

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAT KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA  
2,3,7,8- TETRAKLORODİBENZO-*P*-DİOKSİN (TCDD)'NİN NEDEN  
OLDUĞU OKSİDATİF STRES ÜZERİNE PROTOKATEŞEİK ASİT 'İN  
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AHMET SAVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA

2012

Tezin Başlığı: Rat Karaciğer Ve Bbbrek Dokularında 2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-  
P-Dioksin (TCDD)'nin Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Protokateşik Asit 'in  
Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Ahmet SAVCI

Sınav Tarihi: 06.07.2012

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerli olduğu ve Kimya Ana Bilim Dalında Yüksek  
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Dilek ASMA



Doç.Dr. Osman ÇİFTÇİ



Yrd. Doç.Dr. İlknur ÖZDEMİR (Danışman)



Prof.Dr. Asım KÜNKÜL  
Enstitü Müdürü

*Ailem'e*

## ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Rat Karaciğer Ve Böbrek Dokularında 2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)’nin Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Protokateşik Asit ’in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ahmet SAVCI

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RAT KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA  
2,3,7,8- TETRAKLOORODİBENZO-*P*-DİOKSİN (TCDD) 'NİN NEDEN  
OLDUĞU OKSİDATİF STRES ÜZERİNE PROTOKATEŞEİK ASİT 'İN  
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet SAVCI

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

xii + 59 sayfa

2012

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İlknur ÖZDEMİR

Her geçen gün artan çevre kirliliği, bugünün ve geleceğin dünyasını ciddi şekilde tehdit etmekte, ekolojik tehlikelerle karşı karşıya bırakmaktadır. Dünya nüfusunun hızla artması, paralel olarak artan enerji ihtiyacı, endüstrinin gelişimi ve şehirleşmeyle ortaya çıkan çevre kirliliği, insan sağlığı ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Birçok toksik maddenin çevre ve canlı organizmalar üzerine etkileri tespit edilmekle birlikte bu maddeler içerisinde dioksin ve dioksin benzeri maddeler en çok karşılaşılan ve en çok toksisiteye sahip olanlar arasındadır. Bu çalışmada, subkronik 2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) uygulamalarının ratlarda karaciğer ve böbrek dokuları üzerine etkileri ve bu etkiler üzerine protokateşik asidin koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 280-310 g ağırlığında toplam 28 adet Wistar Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Ratlar her grupta 7 adet olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Deney süresi 45 gün olarak belirlendi. Çalışma periyodu boyunca grup 1 kontrol grubu olarak belirlendi ve 0,5 mL mısır yağı gavajla uygulandı. Grup 2'ye 2 µg/kg/hafta dozunda TCDD, Grup 3'e 100 mg /kg/gün protokateşik asit ve Grup 4'e protokateşik asit + TCDD uygulandı. 45 gün sonunda ratlar sakrifiye edilerek biyokimyasal analizler için karaciğer ve böbrek dokuları alındı ve 80 °C'de muhafaza edildi.

Karaciğer ve böbrek dokularında SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri ile GSH düzeylerinin TCDD grubunda kontrol ve PCA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,001$ ) bir şekilde azaldığı belirlenirken, bu enzim aktivitelerinin ve GSH düzeylerinin PCA grubunda TCDD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,001$ ) şekilde arttığı gözlenmiştir.

Karaciğer dokusu TCDD ve PCA'nın birlikte verildiği grupta GSH düzeyleri yalnız TCDD'nin verildiği gruba göre anlamlı ( $p \leq 0,001$ ) bir şekilde artarken, diğer antioksidan enzimlerde anlamlı ( $p \geq 0,001$ ) bir değişiklik görülmedi. Böbrek dokusu TCDD+PCA grubunda TCDD grubuna göre GSH-Px ve SOD aktiviteleri ile GSH düzeylerinde anlamlı olarak ( $p \leq 0,001$ ) artış olmasına karşın CAT enzim aktivitelerinde istatistiksel ( $p \geq 0,01$ ) olarak anlamlı değişme olmadığı belirlendi.

Karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinin TCDD grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel ( $p \leq 0,001$ ) olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. PCA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel ( $p \geq 0,001$ ) olarak anlamlı değişmeler gözlenmedi. MDA düzeylerinde PCA+TCDD grubunda TCDD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmalar olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; PCA'nın, karaciğer ve böbrek dokularında TCDD'nin neden olduğu lipid peroksidasyonu azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ortaya konulmuştur. Bu bağlamda, TCDD'nin neden olduğu toksik etkileri önlemede PCA'nın yararlı etkisinin olabileceği kanaatine varılabilir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** TCDD, protokateşik asit, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler.

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF PROTOCATECHUIC ACID ON OXIDATIVE STRESS INDUCED IN RAT'S LIVER AND KIDNEY OF 2,3,7,8- TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD)**

Ahmet SAVCI

İnönü University

Graduate School of Natural and Applied Science

Chemistry Department

xii + 59 pages

2012

Supervisor: Assist.Prof. Dr. İlknur ÖZDEMİR

Environmental pollution is increasing every day, seriously threatening the world of today and the future, leaves with face to face the ecological dangers. Rapid increase in world population, increasing energy needs at the same time the industry's development and the resulting environmental pollution of urbanization have a negative impact on human health and other living things. Many toxic effects of substances on the environment and living organisms, among these toxic substances were detected in the dioxin and dioxin-like substances are the most common and have most toxicity. The aim of this study was to investigate the effects of sub-chronic TCDD applications on liver and kidney tissues in rats, and the protective role of protocatechuic acid in this respect.

A total of 28 male Wistar Albino rats weighing between 280-310 g were used in the present study. Rats were divided into four groups each of which including seven rats. The experiment period was planned as 45 days. During the study period, Group 1 was the control group and 0.5 mL of corn oil was applied with gavage. Group 2 was applied 2 µg/kg/week dose 2,3,7,8-TCDD (tetrachlo-p-dioxin), Group 3 was applied

100 mg/kg/day of protocatechuic acid and Group 4 was applied protocatechuic acid + TCDD. At the end of the 45 days, the rats were sacrificed and their liver and kidney tissues were taken for biochemical analysis and were stored at 80°C.

It was observed that liver and kidney tissues SOD, CAT, GSH-Px activities and GSH levels have significantly reduced in TCDD group compared to control group. Although the increase in these enzyme activities is statistically ( $p \leq 0,001$ ) significant in PCA group.

It was observed that the increase in GSH levels in TCDD+PCA group is statistically significant than TCDD group, but no significant change has been observed in SOD, CAT and GSH-Px activities between these groups. While the increase in GSH-Px, SOD activities and GSH levels in TCDD+PCA group was statistically significant than TCDD group, no significant ( $p \geq 0,001$ ) change has been observed in CAT activities between these groups.

It was determined that the increase in MDA levels in liver and kidney tissues in TCDD group was statistically significant than control group. But no statistically significant change was observed in PCA group than control group. It was determined that the decrease in MDA levels in TCDD+PCA group was statistically significant than TCDD group.

In conclusion, the results of the study in liver and kidney tissues showed that PCA decreased TCDD-induced lipid peroxidation, and supported antioxidant activity. Therefore, it can be suggested that protocatechuic acid has the potential prohibition or reducing effects for the treatment against the toxicity caused by TCDD.

**KEYWORDS:** TCDD, protocatechuic acid, oxidative stress, liver and kidney tissues, lipid peroxidation, antioxidant enzymes.



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçilmesinde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana yön veren, her konuda destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İlknur Özdemir'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım ve özellikle laboratuvar çalışmalarında deneyim kazanmamda değerli bilgilerinden benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Osman ÇİFTÇİ 'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Oğuz ÇAKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında, her türlü desteğini benden esirgemeyen ve bana destek olan eşime teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda beni teşvik eden, yardımlarını benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Grv. Barış KURT ve Arş. Grv. Kenan BULDURUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde 2011/18 no'lu ve "Rat Karaciğer Ve Böbrek Dokularında 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*P*-Dioksin (TCDD)'nin Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Protokateşik Asit 'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje ile finansal destek sunan, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<u>ÖZET</u> .....	i
<u>ABSTRACT</u> .....	iii
<u>TEŞEKKÜR</u> .....	v
<u>İÇİNDEKİLER</u> .....	vi
<u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u> .....	ix
<u>TABLolar DİZİNİ</u> .....	x
<u>SİMGELER VE KISALTMALAR</u> .....	xi
<u>1.GİRİŞ VE KURAMSAL TEMELLER</u> .....	1
<u>1.1. Dioksin ve Benzeri Bileşikler</u> .....	1
1.1.1. <u>Dioksin kaynakları ve oluşumu</u> .....	2
1.1.2. <u>Dioksinin etki mekanizması</u> .....	3
1.1.3. <u>Dioksinlerin toksikokinetikleri</u> .....	4
1.1.3.1. <u>Emilim ve dağılımı</u> .....	4
1.1.3.2. <u>Dioksinin metabolizması ve atılımı</u> .....	5
1.1.4. <u>Dioksinlerin toksisitesi</u> .....	6
1.1.4.1. <u>TCDD'nin akut toksisitesi</u> .....	8
<u>1.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller</u> .....	8
1.2.1. <u>Başlıca reaktif oksijen radikalleri</u> .....	10
1.2.2. <u>Serbest radikallerin etkileri</u> .....	12
1.2.2.1. <u>DNA ve nükleik asitlere etkileri</u> .....	13
1.2.2.2. <u>Proteinlere etkileri</u> .....	14
1.2.2.3. <u>Karbonhidratlara etkileri</u> .....	14
1.2.2.4. <u>Lipidlere etkileri</u> .....	15
1.2.3. <u>TCDD ve oksidatif stres</u> .....	16
<u>1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri</u> .....	17
1.3.1. <u>Protokateşik asit (PCA)</u> .....	20
1.3.1.1. <u>Protokateşik asidin antioksidan etkisi</u> .....	22

<u>1.3.1.2. Protokateşik asidin karsinojen metabolizması üzerindeki etkisi</u>	23
.....	23
<u>1.4. Çalışmanın Amacı</u>	25
<u>2. GEREÇ ve YÖNTEM</u>	26
<u>2.1. Gereç</u>	26
<u>2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler</u>	26
<u>2.1.2. Kullanılan cihazlar</u>	27
<u>2.1.3. Deney hayvanları</u>	28
<u>2.1.3.1. Deney grupları</u>	28
<u>2.1.4. Örneklerin alınması ve hazırlanması</u>	28
<u>2.1.4.1. Homojenatların hazırlanması</u>	28
<u>2.2. Yöntemler</u>	29
<u>2.2.1. Protein miktarının tayini</u>	29
<u>2.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü</u>	29
<u>2.2.3. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü</u>	30
<u>2.2.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite ölçümü</u>	31
<u>2.2.5. Redükte glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü</u>	32
<u>2.2.6. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü</u>	33
<u>2.2.7. İstatistiksel analizler</u>	33
<u>3. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	34
<u>3.1. Biyokimyasal Parametreler</u>	34
<u>3.1.1. Dokulardaki SOD aktiviteleri</u>	34
<u>3.1.1.1. Karaciğer dokusu SOD aktivitesi</u>	34
<u>3.1.1.2. Böbrek dokusu SOD aktivitesi</u>	35
<u>3.1.2. Dokulardaki CAT aktiviteleri</u>	36
<u>3.1.2.1. Karaciğer dokusu CAT aktivitesi</u>	36
<u>3.1.2.2. Böbrek dokusu CAT aktivitesi</u>	37
<u>3.1.3. Dokulardaki GSH-Px aktiviteleri</u>	38

3.1.3.1. Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitesi.....	38
3.1.3.2. Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi.....	39
3.1.4. Dokulardaki GSH düzeyleri.....	40
3.1.4.1. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri.....	40
3.1.4.2. Böbrek dokusu GSH düzeyleri.....	41
3.1.5. Dokulardaki MDA düzeyleri.....	42
3.1.5.1. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.....	42
3.1.5.2. Böbrek dokusu MDA düzeyleri.....	43
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
5. KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. PCDD ve PCDF'nin Genel Yapısı.....	2
Şekil 1.2. 2,3,7,8-tetrakloro-p-dioksin (TCDD).....	2
Şekil 1.3. Serbest Radikal Kaynakları ve Doku Hasarı .....	9
Şekil 1.4. Serbest radikallerin DNA üzerindeki etkileri .....	13
Şekil 1.5. Hücrede radikal aracılı hasar .....	14
Şekil 1.6. Lipid Peroksidasyonu .....	16
Şekil 1.7. TCDD ve aril hidrokarbon reseptörü (Ahr) mekanizması .....	17
Şekil 1.8. Antioksidanların sınıflandırılması .....	19
Şekil 1.9. Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu ve antioksidan savunma sistemi...20	
Şekil 1.10. Fenolik bileşikler.....	21
Şekil 1.11. Protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'in kimyasal yapısı...22	
Şekil 3.1. Karaciğer dokusu SOD aktiviteleri.....	34
Şekil 3.2. Böbrek Dokusu SOD aktiviteleri .....	35
Şekil 3.3. Karaciğer dokusu CAT aktiviteleri .....	36
Şekil 3.4. Böbrek dokusu CAT aktiviteleri .....	37
Şekil 3.5. Karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri .....	38
Şekil 3.6. Böbrek dokusu GSH-Px aktiviteleri .....	39
Şekil 3.7. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri .....	40
Şekil 3.8. Böbrek dokusu GSH düzeyleri .....	41
Şekil 3.9. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri .....	42
Şekil 3.10. Böbrek dokusu MDA düzeyleri .....	43

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından saptanan, PCB'ler, PCDD'ler ve PCDF'lerin Toksik Eşdeğer Faktörleri	7
Tablo 1.2. Serbest radikallerin oluşum kaynakları	8
Tablo 1.3. Serbest Oksijen Radikalleri	10

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- AHH: Aril hidrokarbon hidroksilaz  
AhR: Aril hidrokarbon Reseptörü  
BSA: Bovine Serum Albümin  
°C: Santigrat Derece  
CAT: Katalaz  
DNA: Deoksiribonükleik Asit  
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü  
DTNB: 5,5-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit]  
EDTA: Etilendiamintetra Asetik Asit  
GSH: Redükte Glutasyon  
GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz  
GSSG: Okside Glutasyon  
GST: Glutasyon-S-transferaz  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit  
iNOS: İndükleyebilen Nitrik-oksit Sentaz  
L: Lipid Radikali  
LDL: Düşük yoğunluklu Lipoprotein  
LOO· : Lipid Peroksil Radikali  
LOOH: Lipid Hidroperoksit  
MDA: Malondialdehit  
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat  
NBT: Nitroblue Tetrazolium  
NO: Nitrik Oksit  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Süperoksit Anyon Radikali  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Singlet Oksijen  
OH· : Hidroksil Radikali  
8-OHdG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin  
ÖD: Öldürücü Doz  
*p*- : Para  
PCA: Protokateşik asit  
PCB : Poliklorlu Bifenil  
PCDD : Poliklorludibenzo Dioksin  
PCDF : Poliklorludibenzo Furan

PKC : Protein Kinaz C  
ROT : Reaktif Oksijen Türleri  
RNT: Reaktif Nitrojen Türleri  
SOD : Süperoksit Dismutaz  
TBA : Tiyobarbitürik Asit  
TBARs : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri  
TCA : Triklorasetik Asit  
TCDD : 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin  
TEF : Toksik Eşdeğerlik Faktörü  
TEQ : Toksik Eşdeğerlik Konsantrasyon  
TNF- $\alpha$  : Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$



# 1.GİRİŞ VE KURAMSAL TEMELLER

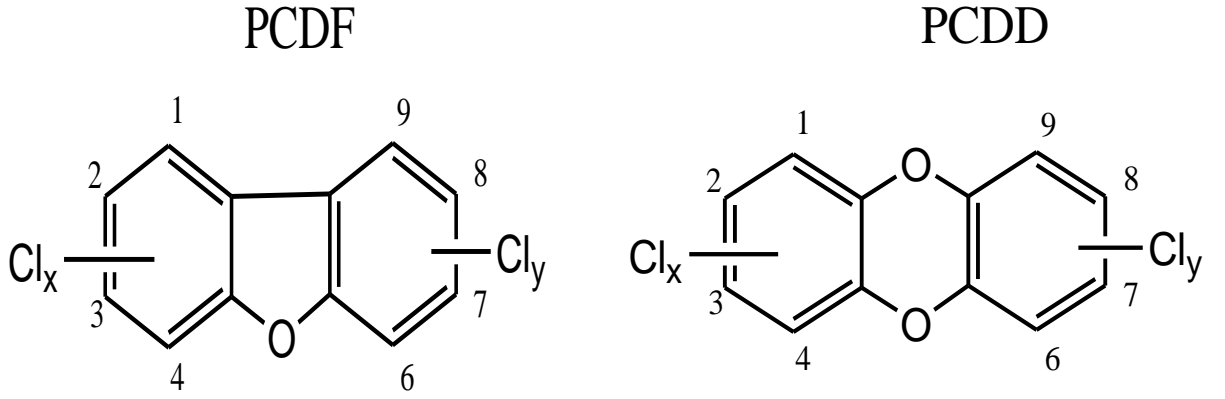
## 1.1. Dioksin ve Benzeri Bileşikler

Dioksinler, özellikleri ve toksisiteleri birbirleriyle ilişkili olan geniş bir kimyasal madde grubudur. Kimyasal yapı ve toksisite bakımından benzerliğinden dolayı dioksin ve dioksin benzeri maddeler olarak adlandırılan Poliklorodibenzo-*para*-dioksinler (PCDD), poliklorodibenzofuranlar (PCDF) ve poliklorodibifeniller (PCB) hidrofobik özeliğe sahip, yıkımları zor ve doğada kararlı durumda bulunabilen çevresel kirleticilerdir [1]. Doğada 210 farklı PCDD/F (75 PCDD, 135 PCDF) bileşiği bulunmakta ve bu bileşiklerden 17 tanesi en fazla toksik etki göstermektedir [2].

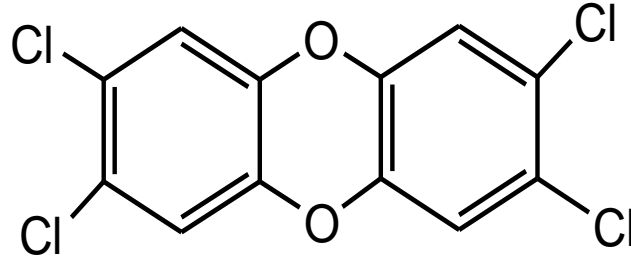
Dioksin bileşikleri, yapılarında karbon, oksijen, hidrojen atomları bulunduran ve yapılarındaki karbon atomlarının klorlanmasıyla şekillenen, sıvı haldeyken renksiz ve kristalize görünümlü kimyasallardır. Yapılarındaki klor grupları nedeniyle yağda iyi çözünen bu bileşikler su ve havada çözünmemiş olarak bulunurlar. Ancak akarsu, deniz, okyanus ve göllerde bulunan organik maddeler ile planktonlara bağlanarak çözülmüş hale geçerler ve balıklar ile diğer deniz canlılarının bu plankton ve organik maddeleri alması sonucunda yağ dokuda birikirler.

Molekül yapısı Şekil 1.1’de verilen dibenzo-*p*-dioksinler, 1 den 9 a kadar olan karbon atomlarına farklı konumlarda klor iyonlarının bağlanmasıyla oluşur ve klor iyonlarının bağlandığı karbon atomu ile bağlanan klor iyonu sayısına göre isimlendirilirler. Örneğin molekülün 2.,3.,7. ve 8. Karbon atomlarına 4 adet klor iyonu bağlanmışsa bileşik 2,3,7,8- tetraklorodibenzo-*p*-dioksin olarak isimlendirilir. (Şekil 1.2) Aynı şekilde moleküle bağlanan klor sayısı bir ise mono, iki ise di (DCDD), üç ise tri (TrCDD), dört ise tetra (TCDD), beş ise penta (PeCDD), altı ise hepta (HeCDD), yedi ise hekza (HxCDD), sekiz ise okta (OCDD) olarak isimlendirilir [3].

Dioksin ve benzeri bileşiklere maruz kalınması sonucu oluşan yan etkilerin başında; kanser (özellikle sindirim sistemi, karaciğer ve göğüs kanserleri), gelişme bozuklukları, wasting sendromu, lenfoid ve gonadal atrofi, kloroakne, hepatotoksisite, damak yarığı, kusurlu böbrek oluşumu gibi doğuma ait bozukluklar ile immunotoksisite, nörotoksisite ve kardiyotoksisite, mide bulantısı, solunum güçlüğü, üreme bozuklukları, çocuklarda gelişim bozukluğu, yüksek tansiyon ve astımın geldiği belirlenmiştir [1,2].



Şekil 1.1. PCDD ve PCDF'nin Genel Yapısı [4].



Şekil 1.2. 2,3,7,8-tetrakloro-p-dioksin (TCDD) [5].

### 1.1.1. Dioksin kaynakları ve oluşumu

Dioksinler, yağda yüksek miktarda çözünmesi ve çevre şartlarına olan dayanıklılığı sonucu birçok endüstriyel ve kimyasal ürünlerden kaynaklanabilir. Dioksinler, doğada yanma ürünleri (kömür, petrol ve ürünleri gibi çeşitli maddelerin yakılması, orman yangınları), metallerin işlenmesi, ağaç endüstrisinde Cl içeren maddelerin kullanımı, klorlu fenoller, herbisidler ve klorlu alifatik bileşiklerin kullanım işlemleri, biyolojik ve fotokimyasal işlemler, mikroorganizmaların klorlu bileşiklere maruz kalmaları gibi olaylar sonucunda ortaya çıkabilirler [6, 7, 8]. Klorlu bileşikler, yıllar boyunca tehlikesi bilinmeden polivinil klorür (PVC) üreten fabrikalarda, pestisit ve herbisit olarak tarımda ve kağıt endüstrisinde beyazlatıcı amaçla kullanılmıştır [9, 10,

11]. Yağda kolay çözünebilir olmaları besin zincirinde de önemli derecede yer almalarına sebep olmuştur [12].

Çeşitli süreçler sırasında açığa çıkan dioksin bileşikleri çoğunlukla hava yoluyla taşınarak su, toprak, hayvansal dokular ve bitkilerde birikirler. Bu bileşiklerin yağda çözünürlük oranları fazla olduğundan özellikle organik maddeler, toprak ve bitkilerde daha yoğun olarak birikmektedir [13]. Doğada bulunan dioksin bileşikleri özellikle bitkiler yolu ile hayvanlar tarafından alınır ve hayvanların yağ dokularında birikerek kararlı durumda bulunurlar. İnsanlar, dioksin bileşiklerini hayvansal ve bitkisel gıdalar yoluyla alarak dioksin maruz kalırlar. Dioksin zehirlenmelerinin %90'ının besin zinciri yoluyla olduğu bildirilmektedir [14,15].

### **1.1.2. Dioksinin etki mekanizması**

Dioksinler hücrede bulunan reseptörlere bağlanarak genlerin yazılımında değişiklikler ve buna bağlı olarak dogmasal anomalilerde artma, immün sistemin baskılanması, çeşitli hormonların parçalanması gibi sonuçlar ile önemli ölçüde hücrenin fizyolojisini değiştirir [16].

Dioksinler, yağda çözünürlüklerinin fazla olması nedeniyle hücre zarını kolayca geçerek sitoplâzmaya ulaşabilirler. Sitoplâzmadaki özellikle Aril Hidrokarbon Reseptörü (AhR) basta olmak üzere birçok reseptöre kolayca bağlanabilme özelliğinden dolayı bu reseptöre “dioksin reseptörü” de denir [17, 18].

Faz I tepkimeleri monooksijenazlar veya sitokrom P450'ler olarak bilinen enzim sınıfının üyeleri tarafından katalizlenen tepkimeleridir. Faz I tepkimelerinde moleküle OH, COOH, NH<sub>2</sub> ve SH gibi polar gruplar eklenir. Faz I tepkimeleri özellikle karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumu içerisinde bulunan enzim sistemleri tarafından yürütülür. Bununla birlikte belli bir miktar enzimatik aktivite bağırsaklar, böbrek, akciğer, beyin ve deride de bulunabilir. Sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri lipofilik özellik taşıyan ksenobiyotikleri hidroksilasyon ile hidrofilik hale getirirler [19,20]. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve benzo [α] pren gibi bazı kimyasallar Faz I tepkimelerinde biyolojik olarak etkin bileşiklere çevrildikten sonra karsinogenik hale gelirler ve DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerle kovalent olarak bağlanabilirler. Bazı kimyasallar ise etkinleştirmeye uğramadan doğrudan hücresel makromoleküllerle kovalent olarak bağlanırlar ve kanser oluşumuna neden olurlar Faz II tepkimelerinde; Faz I tepkimelerinde hidroksillenmiş bileşikler özgül enzimlerle glukronik asit, sülfat, glutatyon ve bazı amino asitlerle konjuge edilerek veya

metillenme yoluyla çeşitli polar metabolitlere dönüştürülür. Faz II tepkimelerinde N-asetil transferaz, glutatyon S-transferaz, aldehit dehidrogenaz, sülfotransferaz, tiopürin metiltransferaz ve epoksit hidrolaz enzimleri görev alır [19].

Epoksitler, sitokrom P450 monooksijenaz sistemi de dahil olmak üzere hücre ve dokularda ksenobiyotiklerin metabolizması ve endojen olarak oksidatif metabolizma sırasında oluşan oksijenin organik konfigürasyonlarıdır. Epoksit ara ürünler kimyasal olarak reaktiftir ve sulu ortamlarda oldukça kararsızdır. Oluşan epoksit ara ürünlerden bazıları nükleik asit bileşenleri için genotoksiktir. Bu reaktif epoksitler nükleik asitlerin yapısında yer alan pürin bazlarının amino gruplarına ya da azot molekülüne bağlanırlar. Eğer zamanında elimine edilmezlerse genetik mutasyonda ve hücresel yapı bozukluklarının oluşumunda başlatıcı ajan olarak rol alırlar. Bu nedenle epoksit ara ürünlerin seviyelerinin düzenlenmesi organizma için yaşamsal önem taşımaktadır [21].

Dioksinlerin kanser yapıcı etkilerinin doğrudan DNA'da mutasyon yapmalarından çok lipid peroksidasyonuna neden olmaları ile meydana geldiği ve bu nedenle de anılan bileşiklerin, kanserin başlangıç periyodunda fazla etkili olmadığı; fakat gelişme periyodunda önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir [22]. Dioksin bileşiklerinin, P450 enzimlerinin sentezini arttırmalarının bir sonucu olarak; moleküler oksijen taşınması artar ve bu da epoksitlerin oluşmasına ve lipid peroksidasyona yol açar. Kemirgenlere TCDD uygulanması ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda oksidatif stres artışına bağlı olarak süper oksit oluşumu ile lipid peroksidasyonun arttığı ve DNA tek sarmalında kırılmaların olduğu belirlenmiştir [22,23].

### **1.1.3. Dioksinlerin toksikokinetikleri**

#### **1.1.3.1. Emilim ve dağılımı**

Dioksine maruz kalma yolları çevresel, mesleki ya da kaza sonucu olabilir. Maruz kalmaların büyük çoğunluğu hayvansal gıdaların ya da dioksin içeren ürünlerin tüketilmesi gibi ikincil yollarla olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre; et, balık, yumurta gibi hayvansal ürünler insanlar için asıl dioksin kaynaklarıdır [4].

Dioksin zehirlenmelerinde bulaşma %90 oranında ağız yoluyla olmakla birlikte; fabrika patlamaları, orman yangınları gibi durumlarda her üç yoldan da bulaşma olabilir. Dioksin bileşikleri yağda iyi çözündüklerinden ortamdaki yağ oranı ile emilim arasında pozitif yönde bir ilişki vardır. TCDD ağız yolu ile bitkisel yağda çözdürülerek verildiğinde %90 oranında emilirken diyetle karıştırıldığında bu oran %50-60'a kadar düşmektedir [24].

Dioksinler vücuda alındıktan sonra temel olarak kan, kaslar, karaciğer ve yağ dokuda dağılırlar. Ancak, bu bileşikler özellikle karaciğer ve yağ dokuda birikme [22] özelliği gösterirler. Yapılan bir çalışmada [25] deneysel olarak ratlara, damar içi yolla verilen TCDD'nin 24 saat içinde doku dağılımının tamamlandığı ve bu süre sonunda yağ dokuda birikimin en fazla olduğu tespit edilmiştir. Dioksinli bileşikler, karaciğerde AhR reseptörleri aracılığında aktive ettikleri hepatik bağlayıcı proteinlere bağlı olarak bulunur ve lineer olmayan doza bağımlı doku dağılımına sebep olurlar [26]. Karaciğer ve yağ dokuda bulunan depo edilmiş bu bileşiklerin yeniden dağılıma uğrayarak akciğer, dalak, timus ve vücudun diğer organlarına ulaştığı bildirilmektedir [25]. Dioksinli bileşiklerin vücutta dağılımları bileşiğe maruz kalma miktarı ve hayvan türüne göre farklılık gösterir. TCDD'nin yağ doku ve karaciğerde türlere göre farklı oranda dağıldığı belirtilmesine rağmen diğer bileşikler için bu durum bildirilmemiştir [27]. Dağılım sırasında serumdaki dioksin konsantrasyonu ile yağ doku ve diğer vücut kısımlarındaki konsantrasyon arasında ters bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir [28].

#### **1.1.3.2. Dioksinin metabolizması ve atılımı**

Dioksinli bileşikler karaciğer mikrozomlarında bulunan ve ilaçların metabolizmasında görevli sitokrom p-450 enzimleri tarafından polar maddelere oldukça yavaş metabolize edilirler [29]. Bu bileşiklerin metabolizmaları da emilim ve dağılımlarında olduğu gibi bileşik ve canlının türüne göre oldukça önemli farklılıklar gösterir. Metabolizma sırasında hidroksil metabolitler ile sülfür taşıyan metabolitler tespit edilmiş ve açığa çıkan metabolitlerin konjuge edilerek idrar veya safrayla atıldığı bildirilmiştir [30]. Yapılan bir çalışmada [31] TCDD veya metabolitleri ile proteinler veya nükleik asitler arasında kırılması oldukça güç olan ve yüksek enerji gerektiren kovalent bağla bağlanmanın hemen hemen hiç olmadığı tespit edilmiştir. Dioksinlerin temel atılımı dışkı yoluyla olup, idrarla atılan oran dışkıdakine göre oldukça düşüktür. Klorlanmanın artması ile dışkı ile atılım artarken süt ve yağ dokuda depolanma azalır [32].

Dioksinli bileşiklerin yarı ömürleri bileşik çeşidine ve canlı türüne göre farklılık gösterir. Örneğin; TCDD'nin yetişkin insanlardaki yarı ömrü, ortalama 2840 gün iken ratlarda 19 gün civarındadır. Ayrıca, obezite ve tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıklar, dioksinin yarılanma ömrünü arttırarak vücutta kalış sürelerini ve zehirliliklerini arttırmaktadır. Genel olarak bu bileşiklerin ratlardaki yarı ömrü 12-24, maymunlarda 365 gün ve insanlarda 5.8-9.8 yıl olduğu belirlenmiştir. [33]. İnsanlarda bazı dioksin

türevlerinin yarılanma ömürleri ise, 1,2,3,7,8-PeCDD için 12.6 yıl, 1,2,3,4,7,8-HxCDD için 26-45 yıl, 1,2,3,4,6,7,8- HpCDD için 80-102 yıldır [29].

#### **1.1.4. Dioksinlerin toksisitesi**

2,3,7,8-klor türevine sahip 17 adet dioksin/furan bileşiği bulunur ve bunlar biyokimyasal mekanizma yoluyla etki yaparlar. Toksisiteleri 2,3,7,8 tetraklorodibenzo-p-dioksin'e göre belirlenir ve her bir bileşiğe bir toksisite denklik faktörü (Toxicity Equivalence Factor, TEF) verilir. Bu sistem, karışık haldeki dioksin ve furanların toplam toksisitesinin 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksininkine göre tahmin edilmesini sağlar. Dioksin ve furanların toplam konsantrasyonlarını hesaplamak için, dioksin ve furanların her biri için bulunan kütle konsantrasyonları, Tablo 1.1'de verilen toksisite eşdeğerlik faktörleri ile çarpılır ve çarpımlar toplanarak, toplam konsantrasyon I-TEQ olarak bulunur [34].

Dünya sağlık örgütü (DSÖ), dioksinlerin tolere edilebilir günlük alım miktarının TEQ (toplam dioksin toksik eşdeğeri) değerini 1-4 pg / kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. Bu dozları aşmadan maruz kalmanın toksik etki yaratmadığı anlaşılmıştır [35].

Dioksinlerin toksik etkileri genel olarak bağışıklık sistemini baskılama, karsinojenik ve teratojenik etkiler olarak karşımıza çıkar. Ortaya koyduğu semptomlar genel olarak maruziyet süresine göre değişir. Akut zehirlenmeler genel olarak iki hafta ile iki ay arasında meydana gelen etkiler sonucu ortaya çıkmasına karşılık, subakut veya kronik olaylar daha uzun sürede ortaya çıkar. Akut olaylarda deri, göz ve solunum yollarında irkilteler, insanlarda huzursuzluk, duyu organlarında algılama yetersizliği, baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı gibi semptomlar ile karşılaşılırken kronik olaylarda bu semptomlara ilave olarak kanser, spina bifida gibi diğer dogmasal olumsuzluklar, otizm, karaciğer hastalıkları, endometritis, cinsel isteğin azalması, üreme problemleri, baskılanmış immun sistem ve diğer kan ve sinir bozuklukları gibi ciddi sağlık problemlerine sebep olduğu bildirilmektedir [36, 37, 38].

Dioksin maruziyeti sonucunda tüm doku ve organlarda kanser riski artmaktadır. Özellikle akciğer ve yumuşak doku sarkomlarında artışlar olduğu US-EPA ve DSÖ raporunda bildirilmektedir [39, 40].

Genel olarak endokrin hormonlarını etkilediği gibi insülinin salınımı ve hedef dokulardaki işlevinin değiştirmesinden dolayı diyabete yatkınlığa sebep olurlar [36].

Organizmada, özellikle Aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) enzim etkinliği başta olmak üzere mikrozomal enzim etkinliğinde artma, UDP glukuronil transferaz ve glutatyon-S-transferaz etkinliklerinde değişiklikler belirtilmektedir [41].

**Tablo 1.1.** Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından saptanan, PCB'ler, PCDD'ler ve PCDF'lerin toksik eşdeğer faktörleri (WHO-TEF, 1998) [34].

GRUPLAR	ÜYELER	TEF DEĞERLERİ
<b>PCDD</b>	2,3,7,8-TCDD	1
	1,2,3,7,8-PeCDD	1
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
	OCDD	0,0001
<b>PCDF</b>	2,3,7,8-TCDF	0,1
	1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
	2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
	OCDF	0,0001
<b>Non-orto PCB</b>	PCB 77	0,0001
	PCB 81	0,0001
	PCB 126	0,1
	PCB 169	0,01
<b>Mono-orto PCB</b>	PCB 105	0,0001
	PCB 114	0,0005
	PCB 118	0,0001
	PCB 123	0,0001
	PCB 156	0,0005
	PCB 157	0,0005
	PCB 167	0,00001
	PCB 189	0,0001

#### 1.1.4.1. TCDD'nin akut toksisitesi

Hayvanlarda yapılan akut zehirlilik denemelerinde; dioksinli bileşiklerle zehirlenmelere en duyarlı türün kobaylar olduğu, en dirençli türün ise hamsterlar olduğu bulunmuştur [40]. Ayrıca dioksin zehirlilik derecesinin cinsiyete bağlı olarak da değiştiği belirlenmiştir. Örneğin, minklerin dişilerinde öldürücü doz (ÖD) 0.26 µg/kg iken erkeklerde bu oran 4.2 µg/kg olarak saptanmıştır. Dioksinli bileşiklerin zehirliliklerinin, aynı türün ırkları arasında da farklılık gösterdiği ve Han/Wistar ırkı ratlarda (ÖD) > 7200 µg/kg iken Longs-Evans ırkı ratlarda ise 10 µg/kg olarak belirlenmiştir. Akut dioksin zehirlenmelerine bağlı ölümLer bir hafta ile elli gün arasında gerçekleşirken, vücut ağırlığının yarısından fazlasının kaybolması ölüm sebebi olarak görülmektedir [31].

#### 1.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

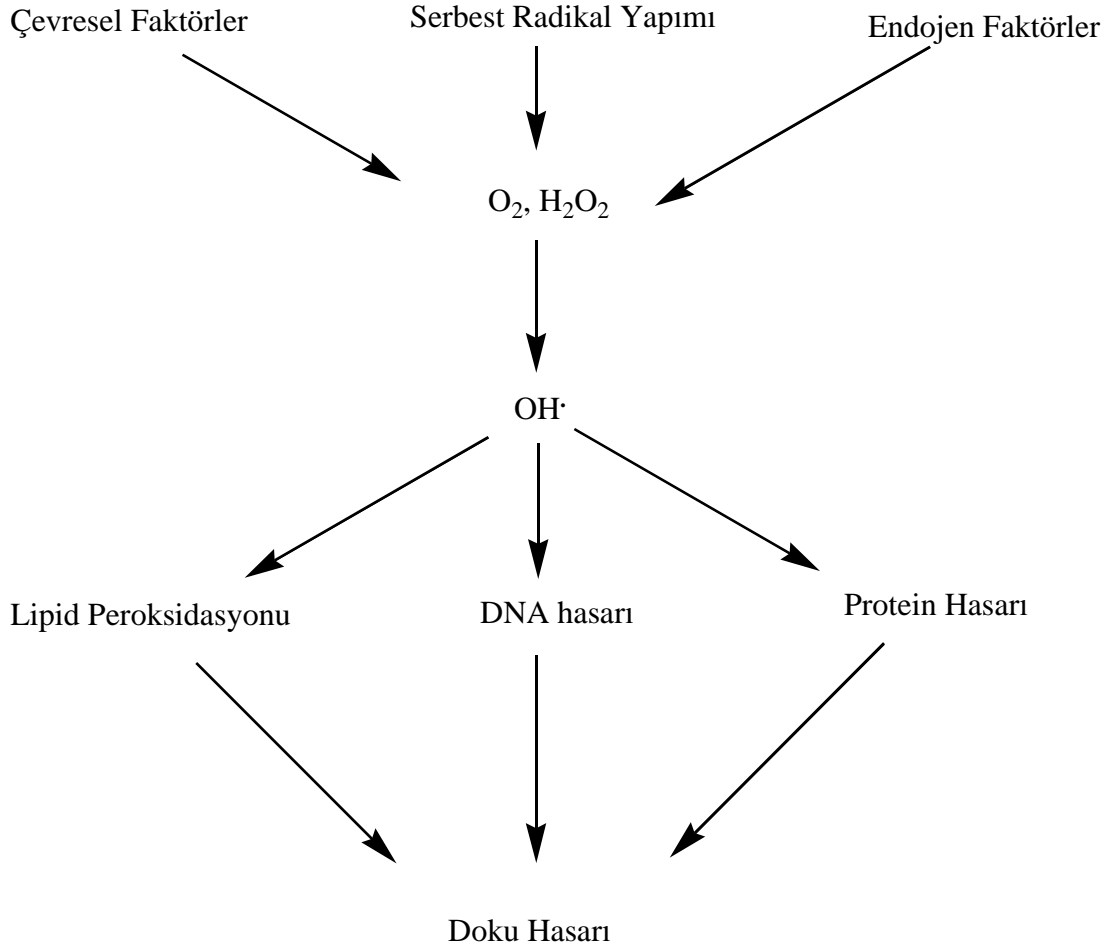
Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır [42].

Serbest radikaller her türlü biyokimyasal süreç için temel olan ve aerobik hayatın vazgeçilmez bir bölümünü temsil eden reaktiflerdir. Bu reaktifler bir veya daha fazla ortalanmamış elektrona sahip ve bu nedenle elektron donörleriyle tepkimeye girebilen maddeler olarak tanımlanır [43]. Serbest radikallerin oluşum kaynakları endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grupta incelenir [42].

**Tablo 1.2.** Serbest radikallerin oluşum kaynakları [42].

<b>Eksojen Kaynaklar</b>	<b>Endojen Kaynaklar</b>
Sigara dumanı	İnflamatuar hücreler
Radyasyon	Fibroblastlar
Karsinojenler	Endotel hücreler
Çevresel Kirleticiler	Solunum zinciri
Egzersiz	Ksantin ve NADPH Oksidaz
Ksenobiyotikler	





**Şekil 1.3.** Serbest radikal kaynakları ve doku hasarı [42].

Serbest radikaller hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) içeren oksijen, azot, karbon ve sülfür bazlı moleküllere ayrılabilir. Hidroksil radikali oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı ve karşılaştığı ilk biyomolekül ile reaksiyona girebilen bir radikaldir. Diğer serbest radikaller nitrik oksit ( $NO\cdot$ ) ve azot dioksit ( $NO_2\cdot$ ) içeren iki gaz fazındaki radikal, organik bileşiklerin karbon merkezli radikalleri ( $R\cdot$ ) olan alkoksil ( $RO\cdot$ ) ve lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ( $ROO\cdot$ ) radikalidir. Kükürt bazlı radikaller ise ( $RS\cdot$ ) ve ( $RS-SR\cdot$ ) hücrel fonksiyonlarda görev alırlar [44].

**Tablo 1.3.** Serbest reaktif türleri [44].

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal Olmayanlar</b>
Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil ( $HO^{\cdot}$ )	Singlet oksijen ( $^1O_2$ )
Peroksil ( $ROO^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoksil ( $RO^{\cdot}$ )	Hipokloröz asit ( $HOCl$ )
Nitrik Oksit ( $NO^{\cdot}$ )	Lipid hidroperoksit ( $LOOH$ )
Semikinon Radikali ( $HQ^{\cdot}$ )	Peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ )
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit ( $NO_2$ )
Organik radikaller ( $R^{\cdot}$ )	N-Halojenli aminler ( $R-NH-X$ )
Organik peroksit radikali ( $RCOO^{\cdot}$ )	Hipohalöz asit ( $HOX$ )

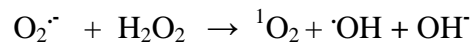
### 1.2.1. Başlıca reaktif oksijen radikalleri

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

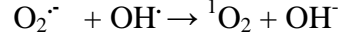
Zayıf reaktif bir serbest radikal olan süperoksit anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda kendiliğinden meydana gelir. Süperoksit radikali ksantin oksidaz ve bir grup flavoenzimler tarafından oluşturulmaktadır. Diğer süperoksit üreten enzimler lipooksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik hücrelerin NADPH bağımlı oksidaz enzim kompleksi fazla miktarda süperoksit radikali oluşturmaktadır. İki molekül süperoksit molekülü süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür [45].

Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

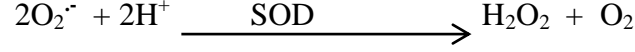
1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturabilir.
2.  $H_2O_2$  ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ( $^{\cdot}OH$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşturabilir.



Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



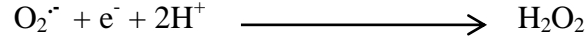
Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korumasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarının bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar.



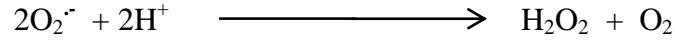
### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrojen peroksit iki yol ile oluşur.

1. Oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortaya çıkar.

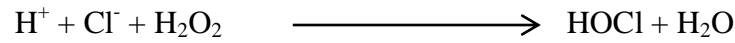


2. Biyolojik sistemlerde sıklıkla görülen süper oksidin dismutasyonunu ile oluşmaktadır ve böylece iki süperoksit anyon radikali birbiriyle, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde reaksiyona girerler.



Süperoksit radikallerinin temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu reaksiyon SOD tarafından veya kendiliğinden oluşabilir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. Nötrofil fagozomlarında bulunan miyeloperoksidaz enzimiyle çok reaktif serbest oksijen radikali olan HOCl oluşumuna sebep olur.

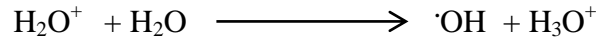
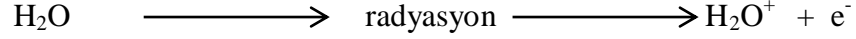


H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali (SOR) olan  $\cdot\text{OH}$  radikalinin oluşumunu sağlar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin diğer önemli bir görevi de intraselüler sinyal molekülü olarak rol almasıdır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılır [45].

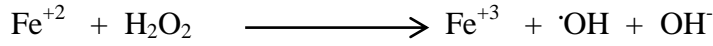
### **Hidroksil Radikali ( ·OH)**

(·OH) biyolojik sistemlere diğer serbest oksijen türlerinden daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir. 3 yolla oluşabilir.

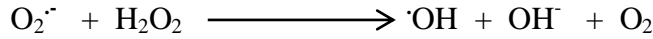
1. Radyasyon-Su ortamında;



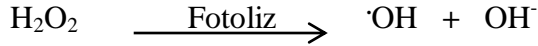
2. Fe – katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süper oksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesidir.



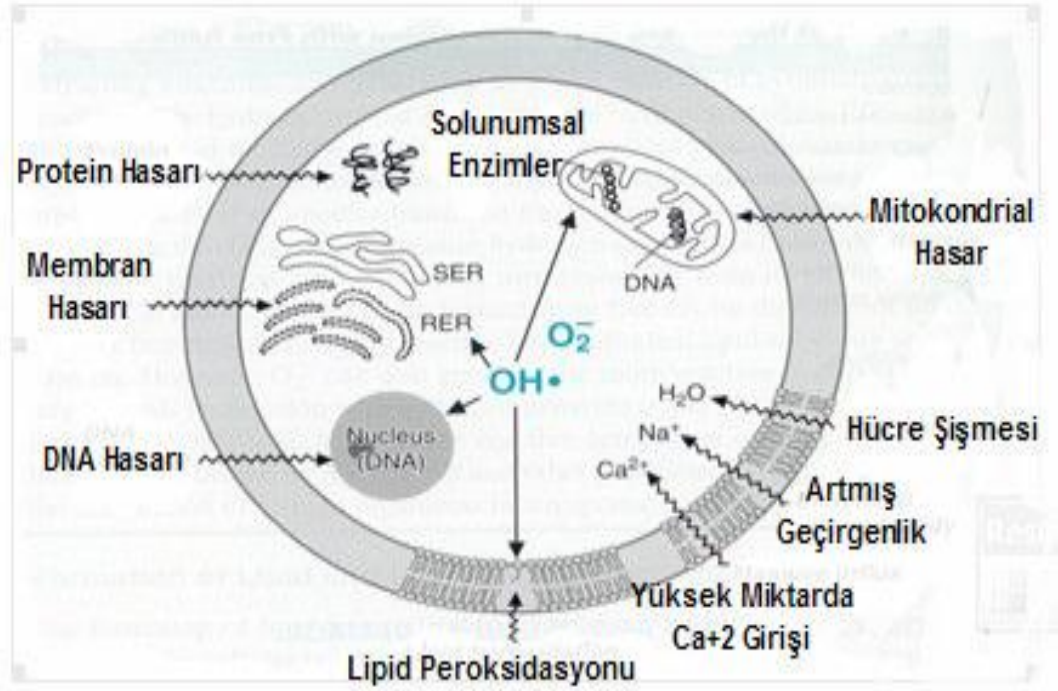
3. Hidrojen peroksidin fotolizi ile,



·OH radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir. Lipid peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve hemen her organik molekülü, ayırım yapmadan okside edebilir [46].

#### **1.2.2. Serbest radikallerin etkileri**

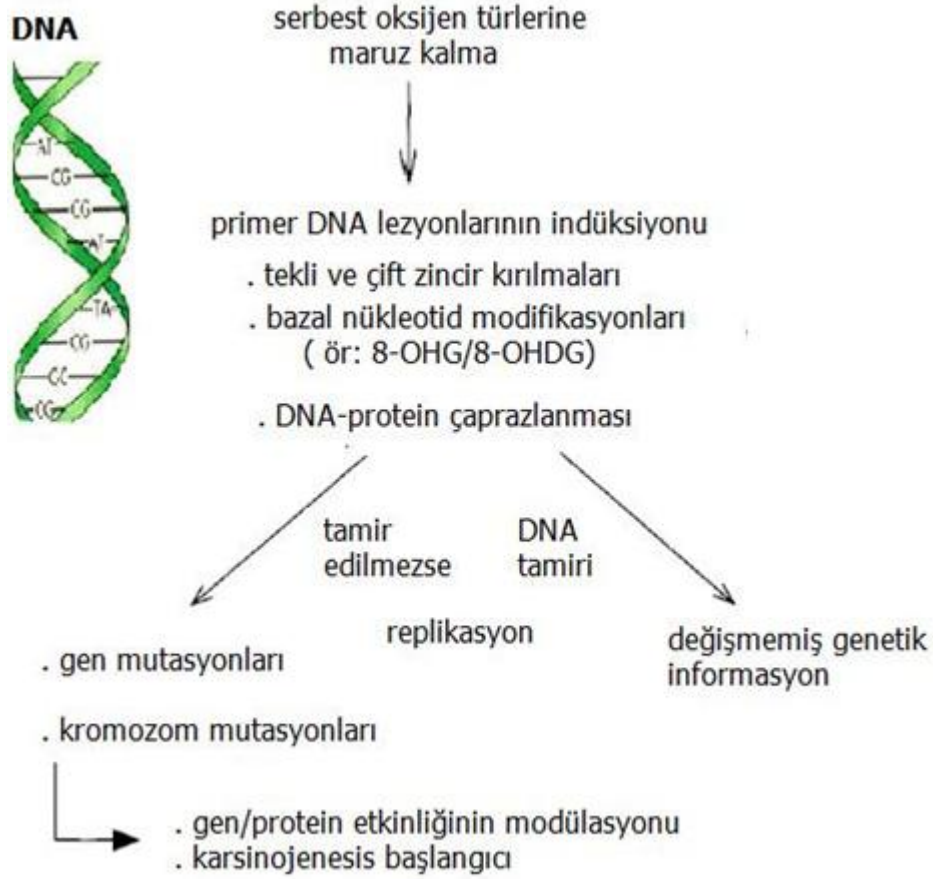
Hücrede ROT'nin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Serbest radikaller inaktive edilmemişse, onların kimyasal reaktiviteleri proteinleri, karbonhidratları, lipidleri ve nükleik asitleri içine alan bütün hücresel makromoleküllere zarar verebilir.



Şekil 1.4. Hücrede radikal aracılı hasar [47].

### 1.2.2.1. DNA ve nükleik asitlere etkileri

İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir [48].



Şekil.1.5. Serbest radikallerin DNA üzerindeki etkileri [49].

### 1.2.2.2. Proteinlere etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipidlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmungulobin G ve albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur [ 48].

### 1.2.2.3. Karbonhidratlara etkileri

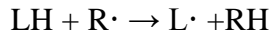
Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler [48].

Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbonhidratların parçalanmalarına da yol açabilirler [50].

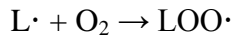
#### 1.2.2.4. Lipidlere etkileri

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipid ve proteinden oluşmaktadır, lipid peroksidasyonu lipidlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir [51]. Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür [50,52].

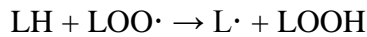
Zincir reaksiyonu şeklinde olan lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan radikal etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon başlangıç reaksiyonu olarak isimlendirilir. Hidrojen atomu uzaklaşması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali (L·) niteliği kazanır.



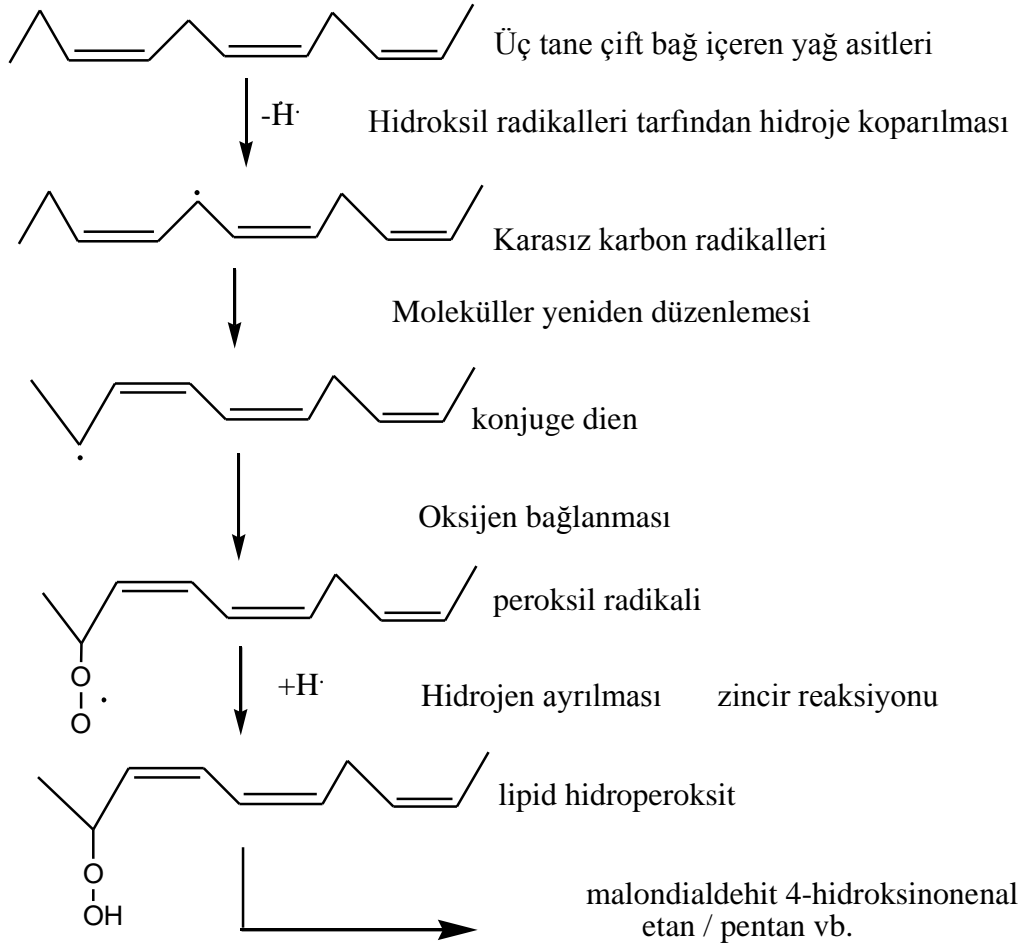
Oluşan lipid radikalının molekül içi çift bağlarının pozisyonunun değişmesiyle konjuge dienler oluşur. Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa bu yapı konjuge dien olarak isimlendirilir. Bu şekilde moleküler düzenleme sağlanmış olur. Lipid radikalının moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali (LOO·) oluşur.



Peroksil radikali diğer komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına neden olurken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşür. Böylece peroksidasyon başladıktan sonra kendi kendine yayılabilmekte ve çok sayıda yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine dönüşebilmektedir. Bu tepkime ilerleme reaksiyonu olarak isimlendirilir.



Oldukça kararlı olan lipid hidroperoksitleri lipid peroksidasyonunun ilk ürünüdür. Lipid peroksidasyonunun sürekli olarak devam ettiği durumlarda E vitamini gibi zincirleme tepkimeyi sonlandırıcı bir antioksidan ile lipid peroksidasyonu sonlanabilir [53].



Şekil 1.6. Lipid peroksidasyonu [45].

### 1.2.3. TCDD ve oksidatif stres

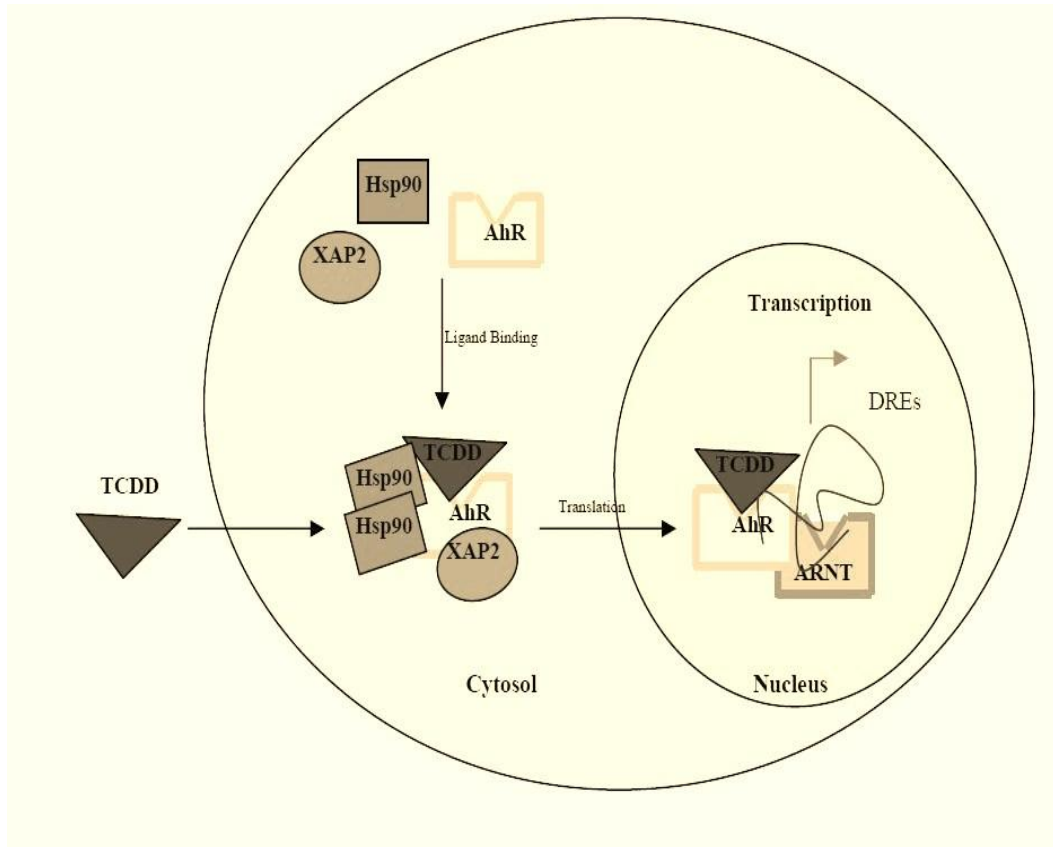
Çoklu halojenli aromatik hidrokarbonlar insan sağlığı için potansiyel bir risk teşkil eden kalıcı çevresel kirleticilerdir. Bu bileşikler içinde en toksik olarak bilineni 2,3,7,8-TCDD'dir. TCDD'ye maruz kalan deney hayvanlarında; dermal toksisite, immüntoksisite, hepatotoksisite, karsinogenesite, teratojenisite, davranışsal, endokrin ve çeşitli sayıda biyokimyasal değişiklikler gibi doku ve türe özel çeşitli hastalıklar tespit edilmiştir: [54.55]. Ayrıca TCDD'ye maruz kalmanın sonucunda bu hastalıklara ek olarak oksidatif stresin önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Oksidatif stres oksidan-antioksidan dengesindeki bozukluklar olarak tanımlanabilir. Yüksek dozda TCDD'ye akut maruz kalan bütün dokularda oksidatif stres olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. TCDD ile yapılan oksidatif strese maruz kalan deney hayvanlarında serbest oksijen türleri, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarının arttığı görülmüştür. TCDD'nin yaptığı oksidatif stres aril hidrokarbon



reseptörü (AhR) kaynaklıdır. Yakın tarihli bir çalışmada C57BL/6J dişi farelerde 8 hafta süresince üçer gün arayla 5 mg/kg TCDD uygulamasının oksidatif strese yol açtığı rapor edilmiştir. Ayrıca 0.45 ng TCDD/kg/gün uygulanan beyin dokularında oksidatif stresin varlığı tayin edilmiştir. Düşük dozlarda uygulanan TCDD'nin oksidatif strese yol açıp açmadığı noktasında ise belirsizlik bulunmaktadır [56].

TCDD aracılı serbest radikal üretimi ile ilgili bir mekanizma da sitokrom P450 ile ilgili öne sürülmüştür. CYP1A1 ve CYP1A2'nin TCDD aracılı oksidatif stresle ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Dioksin tarafından CYP 1A1, CYP 1A2 ve CYP 1B1'in induksiyonu, serbest radikallerin oluşumunu ve lipid peroksidasyonun artması ile sonuçlanmaktadır [57,58]. İleri sürülen bir diğer mekanizma da TCDD kaynaklı sitokrom p-450 enzimleri yoluyla östrojenin metabolik aktivasyonudur. Normal enzim fonksiyonu süresince serbest oksijen türleri (ROT) üretiminde sitokrom p-450'nin ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir ve östrojenin de TCDD'nin neden olduğu bu ROT'a katkıda bulunduğu belirtilmiştir [58].



Şekil 1.7. TCDD ve aril hidrokarbon reseptörü (AhR) mekanizması [58].

### 1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan

savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler [59].

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplandırılabilirler [60]:

**1. Yapılarına göre**

- a. Enzim karakterli antioksidanlar
- b. Enzim karakterli olmayan, küçük moleküller

**2. Kaynaklarına göre**

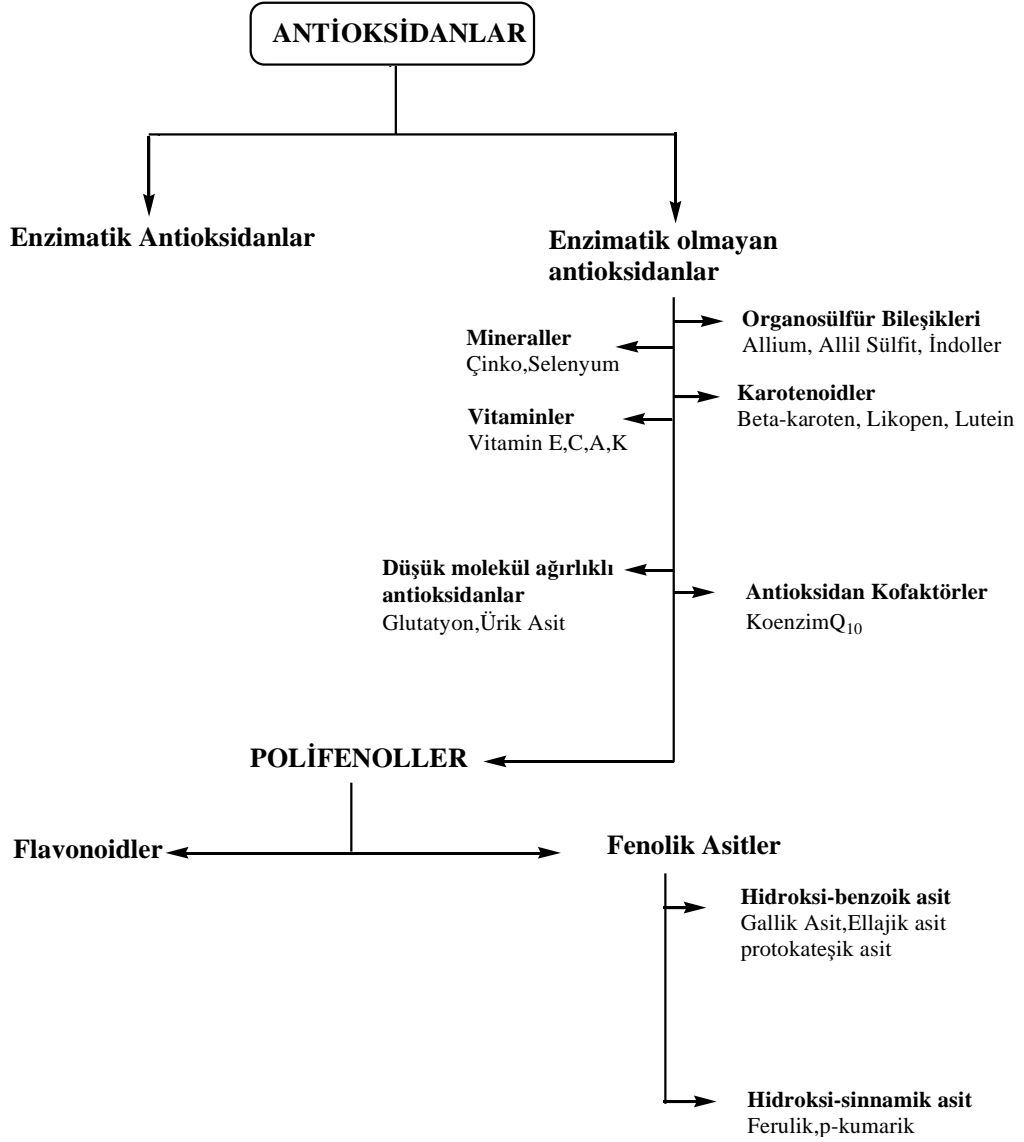
- a. Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
- b. Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

**3. Çözünürlüklerine göre**

- a. Suda çözünenler
- b. Lipidlerle çözünenler

**4. Yerleşimlerine göre**

- a. Hücre içinde bulunanlar
- b. Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar [45].

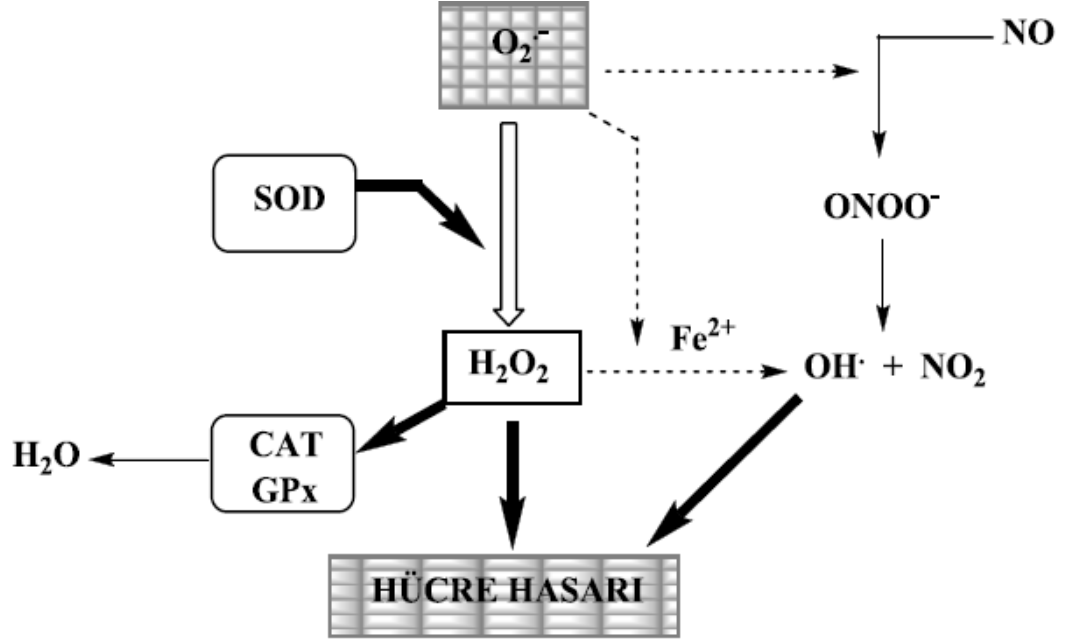


**Şekil 1.8.** Antioksidanların sınıflandırılması [61].

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1. Toplayıcı etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.
- 2. Bastırıcı etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir.
- 3. Onarıcı etki:** Lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederler.

**4. Zincir kırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir [62].

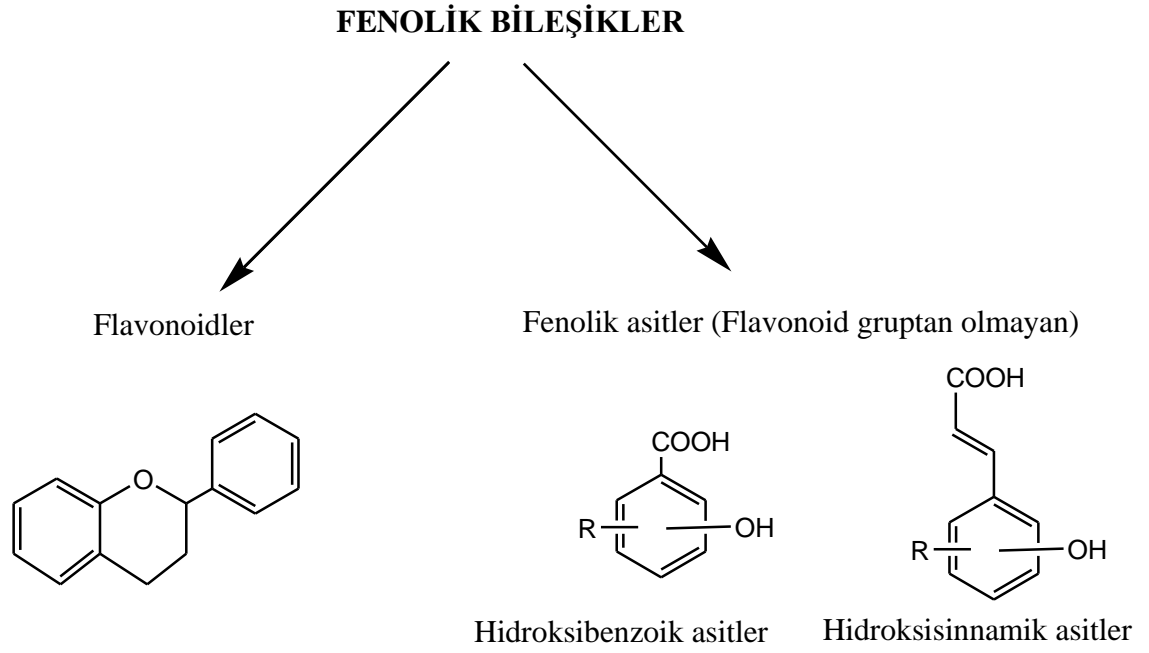


**Şekil 1.9.** ROT (Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu) ve antioksidan savunma sistemi [42].

### 1.3.1. Protokateşik asit (PCA)

Bir çok bitkinin dokusunda bulunan sekonder bileşikler olan fenolik bileşikler bitkinin büyüme, gelişme ve üremesi için gerekli değilse de antioksidan olmaları açısından çok önemli rol oynarlar [63]. Fenolik bileşikler oksidatif stres altındaki doku hasarını önleyerek ve/veya azaltarak kronik hastalıkların oluşmasını önlerler [64].

Fenolik bileşikler en az bir aromatik halkaya sahip bir ya da daha fazla hidroksil grubu bulunduran yapılardır. Bu bileşikleri temelde flavonoidler ve flavonoid olmayan gruplar olarak ikiye ayırabiliriz.



**Şekil 1.10.** Fenolik bileşikler [65].

Fenolik asitler benzen halkasına bağlanmış bir karboksil grubu bulunduran yapılardır. Fenolik asitler yapısal olarak iki gruba ayrılabilirler:

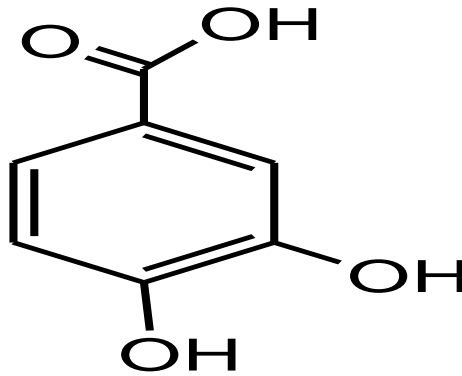
- i. benzoik asit türevleri (ör: hidroksibenzoik asitler, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)
- ii. sinamik asit türevleri (ör: hidroksisinnamik asitler, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) [65].

Fenolik bileşiklerin temel bir sınıfını teşkil eden fenolik asitler bitki aleminde geniş bir alana yayılır [70]. Baskın fenolik asitler hidroksibenzoik asitler (gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve sirinjik asit) ve hidroksisinnamik asitlerdir (ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, klorojenik asit ve sinapik asit). Doğal fenolik asitler ya serbest formLarda ya da konjuge formLarda, genellikle esterler veya amitler olarak görünür. Yapısal benzerlikleri nedeniyle kapsaisin, rosmarinik asit, gingerol, gossypol, hidroksitirosol ellajik asit, sinarin ve salvanolik asit B gibi bileşikler fenolik asit analogları olarak kabul edilmektedir [66,67].

Fenolik asitler ve türevleri geniş biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir ve bazıları kanserin önlenmesinde önemLi rol oynarlar. Fenolik asitlerin antioksidan kapasitesi ve radikal süpürücü özelliği fenolik aside bağlı olan hidroksil grubu ve moleküldeki metoksi süstitüentlerin sayısı ve dizilişlerine bağlıdır. Buna ek olarak fenolik asitler bazı enzimLeri uyararak, sinyal iletim yollarını düzenleyerek, hücre

döngüsünde rol alarak tümör hücrelerinin oluşumunu engellemektedir. Ayrıca bazı fenolik asitler ve bunların analogları anti bakteriyel, antifungal, antiviral, antimutajenik ve anti-inflamatuar özellikler gösterirler [68, 69, 70].

Protokateşik asit doğal kaynaklardan elde edilen bir basit fenolik bileşiktir. Diğer basit fenolik asitler gibi protokateşik asit de bir çok bitkide bulunduğu için insan beslenmesinde önemli yer tutar. Kahverengi pirinç, soğan, erik, bekaşi üzümü ve diğer üzümLer, fındık, badem, zeytin yağı, beyaz şarap, anason, melisa, biberiye, kekik , Japon Ginkgo zengin PCA kaynaklarıdır [71].



**Şekil 1.11.** Protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'in kimyasal yapısı [71].

#### **1.3.1.1. Protokateşik asidin antioksidan etkisi**

Protokateşik asidin kemopreventif özelliği antioksidan özelliklerinden kaynaklanır. Nükleik asitler, yapısal proteinler ve enzimler, membran lipidleri gibi makro moleküllere zarar veren reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) çevresel kimyasallara maruz kalma ile fizyolojik ve metabolik süreçlerin radyasyona maruz kalması sonucu açığa çıkarlar. Bu durum mutasyona ve hücredeki sinyal iletim yollarının bozulmasına ve dolayısıyla kanser gelişimine neden olabilir. Yapılan çalışmalar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin her türlü kanserin başlangıç ve ilerleme aşamalarında etkili olduğunu ortaya koymuştur [72].

SOR üretimi ve in vitro selüler sistemin kullanıldığı çalışmalar göstermiştir ki PCA, yüksek reaktivite gösteren hidroksil radikali de dâhil radikallerin süpürücülüğünde etkili olmuştur [73,74]. PCA geçiş metal iyonları olan Cu(II) ve Fe(II) ile kompleks oluşturarak veya ksantin oksidazın yaptığı gibi radikal oluşum yolundaki enzim kataliz reaksiyonlarının aktivitesini düşürerek serbest radikallerin inhibisyonunu

sağlar. Serbest radikallerin nötralizasyonu onların PCA' daki hidroksil gruplarıyla reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. İn vitro modellerde PCA'nın DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermiştir [74,75].

Protokateşik asidin antioksidan etkisi ayrıca oksidatif stres altındaki hücre kültürlerinde in vitro ortamda gözlenmiştir [76]. PCA, sıçan makrofaj benzeri hücreler olan J774A.1. inhibisyonu yoluyla oluşturulan düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önlemede tamamen başarılı olmuştur [77]. PCA indirgenmiş glutatyon içeriğinin konsantrasyonunu engeller ve glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerini geri kazandırır. PCA ayrıca glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve  $\gamma$ -glutamilsistein sentazın mRNA seviyelerinin kontrol seviyelerine gelmesine yardımcı olur [77].

0.02-0.1 mg/mL ve 50-100 mg/kg konsantrasyonlarındaki PCA tert-bütül hidroperoksit'e (t-BHP) maruz kalan sıçan karaciğerindeki ve sıçan hepatositlerin primer kültürlerindeki oksidatif stresin önlenmesinde başarılı olmuştur [78,79]. Bulgulara göre, PCA t-BHP nin sitotoksitesini azaltmış ve glutatyon (GSH) seviyesini yükseltmiştir. Ayrıca PCA, nükleik asitlerin indüklediği oksidatif hasarı ve DNA onarım süreçlerini, lipid peroksidasyonunu inhibe etmiş ve mitokondrial membran depolarizasyonunu önlemiştir. Buna ek olarak PCA, hepatositlerin proteinlerinin tirozin rezidülerinin fosforilasyonunda azalmaya neden olmuş ve hücredeki hücre dönüştürme mekanizmaları üzerinde bir etki oluşturmuştur [78].

Protokateşik asit, CD-1 farelerin derilerinde lokal olarak uygulanan bir başka indükleyici olan TPA tarafından oluşturulan oksidatif stresi etkilemiştir. 5-20mM dozlarındaki PCA, TPA uygulamanın neden olduğu inflamasyonu azaltmış, hidrojen peroksit üretimini inhibe etmiş ve derideki miyeloperoksidaz aktivitesini de azaltmıştır [70].

### **1.3.1.2. Protokateşik asidin karsinojen metabolizması üzerindeki etkisi**

PCA'nın kemopreventif etkisi ayrıca onun karsinojenlerin metabolizması üzerindeki etkisiyle ilgilidir. Süreç Faz I ve Faz II olmak üzere iki grup enzim içerir. Faz I biyotransformasyon enzimleri esas olarak sitokrom P450 ve kataliz hidroksilasyon reaksiyonlarından oluşur. Bu dönüşüm sırasında metabolik aktivasyonlar meydana gelebilir ve elde edilen bu metabolitler DNA ve katma bileşiklerle reaksiyona girebilirler. Bunun aksine detoksifiye edilmiş karsinojenler olan Faz II enzimleri glukuronik asit, sülfürük asit veya glutatyonun konjugasyonunu katalizlerler. Bu yükselişler bu bileşiklerin su içerisindeki çözünürlüğünü arttırarak boşaltımı

kolaylaştırır. Ayrıca bu raksiyonlar bazı karsinojenlerin aktivasyonuna da yol açabilir. Bu grup GST, üridin 5'-difosfat (UDP)-glukuronoziltransferaz içerir ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NAD(P)H): kinon (NQ01)'I azaltır [80]. Yapılan çalışmalar PCA'nın hem faz I hem de faz II üzerinde etkili olduğunu göstermiştir [76,81-83].

PCA, in vitro çalışmalarda fare hepatositlerinden mikrozomlarda sodyum fenobarbital veya 5,6-benzofenon tarafından indüklenen sitokrom P450 enzimleri olan özellikle CYP1A2 ve daha az oranda CYP1A1 ve CYP2B enzimlerinin katalitik aktivitelerini inhibe etmiştir [81]. İn vivo çalışmalarda da ratlarda faz I ve faz II enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisi 250 veya 500 mg/kg vücut ağırlığı dozlarındaki subkronik uygulamalarına göre çok daha güçlü olmuştur. PCA'ya maruz kalan ratların karaciğerlerindeki CYP1A2, CYP1A1 ve CYP2B ile böbrek homojenatlarından alınan mikrozomlardaki sadece CYP2B aktiviteleri azalmıştır. CYP1A1 tarafından metabolik süreçte değişebilen bir aromatik amin olan o-toluidin uygulamasından bir saat önce verilen PCA, karaciğerde CYP1A1 ve CYP1A2 enzim aktivitelerini ve böbrekte ise sadece CYP1A1 aktivitesini arttırmıştır. PCA ayrıca o-toluidin uygulamasından sonra azalmış olan GST aktivitesini de arttırmıştır [94]. PCA ayrıca 3-methylcholanthrene tarafından indüklenen sıçan böbreklerinde CYP2E1 izoenzim oluşturucu aktivitesini azaltmıştır. PCA uygulaması hayvan karaciğerlerindeki GST, UDP-glukuronoziltransferaz ve NQ01 enzim detoksifikasyon aktivitelerini azaltırken sitokrom P-450 aktivitesi üzerinde etkili olmamıştır.

Bu sonuçlar göstermektedir ki PCA sadece karsinojen metabolizmasındaki enzimlerin aktivitelerini etkilemekle kalmayıp aynı zamanda ara metabolitlerin aktivitelerini nötralize edip onların DNA'ya bağlanmasını da önlemektedir. PCA tarafından karsinojenlerin DNA'ya bağlanmasının engellenmesi muhtemelen DNA mutasyonunu ve tümör gelişimini önlemektedir [82].

Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada PCA'nın DNA replikasyon süreçleri üzerinde direkt bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Stagos ve ark.[84] DNA polinükleotid zincirlerinin kırılması ve birleşmesinde görevli topizomeraz I enziminin potansiyel inhibitörü olduğunu ortaya koymuşlardır.

Protokateşik asidin kanser önleyici özelliğini araştırmak amacıyla yapılan bazı çalışma verilerine göre ratların dil, mide, karaciğer, ince bağırsak ve mesanelerinde değişik kimyasallarca oluşturulmuş karsinojenlere karşı başlangıç ve gelişim safhalarında 500 ppm veya 1000 ppm dozlarında verilen protokateşik asidin ardından 500 ppm dozundaki PCA'nın bu dokulardaki karsinojenleri azaltmada yeterli olduğu



görülmüştür [85, 86]. Buna ek olarak, 2000 ppm PCA'nın dil kanserine neden olan etkenlere karşı koruyucu etkisi keşfedilmiştir [87]. Bundan dolayı 2000 ppm'den daha düşük dozlarda verilen PCA'nın dil kanserine neden olan etkenlerin tüm aşamalarında etkili olabileceği söylenmiştir.

#### **1.4. Çalışmanın Amacı**

Her geçen gün artan çevre kirliliği, bugünün ve geleceğin dünyasını ciddi şekilde tehdit etmekte, ekolojik tehlikelerle karşı karşıya bırakmaktadır. Dünya nüfusunun hızla artması, paralel olarak artan enerji ihtiyacı, endüstrinin gelişimi ve şehirleşmeyle ortaya çıkan hava kirliliği, insan sağlığı ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Kanseri de içeren kronik hastalıkların önlenmesi eski ama önemli konulardan bir tanesidir. Diyet faktörlerinin kanser gelişimini etkilediği bilinmektedir. Dışsal faktörlerin kullanımı ile endojen mekanizmaların tetiklenerek değişik çevresel faktörlere maruziyet sonucu oluşan kanser gelişim riskinin azaltılması kanserden korunmanın sağlanmasıyla mümkün olabilir. Bu dışsal faktörlerden bazıları besin maddeleri, ilaçlar, aşular ve takviye besinlerdir. Alternatif tıpta kullanılan yenilebilir bitkiler ve diğer bitkiler zengin kanser kemopreventif ajanlardır.

Çalışmamızda, deneysel dioksin zehirlenmelerinde model olarak kullanılan TCDD'nin ratlarda karaciğer ve böbrek dokularında neden olduğu oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi ve bu hasarın fenolik asit yapılı protokateşik asit ile engellenebilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle TCDD, protokateşik asit ve TCDD ile eşzamanlı protokateşik asit uygulanan ratların karaciğer ve böbrek dokularında SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzim aktiviteleri, GSH düzeyleri ve lipid peroksidasyonun göstergesi olarak da MDA düzeyleri belirlenerek oksidan-antioksidan sistemi ne yönde etkilediği araştırılmıştır.

Yapılan değerlendirmeler sonucu çalışmamız; çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu gösterilen protokateşik asidin TCDD toksisitesine karşı karaciğer ve böbrek dokularında tedavi amaçlı kullanılabilirliği konusunda bir fikir verecektir.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Amonyum sülfat	Merck A596217
Bakır-2-klorür	Fluka 61174
Bakır sülfat penta hidrat	Sigma 12849
Disodyum hidrojen fosfat-2-hidrat	Carlo Erba 480137
5,5"-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit	AppliChem 69-78-3
Etanol	Carlo Erba 64-17-5
EDTA	Sigma E5134
Folin&ciocalteus-phenol Reaktifi	Sigma F9252
Glutasyon redüktaz	Sigma-Aldrich 64251
Hidrojen peroksit (%35)	Merck 1.08600
Hidroklorik asit (%37)	Merck 1.00314
İndirgenmiş glutasyon	Sigma-Aldrich G4251
Ksantin oksidaz	Sigma X4376
Kloroform	Merck 2431
Nitroblu tetrazolyum klorür	Sigma 014K5310
NADPH	Applichem 8N00698
Protokateşik asit	Sigma 08992
Sığır serum albumini	Acros Organics 268130100
Sodyum azid	Sigma-Aldrich 58032
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich 8295A
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich 13418
Sodyum potasyum tartarat	Fluka 60412
Sodyum sitrat	Sigma S1804
2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin	Accu standtard D404N
Trikloroasetik asit	Sigma-Aldrich 27242
Tiyobarbitürik asit	Merck L55063680 731
Tris	Merck TD641819

### 2.1.2. Kullanılan cihazlar

Hassas terazi	Ohaus corp. Pine brook, NJ-USA
Homojenizatör	Bunsen-Overhead Stirren AGV-10
Sonifikatör	Vibra cell
Manyetik karıştırıcı-ısıtıcı	Wisestir MSH-20D
pH metre	Cyberscan-1000
Soğutmalı santrifüj (Ependorf)	Hettich Zentrifugen Mikro-22R
Soğutmalı santrifüj (Vidalı Tüp)	Hettich Zentrifugen EBA-21
-80°C soğutucu	Nuare
Spektrofotometre	T80 UV/VIS
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvarz)	
Su banyosu	Memmert
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176

### 2.1.3. Deney hayvanları

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen 3-4 aylık, 280-310 g. ağırlığında 28 adet Wistar-albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar standart şartlarda (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) 7'şerli 4 eşit gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Ratlara taze su ve yem *ad libitum* olarak verildi.

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alınarak (2011/A-15); çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

#### 2.1.3.1. Deney grupları

Her grupta 7 hayvan olacak şekilde ratlar 4 gruba ayrıldı;

**Kontrol Grubu;** 45 gün süreyle hayvanlara günlük olarak 0,5 mL mısır yağı gavajla uygulandı.

**TCDD Grubu;** 45 gün süreyle hayvanlara günlük olarak mısır yağı içerisinde TCDD 2 µg/kg/hafta dozunda gavajla uygulandı.

**Protokateşik asit (PCA) Grubu;** 45 gün süreyle hayvanlara günlük olarak mısır yağı içerisinde Protokateşik asit 100 mg/kg dozunda gavajla uygulandı

**Protokateşik asit + TCDD Grubu;** 45 gün süreyle hayvanlara günlük olarak mısır yağı içerisinde Protokateşik asit 100 mg/kg/gün ve TCDD 2 µg/kg/hafta dozunda gavajla uygulandı.

#### 2.1.4. Örneklerin alınması ve hazırlanması

45 gün sonunda ratlar sakrifiye edilerek doku örnekleri (karaciğer ve böbrek) alındı ve SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri, protein, GSH ve MDA düzeylerinin ölçümleri yapılmaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

##### 2.1.4.1. Homojenatların hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular yaklaşık 1g olacak şekilde tartılarak cam tüplere konuldu. Üzerine 1/10 (g/h) oranında dilüsyon olacak şekilde Tris-HCl tamponu (pH=7,4) ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlarda doku MDA tayini yapıldı. Geri kalan homojenatlar +4°C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda GSH-Px, GSH ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü. Geri kalan süpernatant kısmına

kloroform/etanol (3/5, h/h) karışımından oluşan ayıraç 1/1 (h/h) oranında ilave edildi. Daha sonra +4°C'de 45 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kloroform/etanol fazında SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümleri yapıldı.

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Protein miktarının tayini

Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarları Lowry [88] metoduna göre tayin edildi.

**Prensip:** Alkali bakır ayırıcındaki  $Cu^{+2}$  peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 700 nm'de okunur.

#### **Kullanılan çözeltiler:**

Çözelti A: [% 2  $Na_2CO_3$  (0,1 N NaOH içinde)]

Çözelti B1: (% 1  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )

Çözelti B2: (% 2 Na-K-tartarat)

Çözelti C: 50 hacim çözelti A, 1 hacim 1/1 oranındaki çözelti B1 ve B2 karışımı ile karıştırıldı.

Folin-ciocalteu çözeltisi: Kullanılmadan önce 1/1.5 oranında distile saf su ile seyreltildi.

**Hesaplama:** 700 nm'de okunan örnek absorbanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$y = 0,0857x + 0,0719 \quad (R^2=0,9894)$$

### 2.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Dokulardaki SOD enzim aktiviteleri Sun [89] metoduna göre tayin edildi.

**Prensip:** Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorban verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavi-mor renk

oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur.



**Kullanılan çözeltiler:**

Ksantin çözeltisi (0,3 mM)

EDTA (0,6 mM)

NBT (150 µg/l)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (400 mM)

BSA (1 g/l)

Reaktif çözeltisi: 2/1/1 oranında ksantin çözeltisi, EDTA çözeltisi ile NBT çözeltisi ve 2/1 oranında Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ile BSA çözeltisi alındı ve karıştırıldı.

Ksantin oksidaz: 48 µl alındı, 3 mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de çözüldü.

2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,8 mM)

**Hesaplama:** 560 nm’de okunan örnek absorbansları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = [\text{Absorbans Kör (K)} - \text{AbsorbansÖrnek (Ö)}] / K \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

**2.2.3. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü**

Katalaz, katalitik aktivitesiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’yi dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir. Dokulardaki CAT enzim aktiviteleri Aebi [90] metoduna göre tayin edildi.

**Prensip:** Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin CAT enzimi tarafından parçalanması, ultraviyole spektrumda bir absorbans azalması olarak takip edilir. Absorbansta görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.



**Kullanılan çözeltiler:**

Fosfat tamponu (50 mM)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM)

**Hesaplama:** 240 nm’de okunan örnek absorbanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$k/\text{sec}=k \times \text{sec}-1 = \frac{2.31 \log \text{OD}1/\text{OD}2}{30 \text{sn}}$$

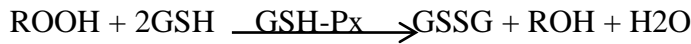
$$k/\text{mg protein} = \frac{k \times \text{sec}-1}{\text{mg protein}}$$

Dokular için sonuçlar k/mg protein olarak hesaplandı.

**2.2.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite ölçümü**

GSH-Px, Redükte glutasyonu kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. GSH-Px aktivitesi Paglia de Valentine [91] metoduna göre yapıldı.

**Prensip:** GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşmesini katalize eder. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin bulunduğu ortamda GSH-Px’in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH’a dönüştürülür. GSH-Px aktivitesi, deney ortamındaki NADPH’in NADP<sup>+</sup>’ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorban farkının 340 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır.

**Kullanılan çözeltiler:**

EDTA’lı Fosfat Tamponu (pH=7)

Redükte Glutasyon (GSH)

NADPH: 0,01M NADPH alındı, EDTA’lı Fosfat tamponunda çözüldü.

Sodyum Azid (NaN<sub>3</sub>): 0.01M sodyum azid alındı, EDTA’lı Fosfat tamponunda çözüldü.

GSH Redüktaz: 2/3 oranında, 3,2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözüldü.

Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 3/1000 oranında EDTA'lı Fosfat tamponunda çözüldü.

Amonyum Sülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 3.2M alındı, distile su ile çözüldü.

**Hesaplama:** 340 nm'de okunan örnek absorbanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$U/L(\text{mikromol}/\text{min}/L = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times t}$$

E: NADP'nin ekstinksiyon sabiti ( $6.22 \times 10^3$ )

V<sub>t</sub>: Total reaksiyon hacmi (mL)

V<sub>s</sub>: Total hacim içindeki numune hacmi (mL)

t: Küvet çapı (1 cm)

ΔA/t: Dakikadaki absorban değişimi

10<sup>6</sup> : Molü mikromole çevirim faktörü

$$U/L = \frac{\Delta A/t \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \frac{\Delta A/5 \text{ dk} \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

Elde edilen Ünite değeri proteine bölünerek spesifik aktivitesi elde edildi.

$$U/\text{mg protein} = \frac{U/L}{\text{protein}(\text{mg}/\text{dl})}$$

### 2.2.5. Redükte glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümü

Doku GSH düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Sedlak and Lindsay [92] metoduna göre yapıldı.

**Prensip:** Dokuların bütün protein olmayan sülfidril grupları GSH şeklinde bulunur. 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturur. Bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH aktivitesi saptanır.

#### **Kullanılan çözeltiler:**

Triklorasetik Asit (TCA): % 10'luk TCA kullanıldı.

5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB)

Tris-EDTA Tamponu (pH= 8.9)



**Hesaplama:** 412 nm’de okunan örnek absorbanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$E1 = \frac{D1}{D2}$$

D1 = 1 cm’lik küvette, dar bir aralığı olan spektrofotometredeki okuma değeri.

D2 = Aynı örneğin kalibrasyonu önceden yapılmış bir sistemdeki okuma değeri.

*Glutasyon derişimi:*

$$C(\mu\text{mol}/\text{mg protein}) = \frac{(\text{OD2}-\text{OD1}) \times E1 \times 10}{\text{protein}(\text{mg}/\text{dl})}$$

### 2.2.6. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Yagi [93] metoduna göre yapıldı.

**Premsip:** Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH 3.5’te, doku homojenatının kaynar su banyosunda 60 dakika inkubasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA’nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

#### **Kullanılan çözeltiler:**

Triklorasetik Asit (TCA): % 10’luk TCA kullanıldı.

Tribarbitirik Asit (TBA): % 0,675’lik TBA kullanıldı.

**Hesaplama:** 532 nm’de okunan örnek absorbanları (OD), standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA}(\text{nmol}/\text{g doku}) = \frac{\text{örnek O.D} \times \text{Std.konsantrasyonu}}{\text{Std.O.D}}$$

### 2.2.7. İstatistiksel analizler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 10.0 programı ile One-Way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Parametreler arasındaki korelasyonun saptanmasında Pearson’s korelasyon analizinden yararlanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi ve  $p < 0.001$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

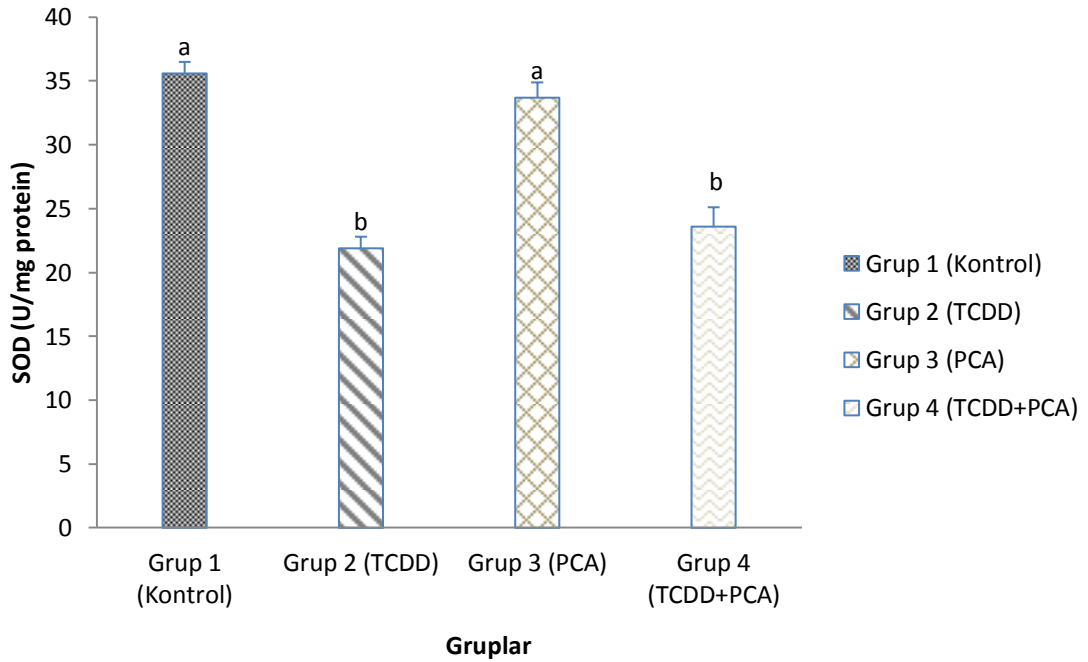
#### 3.1. Biyokimyasal Parametreler

##### 3.1.1. Dokulardaki SOD aktiviteleri

###### 3.1.1.1. Karaciğer dokusu SOD aktivitesi

Karaciğer dokusu SOD aktivitesi TCDD verilen grupta ( $21.9 \pm 0.89$  IU/mg protein); kontrol grubu ( $35.6 \pm 0.90$  IU/mg protein) ve PCA grubuna ( $33.7 \pm 1.21$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu. Sadece PCA verilen grup ( $33.7 \pm 1.21$  IU/mg protein) ile kontrol grubu ( $35.6 \pm 0.90$  IU/mg protein) arasında sayısal bir fark olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi. TCDD ile PCA'nın birlikte verildiği grup ( $23.6 \pm 1.50$  IU/mg protein) ile sadece TCDD'nin verildiği grup ( $21.9 \pm 0.89$  IU/mg protein) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $P \geq 0.001$ ).

Gruplara ait SOD aktiviteleri şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Karaciğer dokusu SOD aktiviteleri

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

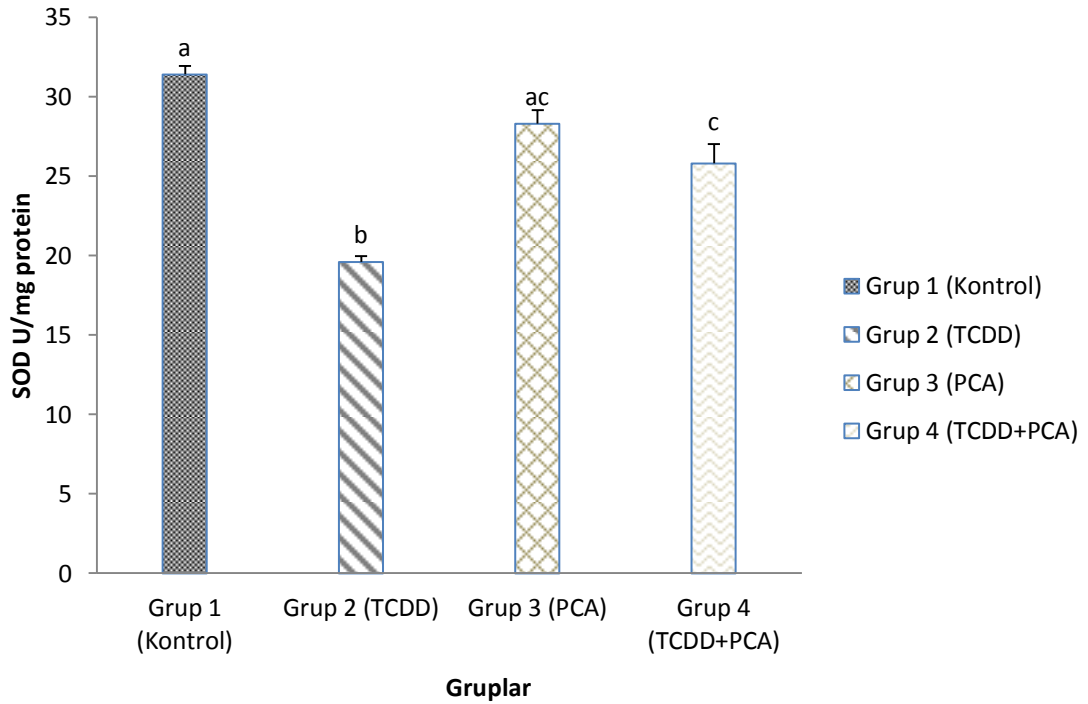
$P \leq 0.001$  Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında

$P \geq 0.001$  Grup 3 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında

### 3.1.1.2. Böbrek dokusu SOD aktivitesi

Böbrek dokusu SOD aktivitesi TCDD grubunda ( $19.6 \pm 1.65$  IU/mg protein); kontrol grubu ve ( $31.4 \pm 1.31$  IU/mg protein) PCA grubu ( $28.3 \pm 1.50$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulunurken; PCA grubu ( $28.3 \pm 1.50$  IU/mg protein) ve kontrol grubu ( $31.4 \pm 1.31$  IU/mg protein) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi. SOD aktivitesi PCA+TCDD grubunda ( $25.8 \pm 1.93$  IU/mg protein); kontrol grubuna ( $31.4 \pm 1.31$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu.

Gruplara ait SOD aktiviteleri şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Böbrek dokusu SOD aktiviteleri

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$  Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

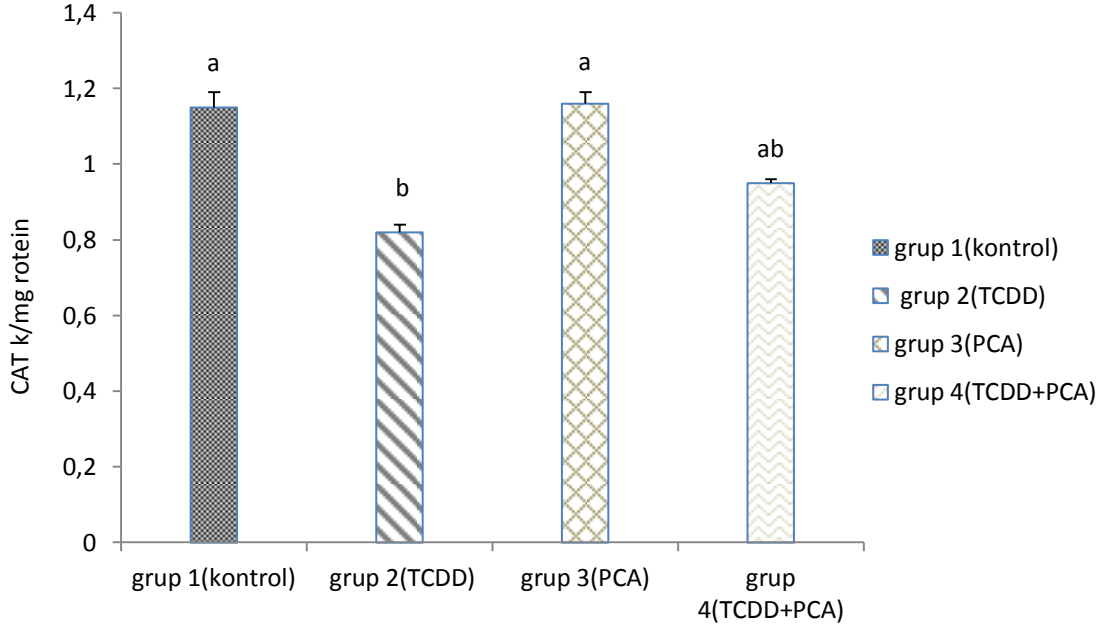
$P \geq 0.001$  Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

### 3.1.2. Dokulardaki CAT aktivitelele

#### 3.1.2.1. Karaciğer dokusu CAT aktivitele

Karaciğer dokusu CAT aktivitele TCDD grubunda ( $0.82 \pm 0.02$  k/mg protein); kontrol grubu ve ( $1.15 \pm 0.04$  k/mg protein) PCA grubuna ( $1.16 \pm 0.03$  k/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulunurken, PCA grubu ( $1.16 \pm 0.03$  k/mg protein) ve kontrol grubu ( $1.15 \pm 0.04$  k/mg protein) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi. CAT aktivitele PCA ve TCDD'nin birlikte verildiği grup ( $0.95 \pm 0.01$  k/mg protein) ile TCDD grubu ( $0.82 \pm 0.02$  k/mg protein) arasında da istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi.

Gruplara ait CAT aktivitelele şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Karaciğer dokusu CAT aktivitelele.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

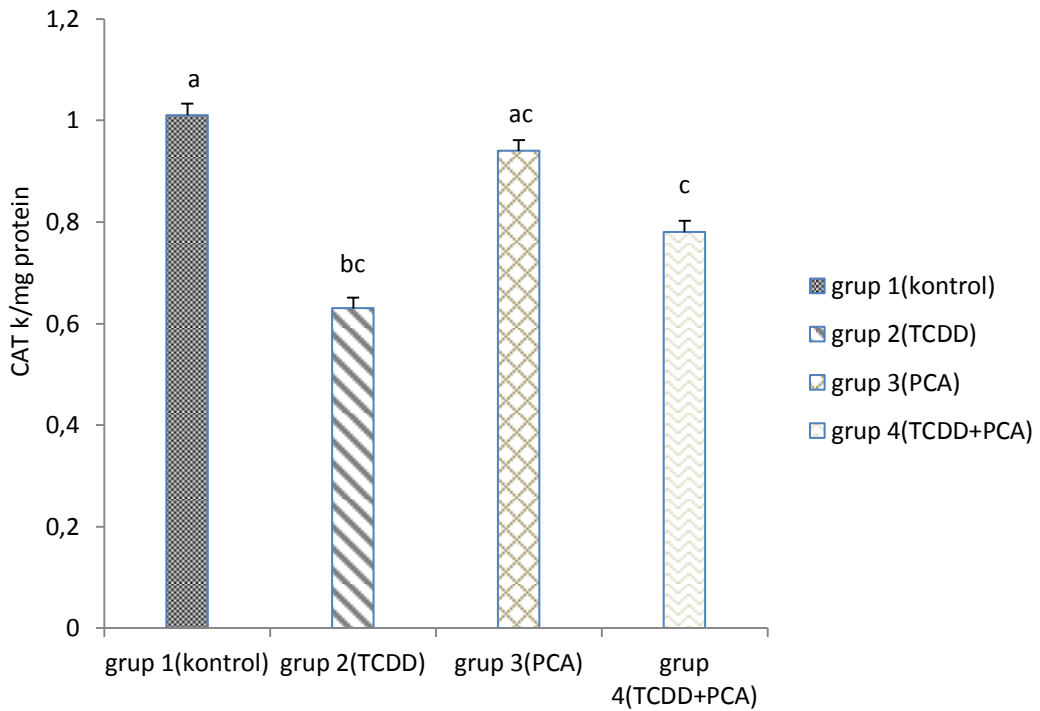
$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

### 3.1.2.2. Böbrek dokusu CAT aktivitesi

Böbrek dokusu CAT aktivitesi TCDD verilen grup ( $0.63 \pm 0.021$  k/mg protein); kontrol grubu ve ( $1.01 \pm 0.023$  k/mg protein) PCA grubuna ( $0.94 \pm 0.021$  k/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu. CAT aktivitesi PCA grubu ( $0.94 \pm 0.021$  k/mg protein) ile kontrol grubu ( $1.01 \pm 0.023$  k/mg protein) ve PCA+TCDD grubu ( $0.78 \pm 0.022$  k/mg protein) ile TCDD grubu ( $0.63 \pm 0.021$  k/mg protein) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi.

Gruplara ait CAT aktiviteleri şekil 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Böbrek dokusu CAT aktiviteleri.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

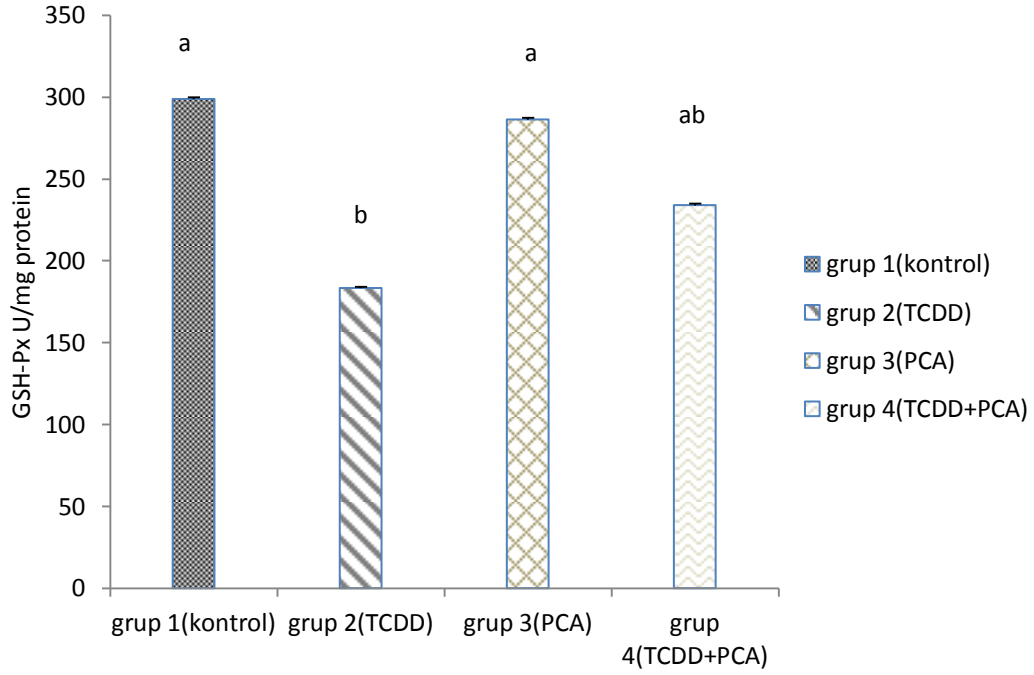
$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

### 3.1.3. Dokulardaki GSH-Px aktiviteleri

#### 3.1.3.1. Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitesi

Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitesi TCDD verdiğimiz grupta ( $183.3 \pm 12.1$  IU/mg protein); kontrol grubu ve ( $298.7 \pm 8.16^a$  IU/mg protein) PCA grubuna ( $286.2 \pm 9.5^a$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ( $P \leq 0.001$ ). GSH-Px aktivitesi PCA grubu ( $286.2 \pm 9.5^a$  IU/mg protein) ile kontrol grubu ( $298.7 \pm 8.16^a$  IU/mg protein) ve PCA+TCDD grubu ( $233.9 \pm 7.3^{ab}$  IU/mg protein) ile TCDD grubu ( $183.3 \pm 12.1^b$  IU/mg protein) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark olmadığı tespit edildi.

Gruplara ait GSH-Px aktiviteleri şekil 3.5.'de verilmiştir



**Şekil 3.5.** Karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri.

a ve b harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

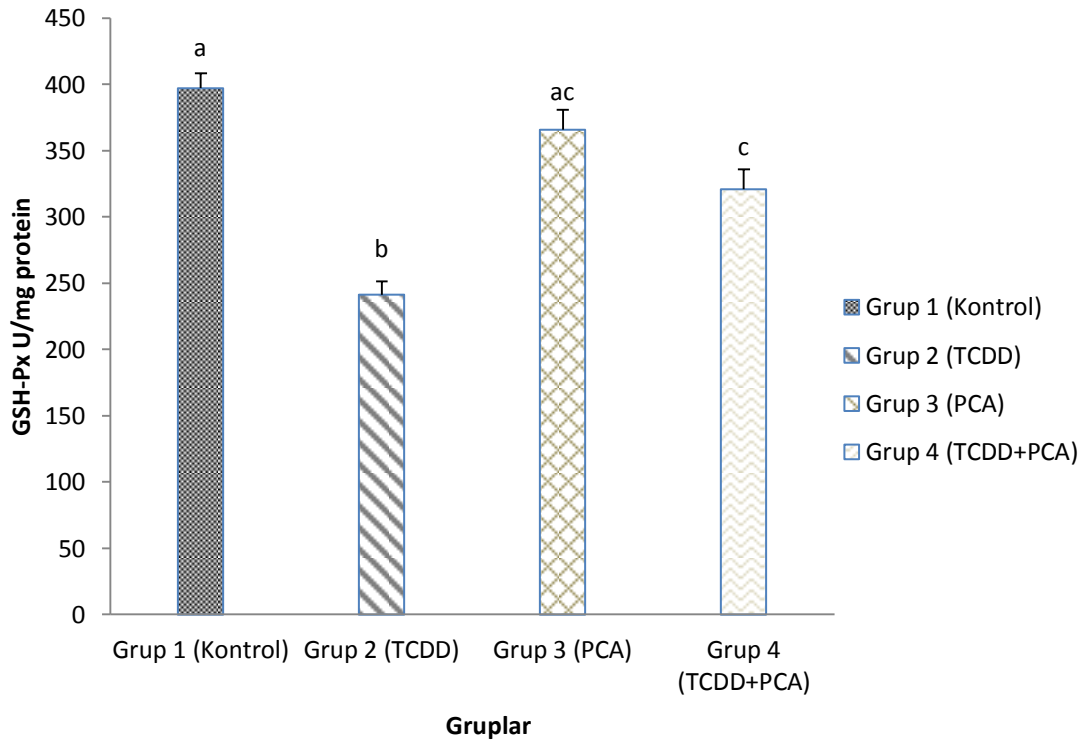
$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında

$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

### 3.1.3.2. Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi.

Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi TCDD grubunda ( $241.4 \pm 9.8$  IU/mg protein); kontrol grubu ve ( $397.1 \pm 11.2$  IU/mg protein) PCA grubuna ( $365.8 \pm 14.9$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulunurken GSH-Px aktivitesi PCA grubu ( $365.8 \pm 14.9$  IU/mg protein) ile kontrol grubu ( $397.1 \pm 11.2$  IU/mg protein) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir fark gözlenmedi. GSH-Px aktivitesi PCA+TCDD grubunda ( $320.9 \pm 15.2$  IU/mg protein); TCDD grubuna ( $241.4 \pm 9.8$  IU/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ( $P \leq 0.001$ ).

Gruplara ait GSH-Px aktiviteleri şekil 3.6.'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Böbrek dokusu GSH-Px aktiviteleri.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

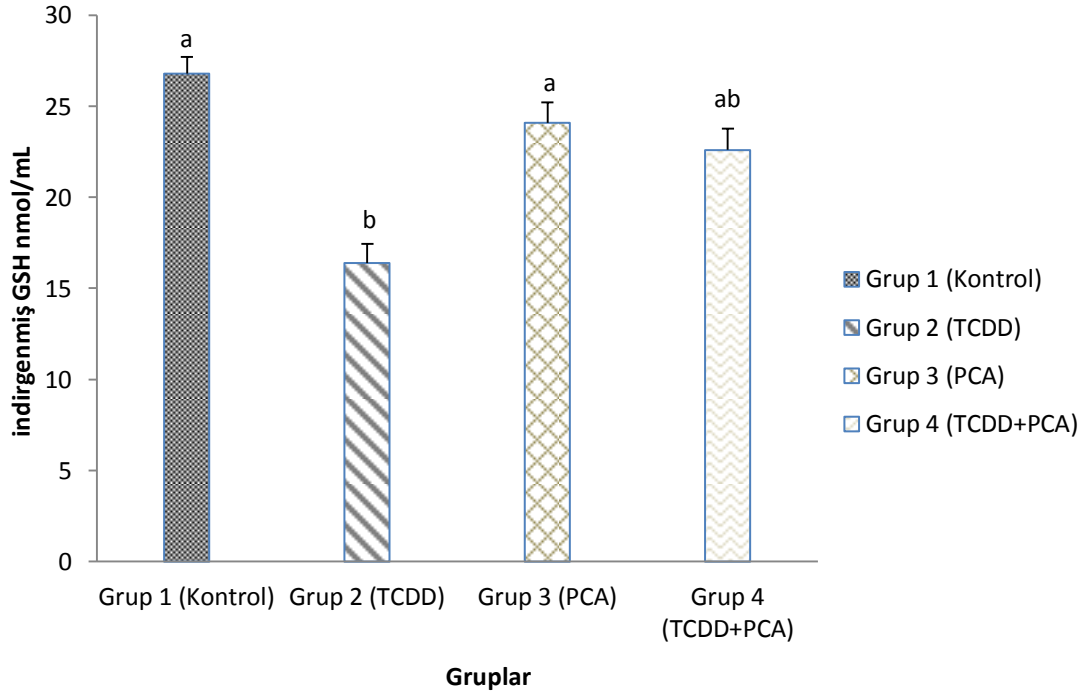
$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

### 3.1.4. Dokulardaki GSH düzeyleri

#### 3.1.4.1. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri

Karaciğer dokusu GSH düzeyleri TCDD grubunda ( $16.4 \pm 1.04$  nmol/mL); kontrol grubu ve ( $26.8 \pm 0.89^a$  nmol/mL) PCA grubuna ( $24.1 \pm 1.11$  nmol/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu. GSH düzeyleri PCA grubu ( $24.1 \pm 1.11$  nmol/mL) ve kontrol grubu ( $26.8 \pm 0.89^a$  nmol/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir değişme görülmezken, GSH düzeyleri PCA+TCDD grubu ( $22.6 \pm 1.18$  nmol/mL) TCDD verdiğimiz gruba ( $16.4 \pm 1.04$  nmol/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde yüksek olduğu tespit edildi.

Gruplara ait GSH düzeyleri şekil 3.7.'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri.

a ve b harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

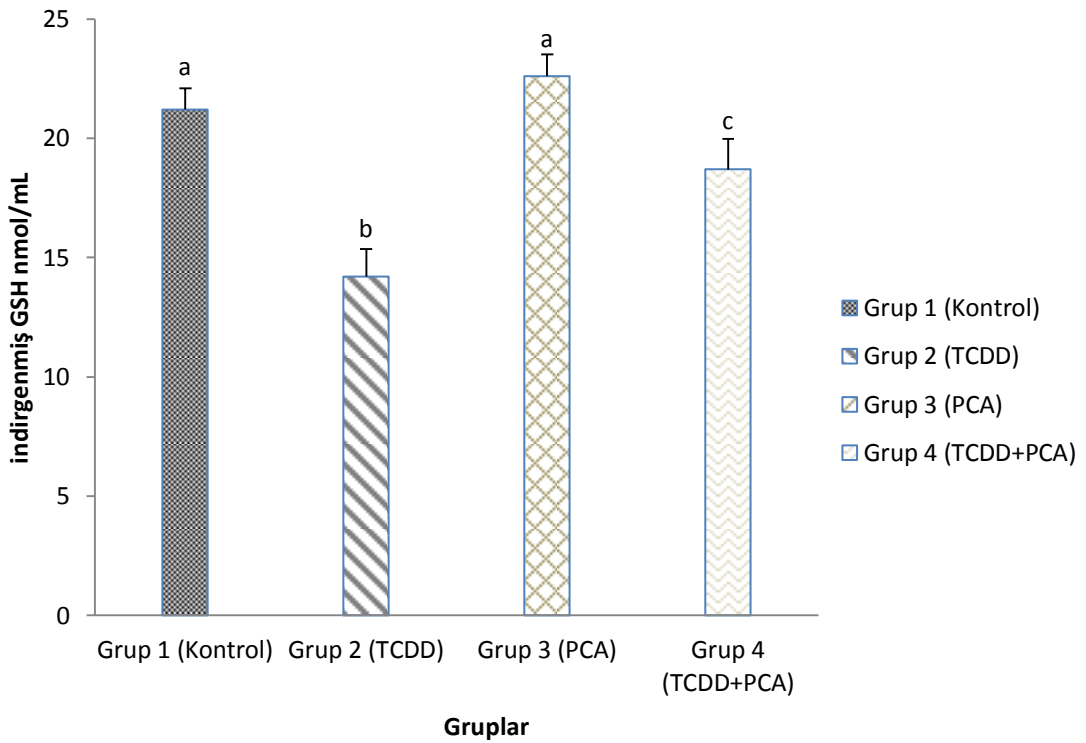
$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.



### 3.1.4.2. Böbrek dokusu GSH düzeyleri

Böbrek dokusu GSH düzeyleri TCDD grubunda ( $14.2 \pm 1.15$  nmol/mL); Kontrol grubu ( $21.2 \pm 0.89$  nmol/mL) ve PCA grubuna ( $22.6 \pm 0.92^a$  nmol/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunurken ( $P \leq 0.001$ ), PCA grubu ( $22.6 \pm 0.92$  nmol/mL) ile kontrol grubu ( $21.2 \pm 0.89$  nmol/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir değişme görülmedi. TCDD ile eş zamanlı verilen PCA grubunda ( $18.7 \pm 1.28$  nmol/mL) ise TCDD grubuna ( $14.2 \pm 1.15$  nmol/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ( $P \leq 0.001$ ).

Gruplara ait GSH düzeyleri şekil 3.8.'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Böbrek dokusu GSH düzeyleri.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında

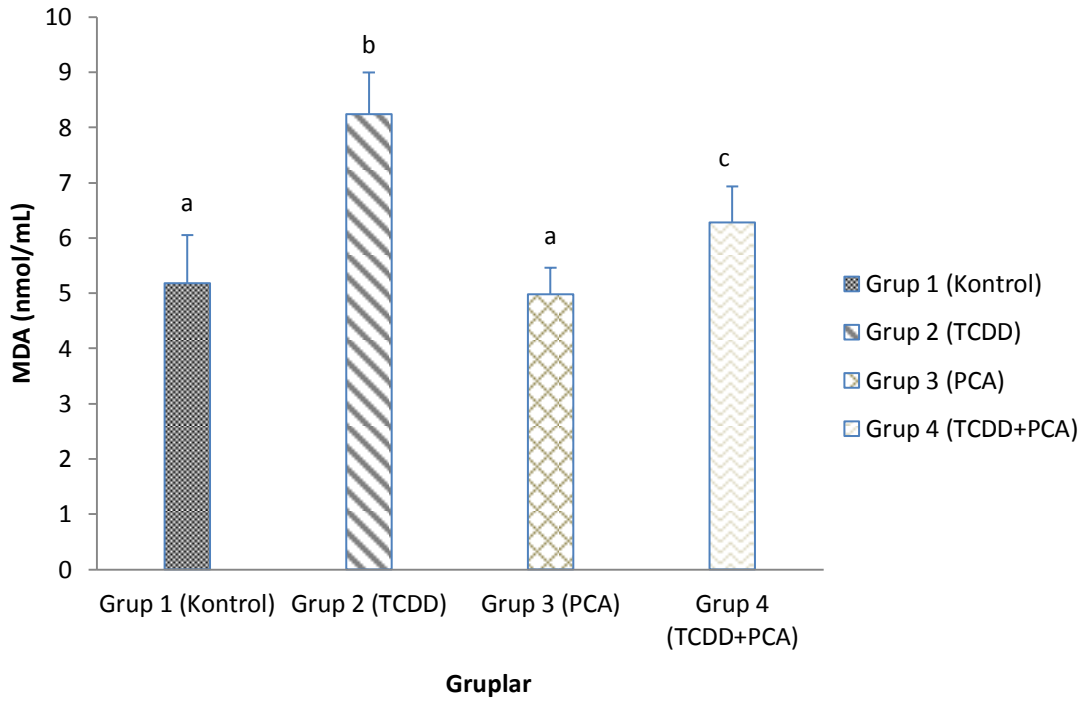
$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

### 3.1.5. Dokulardaki MDA düzeyleri

#### 3.1.5.1. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri TCDD grubunda ( $8.24 \pm 0.75$  nmol/g doku); diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde yüksek bulunurken, PCA grubu ( $4.98 \pm 0.48$  nmol/g doku) ve kontrol grubu ( $5.18 \pm 0.87$  nmol/g doku) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme görülmedi ( $P \geq 0.001$ ). MDA düzeyleri PCA+TCDD grubunda ( $6.28 \pm 0.65$  nmol/g doku) ise TCDD grubuna ( $8.24 \pm 0.75$  nmol/g doku) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu.

Gruplara ait MDA düzeyleri şekil 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

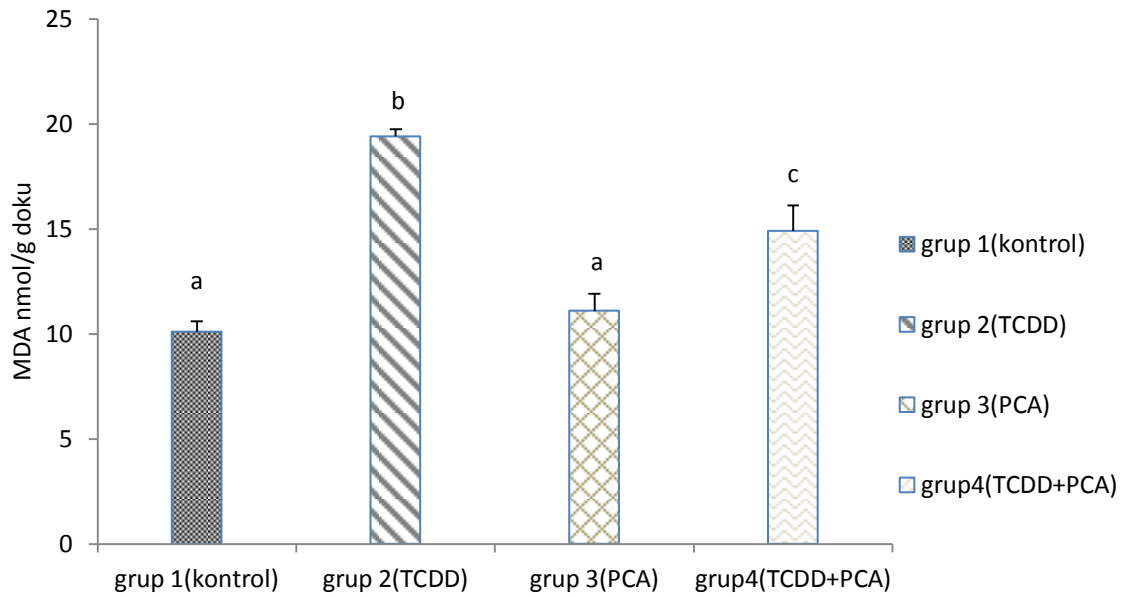
$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ve Grup 1, Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

### 3.1.5.2. Böbrek dokusu MDA düzeyleri

Böbrek dokusu MDA düzeyleri TCDD verilen grupta ( $19.4 \pm 0.35$  nmol/g doku); diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde yüksek bulundu. MDA düzeyleri PCA grubu ( $11.1 \pm 0.83^a$  nmol/g doku) ve kontrol grubu ( $10.1 \pm 0.51^a$  nmol/g doku) arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $P \geq 0.001$ ) bir değişme görülmezken, PCA+TCDD grubunda ( $14.9 \pm 1.23^c$  nmol/g doku) TCDD grubuna ( $19.4 \pm 0.35^b$  nmol/g doku) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) bir şekilde düşük bulundu.

Gruplara ait MDA düzeyleri şekil 3.10.'da verilmiştir.



**Şekil 3.10.** Böbrek dokusu MDA düzeyleri.

a, b ve c harfleri farklı gruplar arasındaki anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) değişiklikleri göstermektedir.

$P \leq 0.001$ ; Grup 2 ve Grup 1, Grup 4 ile Grup 2 karşılaştırıldığında.

$P \geq 0.001$ ; Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda, endüstrinin gelişmesi ile birlikte çevreye yayılan dioksin ve benzeri bileşik düzeylerinde çok önemli artışların gerçekleşebileceği ve bu artışlara bağlı olarak başta kanser olmak üzere insan sağlığı açısından ciddi sağlık riskleri oluşabileceği düşünülmektedir [94].

Geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalar TCDD'nin önemli bir oksidatif ajan olduğunu ve çeşitli dokular üzerinde oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir. Biz de çalışmamızda TCDD'nin rat karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stresi oluşturduğu ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu arttırdığını gördük. Diğer yandan TCDD'nin yapmış olduğu oksidatif stresi önleyeceğini düşünerek PCA'nın ise TCDD verdiğimiz gruba göre antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını gözlemledik.

Yüksek reaktivite gösteren hidroksil radikallerinden daha az reaktif olan oksijen ve nitrojen türlerine kadar oksidanlar biyolojik sistemlerde önemli rol oynarlar. Çeşitli oksidanlar benzer çeşitli antioksidanlarla (enzimler ve daha düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan oluşan antioksidan ağı) eşleşmiştir [95].

Oksijenin hidrojen perokside dismutasyonunu SOD, hidrojen peroksidin dismutasyonunu ise katalaz katalizlemektedir. GPx ise hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini indirgemektedir. Yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan GR, endirekt yolla antioksidan etki göstermektedir [96].

Çalışmamızda, karaciğer ve böbrek dokusu TCDD grubundaki SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzim aktivitelerini kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda SOD, CAT ve GSH -Px aktivitelerinin TCDD ile anlamlı şekilde azaldığını ( $P \leq 0.001$ ) gözlemledik.

Türkez ve arkadaşları kalıcı bir çevre kirleticisi olan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'nin rat karaciğeri üzerindeki oksidatif hasara karşı astaxanthinin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada; TCDD ile uyarılan ratların karaciğerlerinde SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinde ve GSH düzeyinde önemli şekilde düşüş görülmüştür [97].

Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçüldüğü diğer bir çalışmada; TCDD ile uyarılan ratlarda reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarında artış kaydedilmiştir. TCDD ile uyarılmış rat karaciğerinde SOD, CAT, GSH-Px enzimleri ve GSH düzeylerinde önemli derecede düşüş görülmüştür [98].

Çiftçi ve arkadaşları, kalıcı bir çevre kirleticisi olan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'nin, curcumin,  $\beta$ -(myrcene) ve 1,8 (sineol) antioksidan savunma sistemi üzerinde etkinliğini enzim düzeyinde incelemiştir. TCDD uygulamasıyla karaciğer SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve GSH düzeylerinde önemli düzeyde azalma gözlenmiştir [99].

Hasooun ve arkadaşlarının ratların beyinlerinin değişik bölgelerinde yaptığı oksidatif hasara karşı ellajik asit (EA) ve vitamin E süksinatının (VES) koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında VES uygulamasıyla ratların beyinlerinin bütün bölgelerinde SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı artışlar görülürken, EA uygulamasıyla bu enzimlerde anlamlı değişiklikler görülmemiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TCDD uygulanan ratların beyinlerinin bazı bölgelerinde SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı düşüşler görülmüştür [100].

Bir başka çalışmada Aly ve arkadaşları rat Sertoli hücreleri üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda TCDD uygulanan grupta kontrol grubuna göre SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinde ve GSH seviyelerinde anlamlı düşüşler olduğu gözlenmiştir [101].

TCDD ile uyarılan ratlarda oluşturulan nefrotoksisiteye karşı Quercetin (Q) ve chrysin (CH) in iyileştirici özelliğinin araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre TCDD uygulaması rat böbrek dokularında kontrol grubuna göre SOD, CAT, GSH-Px ve GSH seviyelerini düşürmüştür [102].

L-glutaminin rat karaciğeri üzerindeki düzenleyici etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada TCDD ile uyarılan grupta SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüşler olduğu tespit edilmiştir [103].

Kuvvetli bir antioksidan olan protokateşik asidin özellikle hidroksil radikali başta olmak üzere çeşitli serbest radikallere karşı antioksidan rol oynadığı, yüksek reaktivite gösteren radikallerin süpürücülüğünde etkili olduğu bilinmektedir [104].

Çeşitli sinamik ve benzoik asitlerin peroksil radikalleri süpürmedeki özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, metil linoleat oksidasyonunu önlemede ve peroksil radikallerini süpürmede protokateşik asidin p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asitten çok daha etkili olduğunu görülmüştür [105].

Çalışmamızda, karaciğer ve böbrek dokusu TCDD grubundaki SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzim aktivitelerini kontrol grubu ve PCA grubu ile karşılaştırdığımızda SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin TCDD ile anlamlı ( $P \leq 0.001$ ) şekilde azaldığını gördük. Protokateşik asit grubu ile TCDD grubu kıyaslandığında

protokateşik asit uygulanmasının bu azalışı anlamlı bir şekilde ( $P \leq 0.001$ ) engellediğini gözledik.

Szaefer ve ark. [81] fare hepatositleri üzerinde yaptıkları çalışmada PCA'nın sitokrom P450 enzimlerinden CYP1A2, CYP1A1 ve CYP2B enzimlerinin katalitik aktivitelerini azaltarak epoksit oluşumunu önlediğini tespit etmişlerdir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenmiş ratların PC12 hücrelerinde oluşan oksidatif hasara karşı Alpinia PCA'nın koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada PCA'nın GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerini arttırdığı lipid peroksidasyonunu önlediği ve serbest radikal üretimini azalttığı rapor edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasıyla ratların PC12 hücrelerinde GSH-Px ve SOD aktivitelerinin düştüğü, PCA uygulamasıyla bu enzimlerin aktivitelerinde artış olduğu ve kontrol seviyesine yaklaştırıldığı gözlenmiştir [106].

An ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, 1-methyl-4-phenylpyridinium iyon (MPP<sup>+</sup>) ile indüklenen rat PC12 hücresinde oluşan oksidatif hasara karşı PCA'nın koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada MPP<sup>+</sup> uygulamasının SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini azaltırken PCA'nın bu enzim aktivitelerini arttırarak kontrol seviyelerine getirdiği gözlemlenmiştir [107].

Çevresel bir atık olan TCDD'nin reproduktif toksisitesine karşı protokateşik asidin faydalı etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı bir çalışmada, TCDD'nin TBARS seviyelerinde bir artışla oksidatif stresi tetiklediği ve erkek ratların GPx, CAT ve SOD seviyelerinde azaltma meydana getirdiği görülmüştür. Buna karşılık protokateşik asidin TCDD'nin toksik etkilerini önlediği ve SOD, GPx, CAT enzim aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir [108].

Streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda protokateşik asidin antioksidan ve antihiperlipidemik aktivitesini değerlendirmek için bir çalışma yapılmıştır. Diyabetik ratlardaki lipid profilinde artış olurken HDL-C seviyesi azalmıştır. Protokateşik asit ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda bu değişiklikler yaklaşık kontrol seviyelerine geri döndürülmüştür. Histopatolojik çalışmalar ayrıca protokateşik asidin böbrek ve karaciğer üzerindeki koruyucu etkisini de ortaya koymuştur. Bu bulgulara dayanarak protokateşik asidin oksidatif stresi ve lipid profili azaltan özelliğinden dolayı tedavi edici olarak kullanılması önerilmiştir [109].

Protokateşik asidin antioksidan etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, kurutulmuş Alpinia Oxyphylla Miq'ten izole edilen fenolik bir bileşik olan Alpinia

PCA'nın nöroprotektif etkileri bulunmuştur. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) testleri ile hücre canlılığı ölçülerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen PC12 hücrelerindeki oksidatif hasara karşı Alpinia PCA'nın koruyucu etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre; lipid peroksit seviyesi azalmış, GPx ve SOD aktivitesi artmış, Alpinia PCA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen hücrelerdeki canlılığın azalmasını önlediği tespit edilmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda PCA'nın serbest radikallerin üretimini azalttığını ve endojen antioksidan enzimlerin artışını teşvik ederek, nöroprotektif bir ajan olduğunu rapor etmişlerdir [110].

Çalışmamızda, TCDD ile eş zamanlı uygulanan PCA'nın, TCDD grubuna göre SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerini arttırdığı görüldü.

Çiftçi ve arkadaşları rat kalp dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada, TCDD ile indüklenmiş oksidatif ve histopatolojik hasara karşı protokateşik asidin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre TCDD uygulanan grupta kontrol grubuna göre SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri azalırken, PCA grubunda bu enzim aktivitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir. TCDD ile aynı zamanda uygulanan grupta da TCDD grubuna göre SOD, CAT, GSH-Px aktivitelerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir [111].

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilir bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir [112].

Çalışmamızda, karaciğer ve böbrek dokuları TCDD grubundaki GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin TCDD ile anlamlı şekilde azaldığını ( $P \leq 0.001$ ) ve eşzamanlı protokateşik asit uygulanmasının bu azalışı engellediğini gözlemledik ( $P \leq 0.001$ ).

Rat kalp dokusu üzerinde yapılan bir çalışmada TCDD uygulamasının GSH seviyelerini azalttığı tespit edilirken, PCA uygulamasıyla TCDD grubuna göre anlamlı artışlar olduğu tespit edilmiştir [111].

Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek peroksidasyonu başlatmaktadırlar. Bu şekilde oluşan lipid

peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta malondialdehit (MDA) olmak üzere farklı ikincil ürünleri meydana getirmektedir [113]. Çeşitli çalışmalarla protokateşik asidin antioksidan savunma sistemi enzimlerini artırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı farklı şekillerde ortaya konulmuştur [105].

Çalışmamızda karaciğer ve böbrek dokularında TCDD uygulanan gruptaki MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA düzeylerinin TCDD uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ( $P \leq 0.001$ ) ve eşzamanlı protokateşik asit uygulanmasının bu artışı engellediği gözlemlendi ( $P \leq 0.001$ ).

Liua ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tert-bütillhidroperoksit (t-BHP) ile indüklenmiş ratlarda oluşturulan oksidatif hasara karşı protokateşik asidin koruyucu rolü incelenmiştir. Çalışmalarının sonuçlarına göre t-BHP'nin rat karaciğerindeki MDA seviyesini arttırdığı ve GSH seviyesini azalttığı buna karşılık t-BHP ile birlikte uygulanan PCA'nın MDA seviyesini düşürerek GSH seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir [114].

$H_2O_2$  ile indüklenmiş ratların PC12 hücrelerinde  $H_2O_2$  uygulamasıyla ratların PC12 hücrelerinde MDA düzeylerinde artış olduğu gözlenirken PCA uygulamasıyla MDA düzeyinde anlamlı düşüşler olduğu ve kontrol seviyesine yaklaştırıldığı gözlenmiştir [106].

Çalışmamız sonucunda; TCDD'nin oluşturduğu oksidatif stres ile karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonunu arttırdığı, antioksidan enzim aktivitelerini ise azaltıcı yönde etki gösterdiği görüldü. Protokateşik asidin karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde TCDD'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini genellikle artırdığı gözlemlendi. Protokateşik asidin bu yararlı etkileri göz önüne alındığında, TCDD'nin karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde neden olduğu toksisitelere tedavi amaçlı kullanılabileceği kanaatine varılabilir.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] D. Arıkan, H. Yetim, O. Sağdıç, Z. Kesmen, *Gıdalarda Dioksin Kontaminasyonu ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri*, **Gıda Tek. Elekt. Der.**, 12(2), (2009) 9-15.
- [2] G. Güneş, “*Dioksin ve Furan’ın Oluşum Mekanizmaları ve Giderilme Teknolojileri*”. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Türkiye, 2007
- [3] O.Ciftci, *Dioksinli Bileşiklerin Etki Mekanizması, Kimyasal Yapısı ve Toksikokinetik Özelliklerinin İncelenmesi*, **İnönü Üniv. Tıp Fak. Der.**, 17(4): (2010) 413-422.
- [4] M. Natalija, P. Daria, F. Goran, G. Branka, R. Ana Stavljenić, *Dioxins And Human Toxicity*, **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, 61 (2010) 445-453.
- [5] P. Kulkarni, J. Crespo, C. Afonso, *Dioxins sources and current remediation technologies - A review*, **Environ. Int.**, 34 (2008) 139-153.
- [6] Mc. Agramunt, M. Schuhmacher, Jm. Hernandez, Jl. Domingo, *Levels of dioxins and furans in plasma of nonoccupationally exposed subjects living near a hazardous waste incinerator*, **J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.**, 15(1) (2005) 29-34.
- [7] Gm. Egeland, Mh. Sweeney, Ma. Fingerhut, Kk. Wille, Tm. Schnorr, We. Halperin, *Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin*, **J Epidemiol.**, 139 (1994) 272–281.
- [8] EPA Dioxin Reassessment Summary 4/94- Vol.1, (1994) 37-38.
- [9] B. Eskenazi, P. Mocarelli, M. Warner, S. Samuels, L. Needham, D. Patterson, P. Brambilla, Pm. Gerthoux, W. Turner, S. Casalini, M. Cazzaniga, Wy. Chee, *Seveso Women's Health Study: does zone of residence predict individual TCDD exposure?*, **Chemosphere.**, 43: 4-7 (2001) 937-942.
- [10] Mm. Feeley, Dl. Grant, *Approach to Risk Assessment of PCDDs and PCDFs in Canada*, **Reg. Toxic. and Pharm.**, 18: 3 (1993) 428-437.
- [11] Sd. Stellman, Mv. Djordjevic, Ja. Britton, Je. Muscat, ML. Citron, M. Kemeny, E. Busch, L. Gong, *Breast cancer risk in relation to adipose concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Long Island, New York*, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 9 (2000) 1241–1249.
- [12] A. Schecter, P. Cramer, K. Boggess, J. Stanley, O. Pöpke, J. Olson, A. Silver, M. Schmitz, *Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population* **J. Toxic. Environ. Health**, 63 (2001) 1–18.
- [13] European Commission meeting at Brussels july. *Fact Sheet on dioxin in feed and food*, Publishedon 2001.

- [14] Ministry of Health and Welfare (Japan) Interim Report of Studies on Dioxin Risk Assessment (in Japanese), 1996.
- [15] WHO Executive Summary Report of ‘ *Assessment of health risks of dioxins; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI)*, 1998.
- [16] R. Krowke, K. Abraham, T. Wiesmuller, H. Hagenmaier, D. Newbert, *Transfer of various PCDDs and PCDFs via placenta and mother's milk to Marmoset offspring*, **Chemosphere.**, 20 (1990) 1065–1070.
- [17] Af. Badawi, El. Cavalieri, Eg. Rogan, *Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17betaestradiol*, **Metabolism**, 50 (2001) 1001–1003.
- [18] Sh. Safe, *Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis*, **Toxicol. Lett.**, 120 (2001) 1–7.
- [19] K.R. Murray, *Harper'in Biyokimyası, Ksenobiyotiklerin Metabolizması*, ISBN:975–95331–1–1, 1996, 799 –806.
- [20] H. Pınarbaşı “*Bir Türk populasyonunda GSTM1 polimorfizmi ve akciğer kanseri ilişkisi*” Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sivas, 2004.
- [21] M. Arand, A. Cronin, F. Oesch, S.L. Mowbray and T.A. Jones, *The telltale structures of epoxide hydrolases*, **Drug Metabol. Rev.** , 35 (4): (2003) 365-383.
- [22] B. Pier Alberto, Z. Carlo, C. Angela, Pesatori, G. Stefano, S. Maurizio and R. Laura, *Ten-year mortality study of the population involved in the seveso incident in 1976*, **Am. J. Epidemiol.**, 129 (1989) 1187-1200.
- [23] A.C. Pesatori, C. Zocchetti, S. Guercilena, D. Consonni, D. Turrini, P.A. Bertazzi, *Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study*, **Occup. Environ. Med.**, 55 (1998) 126-131.
- [24] J.R. Allen, D.A. Barsotti, J.P. Van Miller, L.J. Abrahamson, J.J. Lalich, *Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*, **Food Cosmet. Toxicol.**, 15 (1977) 401-410.
- [25] C.K. Kelling, L.A. Menahan, R.E. Peterson, *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment on mechanical function of the rat heart*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 91 (1987) 497-501.
- [26] M. Flesch, Y. Ko, C. Seul, R. Düsing, H. Feltkamp, H. Vetter, A. Sachinidis, *Effects of TCV-116 and CV-11974 on angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells*, **Eur. J. Pharmacol.**, 28: 289 (1995) 399-402.

- [27] O. Çiftçi, *Dioksinli Bileşiklerin Etki Mekanizması, Kimyasal Yapısı ve Toksikokinetik Özelliklerinin İncelenmesi*, **İnönü Üniv. Tıp Fak. Der.**, 17 (2010) 413-422.
- [28] G.M. Calvert, D.K. Wall, M.H. Sweeney, M.A. Fingerhut, *Evaluation of cardiovascular outcomes among U.S. workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*, **Environ. Health Perspect**, 106: 2 (1998) 635-643.
- [29] H. Vural, *Gıda Kirliliği Açısından Dioksin ve Furan İzomerleri.*, **Eko. Çevre Der.**, 15 (1995) 45-49.
- [30] S. Aslan, M. Korucu, K.A. Karademir, E. Durmuçoğlu, *Kocaeli'nde Yerel Olarak Üretilen Yumurtalarda Dioksin ve Furan (PCDD/F) Seviyelerinin Belirlenmesi*. 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, **Yaş. Çev.Tek.**, (2007).
- [31] J.A. Scott, J.P. Incardona, K. Pelkki, S. Shepardson, P.V. Hodson, *AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to retene*, **Aquat. Toxicol.**, 17 101 (2011) 165-174.
- [32] K. Kitamura, Y. Kikuchi, S. Watanabe, G. Waechter, H. Sakurai, T. Takada, *Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers*, **J Epidemiol.** 10 (2000) 262–270.
- [33] Je. Michalek, Fz. Akhtar, Jc. Arezzo, Dh. Garabrant, Jw. Albers, *Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand*, **Neurotoxicology** 22 (2001) 479–490.
- [34] C. Rappe, *Sources and Environmental Concentrations of Dioxins and Related Compounds* **Pure & App Chem.**, 68 (9) (1996) 1781-1789.
- [35] World Health Organization (WHO), Executive summary, *Assessment of health risks of dioxins: re-evaluation of the Tolerable daily intake (TDI)*. Geneva, WHO (1998)
- [36] Je. Michalek, Ns. Ketchum, Mp. Longnecker, *Serum dioxin and hepatic abnormalities in veterans of Operation Ranch Hand*, **Ann. Epidemiol.**, 11 (2001) 304–311.
- [37] Sa. Van Der Plas, I. Lutkeschipholt, B. Spenkelink, A. Brouwer, *Effects of subchronic exposure to complex mixtures of dioxin-like and non-dioxin-like polyhalogenated aromatic compounds on thyroid hormone and vitamin A levels in female Sprague-Dawley rats*, **Toxicol Sci.**, 59 (2001) 92–100.

- [38] WHO (1998). *Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)*. Consultation, May 25-29, Geneva, Switzerland, (1998).
- [39] Safe Sh., *Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis*. **Toxicol. Lett.** 120 (2001) 1–7.
- [40] JM. Henck, MA. New, RJ. Kociba, KS. Rao, *1,2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin: acute oral toxicity in hamsters*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 30 59(2) (1998) 405-407.
- [41] C. A. Rice-Evans, *Flavonoid antioxidants*, **Current Med. Chem.**, 8 (2001) 797-807.
- [42] M. Serafini, D. Del Rio, *Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool*, **Redox Report**, 9, (2004) 145-152.
- [43] B. Halliwell, *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans*, **Free Rad. Res.**, 25 (1996) 57-74.
- [44] C. Tsang, *Antioxidant Activity, Protective Effects and Absorption of Polyphenolic Compounds*, 2004, 15-16.
- [45] Salih Sarı, *farelerde ehrlich asit solid tümör modelinde thymus sipyleus ve taurinin, böbrek mda, glutasyon, aopp düzeylerine ve sod aktivitesine etkileri*, yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Ankara, 2008.
- [46] M. J. DeVito, L. S. Birnbaum, W. H. Farland, and T. A. Gasiewicz, *Comparisons of estimated human body burdens of dioxinlike chemicals and TCDD body burdens in experimentally exposed animals*, **Environ. Health Perspect.**, 103 (1995) 820–831.
- [47] D. Tokaç, *Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Oksidatif DNA Hasarına Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Ankara, 2007.
- [48] İ. Meram, Ş. Aktaran, *Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri*. *Arşiv*, 11 (2002) 299.
- [49] K. Chandan Sen, Ph.D. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*, 9, 2000, 197.
- [50] E. Kurutaş Belge, F. İnanç Güler, M. Kılınç, *Serbest Radikaller*, *Arşiv*, 13 (2004) 120-131.
- [51] B. Halliwell, JM. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, **Clarendon Pres**, (1989) 125.

- [52] J. M. C. Gutteridge, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*, **Clin. Chem.**, 41 (1995) 1819-1828.
- [53] Ş.Efsun Antmen, *Beta Talasemide Oksidatif Stres*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Adana, 2005.
- [54] M. Viluksela, B. U. Stahl, and K. K. Rozman, *Tissue-specific effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in rats*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 135, (1995) 308–315.
- [55] B.P.Slezak , G.E.Hatch, M.J.DeVito, J.J.Diliberto, K.Crissman, E.Hassoun and L.S.Birnbaum *Oxidative Stress in Female B6C3F1 Mice following Acute and Subchronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*, **Toxic.Sci.**, 54 (2000) 390-398.
- [56] P.A. Kern, R.B. Fishman, W. Song, A. Brown, V. Fonseca, *The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver*, **Toxicol.**, 171 (2002) 117-125.
- [57] C. Latchoumycandane, P.P. Mathur, *Effects of vitamin E on reactive oxygen speciesmediated 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in rat testis*, **J. Appl. Toxicol.**, 22 (2002) 345-351.
- [58] O. Abdulrahman Shaikh-Omar, MPhil, *Recombinant expression of the aryl hydrocarbon receptor*, PhD Thesis Nottingham England, 2007.
- [59] İ. Akkuş, *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*, Konya, 1995.
- [60] A.S. Yalçın, *Antioksidanlar*, **Kli. Gel.**, 11 (1998) 342 –334.
- [61] F. Gürsoy, *etanolün indüklediği karaciğer hasarında matriks metalloproteinazların rolü ve antioksidanların etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Afyon, 2005.
- [62] K.R. Martin, C. L. Appel, *Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword*, **Nutr. Dietary Suppl.**, 2 (2010) 1-12.
- [63] A. Özkaya, *oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Elazığ, 2007
- [64] L. Bravo, *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, **Nutr. Rev.**, 56 (1998) 317-333.
- [65] W.Y. Huang, Y.Z. Cai, Y.B. Zhang, *Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention*, **Nutr. Cancer**, 62 (2010) 1-20.

- [66] YZ. Cai, Q. Luo, M. Sun, and H. Corke, *Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer*, **Life Sci.**, 74 (2004) 2157–2184.
- [67] XZ. Han, T. Shen, and H. X. Lou, *Dietary polyphenols and their biological significance*. **Int. J. Mol. Sci.**, 8 (2007) 950–988.
- [68] S. Silici, M. Unlu, and G. Vardar-Unlu, *Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions*, **World J. Microb. Biot.**, 23 (2007) 1797–1803.
- [69] R. Chaubal, AM. Mujumdar, A. Misar, and N. R. Deshpande, *Isolation of phenolic compounds from *Acacia nilotica* with topical antiinflammatory activity*, **Asian J. Chem.**, 17 (2005) 1595–1599.
- [70] T. Tanaka ,T. Tanaka, M. Tanaka, *Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid*, **J. Exp. Clin. Med.**, 3 (1): (2011) 27-33.
- [71] J.J. Yan, J.S. Jung, Y.J. Hong, Y.S. Moon, H.W. Suh, Y.H. Kim, H.S. Yun-Choi, *Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation of IL-10*, **Biol. Pharm. Bull.** 27 (2004) 2024-2027.
- [72] G. C. Yen, C. L. Hsieh, *Reactive oxygen species scavenging activity of *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides* oliv.) and its active compounds*, **J. Agric. Food Chem.**, 48 (2000) 3431-3436.
- [73] K. Valentova, L. Cvak, A. Muck, J. Ulrichova, V. Simanek, *Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius**. **Eur. J. Nutr.**, 42 (2003) 61-66.
- [74] M. Yoshino, K. Murakami, *Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization*, **Anal. Biochem**, 257 (1998) 40-4.
- [75] Masella R., Cantafora A., Modesti D., Cardilli A., Gennaro L., Bocca A., Coni E., *Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols*, **Redox Rep.**, 4, (1999) 113-21.
- [76] R. Masella, R. Vari, M. D'Archivio, R. Di Benedetto, P. Matarrese, W. Malorni, B. Scazzocchio, *Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes*, **J. Nutr.**,134 (2004) 785-791.
- [77] CL. Liu, JM. Wang, CY. Chu, MT. Cheng, TH. Tseng, *In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity*, **Food Chem. Toxicol.**, 40 (2002) 635-41.

- [78] T. Tsuda, F. Horio, T. Osawa, *Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats*, **FEBS Lett.**, 449 (1999) 179-182.
- [79] FP. Guengerich *Metabolism of chemical carcinogens*. **Carcinogenesis**, 21 (2000) 345-351.
- [80] W. Baer-Dubowska, H. Szaefer, V. Krajka-Kuzniak *Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds*, **Xenobiotica**, 28: (1998) 735-743.
- [81] E. Ignatowicz, B. Balana, SV. Vulimiri, H. Szaefer, W. Baer-Dubowska, *The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence in vitro*, **Toxicology**, 189 (2003) 199-209.
- [82] H. Szaefer, M. Cichocki, D. Brauze, W. Baer-Dubowska, *Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis*, **Nutr. Cancer**, 48 (2004) 70-77.
- [83] H. Szaefer, J. Jodynis-Liebert, M. Cichocki, A. Matuszewska, W. Baer-Dubowska, *Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine*, **Toxicology**, 186 (2003) 67-77.
- [84] D. Stagos, G. Kazantzoglou, P. Magiatis, S. Mitaku, K. Anagnostopoulos, D. Kouretas, *Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA*, **Int. J. Mol. Med.**, 15 (2005) 1013-1022.
- [85] T. Tanaka, T. Kojima, T. Kawamori, H. Mori, *Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid*, **Cancer**, 75 (1995) 1433-1439.
- [86] Y. Hirose, T. Tanaka, T. Kawamori, M. Ohnishi, H. Makita, H. Mori, K. Satoh, *Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats*, **Carcinogenesis**, 16 (1995) 2337-2342.
- [87] R. Suzuki, H. Kohno, S. Kohno, T. Tanaka, *Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis*, **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, 4 (2003) 319-326.
- [88] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *Protein measurement with pholin phenol reagent*, **J. Biol. Chem.**, 193 (1951) 265-275.
- [89] Y. Sun, L.W. Oberley, Y. Li, *A simple method for clinical assay of superoxide dismutase*, **Clin. Chem.**, 34 (1988) 497-500.

- [90] H. Aebi, *Catalase in vitro assay methods*, **Met. Enzymol.**, 105 (1984) 121-126.
- [91] W. Paglia De Valentine, *Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase*, **J. Lab. Clin. Med.**, 70 (1967) 158-159.
- [92] J. Sedlak and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent*, **Anal. Biochem.**, 24; 25 (1968) 192-205.
- [93] K. Yagi, *Assay of lipid peroxidation in blood plasma or serum*, **Met. Enzymol.**, 105 (1984) 328-331.
- [94] O. Çiftçi, *Elazığ ve Çevresinde Tüketilen Tereyağlarında, Dioksin ve Benzeri Bileşik Düzeylerinin Araştırılması*, **F.Ü. Sağ. Bil. Derg.**, 22 (5) (2008) 289 – 292.
- [95] P.C.H. Hollman, A. Cassidy, B. Comte, M. Heinonen, M. Richelle, E. Richling, M. Serafini, A. Scalbert, H. Sies, and S.Vidry, *The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established*, **The J. of Nut.**, 141:5 (2011) 9895-10095.
- [96] F. Gürsoy, *Etanolün İndüklediği Karaciğer Hasarında Matriks metalloproteinazların Rolü ve Antioksidanların Etkisi*, yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Afyon (2005).
- [97] H. Türkez, F. Geyikoğlu and I. Y. Mokhtar, *Beneficial effect of astaxanthin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced liver injury in rats*, **Toxicol. Ind. Health**, 10.1177/0748233711434959 (2012) 1–9.
- [98] H. Türkez, F. Geyikoglu and Y. Mokhtar, *Ameliorative effect of docosahexaenoic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damage in rat liver*, **Toxicol. Ind. Health**, 10.1177/0748233711420475 (2011) 1–10.
- [99] O. Çiftçi, İ. Özdemir, S. Tanyıldızı, S. Sildiz, H. Oğuztürk, *Antioxidative effects of curcumin,  $\beta$ -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver*, **Toxicol. Ind. Health**, 0748233710388452, (2011).
- [100] E. A. Hassoun, J. Vodhanel, B. Holden, A. Abushaban, *The Effects Of Ellagic Acid and Vitamin E Succinate On Antioxidant Enzymes Activities and Glutathione Levels In Different Brain Regions Of Rats After Subchronic Exposure To TCDD*, **J. of Toxic.and Environ. Health**, 69 (2006) 381–393.



- [101] A.A. Hamdy, A. Rasha, M. Khafagy, *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cytotoxicity accompanied by oxidative stress in rat Sertoli cells: Possible role of mitochondrial fractions of Sertoli cells*, **Toxic. and App.Pharm.**, 252 (2011) 273–280.
- [102] O. Ciftci, I. Ozdemir, N. Vardi, A. Beytur, F. Oguz, *Ameliorating effects of quercetin and chrysin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced nephrotoxicity in rats*, **Toxicol. Ind. Health**, (2011) 1–8.
- [103] H. Türkez, F. Geyikoglu, M.I. Yousef, *Modulatory effect of L-glutamine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced liver injury in rats*, **Toxicol. Ind. Health**, 28 (2012) 663-672.
- [104] J.J. Yan, J.S. Jung, Y.J. Hong, Y.S. Moon, H.W. Suh, Y.H. Kim, H.S. Yun-Choi, *Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation of IL-10*, **Biol. Pharm. Bull.**, 27 (2004) 2024-2027.
- [105] A. Mansouri, P.M. Dimitris, K. Panagiotis, *Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure–activity relationships*, **J. of Pharm. and Biomed. Anal.**, 39 (2005) 22–26.
- [106] G. Shi, L. An, B. Jiang, S. Guan, Y. Bao, *Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo*, **N.Lett.**, 403 (2006) 206–210
- [107] L.J. An, S. Guan, G.F. Shi, Y.M. Bao, Y.L. Duan, B. Jiang, *Protocatechuic acid from Alpinia oxyphylla against MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in PC12 cells*, **F. Chem. Toxic.**, 44 (2006) 436–443
- [108] A. Beytur, O. Ciftci, M. Aydin, O. Cakir, N. Timurkaan, F. Yilmaz, *Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats*, **Andrologia.**, 44 (2012) 454-461.
- [109] R. Harini, K.V. Pugalendi, *Antioxidant and antihyperlipidaemic activity of protocatechuic acid on streptozotocin-diabetic rats*, **Redox. Report.**, 15(2) (2010) 71-80.
- [110] S. Gui-Fang, A. Li-Jia, B. Jiang, S. Guan, B. Yong-Ming, *Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo*, **Neur. Lett.**, 403: 3 (2006) 206-210.

- [111] O. Ciftci, O. M. Disli, N. Timurkaan, *Protective effects of protocatechuic acid on TCDD-induced oxidative and histopathological damage in the heart tissue of rats*, **Toxicol. Ind Health**, DOI: 10.1177/0748233712442735, (2012).
- [112] N. Koca, F. Karadeniz, *Serbest Radikal oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri*, **Gıda Müh. Derg.**, (2003) 32-37.
- [113] Ö. Coşkun, M. Kanter, F. Armutçu, K. Çetin, B. Kaybolmaz, Ö. Yazgan, *Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer*, **Eur. J. Gen. Med.**, 1 (2004) 37-42.
- [114] C. Liua, J. Wangb, C. Chub, M. Chengc, T. Tsengb, *In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity*, **Food and Chem. Toxic.**, 40 (2002) 635–641.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ahmet SAVCI, 1981 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 1999-2004 öğretim yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2003-2004 öğretim yılında bu bölümden mezun oldu. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya anabilim dalında yüksek lisansa başladı.