kabul ve Onay

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

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Duygu Tozcu
ANABİLİM DALI : Fizyoloji AD.
SINAV TARİHİ : 12.08.2008
TEZ KONUSU : Puberte dönemine kadar 4-CPA 'ya
(4. klorofenoksi asetik asit) maruz kalan sıçanların karaciğer.
dokusundaki oksidan olayların incelenmesi

KARAR

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :

Kabulüne : X

Reddine :

OYBİRLİĞİ / OYÇOKLUĞU ile karar verilmiştir.

GEREKCE :


Prof. Dr. Aydan BABİL
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Şule Coşkun
ÜYE

Doç. Dr. Gökdem Özer
ÜYE

ÜYE

ÜYE

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Tablolar	VI
Semboller, Kısaltmalar	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Endokrin Bozucular	3
2. 1. 1. Endokrin Bozucuların Tanımı	3
2. 1. 2. Endokrin Bozucuların Doğadaki Formları	3
2. 1. 2. 1. Doğal Endokrin Bozucular	5
2. 1. 2. 1. 1. Fitoöstrojenlerin Sınıflandırılması ve Yapıları	6
2. 1. 2. 1. 2. Doğadaki Fitoöstrojenlerin Kaynakları	9
2. 1. 2. 1. 3. Fitoöstrojenlerin Biyolojik Potansiyelleri ve Hedefleri	12
2. 1. 2. 2. Sentetik Endokrin Bozucular	15
2. 1. 2. 3. Endokrin Bozucuların Organizmadaki Etkileri	17
2. 2. Bitki Büyüme Düzenleyici Hormonlar (BBDH)	22
2. 2. 1. 4-Klorofenoksi Asetik Asit (4-CPA)	25
2. 3. Serbest Radikaller	28
2. 3. 1. Serbest Radikallerin Tanımı	28
2. 3. 2. Reaktif Oksijen Ürünleri	30
2. 3. 3. Reaktif Nitrojen Ürünleri	33
2. 3. 4. Serbest Radikallerin Oluşumunu Arttıran Faktörler	35
2. 3. 4. 1. Ekzojen Faktörler	35
2. 3. 4. 2. Endojen Faktörler	35

2. 3. 5. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	36
2. 3. 5. 1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri	37
2. 3. 5. 2. Lipid Reaksiyonunun Organizmadaki Etkileri	39
2. 3. 5. 3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	40
2. 3. 5. 4. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu	41
2. 3. 5. 5. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	42
2. 3. 5. 6. Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerine Etkileri	42
2. 4. Antioksidan Savunma Sistemi	42
2. 4. 1. Glutatyon (GSH)	44
2. 5. Pestisitler ile Serbest Radikaller Arasındaki İlişki	47
2. 6. Karaciğer Hücrelerinin Oksidatif Stresle İlişkisi	50

3. GEREÇ VE YÖNTEM

54

3. 1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler	54
3. 1. 1. Deney Hayvanları	54
3. 1. 2. Laboratuar Koşulları	54
3. 1. 3. Kullanılan Laboratuar Cihazları ve Kimyasal Maddeler	55
3. 2. Araştırma Planı	56
3. 3. Tayin Yöntemleri	58
3. 3. 1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi	58
3. 3. 2. Dokuda Glutatyon Tayin Yöntemi	59
3. 3. 3. Dokuda Nitrik Oksit Tayin Yöntemi	59
3. 3. 3. 1. Numunelerin Hazırlanması	59
3. 3. 3. 2. Ölçümün Yapılışı	60
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	60

4. BULGULAR	61
4. 1. Dokuda TBARS Düzeyleri	61
4. 2. Dokuda GSH Düzeyleri	63
4. 3. Dokuda NOx Düzeyleri	65
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ	74
7. ÖZET	75
8. SUMMARY	77
9. KAYNAKÇA	80
10. EKLER	100
10. 1. Teşekkür	100
10. 2. Etik Kurul Onayı	101
11. ÖZGEÇMİŞ	102

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kimyasal Yapılarına Göre Fitoöstrojenler	8
Şekil 2. 4-CPA'nın Kimyasal Formülü	25
Şekil 3. Lipid Peroksidasyonu	38
Şekil 4. Bağırsak Karaciğer, Kas ve Yağ Dokusu Aksında Gerçekleşen Karbohidrat Yağ Metabolizma Etkileşimi	51
Şekil 5. Redoks Potansiyeli	52
Şekil 6. Dişi Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri	61
Şekil 7. Erkek Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri	62
Şekil 8. Dişi Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri	63
Şekil 9. Erkek Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri	64
Şekil 10. Dişi Sıçanlarda Doku NOx Düzeyleri	65
Şekil 11. Erkek Sıçanlarda Doku NOx Düzeyleri	66
Şekil12. NOx Tayininde Standart Solusyonlara Karşılık Gelen Absorbansların Oluşturduğu Doğrusal Regresyon Grafiği	69

TABLÖLAR

Tablo 1. Endokrin Bozucular	4
Tablo 2. Bazı Besinlerin Toplam İzoflovan İçerikleri (mg/100 gr yenilebilir porsiyon)	10
Tablo 3. Bazı Besinlerin Lignan İçerikleri	11
Tablo 4. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri	18
Tablo 5. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	20
Tablo 6. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Üzerindeki Etki Mekanizmaları	21
Tablo 7. Serbest Radikaller ile İlişkili Bazı Hastalıklar	29
Tablo 8. Normal Süreçte Oluşan ROS Kaynakları	30
Tablo 9. Antioksidan Sistemlerde Yer Alan Moleküller	43
Tablo 10. Dokuda TBARS, GSH, NOx Düzeyleri (Dişi Sıçanlar)	67
Tablo 11. Dokuda TBARS, GSH, NOx Düzeyleri (Erkek Sıçanlar)	68

SEMBOLLER, KISALTMALAR

AA	Askorbik Asit
AOOP	Advanced Oxidation Protein Products
BBDH	Bitki Büyüme Düzenleyici Hormon
BHT	Bütilhidroksitoluen
BNOA	Betanaftoksiasit
BH ₄	Tetrahidro Biopterin
DDT	Dipheynl – Trichloroethane
DES	Dietilstilbesterol
DTNB	Di Tiyobis Nitro Benzoik Asit
eNOS	Endotelial 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
H ₂ O ₂	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	Naftelen Asetik Asit + Naftalen Asit Amid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
NEDD	1-Naphetyl Ethylenediamide Dihydrochloride
nNOs	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
NO	Nitrik Oksit
NO ⁻	Nitroksil Anyonu
NO ⁺	Nitrosonyum Katyonu
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
¹ O ₂	Singlet Oksijen Radikali
³ O ₂	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 tarımda, özellikle örtü altı sebzeçilikte, meyve ve sebzelerin üretim sürecini hızlandırmak için Bitki Büyüme Düzenleyici Hormon (BBDH) adı verilen pek çok madde kullanılmaktadır

BBDH' lar bitkinin yaşam süresi boyunca bitki tarafından çok düşük miktarlarda üretilen ve bitki içerisinde dokudan dokuya taşınarak, taşındıkları dokunun fizyolojik olaylarını düşük dozlarda bile olumlu/olumsuz etkileyebilen maddelerdir. BBDH' lar bitki bünyesinde üretilebildikleri gibi olumsuz dış koşullar nedeniyle bu hormonların dışarıdan da takviye edilmeleri gerekmektedir. BBDH' lar genellikle bitkinin büyüme aşamasında belirli bir dönem etkilidir ve daha sonra etkileri ortadan kalkar.

BBDH' lar içinde sık kullanılan, 4-klorofenoksi asetik asit (4-CPA) fenoksi ailesi üyesi bir oksindir. Ülkemizde 4- CPA, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı' nın izniyle özellikle domates üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle çiçek açma döneminde püskürtme metodu ile uygulanmakta, çiçeklerin meyveye dönüşümünü teşvik etmektedir.

Uygun doz ve uygun zamanda yapılan uygulamanın bitkilerde kalıntı bırakmadığı ve insan sağlığı açısından olumsuz etkilerinin olmayacağı düşünülmekteyse de, günümüzde “ne kadar fazla ve sık verilirse o kadar çok verim” alınacağı görüşünden dolayı yüksek doz uygulamalara sıklıkla rastlanmaktadır. Dolayısıyla insan sağlığı açısından toksik etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir. İlacın toksik etkilerine en duyarlı olunan dönemin puberte öncesi dönem olduğu ifade edilmektedir.

Literatürde 4-CPA ile ilgili çeşitli toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar özellikle üreme sistemi ve endokrin sistem üzerine yoğunlaşmıştır. Nitekim puberte dönemine kadar 4-CPA' ya maruz kalan dişi ve erkek sıçanlarda, üreme organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilediği, doz bağımlı olarak üreme organlarında apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Ancak literatürde 4-CPA ile oksidan olaylar arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmadı.

Karaciğer, metabolik aktivitenin en fazla olduğu dokudur ve yüksek doz 4-CPA maruziyetinin hepatosellüler nekroza neden olduğu ifade edilmektedir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda puberte dönemine kadar değişik dozlarda 4- CPA' ya maruz kalan dişi ve erkek sıçanların karaciğer dokusunda oksidan ve antioksidan olayları incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucular

2. 1. 1. Endokrin Bozucuların Tanımı

Sağlıklı bir organizmada ve onun gelecekteki neslinde endokrin sistem gelişimini ve fonksiyonlarını değiştiren, ekzojen ajanlara “endokrin bozucular” denir.⁹⁵

Endokrin bozucular, hormonların üretim, salınım, taşınma, bağlanma, aktivite, parçalanma ve organizmadan atılımlarına etki ederek değişik etkilere neden olabilirler. Bu maddeler, başlıca hormonların reseptörlerine bağlanmasını uyarıcı ve/veya baskılayıcı özellikler gösterebildikleri gibi, östrojen ve testosteron gibi doğal hormonların aktivitelerini de taklit ederek hormon benzeri etkiler gösterebilirler.^{20,22,78,112,115}

2. 1. 2. Endokrin Bozucuların Doğadaki Formları

Endokrin bozucular doğada doğal olarak bulunabildikleri gibi, değişik sentetik ve endüstriyel ürünlerin içerisinde de yer alabilirler (Tablo 1).

Tablo 1. Endokrin Bozucular

Fitoöstrojenler	Daidzein, Genistein, Formononetin, Biokanin-A, Prunetin, Pratensein, Glisetein, Ekuol, Desmetilangolestin, Enterolakton, Enterodiol, Matairesinol, Zearalanon
Organohalojenler	Dioksinler, Furanlar, Poliklorine bifeniller, 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-butyl benzen, 4- nitrotoluen, 2,4-diklorofenol

2. 1. 2. 1. Doğal Endokrin Bozucular

Doğal endokrin bozucular, sentetik veya endüstriyel ürünlerde bulunanlara oranla yarı ömürlerinin kısa olması, kolay bir şekilde yıkılıp vücuttan atılmaları, dokularda birikim yapmamaları nedeniyle organizma için genellikle önemli yan etkiler oluşturmazlar. Doğal endokrin bozucular içinde en iyi bilineni bitkilerde bulunan fitoöstrojenlerdir.⁷⁸

Fitoöstrojenler, endojen östrojenlere benzer aktiviteler gösterebilen bitkisel kaynaklı kimyasallardır. Son yıllarda yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarla önem kazanmışlardır. Bu çalışmalar fitoöstrojen zengin diyetle beslenen toplumlarda kardiovasküler hastalıklar, osteoporoz, göğüs, prostat ve barsak kanserleri ile ilgili şikayetlerin daha az görüldüğünü ve postmenopozal dönemdeki kadınlarda östrojen yetersizliğine bağlı semptomların daha hafif yaşandığını göstermiştir. Bu bileşiklerin sahip oldukları aktivitelerin aydınlatılabilmesi için birçok in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Ancak fitoöstrojenlerin metabolizmaları, emilimleri, potansiyel yararlı etkileri ile ilgili mekanizmalar, bu etkiler için gerekli optimal ve toksik dozlar ile ilgili bilinenler yetersizdir.²⁷

Fitoöstrojenler, vücutta üretilen östrojenlere oranla daha zayıf etki göstermelerine karşın, çok miktarda alınmaları sonucunda organizma için belirgin etkilere neden olabilirler.^{72,78} Ayrıca endokrin bozucuların etkili olmasında, yaş cinsiyet gibi faktörlerde oldukça önemlidir. Örneğin; fitoöstrojenler, vücutlarında az miktarda östrojen bulunduran çocuk ve erişkin erkeklerde belirgin östrojenik etki yapmalarına karşın; yüksek konsantrasyonlarda östrojen bulunduran erişkin bayanlarda, vücuttaki östrojen ile yarışarak bunların etkilerini azaltabilirler.^{6,34,89,104,119,131}

2. 1. 2. 1. 1. Fitoöstrojenlerin Sınıflandırılması ve Yapıları

Bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenen fitoöstrojenler, kimyasal olarak çok geniş çeşitlilik gösterirler. Fitoöstrojenler kimyasal yapılarına göre izoflavonlar, flavanonlar, kalkonlar, lignanlar, kumestanlar, makrolitler, stilbenler ve steroller olarak sınıflandırılır (Şekil 1). Yapıda temel olarak bulunan fenolik grup östrojen agonisti ve antagonist özelliklerini tanımlamada önemli rol oynar.

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.³⁵ Etkisi nedeniyle üzerinde en çok çalışılan fitoöstrojenler izoflavonlardır. Diğer yapılarla ilgili çalışma sayıları çok azdır.³⁰

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 yapılardır. 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.^{30,110}

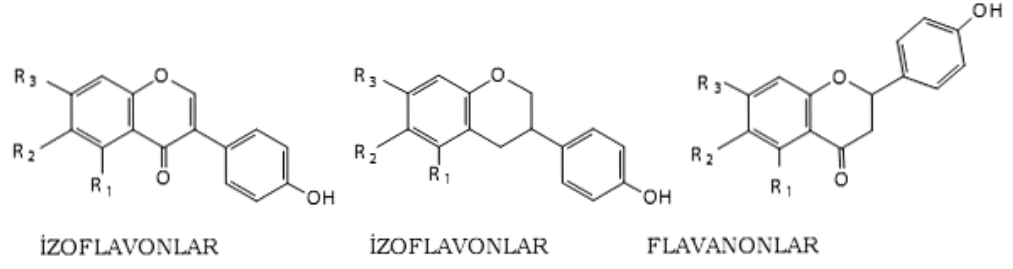
İzoflavonlar bitkilerde doğal olarak şekerlerle konjuge yapılar halinde, yani glikozit halde bulunurlar. 6'-O-asetilglukozit ve 6'-O-malonilglukozit yapılar ise, aglikona bağlanan şeker molekülü dışında, asetil veya malonil molekülü içerirler.^{110,82}

Bitkilerden izole edilen izoflavonların birçoğunun östrojenik etkisi olmadığı, etkili olanların da östrojenik etkilerinin aynı olmadığı saptanmıştır.³⁵ Örneğin genistein en güçlü östrojenik etkiyi gösterirken, soya izoflavonlarının % 5-10'unu oluşturan glisitein diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir.^{30,82,116}

Kumestanlar yapısal olarak izoflavonlara benzerler. Bir çoğu Wong tarafından listelenen kumestanlar içinde en önemli östrojenik aktiviteye sahip olan 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 öncüleri üzerindeki aktivitesi sonucu oluşurlar. Enterolaktonun bunun dışında enterodiol'ün oksidasyonu ile de oluştuğu bilinir.³⁵

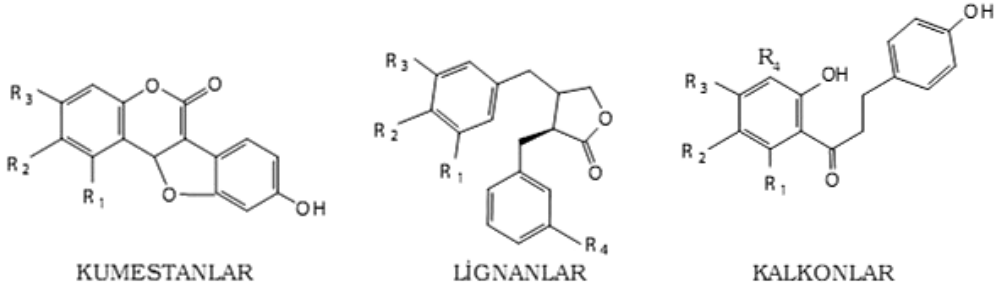
Makrolitler, özellikle uygun olmayan koşullarda depolanan tahıllar, yağlı tohumlar ve otlarda hızla çoğalan organizma olan Fusarium gibi mantarların ikincil metabolitleridir. Çoğunlukla tohumun kabuk kısmında konsantre olmuşlardır ve bilindiği gibi bu kısım genellikle besinin işlenme sürecinde bitkiden ayrılır. Zearalenon, α - ve β -zearalanol östrojenik aktiviteye sahip olduğu bilinen mikoöstrojenlerdir.³⁵



R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	H	OH	Daidzein
OH	H	OH	Genistein
H	OCH ₃	OH	Glistein
H	H	O-Glukoz	Daidzin
OH	H	O-Glukoz	Genistin
H	OCH ₃	O-Glukoz	Glistin

R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	H	OH	Ekuol

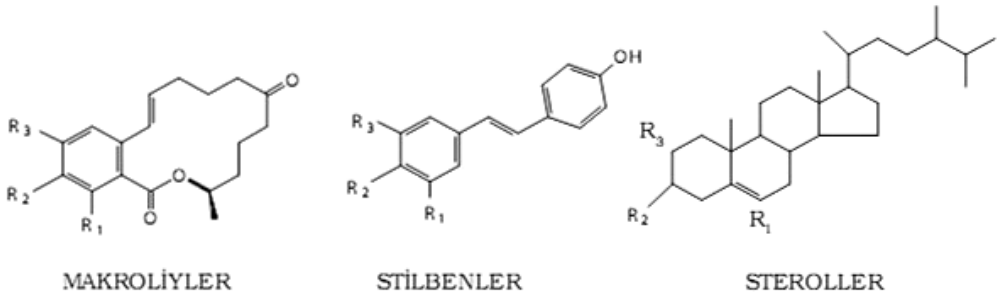
R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
OH	H	OH	Naringenin



R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	OH	H	Kumestrol

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bileşik
H	H	OH	OH	Enterolakton

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bileşik
OH	H	OH	OH	Ksantohumol



R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
OH	H	OH	Zeralenon

R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
OH	H	OH	Resveratrol

R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	OH	H	Sitosterol

Şekil 1. Kimyasal Yapılarına Göre Fitoöstrojenler

2.1.2.1.2. Doğadaki Fitoöstrojenlerin Kaynakları

Farklı gruplarda ele alınan 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. Soya ürünleri dışındaki kaynaklar diğer kuru baklagiller, tam-tahıl ürünleri, simisifuga ve kırmızı yonca otlarıdır.^{23,30,109,123} Çalışmalar kuş üzümü ve kuru üzüm gibi küçük taneli meyvelerin iyi fitoöstrojen kaynakları olduğunu göstermektedir.^{81,83}

Uzakdoğuda sıklıkla tüketilen fermente soya ürünlerinin izoflavon içeriği zengindir. Çünkü fermentasyon süresince mikroorganizmalar izoflavonların β -glikozit bağını kopararak glikozit yapılarının aglikonlara dönüşmesini sağlar. Bu durum serbest formdaki bileşiklerin konsantrasyonunu ve biyoyararlılığını arttırabilmektedir.^{81,107} Soya fasulyesinden elde edilen soya yağı ve sosu eser miktarda izoflavon içerirken, soya ve ürünlerinin izoflavon içeriğinin genel olarak 1-3 mg/gr arasında değiştiği bilinmektedir.^{30,82,109,116}

Çeşitli besinlerin 100 gramlarındaki izoflavon miktarları Tablo 2'de gösterilmiştir.¹³⁹

Tablo 2. Bazı Besinlerin Toplam İzoflovan İçerikleri (mg/100g yenilebilir porsiyon)

Besin	Ortalama Değerler	Besin	Ortalama Değerler
Soya fasulyesi, Kore	144,99	Soya peyniri	31,32
Soya fasulyesi, Japonya	118,51	Tofu	29,50
Soya fasulyesi, Brezilya	87,63	Tempeh	43,52
Soya unu, tam yağlı	177,89	Miso	42,55
Soya unu, yağsız	131,19	Natto	58,93
Soya protein konsantresi, su ile ekstrakte edilmiş	102,07	Diğer fasulye çeşitleri	0,06
Soya protein konsantresi, alkol ile ekstrakte edilmiş	12,47	Nohut	0,10
Soya protein isolatı	97,43	Bakla	0,03
Soya fasulyesi filizi	40,71	Mercimek	0,01
Soya sütü	9,65	Fıstık	
Soya sosu	1,64	Kırmızı yonca	

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 tohumudur³⁰ (Tablo 3).

Tablo 3. Bazı Besinlerin Lignan İçerikleri

Besin	Lignan (µg/gr)	Besin	Lignan (µg/gr)
Keten tohumu	675.0	Yulaf	3.4
Keten tohumu unu	527.0	Kuşkonmaz	3.7
Mercimek	17.9	Havuç	3.5
Soya fasulyesi	8.6	Patates	3.0
Buğday kepeği	5.7	Pırasa	2.0
Yulaf kepeği	6.5	Brokoli	2.3
Kuru fasulye	5.6	Armut	1.8
Sarımsak	4.1	Erik	1.5

2. 1. 2. 1. 3. Fitoöstrojenlerin Biyolojik Potansiyelleri ve Hedefleri

I. Östrojenik ve Antiöstrojenik Aktivite:

Fitoöstrojenlerin en önemli biyolojik potansiyelleri, östrojenik ve antiöstrojenik aktiviteye sahip olmalarıdır.^{30,47}

Fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri, ilk olarak 1946 yılında Batı Avusturalya'da, izoflavonca zengin bir çeşit yonca (*Trifolium subterraneum*) ile beslenen koyunlarda üreme bozukluğunun geliştiğinin farkedilmesi ile anlaşılmıştır.^{3,35,42} Benzer etkiler 2. Dünya Savaşının sonlarına doğru, yaşanan besin kıtlığı nedeniyle, lale soğanlarını gıda olarak tüketen Almanlarda da kaydedilmiş; bir çok kadında menstrual bozukluklar gözlenmiştir.³⁵

Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri, temel olarak, endojen östrojen olan 17- β -östradiol'e yapısal ve işlevsel benzerliği nedeniyle östrojen reseptörlerine (ER) kolay bağlanmasıyla açıklanmaktadır.^{35,82} Aslında fitoöstrojenlerin etki mekanizması çok komplekstir. ER- α ve ER- β için bir ligand olan fitoöstrojenler saf agonist, saf antagonist veya kısmi veya seçici agonist/antagonist aktivite gösterebilirler. Fitoöstrojen ile reseptörün etkileşimi, aktive ediciler ve baskılayıcıların aktiviteleri, etkileşimleri ve farklı tanımlamaları, östrojen regüle eden genlere etki eden reseptörler gibi faktörlerin etkisi nedeniyle fitoöstrojenler östrojen agonisti veya östrojen antagonisti gibi etki gösterebilirler.^{23,30,93}

Fitoöstrojenlerin aktivitelerinin ortamın endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olabileceği; premenopoz döneminde antiöstrojenik etki gösterirken, postmenopoz döneminde östrojenik etki gösterebilecekleri düşünülmektedir.^{87,126}

Son dönemde yapılan çalışmalar, genel olarak fitoöstrojenlerin ER- β için ER- α ' dan daha güçlü bağlama kapasitesine sahip olabildiklerini göstermiştir. Örneğin; genistein ER- β ' yi ER- α ' dan 20 kat fazla bağlayabilir.^{3,23,30}

İn vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar, fitoöstrojen potansiyellerinin canlının türüne, fitoöstrojenlerin verilme yoluna ve kullanılan bitiş noktasına göre de büyük farklılık gösterdiğini işaret etmektedir. Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özelliklerinin açıklanmasında, steroid metabolizmasını etkileyen enzimler üzerindeki etkilerinin de önemli olabileceği ileri sürülmüştür. İzoflavonların plasenta ve overlerdeki mikrozomlarda aromataz enzimini baskılayarak androjenlerin östrojenlere dönüşümünü bloke ettiği; özellikle kumestrol ve genisteinin östronun, östradiole çevrilmesinden sorumlu olan 17- β -östradiol oksidoredüktaz enzimini baskıladığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.^{33,99}

II. Antioksidan Aktivite:

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

Toda ve Shirataki'nin yaptıkları araştırmada, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonuna dört farklı fitoöstrojen etkileri incelenmiş, izoflavonların kimyasal yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında ilişki gösterilmiştir.¹²¹ Genistein izoflavonlar içinde en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren bileşik olarak bilinmektedir.⁷⁴

III. Antikarsinojenik Aktivite:

İzoflavonların anjiogenez ve hücre siklus ilerleyişinin inhibisyonunu da içeren potansiyel antikarsinojenik etkileri, bugüne kadar bir çok kez kaydedilmiştir. Özellikle fitoöstrojenlerin DNA topoizomerez 1 ve 2, tirozin kinaz, ribozomal S6 kinaz, 5 α -redüktaz gibi tümör oluşumunda önemli rol oynayan bazı enzimlerin etkinliklerini baskılayabildiklerini gösteren çalışmalardan sonra, bu bileşiklerin potansiyel antikarsinojenik etkilerine odaklanılmıştır.^{26,35,63,123} Bu bileşiklerin aynı zamanda antioksidan ve antiproliferatif özelliklerinin varlığı da, kansere karşı koruyucu rollerini desteklemektedir. Zira fitoöstrojenler antiproliferatif özellikleri ile hücrelerin bölünerek çoğalmasını önler, antianjiogenetik etki ile de anjiogenez baskılayarak tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azaltırlar. Ancak sınırlı sayıdaki hücre kültürü ve hayvan çalışmalarının çelişkili sonuçları yeni araştırmaları gerektirmektedir.^{3,30,35,74,123}

2. 1. 2. 2. Sentetik Endokrin Bozucular

Sentetik endokrin bozucular, endüstriyel alanlarda, tarım alanlarında, evlerde kullanılan değişik maddelerin içinde yer almaktadır.^{71,91,129}

İçlerinde en iyi bilineni; güçlü bir östrojenik etkiye sahip olan “dietilstilbesterol” (DES)’ dur. DES, ilk kez 1938 yılında üretilmiş, ucuz olması ve kolay elde edilebilmesi nedeniyle Amerika ve Avrupa’da yıllarca toksemilerde, erken doğum tehditlerinde ve fetal ölümlerin önlenmesinde kullanılmıştır. Bu süre içinde Amerika’da yaklaşık 5- 10 milyon kadın DES almış veya intrauterin DES’e maruz kalmıştır. Gebeliği sırasında annesinin DES aldığı saptanan 6 genç kadında, yalnızca yaşlı kadınlarda görülen ve nadir rastlanan bir kanser olan vajinal clear-cell adenokarsinoma saptanmış ve bu kanser türü DES’e maruz kalma ile ilişkilendirilmiş ve sonuçta DES piyasadan kaldırılmıştır. Ayrıca, Amerika ve Avrupa’da yapılan bazı çalışmalarda, DES’e maruz kalan bayanlarda meme kanseri gelişme riskinin yaklaşık 2 kat arttığı ve DES’e intrauterin maruz kalan kızlarda serviks kanseri, overyan germ hücre kanseri, serviko-vajinal displazi ve vajinal clear-cell adenokarsinoması ile intrauterin maruz kalan erkeklerde minör ürogenital anomali ve testis kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir.^{52,78,115,127}

Temizlik maddeleri, fungusitler, pestisitler, herbisitler ile boyalar, plastikler ve çözücüler gibi endüstriyel organik kimyasalların da endokrin bozucu olma potansiyeli mevcuttur. Bunlardan poliklorine bifeniller, dioksinler ve benzo-pirenler endokrin bozucu olarak bilinmektedir. Bu maddelerin birçoğu yağda çözünebilme özelliğiyle, yağ dokusunda birikmeleri ve vücutta uzun süre kalmaları nedeniyle organizmada zararlı etkiler yaratabilmektedirler.

Bunun sonucu olarak Sentetik endokrin bozucular, doğal endokrin bozuculara göre daha uzun ömürlüdürler ve organizmada daha zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler.^{78,115}

Endokrin bozucuların organizma için zararlı etkiler oluşturmada, endokrin bozucuya maruz kalınan dönem oldukça önemlidir. Organ ve dokuların geliştiği dönemlerde endokrin bozucuya maruz kalınması durumunda oluşabilecek yan etkiler çok daha şiddetli olabilmektedir. Seksüel farklılaşmanın olduğu intrauterin dönemde, nörokognitif gelişim ve büyümenin olduğu bebeklik ve erken çocukluk döneminde, pubertenin başladığı ve seksüel olgunlaşmanın olduğu pubertal yıllarda organizma endokrin bozuculara farklı duyarlılık göstermektedir.^{6,55,71,89,131} Oldukça toksik bir endokrin bozucu olan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) ile yapılan invitro çalışmalarda testis leydig hücrelerinin androjen sentezinin direkt engellediği saptanmıştır.³¹ TCDD 'ye, intrauterin maruz kalan erkek kemirgen hayvanların iç ve dış genital organlarının maskülizasyonunda, testislerin inmesinde, androjenlerin üretiminde ve spermatogenezde problemler yaşandığı tespit edilmiştir. Ancak TCDD'ye post natal maruz kalınması halinde sadece spermatogenez ile somatik ve genital büyümenin olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür ^{18,61,78}

Endokrin bozucuların organizmada zararlı etkiler oluşturmada üzerinde durulması gereken önemli bir nokta da, endokrin bozucuların dozu ve maruz kalınma süresidir. Endokrin bozuculara maruz kalınma süresi uzadıkça veya maruz kalınan endokrin bozucunun dozu arttıkça organizmada oluşabilecek olumsuz etkilerin daha şiddetli olması söz konusudur. ^{28,71}

Endokrin bozucular organizma için her zaman benzer olumsuz etkilere neden olmamaktadır. Örneğin düşük dozda östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren bir endokrin bozucu, yüksek dozda androjen reseptörlerine bağlanarak anti-androjenik etki gösterebilir.²² Bu nedenle, endokrin bozucuların doz-cevap eğrisi her zaman doğrusal olmamaktadır. Ayrıca endokrin bozucular aynı anda birçok sistemi etkileyebilmektedirler. Örneğin, zayıf bir östrojenik madde olan genistein üreme sisteminde neden olduğu bazı patolojilerin yanı sıra tiroid peroksidazı da inhibe ederek tiroid patolojilerin etiyolojisinde de rol alabilmektedirler. Bu nedenle, endokrin bozucunun etkisinin anlaşılmasında, farklı etkilere neden olabildikleri ve aynı anda birçok sistemi etkileyebildikleri unutulmaması gereken önemli bir noktadır.³⁸

2. 1. 2. 3. Endokrin Bozucuların Organizmadaki Etkileri

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkilerine bakıldığında özellikle üreme sistemi ve tiroid fonksiyonlarını etkiledikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte birçok farklı etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir.^{71,91,129} (Tablo 4.)

Tablo 4. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri

	Dişi	Erkek
Kanser	Kanser hücre çoğalmasının ve anjiyogenezinin 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	

Endokrin bozucuların son yıllarda bilim dünyasının dikkatini çekmesi; endüstriyel ürünlerle kontaminasyonun olduğu bölgelerde balık, kuş gibi hayvanlarda fertilizasyonun azalması, ürogenital ve somatik anomalilerin artması nedeniyle olmuştur.^{78,115}

Doğal ve sentetik endokrin bozucular doğada çok yaygın olarak bulunmakta ve kullanılmaktadır. Bu endokrin bozucular hormonların üretimlerinden, etkilerinin ortaya çıkmasına kadar süregelen her evrede etki gösterebilmektedirler. Tarımda, evlerde, endüstride kullanılan pek çok madde endokrin bozcucu içermektedir. Bu endokrin bozucular organizmada özellikle üreme sistemini, tiroid hormonlarının çalışmasını olumsuz etkilemektedir.^{72,122}

Endokrin bozucular üreme sistemini her aşamada etkileyebildiklerinden, çok çeşitli bozukluklara neden olabilmektedirler (Tablo 5.). İntrauterin yaşam üreme organlarının farklılaşması açısından kritik bir dönem olduğundan, bu dönemde endokrin bozuculara maruz kalınması üreme organlarında ve reseptörlerinde geri dönüşümsüz, ciddi patolojilere neden olabilmektedir.²²

Tablo 5. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Dişi	Erkek
• Kuşkulu genitalya • Hipoblastik ve atrofik uterus • Yenidoğanda hemorajik over • Ovaryumda folikül atrezisi • Uterus ve over ağırlığının artması • Prematüre telarş • Erken ve geç puberte • İnfertilite • Laktasyon • Erken menarş	• Kuşkulu genitalya • Hipospadias • İnmemiş testis • Ektopik testis • Testis atrofisi • Prostat ve v. seminalis atrofisi • Testis ve prostat ağırlığının azalması • Seminifer tübül atrofisi • Erken ve geç puberte • Sperm azlığı • Sperm morfoloji ve hareket bozukluğu • Jinekomasti • Leydig ve sertoli hücrelerinde atrofi • İnfertilite

Organizmanın endokrin bozuculara karşı en savunmasız olduğu dönemlerden biri yeni doğan dönemidir. Testis endokrin bozuculara karşı bu dönemde çok hassastır. Androjen etkili bir ilaç verilen yeni doğan sıçanlarda testis fonksiyonları incelendiğinde testis ağırlığının ve steroid üretiminin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir.⁷⁶

Endokrin bozuculardan üreme sistemi üzerine etki edenlerin pek çoğu, östrojenik etkili olmakla birlikte antiöstrojenik ve antiandrojenik etkili olanları da bulunmaktadır. Bu endokrin bozucular çok çeşitli mekanizmlarla üreme bozukluklarına neden olabilmektedirler.^{39,71,91,129} (Tablo 6).

Tablo 6. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Üzerindeki Etki Mekanizmaları

1. Östrojen Reseptörlerini Uyarımlar Bisfenol A ve B, DES, Metoksiklor, Klordekon, Oksilfenol, Nonilfenol, Genistein, DDT ve metabolitleri
2. Androjen Raseptörlerini İnhibe Edenler Vinklozin, Flutamid, DDT ve metabolitleri, Metoksiklor, Fenitroton, Prosimidon, Linuron
3. Steroid Hormon Sentezini İnhibe Edenler Fitalatlar, Trifeniltin, Fenarimol, Fadrozol, Ketokonazol, Finasterid, Endosulfan
4. Apoptozise Neden Olanlar Deltametrin, Oksilfenol, 1,2-dibromo-3-kloropropan

2. 2. Bitki Büyüme Düzenleyici Hormonlar (BBDH)

Bitki bünyesinde oluşturulan veya bitkiye dışarıdan verilen, bitkinin büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olaylarını oldukça düşük konsantrasyonlarda dahi olumlu ya da olumsuz etkileyebilen maddelere bitki büyüme düzenleyici hormonlar (BBDH) denilmektedir. BBDH' lar pestisit olarak bilinen hastalık ve zararlılara karşı kullanılan tarımsal kimyasallar içerisinde yer alan bir grup maddedir.^{37,68,69,138,141,142}

Bitki bünyesinde üretilen ve bitkide, hücrelerde su ve iyon geçirgenliği, solunum reaksiyonları, protein sentezi gibi fizyolojik olayları kontrol eden maddelere bitki hormonu ya da fitohormon denilmektedir. Bitkinin kök sürgün, yaprak, çiçek, meyve oluşumu ve gelişimi gibi yaşamsal olaylarda fitohormonlar önemli rol oynamaktadırlar.^{68,69}

BBDH' lar günümüzde, çimlenme, çiçek ve meyve seyreltilmesi, çiçeklenme, meyve tutulması, cinsiyet oluşumu, meyve kalitesini artırma, hasat öncesi dökülmeyi azaltma, muhafaza, doku ve meristem kültürleri ile hastalık ve yabancı ot mücadelesi gibi amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır. BBDH' ların kullanılması verimi arttırmakla beraber, dayanıklılığı arttırmakta, ürün kalitesini yükseltmekte ve uzun raf ömrü sağlayarak ürünlerin ihracat olanağını arttırmaktadır.^{6,68,69,138,141}

BBDH' lar doğal ve sentetik olarak iki grupta incelenmektedirler. Doğal BBDH' lar bitkinin bünyesinde sentez edilmektedir. Sentetik BBDH' lar ise kimya endüstrisi tarafından, bitkilerden izole edilen hormonların yapılarının anlaşılması ile elde edilen bilgiler ışığında üretilen değişik yapı ve özellikte maddelerdir. Doğal BBDH' lara oranla, sentetik BBDH' ların bazı bitkilerde daha çok etkili oldukları ve ürünü daha çok artırdıkları tespit edilmiştir.

Bu nedenle, daha iyi ürün elde etmek adına sentetik BBDH' ların zaman içerisinde doğal BBDH' ların yerini alması söz konusu olmuştur.^{6,68,69,138} Ancak, sentetik BBDH' ların istenilen amaca ulaşmak için kullanılmaları esnasında dikkat edilmesi gereken bir takım önemli noktalar vardır. Bitkiye verilecek sentetik hormonun uygulanma zamanı ve dozu, oluşacak etkinin belirgin olması konusunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Aksi takdirde beklenen amaca ulaşılamadığı gibi, insan sağlığı açısından da olumsuz etkilerin ortaya çıkması mümkündür.^{6,68,69,138,141} Bunun yanı sıra büyümeyi uyaran bir hormonun yoğunluğu arttıkça büyümeyi engellemesi de söz konusu olabilmektedir. Bundan dolayı BBDH, bitki üzerinde meydana getirdiği etkilerine göre büyüme ve gelişmeyi uyaran, “uyarıcı hormonlar” ve büyüme ve gelişmeyi yavaşlatan ya da durduran “engelleyici hormonlar” olarak iki sınıf altında incelenmektedir.^{37,68,69} Bitki büyümesinin değişik aşamalarında farklı bitki kısımlarına değişik etkiler gösterebildiklerinden, uyarıcı hormonlar ile engelleyici hormonları net çizgilerle ayırmak pek mümkün değildir.

BBDH' lar yapılarına göre 5 sınıfta incelenmektedirler.

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

Oksinler, giberillinler, sitokininler uyarıcı hormanlar; dorminler ve etilen ise engelleyici hormonlar olarak etki göstermektedir.^{138,140,141}

Oksinler, tarımsal alanda eskiden beri kullanılan, bitkilerin büyüyen uç kısımlarından, geniş yapraklarından ve gelişmiş embriyolarından elde edilen; bitkinin ne yönde ve ne kadar gelişeceğini kontrol eden, hücre bölünmesi, hücre ve doku farklılaşması ve enzimlerin aktivitesini artırması yoluyla hücre büyümesinde etkili olarak çekirdeksiz meyve oluşumunu sağlayan hormonlardır.^{138,140} Ayrıca, oksinler domates, salatalık, elma gibi birçok bitkide döllenme olmaksızın meyve oluşumuna neden olurlar.

Ülkemizde oksin preparatlarından Beta naftoksi asit (BNOA), Naftelen asetik asit + Naftalen Asit amid (NAA-NAD) ve 4-CPA ruhsatlıdır. Bu oksin preparatları özellikle örtü altı sebzeçilikte yaygın olarak kullanılmaktadır.^{138,140,141}

Giberillinler, ilk kez Japonya'da Gibberella Fujikuroi adlı mantarın bitkilerde aşırı boy uzamasına neden olduğunun fark edilmesi sonucu tarımsal alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Giberillinler de oksinler gibi hücre büyümesini artırır, dormansinin kırılmasını ve hızlı çimlenmeyi sağlar.^{107,138,140}

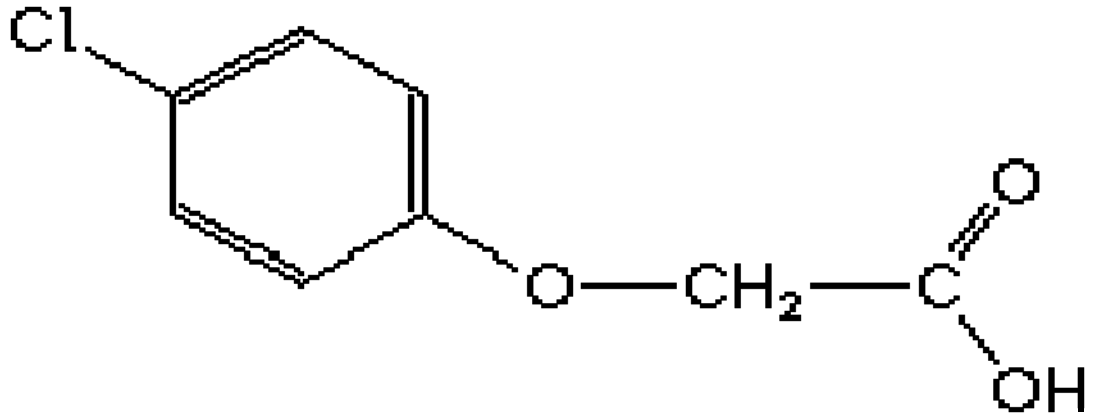
Sitokininler, dallanmayı tomurcuklanmayı ve tohumların filizlenmesini artırır. Ayrıca çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların yaşlanmasını, dökülmesini önler.¹³⁸

Dorminler, bitkinin dinlenme fazının uzamasına neden olarak bitki büyümesini engellemektedir.^{138,140}

Etilen, bitkilerde yaprak ve meyve dökümünü hızlandırır ayrıca bitkinin boyunun uzamasını engeller.¹³⁸

2. 2. 1. 4-Klorofenoksi Asetik Asit (4-CPA)

İlk kez Dow Chemical tarafından 1950'de geliştirilen 4-CPA, fenoksi ailesi üyesi bir oksindir.



Şekil 2. 4-CPA' nın Kimyasal Formülü

Dünya sağlık örgütünün orta derecede zararlı-toksik olarak değerlendirdiği 4-CPA için gıdalarda belirlenmiş üst bir limit bulunmaktadır.

25,49,64,124

Akut toksisite çalışmalarında 2703 mg/kg dozunda 4-CPA'nın sıçanların %50'sini öldürdüğü saptanmış, ayrıca sıçanlarda yürümede bozukluk, hipoaktivite, ağrı duyusu kaybı gibi klinik bulgular gözlenmiştir.¹²⁴

4-CPA'nın inhalasyon yoluyla verilmesi ile yapılan bir başka çalışmada 5.25 mg/L üstündeki dozlarda sıçanların yarısının öldüğü saptanmıştır.¹²⁴

Tavşanlarda yapılan bir çalışmadaysa şiddetli göz irritasyonuna neden olduğu gözlenmiştir.¹²⁴

Gestasyonun 6-15. gününde oral olarak 0, 150, 300, 600 ve 1000 mg/kg/gün dozunda 4-CPA verilmesiyle gebelik üzerinde ki etki araştırılmış ve 300 mg/kg/gün dozunda annede tremor, kilo kaybı, halsizlik gibi olumsuz etkilerin görüldüğü saptanmıştır. 1000mg/kg/gün dozunda mortalite gözlenmiş, 600 ve 1000 mg/kg/gün dozunda fetüsün vücut ağrılığında azalma ve iskelet sisteminde problemler tespit edilmiştir.¹²⁴

Ülkemizde 4-CPA, Tarım Bakanlığı izni ile çeşitli formüllerde örtü altı sebzeçilikte, özellikle domates üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle költürde iek açma döneminde püskürtme metodu ile uygulanmakta, çiçeklerin meyveye dönüşmesini teşvik etmektedir.^{37,69,141}

Domatesin sağlıklı bir şekilde meyve verebilmesi için yetiştiği ortamın sıcaklığının 18-26 °C olması gerekmektedir ve 13 °C altında 33 °C üzerindeki sıcaklıklarda domates çiçeğinin polen oluşumu azalır ve meyve oluşmama riski artar. Bu koşulları sağlayabilecek modern seraların azlığı sebebiyle hormon kullanımı gerekmektedir.

Kış aylarında (Aralık-Şubat) havaların soğuk olması nedeniyle çiçekte yeterli polen oluşmadığı için hormon kullanılmakta gerekmektedir ve bu durum Nisan-Mayıs dönemlerinde hormonlu meyve hasat edilmesi anlamına gelmektedir. Düşük hava ısı ve sentetik hormonların kullanılması kış aylarında seralarda üretilen domateslerin şeklinin bozuk olmasına neden olmaktadır.^{6,69,141}

Gökmen ve ark. yaptıkları çalışma ile sera domateslerindeki şekil bozukluğu ile 4-CPA miktarı arasında ki ilişkiyi incelediklerinde, ülkemizde yetiştirilen sera domateslerinde 4-CPA kalıntısına rastlanmakla birlikte, kalıntı miktarının çok yüksek olmadığını tespit etmişlerdir.⁵⁴

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 domatesteki 0.2 mg/kg altındaki kalıntısı güvenli, 0.5 mg/kg üzerindeki kalıntısı ise riskli olarak değerlendirilmiştir.^{53,54} Ayrıca Gökmen ve ark. çalışmalarında, domatesin kabuğunun soyulmasının kalıntı miktarını %36 azalttığı tespit etmişlerdir. Bu nedenle, özellikle seralarda kış aylarında hormon kullanıldığı için domatesin kabuğunun soyulmasının, vücuda alınacak kalıntı miktarını azaltacağı ifade edilmektedir.^{53,54}

BBDH' nın kontrollü uygulanması ile elde edilen domatesler ile, vibrasyon veya arı kullanarak doğal yolla meyve tutan domatesleri birbirinden ayırmak oldukça zordur. Ancak döllenme sonucu oluşan domateslerde enine kesit yapıldığında içerisinde döllenme sonucu oluşan tohumlar görülürken, BBDH kullanılarak üretilen domateslerde tohum oluşmaz.^{68,69}

2. 3. Serbest Radikaller

Serbest radikallerin biyolojik sistemler içerisindeki varlığı yaklaşık olarak 50 yıl önce ortaya atılmıştır. 1956 yılında McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz (SOD) enzimini keşfetmeleriyle biyolojide serbest radikallerin önemi anlaşılmaya başlanmıştır. Daha sonra çalışmalar serbest radikallerin hücre düzeyindeki fonksiyonları, nitrik oksit (NO) ve derivelerinin biyolojik sistemlerdeki önemini gösteren araştırmalarla devam etmiştir.¹⁷

2. 3. 1. Serbest Radikallerin Tanımı

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar.⁹² Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler.

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir.¹²⁵

Bilindiği gibi, oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3 ' ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^*) oluşur.¹⁰⁰

Yaşam için gerekli olan oksijen, serbest radikal oluşumuna yol açtığı için toksik olabilmektedir ve çoğu hastalığın patogeneğinde, yaşlanma ve inflamasyonun açıklanmasında karşımıza çıkmaktadır ^{16,50} (Tablo 7.).

Tablo 7. Serbest Radikallerle İle İlişkili Bazı Hastalıklar¹⁹

Oksijen toksisitesi	Gastrointestinal Hastalıklar
İnflamasyon	İnfeksiyon Hastalıkları
İmmünolojik Hastalıklar	Musküler distrofi
Yaşlanma	Ürolojik Hastalıklar
Nörolojik Hastalıklar	Göz Hastalıkları
Ateroskleroz	Deri Hastalıkları
Hipertansiyon	Pulmoner Hastalıklar
İskemik Hasar	Ksenobiotiklerin Metabolizması
Karsinogenezis	Karaciğer Hastalıkları
Mutajenezis	

2. 3. 2. Reaktif Oksijen Ürünleri

Oksijen ortamda sürekli bulunan ve elektrofilik ataklara en yatkın olan moleküldür.²⁴ Oksijen ve onun minör metabolitleri olan O_2^- , hidrojen peroksit (H_2O_2), $OH^\bullet$ ve singlet oksijen (1O_2) canlı sistemler için genellikle toksiktir. Bu ürünler kısaca ROS (Reactive Oxygen Species) olarak adlandırılır.⁵¹

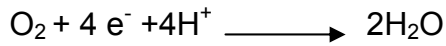
Organizmada genelde ROS normal fizyolojik olaylar esnasında oluşur⁴⁵ (Tablo 8.).

Tablo 8. Normal Süreçte Oluşan ROS Kaynakları⁴⁵

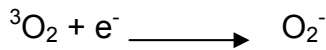
1. Solunum Mitokondriyal elektron transportu Hekzos monofosfat şantı
2. Ksenobiyotiklerin metabolizması Mikrozomal elektron transportu (sitokrom P450 ve b5) ve karışık oksidaz fonksiyonu Peroksidatif oksidasyon (MPO, prostoglandin H sentezi)
3. Doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu Periferal kan PMN'ler, bazofiller ve monositler Doku makrofajları Kupffer hücreleri (karaciğer) Klara hücreleri (akciğer)
4. Biyosentez ve biyolojik parçalanma süreçleri Araşidonik asit metabolizması Yağ asit CoA oksidaz D-amino oksidaz L-α hidroksi asit oksidaz Ürat oksidaz Tirozin peroksidaz

Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli reaktif oksijen metabolitleri, O_2^- , H_2O_2 ve $OH^\bullet$ dir.

Oksijen 4 elektron alarak suyu oluşturur.

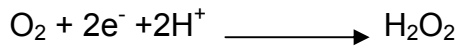


O_2^- , triplet durumdaki oksijen molekülünün (3O_2) redüksiyonuyla meydana gelir.^{45,111}



Bu işlem NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler aracılığıyla veya mitokondriyal elektron zincirinin semi-ubikinon içeriği gibi redoks – reaktif bir yolla non enzimatik olarak gerçekleşir.⁴⁰ O_2^- membran hasarına, lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne neden olabilir. Ayrıca daha güçlü oksidanların öncüsüdür.

Oksijenin iki elektron redüksiyonu ile H_2O_2 meydana gelir.

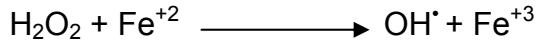


Biyolojik sistemlerde O_2^- fizyolojik pH' da spontan dismutasyonla hidrojen peroksidi oluşturabildiği gibi, reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenebilir.^{45,111}



Süperoksid biyolojik olarak organik ve inorganik substratlarla reaksiyona girebilir. Örneğin ferrisitokrom c, kinonlar, geçişli metal komplekslerini redükleyebilir ve askorbik asit, tokoferol, katekolaminler, tetrapiroller, hemoproteinler, tioller oksitleyebilir.

H₂O₂ kuvvetli bir oksidan olmakla birlikte organik substratların çoğuyla yavaş reaksiyona girebilir. Kendisi serbest radikal değildir; (bütün elektronları çiftleşmemiştir) ancak reaktif oksijen türleri kategorisinde bulunur. Demir ve bakır iyonları gibi taşıyıcı metallerin katalizlendiği durumlarda daha güçlü bir oksidan olan OH[•] ni oluşturabilir.



Bu reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir. OH[•], süperoksid ve H₂O₂' ten daha güçlü oksidan olup hemen hemen bütün biyolojik substratları etkileyebilir. OH[•] biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en reaktif olanıdır. Serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarından en fazla sorumlu tutulandır. Non- katalizli Haber-Weiss reaksiyonu süperoksidin, H₂O₂ ile direkt reaksiyonudur.^{45,111}

H₂O₂, katalaz veya Glutasyon peroksidaz (GP-x) ile su oluşturulabilir. GP-x'in katalizlediği reaksiyonda glutasyon (GSH), glutasyon redüktaz (GR-x) enziminin yardımıyla Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADPH) harcanan bir reaksiyonla tekrar GSH'a dönüşebilen glutasyon disülfide okside olur.⁴⁰ O₂⁻ sentezi sırasında harcanan NADPH heksoz monofosfat şantı (HMP) ile yeniden oluşturulur.^{41,45} Nadir olmasına rağmen HMP şantının ilk enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enziminin eksikliği görülen kişilerde NADPH oluşumunun yetersizliğine bağlı olarak O₂⁻ üretiminde azalma ve membran oksidan sistem substratlarının azlığı ortaya çıkar.

Dolayısıyla bu kişilerde bakteriyosidal ve sitozolik kapasitede azalma görülür.⁴¹

Fagositik hücrelerin yabancı partiküller veya immün kompleksler ile karşılaştıklarında, oluşturdukları solunum patlaması en önemli oluşum kaynaklarından birisidir. Solunum patlaması fagositoz sırasında meydana gelen metabolik olaylar dizisidir ve fagositozda da önemlidir.⁴¹

ROS'un aşırı seviyeleri hem sıkı düzenlenmiş NADPH oksidazın aşırı uyarılmasıyla hem de düzenlenmemiş yolla 'kazara' ROS üreten diğer mekanizmalarla ortaya çıkar. İkinci durum yüksek organizmalarda ROS'un en önemli kaynağı olan mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ) üretilen ROS' u içerir. Mitokondriyal ETZ' den ROS üretimi substrat miktarına bağlıdır. Endotelial hücrelerde glukoz konsantrasyonunun artması ROS üretiminin artmasına neden olur.⁴⁰

2. 3. 3. Reaktif Nitrojen Ürünleri

NO, biyolojik sistemlerde üretilen çok yönlü, inorganik bir serbest radikaldir⁷¹. NO radikali, yüksek organizmalarda L-arjinin'in terminal guanidonitrojen atomlarından birinin oksidasyonu ile oluşur. Bu reaksiyon nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle katalizlenir. Oluşan NO içinde bulunduğu mikro çevreye göre nitrosonyum katyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-) ya da O_2^- ile reaksiyona girerek oksidatif hasarda rol oynayan peroksinitrit (ONOO^-) gibi çeşitli reaktif nitrojen ürünlerine (RNÜ) dönüşebilir.¹¹⁸ Bazı fizyolojik hallerde ara form olan S-nitroso-sistein ya da S-nitroso-glutatyon durumunda bulunabilir.⁴⁰

NO, NOS enzimlerinin kataliziyle vücutta pek çok yerde sentezlenebilir. Tanımlanmış NOS'lar:

1. Tip I nöronal (nNOS)
2. Tip II indüklenbilir (iNOS)
3. Tip III endotelial (eNOS)

NOS'un üç tipi de moleküler oksijen ve L-arginini substrat olarak kullanırken, NADPH, Flavin adenin nükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidro biopterin (BH₄)' i kofaktör olarak kullanır.⁷⁴

NO düşük konsantrasyonda vasküler tonusun kontrolü, nörotransmisyon, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik süreçlerde görev yaparken, yüksek konsantrasyonda savunma amacı ile sitotoksin gibi rol oynar.⁸⁵ NO aracılığıyla oluşan DNA hasarı çekirdek içinde poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonuna neden olur. NAD⁺ tükenir ve hücre ölümüne yol açar.^{106,118}

2. 3. 4. Serbest Radikallerin Oluşumunu Arttıran Faktörler

2. 3. 4. 1. Ekzojen Faktörler

- I. Diyetel Faktörler: Doymamış yağ asitlerinden zengin diyetle beslenme, yüksek kalorili diyetle beslenme, hayvansal proteinlerce zengin diyetle beslenme, alkol ve uygun koşullarda hazırlanmamış yiyeceklerle beslenme.
- II. Çevresel Faktörler: Sigara dumanı, hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, Hidrokarbonlar), radyasyon ve diğer kirleticiler (aspest, pestisitler vs.).
- III. İlaçlar: Anti-kanserojenik ilaçlar, glutatyon tüketen ilaçlar.¹²⁵

2. 3. 4. 2. Endojen Faktörler

- I. Sedanter yaşam
- II. Stres
- III. Yaşlanma
- IV. Doku hasarı ve kronik hastalıklar (ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı vs.)
- V. Diyetel antioksidan alınının etkileyen koşullar (iştahsızlık, malabsorbsiyon, kolestaz)¹²⁵

2. 3. 5. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

Serbest radikaller hücre ve dokularda bir çok hasara neden olmaktadır. Bu hasarlar şöyle sıralanabilir:

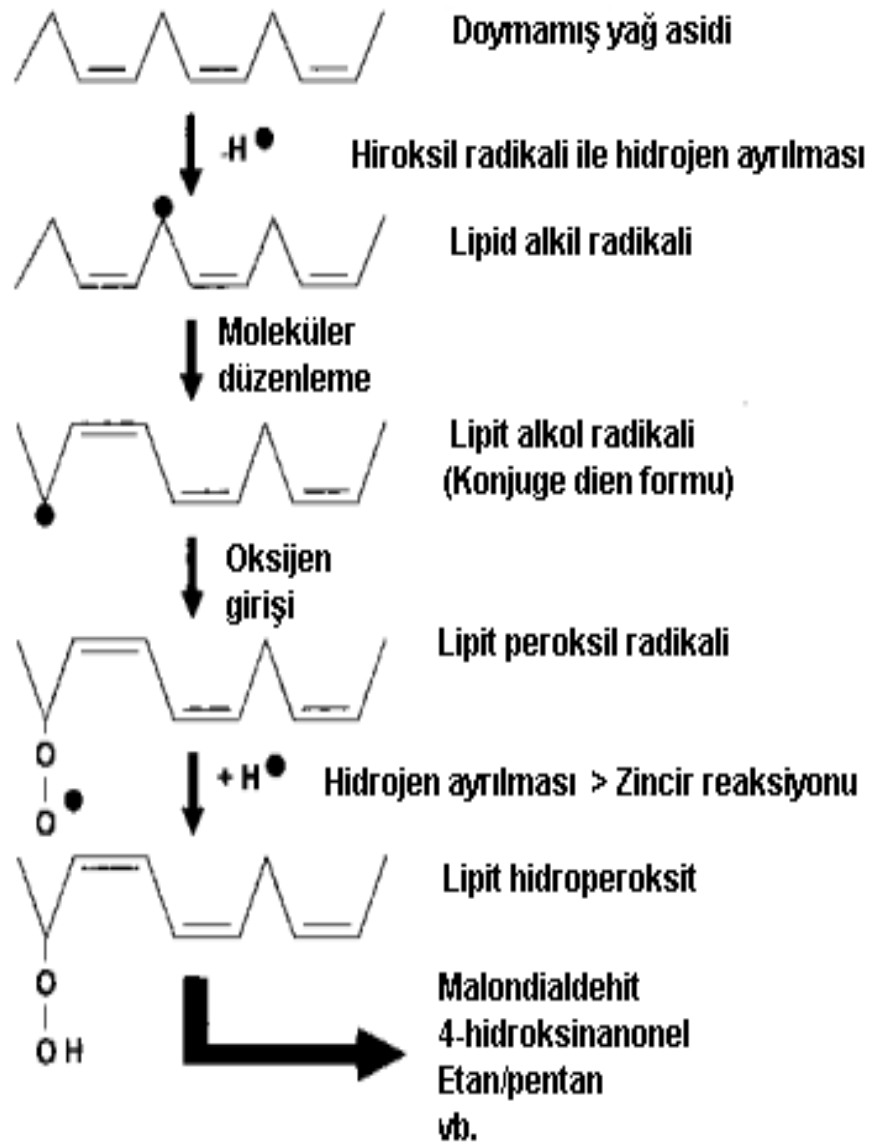
- I.** DNA'nın tahrip olması
- II.** Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı
- III.** Lipid peroksidasyonu sonucu membran yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- IV.** Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler
- V.** Protein ve lipitlerle kovalan bağlar oluşturulması
- VI.** Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- VII.** Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- VIII.** Proteinlerin tahrip olması ve protein "turnover" nın artması
- IX.** Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi
- X.** Kollagen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması
- XI.** Mukopolisakkaritlerin yıkımı.¹²⁵

2. 3. 5. 1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum), membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı dolayısıyla oksidatif ataklara oldukça duyarlıdır.¹³¹ Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve son derece zararlıdır; çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirindeki α - metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar.⁵ Yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asiti zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır.

Lipid radikali ($L^{\bullet}$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. $L^{\bullet}$ moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO^{\bullet}$) oluşur. $LOO^{\bullet}$, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.^{5,125} Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, in vivo lipid peroksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değeriendirilmektedir.⁵⁸



şekil 3. Lipid Peroksidasyonu

2. 3. 5. 2. Lipid Peroksidasyonunun Organizmadaki Etkileri

- 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.¹³⁴

2. 3. 5. 3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller bazı aminoasitlerle reaksiyona girerek enzimlerin aktivitelerini ortadan kaldırarak modifiye, fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına sebep olmaktadır. En çok sorumlu tutulan aminoasitler sülfür içerenlerdir.¹⁰¹

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen metabolitleri (ROM) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.⁵

2. 3. 5. 4. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

Protein oksidasyonunun yeni bir belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünleri Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır.⁷ AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon göstermediği belirtilmiştir.⁴⁶ Bununla birlikte protein-protein çapraz bağlanmaları proteinlerin oksidatif değişiminin bir belirteci olmakla birlikte birkaç farklı reaksiyonla gerçekleşmektedir.

Bu reaksiyonlar;

- a.** Karbon merkezli iki radikalın direkt reaksiyonu sonucu
- b.** İki tirozin radikali arasında etkileşimi sonucu
- c.** İki sistein-tiil radikalının reaksiyonu sonucu
- d.** Karbonil grubu içeren proteinlerin aynı veya farklı protein yan zincirindeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu sonucu
- e.** Reaktif aldehitlerin aynı veya farklı protein moleküllerinin lizin bakiyeleri arasındaki reaksiyon sonrası
- f.** Glikasyon/glioksidasyon reaksiyonları sonucu karbonil grubuna sahip proteinlerin aynı veya farklı proteinlerin lizin veya arjinin bakiyeleri ile reaksiyonu sonrası
- g.** Michael reaksiyonu ile lipid peroksidasyon belirteçlerinin, proteinlere eklenmesi sonucu oluşan protein aldehitlerin, aynı veya farklı proteinlerdeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu olarak sıralanabilir.¹¹⁷

2. 3. 5. 5. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA' nın kimyasal modifikasyonu ile mutagenik etki göstermektedir. Özellikle OH^{*} radikali, serbest radikallerin sebep olduğu bir takım değişimlere (DNA ayrılması, DNA-protein çapraz bağlanımı, pürinlerin oksidasyonu gibi) sebep olmaktadır. DNA onarım sistemi hemen DNA'yı rejenere etmezse replikasyon sırasındaki yanlış baz çifti mutasyonla sonuçlanacaktır. Bu mekanizma oksidatif strese maruz kalmış kişilerdeki artmış kanser prevalansını açıklamaktadır. Serbest radikal vasıtasıyla oluşan apoptozis bazı vakalarda serbest radikale bağlı DNA hasarının bir parçasıdır.¹⁰¹

2. 3. 5. 6. Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz, mannitol ve deoksisekale OH^{*} ile reaksiyon verirler. Glikozaminoglikan olan sinoviyal sıvının vizkozitesinde önemli rol oynayan hiyaluronik asit serbest radikallerle etkilenerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının vizkozitesinin kaybına neden olur.¹³²

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

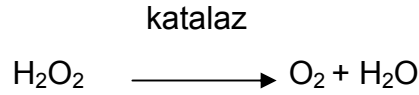
Aerobik organizmalar oksijen toksisitesinden enzim sistemleri ve serbest radikal tutucuları gibi savunma mekanizmaları tarafından korunurlar. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler (Tablo 9).

Tablo 9. Antioksidan Sistemlerde Yer Alan Moleküller ⁴⁵

1.Antioksidan Enzimler — Süperoksit Dismutaz — Katalaz — GSH – peroksidaz — GSH – redüktaz — GSH – S-transferazlar
2.Antioksidan proteinler — Seruloplazmin — Transferrin — Laktoferrin — Albumin — Haptogloblin
3.Düşük moleküler ağırlıklı antioksidan maddeler — GSH,NAD(P)H — α- Tokoferol — Askorbat,ürat — β-Karoten
5.Okside proteini parçalayan enzimler — Makroproteinazlar

Savunma mekanizmaları serbest radikal üretim hızı karşısında yetersiz kalınca serbest radikalın zararlı etkisi görülür. SOD, katalaz, Gp-x serbest radikal birikimini önleyen başlıca enzimlerdir. SOD, O_2^- , katalaz ve Gp-x ise H_2O_2 'i metabolize ederler.¹⁹

Katalaz, bütün bilinen organizmalarda bulunmaktadır. H_2O_2 'yi oksijen ve suya indirger. NADPH bağımlıdır.^{12,41,44,94,113}



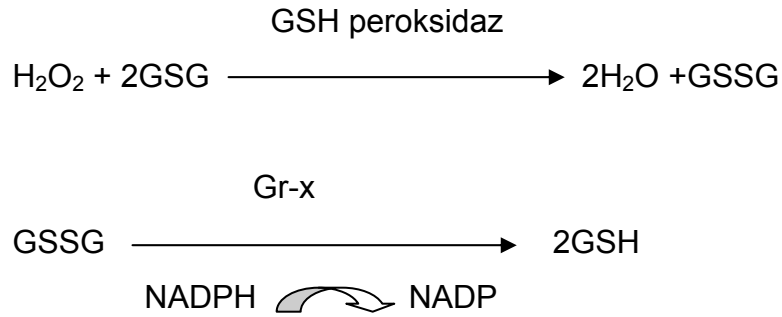
2. 4. 1. Glutasyon (GSH)

GSH bilinen en önemli antioksidan olup, hücreleri oksidatif stresten koruma oldukça önemli bir role sahiptir.^{62,135} Karaciğer GSH sentezi için oldukça önemli bir dokudur. GSH'ın yaklaşık %90' ı karaciğerde sentezlenmektedir.⁷⁸

GSH bağımlı antioksidan sistem Gp-x ve glutasyon redüktaz olarak iki enzim içerir. Bu sistem GSH'ın okside ve redükte formlarını içeren bir döngü ile çalışır.¹² Gp-x, GSH bağımlı antioksidan sistemin bir kısmını oluşturur. GSH bağımlı sistem, hücre içindeki hidroperoksitleri indirgeyen temel mekanizmadır.¹³⁶ Enzimin selenyuma bağlı ve selenyumdan bağımsız iki tipi bulunmaktadır.^{41,44,136} Selenyum bağımsız Gp-x organik peroksitleri detoksifiye edebilir ancak H_2O_2 'yi metabolize edemez.^{41,136}

Total enzim miktarının üçte ikisi sitozolde, üçte biri mitokondride bulunur. Gp-x enziminin en fazla bulunduğu bölgeler eritrositler ve karaciğerdir.¹³⁶

Gp-x, H_2O_2 'yi suya indirger. Aynı zamanda lipid hidroperoksitlerini daha az reaktif olan hidroksi yağ asitlerine metabolize edebilir. Dolayısıyla membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur.^{41,93} Gp-x' in H_2O_2 ve diğer hidroperoksitleri indirgemesi glutatyon Gr-x ve NADPH' a bağlıdır.^{11,41,44,94,113,136} Okside glutatyon (GSSG), $NADP^+$ üretilen Gr-x reaksiyonu ile redükte GSH' a çevrilir.¹¹



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 önemlidir.⁴

Kinetik incelemeler H_2O_2 'in daha çok Gp-x ile metabolize edildiğini göstermiştir. Çünkü katalaz aktivitesi hücrenin peroksizomları ile sınırlıyken Gp-x tüm sitoplazmada bulunur ve oksidanlarla daha fazla reaksiyona girebilir. ^{41,136}

Katalaz ve SOD başlıca membranın hidrofilik bölgelerinde etki gösterir. Gp-x ise hidrofobik membran komponentlerinde lipid peroksidasyona karşı indirekt koruyucu etki yapmaktadır. Dolayısıyla Gp-x, katalaz ve SOD'un kombine bulunduğu durumlarda serbest radikal ataklarına karşı hücre bütünlüğünün korunması daha etkili olmaktadır. ⁹⁴

Bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler; karotenler, bilirubin ve ürik asit biyolojik antioksidanlar olarak fonksiyon görebilirler. Bu gruptakilerin en önemlileri askorbik asit (Vitamin C) ve α – tokoferol (Vitamin E)' dir. Askorbik asit suda çözünür ve doku kompartmanlarına hızla yayılır.¹² Askorbik asit GSH ile birlikte sıvı fazdaki en önemli antioksidan olarak görülmektedir.^{41,113} α – tokoferol ve β karoten lipofilik zincir kıran antioksidanların başlıca örneğidir. Zincir kıran antioksidanlar ROO^* ve RO^* gibi lipid radikallerini tutarak oksijen veya yağ asidi ile birleşme yeteneğinde olmayan daha az reaktif türler oluşturarak lipid peroksidasyon hasarını önlerler. ^{59,80,130}

2.5. Pestisitler ve Serbest Radikaller Arasındaki İlişki

Serbest radikaller, pestisidlerin ve çevresel kimyasalların toksisitelerinde önemli rol oynarlar. Pestisidler, oksidatif strese, serbest radikal üretimine, antioksidanlarda değişime yol açabilirler. Lipid peroksidasyon, pestisidlerin neden olduğu zehirlenmelerde zehirlenme mekanizmalarından biri olarak belirtilmiştir.⁷⁰

Fazla miktarda reaktif oksijen grubunun açığa çıkması, GSH tükenmesine yol açılması, selenyum, bakır gibi bazı metallerin eksikliği veya fazlalığı bu yeteneği sınırlandırır. Böylece açığa çıkan reaktif oksijen türleri hücre zarları, DNA, RNA gibi yapılarda hasara neden olur. Bu durum, pestisidlerin karaciğer, böbrek, sinirler, kaslar ve benzeri yerlerde yol açtıkları hasarın başlıca nedenleri arasındadır.

Paratyon, paraokson, metilparatyon, malatyon, malaokson, dimetilmalatyon, klortiyon, Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT), dikaptiyon, fenitrotiyon, heksaklorobenzen, triklorfon, mireks, CCl₄, uçucu halojenli alkan bileşikler, dioksin, klorprofam, klorbufam gibi fenilkarbamatlar, fenilüre, propanil, manolid gibi asilanilidler, bipiridil türevi herbisidler lipid peroksidasyona yol açarlar. Mevinfos, fosfamidon, dikrotofos, tetraklorvinfos, temivenfos gibi vinilfosfat türevi organik fosfor (OF) bileşikler ile pentaklorofenoller peroksidasyonu kolaylaştırırlar. Aminotriazid gibi pestisidler ise katalazın etkinliğini engellerler.⁶⁷

Nitro-aromatik yapılu OF'lu bileşikler vücutta biyotransformasyonları sırasında süperoksid grupları açığa çıkarılır; hücre zarı fosfolipidlerinde lipid peroksidasyona ve sonuçta hücre hasarına yol açarlar.

Fosfolipidlerin peroksidasyonunu kolaylaştıran OF'lu bileşikler, biyotransformasyonları sırasında ortak metabolit 2,4-diklorofenilasil klorür şekillenir. Bu madde GSH' nun tükenmesine yol açarak lipid peroksidasyona karşı koruyucu mekanizmaları zayıflatır. Ayrıca tiyodemeton, NADPH ve askorbik asitle hızlandırılan lipid peroksidasyonu teşvik eder. Bazı çalışmalarda lipid peroksidasyonun, organik fosforlu insektisid toksisitesinin moleküler mekanizmalarından biri olduğu ileri sürülmüştür.^{13,14,57,137} OF'lu bileşiklerin neden olduğu felçler, oksidatif stresle ilişkilidir. Aynı zamanda OF bileşiklerle zehirlenmeye eşlik eden akut tubüler nekrozun, lipid peroksidasyon ve reaktif oksijen türleriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir.²

Etil-klorpinfosun eritrositlerde lipid peroksidasyonun artmasına neden olduğu gösterilmiştir.⁵⁷

Altuntaş ve ark. OF'lu insektisitlerden fosalonun yüksek dozlarda MDA şekillenmesinde bir artışa; katalaz, SOD, Gp-x aktivitelerinde bir azalmaya neden olduğu; fakat düşük dozlarda ROS' nin toksik etkiler içinde yer almayacağını bildirmişlerdir.⁹

DDT ve metoksiklorun oksidatif stres ve lipid peroksidasyona neden olduğu kanıtlanmıştır. Aynı zamanda metoksiklorun erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkileri tanımlanmıştır ki bunlar, keçilerin epididimal spermelerindeki antioksidanların azalmasına bağlı olmaktadır.^{2,48} Lipid peroksidasyon, lindanın (Klorlanmış hidrokarbonlar ailesinden dayanıklı suda çözünmeyen bir tarım ilacı) meydana getirdiği doku hasarını da kapsayan önemli moleküler mekanizma olarak belirtilmiştir. DDT ve lindanın neden olduğu immunotoksisitede serbest radikallerin ilgisi olduğu kanıtlanmıştır.

Endosülfan ile dieldrinin de oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir. Artmış MDA düzeyi endosulfan hasarının bir göstergesidir. LD₅₀' nin altındaki dozlarda bile endosulfan, miyokard hücrelerini etkiler. Vit E, serbest radikal şekillenmesini inhibe ederken, aynı zamanda endosulfanın kardiyotoksitesini de azaltır.^{1,66}

Rodentisidlerden alüminyum fosfür ile zehirlenmiş 45 hastada, kontrollere göre SOD düzeyleri belirgin olarak yüksek olmasına karşı, serum katalaz düzeyleri önemli oranda düşük bulunmuştur. Bu durum yoğun H₂O₂ yüklemesiyle sonuçlanmış ve MDA da buna paralel olarak çok yüksek bulunmuştur.³²

Bipiridil herbisitlerin oksidatif stres oluşturma mekanizması basittir. Parakuat NADPH'ya bağımlı indirgenme/yükseltgenme tepkimesine maruz kalmakta ve her seferinde elektron doğurarak süperoksidleri şekillendirmektedir. Bu nedenle parakuat önderliğinde şekillenen süperoksit gruplarına, akciğer dokusu aşırı derecede duyarlılık gösterir. Aminotriazol gibi katalazın etkinliğini engelleyen maddeler, parakuata duyarlılığı artırır ve hayvanlarda hızla ölüme yol açar.^{2,67,126} Parakuat, reaktif oksijen türlerinin anormal oluşumu nedeniyle beyin hasarı meydana getirir. Dopaminerjik nöronlar, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine çok duyarlıdır.⁹⁷

Diuron, fenuron, linuron, monolinuron, monuron, metazol, neburon gibi fenilüre türevi herbisidler, vücutta uğradıkları N-yükseltgenme tepkimesiyle azoik bileşikler oluştururlar. Karsinojenik olan azoik bileşikler, hücre zarlarında lipid peroksidasyona yol açarlar.⁶⁷ Fenoksi herbisidlerden 4-CPA' nın, insan eritrosit antioksidan enzimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bazı enzimlerin inaktivasyonunun bu bileşiklerin toksikasyonunda rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür.⁸

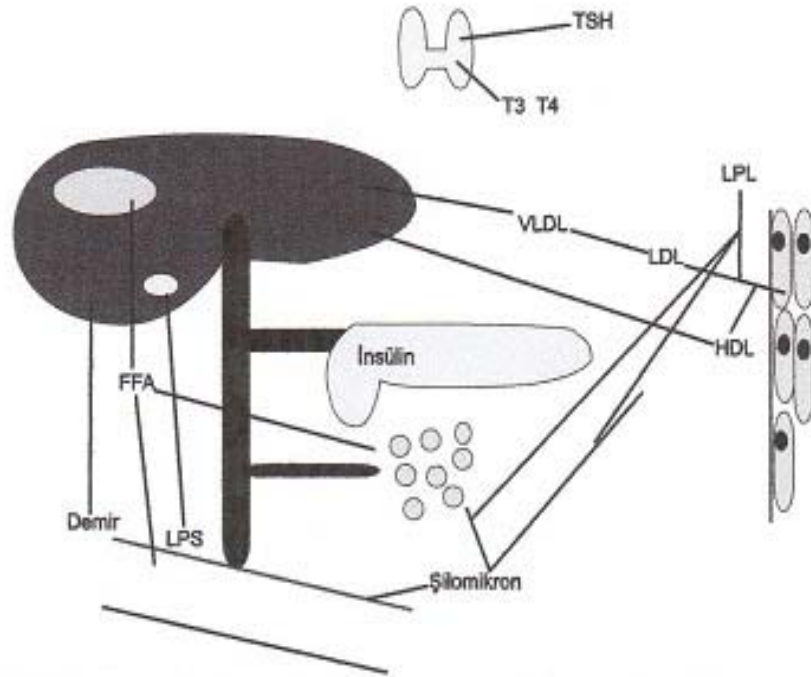
Pek çok çalışma, piretroidlerin oksidatif strese yol açtığını göstermiştir. SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış, muhtemelen piretroidlerle zehirlenmiş sıçanlarda artmış oksidatif strese ilk verilen cevaptır. Piretroidlerden fenvalerat uygulanmış farelerde serbest radikal üretiminde artış olmakla birlikte SOD ile katalazın aktivitelerinde de artış olmaktadır.^{2,56,65,86}

2. 6. Karaciğer Hücrelerinin Oksidatif Stresle İlişkisi

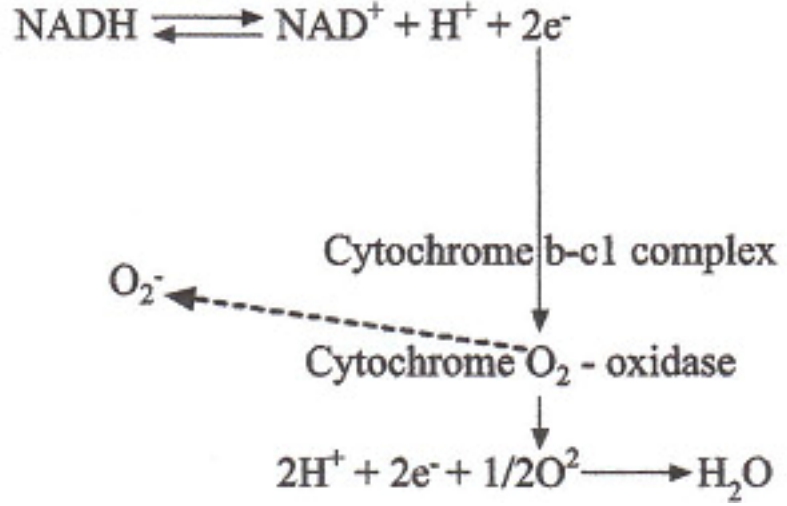
Karaciğer dokusunda bulunan hepatositler, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanal epitelyum hücreleri sıklıkla oksidan strese maruz kalmaktadır.¹²⁰

Karaciğer dokusundaki hücrelerin yaklaşık %80'ni hepatositler oluşturur. Hepatositler organizmada yağ metabolizmasının merkezi durumundadır. Bağırsaktan absorbe olan yağ asitleri hücrede metabolize olarak kahverengi yağ dokuda trigliserit şeklinde depolanmaktadır. Yağ asitlerinin bir kısmı mitokondride β - oksidasyona uğramakta ve enerji açığa çıkmaktadır.¹²⁰ Açlık durumunda ise yağ dokudan serbestlenen yağ asitleri karaciğere taşınıp, apolipoproteinle birleştirilerek Very Low Density Lipoproteins (VLDL) 'e dönüştürülmekte ve enerji kaynağı olarak kas dokusuna gönderilmektedir. İnsülin yapıların β - oksidasyonunu baskımlarken, yağ asitlerinin trigliserit şeklinde depolanmasını artırmaktadır. Yağ asitlerinin β - oksidasyonu mitokondride gerçekleşmektedir ve karaciğer hücrelerinde mitokondri sayısı oldukça fazladır.¹²⁰

Metabolik süreçlerde ortaya çıkan serbest elektronların bir sistemden diğerine aktarılması sonucu enerji açığa çıkar. Bu elektronlar sitokrom sisteminde oksijene aktarılmakta ve su oluşmaktadır. Her iki su molekülü oluşumu için oksijene 4 elektron aktarılmaktadır. Ayrıca mitokondri dışında sitozolde bulunan P450EI (CYP2EI) mikrozomal oksidasyon sisteminde özellikle fazla alkol alımında ve ilaç metabolizması esnasındaki indüksiyonla iki önemli oksijen radikali kaynağını oluşturmaktadır. Ancak fizyolojik koşullarda serbestleşen oksijen radikalleri, antioksidan savunma sistemleri aracılığıyla ciddi bir hasar oluşturmadan nötralize edilebilmektedir.¹²⁰



Şekil 4. Bağırsak, Karaciğer ve Yağ Dokusu Aksında Gerçekleşen Karbohidrat Yağ Metabolizma Etkileşimi



Şekil 5. Redoks Potansiyeli

Karaciğer vasküler bir organdır ve dolayısıyla endotel hücrelerinden zengindir. Endotel hücreleride oksidatif hasardan etkilenmektedir. NO endotel hücrelerinde eNOS ve kupffer hücrelerinde iNOS tarafından üretilir. NO' nun fizyolojik dozlarda salınımı hem vazodilatasyonun sağlanması ve hem de kanın şekilli elemanlarının endotel duvarına adhezyonunun sürdürülmesinde önemlidir.¹²⁰ Ancak oksijen radikallerinin aşırı artışı, kupffer hücrelerinden “intra cellüler adhesion molecules” (ICAM) gibi adezyon molekülü tabiatındaki sitokinlerin fazla miktarda serbestlenmesine neden olabilir. Bunun sonucu olarakta mikrosirkülasyon kesintiye uğrayabilir. Dolaşımın bozulması sonucu hepatositler hem hipoksiye maruz kalır hem de endotel hasarı nedeniyle immun hücrelerin atağına açık hale gelir.¹²⁰

Alkole bağı karaciğer hasarında MDA ve 4-hidroksinonenal gibi ürünler, alkol metabolizması ürünü olan asetaldehit ile kompleks yapılar oluştururlar ve bu antijenik yapılar CYP2E1 hücre yüzeyine bağlanarak T lenfositleri çekerler. Benzer antijenik yapıların ilaç toksisitesi esnasında oluştuğu bildirilmektedir.¹²⁰

Karaciğer, bağırsak ve sistemik dolaşımda bir kapı olarak kabul edilirse, kuppfer hücreleri de bu kapının bekçileri olarak tanımlanabilir. Aslında kuppfer hücreleri sağkalım nükleer faktör kappa B (NFκB) sisteminin önemli bir parçasıdır. Fizyolojik koşullarda bu sistemin aktive ettiği kaskad ile oluşan sitokinler hepatosite, çeşitli zararlı etkilere karşı koruma şansı sağlamaktadır. Ancak bu sitokinlerin aşırı salınımı hepatositlerde bizzat hasara neden olabilmektedir. Bu sitokinlerin başında TNF-α gelmektedir ve hepatositte oluşan ROS kuppfer hücrelerini uyararak TNF oluşumuna yol açar. TNF-α etkisiyle mitokondrial ATP tükenmekte, kaspas sistem aktive olmakta ve hepatosit apoptoza uğramaktadır. Ancak ROS düzeyi arttığında kaspas sistemi aşılmakta ve nekroz tarzında daha zararlı hücre ölümü ortaya çıkmaktadır. Yine oksidatif strese yanıt olarak kuppfer hücresi fazla miktarlarda NO ve TGF-β da üretmektedir. NO serbest oksijen radikallerini bağlayarak kısmen oksidatif stresin zararının sınırlandırmasına katkıda bulunmaktadır. TGF-β ise fibroza yol açar ve hedef hücresi stellat hücrelerdir. Kuppfer hücreleri bunun yanında antijen sunan hücre olarak görev yapmaktadır ve hücrel immunitiyi aktive etmektedir. Organizmada retinol deposunun büyük kısmını oluşturan stellat hücreler, fizyolojik koşullarda inaktif haldedir. Kuppfer hücrelerinin örneğin, oksidatif stres ile uyarılmaları ile ortaya çıkan TGF-β stellat hücreleri aktif hale getirmekte ve bu hücreler retinol kaybetmektedirler. Aktif stellat hücreleri disse mesafesine kollajen salgılamaya başlar ve bu fibrozun başlangıcıdır ancak geri dönüşümsüz değildir.¹²⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler

3. 1.1. Deney Hayvanları

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 40 erkek, 40 dişi adet Wistar Albino sıçan kullanıldı.

3. 1. 2. Laboratuvar Koşulları

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.

3. 1. 3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Kimyasal Maddeler

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

Kimyasal Maddeler

- 4-CPA (4- Kloro fenoksiasetik asit)
- Triklorasetik asit (TCA, Sigma T-9759)
- Bütilhidroksitoluen (BHT, Sigma B-1378)
- Tiyoobarbitürik asit (TBA, Sigma T- 5500)
- Di tiyobis nitro benzoik asit (DTNB) (Sigma D-8130)
- Vanadium (III) Klorid(VCl_3)
- Sulfanilamid
- Etil alkol
- NEDD(N-(1-Naphytl) ethylenediamide dihydrochloride)

3. 2. Araştırma Planı

Çalışma 20 günlük Wistar-Albino cinsi dişi ve erkek sıçanlarda gerçekleştirildi. Sıçanlar doğumu takiben 20. günün sonunda (sütten kesilme dönemi) cinsiyetlerine göre ayrı gruplarda toplandı. Çalışma süresince tüm sıçanlar gruplarına ve cinsiyetlerine göre ayrı kafeslerde tutuldu. Dişi ve erkek sıçanlar da yapılan uygulamaya göre kendi içlerinde 5 gruba ayrıldı. 4- CPA'nın üç ayrı dozu (25-50-100 mg/kg/gün) kullanıldı. Uygulamalar oral yoldan, günde tek doz, 30 gün süreyle yapıldı.

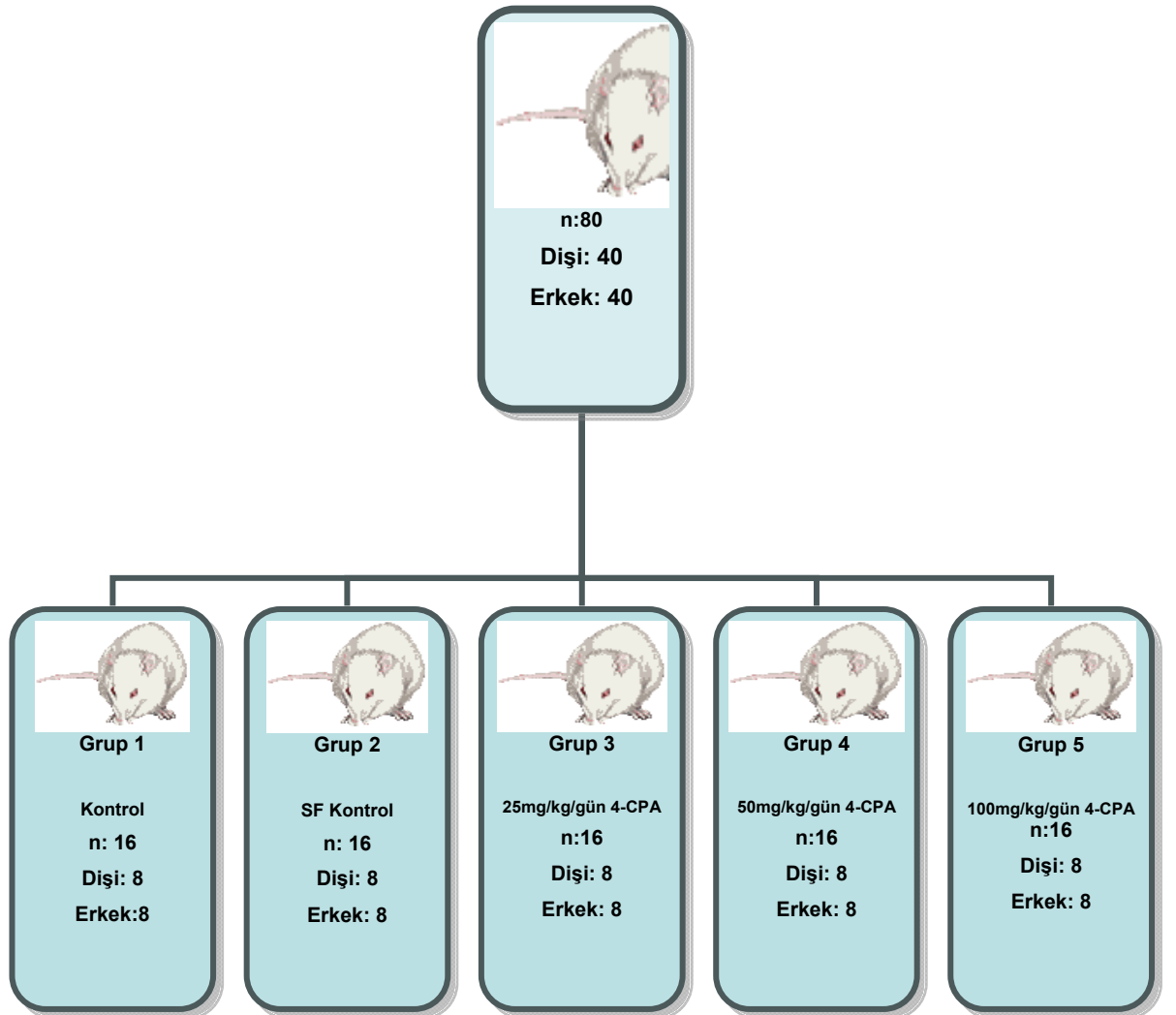
Deneydeki Çalışma Grupları,

Erkek sıçanlar

1. Grup 1. Kontrol (n=8) : Herhangi bir uygulama yapılmadı.
2. Grup 2. SF kontrol (n=8) : Serum fizyolojik verildi (0.5 ml/gün)
3. Grup 3. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 25 mg/kg/gün 4-CPA verildi.
4. Grup 4. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 50 mg/kg/gün 4-CPA verildi.
5. Grup 5. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 100 mg/kg/gn4-CPA verildi.

Dişi sıçanlar

1. Grup 1. Kontrol (n=8) : Herhangi bir uygulama yapılmadı.
2. Grup 2. SF kontrol (n=8) : Serum fizyolojik verildi (0.5 ml/gün).
3. Grup 3. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 25mg/kg/gün 4-CPA verildi.
4. Grup 4 . (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 50 mg/kg/gün 4-CPA verildi.
5. Grup 5. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 100 mg/kg/gün 4-CPA verildi.



Son uygulamadan 24 saat sonra intra muskuler (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 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.²⁹

Kullanılan Solüsyonlar:

- %10'luk TCA
- %1'lik BHT (%95'lik alkol içinde)
- %0.67'lik TBA

Karaciğer doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile soğuk TCA (1 gr doku + 9 ml %10'luk TCA) 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. Örnekten 750 µl alınarak üzerine 750 µl %67'lik TBA ve 10 µl %1'lik BHT eklendi. Vorteksle iyice karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi ve daha sonra oda ısısına kadar soğutulurak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de, köre karşı okundu. Lipid peroksit seviyeleri $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile çarpılarak MDA ekivalanı nmol olarak gr doku başına hesaplandı.

3. 3. 2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Dokuda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı.¹⁰

Kullanılan solüsyonlar:

- 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⁻¹cm⁻¹ katsayısı kullanılarak µmol / gr doku olarak ifade edildi.

3. 3. 3. 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 dilusyonları kullanıldı.

3. 3. 3. 1. Numunelerin Hazırlanması

Doku örneklerini pH 7,4 olan fosfat tamponu ile 5:1 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenat +4⁰C de 3000x 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 $ZnSO_4$ ilave edildi. Vortekslenen karışım $+4^{\circ}C$ de 3000g de 5 dk santrifüj edildi. Üst fazın tamamı ayrılarak $+4^{\circ}C$ de 14000 rpm de 5 dk daha santrifüj edildi.

3. 3. 3. 2. Ölçümün Yapılışı

Doku örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlemlerinden sonra elde edilen üst fazlarından NO_x tayini için 0,1 ml alınarak her bir örnekten çift tekrar olacak şekilde 96 çukurlu ELISA plağına yerleştirildi. Eş hacimde standart solusyonları da ayrı çukurlara yerleştirildi. Standart solusyonlar 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 sulfanilamid ve ardından 0,05 ml NEDD eklendi. Plak $37^{\circ}C$ de 30 dk inkübe edildi. İnkubasyon sonunda ELISA okuyucusunda 540 nm de okundu.

3. 4. İstatistiksel Değerlendirme

Deneyler sonucunda elde edilen veriler bilgisayarda SPSS istatistik paket programı kullanılarak analiz edildi. 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.

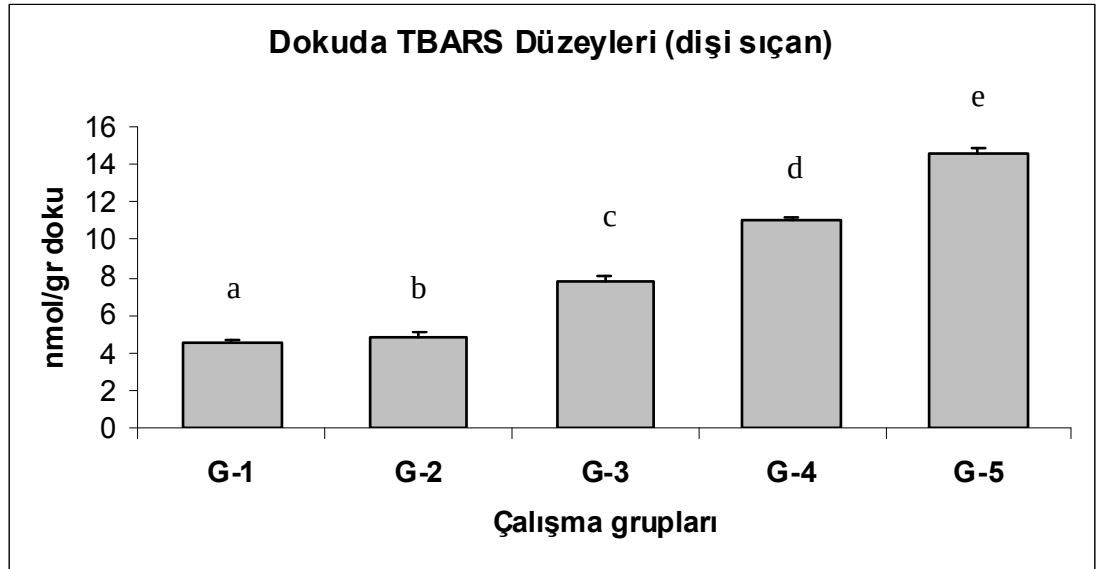
4. BULGULAR

4-CPA'nın karaciğer dokusundaki etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, oksidan olayların göstergesi olarak MDA ve NOx düzeyleri ile antioksidan olarak fonksiyon gören GSH düzeyleri ölçüldü.

4.1.Dokuda TBARS Düzeyleri

a. Dişi sıçanlar

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu (Grup 1) ile SF grubu (Grup 2) arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi. 4-CPA uygulanan gruplarda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak doku MDA düzeylerinde artış görüldü (Şekil 6.) (Tablo 10.).



Şekil 6. Dişi Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

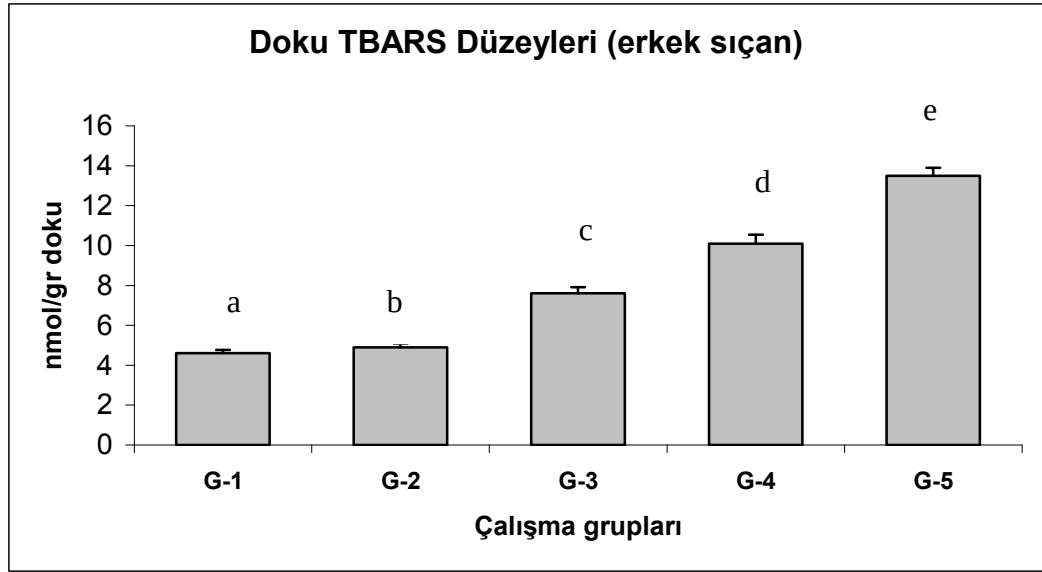
Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

P< 0.001: a-c, a-d, a-e, b-c, b-d, b-e, c-d, c-e, d-e

b. Erkek sıçanlar

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu (Grup 1) ile SF grubu(Grup 2) arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi. 4-CPA uygulanan gruplarda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak doku MDA düzeylerinde artış görüldü (Şekil 7.) (Tablo 11.).



Şekil 7. Erkek Sıçanlarda Doku TBARS Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

$P < 0.01$: c-d, d-e

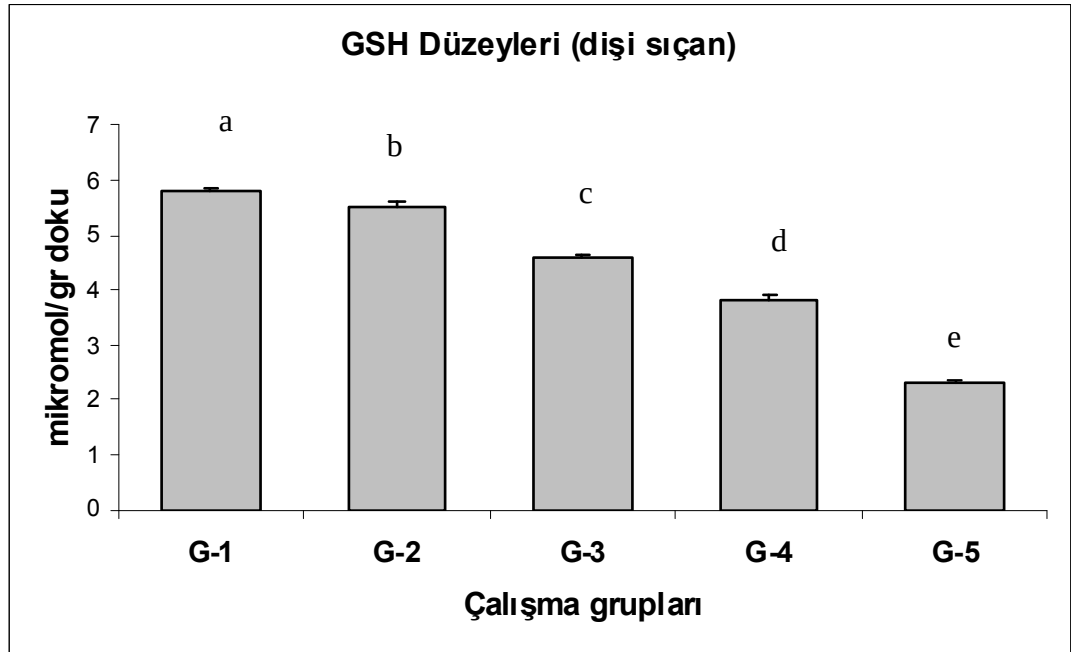
$P < 0.001$: a-c, a-d, a-e, b-c, b-d, b-e, c-e

Çalışmamızda, dişi ve erkek sıçanların karaciğer MDA düzeyleri arasındaki fark önemsiz bulundu.

4. 2. Dokuda GSH Düzeyleri

a. Dişi sıçanlar

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu (Grup 1) ile SF grubu (Grup 2) arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi. Gerek kontrol, gerekse SF grubuyla karşılaştırıldığında 4-CPA uygulanan gruplarda doza bağlı olarak GSH düzeylerinde anlamlı düşmeler gözlemlendi (Şekil 8.) (Tablo 10.).



Şekil 8. Dişi Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

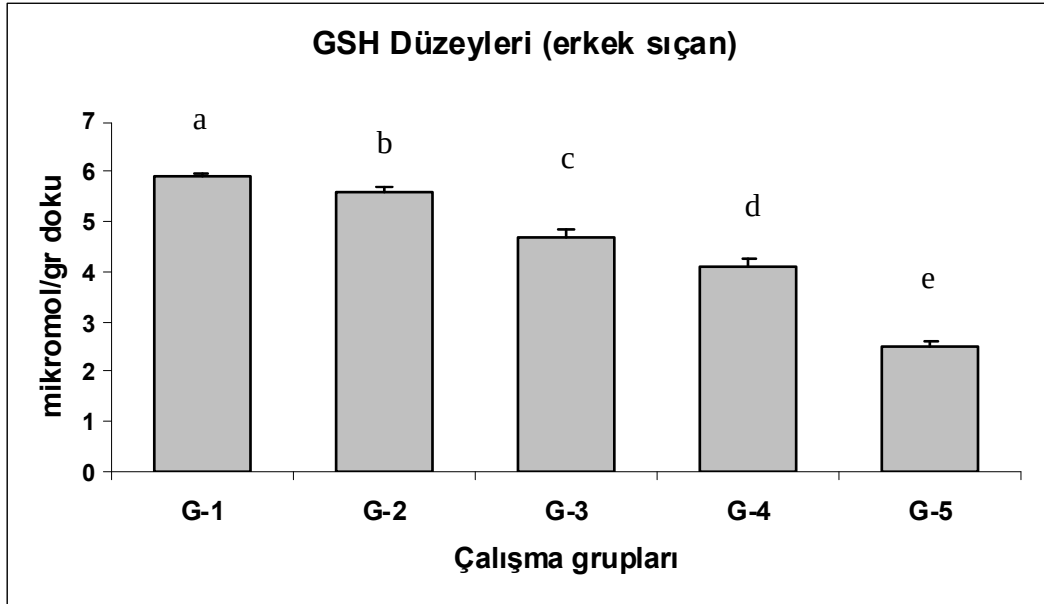
Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

P< 0.01 : a-d, b-d, c-d, d-e

P< 0.001 : a-c, a-e, b-c, b-e, c-d

b. Erkek sıçanlar

Kontrol grubu (Grup 1) ile SF grubu (Grup 2) karşılaştırıldığında, SF grubunda doku GSH düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Gerek kontrol, gerekse SF grubuyla karşılaştırıldığında 4-CPA uygulanan gruplarda doza bağlı olarak GSH düzeylerinde anlamlı düşmeler gözlemlendi (Şekil 9.) (Tablo11.).



Şekil 9. Erkek Sıçanlarda Doku GSH Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

$P < 0.01$: b-d, c-d, d-e

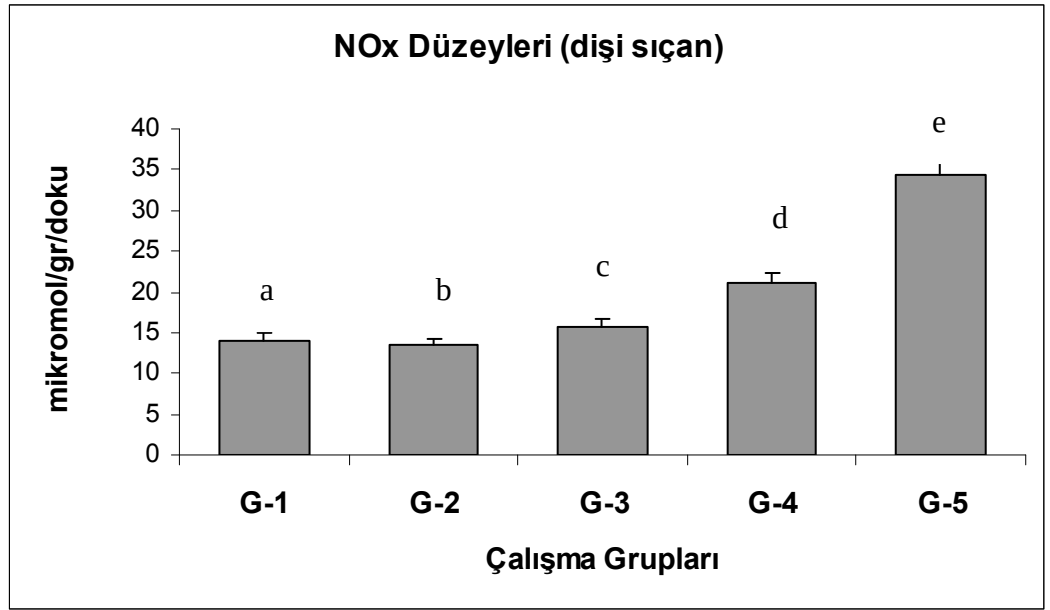
$P < 0.001$: a-c, a-d, a-e, b-c, b-e, c-e

Çalışmamızda, dişi ve erkek sıçanların karaciğer MDA düzeyleri arasındaki fark önemsiz bulundu.

4. 3. Dokuda NOx Düzeyleri

a. Dişi Sıçanlar

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu, (Grup 1) SF grubu (Grup 2) ile 25 mg/kg/gün 4-CPA uygulanan grup (Grup 3) arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi. 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün 4-CPA uygulanan gruplarda, (Grup 4) (Grup 5) ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak doku NOx düzeylerinde artış gözlemlendi (Şekil 10.) (Tablo 10.).



Şekil 10. Dişi Sıçanlarda Doku NOx Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

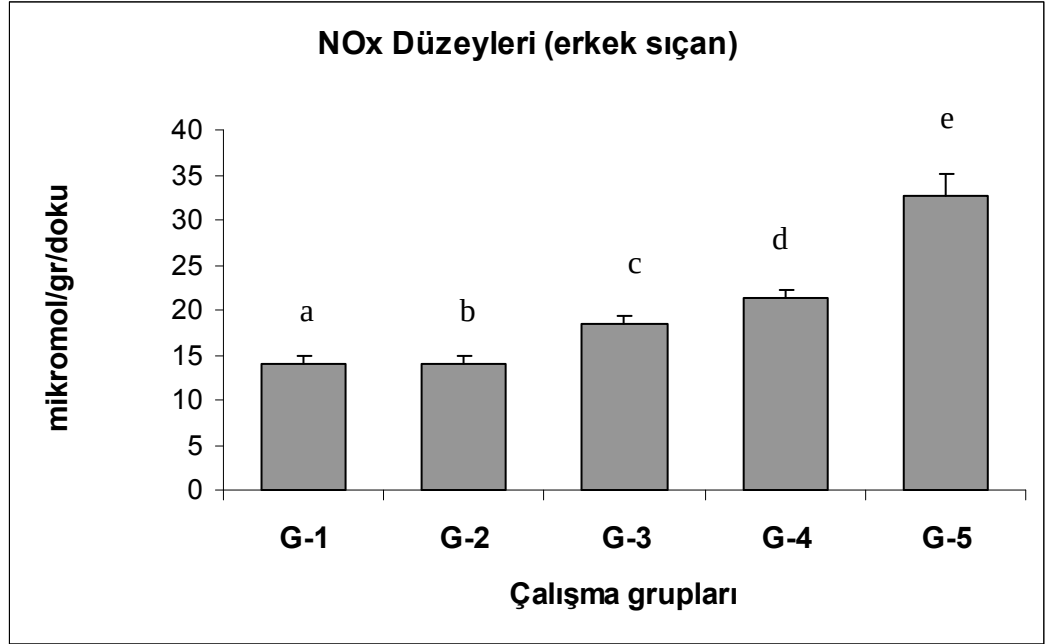
Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

P< 0.01 : b-d, c-d, c-e, d-e

P< 0.001 : a-d, a-e, b-e

b. Erkek Sıçanlar

Herhangi bir uygulama yapılmaya kontrol grubu (Grup 1) ile SF grubu (Grup 2) arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark görülmedi. 4-CPA uygulanan gruplarda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak doku NOx düzeylerinde artış görüldü. (Şekil 11.) (Tablo 11.).



Şekil 11. Erkek Sıçanlarda Doku NOx Düzeyleri

G-1: Grup 1 , G-2: Grup 2, G-3: Grup 3, G-4: Grup 4, G-5: Grup 5

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

$P < 0.01$: a-c, b-c, d-e

$P < 0.001$: a-d, a-e, b-d, b-e, c-e

Tablo 10. Dokuda TBARS, GSH, NOx Düzeyleri (Dişi Sıçan)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
MDA (nmol/gr/doku)	4.5±0.22	4.9±0.21	7.8±0.31	11±0.25	14.6±0.32
GSH (µmol/gr/doku)	5.9±0.05	5.5±0.11	4.6±0.05	3.8±0.13	2.3±0.07
NOx (µmol/gr/doku)	14.1±0.77	13.6±0.74	15.7±1.05	21.2±1.14	34.3±2.26

Sonuçlar Mann Whitney U Testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verildi

Grup 1. Kontrol (n=8) : Herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2. SF kontrol (n=8) : Serum fizyolojik verildi (0.5 ml/gün).

Grup 3. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 25 mg/kg/gün 4-CPA verildi.

Grup 4. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 50 mg/kg/gün 4-CPA verildi.

Grup 5. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 100 mg/kg/gün 4-CPA verildi.

Tablo 11. Dokuda TBARS, GSH, NOx Düzeyleri (Erkek Sıçan)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
MDA (nmol/gr/doku)	4.6±0.17	4.9±0.18	7.6±0.31	10.1±0.45	13.5±0.4
GSH (µmol/gr/doku)	5.9±0.05	5.6±0.09	4.7±0.13	4.1±0.16	2.5±0.13
NOx (µmol/gr/doku)	13.9±0.83	14.1±0.88	18.4±0.93	21.3±0.86	32.6±0.86

Sonuçlar Mann Whitney U Testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verildi

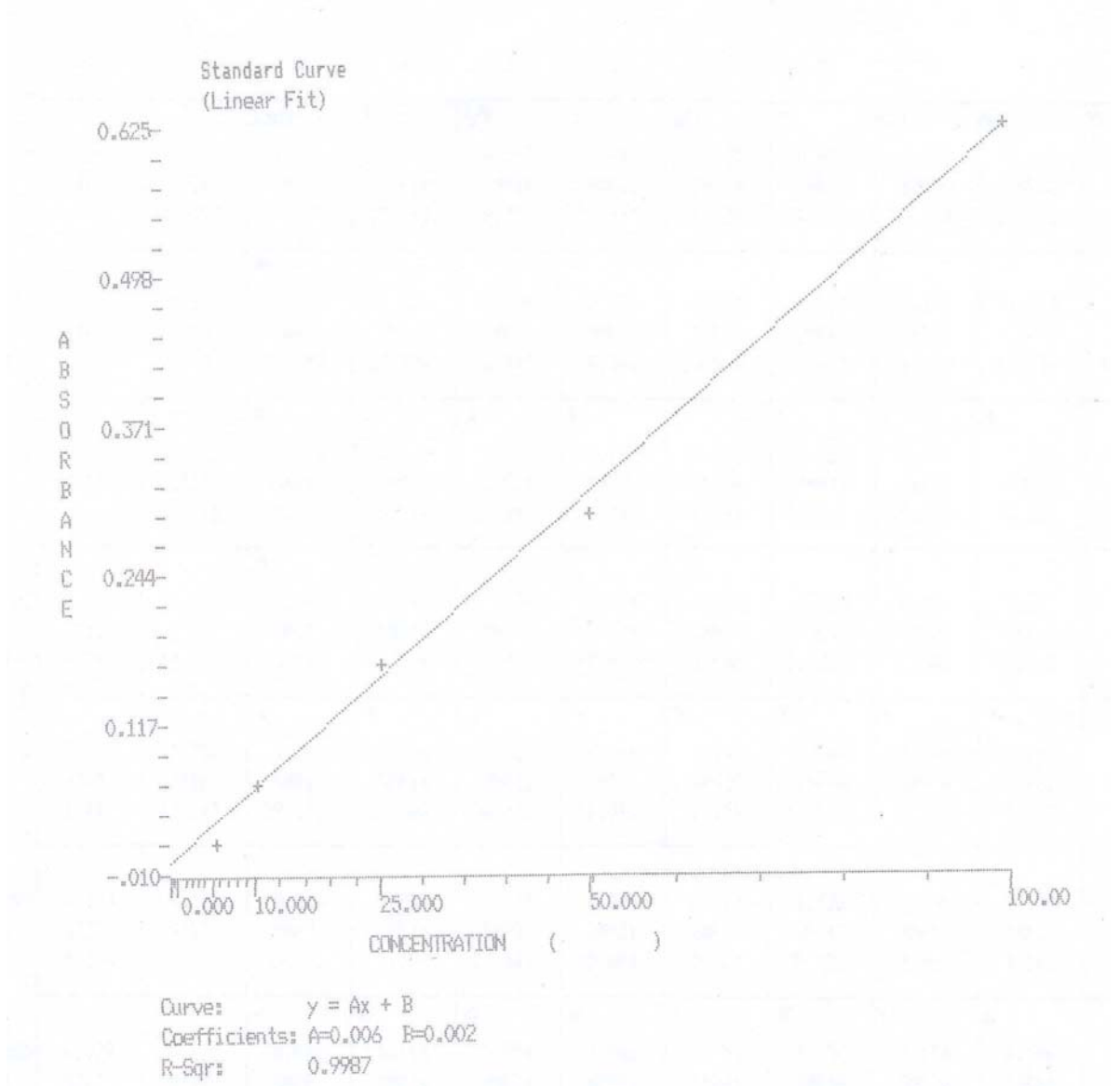
Grup 1. Kontrol (n=8) : Herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2. SF kontrol (n=8) : Serum fizyolojik verildi. (0.5 ml/gün)

Grup 3. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 25 mg/kg/gün 4-CPA verildi.

Grup 4. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 50 mg/kg/gün 4-CPA verildi.

Grup 5. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 100 mg/kg/gün 4-CPA verildi.



Şekil 12. NO_x Tayininde Standart Solusyonlara Karşılık Gelen Absorbansların Oluşturduğu Doğrusal Regresyon Grafiği

5. TARTIŞMA

Gıda gereksiniminin artmakta olduğu günümüz koşullarında endokrin bozucuların tarım alanındaki kullanımı da gittikçe yaygınlaşmaktadır. Bu durum BBDH' ların kullanımı ile ilgili sorunları da beraberinde getirmektedir. Çünkü son yıllarda artan bir şekilde özellikle örtü altı sebzeçilikte kullanılan bu maddelerin ancak uygun zaman ve uygun dozda kullanılması durumunda toksik olmadığı görüşü kabul edilmektedir. Ürün verimini artıracığı düşüncesiyle yüksek dozda ve bilinçsiz olarak kullanılma olasılığı yüksek olan bu maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkileri yeterince bilinmemektedir.^{6,68,69,138,141}

4- CPA, günümüzde seralarda sıklıkla kullanılan BBDH' ların başında gelmektedir, bu nedenle de araştırmada kullanılması tercih edilmiştir.^{37,69,141}

Mevcut literatür bilgileri, ilacın yan etkilerinin en fazla görüldüğü dönemin, doku ve organ gelişiminin devam etmekte olduğu puberte öncesi dönemde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmada, 4- CPA uygulamasına sıçanlar 20 günlük iken başlanmış ve eşeysel olgunluğa eriştikleri 50. güne kadar devam edilmiştir. Deneklerde yapılan 30 günlük ilaç uygulama süresi insan ömrüyle karşılaştırıldığında yaklaşık 2 yıllık bir zamana eşdeğer gelmektedir.

Literatürde 4- CPA' nın kullanılma dozu konusunda da yeterli bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle doz seçiminde subkronik toksisiteyi araştırmak üzere yapılmış olan çalışmalardaki dozlar referans olarak alınmıştır. Ayrıca deneklerin 20 günlük olmaları nedeniyle, dozlar yeniden uyarlanmıştır. Hayvanların tolere edebilecekleri maksimum doz, 100 mg/kg/gün olarak belirlenmiş ve diğer dozlar maksimum dozun katları oranında azaltılarak uygulanmıştır.

Literatürdeki BBDH ve 4- CPA' nın toksik etkilerini inceleyen araştırmalarda, üreme organları ve endokrin sistem ile ilgili bulgulara rastlanmaktadır. Çalışmalarda özellikle puberte öncesi dönemde ilaca maruz kalmanın üreme organlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir.^{88,90} Çalışmamızda toksik madde atılımında önemli hedef organlardan birisi olması nedeniyle karaciğer incelenmiştir. Literatürde fenoksi asit türevleri ile yapılan araştırmalarda karaciğerde sitokrom P- 450 seviyelerinin arttığı ve metabolizma ile ilgili bazı enzimlerini etkilediği gösterilmiştir.¹⁰² Ayrıca sıçanlarda yapılan toksisite çalışmalarında iştah azalması, kilo kaybı ve hepatosellüler nekroz bulguları olduğu bildirilmiştir.¹²⁴ Diğer taraftan insan lenfositlerinin sitogenetik yönden incelendiği bir çalışmada 4- CPA 'nın genotoksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.¹⁵

4- CPA gibi oksin grubu üyelerinden olan indol asetik asit (IAA) bitkilerde, mikroorganizmada ve memeli hayvanlarda sentez edilmektedir.¹⁰⁵ Literatürde bu kimyasalla ilgili, bizim çalışmamıza paralel bazı araştırmalar bulunmaktadır.

Oliveria ve ark. nın 2007 de yapmış olduğu bir çalışmada bu oksinin lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisi olduğu bildirilmiştir.¹⁰³ Peroksidazların bulunduğu in vitro ortamda IAA' in reaktif oksijen türevlerine metabolize olarak lipid peroksidasyonunu artırdığı saptanmıştır.⁴³

Lins ve ark. da bu bulguyu destekler şekilde IAA' in karaciğer ve plazmada TBARS düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir.⁸⁴ Ayrıca Kim ve ark. IAA 'in insan melanoma hücrelerinde, peroksidasyona neden olarak apoptozisi artırdığını göstermişlerdir.⁷³

Bizim bulgularımız da, oksin grubu üyelerinden olan 4- CPA' nın hem dişi hem erkek sıçanların karaciğer dokusunda aynı etkiyi gösterdiğini ve doza bağlı olarak MDA düzeylerini artırdığını buna paralel olarak GSH düzeylerini anlamlı olarak azalttığını göstermiştir. MDA ve GSH düzeylerindeki değişiklikler bu BBDH' nun lipid peroksidasyonunu artırdığı kanıtlanmıştır.

Alıcıgüzel ve ark. 4- CPA' nın in vitro şartlardaki insan eritrositlerinde selektif olarak katalaz ve G6DP enzimlerini azalttığını, diğer antioksidan enzimlerini etkilemediğini gözlemlemişlerdir.⁸

Çalışmamızda karaciğerdeki NOx düzeyleri, uygulanan 4- CPA' nın muhtemelen inflamasyonu artırması ile ilgili olarak yüksek bulunmuştur. Bilindiği gibi inflamatuvar cevabın arttığı durumlarda iNOS sentezi artışına bağlı olarak NOx düzeyi yükselmektedir. NOx 'in oksidan hasarlardaki etkisi ise değişken olabilmektedir. Süperoksit anyonu ile reaksiyona giren NOx onu ortamdan uzaklaştırabilir veya oluşan peroksinitrit nedeniyle aktif oksidan gibi rol oynayabilir.

Wong ve ark. karaciğer hücrelerinde Glutasyon S transferaz'ın peroksinitrit, miyeloperoksidaz, H₂O₂, nitrit gibi NO aracılı reaktif nitrojen türevlerinin detoksifikasyonunu sağladığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada artan NO aracılı reaktif nitrojen türlerinin glutasyon transferaz yapımını da inhibe ettiği gösterilmiştir.¹³³

Normal Fizyolojik koşullarda eNOS'a bağlı NO yapımı hepatik stellat hücrelerin parakrin olarak kontrolünü sağlarken patolojik koşullarda değişen NO düzeyine bağlı olarak inflamasyon ve kontrolsüz apoptozise neden olmaktadır.^{77,114}

Bulgularımız doğrultusunda puberte öncesi dönemde uygulanan 4- CPA' nın karaciğer dokusunda cinsiyete bağlı olmaksızın lipid peroksidasyonunu ve muhtemelen inflamatuvar reaksiyonları arttırdığı söylenebilir.

6. SONUÇ

Akut ve subakut etkileri kesin olarak bilinmeyen 4-CPA' nın kalıntı miktarını göz önünde tutarak daha kontrollü ve bilinçli kullanılması, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada 4- CPA' nın karaciğer ve diğer organlar üzerindeki etkilerinin gösterilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır

7. ÖZET

PUBERTE DÖNEMİNE KADAR 4-CPA (4-KLOROFENOKSİ ASETİK ASİT)'YA MARUZ KALAN SIÇANLARIN KARACİĞER DOKUSUNDAKİ OKSİDAN OLAYLARIN İNCELENMESİ.

Bitki Büyümesi Düzenleyici Hormonlar (BBDH) bitkinin büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olaylarını olumlu ya da olumsuz etkileyebilen maddelerdir. Bu hormonlar günümüz koşullarında verimi, dayanıklılığı arttırmak ve ürün kalitesini yükseltmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

4-Klorofenoksi asetik asit (4-CPA) seralarda özellikle domates üretiminde en fazla kullanılan BBDH' lardan biridir. BBDH' larının dozu ve uygulama zamanı verim açısından önemlidir. Aşırı doz ve uygun olmayan zamanda kullanım bitki büyümesini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca bitkilerde bıraktıkları kalıntılar nedeniyle insan sağlığı üzerinde de istenmeyen etkilere neden olabilmektedir. Bu etkilenmede cinsiyet ve yaş faktörünün de önemli olduğu bilinmektedir.

Literatürde 4-CPA ile ilgili çeşitli toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar özellikle üreme sistemi ve endokrin sistem üzerine yoğunlaşmıştır. Nitekim puberte dönemine kadar 4-CPA' ya maruz kalan dişi ve erkek sıçanlarda, üreme organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilediği, doz bağımlı üreme organlarına apoptozise neden olduğu literatürde gösterilmiştir.

Karaciğer, metabolik aktivitenin en fazla olduğu dokudur ve yüksek doz 4-CPA maruziyetinin hepatosellüler nekroza neden olduğu ifade edilmektedir. . Ancak 4-CPA ile oksidan olaylar arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmadı.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda puberte dönemine kadar değişik dozlarda 4- CPA' ya maruz kalan dişi ve erkek sıçanların karaciğer dokusunda oksidan ve antioksidan olayları incelemeyi amaçladık.

Çalışmada 20 günlük 40 erkek, 40 dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlarda kendi içlerinde 5 gruba ayrıldı.

Grup 1. Kontrol (n=8) : Herhangi bir uygulama yapılmadı

Grup 2. SF kontrol (n=8) : Serum fizyolojik verildi (0.5 ml/gün)

Grup 3. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 25 mg/kg/gün 4-CPA

Grup 4. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 50 mg/kg/gün 4-CPA

Grup 5. (n=8) : 0.5 ml SF içinde çözünmüş 100 mg/kg/gün4-CPA

Uygulamalar oral yoldan, 30 gün süre ile yapıldı. 30. uygulamadan 1 gün sonra hayvanlar Rompun+Ketamin (50+60-100mg/kg) anestezisi altında feda edildi. Karaciğer dokusunda oksidan stresin göstergesi malondialdehit (MDA) ve doğal antioksidan glutatyon (GSH) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle, NOx düzeyi (nitrat+nitrit) ise Griess yöntemi ile çalışıldı. Sonuçlar, Anova ve Mann-Whitney U testleri ile değerlendirildi. $P<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Her iki cinste de kontrol ve SF grupları arasında MDA, GSH ve NOx düzeyleri açısından bir fark tespit edilmedi. 4-CPA uygulaması doz bağımlı olarak MDA ve Nox düzeylerinde artışa, GSH düzeylerinde ise azalmaya neden oldu.

Bulgularımız doğrultusunda puberte öncesi dönemde uygulanan 4- CPA' nın karaciğer dokusunda cinsiyete bağlı olmaksızın lipid peroksidasyonunu ve muhtemelen inflamatuvar reaksiyonları arttırdığı söylenebilir.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF OXIDANT PROCESSES IN LIVER TISSUES OF THE RATS, WERE EXPOSED 4-CPA UNTILL PUBERTY

Plant growth regulators (PGRs), are hormones which might be produced by plant itself or were administered externally. These hormones can effect growth, development and other physiological processes of plants either positively or negatively. PGRs are used frequently at the present days to improve yield, durability and quality of the products.

4- Chlorophenoxy acetic acid (4-CPA) is one of the PGRs, and used extensively in greenhouses, especially for tomato farming. Usage doses and application time of PGRs are critical for the yield of products. Overdose usage of PGRs or application in inappropriate time periods effect plant growth adversely. PGRs also might have undesirable effects on human health because of their remains on plants. It is known that gender and age are important for the adverse effects of those regulators.

There are several toxicity studies about 4-CPA in the literature. These studies spesifically focus on the reproductive and endocrine systems. In fact, in the literature it has been shown that being exposed to 4-CPA untill puberty effects the development of the reproductive organs of both male and female rats. It is also shown that 4-CPA causes apoptosis in reproductive organs in a dose dependent manner.

The liver tissue has the highest metabolic activity, and it is declared that being exposed to high doses of 4-CPA give rise to hepatocellular necrosis. However there is no study, which shows the relationship between 4-CPA and oxidant processes in the literature.

Based on this information, we aimed to investigate the oxidant and antioxidant processes in the liver tissue of the male and female rats, which were exposed to several doses of 4-CPA until puberty.

40 Male and 40 female rats in their 20th days were used for this study, and rats were randomly divided for 5 groups for each gender.

Groups were like at the bottom:

Group 1: (n=8) Control (without any administration)

Group 2: (n=8) SF Control 0,5 ml physiologic saline solution (PS) per day

Group 3: (n=8) 4-CPA, 25 mg.kg⁻¹.day⁻¹ in 0.5 ml PS

Group 4: (n=8) 4-CPA, 50 mg.kg⁻¹.day⁻¹ in 0.5 ml PS

Group 5: (n=8) 4-CPA, 100 mg.kg⁻¹.day⁻¹ in 0.5 ml PS

Agents were administered orally throughout 30 days. The day after the last agent administration, rats were killed via Rompun (50 mg.kg⁻¹) and Ketalar (60-100 mg.kg⁻¹) anesthesia. An oxidant marker malondialdehyde (MDA), a natural antioxidant glutathione (GSH) levels were measured spectrophotometrically, and NO_x (nitrate+nitrite) levels determined by Griess reaction in liver tissue. Results were evaluated by ANOVA and Mann-Whitney U tests. The level of significance was set at $p < 0.05$.

There was no statistically significance for MDA, GSH and NO_x levels between control and PS groups of both genders. Administration of 4-CPA, increased MDA and NO_x levels, and decreased GSH levels in a dose-dependent manner in all groups.

According to our results, it might be suggested that administration of 4-CPA before puberty increases lipid peroxidation and possible inflammatory reactions independent from gender.

9. KAYNAKÇA

1. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarier K, : Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. Comp. Biochem. Physiol. C. 2003; 135: 331-336.
2. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A,: Pesticides and oxidative stress : a review. Med. Sci. Monit. 2004; 10: 141-147.
3. Adlercreutz H., Mazur W. Phyto-oestrogens And Western Diseases. Ann Med 1997; 29 (2): 95-120,.
4. Akbulut, K.G.: Melatoninin yaşlanma ile antioksidan mekanizmalar ve humoral immun sistem arasındaki ilişkiler üzerindeki etkileri, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara (1997)
5. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 1-110
6. Aksglaede L, Juul A, Leffers H, Skakkebaek NE, Endersson AM. The sensivity of the child to sex steroids: Possible impact of exogenous strogens. Whom reprod Update, 2006; 12:341-349
7. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. Free Radic Biol Med. 2002; Mar 1; 32,5:377-85

8. Alıcıgüzel Y, Özdem S, Demir AY, Ünal F, Kumbul D, Özdem SS, Perry G, Smith MA: Effect of the herbicide 4-CPA on human erythrocyte antioxidant enzymes in vitro. *Redox Rep.* 2001; 6: 153-154.
9. Altuntaş İ, Delibaş N, Doğuca 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.
10. Aykaç AG, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H: The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats, *Toxicology*, 1985; 36, 71-76.
11. Babior, B.M. : Oxygen- dependent microbial killing by phagocytes, *New Engl. J. Med.* 1978; 298(12), 659-668.
12. Babior, B.M.: Superoxide : a two – edged sword, *Barz J. Med. Biol. Res.*, 1997; 30, 141-155.
13. 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.
14. 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.

15. Bağcı H, Bağcı G, Açıkbaz İ, Demir G, In Vitro testing for genotoxicity of 4-CPA by sister chromatid Exchange in human lymphocyte culture. *Turk J Med Sci.* 2005; 35:75-78
16. Barnett AH. Origin of the microangiopathic changes in diabetes. *Eye* 1993; 7:218-22.
17. Barry Helliwell, Guttridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Oxford, Clarendon Press, 1995.
18. Barthold JS, Kryger JV, Derusha AM, Drel BP, Jendak R, Skafat DF. Effect of an environmental endocrine disruptor on fetal development, estrogen receptor(alpha) and epidermal growth factor receptor expression in the porcine male genital tract. *J Urol.* 1999; 162: 864-871.
19. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* 1990;68:989-98. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1986; 548(Suppl):9-37
20. Bay K, Askhild C, Skakkebaek NE, Andersson AM. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20: 77-90.
21. Bertuzzi A, Mingrone G, Gandolfi A, Greco AV, Ringoir S, Vanholder R. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. *Clin Chim Acta* 1997; 265: 183–192.

22. 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.
23. Bingham SA., Atkinson C., Liggins J. Phyto-oestrogens: Where Are We Now? *British Journal of Nutrition.* 1998; 79:393-406.
24. Bingöl, F., Aydın S. Açıkgöz Ş. Serbest Radikaller ,Ankara Hastanesi Tıp Dergisi, 1993; 28(2), 1-23
25. Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA. Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicol Rev.* 2004; 23: 65-73.
26. Burke GL., Vitols MZ., Bland D. Soybean Isoflavones As An Alternative To Traditional Hormone Replacement Therapy: Are We There Yet? *J. Nutr.* 2000; 130:664-665.
27. Büyüktuncer Z. Başaran AA. Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 25 / Sayı 2 / Temmuz 2005 / ss. 79-94*
28. Carlsen E, Gwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992; 305: 609-613.
29. Casini A, Ferrali M, Pompella A: Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice, *Am. J. Pathol.* 1986; 123, 520-531.

30. Cassidy A., Hanley B., Raventos R. Isoflavones, Lignans And Stilbens-Origins, Metabolism And Potential Importance To Human Health. *Journal Of The Science of Food And Agriculture*. 2000; 80:1044-1062.
31. Chaffin CL, Trewin AL, Watanabe G, Taya K, Hutz RJ. Alterations to the pituitarygonadal axis in the peripubertal female rat exposed in the utero and through lactation to 2,3,7,8,- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biol report*. 1997; 56: 1498-1502.
32. Chugh SN, Arora V, Sharma A, Chugh K: Free radical scavengers and lipid peroxidation in acute aluminium phosphide poisoning. *Indian J. Med. Res*. 1996; 104: 190-193.
33. Collins BM., McLachlan JA., Arnold SF. The Estrogenic And Antiestrogenic Activities Of Phytochemicals With The Human Estrogen Receptor Expressed In Yeast. *Steroids*. 1997; 62:365-372.
34. Colon I, Caro D, Bourdony CJ , Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect*. 2000; 108: 895-900.
35. Davis S., Dalais F., Simpson E., Murkies A. Phytoestrogens In Health And Disease. *Recent Progress In Hormone Research*. 1999; 54:185-211.

36. De Silva AE, Kadir MA, Aziz MA, Kadzimin S. Proliferation potential of 18-month-old callus of *Ananas comosus* L. Cv. Moris. Scientific World Journal. 2006; 17: 169-175.
37. Deniz Şeker. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden Absisik asit, 4-Klorofenoksiasetik asit, Giberellik asit ve Maleik Hidrazidin Swiss-Albino farelerinin Karaciğer ve Kas Glikojeni Üzerine Etkileri. Ankara Doktora Tezi, Antalya 2002.
38. Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean : Isolation, characterization, and mechanisms of action. Biochem Pharmacol. 1997; 54: 1087-1096.
39. Dötsch J, Dörr HG, Wildt L. Exposure to Endogenous Estrogens During Lifetime: The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1, Melzler M (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; S.81- 99
40. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, Physiol Rev . 2002; 82, 47-95
41. Fantone, J.C., Ward, P.A.: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte-development inflammatory reactions, 1982; 107(3), 397-418.
42. Fitzpatrick LA. Selective Estrogen Receptor Modulators And Phytoestrogens: New Therapies For The Postmenopausal Women. Mayo Clin Proc . 1999; 74:601-607.

43. Folkes, L.K. and Wardman, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61, 129–136.
44. Freeman, B.A., Carpo, J.D.: Biology of disease free radicals and tissue injury, *Lab . Invest.* 1982; 47(5), 412-426.
45. Frenkel, K.: Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage, *Pharmacol. Ther.* 1992; 53, 127-166.
46. Friedlander MA, Witko-Sarsat V, Nguyen AT, Wu YC, Labrunte M, Verger C, Jungers P, Descamps- Latscha B. The advanced glycation endproduct pentosidine and monocyte activation in uremia. *Clin Nephrol.* 1996 Jun; 45,6: 379-82.
47. Fukutake M., Takahashi M., Ishida K., Et al. Quantification Of Genistein And Genistin In Soybeans And Soybean Products. *Food And Chemical Toxicology.* 1996; 34:457-461.
48. Gangadharan B: Effect of methoxychlor on antioxidant system of goat epididymal sperm in vitro. *B. Asian J. Androl.* 2001; 3: 285-88.
49. Garry VF, Burroughs B, Tarone R, Kesner JS. Herbicides and adjuvants: as evolving view. *Toxicol Ind Health.* 1999; 15: 159-167.
50. Gey KF. Prospects for the prevention of free radical disease. Regarding cancer and cardiovascular disease. *Br Med Bull* 1993; 49:679-99.
51. Gilbert D.L.: Fifty Years of Radical Ideas in Reactive Oxygen Species, Ed Chiueh C.C. , *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , 2000; 899:1-14

52. Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited. A review of the long term health effects. *Ann Intern Med.* 1995; 122: 778-778.
53. Gokmen V, Acar J. Characterization of surface auxin residues of greenhouse tomatoes. *Journal of Food Quality.* 2001; 24:351-358.
54. Gokmen V, Acar J. Investigations on the synthetic auxin residues of greenhouse tomatoes. *Journal of Food Quality.* 2000; 23: 503-512.
55. Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillette L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl.* 2006; 29: 96-104.
56. Gupta A: Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats. *J. Appl. Toxicol.* 1999; 19: 67-72.
57. Gültekin F, Öztürk M, Akdoğan M: The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch. Toxicol.* 2000; 74: 533-538.
58. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.

59. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996; 25:57-74.
60. Hu T, Dryhurst G. Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. *J Electroanal Chem* 1997; 432: 7–18.
61. Ishihara K, Warita K, Tnida 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.
62. Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, et al: Effect of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci.* 1998; 63:1921- 1929.
63. Jacobs MN., Lewis DFV. Steroid Hormone Receptors And Dietary Ligands: A Selected Review. *Proceedings Of The Nutrition Society.* 2000; 61:105-122.
64. Jena BS, Patnaik BK. Effect of malonate and p- chlorophenoxy acetic on hepatic succinic dehydrogenase activity of ageing lizards. *Gerontology.* 1990; 36: 12-18.
65. Kale M, Rathore N, John S, Bhathagar D: Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alteration in antioxidant status in rat erythrocytes. A possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 1999; 105: 197-205.

66. 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.
67. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, Ankara, 1998; s. 222, 232, 273, 276, 355.
68. Kaynak L, Ersoy N. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 1997; 10: 223-236.
69. Kaynak L. Memiş K. Bitki Büyüme Engelleyici ve Geciktiricilerin Etki Mekanizmaları. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 1997; 10: 237-248.
70. Kehrer JP: Free radical as mediator of tissue injury and disease. Crit. Rew. Toxicol. 1993; 23: 21-48.
71. Kelce WR, Wilson EM. Antianrogenic Effects of Environmental Endocrine Disruptors: The Book of Enviromental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1, Meltzer M(ed), Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 2001; S. 39-61.
72. 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.

73. Kim DS, Jeon SE, Jeong YM, Kim YS, Kwon SB, Park KC. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase- induced apoptosis. *FEBS Letters* 2006; 580: 1439-1446.
74. Knight DC., Eden JA. A Review Of The Clinical Effects Of Phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 87:897-904, (1996).
75. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthesis in mammals, *Biochem J.* 1994; 298:249-258.
76. Kuwada M, Kawashima R, Nakamura K, Kojima H, Haumi H, Maki J. Study of neonatal exposure to androgenic endocrine disruptors, testosterone and dihydrotestosterone by normal-phase HPLC. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20: 1237-1241.
77. Langer DA, Das A, Semela D, Decker NK, Hendrickson H, Bronk SF, Katusic ZS, Gores JG, Shah VH. Nitric oxide promotes caspase-independent hepatic stellate cell apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *Hepatology* May 2008; 47:6, 1983-1993
78. Lee MM. Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology. 2007; 109- 118.
79. Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione depletion in rested and exercised mice: Biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316:941-949.

80. Leibovitz B, Hu ML, Tappel AL. Dietary supplements of vitamin E, carotene, coenzyme Q and selenium protect tissues against lipid peroxidation in rat tissue slices. *J Nutr* 1990; 120:97-104.
81. Liggins J., Bluck JC., Runswick S., Et al. Daidzein And Genistein Content Of Fruits And Nuts. *J Nutr Biochem*. 2000; 11:326-331.
82. Liggins J., Bluck LJC., Coward A., Et al. Extraction And Quantification Of Daidzein And Genistein In Food. *Analytical Biochemistry*. 1998; 264:1-7.
83. Liggins J., Mulligan A., Runswick A. Daidzein And Genistein Content Of Cereals. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56:961-966
84. Lins GP, Vale CR, Pugine MPS, Oliveira DL, Ferreira LSM, Costa XJE, de Melo MP. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophil functions and oxidative stress from neutrophil, mesenteric lymph node and liver. *Life Sciences* 2006; 78: 564-570
85. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: A physiologic messenger, *Ann Intern Med*. 1994; 120:227-237.
86. Maiti PK, Kor A, Gupta P, Chaurasia SS: Loss of membrane integrity and inhibition of type-1 iodothyronine 5-monooxygenase activity by fenvalerate in female mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995; 214: 905-909.
87. Martini MC., Dancisak BB., Haggans CJ., Et al. Effects Of Soy Intake On Sex Hormone Metabolism In Premenopausal Women. *Nutrition And Cancer*. 1999; 34(2): 133-139.

88. Massart F, Parrino R, Seppia P, Federico G, Saggese G. How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty? *Minerva Pediatr.* 2006; 58: 247-257.
89. McKee RH . Phthalate exposure and early thelarche. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 541-543.
90. McLachan JA, Simpson E, Martin M. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20: 63-75.
91. 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.
92. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi , *YYU Vet Fak Derg.* 2004; 15 (1-2):91-96
93. Messina M., Gugger ET., Alekel DL. Soy Protein, Soybean Isoflavones, And Bone Health: A Review Of The Animal And Human Data. "Nutraceuticals And Functional Foods" (Ed. Wildman RE.) 1st ed. CRP Press, USA, 2001; s.77-99.
94. 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.
95. Ministry of Ecology and Sustainable Development Endocrine disruptors: what are their effects ? Paris, Mars 2004

96. Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide*. 2001; 5: 62-71.
97. Mollace V, Lannone M, Muscoli C, Palma E, Granato T, Rispoli V, Nistico R, Rotiroli D, Salvemini D: The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic. *Neurosci. Lett.* 2003; 335: 163-166.
98. Moncada S: The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: Nitric oxide pathway, *Acta Physiol Scand.* 1992; 145:201-227
99. Morris D. Hormone Replacement Therapy And Coronary Artery Disease. *Current Opinion In Obstetrics And Gynecology.* 1996; 8:184-7.
100. Nakazawa H, Genka C, Fujishima m. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996; 46: 15-32
101. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol Med.* 2001; 31:1287-1312
102. Noritaka I, Hidenobu Y, Yasuji A, Masashi T, Masamaru Y. Effects of MCPA and other phenoxyacid compounds on hepatic xenobiotic metabolism in rats, *Tohoku J. Exp. Med.* 1991; 165:171-182.

103. Oliviera DL, Piccoli SM, Ferreira LSM, Lins PG, Costa XJE, de Melo MP. Influence of indole acetic acid on antioxidant levels and enzyme activities of glucose metabolism in rat liver. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25: 195-201.
104. Potashnik G, Ben Aderet N, Israeli R, Yanai – Inbar I, Sober I. Suppressive effect of 1,2-dibromo-3-chloropropane on human spermatogenesis. *Fertil Steril.* 1978; 30: 444-447.
105. Qureshi GA, Baig SM. The role of tryptophan, 5-hydroxy indole-3-acetic acid and their protein binding in uremic patients. *Biochem. Mol Biol Int* 1993; 29: 411–419.
106. Radons J, Heller B, Bürkle A, Hartmann B, Rodriguez ML, Kroncke KD, Burkart V, Kolb H: Nitric oxide toxicity in islet cell involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD^+ depletion, *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199: 1270-1277.
107. Ravikumar S, Srikumar K. Metabolic dysregulation and inhibition of spermatogenesis by gibberellic acid in rat testicular cells. *J Environ Biol.* 2005; 26: 567-569.
108. Reinli K., Block G. Phytoestrogen Content Of Foods-A Compendium Of Literature Values. *Nutr Cancer.* 1996; 26:123-148.
109. Rowland I. Optimal Nutrition: Fibre And Phytochemicals. *Proceedings Of The Nutrition Society.* 1999; 58:415-19.

110. Sam K., Chang C. Isoflavones From Soybeans And Soy Foods. "Functional Foods Biochemical And Processing Aspects" (Ed Gazza M.) de CRC Press, New York, 2002.
111. Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interactions* 1990; 76:141-61.
112. Shea KM. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics*. 2003; 111: 1467: 1474.
113. Sies, H.: Biochemistry of oxidative stres, *Angnew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986; 25,1508- 1071.
114. Smith JMS, Lautt WW. Nitric oxide and prostoglandins potentiate the liver regeneration cascade. *Can J Gastroenterol*. 2006;20(5) 329-34
115. Solomon GM, Schetter T.Environment anh health . 6.Endocrine disruption and potential human health implications. *CMAJ Canadian Medicel Asoociation Jorunal*. 2000; 1116: 1467-1474.
116. Song TT., Hendrich S., Murphy PA. Estrogenic Activity Of Glycitein, A Soy Isoflavone. *J Agric Food Chem*. 1999; 47:1607-1610.
117. Stadman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free aminoacids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 2003 Dec; 25 3-4: 207-18. Epub 2003 Jul 29
118. Stamler JS, Singel D, Loscalzo J: Biochemistry, of nitric oxide and its redox activated forms, *Science*. 1992; 258:1898-1902.

119. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Tarnaud CI, Sullivan S, Teague JL. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:1056-1061.
120. Şentürk H. Serbest Radikal Hasarının Hepatobiliyer Sistem Üzerindeki Rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi* 5 (2204) Ek sayı 1-8
121. Toda S., Shirataki Y. Inhibitory Effects Of Isoflavones On Lipid Peroxidation By Reactive Oxygen Species. *Phytotherapy Research.* 1999; 13:163-165
122. 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.
123. Umland EM., Pharm D., Cauffield JS., Et al. Phytoestrogens As Therapeutic Alternatives To Traditional Hormone Replacement In Postmenopausal Women. *Pharmacotherapy.* 2000; 20 (8): 981-990.
124. United States Environmental Protection Agency (EPA), Prevention, Pesticides and toxic Substances (7508W). 4- Chlorophenoxy acetic acid. 1997; 738-F-97-001, S.1-78.
(<http://epa.gov/pesticides/REDs/2115red.pdf>)

125. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim. 1998; 11: 336-341
126. Vincent A., Fitzpatrick LA. Soy Isoflavones: Are They Useful In Menopause? Mayo Clin Proc. 2000; 75:1174-1184.
127. Vom Sall FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. Prostate enlargemet in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. Proc Natl. Acad Sci. 1997; 94: 2056-2061.
128. Vural N: Toksikoloji. A. Ü. Ecz. Fak. Yay. No 56, Ankara, 1984; s.179, 384, 464.
129. Ward WE, Thompson LU. Dietary Esrogens of Plant and Fungal Origin: Occurence and Exposure: The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Distruptors Part 1, Metzler M (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; S. 101-128.
130. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflamation. Acta Phsysiol Scand 1986; 548(Suppl):9-37
131. Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H, Hauser R. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. Environ Health Perspect. 2006; 114: 1424-1431.

132. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation. Second messengers and mediators tissue destruction. Br Med Bull 1993; 49:506-22
133. Wong PS, Eiserich JP, Reddy S Lopez CI, Cross CE, Vander Vliet A. Inactivation of glutathione S-transferases by nitric oxide derive oxidants exploring a role of tyrosine nitration. Arch Biochem Biophys 2001 Oct; 15:394 (2) 216-28
134. Y.Baykal, F. Kocabalkan. Serbest radikalleri ve hücre hasarı. Sendrom. 2000; 9:31-36
135. Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, et al: Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. Com Biochem Physiol Part C. 2002; 132: 437-444.
136. Yavuz,Ö: Gerbillerde deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde 2-kloroadenozinin beyin dokusu lipid peroksit düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara;1994.
137. 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.
138. <http://cevre.club.fatih.edu.tr/webyeni/konfreweb konu25.pdf>
139. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isfl_tbl.pdf
140. www.agr.ege.edu.tr/~tuam/dergi/dergi2/hormonlarfp.htm

141. www.aib.gov.tr/proje/sebzelerdehormon.pdf

142. www.tuam.ege.edu.tr/dergi/gergi2/hormonlarfp.htm

10. EKLER

10.1. Teşekkür

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

Hiç yorulmadan çalışmalarımda bana ışık tutan, her konuda bana destek olan, içtenliğiyle beni yüreklendiren çok değerli hocam Doç. Dr. Çiğdem Özer' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarıyla bana yön veren, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinolojisi Anabilim Dalı hocalarından, Prof. Dr. Peyami Cinaz' a, Prof. Dr. Aysun Bideci' ye, Uzm. Dr. Ediz Yeşilkaya' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca, yardımlarını, emeklerini benden esirgemeyen, her konuda yanımda olan güzel arkadaşlarım Dr.O.Fuat Sönmez' e, Dr. Şevin Güney' e, Araş. Gör. A. Şebnem İlhan' a, Ayhan Korkmaz' a, İlknur Karayel' e, Atilla N. Mohammed'e, ve kıymetli dostlarım Eda Köylü ve Serkan Levent'e sonsuz teşekkür ederim.

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

10.2. Etik Kurul Onayı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

16.01.2008

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/04-870
KONU:

Sayın

Doç.Dr.Çiğdem ÖZER
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.072 kod numaralı ve "Sütten kesilme döneminden eşeyssel olgunluğa ulaşana kadar pestisite maruz kalan sıçanlarda oksidan olayların incelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

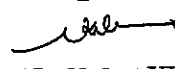
Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.072 and entitled "Investigation of the oxidant event in rats that are exposed to the pesticide from the time of weaning until gaining sexual maturity" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council


Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER


Prof.Dr.Nedret KILIÇ


Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

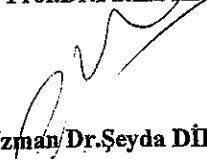
Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ


Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU


Uzman Dr.Seyda DİKER

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: DUYGU

Soyadı: TOZCU

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara / 31. Temmuz. 1982

EĞİTİMİ:

2006–2008 Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;
Fizyoloji Anabilim Dalı
(Yüksek Lisans Eğitimi)

2002 – 2006 Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü
(Lisans Eğitimi)

1996 – 2000 Kılıçarslan Süper Lisesi (Ank)

1993 – 1996 Bahçelievler İlköğretim Okulu (Ank)

1992 – 1993 Özel Bilim Koleji (Ank)

1990 – 1992 Özel Evrensel Koleji (Ank)

1988 – 1990 Özel Aydın Anadolu Koleji (Ank)

Yabancı Dili: İngilizce