

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA PENTAKLOROFENOL ZEHİRLENMESİNDE
NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ LİPİD PEROKSİDASYONU VE
BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE
ETKİLERİ

Hazırlayan
Zeynep SOYER SARICA

Danışman
Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

Doktora Tezi

Ocak 2012
KAYSERİ

- III -

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA PENTAKLOROFENOL ZEHİRLENMESİNDE
NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ LİPİD PEROKSİDASYONU VE
BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE
ETKİLERİ**

**Hazırlayan
Zeynep SOYER SARICA**

**Danışman
Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN**

Doktora Tezi

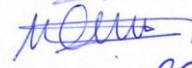
**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TSD-09-758 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2012
KAYSERİ**

Prof.Dr.Bilal Cem LİMAN danışmanlığında Zeynep SOYER SARICA tarafından hazırlanan “Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Veteriner Farmakoloji –Toksikoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

05/01/2012.

JÜRİ:

Danışman Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji ABD) 
Üye Prof.Dr. Sezai KAYA (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji ABD) 
Üye Doç. Dr. Meryem EREN (Veteriner Biyokimya ABD) 
Üye Doç. Dr. Gökhan ERASLAN (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji ABD) 
Üye Doç. Dr. Murat KANBUR (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji ABD) 

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunda 09 ŞUBAT 2012 tarih ve 537 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

09 ŞUBAT 2012


Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR



Prof.Dr.Bilal Cem LIMAN danışmanlığında Zeynep SOY hazırlanan "Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar (Naratriptan) ile Pentaklorofenolün Oksidasyonu ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri" başlıklı tezi Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Veteriner Bilimler Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir..

0

ÖRİ:

danışman Prof.Dr. Bilal Cem LIMAN (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji)
ye Prof.Dr. Sezai KAYA (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji)
ye Doç. Dr Meryem EREN (Veteriner Biyokimya ABL)
ye Doç. Dr. Gökhan ERASLAN (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji)
ye Doç. Dr. Murat KANBUR (Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 09 ŞUBAT 2016 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Pi

...

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Zeynep SOYER SARICA

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri” adlı **Doktora** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Zeynep SOYER SARICA

Danışman

Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN danışmanlığında **Zeynep SOYER SARICA** tarafından hazırlanan “**Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2012

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

Üye : Doç. Dr. Murat KANBUR

Üye : Doç. Dr. Meryem EREN

Üye : Prof. Dr. Sezai KAYA

Üye : Doç. Dr. Gökhan ERASLAN

ONAY

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

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

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana tez çalışmalarım da yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Murat KANBUR ve Doç. Dr. Gökhan ERASLAN'a, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince sonsuz sabrı ile manevi ve teknik desteğini hiç eksik etmeyen sevgili eşim Melih SARICA'ya ve aileme teşekkür ederim.

**RATLARDA PENTAKLOROFENOL ZEHİRLENMESİNDE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ LİPİD PEROKSİDASYONU
VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE**

ETKİLERİ

Zeynep SOYER SARICA

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Ocak 2012

Danışman: Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN

KISA ÖZET

Bu çalışma ile ratlarda pentaklorofenolle (PCP) oluşturulan lipid peroksidasyonuna karşı nar çekirdeği yağının (NÇY) lipid peroksidasyonu ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada 4-5 aylık, 40 adet Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı ve dört grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruba 0,15 ml/kg dozunda NÇY, üçüncü gruba 40 mg/kg dozunda PCP ve dördüncü gruba 40 mg/kg dozunda PCP+ 0,15 ml/kg dozunda NÇY uygulandı. Uygulamalar 28 gün boyunca gavaj ile yapıldı. Deneme sonunda eritrositte hemoglobin, katalaz ve glutasyon peroksidaz, nitrik oksit, malondialdehit, süperoksit dismutaz parametreleri; serumda 8-hidroksi-2-deoksi guanosin ve biyokimyasal parametreleri incelendi.

Pentaklorofenol verilen grupta (grup 3) kontrol grubuna göre (grup 1) MDA, NO, SOD değerlerinde artış, CAT ve GSH-Px değerlerinde ise düşüş olduğu görüldü. PCP verilen gruba (grup 3) göre PCP+NÇY (grup 4) verilen grupta MDA, NO ve SOD düzeylerinde azalma; CAT ve GSH-Px düzeylerinde artış olduğu belirlendi. Pentaklorofenol verilen grubun (grup 3) kontrol grubuna göre (grup 1) ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri ile BUN, glukoz, kolesterol, LDL, kreatinin, trigliserit ve ürik asit düzeylerinde artışa sebep olduğu görüldü. Total protein, HDL ve albümin değerlerinde ise düşüş görüldü. Pentaklorofenol verilen gruba (grup 3) göre PCP+NÇY (grup 4) verilen grubun ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri ile BUN, glukoz, kolesterol, LDL, kreatinin, trigliserid ve ürik asit düzeylerinde anlamlı oranda düşüş, total protein, HDL ve albümin değerlerinde ise yükselme gözlemlendi. Kontrol (grup 1) ve PCP+NÇY (grup 4) verilen grubun değerleri karşılaştırıldığında ise grup 4 ALT, AST ve ALP aktiviteleri ile glukoz, kreatinin, LDL değerlerinde anlamlı bir yükselme meydana gelirken; BUN, kolesterol, trigliserid, ürik asit, total protein ve albümin değerlerinde anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada sıçanlara oral yoldan gavaj ile 40 mg/kg (ca) uygulanan PCP'nin karaciğer hasarına, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzim etkinliklerinde azalmaya yol açtığı; 15 ml/kg ca dozunda 28 gün boyunca verilen NÇY'nin ratlarda protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması üzerine istenmeyen etkilerinin olmadığı, karaciğer üzerinde toksik etkilere yol açmadığı, lipid peroksidasyonu oluşturucu etkilerinin bulunmadığı; NÇY'nin PCP'nin istenmeyen etkileri üzerine koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir.

-X-

Anahtar kelimeler: Pentaklorofenol, Lipid Peroksidasyon, Nar Çekirdeği Yağı, Rat

,

EFFECTS OF POMEGRANATE SEED OIL ON PENTACHLOROPHENOL TOXICITY LIPID PEROXIDATION AND SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS

Zeynep SOYER SARICA

ABSTRACT

In this study, it was aimed to evaluate the effects of pomegranate seed oil against pentachlorophenol induced lipid peroxidation in rats.

In the study, 4-5 months old, 40 Sprague-Dawley male rats were used and four groups were formed. The first group was held as the control group. The second group was given 0,15 ml/kg PSO, the third group was given 40 mg/kg PCP, the forth group was given 40 mg/kg PCP +0,15 ml/kg PSO during 28 days as specified. This material was applied by gavage. At the end of the experiment, erythrocyte haemoglobin, catalase, glutathione peroxidase, nitric oxide, blood serum 8-OH-dG and biochemical parameters were analysed.

When the pentachlorophenol treated group (group 3) was compared to control group (group 1) an increase in MDA, NO and SOD levels and decrease in CAT and GSH-Px level were seen. According to the pentachlorophenol group (group 3) in the PCP+PSO treated group (group 4), reduce in MDA, NO and SOD levels; and increase in CAT and GSH-Px levels were explored. BUN, glucose, cholesterol, LDL, creatinin, triglyceride, uric acid levels and AST, ALP, ALT activity were increased in Group 3, which was given PCP. Compared to control group (group 1) HDL, total protein and albumin levels were decreased. Group 3, which was given PCP, compared to Group 4, PCP+PSO, BUN, glucose, cholesterol, LDL, creatinin, triglyceride, uric acid levels, AST, ALT and ALP activity were decreased at significant levels and HDL, total protein and albumin levels were increased. When control group (group 1) and PCP+PSO were compared, it was seen that ALT, AST, and ALP activity and glucose, creatinin, LDL, levels were increased, but there were no significant change in the levels of BUN, HDL, cholesterol, triglyceride, uric acid, total protein and albumin.

As as result, 40mg/kg (ca) PCP applied by gavage, cause liver damage, lipid peroxidation and decrease in anti-oxidant enzyme activity and 15mg/kg (ca) PSO applied for 28 days, has no negative effect on protein, oil and carbonhidrate metabolism, has no toxic effect on liver and has no effect on lipid peroxidation. Overall, it's determined that PSO protects against the negative effects of the PSP.

Keywords: Pentachlorophenol, Lipid Peroxidation, Pomegranate Seed Oil, Rat

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. PENTAKLORFENOL	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	4
2.1.2. Çevre Dayanıklılığı.....	4
2.1.3. Etki Şekli	4
2.1.4. Zehirliliği.....	5
2.1.5. Toksikokinetik	6
2.1.6. Çevre Kirliliği	7
2.2. NAR ve NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI.....	8
2.2.1. Kimyasal Yapısı	8
2.2.2. Etkileri	11
2.2.2.1. Antioksidan Etkileri	11
2.2.2.2. Antikarsinojen Etkileri	12
2.2.2.3. Antienflamatuar Etkileri.....	12
2.2.3. Olası İlaç Etkileşimleri	13
2.2.4. Nar Ekstraktlarının Zehirliliği.....	13

2.3. OKSİDATİF STRES VE LİPİD PEROKSİDASYON	14
2.3.1. Serbest Radikaller	14
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	18
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	19
2.3.1.3. Hidroksi Radikali ($OH^\cdot$)	20
2.3.1.4. Singlet Oksijen (ΔO_2)	20
2.3.2. Lipid Peroksidasyonu	20
2.3.2.1. Malondialdehit (MDA)	21
2.3.2.2. Nitrik Oksit (NO)	22
2.3.2.3. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları	23
2.3.3. Oksidatif DNA Hasar	24
2.3.3.1. 8- hidroksi-2-deoksi Guanosin (8-OH-dG)	25
2.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	28
2.3.4.1. Enzimatik Savunma Sistemleri	28
2.3.4.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri	30
2.3.5. Lipid Peroksidasyon Olayının Belirlenmesi	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 GEREÇLER	33
3.2. KİMYASAL MODELLER	34
3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI	35
3.4. NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI BİLEŞİMİ	38
3.5. YEM BİLEŞİMİ	40
3.6. HAYVAN MATERYALİ	40
3.7. DENEY GRUPLARI	40
3.8. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI ve SAKLANMASI	40
3.9. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	41
3.9.1. Numunelerin Analize Hazırlanması	41
3.9.2. Serum Biyokimya Analizleri	41
3.9.3. Eritrosit Hb Tayini	41
3.9.4. MDA Tayini	42
3.9.5. NO Tayini	42

	<u>Sayfa no</u>
3.9.6. CAT Aktivitesi Ölçümü.....	43
3.9.7. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	44
3.9.8. GSH-Px Aktivitesi Ölçümü	45
3.9.9 8-OH-dG Tayini.....	46
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	48
4. BULGULAR	49
4.1. LİPİD PEROKSİDASYONUNA AİT BULGULAR	49
4.1.1. MDA.....	49
4.1.2. NO.....	50
4.1.3. SOD	51
4.1.4. CAT	52
4.1.5. GSH-Px	53
4.1.6. 8-OH-dG.....	54
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR	55
4.2.1. BUN.....	55
4.2.2. Glukoz	56
4.2.3. HDL	57
4.2.4. Kolesterol	58
4.2.5. Kreatinin	59
4.2.6. Trigliserid	60
4.2.7. LDL	61
4.2.8. Ürik Asit	62
4.2.9. Total Bilirubin	63
4.2.10. ALT	64
4.2.11. AST.....	65
4.2.12. ALP	66
4.2.13. Total Protein	67
4.2.14. Albümin	68
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	70

6.KAYNAKLAR	83
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Pentaklorfenolün zehirliliği (4).....	5
Tablo 2.2. Nar bitkisinin çeşitli kısımları ve kimyasal yapısı (11)	9
Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri (34)	15
Tablo 2.4. Hasarlarla ilişkili Serbest radikal üretim şekilleri (32)	15
Tablo 2.5. Enzimatik antioksidanların etkileri (34)	29
Tablo 2.6. Non enzimatik antioksidanların etkileri (34)	31
Tablo 3.1. Kullanılan yemin bileşimi	40
Tablo 3.2. MDA analizi	42
Tablo 3.3. NO aktivitesi tayini için çalışma şeması	43
Tablo 3.4. CAT analizi çalışma şeması	43
Tablo 3.5. SOD analizi çalışma şeması	44
Tablo 3.6. GSH-Px aktivitesi Ölçümü	47
Tablo 3.7. 8-OH-dG çalışma şeması	47
Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyi ile NO, eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px ve 8-OH-dG enzim aktiviteleri	54
Tablo 4.2. Grupların serum biyokimyasal değerleri	69

Şekil 2.1.	Pentaklorofenol' ün kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2.	Narın bileşiminde bulunan kimyasal maddeler ve yapıları (15).....	10
Şekil 2.3.	Serbest radikallerin hasar ürünleri (38)	17
Şekil 2.4.	Lipid peroksidasyon oluşumu(45)	21
Şekil 2.5 .	Malondialdehitin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.6.	NO enzimlerinin sentezi(50)	23
Şekil 2.7.	DNA'da oksidatif hasar ve olası sonuçları	25
Şekil 2.8.	8-OH-dG'nin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.9.	Guaninden modifiye baz olan 8-OHdG' nin oluşumu (52)	27
Şekil. 3.1.	Punisik asitin kimyasal yapısı	38
Şekil.3.2.	Linoleik asitin kimyasal yapısı	38
Şekil. 3.3.	Oleik asitin kimyasal yapısı	38
Şekil.3.4.	Palmitik asitin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 4.1.	Grupların plazma MDA değerleri.	49
Sekil 4.2.	Gruplarda plazma NO değerleri	50

Sayfa No

Şekil 4.3.	Grupların eritrosit SOD aktiviteleri	51
Şekil 4.4.	Grupların eritrosit CAT aktiviteleri.....	52
Şekil 4.5.	Gruplarda eritrosit GSH-Px aktiviteleri	53
Şekil 4.6.	Gruplarda serum 8-OH-dG değerleri	54
Şekil 4.7.	Grupların serum BUN değerleri	55
Şekil 4.8.	Grupların serum glukoz değerleri	56
Şekil 4.9.	Grupların serum HDL değerleri	57
Şekil 4.10.	Grupların serum kolesterol değerleri	58
Şekil 4.11.	Grupların serum kreatinin değerleri	59

Şekil 4.12.	Grupların serum trigliserid değerleri	60
Şekil 4.13.	Grupların serum LDL değerleri.....	61
Şekil 4.14.	Grupların serum Ürik asit değerleri	62
Şekil 4. 15.	Grupların serum total bilirubin değerleri.....	63
Şekil 4.16.	Grupların serum ALT aktiviteleri	64
Şekli 4. 17.	Grupların serum AST aktiviteleri.....	65
Şekil 4. 18.	Grupların serum ALP aktiviteleri	66
Şekil 4.19.	Grupların serum total protein değerleri	67
Şekil 4. 20.	Grupların serum albümin değerleri	68

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ALT	: Alanin amino transferaz
ALP	: Alkalen fosfataz
AST	: Aspartat amino transferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
TCHQ	:Tetraklorohidrokinon
BUN	: Kan üre nitrojen
HDL	: High density lipoprotein
LDL	: Low density lipoprotein
8-OH-dG	: 8-hidroksideoksiguanozin
CAT	: Katalaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
L [•]	: Lipid radikali
L-OO [•]	: Lipid peroksi radikali
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik oksit
OH	: Hidrojen peroksit
PCP	: Pentaklorofenol
SOD	: süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TCA	:Trikloroasetik asit
XO	: Ksantin oksidaz
O	: Oksijen
Na	: Sodyum
ÖD50	: Öldürücü doz 50

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmada ilaç, ksenobiyotik ve diğer kimyasal maddelere maruz kalma sonucunda hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksitler gibi etkin oksijen grupları oluşur. Canlı organizmada serbest radikaller tarafından DNA, proteinler, hücre zarı gibi yapılarda şekillenen hasar, oksidatif stres olarak tanımlanır.

Günümüzde serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı çeşitli antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Nar meyvesi esas olarak Hindistan, İspanya, İsrail gibi Akdeniz ülkelerinde ve Amerika'nın Kaliforniya bölgesinde yetişen bir bitkidir. Genelde taze meyvesi ya da suyu gibi ürünleri tüketilebilen bir meyvedir. Sağlık açısından yararlı etkileri olduğu antik çağlardan bu yana savunulmaktadır. Günümüzde içerdiği sağlık açısından faydalı biyoaktif bileşenlerden dolayı 90'dan fazla türetilmiş patentli nar ürünü mevcuttur (1). Nar çekirdeği yağı da narın, bilinen antioksidan etkisi başta olmak üzere, çok yönlü biyolojik etkileri olan önemli bir maddedir. Son dönemlerde yapılan araştırmalar nar çekirdeği yağının hem *in vivo* hem de *in vitro* modellerde serbest radikallere karşı etkili bir koruma sağladığını ve oksidatif stresin organlarda oluşturduğu zararlı etkileri düşürdüğünü ortaya çıkarmıştır.

Pentaklorofenol uzun yıllardır insektisit, fungisid, bakterisid, herbisid, molluskisid gibi etkilerinden yararlanmak amacıyla ağaç ve ağaç ürünleri, kağıt, deri, tekstil boya ve tutkal, plastik, fotoğrafçılık, iplik, naylon gibi sanayi alanları ile geniş tarım alanlarının ilaçlamasında fazla miktarlarda kullanılmaktadır. Dünyadaki yıllık üretiminin 50-90 bin ton olduğu bildirilmektedir (2,3). Türkiye'de üretim ve kullanım alanlarıyla ilgili kesin bir bilgi mevcut değildir.

Bu çalışmada pentaklorfenolün ratlarda oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve bazı biyokimyasal parametrelere etkisi ile nar çekirdeği yağının olası antioksidan etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PENTAKLOROFENOL

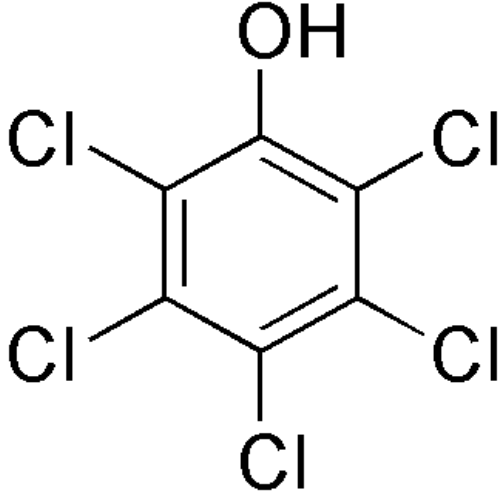
Özellikle ağaç endüstrisinde fungusid olarak kullanılan klorfenollerin en önemli üyeleri triklorofenol, pentaklorofenol, sodyum pentaklorofenattır. Pentaklorofenol (PCP) yabancı ot ve karınca kontrolünde de kullanılır (2). Bu maddelerin türevleri niteliğindeki ürünler de çeşitli endüstri dallarında yan ürün olarak elde edilir (3).

Pentaklorofenol geçmişte fungusid, bakterisid, herbisid, molluskisid, algesid ve insektisit olarak yaygın olarak kullanılmış bir maddedir. Günümüzde daha çok ağaç endüstrisinde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ağaç koruyucu olarak kullanılması 1930'lu yıllarda başlamıştır. Sadece Amerika'da 1947'de yaklaşık 3200 ton üretildiği rapor edilmiştir. Ağaç endüstrisi dışında kullanımı 1987'de yasaklanıp kullanımına kısıtlama getirilerek herbisid, defoliant ve dezenfektan olarak kullanılmasına izin verilmiştir. Pestisid olarak PCP'nin satışı da kısıtlı olup sadece kullanım sertifikası olan kişilerce uygulanmasına izin verilmektedir. Ağaç endüstrisinde % 5'lik solüsyonlar halinde kullanılmaktadır (4).

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Renksiz, kristalize bir madde olan PCP (2,3,4,5,6- pentaklorofenol) suda az, etanol, metanol, dietil eter gibi organik çözücülerde genellikle iyi çözünen yanıcı olmayan fenol türevi bir maddedir. PCP'nin sodyum tuzunun suda çözünürlüğü biraz daha fazladır (5).

Molekül ağırlığı 266.34, 20 °C de yoğunluğu 1.978 g/ml, pH'sı 4.99, kaynama noktası 309 °C'dir (2, 4, 6).



Şekil 2.1. Pentaklorofenol' ün kimyasal yapısı

2.1.2. Çevre Dayanıklılığı

Toprakta orta derecede kalıcı olan PCP'nin parçalanma yarı ömrü 45 gün kadar olmakla birlikte topraktaki organik madde zenginliği, oksijen noksanlığı ve ısıнын yükselmesi parçalanmayı hızlandırır. Nötral ve alkali ortamlarda toprağa çok az tutunur; bu sebeple topraktaki hareketi kolaydır ve su kirliliğine sebep olur. Sudaki parçalanma yarı ömrü birkaç saatle bir gün arasında değişir. Ancak sulu ortamlarda ve suda, askıdaki maddelere tutunur (2,3). Çevrede orta derecede kalıcı olan bir maddedir. Parçalanma yarı-ömrü 45 gün kadardır. Toprağın organik madde yönünden zenginliği, oksijen bulunmayışı ve ısı arştı parçalanmasını hızlandırır. Sudaki parçalanma yarı-ömrü birkaç saatle 24 saat arasında değişir (2).

2.1.3. Etki Şekli

Klorofenoller metabolizma zehiri olarak etki gösterirler. Bu maddeler mitokondrilerde elektron taşıma zincirini etkilemeden ATP üretimini azaltır. Böylece oksidatif fosforilasyon kenedini kırarak elektron taşıma zincirinden oluşan enerji, metabolizma yerine vücut ısısında kullanılır. Vücut ısıı yükseldikçe ısı dağıtım mekanizmaları yenilir, ısı giderek artar, metabolizma hızlanır ve hücrelerde ADP yoğunluğu artar. Artan yoğunluktaki ADP ile elektron taşıma zinciri uyarılır. Elektron taşıma zincirine daha çok oksijen girerek ATP üretimi artar ve enerji açığa çıkar ki oluşan enerjinin çoğu ısı üretiminde kullanılır. Bu döngünün sonucunda vücut ısısında aşırı bir yükselme ortaya çıkar. Pentaklorofenol, ticari formu içinde bulunan dioksinler, dibenzonitrofuraneler gibi kirleticilerden dolayı, özellikle glia hücrelerinde süperoksit dismutazın (SOD) etkinliğini artırırken glutasyon miktarını azaltır (2, 7, 8).

2.1.4. Zehirliliği

Pentaklorofenol hayvanlar için zehirli (sınıf Ib) bir maddedir. ÖD₅₀ dozu sıçanlarda ağızdan 25-210 mg/kg, farelerde 74-130 mg/kg, tavşanlarda 70-300 mg/kg'dır (Tablo 2.1). Solunum yolundan maruz kalındığında orta dereceli zehirlidir. Su kirliliğine sebep olduğu için su canlıları açısından oldukça

önemli bir zehirdir. Balık, yosun, omurgasızlar gibi canlıların vücudunda suya göre 10000 kat miktarda birikebilir (2). Bütün türler için diyetle akut zehirlenme için belirlenen doz 30 mg/kg/gün, kronik zehirlenme için belirlenen doz 1,5 mg/kg/gün olarak bildirilmiştir (4).

Tablo 2.1. Pentaklorfenolün zehirliliği (4).

Zehirlenme Tipi	Sonuçlar	Zehirlilik Kategorisi
Akut Oral Zehirlenme	LD50= 155mg/kg(erkek) LD50= 137 mg/kg(dişi)	II
Akut Dermal Zehirlenme	LD50> 3980 mg/kg	IV
Akut Solunum Yoluyla Zehirlenme		I
Birincil Göz İritasyonu	Damlatma sonrası 7. Günde korneal bağlanma	II
Birincil Dermal Hassasiyet	Uygulamadan 72 saat sonra orta şiddetli iritasyon	III

Pentaklorofenol maruziyetinde hedef organlar karaciğer, böbrek ve kemik iliğidir (6). Madde hasar görmemiş deri ve akciğerlerden de emilebilir; deri ve mukozalar için iritan bir maddedir (8). Kemirgenlerde en önemli hedef organ karaciğerdir. Karaciğerde maruz kalınan doza bağlı olarak biyokimyasal (porfiri, hepatik P450 enzim aktiviteleri, serum karaciğer enzim aktiviteleri ve glikojen düzeyi) parametreler ve canlı ağırlıkta azalma ile birlikte karaciğer mikroskobisinde bazı değişiklikler (hiperpilazi, fibrozis, pigmentasyon, dejenerasyon, karaciğer hücrelerinde genişleme ve nekroz) görülür. Kemirgenlerde akut zehirlenme durumlarında oksidatif fosforilasyon zincirinin kırılması nedeniyle hipertermi, kaslarda tremor, spazm ve refleks kaybı ile solunum felci sonrasında ölüm gözlenir. Akut zehirlenme belirtileri hemen hemen bütün hayvanlarda aynıdır. Kronik zehirlenmelerde ise canlı ağırlık kaybı, karaciğer yağlanması ve nekrozu gözlenir. Pentaklorofenole maruz kalmış rende talaşın altlık olarak kullanıldığı etçi piliçlerde iştahsızlık, civcivlerde immun sistemde baskılanma, yaban domuzlarında fertilite kaybı görülebilir (6, 8).

Hayvan çalışmaları PCP'nin böbrekte ikinci derecede etkiler oluşturduğunu açığa çıkarmıştır. Rodentlerde sıklıkla rapor edilen diğer bir zehirlenme belirtisi böbrek ağırlığında artıştır. Yemlerine PCP katılan süt veren ineklerde böbreklerde büyüme ve interstisiyel nefrit, hiperemi, glomeruler atrofi gibi mikroskopik değişimler görülmüştür. Zehirlenme vakalarında kanda da değişimler ortaya çıkmaktadır. Maddenin ineklerde anemiye yol açtığı, sıçanlarda eritrosit sayısında, hemoglobin konsantrasyonunda ve hematokrit değerlerinde azalmaya neden olduğu ortaya konulmuştur (6).

Ağaç sektörlerinde çalışan insanlarda da PCP'ye bağlı deri döküntüleri, merkezi sinir sistemi ve solunum sistemi bozuklukları ile birlikte çok yüksek ateş görülür. Kan tablosunda ise aplastik anemi, hematokrit seviyesinde düşüş ve hematüri görülür (4,6). pentaklorofenolün fetotoksik olduğu ancak teratojenik olmadığı kabul edilirken, erkek fertilizasyonu üzerine etkisi olmadığı düşünülmektedir (4,6).

2.1.5. Toksikokinetik

Pentaklorofenol sindirim kanalı, deri ve solunum yollarından hızlı ve iyi emilir. Karaciğerde metabolize olur. Sıçanlarda metabolizasyonu oksidasyon yoluyla olmaktadır. Deklorinasyonu ise mikrozomal enzimler aracılığıyla olmaktadır. Pek çok çalışma PCP'nin sitokrom P450 enzimleri yoluyla metabolize edildiğini göstermektedir (6,9).

Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır ve tüm vücuda dağılır. Kısmen yağ doku, karaciğer ve böbrekte biriken PCP'nin hedef organları karaciğer, böbrek ve kemik iliğidir. Sıçanlarda PCP'nin esas hedef organı ise karaciğerdir. Atılımı yüksek oranda böbrek (yaklaşık % 90), düşük oranda ise barsaklarla (yaklaşık % 3' ü feçesle) olur. Diğer metabolitleri ile birlikte rodentlerde %62- %83 oranında başlıca idrarla atılır. Sıçan ve farelere tek doz uygulanan PCP 6-27 saat arasında bir yarılanma ömrüne sahiptir. Ancak ikinci doz daha yavaş bir eliminasyon fazı geçirerek 33- 374 saatlik bir yarılanma ömrü gösterir. Maymunlardaki yarılanma ömrü sıçanlardan daha uzundur (41-92 saat) (6).

2.1.6. Çevre Kirliliği

Endüstride kullanılan PCP'nin çevresel akibeti ve taşınması kimyasal yapısı ile fiziksel özelliklerine bağlı olarak toprak ve su aracılığıyla olur. pH 4-9 arasındaki ortamlarda hidrolitik (suda parçalanma) özellik gösterir. Özellikle yüzey sularında gün ışığının da etkisiyle hızla indirgenir. Bu indirgenme yüksek pH da daha hızlı olur. Toprak kirliliği ise; buharlaşma, yıkama, uygulama yoluna bağlı olarak (basınç ya da termal yoldan uygulama gibi) uygulama havuzundan dışarıya temas edebilir. Bu şekilde çeşitli yollarla PCP toprağa göç edebilir (5).

Gıdalarda kirletici olarak bulunup bulunmadığı Amerikan Gıda İlaç Dairesi tarafından 1991 yılına kadar takip edilmiştir. 1992 yılında gıdalarda tespit edilebilir bir kalıntı olmadığı sonucuna varılarak bu takipler sonlandırılmıştır. Ağaç endüstrisinde koruyucu amaçlı kullanılmaya başlanmasından bu yana genel tüketime yönelik satışı yapılmayan PCP'nin çocukların kullandığı sosyal alanlarda ve konutlarda risk oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak suda çözünebilmesi ve toprak yoluyla yüzey sularına taşınması nedeniyle içme suyunda en fazla bulunmasına müsaade edilen değer yetişkinlerde 10,465 ppm, 1-6 yaş arası çocuklarda 2,990 ppm'dir (4). Ağaç ham maddesi işleyen fabrikalardan çevreye PCP atık su tahliyesi esnasında veya gölet ya da baraj gibi birikintilere taşmasıyla kirlilik oluşturabilir. Bunun dışında PCP ile muamele edilen ağaçların süzdürülerek kurutulması, buharlaştırılması ya da

yıkanarak durulanması esnasında çevre kirliliği oluşabilir. Amerika’da 2008 yılı itibariyle 36 milyon adet PCP havuzu olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca her yıl yaklaşık 1 milyon havuzun bu amaçla kullanım için yapılmaktadır. Amerika Çevre Koruma Ajansının tahminine göre bu havuzlarda 374 kg PCP ve metabolitlerine eşdeğer toksin yıkama ve buharlaşma yoluyla çevreye karışmaktadır. Bu atıklar kalıtsal zehirlenmeye ve doğada uzun süreli kalıcılık ve kirlenmeye sebep olmaktadır (5).

2.2. NAR VE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI

Nar (*Punica granatum*) dünyada özellikle Akdeniz ve Asya ülkelerinin çoğunda yaygın olarak yetişen bir bitkidir. Ülkemizde Kuzey Anadolu’da yabani olarak yetiştiği gibi Akdeniz Bölgesinde meyvesi için de yetiştirilir (10-13).

Nar ağacı boyu 4,5-5 m olan oldukça uzun süre yaşayan, çalı şeklinde bir ağaçtır. Çiçekleri büyük, kırmızı, beyaz ya da bazen karışık renkli ve sonunda meyve yapısına dönen tüp şeklinde bir koni yapısına sahiptir. Olgun meyvelerin çapı 12-13 cm, koyu kırmızı, üzeri deri benzeri kızıl-sarı renkli bir kabukla kaplı, küre şeklinde ve tepesinde çanak şeklinde bir taç yapısına sahiptir. Taneleri beyaz bir çekirdek yapısına sahiptir ve üzeri zar yapısıyla kaplıdır (13).

Nar tanesi üç kısımdan oluşur: Çekirdek kısmı meyvenin yaklaşık % 3’ünü oluşturur ki bunun da yaklaşık % 20’sini yağ oluşturur. Su kısmı meyve ağırlığının yaklaşık % 30’unu oluşturur (12).

Narın meyvesi dışında, ağacının kabuğu, meyve kabuğu, çiçeği, meyve suyu ve çekirdeğinden de faydalanan bir bitkidir (10).

2.2.1. Kimyasal Yapısı

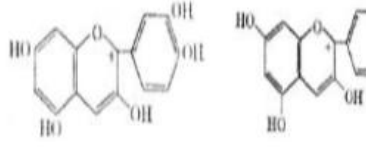
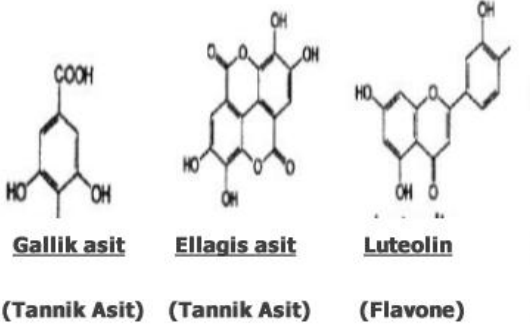
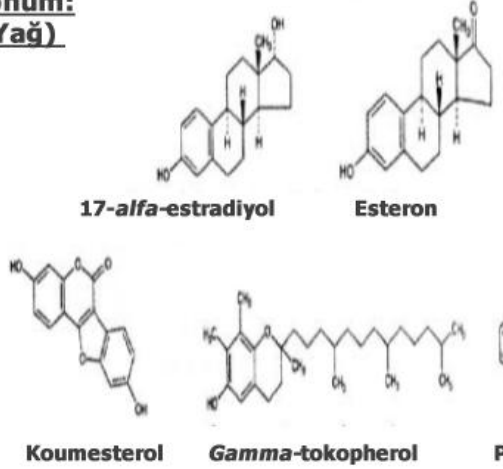
Son on yıl boyunca farmakolojik etki mekanizmaları önemli ölçüde ortaya konulmuş olan narın bu etkilerinden, içeriğindeki çeşitli kimyasal bileşenlerinin sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Nar bitkisinin farklı bölümüne ait ekstraksiyonlarının ayrı bir tedavi edici etkinliği olduğu bildirilmiştir (11). Nar bitkisinin çeşitli kısımları ve kimyasal içerikleri tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Nar bitkisinin çeşitli kısımları ve kimyasal yapısı (11)

Bitki Bileşeni	Kimyasal Bileşenler
Nar suyu	Antosiyaninler, glikoz, askorbik asit, ellagik asit, kateşin, kuersetin, rutin, çok sayıda mineral, demir, amino asitler
Nar çekirdeği yağı	% 95 punisik asit, yağ asitleri, steroller, ellagik asit
Nar meyve örtüsü (kabuk ve iç zarlar)	Fenolik maddeler, gallik asit ve diğer yağ asitleri, kateşin, kuersetin, rutin, antosiyanidler, flavanoller
Nar yaprağı	Taninler (punikalin ve punikafolin), flavon glikozidleri,
Nar çiçeği	Gallik asit, ursolik asit, tritepenoidler, diğer isimlendirilememiş bileşikler
Nar kabuk ve kökü	Ellagitininler, çok sayıda piperidin alkaloidleri

Nar çekirdeğinin temel bileşenleri monoasilgliseroller, gliseridler ve steroller, ek olarak proteinler, pektin ve şekerdir (14). İçerisinde kampesterol, γ - tokoferol ve 17- α - östradiol gibi bileşenler bulunmaktadır (15). Nar çekirdeği yağı (NÇY) konjuge yağ asitleri bakımından (linoleik ve linolenik yağ asitleri) oldukça zengindir. Konjuge linolenik asit (%11t,13c-CLNA); punisik asit pek çok bitkisel yağda az miktarda bulunan bir bileşendir. Ancak NÇY’de konjuge linolenik asit % 40-80 oranında bulunmaktadır (16). NÇY’de yaklaşık % 64-95 oranında bulunan punisik asit (trikosanik asit) uzun zincirli ω -5 doymamış yağ asitidir. Bu maddenin narın antikanserojen etkileri ile ilgili olduğu bilinmektedir (11,17,18). Bitkisel steroller de (örneğin beta-sitosterol, kampesterol, stigmasterol) NÇY’de yüksek miktarda (4089-6205 mg/kg) bulunur (16).

Nar meyvesinden elde edilen ürünlerde piperidin alkaloidleri, piperidin türevi ikincil aminoketonlar, tanen, gallik asit, uçucu yağ, reçineli maddeler ve triterpenik asitler de bulunmaktadır. Alkaloid yoğunluğu % 0,28-0,48 arasındadır ve tannik asitli tuzları şeklinde bulunurlar (10,13).

Meyve suyu :**Siyanidin****Delfinidi****(Antosiyanin)****(Antosiyanin)****Kabuk:****Gallik asit****Ellagis asit****Luteolin****(Tannik Asit)****(Tannik Asit)****(Flavone)****Tohum:
(Yağ)****17-alfa-estradiyol****Esteron****Koumesterol****Gamma-tokopherol****P****Şekil 2.2.** Narın bileşiminde bulunan kimyasal maddeler ve yapıları (15).

Ellagik asit narda yoğun olarak bulunan, antikarsinojen ve antioksidan özelliğe sahip bir maddedir ki çoğu ticari nar ekstraktında en az % 40 düzeyinde bulunması istenir (11). NÇY toplam çekirdek ağırlığının yaklaşık % 12-20'sini oluşturmaktadır. Yağın yaklaşık % 80'i oktadekatrienoik yağ asiti, % 7'si ise linoleik asitten oluşur. Yağ asiti bileşiminin % 95'ini ise triasilgliseroller oluşturur. Çekirdek matriksi ise antioksidan etkili lignin türevleri ve hidroksisinamik asitten oluşur. Nar suyu güçlü antioksidan etkileri olan antosiyaninler ve flavonoidlere bağlı olarak parlak bir renge sahiptir. Narın su

ve çekirdek kısmında demir, kalsiyum, klor, kobalt, krom, bakır, potasyum, magnezyum, molibden, sodyum, selenyum, çinko, sezyum, rubidyum gibi mineraller bulunmaktadır (12).

2.2.2. Etkileri

Narın antikarsinojenik, antioksidan ve antienflamatuar etkileri dışında pek çok farmakolojik etkileri bulunmaktadır:

2.2.2.1. Antioksidan Etkileri

E vitamini içeriği oldukça yüksek olan nar çekirdeği yağı antioksidan polifenoller açısından da oldukça zengindir. NÇY konjuge yağ asitlerini bünyesinde bulunduran ender maddelerden biridir (11). Nar suyu ve çekirdeğinin ekstraksiyonları üzerine yapılan dört ayırıcı test sonucunda antioksidan kapasitesinin kırmızı şarap ve yeşil çaya göre 2-3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Rosenblat ve ark. yaptığı çalışmada yağlı diyetle 4 ay boyunca beslenen ve ateroskleroz geliştirilen farelere nar meyvesinin içeriğinde bulunan gallik asiti 17 ve 51,5 µg equiv/kg/gün dozunda uygulamışlar ve sonuçları değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda gallik asit verilen farelerde peritoneal makrofajlarda oksidatif stres belirteçlerinde düşüş gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Sadece su verilen grup verileri ile gallik asit uygulanan grup verilerini kıyasladıklarında hücresel lipid peroksidasyonda % 42 oranında düşüş, redükte glutasyon seviyesinde % 50 oranında artış olduğunu belirlemişlerdir (19). Gil ve ark. nar suyunun antioksidan aktivitesini dört farklı metodla ölçerek elde edilen sonuçları kırmızı şarap ve yeşil çayın antioksidan aktivitelerine kıyasla değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre nar suyunun aktivitesi kırmızı şarap ve yeşil çaya göre üç kat daha fazla çıkmıştır (20). Schubert ve ark. fermente nar suyu ekstraksiyonu ve soğuk pres nar çekirdeği yağı ile yaptıkları *in vitro* çalışmada, nar ürünlerinin kuvvetli antioksidan kapasitelerinin kırmızı şaraba göre yüksek, yeşil çay ektratına göre benzer oranda çıktığını bildirmişlerdir. Nar çekirdeği yağından ekstrakte edilen flavanoidler koyun siklooksijenaz enzimlerini %31-44 oranında, soya lipoksijenaz enzimlerini ise %69-81 oranında inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Narın fermente suyundan elde edilen flavanoidlerin ise soya lipoksijenaz enzimlerini %21-30 oranında inhibe ederken, koyun siklooksijenaz enzimini inhibe etmediğini tespit etmişlerdir (21). Murthy ve ark. yaptığı çalışmada kurutulmuş nar kabuklarını metanol ile ekstrakte ederek bir grup ratı bu ekstraksiyonla beslemişler, diğer gruba ise karbon tetraklorür (CCl₄) uygulamışlardır. Daha sonra iki grubun karaciğer katalaz (CAT), SOD ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerini kıyaslamışlardır. Tek doz (2 g/kg/ca) CCl₄ uygulanan grubun CAT, SOD ve peroksidaz seviyeleri sırayla % 81, 49 ve 89 oranında düşüş meydana getirirken lipid peroksidasyon değerlerinin 3 kat artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Nar kabuğu ekstraktının 14 gün süresinde uygulanan ve son gün ilave olarak CCl₄ uygulaması yapılan grubun CAT, SOD, peroksidaz seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında lipid peroksidasyon değerlerinin % 54 oranında gerilediğini belirtmişlerdir (22).

2.2.2.2. Antikarsinojen Etkileri

Flavanoidler ve taninler kanser hücrelerinin büyümesini *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda konjuge linoleik asit olarak bilinen yağ asitleri üzerinden baskılar (15). Malik ve ark. yaptığı iki farklı çalışmada üç seri prostat kanser hücresinde *in vitro* uygulanan çeşitli nar ekstraktlarının (nar suyu, çekirdek yağı ve kabuğu) prostat kanser hücrelerinin hücre döngüsünün bozulmasına bağlı olarak invazyon ve proliferasyonu ile apoptozisini baskıladığını ve tümör gelişimini geriletliğini; farklı nar ürünleri ekstraktı karışımlarının daha güçlü etkili olduğunu belirtmişlerdir (23,24).

2.2.2.3. Antienflamatuvar Etkileri

Antik çağda nar; çok çeşitli sistemlerin hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Eski Hindistan’da nar meyvesi için “kendi başına bir eczane” tanımlaması yapılmıştır. Bu kapsamda antiparaziter, kanı sulandırıcı, aft, diyare ve ülserde iyileştirici olarak kullanılmıştır. Nar ayrıca Orta Doğu ve Hindistan’da diyabet için çare olarak kullanılmıştır (11, 12).

Geçmişte narla ilgili yapılan çalışmaların pek çoğu narın antioksidan aktivitesiyle ilgili olup, son yıllarda nar suyu, NÇY, kabuğu ve çiçeğinden elde edilen ekstraktlarının antibakteriyal, antiviral, antidiyabetik ve antikanser etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur (12). Nar ve nar ürünlerinin ishal, dental problemler, erektil disfonksiyon ve infertilite, ultraviyole radyasyondan korunma, yenidoğan beyin iskemisi, Alzheimer hastalığı, artirit ve obezite durumlarında da faydalı etkileri olduğu bildirilmektedir (11, 12).

2.2.3. Olası İlaç Etkileşimleri

Hidaka ve ark. nar meyvesini de içine alan farklı tropikal meyvelerin sitokrom P450 3A üzerindeki etkinliğini incelemişler; insan karaciğer mikrozomal enzimleri üzerinde baskılayıcı etkileri olduğunu tespit ettiklerini belirtmişlerdir (25). Yine Hidaka ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada nar suyunun karbamazepin üzerinde baskılayıcı etkisi araştırılmış, insan karaciğer mikrozomal enzimleri üzerinde nar suyunun inhibe edici etkinliğinin üzüm suyuna benzer bir etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *in vivo* olarak ratlarda karbamazepin farmakokinetiği üzerine nar suyunun etkilerini incelemişler; 50 mg/kg oral karbamazepin alımından bir saat önce uygulanan 2 ml nar suyu alımının karbamazepin konsatrasyonunu yaklaşık 1,5 kat artırdığını bildirmişlerdir (26).

2.2.4. Nar Ekstraktlarının Zehirliliği

Nar ve ondan elde edilen diğer bileşenler yüzyıllardır hiçbir yan etki görülmeden güvenle tüketilmektedir. Vidal ve ark. tavuk embriyosunda yaptıkları çalışmada embriyolara 1, 2 ve 3 mg/ml dozunda nar ekstraktı uygulamışlar ve sonuçları Parkinson hastalığında kullanılan bir etken madde olan amandatin uygulanan diğer grupla ve sadece su uygulanan kontrol grubuyla kıyaslamışlardır. Ölüm oranının kontrol grubuyla benzer olması sebebiyle verilen dozların toksik olmadığı belirtilmiştir (27). Filippich ve ark. yaptığı çalışmada ise nar meyvesinin kimyasal yapısında da mevcut olan

punikalasinin karaciğer nekrozu ve böbrek toksisitesi oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada sariağaç olarak bilinen ve güney yarımkürede sık görülen bir ağaç türünün yapraklarıyla ruminantlarda meydana gelen zehirlenmelerde karaciğer lezyonu oluşturduğu; bu vakalarda uygulanan punikalasinin oral olarak verildiğinde intraperitoneal olarak uygulandığı durumlardan 20 kat daha fazla toksisite oluşturduğunu belirtmişlerdir (28). Cerda ve ark. ratlara farklı yoğunluklarda muhtemel toksik etkilerini araştırmışlar, 37 gün % 6'lık punikalasin içeren diyetle oral yoldan beslenen ratların plazma, karaciğer ve böbreklerinde punikalasin ve olası metabolitlerinin varlığını araştırmışlardır. Yoğunluğu düşük olan diyetle beslenmeye bağlı olabileceği düşünülmekle beraber hem kan parametrelerindeki antioksidan enzim düzeyleri açısından hem de karaciğer ve böbrek dokularının histopatolojisi açısından önemli bir değişim olmadığını belirtmişlerdir (3).

2.3. OKSİDATİF STRES VE LİPİD PEROKSİDASYON

2.3.1 Serbest Radikaller

Günümüzde serbest radikaller, oksijen radikalleri ve hastalıklara bağlı doku hasarı ya da ozon, nitrojen dioksit ve sigara dumanı gibi kirletici maddelere bağlı meydana gelen serbest radikaller, oksijen radikalleri ve oksidatif hasar oldukça ilgi çekmektedir (29). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (30, 31). Radikaller diğer moleküllerle çeşitli yollarla etkileşime girebilirler. İki radikal karşılaştığında kendi paylaşılmamış elektronlarını paylaşarak kovalent bağ oluştururlar. Pek çok biyolojik molekül radikal özellikte değildir ancak bir radikal ile karşılaşılarak bir elektron aldığında radikal özellik kazanır (30). Serbest radikaller organizmada hücre içinde mitokondrial solunum zincirinde ya da hücre dışında özellikle de fagositler tarafından oluşturulur (32). Organizmanın elektromanyetik radyasyona (X- ışınları, gama ışınları) ve partiküllü radyasyona (elektronlar, nötronlar) maruz kalması sonucu primer radikaller açığa çıkar. Buna ilaveten fotokimyasal hava kirliliği, hiperoksi, sigara dumanı, anestezikler, genel olarak aromatik hidrokarbonlar gibi çok çeşitli maddeler de serbest radikalleri oluşturur (33). Organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan maddelere ve doğal durumlarda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelebilirler (31, 33). Ancak oksidatif stres oksijenli hayatın kaçınılmaz bir geri dönüşümü olup, bütün organizmalar yine oksijeni kullanarak serbest radikallerden kendilerini korurlar (32)

Serbest radikaller; hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2\cdot^-$), nitrik oksit (NO), lipid peroksit ($\text{ROO}\cdot$) radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Oksidasyona neden olan serbest

radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, H_2O_2), hipoklorit asit (OCI^-), kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksitlerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Oksijen süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT, peroksidaz, GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar. Yine CAT etkinliğini engelleyen bazı maddeler de, etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırırırlar (31).

Tablo 2.3. Reaktif oksijen türleri (34)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil [$OH^{\cdot}$]	Hipoklorid [$^{\cdot}OCI$]
Alkoksil [$L(R)O^{\cdot}$]	Singlet Oksijen [ΔO_2]
Peroksil [$L(R)OO^{\cdot}$]	Hidrojen peroksit [H_2O_2]
Hidroperoksil [$HOO^{\cdot}$]	Hidroperoksit [$L(R)OOH$]
Süperoksit [$O_2^{\cdot-}$]	Peroksinitrit [$ONOO^{\cdot-}$]
Nitrik Oksit [$NO^{\cdot}$]	

Sigara, herbisid ve pestisidler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışınları, X ışınları, yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler, aşırı egzersiz sonucu fazla oksijen kullanımı ve iyonize radyasyon gibi etkenler sonucu oluşan serbest radikaller enflamasyon, glomerulonefrit, hepatit B ve romatoid artrit gibi çok çeşitli hücre ve organ sistemlerini içine alan hastalıkların patogenezinde de rol almaktadır (31, 32).

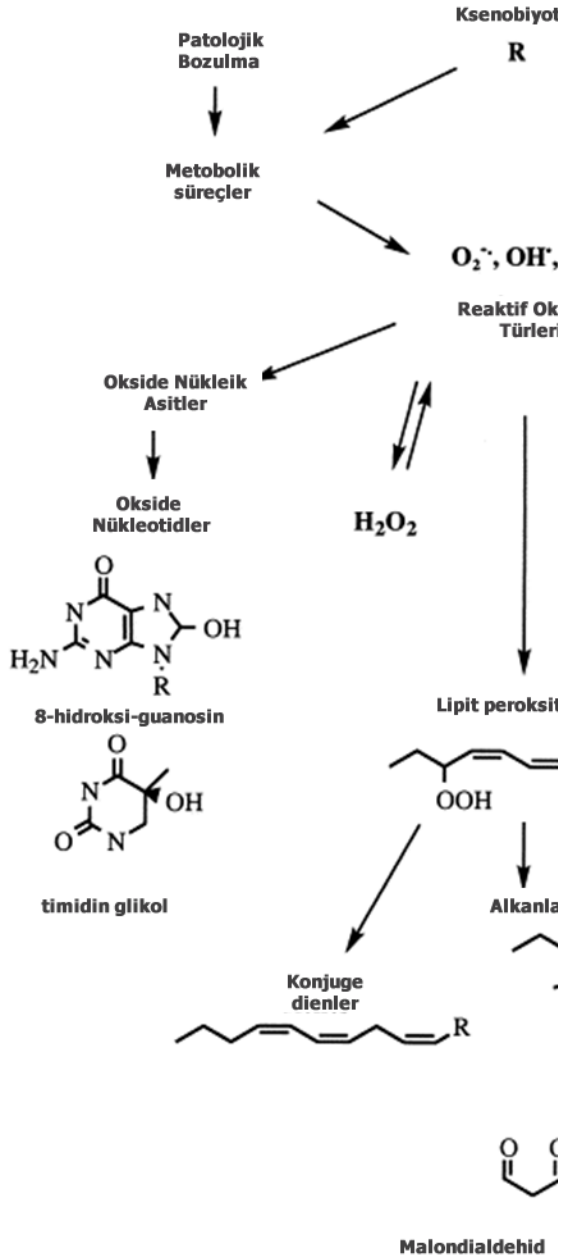
Tablo 2.4. Hasarlarla ilişkili Serbest radikal üretim şekilleri (32)

Iskemi/ reperfüzyon	Lipid peroksidasyon (enzimatik-nonenzimatik)
Termal hasarlar	DNA ve protein kırılmaları,
Travma, toksinler, radyasyona maruziyet	Metal iyonları açığa çıkması, serbest radikal formlarının

	uyarılması
Enfeksiyon ve aşırı egzersiz	Doğal antioksidanlarla müdahale

Oksijen radikalleri fosfolipidlerdeki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek pek çoğu protein ve DNA ile etkileşime giren pek çok ürün ortaya çıkarırlar (35). Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir (33).

Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve serbest azot radikalleri (SNR) biyolojik sistemde, sisteme yarar ve zarar anlamında iki role sahiptir. SOR yüksek konsantrasyonda bulunduğu; protein, lipid ve DNA' yı içeren hücresel yapıların oksidasyonunun yani oksidatif stresin aracısı olarak görev yapar. SOR' un zararlı etkileri ise enzimatik ve non- enzimatik antioksidanlarla dengelenir (36). Normalde hücrelerdeki en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondrial elektron transport zincirinden sızıntıdır. Reaktif oksijen türleri çeşitli serbest radikallerin oluşturduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller, peroksit radikalleri, alkoksi radikalleri ve sülfenil radikalleri gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna sebep olurlar (37).



Şekil 2.3. Serbest radikallerin hasar ürünleri (38)

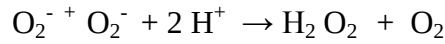
Reaktif oksijen türlerinin insanlar, hayvanlar, bitkiler ve alglerde normal metabolizma yan ürünü olarak meydana gelmesinin kaçınılmaz olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve bunun sonucunda meydana gelen oksidatif hasar, organizmada ışık, sıcaklık ve radyasyon gibi ciddi çevresel uyaranlar sonucunda ilk meydana gelen olay ve etki oluşturarak organizma için uyarı niteliğinde işlev görür (39). Moleküler oksijen (O_2), spinleri aynı yönde paylaşılmamış iki elektron taşıdığından, kararsız yapıdadır. Bu nedenle O_2 dışardan elektron alarak kararlı bir hale dönmeye çalışır. Aerobik canlılarda, moleküler oksijenin % 90'dan fazlası mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ile dört elektron

olarak tamamen suya redüklenmektedir (40). Ancak oksijenin kısmi redüksiyonu, O_2 , H_2O_2 ve OH^- gibi SOR' un oluşmasına yol açmaktadır (33).

2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan O_2^- , indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu meydana gelebilir. Oksijen bir elektron kazandığında O_2^- radikaline veya elektronla beraber bir de proton aldığında HOO^- dönüşür. Hidrofobik ortamda yüksek reaktivite gösterirken hidrofilik ortamlarda düşük reaktivite gösterir. Bu radikalın asıl önemi, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (37, 40).

Perhidroksil ($HO_2^\cdot$) radikali O_2^- ile reaksiyona girdiğinde biri okside olur, diğeri indirgenir (37). Dismutasyon adı verilen bu reaksiyonda, iki O_2^- radikalinden biri oksitlenirken, diğeri indirgenmekte ve böylece H_2O_2 ve O_2 oluşmaktadır Dismutasyon tepkimesi, spontan veya SOD ile enzimatik olarak gerçekleşebilir (41).



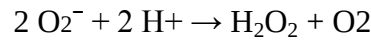
Süperoksit anyonu, hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom C ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyona girdiğinde indirgeyici davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur. Epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve H_2O_2 'ye indirgenir (37).

Katalitik siklusları sırasında birçok enzim serbest radikallerin açığa çıkışını sağlar. Bunlardan üzerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz olup, oksijenin H_2O_2 'ye redüksiyonu sırasında O_2^- radikalini meydana getirir. *In vivo* olarak oluşturulan iskemi, ksantinoksidazı dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüştürürken O_2^- radikalini açığa çıkarır (33).

Süperoksit anyonunun *E. coli* dihidroksiasit dehidrataz, akonitaz, 6-fosfoglokonat dehidrataz gibi pek çok bakteriyel enzimi de inaktive etme özelliği vardır. Bu durumun enzim aktif alanlardaki Fe-S kümelerine saldırarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bu radikalın mitokondrial elektron taşıma zincirindeki NADH dehidrojenaz yapısını inaktive ettiği idia edilmekle beraber, memelilerde bu reaksiyon mekanizması kesin değildir (29).

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit anyonunun çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur (37, 42). Ürat oksidaz, glikoz oksidaz ve D-amino asit oksidaz gibi pek çok enzim oksijenden iki elektron transferiyle H₂O₂ üretirler. Zayıf bir oksidan olup istenmeyen miktarı CAT, selenyum bağlı GSH-Px ve diğer peroksidazlar tarafından hücreden uzaklaştırılır (42). Normal metabolizmanın yanısıra hiperoksi, enflamasyon, radyasyonla artan oksijen metabolizması H₂O₂'nin oluşumunu artırır. Klinik uygulamalarda kullanılan birçok preparat oksijenin serbest radikallerini açığa çıkarabilir (33).



Bu reaksiyon sonucunda radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Gerçekleşmesi ya spontan olur ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. (37).

Hidrojen peroksitin toksik etkisini mitokondrial zarlar, peroksizomal zarlar ve plazma zarlarından kolaylıkla geçiş yaparak açığa çıktığı noktadan daha uzak dokularda güçlü bir biçimde gösterme özelliği vardır (33,41). Düşük mikromolar seviyeleri zayıf etkinliğe sahipken, yüksek seviyeleri hücresel enerji üretim sistemleri ve glikolitik enzim olan gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz enzimi gibi sistemler üzerinde ciddi etkiler oluşturur (29).

Deneyisel çalışmalar açıkça göstermiştir ki, O₂⁻ ve H₂O₂ tarafından meydana getirilen hasarın antioksidan savunma sistemleri tarafından düzeltilmesi sağlıklı bir aerobik hayat için temel bir durumdur (29).

2.3.1.3. Hidroksi Radikali (OH[•])

Suyun yüksek enerjili iyonizasyonu (radyolizis) sonucu oluşan en önemli üründür. OH[•] radikali son derece saldırgan bir radikal olup pek çok biyolojik molekülü etkileyebilir (42). Bu radikalın yarılanma ömrü çok kısadır (37). Bütün organizmalar OH⁻ maruziyeti sonucunda zarar görür; çünkü sudaki O-H bağlarının *in vivo* fizyonu sonucu oluşur. OH⁻ radikali reaktivitesi oldukça yüksek ve özel bir etkisizleştirici olmayan bir radikal olup, neredeyse bütün yaşayan organizmalar bu radikalle etkileşirler. Temel olarak bileşikler OH⁻ radikali ile etkileştiklerinde reaksiyon meydana gelir (29).

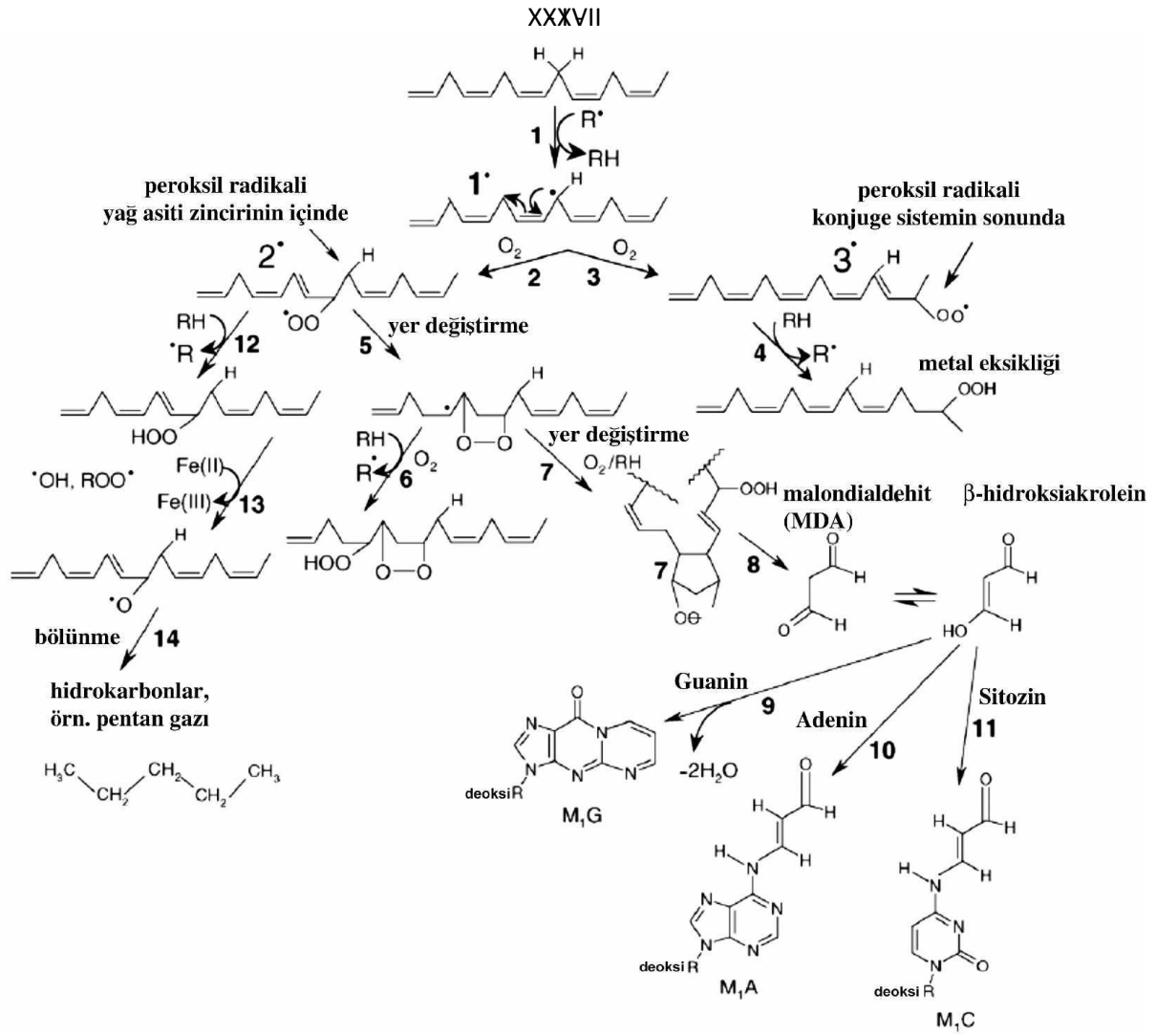
Hidroksi radikali reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştugu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikelleri ($RS\cdot$), karbon merkezli organik radikaller ($R\cdot$), organik peroksitler ($RCOO\cdot$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara sebep olur (37). Bu radikal ile meydana gelen hasarlar normal onarım yollarıyla üstesinden gelinebilecek ölçüde olmaz ve DNA'nın bütün yapıları $OH\cdot$ saldırısına maruz kalabilir (29).

2.3.1.4. Singlet Oksijen (ΔO_2)

Paylaşılmamış elektron içermediği için ΔO_2 bir serbest radikal olmamakla birlikte yine de son derece yüksek oksidan aktiviteye sahip bir oksijen formudur. ΔO_2 , fotokimyasal reaksiyonlarda son derece önem taşır (42). Bazı ışığa duyarlı maddeler örneğin eosin gibi boyalar, tetrasiklinler gibi ilaçlar, insan vücudundaki porfirin, riboflavin ve bilirubin gibi çeşitli maddeler üretilen ΔO_2 etkileşime girerek çeşitli dokularda hasara sebep olabilirler (30).

2.3.2. Lipid Peroksidasyonu

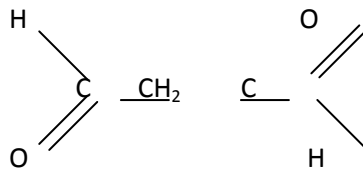
Serbest radikal etkisiyle yağ asiti zincirinden bir H atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanmaktadır. Bu şekilde oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılmasıyla dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu radikaller meydana gelir. Bu radikaller zar yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine ($LOOH$) dönüşür. Lipid peroksidasyonu lipid peroksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona erer (33). Böylece olay kendi kendine katalizlenerek yürümektedir. Lipid peroksidasyon çok çeşitli patolojik durumlara bağlı olarak gelişen, hücre zarları ve diğer lipid içeren biyolojik yapıları etkileyen otokatalitik ve dejeneratif bir süreçtir (43). Serbest radikaller hücre içerisinde protein, hücre zarı ve DNA gibi farklı yapılara zarar verir (44)



Şekil 2.4. Lipid peroksidasyon oluşumu(45)

2.3.2.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit lipid peroksidasyonun tespitinde en sık kullanılan belirteçdir (46). Lipid peroksidasyonun çok fazla miktarda açığa çıkan karbonil ürünlerinden bir tanesidir (35). Lipid peroksidasyon ve prostoglandin biyosentezinde doğal olarak meydana gelen mutajenik ve karsinojenik özellikli bir maddedir (47). Hücredeki lipid peroksidasyon ürünleri içinde çok sentezlenen üründür (48). Perokside olmuş lipidlerde oluşan en önemli aldehit bileşiklerinden biri olan MDA, kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehittir (Şekil 2.5).



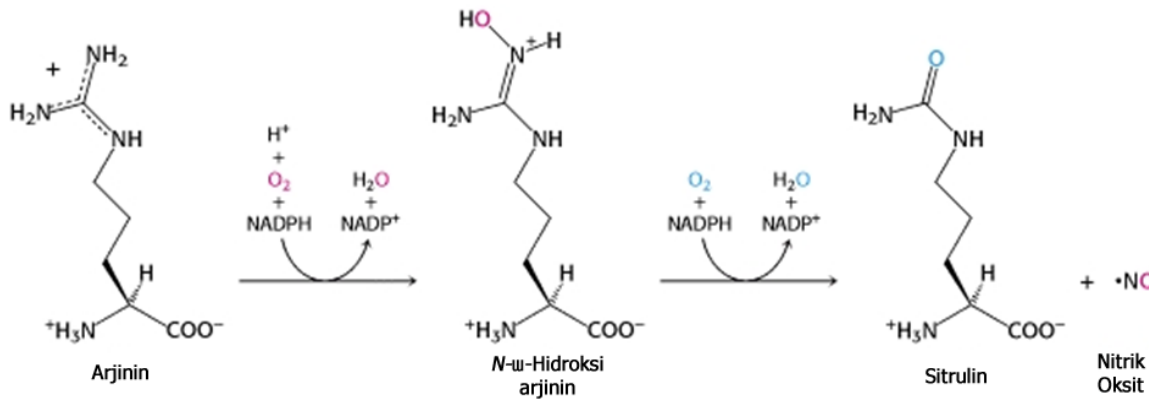
Şekil 2.5 . Malondialdehitin kimyasal yapısı

Trombositlerde araşidonik asit katabolizması esnasında büyük ölçüde reaktif olarak oluşan bir aldehittir. Ayrıca doymamış yağ asitlerinin non-enzimatik lipid peroksidasyonu sırasında da üretilir. MDA hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda proteinlerin serbest amino grupları ile posfolipidlerle, nükleik asitlerle tepkimeye girebilir (49). İnsan ve memeli hücrelerinde mutajenik etki, fare ve sıçanlarda karsinojenik etki göstermektedir (48).

Malondialdehit proteinlerin lizin kalıntılarıyla öncelikli olarak ve de bir dereceye kadar histidin, tirozin, arjinin ve metionin kalıntılarıyla bağ oluşturur (48). Reaktif oksijen türlerinin hücresel membranlarla etkileşiminden kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun en önemli belirtici olarak kabul edilmektedir. Miktar tayini tiyobarbütirik asit testiyle ölçülmekte lipid peroksidasyon düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. (33).

2.3.2.2. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit L- arjinin ve oksijenin NO sentetaz ile reaksiyonu sonucu oluşan ve ilk kez 1980'lerin sonlarında belirlenen bir biyolojik üründür. Sonraki dönemlerde bu enzimlerin izole edildikleri dokulara göre farklı biyokimyasal özellikler taşıdığı tespit edilmiştir. Bu iddiaya göre NO hangi dokuda üretiliyse orada özel düzenleme mekanizmasına sahiptir. Daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalar da bu enzimlerin karmaşık bir düzenleme mekanizması olduğu iddiasını desteklemiştir (50).



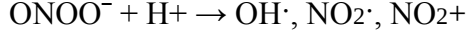
Şekil 2.6. NO enzimlerinin sentezi(50)

Süperoksit radikali NO gibi bazı hedeflerle hızlı bir reaksiyon oluşturarak yeni bir radikal oluşturabilir.



Nitrik oksit fagositler, beyindeki bazı hücreler ve damar endotel hücreleri tarafından *in vivo* üretildiği bilinen bir maddedir. Damarlardaki düz kas hücrelerinin tonusunu düzenleyerek kan basıncını düzenlemek ve nörotransmitter aktivitesini sağlamak gibi bazı fizyolojik görevleri yerine getirir. Nitrik oksitin kan damarlarındaki düz kas hücrelerini etkilemesi sonucu genişleyen damar duvarları O₂^{·-} radikali ile etkilendiğinde NO[·] tekrar devreye girerek damar

duvarlarını daraltır. Ancak bu durum klinik açıdan zararlı bir etkinin işaretidir. Süperoksit ve NO arasındaki yukarıdaki tepkime doğrultusunda meydana gelen etkileşim hücreler için de zararlıdır. Oluşan ONOO^- peroksinitrit hücreler için direk olarak zararlı olabileceği gibi hidrojenle tepkimeye girerek ayrıştığı ürünler vasıtasıyla da zararlı etki oluşturabilir (29).



2.3.2.3. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları

Peroksidasyonla açığa çıkan lipid hidroperoksitleri, peroksit radikalleri ve bunlardan oluşan ürünler, tıpkı SOR gibi, aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek, toksik etkilerini göstermektedirler. Oksidatif DNA hasarı gibi membran ve diğer hücresel komponentleri de kapsayan peroksidatif değişimler şeklinde direkt etki oluşturabilirler. Süperoksit dismutaz, GPx ve CAT metal iyonlarıyla etkileşime girerek daha aktif ürünler haline gelmeden önce peroksit ve süperoksitleri hücre içinden uzaklaştırırlar. Sonuçta enzimatik yıkımdan kaçan reaktif türler tarafından tetiklenen peroksidatif zincir reaksiyonlar askorbat, vitamin E ve koenzim Q gibi zincir kıran antioksidanlar tarafından enzimatik yıkımlanma ile yok edilirler. Dengesiz ROS üretimi iskemi-perfüzyon hasarı, aterosklerozis, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve alerji gibi pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynar. Antioksidan serbest radikal temizleme sistemi sekteye uğradığında enflamasyon, aşırıduyarlılık ve otoimmün bozukluklar oluşabilir. Aromatik aminler, aflatoksinler, östrojenler, fenol ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi ROS' a bağlı DNA hasarı oluşturan faktörler arttığında DNA hasarı oluşarak karsinojeniteye yatkınlık meydana gelir. Pek çok kanser türünün yaşlılıktaki dejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu bunun da hayat boyu toksik oksijenin devamlı etkisine bağlı bir hasar olduğu düşünülür (51).

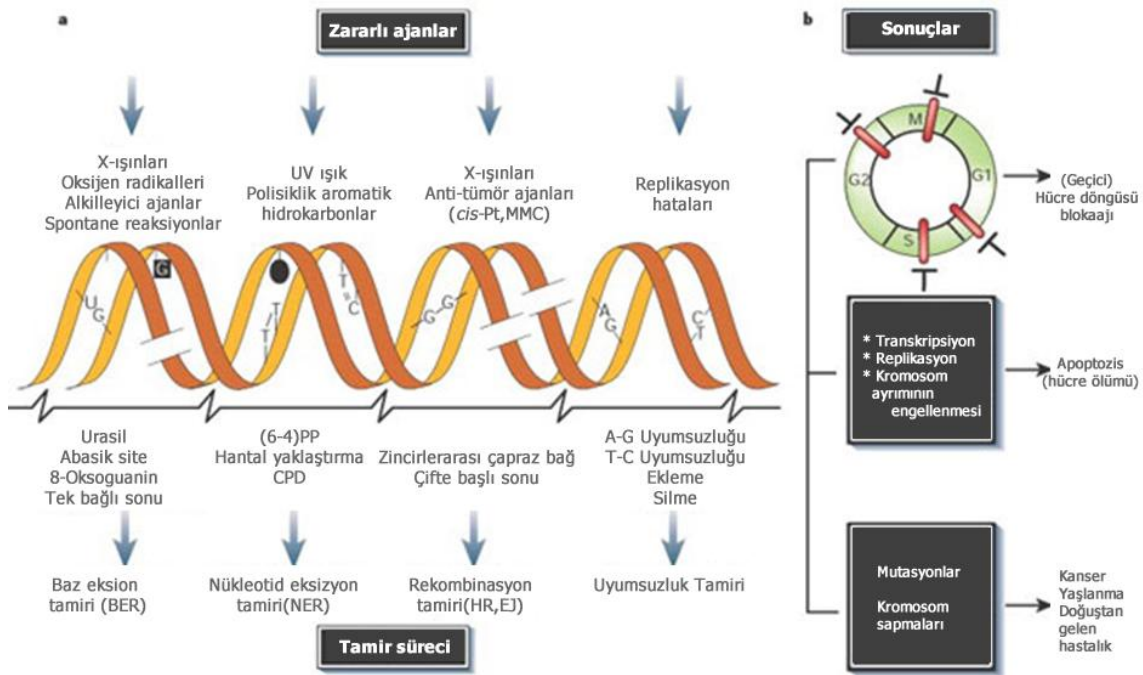
2.3.3. Oksidatif DNA Hasarı

Reaktif oksijen türlerinin ürünleri aerobik organizmaların hücrelerinde metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonlar gibi fizyolojik süreçlerin sonucunda sürekli olarak üretilirler. Endojen olarak üretilen ROS ve oksijen serbest radikalleri fizyolojik fonksiyonlar açısından öneme sahip olmakla beraber reaktif yapıları hücre zarlarında, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara sebep olabilir. Normal şartlar altında bütün aerobik organizmalarda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri ile endojen oksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Dengesizlik meydana geldiğinde oksidanlar DNA'da yaşlanma, kötü huylu tümörle ve diğer bazı dejeneratif hastalıklara sebep olabilen aşırı oksidatif hasara sebep olur (52). Bütün canlı hücrelerde hasar gören DNA enzimatik yollarla onarılarak eski

fonksiyonunu yeniden kazanır. Onarım yapılamadığında karsinojeniteye sebep olan DNA mutasyonları meydana gelebilir (52, 53).

Serbest radikaller içerisinde biyolojik moleküllerde ve DNA'da baz hasarı, şeker hasarı ve DNA-protein çapraz bağları gibi çok sayıda değişime sebep olan ürün $\text{OH}^\cdot$ radikalidir. Bu tip DNA hasarları oksidatif DNA hasarları olarak adlandırılıp mutajenez, karsinojenez ve yaşlanma gibi süreçleri içerir (53).

Oksidatif hasar sonucu DNA'da oluşan yapısal değişimlerin ilk basamağı zincir kırıklarıdır. Daha sonra baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme, kromozomda gen eksilmesi, baz katılımı, dizi amplifikasyonu gibi yapısal değişiklikler meydana gelir (54). DNA'da düşük düzeyde oluşan oksidatif hasar en düşük hata riski altında etkin bir biçimde onarılabilir. Ancak ROS doğrudan onarım enzimlerini ve DNA polimerazı okside ederse DNA onarım mekanizmasının etkinliği azalarak replikasyon doğru biçimde yapılamaz. Bunun sonucunda da kanser oluşabilir (55).



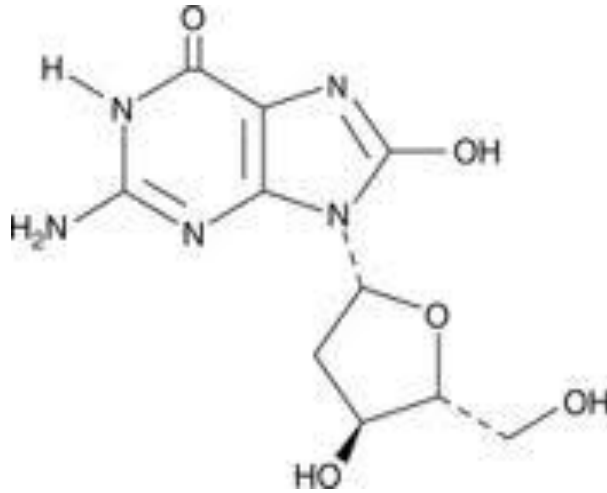
Şekil 2.7. DNA'da oksidatif hasar ve olası sonuçları

Ancak her DNA hasarı mutlaka kansere yol açmaz. Düşük düzeydeki hasarlar etkin bir biçimde onarılır, yüksek düzeydeki hasarlar ise hücre ölümü ile sonuçlanır. Bu durumda orta düzeydeki hasarın kanser oluşturma olasılığı daha yüksektir. Böyle durumlarda antioksidan savunma sisteminin güçlü olması oksidatif hasara karşı hücreyi korusa da kanser oluşumunun olasılığını artırır (56).

Oksidatif stres DNA üzerinde zincir kırıkları, pürin ve pirimidin bazlarının modifikasyonu, abazik bölge oluşumları, DNA-protein çapraz bağlanması, şeker hasarı, gibi çeşitli hasarlara sebep olur (57).

2.3.3.1. 8-Hidroksi-2-deoksi Guanosin (8-OH-dG)

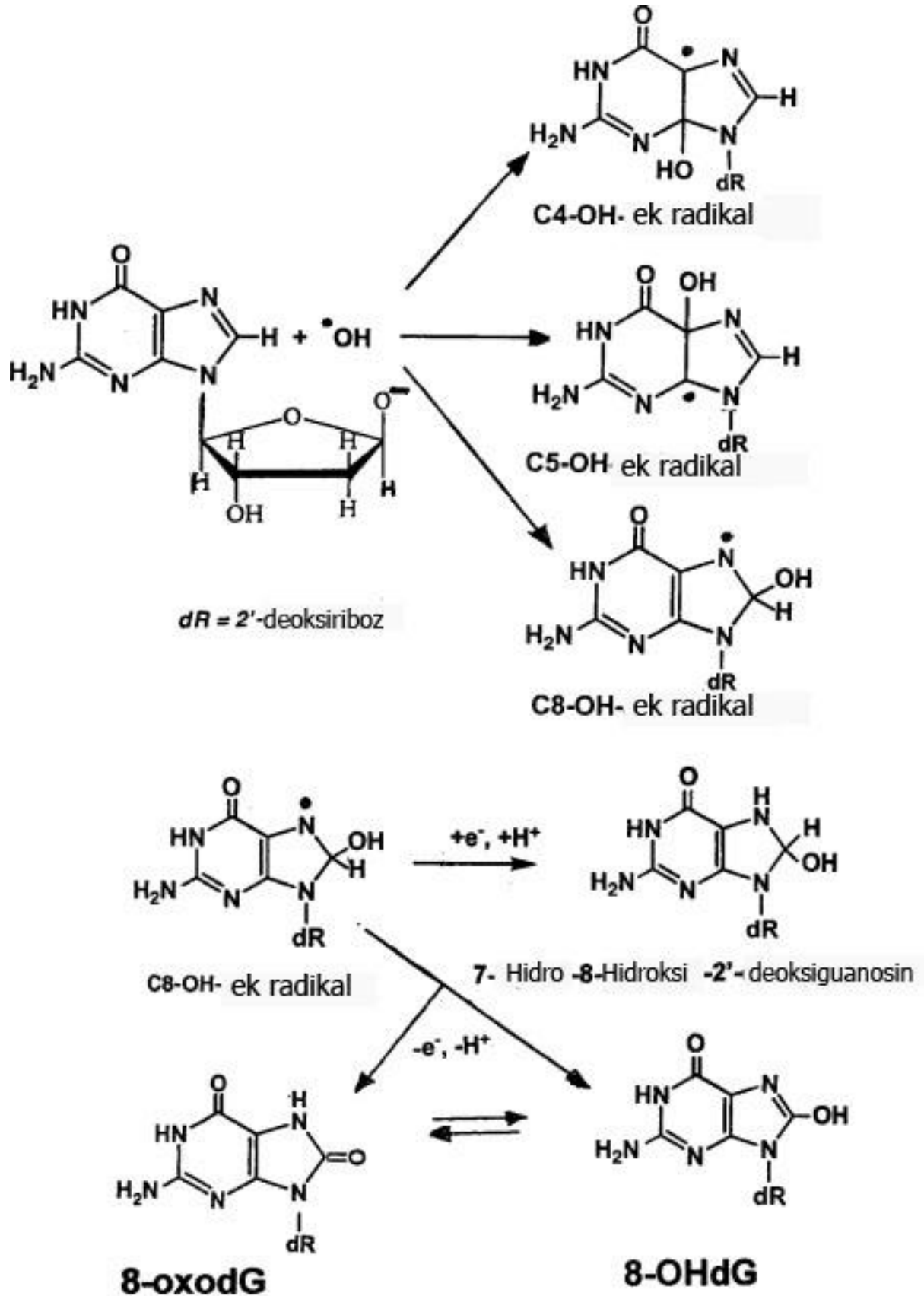
8-Hidroksi-2-deoksi Guanosin reaktif oksijen ve nitrojen türleri tarafından DNA'da oksidatif hasar oluşturan oksidatif stresin bir belirtici olarak bulunur. Guanosin hidroksilasyonu hem normal metabolik süreçlere hem de çeşitli çevresel faktörlere yanıt olarak oluşur. 8-Hidroksi-2-deoksi Guanosin seviyesindeki yükselme yaşlanma sürecine bağlı olmasının yanında kanser, diyabet, hipertansiyon gibi pek çok patolojik duruma da bağlıdır. Plazma, hücre lizati, dokular gibi karmaşık örneklerde 8-OH-dG nükleosidlerde serbest olarak bulunabileceği gibi DNA ile birleşmesi halinde de bulunabilir. Öncelikle kan böbreğe girdiğinde, büyük DNA kısımları kanda aynen kalmasına rağmen, serbest 8-OH-dG kolayca idrara filtre edilir. Plazmanın kompleks yapıda olması nedeniyle, idrar 8-OH-dG miktarını tayin etmede daha uygun matriks yapısına sahiptir. LC-MS'te yapılan analizlere göre idrarda bulunan 8-OH-dG miktarı 2,7-13 ng/mg iken plazma serbest 8-OH-dG miktarı 4-21 pg/ml olarak belirlenmiştir (58).



Şekil 2.8. 8-OH-dG'nin kimyasal yapısı

Protein, membran lipidleri, DNA gibi temel biyomoleküllerde hasara yol açan en önemli serbest oksijen radikali hidroksil radikalidir (52, 53). Bu radikal DNA zincirindeki guanin gibi temel bazlarla etkileşime girerek 8-OHGua (C8-hidroksiguanin) ya da nükleosid formu olan 8-OH-dG oluşumuna yol açar. Başlangıçta OH⁻ ile birleşme radikal eklentilerinin oluşumuna yol açarken sonra bir elektron ayrılır ve 8-OH-dG meydana gelir. 8-Hidroksi-2-deoksi

Guanosin lezyonları en sık rastlanan DNA lezyonları olup görece hızlı oluşur ve karsinogenezisin önemli bir belirteci olarak kabul edilir (52).



Şekil 2.9. Guaninden modifiye baz olan 8-OHdG' nin oluşumu (52)

2.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı organizmalar hidrojen peroksit, süperoksit gibi serbest radikalleri yıkılmayacak antioksidan sistemlerine sahiptir. Antioksidan savunma sistemi enzimleri aerobik hayat için oldukça önemlidir (29). Aerobik organizmalar lipid peroksidasyondan temel süreçte korunabilirler. Lipid peroksidasyon ürünleri DNA hasarına yol açabilecekleri gibi Na/K ATPaz ve glutamat taşıyıcılarını direkt olarak engelleyerek de etki oluşturabilir. Lipid peroksidasyondaki artış ya da antioksidanların koruma oranlarının düşmesi sonucu epoksitler meydana gelir; bunlar, doğal olarak hücrelerin nükleofilik merkezleriyle reaksiyona girerek DNA, RNA ve proteinlerle kovalent bağ oluştururlar. Bu gibi reaksiyonlar sitotoksikite, alerji, mutajenite ve/ veya karsinogeniteye yol açabilir. Ek olarak oksidatif olaylar eter lipidleri mekanizmasında önemli bir rol oynayabileceği gibi hücresel ilaç duyarlılığına da katkıda bulunabilir (51). Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin etkileri nonenzimatik ve enzimatik antioksidanlar ile dengelenmektedir. Antioksidan savunma serbest radikallerin doğrudan temizlenmesinde önemli rol oynarlar ve böylece organizmanın maksimum korunmasını sağlarlar (29). İyi bir antioksidan, özellikle serbest radikalleri temizleyebilmeli, redoks metallerle şelat yapabilmeli, diğer antioksidanlarla reaksiyona girebilmeli, gen ekspresyonu üzerine pozitif etkisi olmalı, kolaylıkla absorbe edilmeli, doku ve vücut sıvılarında yeterli konsantrasyonda olmalı ve sulu ortamlarda ve/veya membranda çalışabilmelidir (34). Tüm bunların ötesinde antioksidan savunma sistemleri *in vivo* üreyen oksijen türevi radikallerin dengesini sağlamakla görevli olsa da memelilerde ciddi bir antioksidan savunma rezervi bulunmamaktadır (24).

2.3.4.1. Enzimatik Savunma Sistemleri

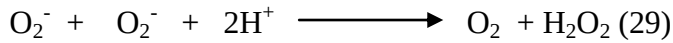
Organizmada serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyona karşı savaşan bir sistemdir. En etkili enzimatik antioksidanlar SOD, CAT ve GSH-Px' dir. Bu sistemlerin kan ve dokudaki düzeyleri ölçülerek lipid peroksidasyon olayı belirlenebilir (51). Bu antioksidanlar hücresel antioksidanlar olarak da adlandırılır (42).

Tablo 2.5. Enzimatik antioksidanların etkileri (34)

Enzimatik Antioksidanlar	Etkileri
Sitokrom oksidaz sistemi	Hücrelerdeki O ₂ ' nin detoksifikasyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit anyonunun detoksifikasyonu
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu
Glutasyon redüktaz	Okside glutatyonun indirgenmesi
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz	NADP' nin NADPH' a dönüşmesi

Süperoksit Dismutaz (SOD)

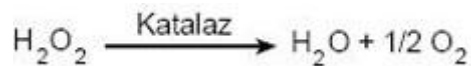
SOD, hücre içi enzimatik aktiviteye sahip antioksidanlar arasında en yüksek aktivite gösterendir (59). Yüksek reaktif aktiviteye sahip O₂⁻ anyonunun daha zayıf reaktif aktiviteye sahip H₂O₂'e dismutasyonunu katalizleyen bir antioksidan enzimdir. Peroksit CAT ve GPx tarafından da yıkımlanabilir (29, 51).



Yangı hücreleri kaynaklı serbest radikallerin oluşturduğu hasardan en çok etkilenen hücre dışı doku bileşenleri kollajen ve hiyalüronik asittir. Süperoksit dismutaz bu komponentlerin serbest radikallere bağlı hasar görmesini engeller. Ancak ekstrasellüler sıvılar çok az miktarda SOD içerdiğinden serbest radikallerin eser miktarları bile bazı doku kompartmanlarında büyük hasara yol açabilir. Genel olarak SOD enzim sistemi antagonistik olmaktan çok organizmayı serbest radikal hasarına karşı koruyan bir sistemdir. Organizmada oksidatif stresin arttığı bazı durumlarda aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini sürdürmeye çalışır. (33). İnsanlarda, SOD enziminin üç şekli vardır: 1) sitozolik Cu/ Zn SOD, 2) mitokondrial Mn-SOD, 3) ekstrasellüler SOD (29). Bu türlerin hepsi anyonlarla azid, florid gibi tek bağ yapar. Ancak türler arasında belirgin farklılıklar vardır (51).

Katalaz (CAT)

Katalaz substratı olan H₂O₂'nin su ile oksijene yıkılmasını katalizlemekte ve böylece hidrojen peroksidin Fenton reaksiyonu aracılığıyla OH⁻ oluşturmasını engellemektedir (29, 37, 51).



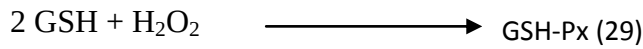
Esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur (37). Hayvanlarda hidrojen peroksit CAT ve GPx ile de yıkımlanır. Normal şartlar altında

CAT bazı hücre tipleri için çok önemli olmamasına rağmen hücrelerin oksidatif stres toleransı ve oluşturacağı cevaba adaptasyonunda önemli rol oynar (51).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, peroksitlerin indirgenmesini uyaran bir metaloproteindir. İnsan hücrelerinde bulunan ve aktivitesi için Se'ye ihtiyaç gösteren en önemli H_2O_2 ayrıştırıcı enzimdir. GPx hidrojen peroksitin indirgenmesinde GSH kullanır (29). Dolayısıyla memeli hücrelerinde oksidatif hasara karşı üretilir. Esasen glutasyon metabolizması en temel antioksidan mekanizmalarından biridir (51). GSH-Px başta karaciğer olmak üzere, eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz, beyin gibi dokularda bulunmaktadır. Enzimin hücreiçi olarak, en çok sitozolde ve mitokondrial matrikste lokalize olduğu bilinmektedir. Memelilerde beş adet glutasyon izoenzimi bulunur. Her izoformun seviyesi bağlı olduğu doku tipine bağlıdır (60).

Mitokondrilerde oluşan veya endoplazmik retikulumdan stoplazmaya salınan ya da SOD gibi sitozolik enzimlerle açığa çıkan H_2O_2 , indirgenmiş glutasyon (GSH) varlığında, GSH-Px ile suya redüklenmektedir (29). GPx, CAT ile H_2O_2 için yarışır ve düşük seviyedeki oksidatif hasardan korunmada önemli etkenlerden biridir (51).



GSH-Px tek başına lipid ve diğer organik peroksidazlarla etkin bir biçimde reaksiyona girerek düşük seviyeli oksidatif strese karşı önemli bir koruma aracıdır (51).

2.3.4.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri

Alfa-tokoferol, karotenoidler gibi lipofilik antioksidanlar ile askorbik asit, redükte glutasyon, glukoz, bilirubin, transferrin ve albumin gibi hidrofilik antioksidanlardan oluşmaktadır. Bunlar hücre dışı ve membran antioksidanları olarak da adlandırılırlar. (42).

Tablo 2.6. Non enzimatik antioksidanların etkileri (34)

Nonenzimatik Antioksidanlar	Etkileri
Seruloplazmin	Bakır bağlar
β -karoten	Radikal tutucu
Askorbik asit	$\cdot$ OH radikali tutucu
Bilirubin	Peroksil radikali
Albumin	Hem ve bakır bağlar

α -tokoferol	Zincir kırıcı antioksidan
Glutasyon	Hücre içi sülfidril tampon
Ferritin	Dokudaki demir iyonlarını bağlar
Transferin	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar
Ürat	Metal iyonlarını bağlar
Sistein	Radikal tutucu
Koenzim Q	Antioksidanlarla etkileşir
Glukoz	$\cdot$ OH radikalini tutar
Trasferrin	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar
Hemopeksin	Hem bağlayıcı protein

Antioksidan savunma sistemleri, pek çok farklı mekanizma ile serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirmektedir. Bu mekanizmaların görevleri; oksijen konsantrasyonunun bölgesel olarak azaltılması, serbest radikallerin tutulması, $O_2\cdot$ radikalinin daha toksik radikallere dönüşümünün önlenmesi, metal iyonlarının bağlanması, peroksitlerin zararsız ürünlere çevrilmesi, lipid peroksidasyonunu oluşturan zincirin kırılması, şeklinde özetlenebilirler (42).

2.3.5. Lipid Peroksidasyon Olayının Belirlenmesi

Peroksidasyon olayının değerlendirilmesinde üç kriterin belirlenmesi önem taşır (61);

a. Oksijen tüketiminin ölçülmesi: Oksijen tüketiminin ölçülmesi manometrik olarak ya da elektrotlarının kullanılmasıyla gerçekleşir. Bu metot peroksidasyonun ölçülmesi amacıyla en önce kullanılan yöntemlerdendir ve bugün de halen güncelliğini korumaktadır.

b. Hidroperoksitlerin ölçülmesi: Bu olay Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e oksidasyonudur; bu yöntem demir tiyosiyanat metodu olarak bilinir. Ayrıca, iyodometrik metodlar, ince tabaka kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), dikloroflorosein metodu şeklindeki yöntemler de bulunmaktadır.

c. Hiperoksitler ve aldehitler gibi yıkımlanma ürünlerinin ölçülmesi: Bu şekilde yıkımlanma ürünlerinin belirlenmesi, tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile; oluşan aldehitlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile; etan ve pentan şekillerinin tesbitiyle; amino asitler, proteinler veya nükleik asitlerin aldehitlerle birleşmesi sonucu oluşan ve floresan veren maddelerin ölçülmesi teknikleriyle yapılır (61).

Bunların yanında enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri hızlı fotometrik yöntemler kullanılarak değerlendirilir. Bu sisteme ait olan SOD, GSH-Px, CAT, vitamin C,

vitamin E, GSH, β - karoten ve vitamin A, sistemin aktivileri ile bu antioksidanların hücre içindeki seviyelerini belirlemede denge sağlayıcı unsur olarak görev yapar. Bu sistem organizmalar için hayati önem taşır (42, 51).

Ek olarak yağ asitlerinin seviyelerinin ölçülmesi de peroksidasyonun belirlenmesinde bilgi verir. Ayrıca, peroksidasyonun başlangıç aşamasında serbest oksijen gruplarının etkisiyle konjuge halde seine grupları oluşur ve bu da spektroskopik olarak ölçülebilir. Peroksidasyon olayının belirlenmesinde daha çok MDA seviyesinin belirlenmesi tercih edilen yoldur (61).

Oksidatif hasar sonuçlarından biri olan DNA zincir kırıklarının analizi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin en sık kullanılanları enzimatik işaretleme teknikleri, jel elektroforezi, tek hücre jel elektroforezi (Comet assay), alkali ile DNA çift sarmalın çözünmesi tekniği, süper sarmal plazmid DNA kullanım tekniği ve ELİSA'dır. DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile zincir kırıkları meydana gelebildiğinden zincir kırığı ölçümü her zaman oksidatif DNA hasarını doğru olarak yansıtmayabilir (52,62,63). DNA'da oluşan oksidatif hasarın tespiti amacıyla yapılan pek çok çalışmada modifiye bazlar analiz edilmektedir. En sık ölçümlenen oksidatif DNA baz hasar göstergesi 8-OH-Gua ve onun deoksiriboz bağlı şekli olan 8-OHdG'dir. 8-OH-dG lezyonları HPLC, GS-MS (gaz kromatografi- kütle spektrometresi), LC-MS-MS (likit kromatografi-kütle spektrometre-kütle spektrometre) ve immunohisto-kimyasal metodlarla ölçülebilir. Bu ölçümlerin amacı oluşması muhtemel baz hasarlarını tespit etmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

1. UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Helios Alfa)
2. ELISA okuyucu (Bio-tek ELx50)
3. Santrifüj (Heraus)
4. Santrifüj (Nüve NF 800R)
5. Vorteks (Heidolph Reaxtop)
6. Hassas terazi (Sartorius BP 121 S)
7. Deiyonize su cihazı (Elektro Mag)
8. Su Banyosu (Nüve BM402)
9. Ultra Saf Su Cihazı (Direct-Q-UV Milipore)
10. Derin Dondurucu (Sanyo Ultra- Low Temperature Freezer MDF- U3086S)
11. Otomatik karıştırıcı (IKA HS 260 basic)
12. Otoanalizör (Abbott-Ititech)

3.2. KİMYASAL MODELLER

1. Pentaklorofenol Sodyum (Fluka 76480)
2. Redükte glutasyon (Merck 104090)
3. Sodyum azid (Merck 106688)
4. Glutasyon redüktaz (Sigma G-3664)
5. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat tetra sodyum tuzu (NADPH) (Sigma N6505)

6. Triklorasetik asit (Merck 100810)
7. Tiyoobarbitürik asit (Merck 108180)
8. Hidrojen peroksit (Merck 108600)
9. t-bütül hidroperoksit (Fluka, 19995)
10. Sodyum klorür (Merck 116224)
11. Potasyum klorür (Merck 104935)
12. Sodyum di-hidrojen fosfat dihidrat (Merck 106345)
13. Sodyum karbonat (Merck 106398)
14. Etilendiamin tetraasetik asit potasyum (EDTA) (Merck 814696),
15. Potasyum dihidrojen fosfat (Merck 104873)
16. Potasyum hekza siyano ferrat (Merck, 104971)
17. Sodyum hidrojen karbonat (Merck, 106329)
18. Amonyum sülfat (Aldrich, 485306)
19. n-butanol (Merck 100988)
20. Nitrat redüktaz (Sigma, N-7265)
21. Ksantin (Sigma X0626)
22. Nitro blue tetrazolium (Sigma N6876)
23. Sulfanilamide (Merck, 111799)
24. N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür (Merck, 106237)
25. Sodyum nitrit (Merck, 106549)
26. Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck 108087)
27. Bakır sülfat (Merck 102791)
28. Orto-fosforik asit (Merck 100563)
29. Potasyum siyanid (Merck 104965)
30. Tetraoksipropan (Sigma T 9889)
31. Sodyum hidroksit (Carlo erba reagent 480507)
32. Sodyum dodesil sülfat (Merck 113760)
33. Glasiyel asetik asit (Merck 100056)
34. Ksantin oksidaz (Sigma X1875)
35. Bakır klorür (Merck 102733)

36. Amonyum sülfat (Merck 101217)
37. Nar çekirdeği yağı (Bükaş, 50 ml soğuk presle elde edilmiş yağ)
38. Flavin adenin dinükleotid (FAD) (Sigma F-6625)
39. 8- Hidroksi-2- deoksi Guanosine EIA Kiti (Cayman Chemical-589320)

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI

Drabkin Reaktifi

0,2 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 g KCN ve 1,0 g $NaHCO_3$ tridistile suda çözündürülerek tridistile su ile litreye tamamlandı.

Triklorasetik asit (TCAA) çözeltisi (%20'lik)

200 g triklor asetik asit (TCAA) tridistile suda çözündürülerek hacmi 1 litreye tamamlandı.

Tiyobarbitürik asit (TBA) (%0.67'lik)

1.675 g tiyobarbitürik asit tridistile suda çözülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

Tetraetoksipropan standardı ($C_{11}H_{24}O_4$)

Tetraetoksipropandan 0.494 ml alınarak etanol ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu karışımdan 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml ye tamamlanarak 20 μ mol/l lik standart elde edildi.

Nikotinadenin dinükleotid (NADPH) çözeltisi (0,86 mM lık)

640,195 mg NADPH 1 litre deiyonize suda çözündürülerek hazırlandı.

Flavinadenin dinükleotid (FAD) çözeltisi (0,11 mM'lık)

829,51 mg FAD 1 litre deiyonize suda çözündürülerek hazırlandı.

Nitrat redüktaz çözeltisi (U/ml)

Liyofilize toz halindeki nitrat redüktaz enziminden 5 U/5 ml, deiyonize su içerisinde 1U/ml konsantrasyonunda hazırlandı.

Sülfanilamid çözeltisi (% 1'lik)

2 mg/ ml oranında % 1' lik hazırlanan sülfanilamid çözeltisi, %5' lik fosforik asit içerisinde çözündürüldü.

N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür (NEDD) çözeltisi (% 0,1'lik)

1 mg/ml NEDD deiyonize su içerisinde % 0,1 konsantrasyonunda hazırlandı. 1 gr NEDD, 1000 ml deiyonize suda çözündürülerek hazırlandı.

Griess reaktifi

Sülfanilamid çözeltisi ile N- (1-naftil) etilendiamin çözeltisi aynı oranda (1:1) karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

pH 7,5 fosfat tamponu (0,33 M'lık)

11,931 g disodyum hidrojen fosfat tartılıp 100 ml' ye su ile tamamlandı (A çözeltisi). 0,907 g potasyum dihidrojen fosfat tartılıp 20 ml' ye distile su ile tamamlandı (B çözeltisi). Sonra 85 ml A çözeltisi, 15 ml B çözeltisi ile karıştırılarak pH tayini yapıldı. pH 7,5 olana kadar fosforik asit ya da sodyum hidroksit ilavesi ile pH ayarlandı.

Fosfat tamponu (50 mmol, pH 7.0)

3.522 g KH_2PO_4 ve 5.796 g Na_2HPO_4 tridistile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı. pH 7.0' ye ayarlanarak +4 °C'de saklandı.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi (10 mmol/ml)

%35'lik H_2O_2 çözeltisinden 0.13 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan 100 ml fosfat tamponu üzerine ilave edildi. Bu karışımın 240 nm'deki absorbansının 0,5 olması gerekir. Okunan absorbans, bu değerden küçük ise H_2O_2 , büyük ise tampon eklenerek absorbansın 0,5 olması sağlandı.

Sodyum fosfat tamponu (pH = 7.0 100 mmol/l)

9 g Na_2HPO_4 ve 7 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 500 ml tridistile suda eritildi ve 500 ml hacme tamamlandı. pH 7.0'a ayarlandı, +4 °C'de saklandı.

Redükte Glutasyon çözeltisi (20 mmol/l)

30.7 mg Redükte glutasyon 5 ml tridistile suda eritildi. 1 normal NaOH ile pH'sı 6.0'a ayarlandı. Testten önce taze olarak hazırlandı.

Etilendiamin tetraasetik asit potasyum (EDTA) çözeltisi (10 mmol/l):

372 mg EDTA 100 ml tridistile suda eritildi ve +4 °C'de saklandı.

Sodyum Azid (NaN_3) çözeltisi (20 mmol/l)

130 mg Na- Azid 100 ml suda eritildi ve +4 °C'de saklandı.

Glutathion redüktaz çözeltisi (10 U/ml)

150 mikrolitre enzim üzerine 8.85 ml tridistile su eklenerek çalışmadan önce taze olarak hazırlandı.

NADPH+ H^+ çözeltisi (3 mmol/l)

12.5 mg NADPH+H⁺ 5 ml fosfat buffer içerisinde eritildi. Çalışmadan önce taze olarak hazırlandı.

Elisa (EIA) tamponu

Kit içerisinde hazır olarak bulunan bir vial EIA tamponu (10X) 90 ml ultra saf su ile sulandırıldı.

Yıkama tamponu

5 ml vial yıkama konsantresi 2 L ultra saf su ile sulandırılıp seyreltilerek üzerine 1 ml Tween 20 eklendi.

8-hidroksi-2-deoksi guanosin (8-OH-dG) standardı stok çözeltisi (30 ng/ml'lik)

100 µl 8-OH-dG EIA standardına 900 µl ultra saf su eklendi.

Elisa (EIA) kalibrasyon çözeltileri

8 adet tüp hazırlandı. İlk tüpe 900 µl EIA tamponu, diğer tüplere ise 500 µl EIA tamponu kondu. Ardından 1. Tüpe 100 µl standart stok çözeltisi eklendi. Devamında 1 numaralı tüpteki çözeltiden 400 µl alınarak 2 numaralı tüpe eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu işlem miktarda değişiklik yapılmadan 8 numaralı tüpe kadar tekrarlandı. Standartlar taze olarak hazırlandı.

8-hidroksi-2-deoksi guanosin AChE Eser

6 ml EIA tamponu ile sulandırıldı ve kullanılabileceği kadar +4 °C'de saklandı.

8-hidroksi-2-deoksi guanosin EIA Monoklonal Antikor

Antikor bulunan şişe 6 ml EIA tamponu ile sulandırıldı ve kullanılabileceği kadar +4 °C'de saklandı.

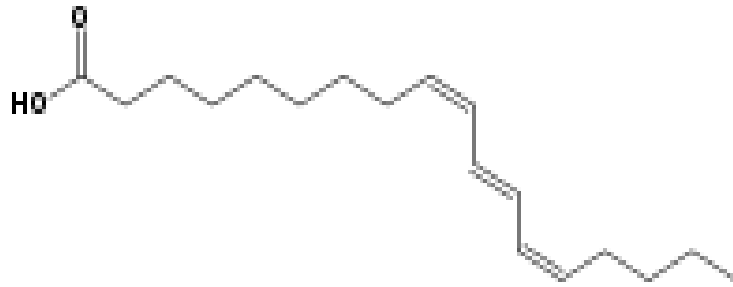
3.4. NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI BİLEŞİMİ

Çalışmada kullanılan NÇY 11.01.2007 tarihinde Tarım ve Köyşleri Bakanlığı İzmir İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü tarafından analiz edilmiş ve aşağıdaki bileşenleri içerdiği rapor edilmiştir:

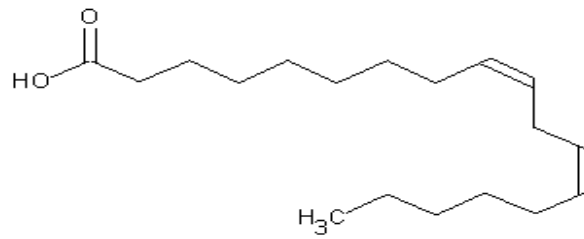
Yağ asitleri kompozisyonu (%)

Maristik asit	0.09
Palmitik asit	3.29
Palmitoleik asit	0.12
Margarik asit	0.05
Stearik asit	2.13
Oleik asit	8.66

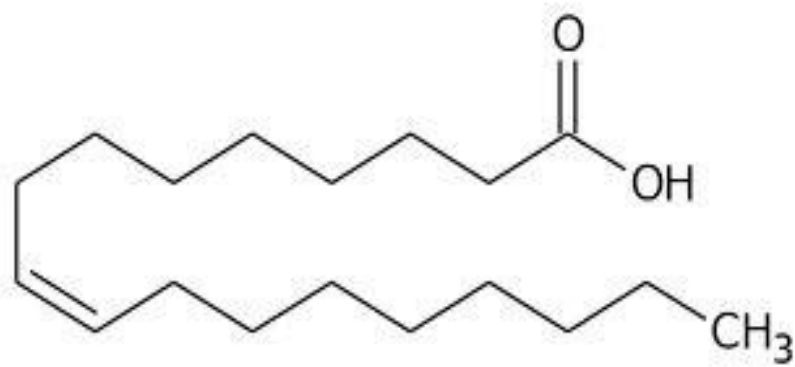
Linoleik asit	5.81
Linolenik asit	0.06
Araşidonik asit	0.42
Ekofenoik asit	0.70
Punisik asit	78.67



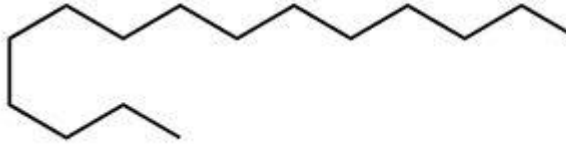
Şekil. 3.1. Punisik asitin kimyasal yapısı



Şekil.3.2. Linoleik asitin kimyasal yapısı



Şekil. 3.3.Oleik asitin kimyasal yapısı



Şekil.3.4. Palmitik asitin kimyasal yapısı

3.5. YEM BİLEŞİMİ

Çalışmada, aşağıdaki tabloda; etiket besin maddesi bileşimi belirtilen sıçan pelet yemi kullanıldı.

Tablo 3.1. Kullanılan yemin bileşimi

Kuru madde (en az)	88,0	Kalsiyum en az-en çok	1,0-1,3	Vit A (en az)	15000 I.Ü/kg
Ham protein (en az)	23,0	Sodyum En az-en çok	0,5-0,6	Vit D3(en az)	3300 I.Ü/kg
Ham selüloz (en çok)	5,0	Fosfor (en az)	0,9	Vit E(en az)	40 mg/kg
Ham Kül (en çok)	8,0	NaCl (en çok)	1,00	Vit B2(en az)	5 I.Ü/kg
HCl de çözünmez kül(en çok)	1.0	Lizin (en az)	1,35	Vit B12 (en az)	20,0 mcg/kg
		Metiyonin (en az)	0,45	Vit K3(en az)	5,0 mg/kg
		Sistin (en az)	0,35	Metabolik enerji(en az)	3100Kcal/kg

3.6. HAYVAN MATERYALİ

Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesi (EÜ HADYЕК) onayı alındı. Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edilen 4-5 aylık, 40 adet Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar polikarbonat kafeslerde (her kafeste üç sıçan olacak şekilde), kaba talaş altlıklarda, araştırma merkezinin sahip olduğu konvansiyonel deney hayvanı barındırma şartlarında [kontrollü sıcaklık (21±2 °C), nem (% 50 ±5), hava değişimi (saatte 12 devir), sıcaklık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)] ve *ad libidum* besleme ile barındırıldı.

3.7. DENEY GRUPLARI

Çalışmada her birinde 10 sıçan bulunan 4 grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak tutuldu ve bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruba 0,15 ml/kg (c.a) dozunda NÇY, üçüncü gruba 40 mg/kg (c.a) dozunda PCP ve dördüncü gruba 40 mg/kg (c.a) dozunda PCP+ 0,15 ml/kg (c.a) dozunda NÇY 28 gün boyunca gavaj yolu ile mideye verildi. Çalışma süresi sonunda hafif eter anestezisi altındaki hayvanların kalbinden punksiyon yöntemiyle heparinli ve kuru tüplere kan örnekleri alındı.

3.8. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SAKLANMASI

Alınan kanlar 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serum, plazma ve eritrositlerine ayrıldı. Plazması ayrılan tüplerdeki eritrosit tabakasına eşit oranda izotonik tuzlu su ilave edildi ve 10 saniye düşük devirde karıştırıldı. Tüpler 2000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Eritrosit süspansiyonları 750 µl miktarda ependorf tüplerine alındı ve üzerlerine eşit miktarda izotonik tuzlu su ilave edildi. Tüpler elle hafifçe alt-üst edildi. Serum, plazma ve eritrosit paketleri analiz zamanına kadar -80 C°'lık derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.9. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.9.1. Numunelerin analize hazırlanması

Eritrosit paketleri analiz öncesinde oda ısısına gelene kadar bekletildi. Çözünen eritrosit paketlerinden 300 µl başka ependorf tüplerine alındı ve üzerine 1200 µl buz soğukluğunda deiyonize su konuldu. Tüpler hızla karıştırıldı ve eritrositlerin hemoliz olması sağlandı. Hemolizatlarda hemoglobin ve MDA düzeyleri ile NO, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ölçüldü. Hemolizattan kloroform/etanol ile ekstrakte edilen faz ise SOD aktivitesi ölçümü için kullanıldı.

3.9.2. Serum Biyokimya Analizleri

Serumlarda glukoz, total protein, albumin, BUN, kreatinin, ürik asit, total bilirubin, trigliserit, kolesterol, HDL, LDL, üre, AST, ALT, ALP analizleri otoanalizörde (Abbott C 16000 Architech) yapıldı.

3.9.3. Eritrosit Hemoglobin Tayini

Analiz için Fairbanks ve Klee'nin bildirdiği yöntem kullanıldı (64). Metodun prensibi hemoglobindeki Fe^{+2} , ferrosiyanür ile Fe^{+3} 'e okside edilerek potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanomethemoglobine dönüşürülmesidir. Siyanomethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Bir deney tüpüne 6,0 ml Drabkin reaktifi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklendi ve karıştırıldı, 5 dakika beklendi. Drabkin reaktifi kör olarak kullanılarak 540 nm'de okundu.

3.9.4. Malondialdehit Tayini

Çalışmada Yoshioka ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (65) kullanıldı (Tablo 3.2).

Metodun prensibi iki molekül TBA'nın bir molekül MDA ile asit ortamda sitokiyometrik olarak reaksiyona girerek pembe renkli bir ürün oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu bileşik 532–535 nm'de maksimum absorbands verir.

Tablo 3.2. MDA analizi

Kullanılan maddeler	Kör tüpü	Numune tüpü
	Vida kapaklı cam tüpler kullanılır.	
Plazma	--	0.5 ml
TCAA çözeltisi	3.0 ml	2.5 ml
TBA çözeltisi	1.0 ml	1.0 ml
Tüpler 30 sn vortekslenir ve kapakları kapatılır.		
Tüpler 30 dakika 90 °C' lik su banyosunda tutulur, süre sonunda tüpler buzlu soğuk suda soğutulur.		
n- Butanol	4.0 ml	4.0 ml
Tüpler 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.		
Üst tabaka (n-butanol) küvete alınır ve 535 nm'de köre karşı okunur		
Değerler 1.1.3.3. tetraetoksipropan çözeltisi ile hazırlanan kalibrasyonlara göre nmol/ml şeklinde hesaplandı.		

3.9.5. Nitrik Oksit Tayini

Nitrik oksit tayininde Griess reaksiyonu olarak bilinen diazotizasyon yöntemi (66) kullanıldı (Tablo 3.3). Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi in vivo olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümünü sağlar. Bu yöntemle göre NO ve sülfanilamidin asit ortamda N(1-naftil) etilendiamin ile reaksiyon vererek pembe renkli kompleks oluşturması ve bunun 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbandsın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon sadece NO₂⁻ ile oluşur. Nitrik oksit oksidasyon ürünleri olan NO₂⁻ ve NO₃⁻ ise karışım halde bulunur, bu nedenle reaksiyon ortamına nitrat redüktaz ilave edilerek NO₃⁻, NO₂⁻'ye dönüştürülür.

Tablo 3.3. NO aktivitesi tayini için çalışma şeması

LVH

Kullanılan maddeler	Stok çözeltiler	İlave hacim(μl)
Plazma, fosfat tamponu ya da standart	-	18
Distile su	-	132
Fosfat tamponu	pH 7.5, 0.33 M	60
NADPH	0.86 mM	30
FAD	0.11 mM	30
Nitrat redüktaz	1 U/ml	30
Karanlıkta, oda ısısında 1 saat inkübe edildi.		
Griess reaktifi	-	600
Toplam hacim	-	900
10 dk oda ısısında inkübasyonun ardından numunelerin 540 nm'deki absorbanı köre karşı okundu.		
Sonuçlar 0,0625 μmol/ml-1μmol/ml aralığında hazırlanan NaNO ₃ standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyona göre hesaplandı.		

3.9.6. Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Analiz Luck, tarafından geliştirilen spektrofotometrik metoda (67) göre yapıldı (Tablo 3.4). Metodun prensibi uygun tampon içinde bulunan hidrojen peroksitin numunede bulunan katalaz enziminin etkisi ile yıkılması sonucu, bu maddenin 240 nm'de sebep olduğu absorbanın azalmasını ölçülmesi esasına dayanır. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz enzim aktivitesi ile orantılıdır. Deneyde fosfat tamponu ve H₂O₂ çözeltisi kullanıldı.

Tablo 3.4. CAT analizi çalışma şeması

Kullanılan maddeler	Kör Küveti (2 adet)	Numune Küveti
Fosfat Tamponu	2.95 ml	--
H ₂ O ₂ çözeltisi	--	2.95 ml
Numune	50 μl	50 μl
Ölçümler 240 nm'de yapıldı.		

Analizde önce hazırlanan kör küvetlerle sıfırlama yapıldı. Bu işlemin takibinde öndeki küvet alındı. Ardından H₂O₂ konulan numune küveti cihaza yerleştirilerek 0., 15., 30. ve 45. saniyelerdeki absorbanları U/mg Hb cinsinden hesaplandı.

3.9.7. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi

Çalışmada, Sun'un bildirdiği metod kullanıldı (68). Yöntemin prensibi, oluşa süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitro blue tetrazoliumu (NTB) indirgememesinin numunede bulunan SOD tarafından engellenmesi esasına dayanır. Renksiz NBT iyonu, süperoksit radikali ile indirgendiğinde maksimum absorpsiyonu 560 nm'de veren mavi renkli formazona dönüşür. Bu reaksiyon sırasında, numunedeki SOD aktivitesi ile orantılı olarak bir absorpsiyon düşmesi gözlenir.

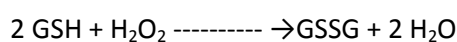
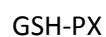
Analizler, eritrosit hemolizatının 3:5 v/v oranında hazırlanan kloroform/etanol karışımıyla hazırlanan ekstraktlarda yapıldı. Cam tüplere alınan 0,5 ml eritrosit hemolizati üzerine 0,5 ml kloroform/etanol karışımı ilave edildi. Tüpler 3000 devir + 4 C° soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan berrak kısımdan 500 µl alınarak analiz için kullanıldı. Üzerine 2.45 ml reaktif karışımı ilave edildi. Daha sonrada, 50 µl ksantin oksidaz çözeltisi eklendi. 20 dakika 25°C'lik su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda, 1.0 ml CuCl₂'den ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve ölçümler 560 nm'de gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. SOD analizi çalışma şeması

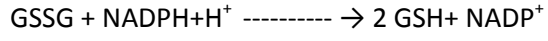
Kullanılan maddeler	Kör	Numune
SOD reaktifi	2.45 ml	2.45 ml
Numune	-	500 µl
Distile su	500 µl	-
Ksantin oksidaz	50 µl	50 µl
20 dakika 25°C'lik su banyosu		
CuCl ₂	1.0 ml	1.0 ml
Ölçümler 560 nm'de yapıldı.		

3.9.8. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü

Analizlerde Paglia ve Valentine'nin geliştirdiği metot (69) kullanıldı (Tablo 3.6). Testin prensibi peroksidaz kullanılarak GSH'ın GSSG'ye dönüşmesidir. Reaksiyonun geriye çevrilmesi Glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından katalizlenen NADPH+H⁺ kullanan bir reaksiyonla gerçekleştirilir. Bu reaksiyonda GSH miktarı sabit kalır.



GR

**Tablo 3.6.** GSH-Px aktivitesi Ölçümü

Kullanılan maddeler	Kör	Numune
Fosfat buffer	1 ml	1 ml
EDTA	0.1 ml	0.1 ml
NaN ₃	0.1 ml	0.1 ml
NADPH+H ⁺	0.1 ml	0.1 ml
Redükte Glutathion	0.1 ml	0.1 ml
Glutathion redüktaz	0.2 ml	0.2 ml
Numune	0.05 ml distile su	0.05 ml hemolizat
İki- üç dakika 37 °C'de sıcak su banyosunda inkübasyon		
t- BOOH	0.2 ml	0.2 ml
366 nm'de 0. ve 60. sn absorbanları ölçüldü.		

Absorbansta meydana gelen düşmeye bağlı olarak enzim aktivitesi U/mgHb cinsinden hesaplandı.

3.9.9. 8-hidroksi-2-deoksi guanosin Tayini

8-hidroksi-2-deoksi guanosin analizleri Cayman marka kit kullanılarak yapıldı.

Testin Prensibi

Bu metot 8-OH-dG ile 8-OH-dG AChE konjugatının ortamda kısıtlı miktarda bulunan 8-OH-dG monoklonal antikor için yarışması esasına dayanır. Çünkü ortamdaki 8-OH-dG miktarı değişirken 8-OH-dG eser miktarı sabit kalır ve ortamdaki serbest 8-OH-dG miktarının oranıyla ters orantılı olarak bağlanma gösterir.

Deneyin Yapılışı

Reaktif İlavesi

1- EIA Tamponu: Spesifik Olmayan Bağlayıcı (NSB) kuyularına 100 µl EIA tamponu ilave edildi. Yüksek Bağlayıcı (Bo) hücrelerine de 50 µl EIA tamponu ilave edildi.

2- 8-hidroksi-2-deoksi guanosin EIA Standardı: 8 numaralı standart tüpünden 50 µl, 8 numaralı standart kuyularına, 7 numaralı standart tüpünden 7 numaralı standart kuyularına ve bu şekilde her standart tüpünden kendisine ait standart hücrelerine 50 µl standart ilave edildi.

3- Örnekler: Örnek hücrelerinin her birine 50 µl örnek eklendi. Her örnek için iki dilüsyon yapıldı.

4- 8-hidroksi-2-deoksi guanosin AChE Eser: Total aktivite ve kör haricinde bütün kuyucuklara 50 µl eklendi.

5- 8-hidroksi-2-deoksi guanosin monoklonal Antikor: Total aktivite, spesifik olmayan bağlayıcı (NSB), Blank hücreleri dışında bütün hücrelere 50 µl eklendi.

Tablo 3.7. 8-OH-dG çalışma şeması

Hücre	EIA Buffer	Standart/Örnek	Eser	Antikor
Kör	-	-	-	-
Total Aktivite	-	-	5 µl (geliştirme aşamasında)	-
Spesifik Olmayan Bağlayıcı (NSB)	100 µl	-	50 µl	-
En Yüksek Bağlayıcı (Bo)	50 µl	-	50 µl	50 µl
Standart/ Örnek	-	50 µl	50 µl	50 µl

İnkübasyon

Hücrelerin üzeri plastik film ile kaplanarak +4°C’de 18 saat inkübasyona bırakıldı.

Plakların Geliştirilmesi

1-20 ml ultra saf su ile sulandırılarak hazırlandı. Çözelti, Ellman’s reaktifi kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2- Hücreler boşaltılarak yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkandı.

3- Her hücreye 200 µl Ellman’s reaktifi eklendi.

4- Total aktivite hücrelerine 5 µl eser eklendi.

5- Plakların üstü plastik filmle kaplanarak otomatik karıştırıcı vasıtasıyla karanlık bir ortamda 120 dakika karıştırıldı.

Plakların Okunması

1-Plakların tabanı silinerek parmak izi, kir ve diğer kalıntılardan arındırıldı.

2- Plakların üzerine kapatılan film dikkatlice açıldı. Bu aşamada Ellman’s reaktifinde kayıp olmamasına dikkat edildi.

3- Plakların 415 nm dalga boyunda absorbansları okundu.

4- Numunelerdeki 8-OH-dG düzeyleri pg/ml olarak kalibrasyon eğrisine göre belirlendi.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistik analizleri SPSS 15.0 paket programı ile yapıldı. Çalışmada gruplardaki ortalama, standart sapma, en alt ve en üst düzeyler ve gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile; farklılık gösteren grupların belirlenmesi ise DUNCAN's testi ile yapıldı.

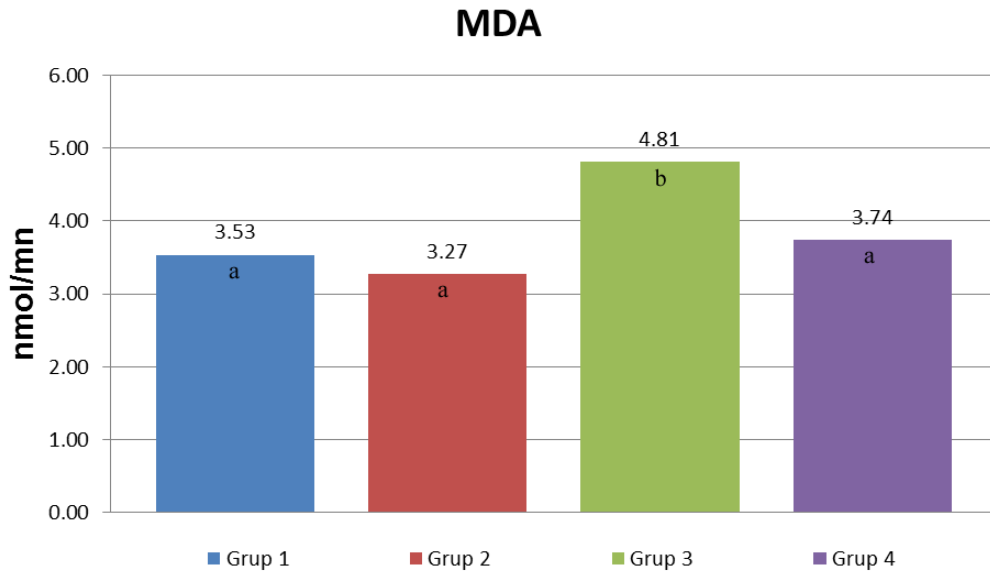
4. BULGULAR

4.1. LİPİD PEROKSİDASYONUNA AİT BULGULAR

4.1.1. Malondialdehit

Kontrol ve deney gruplarının plazma MDA düzeyleri tablo 4.1 ve şekil 4.1’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY ile ilgili MDA verilerinde önemli bir değişim olmadığı görüldü ($p>0.05$). NÇY ve PCP verileri kontrol ile kıyaslandığında PCP uygulaması yapılan grubun MDA düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme gözlenirken; PCP ve PCP+NÇY verileri kıyaslandığında PCP+NÇY uygulanan grubun MDA değerlerinde anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY verilen gruplar kıyaslandığında ise MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

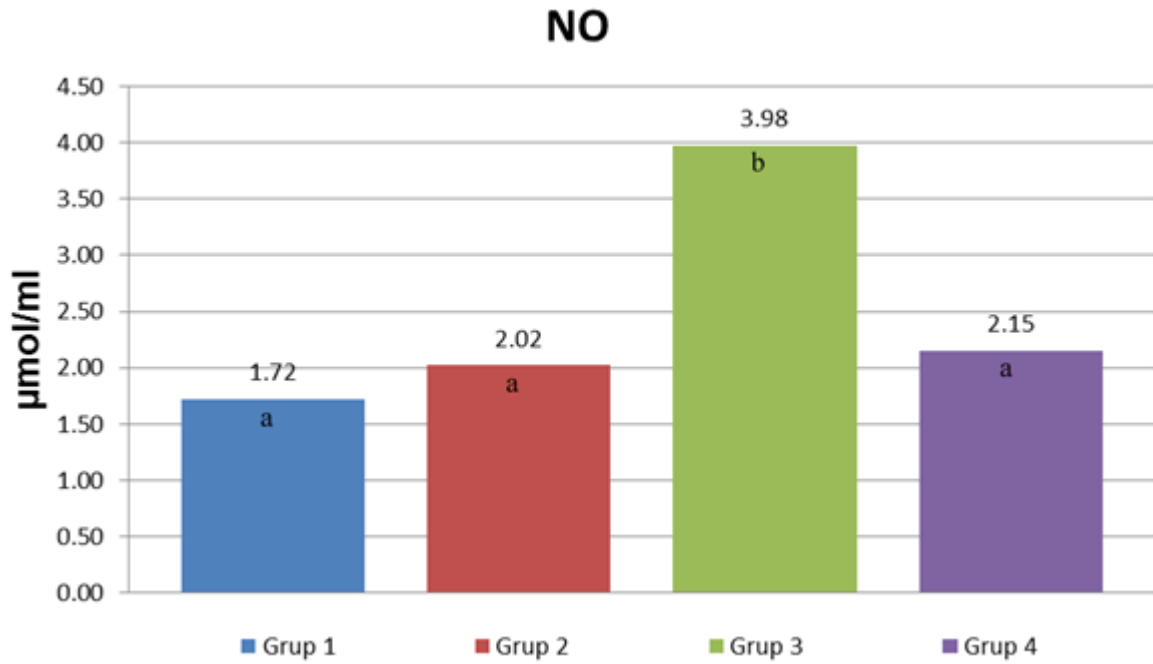


Şekil 4.1. Grupların plazma MDA değerleri.

4.1.2. Nitrik Oksit

Kontrol ve deney gruplarının plazma nitrik oksit düzeyleri tablo 4.1 ve şekil 4.2’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY NO verilerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim olmadığı görüldü ($p>0.05$). NÇY ve PCP uygulanan gruplar kıyaslandığında PCP grubunun değerlerinde nar çekirdeği yağı uygulanan gruba göre istatistik açıdan önemli bir yükselme meydana geldiği gözlenirken; PCP ve PCP+NÇY uygulanan gruplar kıyaslandığında ise PCP uygulanan grup değerlerinin PCP+NÇY uygulanan gruba göre istatistik açıdan önemli oranda yükseldiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY verileri kıyaslandığında ise her iki grup verileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmadığı izlendi ($p>0.05$).

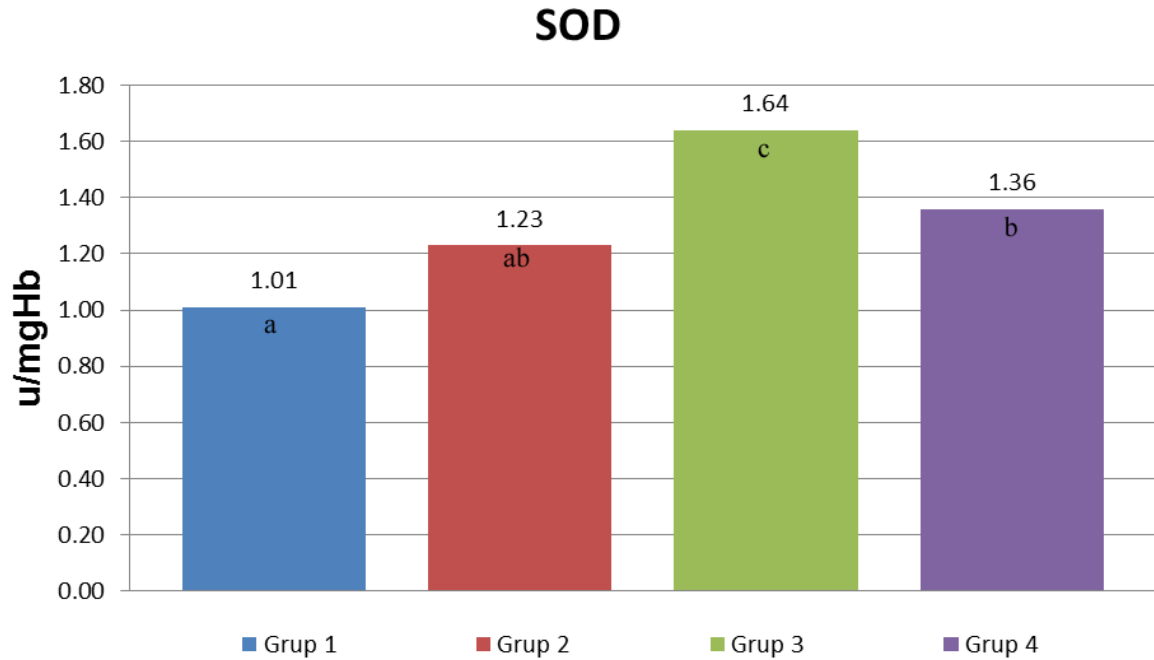


Şekil 4.2. Gruplarda plazma NO değerleri

4.1.3. Süperoksit Dismutaz

Kontrol ve deney gruplarının eritrosit SOD aktiviteleri tablo 4.1 ve şekli 4.3’de verildi

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY SOD verileri arasında istatistiksel açıdan önemli bir değişim olmadığı görüldü ($p>0.05$). NÇY ve PCP uygulanan grupların verileri kontrol grubu ile kıyaslandığında PCP uygulaması yapılan grup değerlerinde NÇY grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme olduğu gözlemlenirken; grup 3, grup 4, grup 1 verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grupta; kontrol ve NÇY+PCP uygulanan gruba göre SOD değerlerinde anlamlı bir artış meydana geldiği gözlemlendi ($p<0.05$). NÇY+PCP ve kontrol verileri kıyaslandığında ise NÇY+PCP uygulanan grubun değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

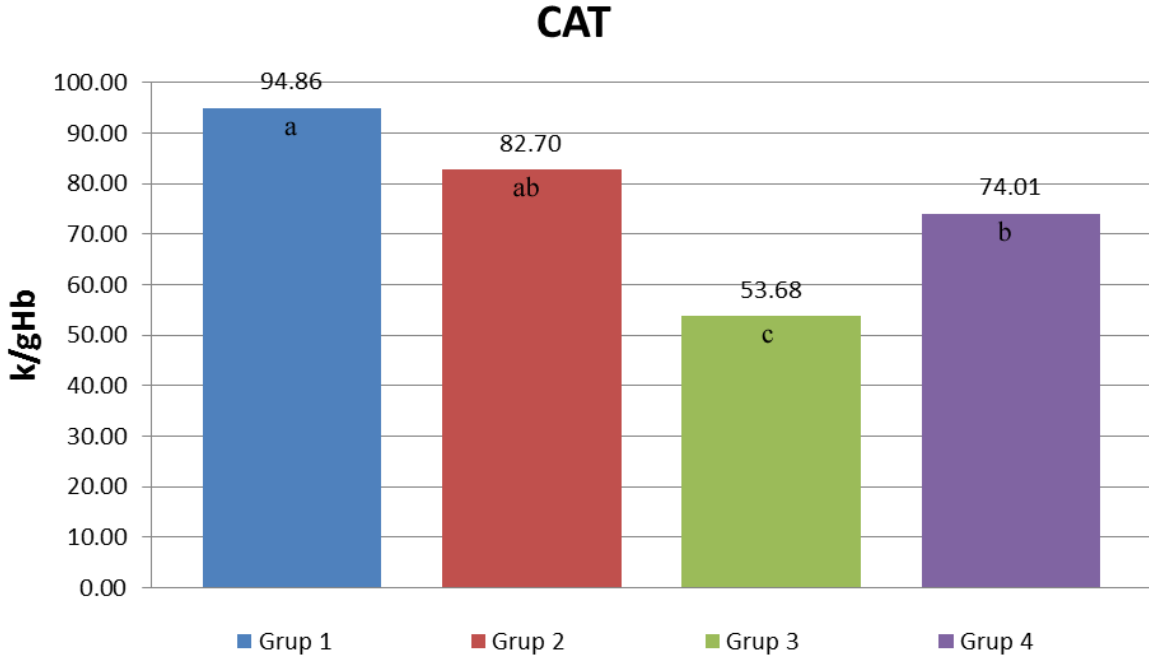


Şekil 4.3. Grupların eritrosit SOD aktiviteleri

4.1.4. Katalaz

Kontrol ve deney gruplarının eritrosit CAT enzim aktiviteleri tablo 4.1 ve şekil 4.4’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY CAT verilerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim olmadığı görüldü ($p>0.05$). NÇY ve PCP uygulaması yapılan gruplarda CAT verileri kıyaslandığında; PCP uygulaması yapılan grupta NÇY uygulaması yapılan grubun değerlerine göre istatistiksel açıdan önemli bir düşüş olduğu; grup 3 verileri ile grup 1 ve grup 4 verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grupta kontrol ve PCP+NÇY verilen gruplara göre CAT değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana geldiği görüldü ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY uygulaması yapılan grup değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş olduğu izlendi ($p<0.05$).

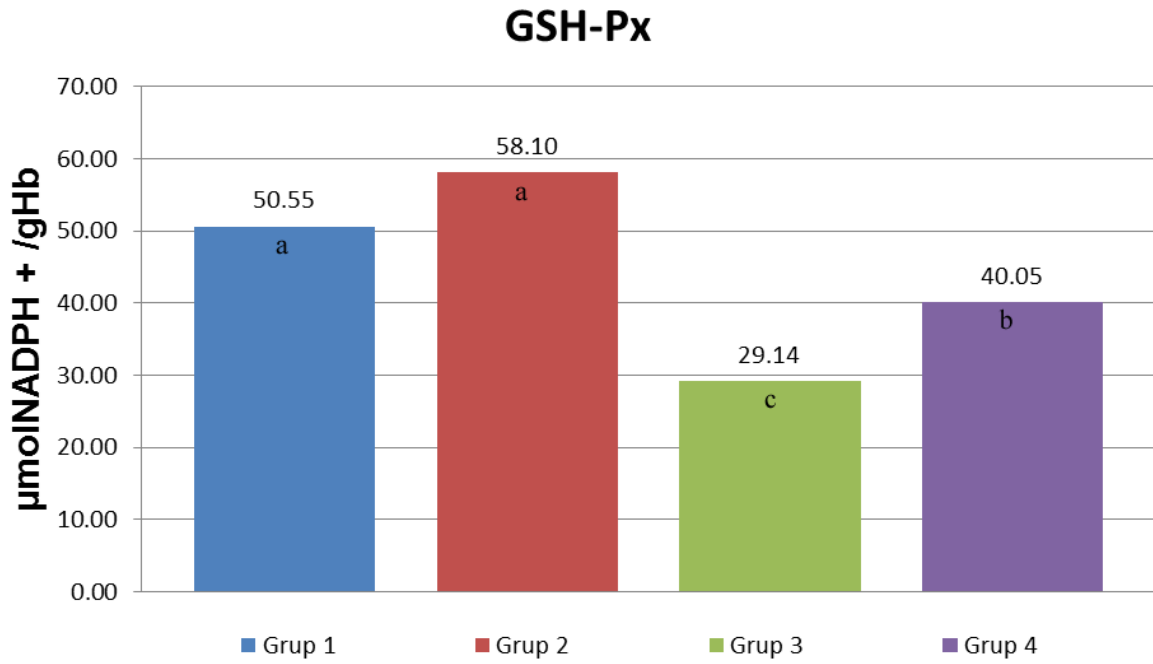


Şekil 4.4. Grupların eritrosit CAT aktiviteleri

4.1.5. Glutasyon Peroksidaz

Kontrol ve deney gruplarının eritrosit GSH-Px enzim aktiviteleri tablo 4.1 ve şekli 4.5’de verildi.

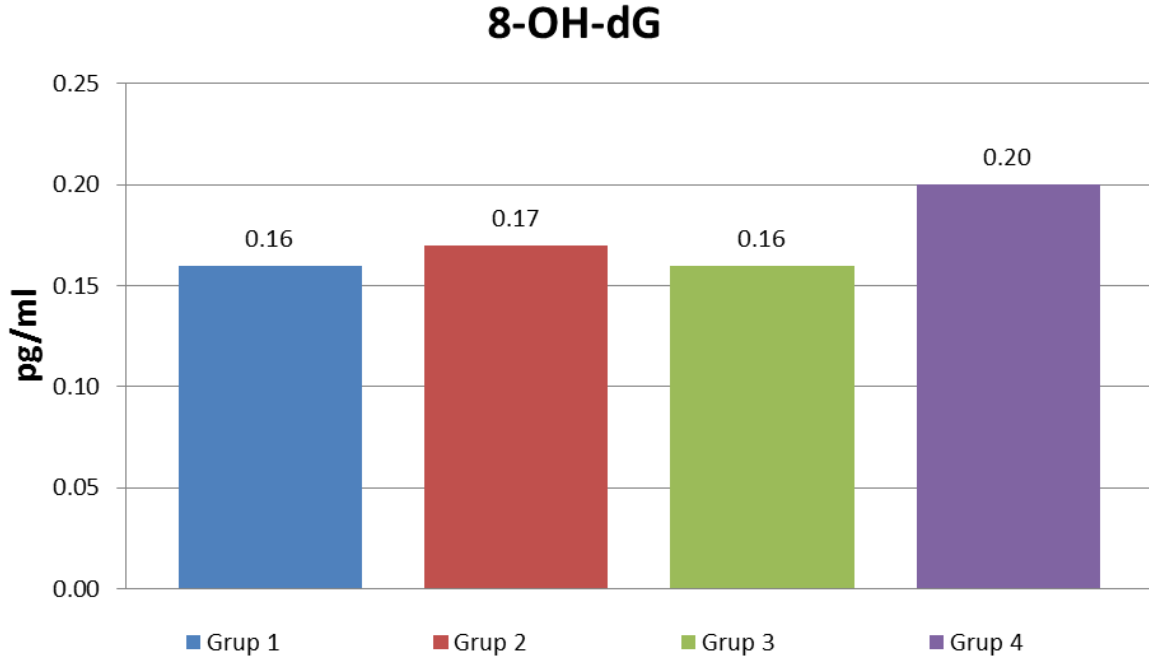
Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY GSH-Px verilerinin istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). PCP ile NÇY ve kontrol verileri kıyaslandığında istatistiksel açıdan fark olduğu gözlemlendi. Bu fark PCP uygulanan grupta düşüş şeklinde gözlenirken; PCP ile PCP+NÇY değerleri karşılaştırıldığında PCP verilen grubun GSH-Px değerlerinin diğer gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşme gözlemlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.5. Graplarda eritrosit GSH-Px aktiviteleri

4.1.6. 8 hidroksi-2- deoksi Guanozin

Tablo 4.1 ve şekil 4.6’da belirtildiği gibi serum 8-OH-dG değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).



Şekil 4.6. Gruplarda serum 8-OH-dG değerleri

Tablo 4.1. Plazma MDA düzeyi ile NO, eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px ve 8-OH-dG enzim aktiviteleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Malondialdehit(MDA) (nmol/ml)	3,53±0,61a	3,27±0,88a	4,81±0,68b	3,74±1,36a
Nitrik Oksit (NO) (µmol/ml)	1,72±0,79a	2,02±0,71a	3,98±1,53b	2,15±1,12a
Katalaz (CAT) (k/gHb)	94,86±12,68a	82,70±19,57ab	53,68±16,96c	74,01±16,31b
Süperoksit Dismutaz (SOD) (U/mgHb)	1,01±0,12a	1,23±0,25ab	1,64±0,33c	1,36±0,29b
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) (µmolNADPH+/gHb)	50,55±6,51a	58,10±16,85a	29,14±5,09c	40,05±7,46b
8-hidroksi-2-deoksi guanosin (8-OH-dG) (pg/ml)	0,16±0,00	0,17±0,01	0,16±0,00	0,20±0,05

Grup1 kontrol, grup 2 NÇY, grup 3 PCP, grup 4 PCP+NÇY* p<0.05 * her satırda farklı harfler taşıyan gruplar anlamlıdır.

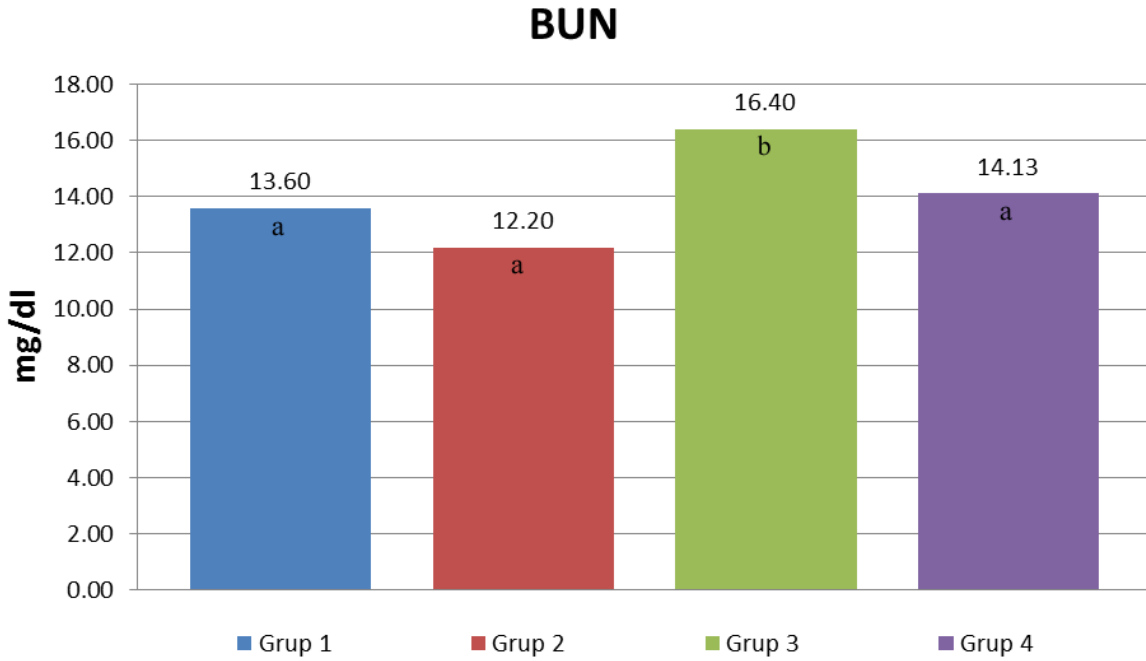
PCP+NÇY* p<0.05 * her satırda farklı harfler taşıyan gruplar anlamlıdır.

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. Kan Üre Azotu (BUN)

Kontrol ve deney gruplarının serum üre azotu düzeyleri tablo 4.2 ve şekil 4.7’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY serum üre azotu değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP verileri karşılaştırıldığında, PCP uygulanan grubun BUN değerlerinde NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir yükselmenin olduğu görüldü ($p<0.05$). Grup 3 ve grup 4 verileri değerlendirildiğinde ise PCP+NÇY BUN değerlerinin PCP grubuna göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Grup 1 ve grup 4 BUN değerleri kıyaslandığında PCP+NÇY verilerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

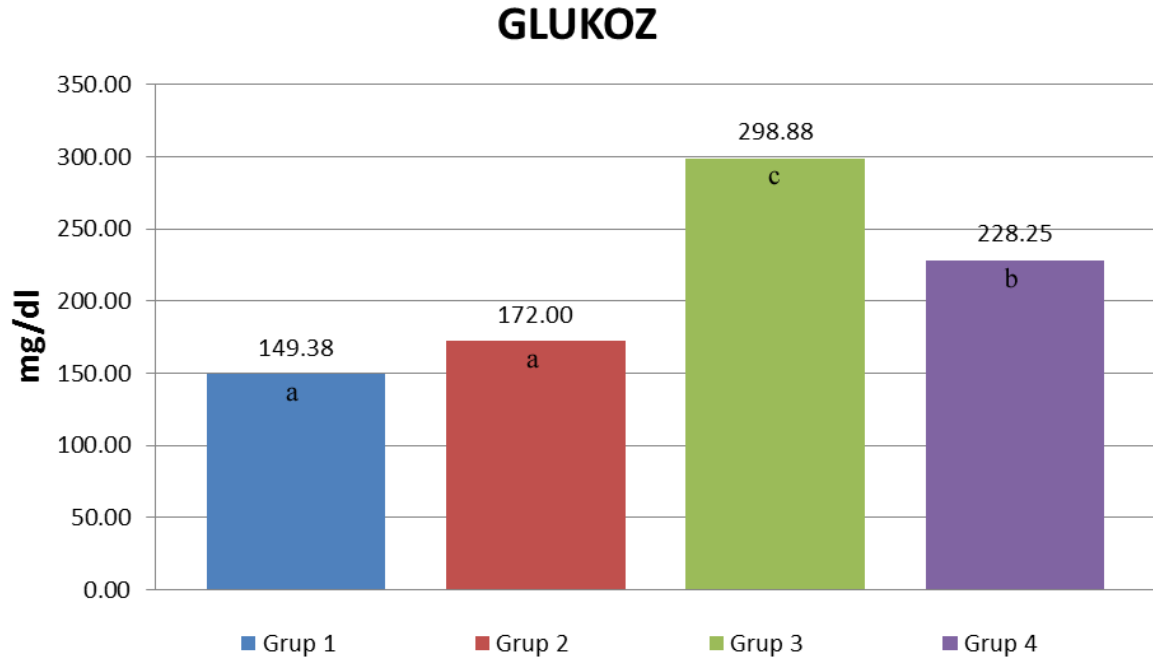


Şekil 4.7. Grupların serum BUN değerleri

4.2.2. Glukoz

Kontrol ve deney gruplarının serum glukoz düzeyleri tablo 4.2 ve şekil 4.8’da verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve NÇY serum glukoz değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP verileri karşılaştırıldığında PCP grubu glukoz değerlerinin NÇY uygulanan gruba göre yükseldiği gözlemlenirken; grup 3 ve grup 4 verileri değerlendirildiğinde ise PCP+NÇY glukoz değerlerinin PCP verilen gruba göre azalmış olduğu belirlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY glukoz verileri kıyaslandığında PCP+NÇY değerlerinde kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

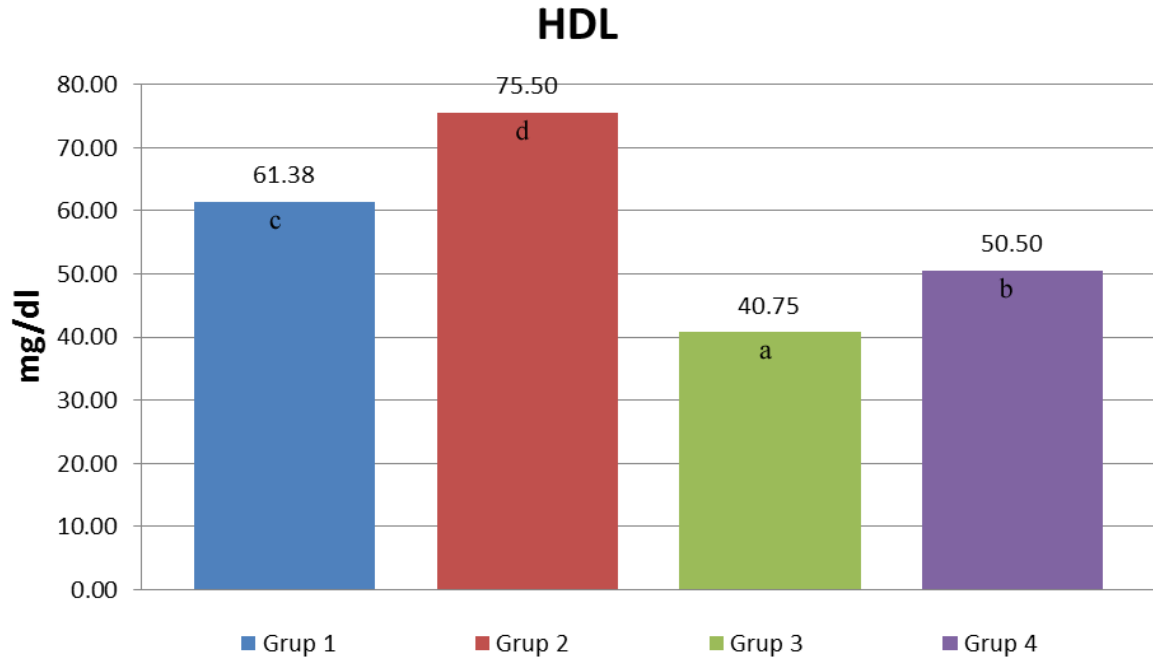


Şekil 4.8. Grupların serum glukoz değerleri

4.2.3. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Kontrol ve deney gruplarının serum HDL değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.9’da verildi.

Kontrol ile NÇY değerleri karşılaştırıldığında, NÇY grubunun serum HDL düzeyinde yükselme olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). NÇY ve PCP verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grupta HDL değerlerinde azalma gözlemlenirken; PCP ve PCP+NÇY verileri değerlendirildiğinde PCP grubunun HDL değerlerinin PCP+NÇY uygulanan grup değerlerine kıyasla azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY HDL verileri kıyaslandığında ise grup 4 değerinde azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

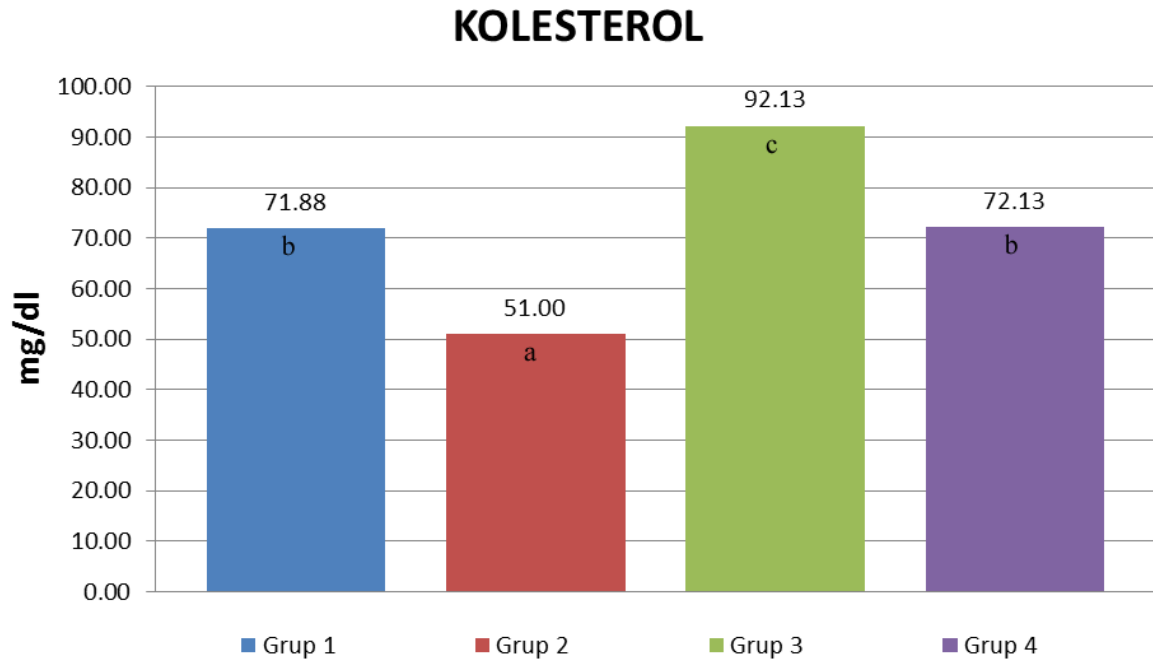


Şekil 4.9. Grupların serum HDL değerleri

4.2.4. Kolesterol

Kontrol ve deney gruplarının serum kolesterol değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.10’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında serum kolesterol değerlerinin NÇY uygulanan grupta kontrol grubuna göre azaldığı; NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum kolesterol değerinin, PCP uygulanan grupta yükseldiği gözlemlendi ($p<0.05$). PCP ve PCP+NÇY kolesterol verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY uygulanan grup değerinin PCP uygulanan gruba göre azalmış olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY kolesterol verileri kıyaslandığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

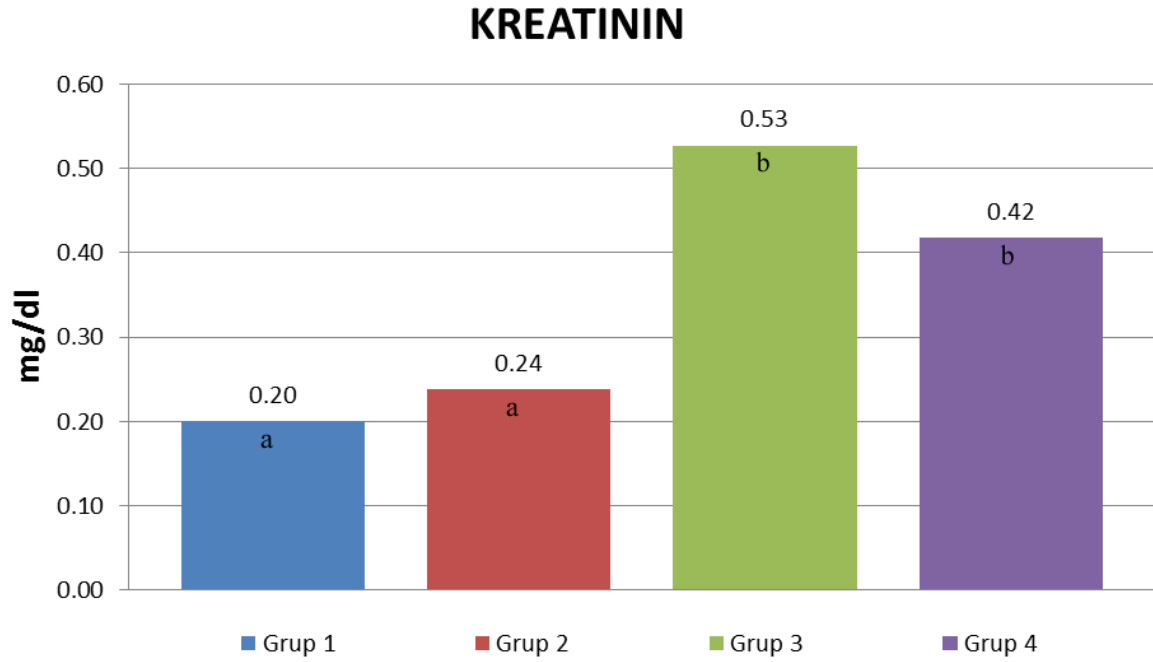


Şekil 4.10. Grupların serum kolesterol değerleri

4.2.5. Kreatinin

Grupların serum kreatinin değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.11’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında serum kreatinin değerlerinin NÇY uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum kreatinin değerinin, PCP uygulanan grupta yükseldiği; PCP ve PCP+NÇY kreatinin verileri kıyaslandığında ise gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY kreatinin verileri kıyaslandığında ise grup 4 değerlerinin yükseldiği gözlemlendi ($p<0.05$).

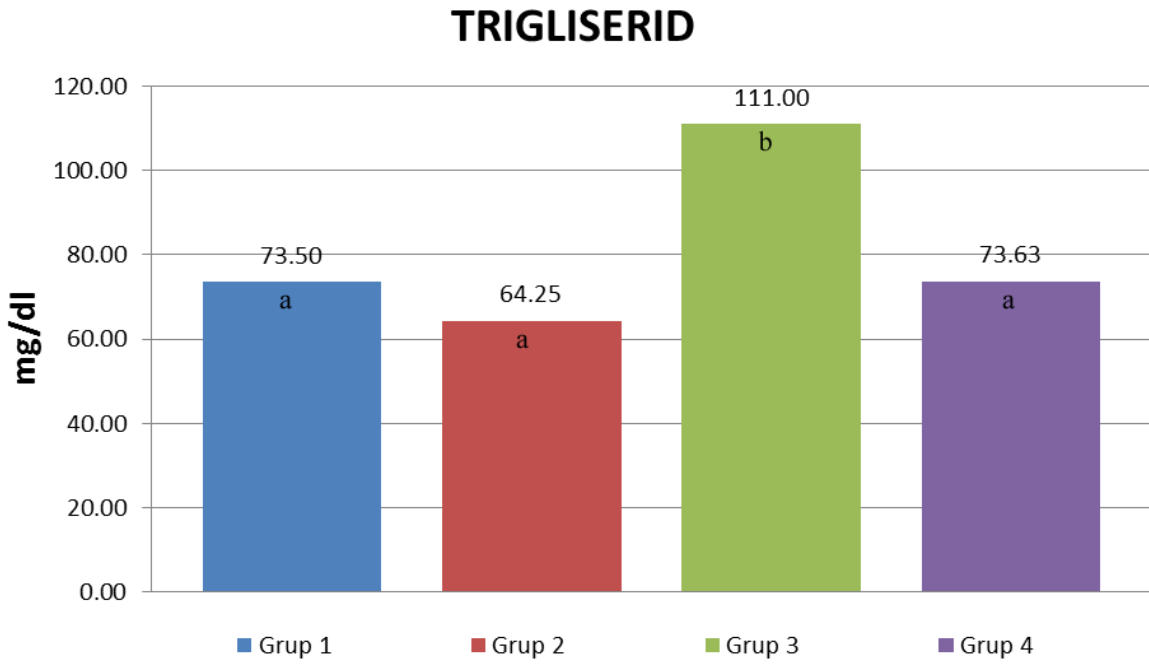


Şekil 4.11. Grupların serum kreatinin değerleri

4.2.6. Trigliserid

Kontrol ve deney gruplarının serum trigliserid değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.12’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında serum trigliserid değerlerinin grup 1, grup 2 ve grup 4 değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grup trigliserid değerinin NÇY uygulanan gruba göre yükseldiği; grup 3 ve grup 4 verileri değerlendirildiğinde ise PCP+NÇY trigliserid değerlerinin PCP grubu değerlerine kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir düşüş gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY trigliserid verileri kıyaslandığında bu değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

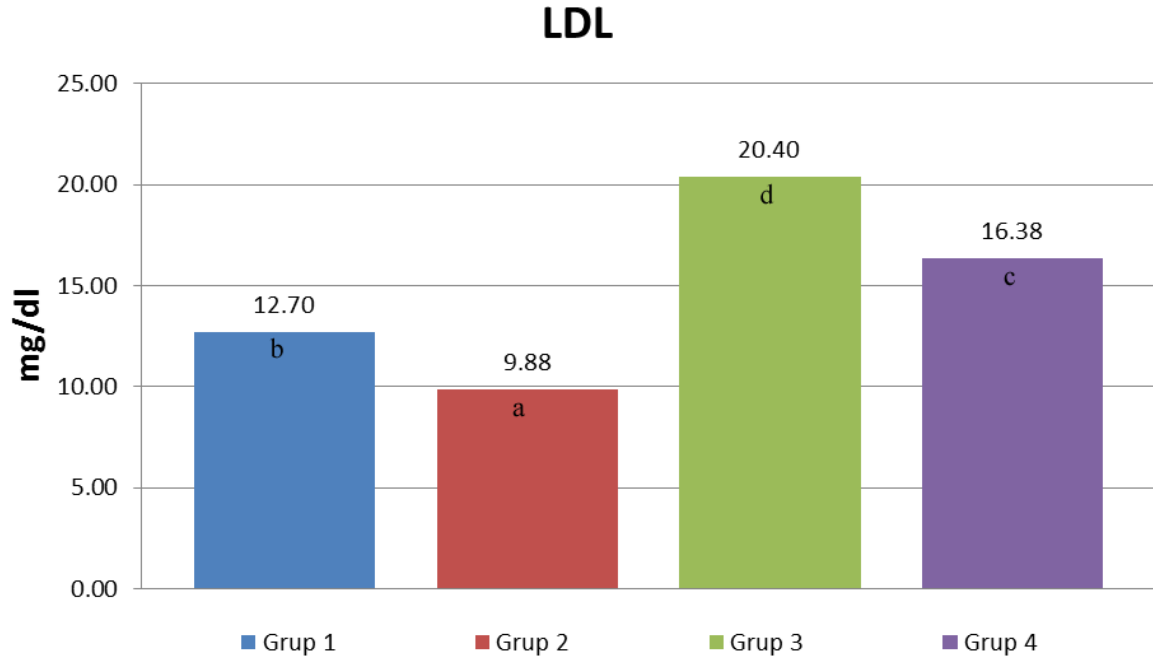


şekil 4.12. Grupların serum trigliserid değerleri

4.2.7. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

Kontrol ve deney gruplarının serum LDL değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.13’de verildi.

Serum LDL verileri kıyaslandığında kontrol ve NÇY değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olduğu ve bu değişimin NÇY uygulanan grupta, kontrol grubuna göre düşüş şeklinde olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). NÇY ve PCP verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grupta LDL değerlerinde NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir yükselmenin olduğu gözlenirken; PCP ve PCP+NÇY verileri değerlendirildiğinde ise PCP+NÇY LDL değerlerinin PCP uygulanan grup değerlerine kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir düşüş gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY LDL verileri kıyaslandığında grup 4 değerlerinde grup 1’e göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

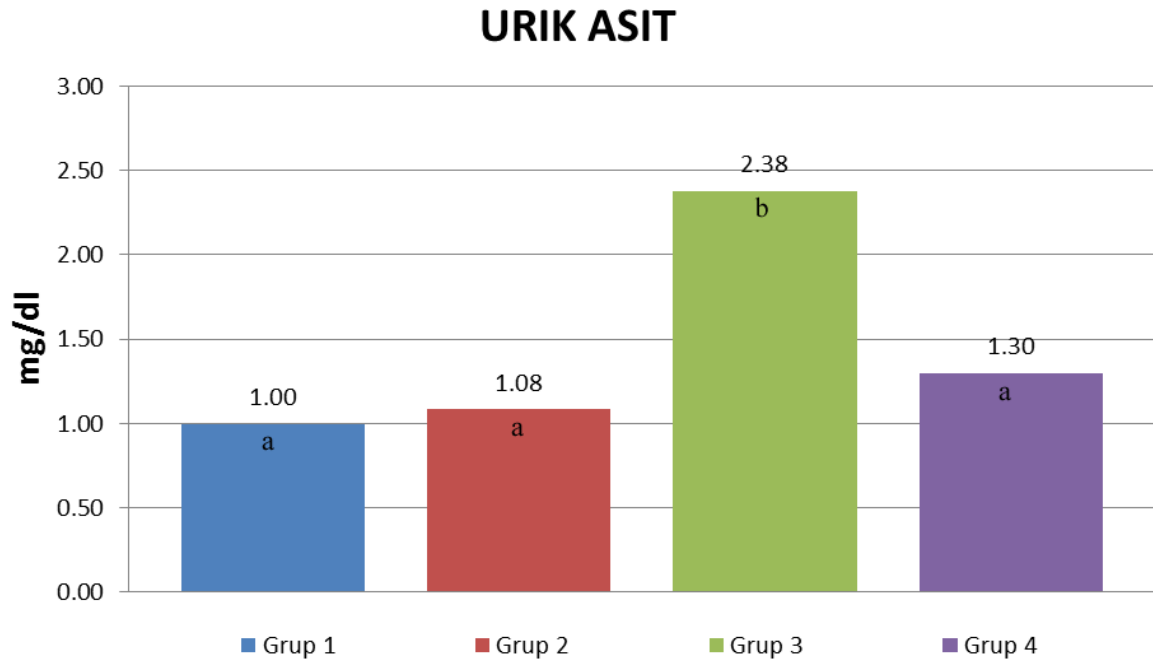


Şekil 4.13. Grupların serum LDL değerleri

4.2.8. Ürik Asit

Kontrol ve deney gruplarının serum ürik asit değerleri tablo 4.2 şekil 4.14’de verildi.

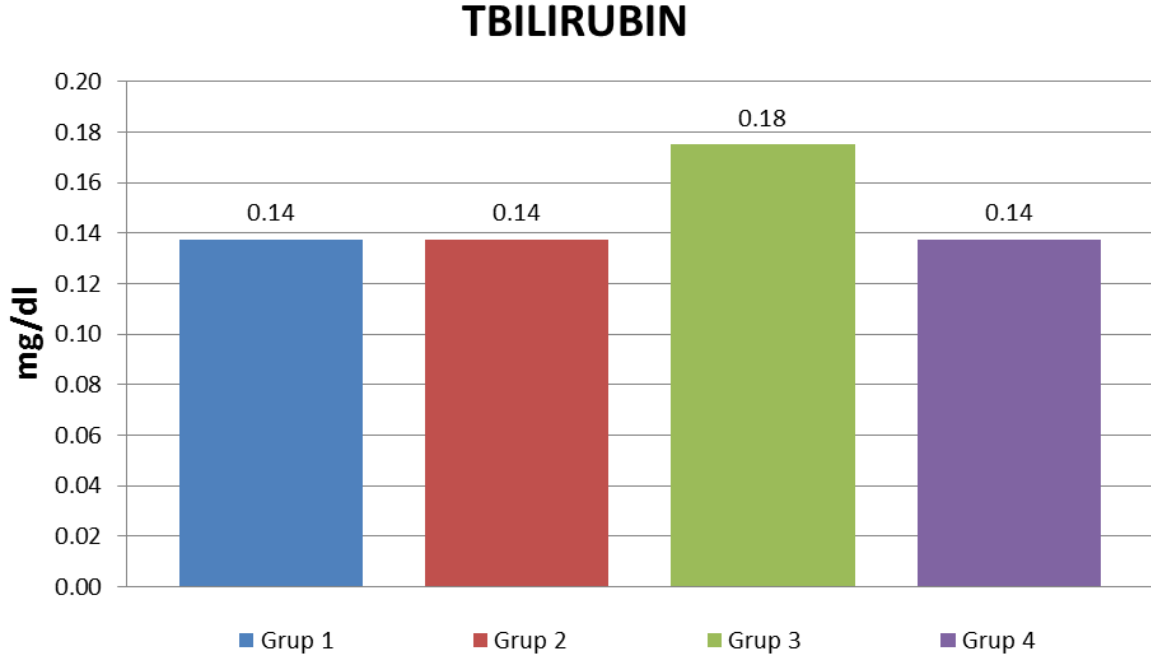
Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında serum ürik asit değerlerinin grup 1, grup 2 ve grup 4 değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP ürik asit verileri karşılaştırıldığında PCP uygulanan grubun değerlerinde NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir yükselmenin olduğu; grup 3 ve grup 4 verileri değerlendirildiğinde ise grup 4 ürik asit düzeyinin azaldığı izlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY ürik asit verileri kıyaslandığında değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).



Şekil 4.14. Grupların serum Ürik asit değerleri

4.2.9. Total Bilirubin

Tablo 4.2 ve şekil 4.15’da belirtildiği gibi, total bilirubin değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişimin olmadığı görüldü ($p>0.05$).

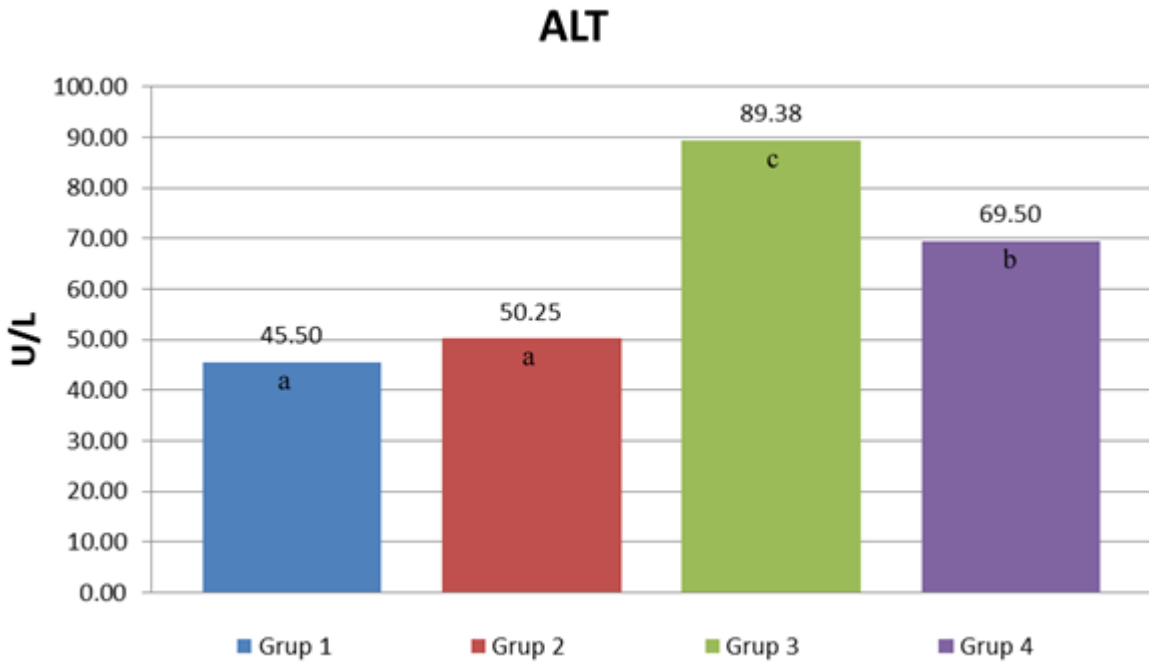


Şekil 4. 15. Grupların serum total bilirubin değerleri

4.2.10. Alanin Aminotransferaz (ALT)

Tüm gruplardaki serum ALT düzeyleri tablo 4.2 ve şekil 4.16’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında kontrol ve nar çekirdeği yağı serum ALT değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında ise serum ALT değerinin, PCP uygulanan grupta NÇY uygulanan gruba göre yükselirken; PCP ve PCP+NÇY ALT verileri kıyaslandığında PCP+NÇY uygulanan grup verilerinin PCP uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir değişim gösterdiği ve bu değişimin düşüş yönünde olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY ALT verileri kıyaslandığında grup 4 değerlerinde grup 1’e göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

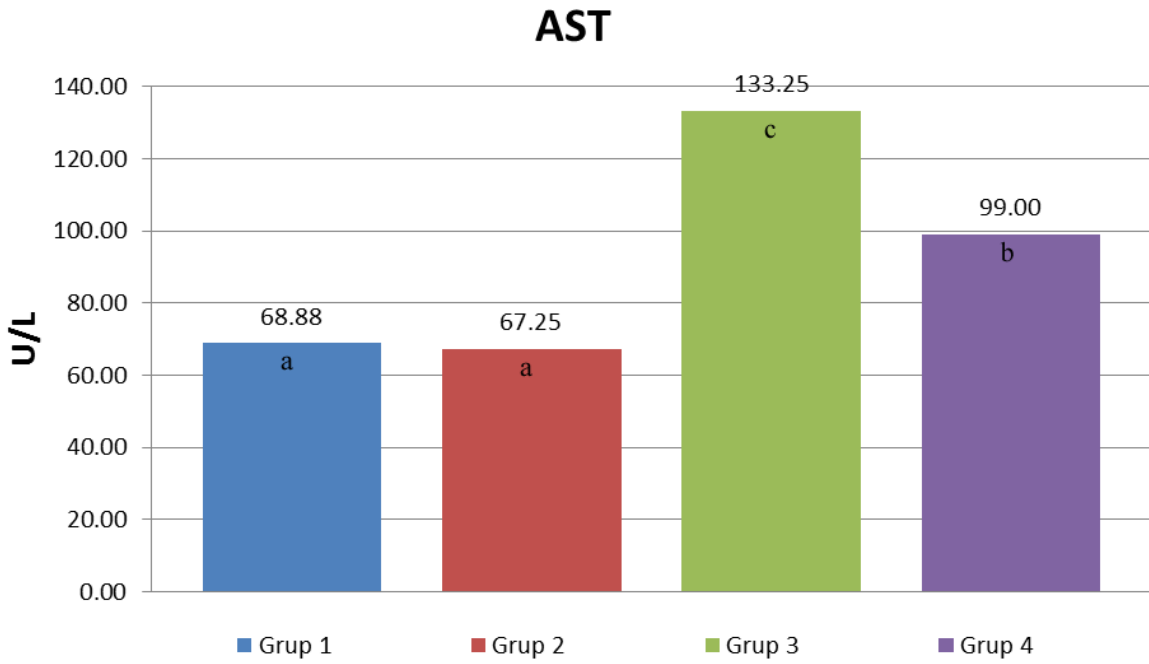


Şekil 4.16. Grupların serum ALT aktiviteleri

4.2.11. Aspartat Aminotrasferaz (AST)

Kontrol ve deney gruplarının serum AST enzim aktiviteleri tablo 4.2 ve şekil 4.17’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında serum AST değerlerinin grup 1 ve grup 2 değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum AST değerinin, PCP uygulanan grupta NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı biçimde yükseldiği; PCP ve PCP+NÇY AST verileri kıyaslandığında ise NÇY+PCP verilen grupta istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüşün olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY AST verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY değerlerinde PCP uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

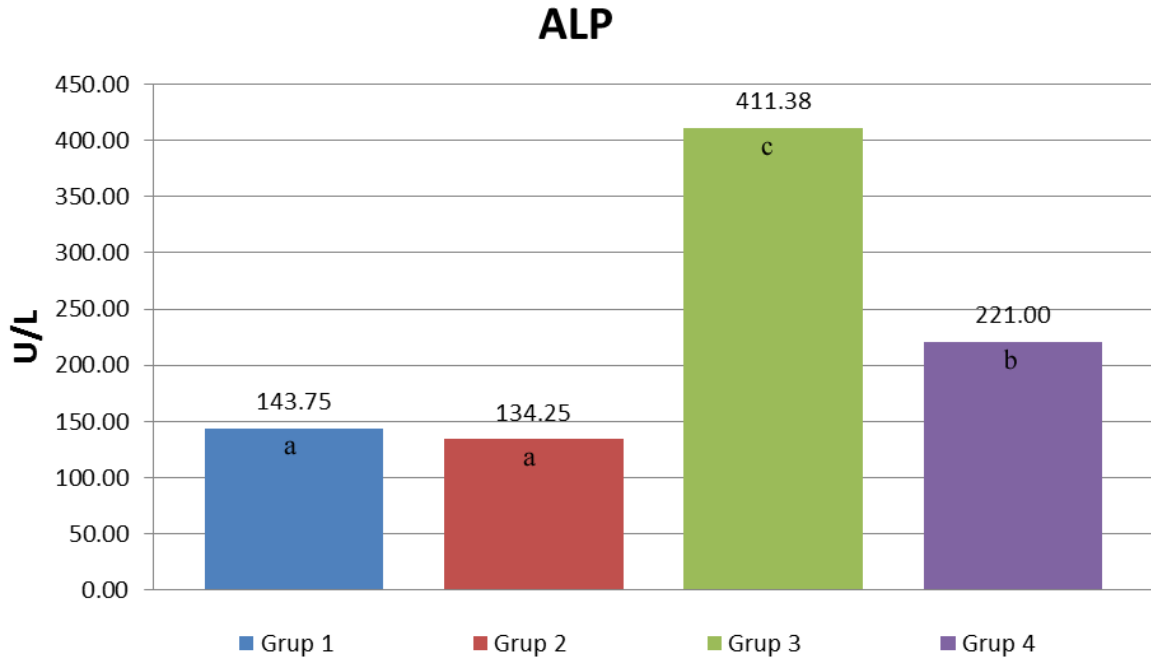


Şekli 4. 17. Grupların serum AST aktiviteleri

4.2.12. Alkalen Fosfataz (ALP)

Kontrol ve deney gruplarının serum ALP enzim aktiviteleri tablo 4.2 ve şekil 4.18’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında grup 1 ve grup 2 değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum ALP değerinin PCP uygulanan grupta NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı biçimde yükseldiği gözlenirken; PCP+NÇY uygulanan grup değerinin PCP uygulanan gruba göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY ALP verileri kıyaslandığında PCP+NÇY değerlerinde kontrol grubu verilerine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

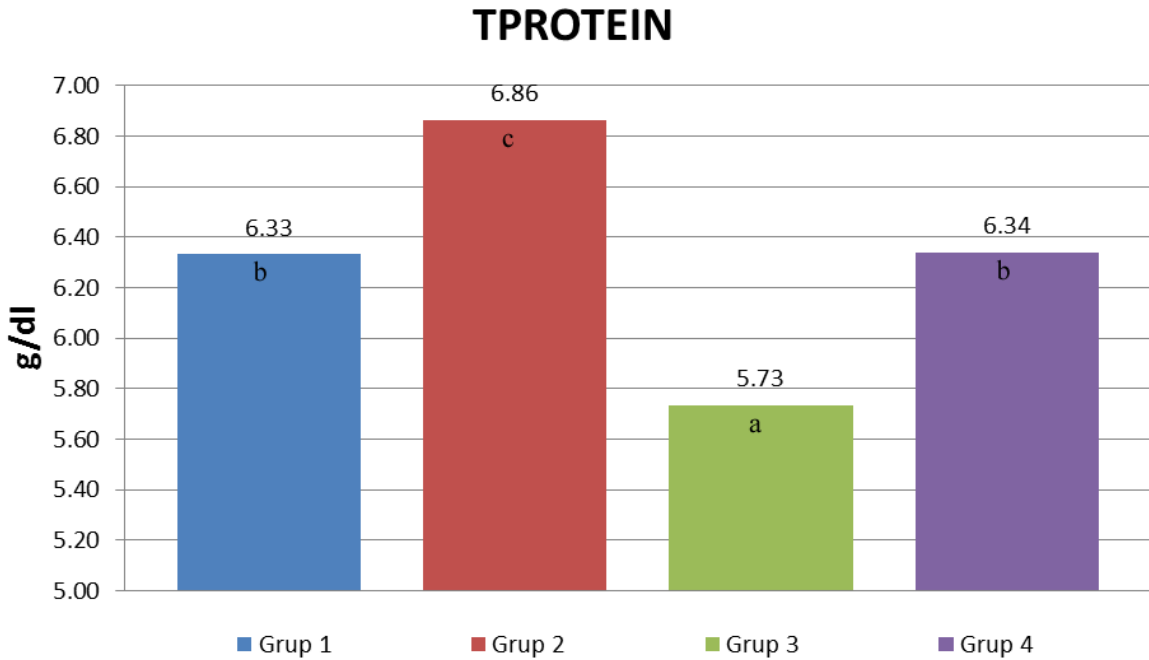


Şekil 4. 18. Grupların serum ALP aktiviteleri

4.2.13. Total Protein

Kontrol ve deney gruplarının serum total protein değerleri tablo 4.2 şekil 4.19’da verildi.

Gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde kontrol ve NÇY serum total protein değerlerinin NÇY uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme gösterdiği izlendi ($p<0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum total protein değerinin, PCP uygulanan grupta NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı biçimde düştüğü gözlemlendi ($p<0.05$). PCP ve PCP+NÇY total protein verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY uygulanan grup verilerinin PCP uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir yükselme gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY total protein verileri kıyaslandığında değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

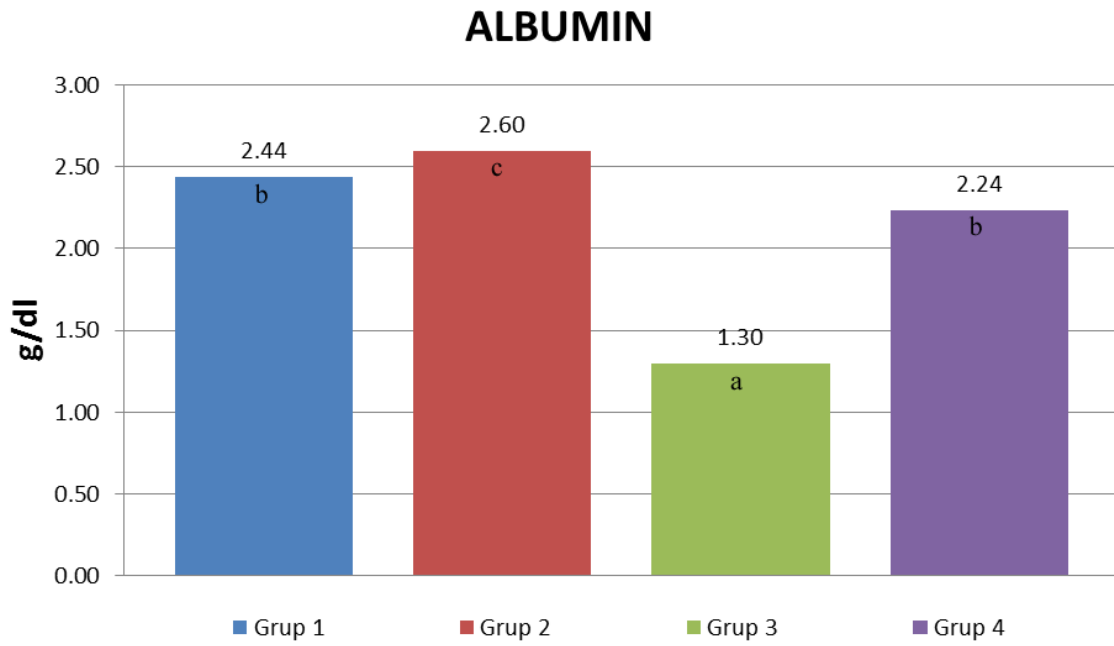


Şekil 4.19. Grupların serum total protein değerleri

4.2.14. Albümin

Kontrol ve deney gruplarının serum albümin değerleri tablo 4.2 ve şekil 4.20’de verildi.

Gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında kontrol ve NÇY serum albümin değerinin NÇY uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme gözlemlendi ($p<0.05$). NÇY ve PCP değerleri kıyaslandığında serum albümin değerinin, PCP uygulanan grupta NÇY uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı biçimde düştüğü gözlenirken; PCP ve PCP+NÇY albümin verileri kıyaslandığında ise PCP+NÇY uygulanan grup değerlerinin PCP uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan önemli bir yükselme gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol ve PCP+NÇY albümin verileri kıyaslandığında değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).



Şekil 4. 20. Grupların serum albümin değerleri

Tablo 4.2. Grupların serum biyokimyasal değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
KAN ÜRE AZOTU (BUN) (mg/dl)	13,60±2,26a	12,20±2,09a	16,39±1,50b	14,12±1,72a
GLUKOZ(mg/dl)	149,37±35,20a	172,00±16,95a	298,00±33,80c	228,25±24,34b
YÜKSEK DANSİTELİ LİPOPROTEİN (HDL) (mg/dl)	61,37±6,36c	75,50±5,60d	40,75±7,99a	50,50±3,96b
KOLESTEROL(mg/dl)	75,87±5,61b	51,00±6,92a	92,12±8,60c	72,12±3,52b
KREATİNİN(mg/dl)	0,20±0,07a	0,23±0,10a	0,52±0,08b	0,41±0,15b
TRİGLİSERİD(mg/dl)	73,50±9,25a	64,25±8,54a	111,0±9,53b	73,62±5,62a
DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİN (LDL) (mg/dl)	12,70±1,24b	9,87±2,26a	20,40±2,60d	16,37±1,50c
ÜRİK ASİT(mg/dl)	0,99±0,14a	1,08±0,20a	2,38±0,89b	1,29±0,17a
TOTAL BİLİRUBİN(mg/dl)	0,13±0,05	0,13±0,05	0,17±0,04	0,13±0,05
ALANİN AMİNOTRANSFERAZ (ALT)(U/L)	45,50±8,60a	50,25±10,18a	89,37±8,34c	69,50±7,17b
ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST)(U/L)	68,87±16,95a	67,25±18,29a	133,25±17,27c	99,00±15,25b
ALKALEN FOSFATAZ(ALP)(U/L)	143,75±14,55a	134,25±36,83a	411,37±43,19c	221,00±64,63b
TOTAL PROTEİN(g/dl)	6,33±0,43b	6,86±0,35c	5,73±0,35 a	6,33±0,53b
ALBÜMİN(g/dl)	2,43±0,26b	2,60±0,25c	1,30±0,10a	2,23±0,22b

Grup1 kontrol, grup 2 nar çekirdeği yağı, grup 3 pentaklorofenol, grup 4 pentaklorofenol+ nar çekirdeği yağı*
p<0.05 * her satırda farklı harfler taşıyan gruplar anlamlıdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest radikaller birçok biyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan ve ksenobiyotik toksisitesi ile ilgili moleküllerdir. Serbest radikaller $\text{OH}^\cdot$, O_2 , NO, lipid peroksit radikalleri gibi değişik yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Membran yapısında yer alan poliansatüre yağ asitlerinin, serbest radikaller tarafından, peroksitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması olarak bilinen lipid peroksidasyonu (LP), basit şekliyle vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak da tanımlanabilir (31,70). Oksidatif stres protein, DNA gibi pek çok önemli biyolojik molekülü hedef alarak zarar verir ve lipid peroksidasyon bu süreçte daha geç gelişir (30). Serbest radikal oluşumunun endojen ve ekzojen kaynakları vardır. İlaçlar (örneğin asetaminofen), metal iyonları (demir, bakır gibi), kirleticiler (asbest lifleri, silika, hipoklorit gibi), radyasyon ve ksenobiyotikler serbest radikal oluşumunun ekzojen sebepleri arasındadır (31). Oksidatif stres ve lipid peroksidasyon pek çok hastalığın nedeni olabilir (43).

Oksijen O_2 grubuna bazı demir ve kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığı ile H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT, peroksidaz, GPx gibi enzimlerle H_2O ve O_2 gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (31).

5.1. YÖNTEMLER

Lipid peroksidasyon parametrelerinin belirlenmesinde yararlanılan bazı belirteçler şöyle sıralanabilir: 1- doymamış yağ asitlerinde oluşan kayıplar, 2- birincil peroksidasyon ürünlerinin miktarı ve 3- ikincil ürünlerin miktarı (karbonil ve hidrokarbon gazları). Bu belirteçlerde tespit edilebilecek karbon ya da

oksijen merkezli radikallerin varlığı biyolojik sistemdeki lipid peroksidasyonun ölçülebilmesi için en uygun metodu özetler. Gerek hayvanlarda gerekse insanlarda oksidatif hasar parametrelerinin tespiti için pek çok yöntem kullanılmakla birlikte en sık olarak kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir: yağ asitleri analizinde GLC ya da HPLC, iyot açığa çıkarılması, oksijen elektrot, hem dejenerasyonu, glutasyon peroksidaz, siklooksijenaz, GC-MS, elektron yörüngesi tuzaklama, hidrokarbon gazları, ışık yayma, floresan, TBA testi, GC- HPLC antibadi teknikleri, dien birleşmesi. Lipid peroksidasyonun belirlenmesinde pek çok yöntem vardır ancak tek bir yöntem bu sürecin ölçüsü değildir (30).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehit (MDA) üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur (31,37). Oluşan MDA hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin, enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara sebep olur. MDA bu özelliği sebebiyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek mutajenik ve hücre kültürlerinde de genotoksik ve karsinojenik etki yapar (31). MDA lipid peroksidasyon oluşumunun göstergesi amacıyla en sık kullanılan belirteçlerden biridir (46). Biyolojik örneklerde MDA analizlerinde, MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin spektroskopik ölçümüne dayalı tayin metodları, kimi dezavantajlarına rağmen halen kabul gören metodlardır (71,72).

Nitrik oksit L- arjinin ve oksijenin NO sentetaz enzimleri ile reaksiyonu sonucu oluşan ve ilk kez 1980'lerin sonlarında belirlenen bir biyolojik üründür. Sentezi, indirgenmiş NADPH'dan türetilir ve substrat olarak da oksijene ihtiyaç duyar. Bütün reaksiyon aşamaları NO enzimlerinin görevlerinden birisi kısmi olarak gen ekspresyonu seviyesini düzenlemektir (50). Sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülatörün bağlanmasıyla ya da nöronlarda bir sinir uyarısına yanıt olarak meydana gelir. Nitrik oksit vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatör olup, Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece bu mekanizmayla karsinogenezde rol oynar. Nitrik oksit radikalının stabil son ürünleri nitrit ve nitrattır. Plazma sıvısı gibi pek çok vücut sıvısında nitrat olarak bulunur (37). Biyolojik sistemlerdeki NO tayinlerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Griess reaksiyonunu temel alan diazotizasyon yöntemi, biyolojik örneklerde duyarlı, basit ve hızlı ölçüme olanak sağlaması açısından sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem nitratın nitrite indirgenmesi ve nitritin asidik ortamda sülfanilamid ile diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorid ile mor renkli kompleks oluşumu ve bu kompleksin spektrofotometrik olarak ölçümü esaslıdır (73,74).

Süperoksit dismutaz, O_2^- serbest radikalının H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen enzimdir (37). Fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır (37,59). Ayrıca fagosite edilen bakterilerin hücre içi ortamda öldürülmesinde de rol oynar, hücre dışı ortamda aktivitesi düşüktür. Süperoksit

dismutaz aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır (37). Aktivite ölçümlerinde ksantin-ksantinoksidaz'ın NBT ile inhibisyonu ile oluşan ürünün absorbansının 560 nm'de ölçümü esasına dayalı yöntem (68) sıklıkla kullanılmaktadır (75).

Katalaz yapısında dört adet hem grubu içeren bir hemoproteindir. Esas olarak peroksizomlarda daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Görevi H_2O_2 'i su ve oksijene parçalamaktır. Hücrede oluşan H_2O_2 'i $OH^\cdot$ serbest radikali oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır (37). Biyolojik örneklerde CAT ölçümlerinde genellikle hidrojen peroksit konsantrasyonundaki azalmanın 240 nm'de değerlendirilmesi yöntemi, hemoglobindeki peroksidaz aktivitesi ile etkileşim göstermediği için özellikle tam kan ve eritrosit hemolizatında CAT ölçümlerinde tercih edilmektedir (75).

Glutasyon peroksidaz enzim olan endojen bir antioksidandır ve sitozolde bulunur (37). Diğer hidroperoksitlerle ve H_2O_2 reaksiyona girer. Peroksitler zarlarda ölçülemez, bunun için önce posfolipazlara yapışmalıdır (30). Aktivitesi, analizlerinde NADPH'in $NADP^+$ 'ya yükseltgenmesi esaslı yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (76).

8-hidroksi-2- deoksi guanosin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürünlerinden birisidir (77,78). Bu ürün normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen kaynaklı reaktif oksijen türlerinin ya da ekzojen kaynaklı olan reaktif oksijen türevleri tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir (79). 8-OH-dG kromozom kırılması ve kromozom kaybının yanında karsinogenesis ve mutagenesis belirtici olarak da değerlendirilebilmektedir (80). DNA replikasyonu sırasında guanin-sitozinden adenin-timine dönüşüme neden olarak mutasyon eğilimini artırır. Bu nedenle 8-OH-dG ölçümü DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede sıkça kullanılmaktadır (78).

Pentaklorofenol ile sıçanlarda subakut zehirlenme oluşturulan ve nar çekirdeği yağının koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada, genel lipid peroksidasyon ve genotoksisite belirlenmesinde sıklıkla kullanılan analitik yöntemler seçildi.

Eritrositler hemoglobinden dolayı yoğun oksidatif tepkimelerin gerçekleştiği hücreler olup, plazma membranlarının çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olması nedeniyle oksidatif strese duyarlılığı yüksek olan hücrelerdir. Bu nedenle oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde eritrosit antioksidan enzim aktivite analizleri öncelikle tercih edilmektedir (81). Bu çalışmada da eritrosit hemolizatlarında SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri üzerinden lipid peroksidasyonun belirlenmesi tercih edildi.

5.2. NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI

Nar (*Punica granatum*) pek çok kültürde yüzyıllar boyunca oldukça yaygın olarak kullanılan çok fazla yan etkisi görülmeyen bu nedenle de geniş kitleler tarafından bilinen bir bitkidir (82).

Nar çekirdeği yağı toplam çekirdek ağırlığının % 12-20'sini oluşturur. Gölükcü ve ark (83) Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin ettikleri NÇY'de palmitik, stearik ve araşidik olmak üzere üç çeşit doymuş; oleik (% 6.83), linoleik (% 5.81) ve punisik asit (% 78.83) olmak üzere üç çeşit doymamış yağ asidinin varlığını tespit etmişler; doymamış yağ asitlerinin toplamının %91.47, doymuş yağ asitlerinin toplamı da %8.53 olarak belirlemişler; nar çekirdeğinin toplam fenolik madde miktarını ise % 0.72 olarak bulmuşlardır. Çalışmada kullanılan NÇY'nin GC-FID dedektörle analizinde yağ asitleri kompozisyonunun (% olarak); maristik asit 0.09, palmitik asit 3.29, palmitoleik asit 0.12, margarik asit 0.05, stearik asit 2.13, oleik asit 8.66, linoleik asit 5.81, linolenik asit 0.06, araşidonik asit 0.42, ekofenoik asit 0.70, punisik asit 78.67 olduğu belirtilmiştir (84). Bu sonuçlar da NÇY'de en fazla bulunan bileşiğin punisik asit olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kontrol grubuna göre NÇY'nin serum HDL, albumin ve total protein düzeyini yükselttiği, kolesterol ve LDL düzeyini ise düşürdüğü (Tablo 4.2) ($p<0.05$); plazma MDA, NO ve 8-OH-dG düzeyleri ile eritrosit CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerinde önemli bir değişime yol açmadığı ($p>0.05$) görülmektedir. Çalışma sonuçları 15 ml/kg dozda 28 gün gün süre ile sıçanlara verilen NÇY'nin sistemik bir toksisiteye yol açmadığını, aksine lipid metabolizması ve protein metabolizması üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Özellikle konjuge linoleik asit ile cis ve trans izomerlerinin, vücutta yağların depolanmasını sağlayan lipoprotein-lipaz enziminin aktivitesini engelleyerek vücutta yağların depolanmasını azalttığı ve kolesterol düzeyini dengelediği bildirilmektedir (85). Bu çalışmada NÇY verilen grupta kolesterol ve LDL düzeyindeki azalma ile HDL düzeyindeki yükselme, NÇY'nin içeriğindeki punikik asit, linoleik asit ve oleik asit gibi doymamış yağ asitlerince zengin oluşu ile ilişkilendirilebilir. Mirmiran ve ark. (86) insanlarda NÇY ile yaptığı çalışmada 4 hafta boyunca günde iki kez 400 mg NÇY uygulanan grubun serum lipid ve lipoprotein değerlerinin plasebo grubuna göre anlamlı ölçüde düştüğünü belirlemişlerdir. Aviram ve ark. (87) üç ay boyunca 200 µg gallik asite eşdeğer çeşitli nar ekstraktları ile besledikleri farelerde ateromatöz plak oluşumunun gerilediğini belirtmişlerdir. Nar çiçeğinin total kolesterol, trigliserid ve glikoz düzeyini azalttığını; nar tanesinin çekirdeksiz kısmının ise trigliserid düzeyinde azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu etkiler narın bileşiminde bulunan fenolik maddeler (punigalasin, punikalin, gallik asit ve elagik asit) ve kompleks şekerlerle ilişkilendirilmiştir. Yamasaki ve ark. (88) da farelere diyetle 3 hafta sürece % 0.12 ve % 1.2 oranında NÇY verdikleri çalışmalarında fosfolipid ve trigliserid seviyesinde anlamlı yükselmenin olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar NÇY'de bulunan punisik asitin ve konjuge linoleik asitlerin farmakolojik etkileriyle ilişkilendirmişler; NÇY'nin karaciğerde lipid seviyesini düşürmede de etkili olduğunu bildirmişlerdir (89). Daha önce yapılan çalışma sonuçları da, bu çalışmada olduğu gibi NÇY'nin lipid metabolizmasını düzenleyici etkileri olduğunu göstermektedir.

Faria ve ark. (90) 4 hafta süre *ad libidum* şeklinde nar suyu verilen farelerin karaciğer homojenatlarını MDA açısından değerlendirmiş ve gruplar arasında önemli bir değer değişimi olmadığını; ancak nar suyunun karaciğer GSH düzeyi ile GSH-Px, SOD ve CAT aktivitesini azalttığını, MDA düzeylerinin değişmemesi nedeniyle bu azalmanın oksidan-antioksidan dengeyi çok fazla bozmadığını, ancak antioksidan enzimlerdeki azalma mekanizmalarının yeni çalışmalarla ortaya konulması gerektiğini ifade etmişlerdir. Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının belirlenmesinin 8-OH-dG ölçümü ile yapıldığı çalışmada nar suyu uygulanan grupta 8-OH-dG düzeyinde belirgin bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Yine Aviram ve ark. yaptığı başka bir çalışmada (91) 2 hafta boyunca günlük 20-80 ml nar suyu verdikleri farelerde nar suyunun plazma, lipoprotein ve makrofajlarda lipid peroksidasyon üzerine baskılayıcı özelliği olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre, sadece NÇY verilen ratlarda kontrol grubuna göre MDA, NO, SOD, CAT, GSH-Px ve 8-OH-dG düzeylerinde anlamlı bir değişimin olmaması, çalışmada seçilen dozda ve sürede verilen NÇY'nin lipid peroksidasyonuna ve genotoksik etkilere neden olmadığını göstermektedir.

5.3. PENTAKLOROFENOL

Pentaklorofenol ağaç ve ağaç ürünleri koruyucu ve herbisit olarak, ayrıca insektisit formülasyonlarının hazırlanmasında yaygın kullanım alanı bulmuş bir maddedir (92,93). Ancak çevrede yıkımlanmasının son derece yavaş olması nedeniyle besinlerde kalıntı problemi olmaya devam etmektedir. Pentaklorofenolün çeşitli deney hayvanlarında karsinogenik ve genotoksik etkili olduğu; PCP'nin bu etkilerine karaciğerdeki biyotransformasyonu sonucu oluşturduğu serbest oksijen radikalleri aracılı olabileceği bildirilmiştir (5, 94).

Michielsen ve ark. (95) dişi kahverengi Norveç sıçanlarına oral yoldan 4 hafta kadar 450 mg heptaklorobenzen ve pentakloronitrobenzen verdikleri çalışmalarında HCB'nin ana metabolitlerinin deri ve akciğer histopatolojisinde değişimlere ve dalak büyümesine yol açtığını, PCP'nin ise belirtilen dokularda önemli bir değişime neden olmadığını bildirmişler; bu farklılığı HCP ve PCP'nin farklı CYP-P450 enzimleri ile metabolize edilmesi ile ilişkilendirmişlerdir.

Chhabra ve ark. (96) 28 gün diyetle farklı dozlarda PCP uyguladıkları sıçanlarda 400 ppm PCP verilen grupta ılımlı hepatosit dejenerasyonu olduğunu, 3200 ppm PCP uygulanan grupta ise şiddetli lobuler merkezli hepatosit hipertrofisi geliştiğini gözlemlemişlerdir. Umemura ve ark. (97) % 0.06 oranında PCP içeren yemle 4 hafta süresince beslenen sıçanlarda AST aktivitesinin de yükseldiğini belirtmişlerdir.

Umemura ve ark. (98) fare diyetine 0,150, 300, 600 ve 1200 ppm oranında PCP ekleyerek 4 hafta boyunca sürdürdükleri çalışmada 600 ppm ve üzeri miktarda PCP eklenmiş yemle beslenen grupların

serum ALP aktiviteleri anlamlı miktarda yükseldiği belirtilirken, ALT ve AST aktivitesinde önemli bir değişim olmadığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (99) sıçan karaciğeri hücre kültüründe yaptıkları çalışmada PCP ve TCHQ verilmesinin lipid peroksidasyon ve karaciğer hasarı üzerine yaptığı etkileri incelemişler, TCHQ'un oksijen reaktiflerinin oluşumunu tetiklediğini, AST ve ALT aktivitesini artırdığını; bu değişimlerin vitamin E uygulamasıyla azaldığını belirlemişlerdir. Yine çalışma sonucunda TCHQ' ya maruz kalan hücrelerde apoptozis şekillendiğini, bu etkinin PCP uygulanan hücre pasajlarında görülmediğini belirtmişlerdir.

Grup 3 ve grup 1 karşılaştırıldığında PCP verilen grupta serum AST, ALP, ALT enzim aktiviteleri ile BUN, glukoz, kolesterol, kreatinin, trigliserid, LDL ve ürik asit değerlerinde yükselme; HDL, albumin ve total protein düzeylerinde azalmanın olduğu; lipid peroksidasyon parametrelerinden plazma MDA ve NO düzeyleri ile SOD aktivitesinde yükselme; CAT ve GSH-Px değerlerinde ise azalmanın meydana geldiği görülmektedir ($p<0.05$).

Özellikle serum ALT aktivitesindeki yükselmeler canlıda karaciğer hasarının göstergeleri olarak değerlendirilmektedir (81,100). Serum AST aktivitesinde artış karaciğer ve kas hasarı sonucunda olabilmektedir. ALP aktivitesindeki yükselmenin ise özellikle safra kanallarında hasar oluşumu sonucu gerçekleştiği bilinmektedir (101,102). Çalışma sonuçlarında, daha önce yapılan çalışmalarda da ortaya konulduğu gibi, PCP verilen grupta serum AST, ALP ve ALT aktivitelerinin yükseldiği görülmektedir. Bu durum PCP'nin karaciğer hücrelerinde hasara yol açarak belirtilen sitozolik enzimlerin hücre dışına çıktığını; ALP aktivitelerindeki yükselme karaciğer hasarının safra kanallarını da kapsayacak şekilde şiddetlendiğini göstermektedir.

Çalışma bulguları ve daha önce yapılan araştırmalar incelendiğinde PCP'nin protein (albumin ve total protein değerlerinde azalma), yağ (serum kolesterol, trigliserit ve LDL değerlerinde yükselme, HDL'de azalma) ve şeker (serum glukoz düzeyinde artış) metabolizması üzerine olumsuz etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır; belirtilen yönleriyle çalışma sonuçları daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Tsai ve ark. (103) akut toksisite çalışmasında sıçanlara 0, 30, 60 ve 120 mg/kg ca dozunda oral yoldan PCP ve farelere 0, 30, 60 mg/kg ca dozunda oral yoldan, kronik toksisite çalışmasında ise sıçanlara 60 mg/kg ca dozunda yeme katılarak 6 ay boyunca PCP verdikleri çalışmalarında PCP metabolizmasının monoksijenaz ve peroksidaz mikrozomal enzimleri aracılığıyla gerçekleştiğini belirtmişler, ayrıca CYP-P450 enzimlerinin PCP metabolizasyonunda arttığı gözlemişler; ayrıca enzim etkinliğindeki yükselmeye bağlı olarak PCP'nin serbest radikal oluşturma potansiyelinin arttığını bildirmişlerdir.

Folch ve ark (104) yapmış olduğu çalışmada sıçanlarda PCP ile mikromolar dozda oluşturulan akut toksisite modelinde beyincik granüler nöronlarına mikromolar konsantrasyonda PCP uygulamışlar ve genlerin kopyalama aktivitesi ile klasik apoptozis yolu, oksidatif stres ve glutatyon metabolizması

(GSH-Px, CAT, Glutasyon S transferaz-3 ve SOD-1) ve mitotik yanıt arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışma sonucu PCP'nin intrinsik apoptotik yolların uyarılmasına yol açtığını; ayrıca ROS detoksifikasyonu, glutasyon metabolizması ve DNA hasarı ile ilgili genlerin sentezini arttırdığını bildirmişlerdir.

Serbest radikalleri etkinsizleştirmede görev alan SOD, CAT ve GSH-Px başta olmak üzere, çeşitli enzimler bulunmaktadır. Fizyolojik sınırlar dışında aşırı NO şekillenmesi durumunda NO'den güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluştuğu, peroksinitritin de dekompozisyonu sonucu OH[•] radikali üretiminin arttığı bilinmektedir. Antioksidan enzimlerden SOD, süperoksit radikalini daha az oksidan etkili H₂O₂'ye dönüştürmekte, GSH-Px ve CAT, SOD tarafından oluşturulan H₂O₂'yi etkinsizleştirmektedir (31,105). Bu sonuçlar PCP'nin farklı serbest radikallerin üretimi ve birikiminin hücrede birikmeye sebep olarak lipid peroksidasyona yol açtığını göstermektedir. Sai-Kato ve ark. (94) PCP'nin süperoksit anyonu oluşturucu etkileri olduğunu; Tsai (106) ve Lin (107) de lipid peroksidatif etkinliğin PCP'nin serbest radikal üretimini tetikleyen karaciğer sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemini etkinliğini artırması ile ilişkili olabileceğini bildirmektedir. Bu çalışmada MDA ve NO düzeyindeki yükselme ile birlikte SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerindeki azalma PCP'nin süperoksit, H₂O₂, peroksinitrit, OH[•] gibi farklı serbest radikallerin birikimine yol açtığını; antioksidan enzimlerin oluşan radikalleri etkinsizleştirmede yetersiz kaldıklarını göstermektedir. Antioksidan enzim etkinliklerindeki azalma, serbest radikal üretimindeki artışla birlikte bu enzimlerin kullanıldığını ve tükenme noktasına geldiğine işaret etmektedir. Sonuç olarak PCP'nin lipid peroksidasyon oluşturucu etkilerinin sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemi etkinliğinin artışına bağlı olarak antioksidan enzim sisteminin etkinsizleştirme kapasitesi üzerinde serbest radikal oluşumuna bağlı olduğu söylenebilir.

Dahlhaus ve ark (108) periton içi tek doz 20 ve 50 mg/kg tetraklorohidrokinon (TCHQ) uygulaması yapılan farelerde 6. ve 24. saat karaciğer 8-OH-dG seviyesinde önemli bir değişim olmadığını; 300 mg/kg-ca/gün dozunda 2 hafta süre ile TCHQ verilen grupta ise karaciğer 8-OH-dG seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Dahlhaus ve ark. (109) başka bir çalışmada PCP ve metabolitleri ile muamele edilen fibroblast V79 hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek için 8-OH-dG ölçümü yapmışlar, PCP verilen grupta kontrol grubuna göre 8-OH-dG düzeyinde önemli bir değişim görülmediğini, ancak metabolitleri ile inkübe edilen hücrelerde 8-OH-dG miktarının 2-2,5 kat arttığını bildirmişlerdir. Yine Dahlhaus ve ark. (110) hamster akciğer fibroblast hücrelerine (V79) TCHQ uyguladıkları çalışmada, TCHQ'nın 6.25 ve 12.5 µM konsantrasyonlarında 8-OH-dG seviyesinde önemli bir değişiklik olmadığını; 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonda ise 8-OH-dG seviyesinde artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

Umemura ve ark. (111) yapmış olduğu çalışmada farelere 8 hafta boyunca diyetle farklı dozlarda PCP uygulaması yapmışlardır. Sonuçta 8-OH-dG seviyesinin doza bağımlı biçimde yükseldiği; 600 ve 1200 ppm dozda verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükselme

olduğunu bildirmişlerdir. Umemura ve ark. 1996 yılında yaptıkları çalışmada (97) fareleri % 0.03, % 0.06 ve % 0.12' lik PCP içeren diyetle 4 hafta süresince beslemişler, % 0.03 ve daha yüksek konsantrasyonlarda PCP ile beslenen farelerde karaciğer 8-OH-dG seviyesinin önemli ölçüde yükseldiğini bildirmişlerdir. Umemura ve ark. (98) yaptığı diğer bir araştırmada farelere diyetle 0,150, 300, 600 ve 1200 ppm oranında PCP eklenerek 4 hafta boyunca beslemişler; 1200 ppm dozda PCP eklenmiş yemle beslenen grubun karaciğer DNA 8-OH-dG seviyesinde anlamlı bir yükselme olduğunu bildirmişlerdir.

Po- Hsiung Lin ve ark. (112) F344 ırkı sıçanlara 27 hafta boyunca diyetle 1000 ppm (60 mg/kg ca doz) PCP verdikleri çalışmada karaciğer 8-OH-dG miktarında kontrol grubuna göre 2 kat artış olduğunu belirtmişlerdir. Sai- Kato ve ark (94) farelere ağızdan tez doz 0, 30, 60 ve 80 mg/kg PCP uyguladıkları çalışmalarında, tek sefer 60 mg/kg ve üzeri dozlarda PCP verilen gruplarda 6. saat karaciğer 8-OH-dG seviyesinin yükseldiğini, 30, 60 ve 80 mg/kg PCP uygulanan gruplarda da 8-OH-dG seviyesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Wang ve ark. (113) bir grup fareye tek doz 40 mg/kg PCP periton içi uygulamışlar, diğer gruba ise 20 mg/kg PCP metaboliti olan TCHQ yine periton içi uygulayarak, 6 saat sonra karaciğerleri almışlardır. TCHQ uygulamasının karaciğerde ROS üretimini hızlandığını, karaciğer GSH seviyesinin azalttığını bildirmişler; DNA izolatını akridin oranj ve etidyum bromür ile boyayıp incelediklerinde apoptozis ve DNA hasarı şekillendiğini belirlemişlerdir.

Diğer çalışmaların aksine, bu çalışmada 40 mg/kg dozda 28 gün süre ile verilen PCP'nin 8-OH-dG düzeyinde anlamlı bir değişime yol açmadığı ortaya konulmuştur. Bu durum PCP dozu, verilme yolu, süresi ve şekli, tür farklılığı gibi faktörlerle ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda verilen doz ve sürede uygulanan PCP'nin genotoksik etkisinin net bir şekilde ortaya konulması için 8-OH-dG ile birlikte diğer genotoksisite testlerinin yapılması; genotoksisite değerlendirmelerinin özellikle de PCP'nin biyotransformasyonu ve atılımı sırasında daha fazla maruz kalınan karaciğer ve böbrek gibi dokularda da yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

5.4. PENTAKLOROFENOL-NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞI

Diyetle ya da koruyucu ve tedavi edici olarak dışarıdan alınan ve antioksidan etkileri bilinen vitamin A, C, E, koenzim Q-10, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, resveratrol gibi bazı maddeler organizmayı serbest radikallere karşı koruyabilmektedir (31,105).

Grup 3 ve grup 4 serum biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde grup 4 AST, ALP, ALT aktiviteleri ile BUN, glukoz, kolesterol, trigliserit, LDL, ürik asit, düzeylerinde azalma, HDL, total protein ve albumin düzeylerinde ise yükselme; grup 1 ve grup 4 karşılaştırmasında ise grup 4'de serum ALT, AST ve ALP aktiviteleri ile glukoz, kreatinin, LDL düzeylerinde artış, HDL düzeyinde ise azalmanın olduğu ortaya konulmuştur.

XCH

Das ve ark. (114) streptozotosinle diyabet oluşturulan bir grup sıçana 300 mg/kg ve diğer grup sıçana 600 mg/kg dozunda nar çekirdeği ekstraktı vermişler ve nar çekirdeği ekstraktının serum glukoz düzeyini azalttığını belirlemişlerdir. Bagri ve ark. (115) streptozotozinle diyabet oluşturulan sıçanlarda 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozunda 21 gün boyunca ağız yoluyla verilen sulu nar ekstresinin serum kan şekeri, total kolesterol, trigiliserit, LDL, VLDL seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü; PCP grubuna göre HDL düzeyini ise yükselttiğini bildirmişlerdir. Punisik asitin sindirim kanalından kolesterol emilimini azaltıcı ve HMG CoA redüktaz enzimi üzerinden kolesterol sentezini baskılayıcı etkisi olduğu belirtilmektedir (81). Çelik ve ark (116) trikloroasetik asit (TCA) uygulanan sıçanlara 5 gün boyunca nar çayı uygulamışlar, çalışma sonunda TCA verilen grubun AST ve ALT seviyelerinde yükselme; TCA+nar çayı verilen grubun AST ve ALT, LDH ve CK seviyelerinde önemli düşüş görüldüğünü belirtmişlerdir. Sunulan çalışmanın verileri de NÇY'nin PCP'nin protein, yağ ve şeker metabolizması üzerindeki olumsuz etkileri önleyici ve karaciğer hasarını düzenleyici etkinliğinin olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi, NÇY'nin biyokimyasal parametreleri düzenleyici etkilerinin bileşiminde bulunan punisik asit (117) ve linoleik asit (81) ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Grup 3 ve grup 4 lipid peroksidasyon parametreleri değerlendirildiğinde grup 4 serum MDA ve NO düzeyleri ile eritrosit SOD aktivitesinde azalma, eritrosit CAT ve GSH-Px aktivitesinde ise yükselmenin olduğu; Grup 1 ve grup 4 karşılaştırmasında ise eritrosit CAT, SOD ve GSH-Px aktivitesinde azalma olmakla birlikte değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmektedir. Çalışma sonuçları NÇY'nin PCP tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunun şiddetini azalttığını göstermektedir. Antioksidan enzim aktivitelerinin tekrar kontrol grubu değerlerine doğru yaklaşması da NÇY'nin antioksidan enzimlerin etkinliğini artırarak serbest radikallerin etkisizleştirildiğine işaret etmektedir.

Bouroshaki ve ark. (118) heksabütadien (HCBD) ile nefrotoksisite oluşturmuş sıçan gruplarına 0.16, 0.32 ve 0.64 mg/kg periton içi nar çekirdeği yağı vererek koruyucu etkisine bakmışlardır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HCBD uygulanan grupta 24 saat sonra idrarda glikoz, protein, serum üre ve kreatinin seviyesinde önemli bir yükselme görüldüğünü, HCBD'nin böbrek yetmezliğine yol açtığını; böbrek MDA MDA düzeyini artırdığını; NÇY uygulanan gruplarda ise serum kreatinin ve üre seviyesi ile idrar glikoz ve protein konsantrasyonlarının azaldığını bildirmişlerdir. Kotamballi ve ark (119) sıçanları 50 mg/kg nar çekirdeği ekstraktı ile 14 gün süresince beslenmişlerdir. Nar çekirdeği ekstraktının, CCl₄ uygulaması sonucu karaciğer aktiviteleri azalan CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitesini yükselttiğini ve karaciğerde lipid peroksidasyon ürünleri (MDA gibi) oluşumunu azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu yararlı etkilerin, serbest radikal hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu bilinen fenolik maddelerin NÇY'de yüksek oranda bulunması ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır. Bagri ve ark. (115) streptozotozinle diyabet oluşturulan sıçanlarda 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozunda 21 gün boyunca ağız yoluyla verilen sulu nar ekstresinin pankreas MDA düzeyini önemli ölçüde

düşürdüğünü, GSH düzeyleri ile antioksidan enzim (SOD, CAT, GSH-Px) aktivitelerini ise kontrol grubuna yaklaştırdığını bildirmişlerdir. Çelik ve ark. (116) TCA uygulanan sıçanlara 5 gün boyunca nar çayı uyguladıkları çalışmada TCA uygulanan grupta karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokusundaki MDA seviyelerinin yükseldiğini, belirtilen parametrelerin NÇY+TCA verilen grupta ise kontrol değerlerine yaklaştığını; TCA verilen grupta karaciğer SOD aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını, NÇY+TCA verilen grupta ise önemli bir değişiklik görülmediğini, ancak NÇY+TCA verilen grupta beyin, karaciğer ve dalak GSH aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Daha önce yapılan araştırmalar NÇY'nin antioksidan ve koruyucu etkilerinin içeriğinde bulunan yağ asitleri ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmalarda NÇY içinde bulunan linolenik asit gibi yağ asitlerinin *in vivo* ortamlarda serbest radikal oluşumunu azaltarak ve eritrosit zarları ile diğer lipidler içindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu önleyerek hidroperoksitlerin oluşumlarını azaltıcı etkileri aracılığıyla antioksidan etkinliğin ortaya çıktığı savunulmaktadır. NÇY'nin antioksidan etkisi ile ilgili kabul gören diğer mekanizma ise, NÇY içindeki yağ asitlerinin konjuge dienler ve serbest radikallerle bağlanarak bunların lipid peroksidasyon oluşturunca etkilerini engellemesidir. Yine bu yağ asitlerinin nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltıcı özelliğinin peroksinitrit kaynaklı lipid peroksidasyonu engelleyici etkileri olabileceği belirtilmektedir (117). Mehta ve Lansky (120) NÇY'nin antitümör özelliğini, NÇY'nin içeriğinde yüksek oranda bulunan punisik asidin eikozanoid metabolizmasını inhibe etmesi sonucu prostaglandin biyosentezinin azalması ve içeriğindeki polifenollerin antioksidan etkileriyle ilişkilendirmiştir. Hora ve ark (121) da NÇY'nin antitümör etkisini yine içeriğindeki punisik asidin prostoglandin biyosentezini (özellikle siklooksijenaz 1 ve siklooksijenaz 2) ve lipooksijenazı inhibe edici, fosfolipaz A2 etkinliğini azaltıcı etkilerine bağlamışlardır. Kohno ve ark. (122) da NÇY'nin antitümör etkinliğini konjuge linolenik asitler ve linoleik asitlerin farmakolojik etkileri ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Literatür bilgisi NÇY antioksidan etkinliğinde çok farklı mekanizmaların rolü olduğu ortaya koymaktadır. Çalışma sonuçları da diğer çalışmalarda olduğu gibi NÇY'nin antilipid peroksidatif ve antioksidan etkileri olduğunu göstermektedir. Sunulan çalışmada NÇY'nin PCP'nin GSH-Px ve CAT aktivitesi ile NO düzeyini kontrol grubu değerlerine doğru yaklaştırması, NÇY'nin özellikle H₂O₂ ve peroksinitrit aracılı oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri olduğunu düşündürmektedir. Yine de NÇY'nin antioksidan etkinliğinde hangi mekanizmaların rol aldığı daha detaylı çalışmalar yapılarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak sunulan çalışmada, oral yoldan gavaj ile 40 mg/kg (ca) uygulanan PCP'nin karaciğer hasarına, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzim etkinliklerinde azalmaya yol açtığı; 15 ml/kg ca dozunda 28 gün boyunca verilen NÇY'nin ratlarda protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması üzerine istenmeyen etkilerinin olmadığı, karaciğer üzerinde toksik etkilere yol açmadığı, lipid peroksidasyonu oluşturunca etkilerinin bulunmadığı; NÇY'nin PCP'nin istenmeyen etkileri üzerinde koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Cerda B, Ceron JJ, Tomas- Berberan FA, Espin JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitanin punigalagin to rat for 37 days is no toxic. J Agric Food Chem 2003; 51: 3493-3501.
2. Kaya S, Pirinççi İ, Ünsal A, Traş B, Bilgili A, Akar F, Doğan A, Yarsan E. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji (2 inci baskı), Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, Medisan Yayınevi, Ankara, 2002: 467.
3. Şanlı Y. Veteriner Klinik Toksikoloji (2 inci baskı), Güngör Matbaacılık, İstanbul, 2002: 463-464.
4. United States Environmental Protection Agency, “Reregistration Eligibility Decision for Pentachlorophenol” EPA Report 739-R-08-008, Amerika, 2008: 10-37.
5. World Health Organization International Programme on Chemical Safety, “Environmental Health Criteria 71- Pentachlorophenol”, WHO IPCS Report, Geneva, 1987:1-195.
6. National Toxicology Program, “Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol”, NTP Report 87-86-5, Newyork, 1999: 5-53.
7. Dökmeci İ, Dökmeci AH. Toksikoloji: Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. 4 üncü baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2005: 602.
8. The Merck Veterinary Manual (10 th ed), Kahn C. M. Merck& Co, İndiana, 2010: 2633- 2634.
9. Niesink RJM, Vries J, Hollinger MA. Toxicology: principles and applications, CRC Press, Florida, 1996: 623.
10. Kaya S. Tıbbi Botanik ve Tıbbi Bitkiler, Medisan Yayınevi, Ankara, 2008: 131- 132.

11. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alternative Medicine Review* 2008; 13: 128-144.
12. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 177-206.
13. Baytop T. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1999: 305- 306.
14. Wang RF, Xie WD, Zhang Z, et al. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *J Nat Prod* 2004; 67: 2096-2098.
15. Kim ND, Mehda R, Yu W. et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res and Treat* 2002; 71: 203-217.
16. Kaufman M, Weisman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI- TOF/ MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10405-10413.
17. Grossmann ME, Mizuno NK, Schuster T, Clearly MP. Punicic acid is an ω - 5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int J Oncol* 2010; 36: 421- 426.
18. Vroegrijk IOCM, Van Diepen JA, Van Den Berg S. et al. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet- induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chem Tox* 2011; 49: 1426-1430.
19. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein E-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 1928-1935..
20. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. *J Agric Food Agric* 2000; 48: 4581-4589
21. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavanoids. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 11-17.
22. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *J Agric Food Chem* 2002; 7: 274-283.
23. Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle* 2006; 5: 371-373.
24. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, et al. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 14813- 14818.

25. Hidaka M, Fujita K, Ogikubo T, et al. Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 A (CYPA) activity. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 581-583.
26. Hidaka M, Okumura M, Ken-ichi F, et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 644-648.
27. Vidal A, Fallarero A, Pena RB, et al. Studies on the toxicity of punica granatum L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol* 2003; 89: 295-300.
28. Filippich [U](#), [Zhu J](#), [Oelrichs P](#), et al. Hepatotoxic and nephrotoxic principles in terminalia oblongata. *Res Vet Sci*. 1999; 50:170-7.
29. Halliwell B, Cross CE. Oxygen- derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994;102:5-12.
30. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-725.
31. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15: 91-96.
32. Stadler I. Oxygen consumption methods, In: *Free radicals and Antioxidant Protocols*. Armstrong D (eds). New Jersey, 1998; 3-15.
33. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992; 12: 201-207.
34. Ünal A. Üriner Sistem Kanseri Hastalarında Cerrahi Tedavi Öncesi ve Sonrası İdrar 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) Seviyeleri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2007: 78.
35. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidations and DNA damage. *Toxicology* 2002; 27: 219-222.
36. Kılıksız S, Demirel C. Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak n-asetil-sistein'in potansiyel rolü. *Türk Onkoloji Dergisi* 2008; 23: 200-207.
37. WEB_1. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf> (15.10.2011).
38. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen PE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med* 1999;26: 202-226.
39. Priya B, Sivaprasanth RK, Jensi VD, et al. Characterization of manganese superoxide dismutase from a marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* BDU20041. *Saline Systems* 2010; 6: 6.
40. Halliwell B. Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 1994; 344: 721-724.

41. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
42. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819- 1828.
43. Wildburger R, Mrakovcic L, Andrisic L, et al. Lipid peroxidation and age-associated diseases- cause or consequence?: review. *Türkiye Klinikleri* 2009; 29: 189-193.
44. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991;11:81-128.
45. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres-induced cancer. *Chem Biol Inter* 2006;160: 1- 40.
46. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stres: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 47: 1209-1214.
47. Marnett LJ. Lipid peroxidation -DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424:83-95.
48. Feng Z, Hu W, Marnett L. J, Tang M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV-and BPDE- induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat Res* 2006; 601: 125-136.
49. Chancerelle Y, Mathieu J, Kergonou JF. Antibodies aganist malondialdehyde-modified proteins, In: *Free radicals and Antioxidant Protocols*. Amstrong D (eds). New Jersey, 1998; 111-118.
50. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of Nitric Oxide Synthases, In: *Nitric Oxide Protocols*. Titheradge MA (eds), Humana Press New Jersey, 1998; 1-32.
51. Mates J, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
52. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stres and carsinogenesis. *Environ Sci Health* 2009; 27: 120-139.
53. Jaruga P, Dizdaroğlu M. Repair products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Asids Research* 1996;24: 1389-1394.
54. Dizdaroğlu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 1991;10:225-242.

55. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clin Chim Acta 2004; 313: 17-29.
56. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. Carcinogenesis 1990; 11: 1447-1450.
57. Halliwell B, Dizdaroğlu M. Commentary: the measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. Free Radic Res Commun 1992; 16:75-87.
58. 8- hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit prospectus book. Cayman Chemical Company. Catalog No. 589320; p. 1-32.
59. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase. Accounts Chem Res 1972;5 :321.
60. Dargel R. Lipid peroxidation- a common pathogenetic mechanism? Exp Toxicol Pathol 1992; 44: 169-181.
61. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. YYÜ vet Fak Derg 1998: 89-95.
62. Cooke MS, Evans MD, Mistry N, Lunec J. Role of dietary antioxidants in the prevention of *in vivo* oxidative DNA damage. Nut Res Rev 2002; 15(1): 19-42.
63. Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in clinical depression. Psychosom Med 2006; 68: 1-7.
64. Fairbank VF, Klee GG. Biochemical aspect of haematology, In: Fundamentals of Clinical Biochemistry. Tiez NW (eds), Saunders WB. Philadelphia, 1987; 803-804.
65. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol 1979; 135: 372-376.
66. Tracey WR, Tse, J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 1995; 272: 1011-1105.
67. Luck HS. Catalase. In: Methods in Analysis Ed. Bergmeyer HU. Academy Press 1955
68. Sun Y, Oberley, LW, Li, YAA, Simple for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497-500.
69. Paglie D, Valentie WN. Studies on the qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Med 1967; 70: 158-169.

70. Gutteridge JMG, Halliwell B. The measurment and mecanism of lipid peroxidation in biological sistems. Trends Biochem Sci 1990;15: 129-135.
71. Giray B. İnsektisitlerin lipid peroksidasyon yapıcı etkileri ve bu etkinin kalsiyum kanal blokörleri ve ksantin oksidaz inhibitörleri ile değıştirilmesi, HÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bilim Uzmanlığı Tezi. 1993; 19-40.
72. Valenzula A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stres. Life Sci 1991; 48: 301-309.
73. Tunçtan B, Abacioğlu N. Biyolojik örneklerde nitrik oksit ölçümü: Diazotizasyon yöntemi. FABAD J 1998; 23: 161-170.
74. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit, Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Palme Yayıncılık Ankara, 2003.
75. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stres: an analytical approach. Current Opin Clin Nutr Metab Care 2000;3: 373-384.
76. Marshall WJ, Bangert SK. Clinical Biochemistry. New York, Churchill Livingstone, 1995.
77. Hamurcu Z, Sarıtaş N, Başkol G, Akpınar N. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. Pediatr Exerc Sci 2010; 22: 60-68.
78. Yokuş B, Çakır DÜ. İn vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. T Klin 2002; 22:535-543.
79. Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. YYU Vet Fak Derg 2009; 20: 79-83.
80. Hamurcu Z, Bayram F, Kahrıman G, Dönmez-Altuntaş H, Başkol G. Micronucleus frequency in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine level in plasma of women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endrocrynol 2010; 26: 590-595.
81. Saha SS, Ghosh M. Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers agonist oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model. Food and Chem Tox 2010; 48: 3398-3405.
82. Meerts IATM, Verspeek-Rip CM, Buskens CAF et al. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. Food and Chem Tox 2009; 47: 1085-1092.
83. Gölükcü M, Tokgöz H, Çelikyurt MA. Nar çekirdeğinin bazı özellikleri ve nar çekirdeği yağının yağ asiti bileşimi. Gıda 2008; 33: 281-290.
84. Nar çekirdeği yağı analiz raporu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 17479 sayılı raporu, İzmir, 2007.

85. Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prod Lipid Res* 2001; 40: 283-298.
86. Mirmiran P, Fazeli MR, Asghari G, Shafiee A, Azizi F. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double blind placebo-controlled clinical trial. *Br J Nutr* 2010; 104: 402-406.
87. Aviram M, Volkova N, Raymond C, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 1148-1157.
88. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, Imamura J, Tachibana H, Yamada K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition* 2006; 22: 54-59.
89. Arao K, Wang YM, Inoue N, Hirata J, Cha JY, Nagao K, Yanagita T. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. *Lipids Health Dis* 2004; 9: 3-7.
90. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur J Nutr* 2007; 46: 271-278.
91. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1062-1076.
92. Bernard BK, Hoberman AM. A study of the developmental toxicity potential of pentachlorophenol in the rat. *Int J Toxicol* 2001; 20: 353-362.
93. Folch J, Yeste-Velasco M, Alvira D et al. Evaluation of pathways involved in pentachlorophenol-induced apoptosis in rat neurons. *Neurotoxicology* 2009; 30: 451-458.
94. Sai-Kato K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Tanimura A, Kurokawa Y. Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995; 33: 877-882.
95. Michielsen C, Boeren S, Rietjens I, van Mil F, Vos J, Bloksma N. The mercapturic acid biotransformation pathway of hexachlorobenzene is not involved in the induction of splenomegaly, or skin and lung lesions in the Brown Norway rat. *Arch Toxicol* 2000; 74: 609-617.

96. Chhabra RS, Maronpot RM, Bucher JR, Haseman JK, Toft JD, Hejtmancik MR. Toxicology and carcinogenesis studies of pentachlorophenol in rats. *Toxicol Sci* 1999; 48: 14-20.
97. Umemura T, Sai-Kato K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. Oxidative DNA damage and cell proliferation in the livers of B6C3F1 mice exposed to pentachlorophenol in their diet. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 30: 285-289.
98. Umemura T, Kuroiwa Y, Kitamura Y et al. A crucial role of Nrf2 in in vivo defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol Sci* 2006; 90: 111-119.
99. Wang YJ, Lee CC, Chang WC, Liou HB, Ho YS. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicol Lett* 2001; 122: 157-169.
100. Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, Silici S, Liman BC, Altinordulu S, Atasever A. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Exp toxicol Pathol* 2009; 61: 123-132.
101. Turgut K. Veteriner klinik labortuvar teşhis. Bahçivanlar Basım Sanayi, Konya, 2000: 189.
102. Karagül H. Klinik biyokimya. Medisan Yayınevi, Ankara, 2000: 133.
103. Tsai CH, Lin PH, Troester MA, Rappaport SM. Formation and removal of pentachlorophenol-derived protein adducts in rodent liver under acute, multiple, and chronic dosing regimens. *Toxicol Sci* 2003; 73:26-35.
104. Folch J, Yeste-Velasco M, Alvira D et al. Evaluation of pathways involved in pentachlorophenol-induced apoptosis in rat neurons. *Neurotoxycology*. 2009; 30: 451-458.
105. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, 1989:139-187.
106. Tsai CH, Lin PH, Waidyanatha S, Rappaport SM. Characterization of metabolic activation of pentachlorophenol to quinones and semiquinones in rodent liver. *Chem Biol Interact* 2001; 134: 55-71.
107. Lin PH, Waidyanatha S, Pollack GM, Swenberg JA, Rappaport SM. Dose-specific production of chlorinated quinone and semiquinone adducts in rodent livers following administration of pentachlorophenol. *Toxicol Sci* 1999; 47:126-133.
108. Dahlhaus M, Almstadt E, Appel KE. The pentachlorophenol metabolite tetrachloro-p-hydroquinone induces the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in liver DNA of male B6C3F1 mice. *Toxicol Lett* 1994;74: 265-274.

109. Dahlhaus M, Almstadt E, Henschke P, Lüttgert S, Appel KE. Oxidative DNA lesions in V79 cells mediated by pentachlorophenol metabolites. *Arch Toxicol* 1996; 70: 457-460.
110. Dahlhaus M, Almstadt E, Henschke P, Lüttgert S, Appel KE. Induction of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and single-strand breaks in DNA of V79 cells by tetrachloro-p-hydroquinone. *Mutat Res* 1995; 329: 29-36.
111. Umemura T, Kai S, Hasegawa R, Sai K, Kurokawa Y, Williams GM. Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1115-1120.
112. Lin PH, La DK, Upton PB, Swenberg JA. Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis* 2002; 23:365-369.
113. Wang YJ, Ho YS, Chu SW, Lien HJ, Liu TH, Lin JK. Induction of glutathione depletion, p53 protein accumulation and cellular transformation by tetrachlorohydroquinone, a toxic metabolite of pentachlorophenol. *Chem Biol Interact* 1997; 105: 1-16.
114. Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Saha BP, Pal M. Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother Res* 2001; 15: 628-629.
115. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 50-54.
116. Çelik I, Temur A, Isik I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (Punica granatum) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 145-149.
117. Saha SS, Ghosh M. Comparative study of antioxidant activity of alpha-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food Chem Toxicol* 2009;47: 2551-2556.
118. Bouroshaki MT, Sadeghnia HR, Banihasan M, Yavari S. Protective effect of pomegranate seed oil on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat kidneys. *Ren Fail* 2010; 32: 612-617.
119. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem* 2002; 50:4791-4795.

120. Mehta R, Lansky EP. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 345-348.
121. Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *J Med Food* 2003; 6: 157-161.
122. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci* 2004; 95: 481-486.