

**DİOKSİNLERİN TOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* KANAT
BENEK TESTİ VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN FARKLI ANTİOKSİDANLAR
İLE GİDERİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Deniz ALTUN ÇOLAK

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Handan UYSAL
2013
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**DİOKSİNLERİN TOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* KANAT
BENEK TESTİ VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN FARKLI
ANTIOKSİDANLAR İLE GİDERİLMESİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Deniz ALTUN ÇOLAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**DİOKSİNLERİN TOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* KANAT BENEK
TESTİ VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE BU
ETKİLERİN FARKLI ANTİOKSİDANLAR İLE GİDERİLMESİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Doç. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında, **Deniz ALTUN ÇOLAK** tarafından hazırlanan bu çalışma 04/02/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : **Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Handan UYSAL (Danışman)**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Ünsal DOĞRU**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Şifa TÜRKOĞLU**

İmza :

Üye : **Yrd. Doç. Dr. Hakan AŞKIN**

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma **BAP** kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: **2009/79**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

DİOKSİNLERİN TOKSİK ETKİLERİNİN *DROSOPHILA* KANAT BENEK TESTİ VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN FARKLI ANTİOKSİDANLAR İLE GİDERİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Deniz ALTUN ÇOLAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Handan UYSAL

Bu çalışmada, farklı dozlarda kronik dioksin uygulamalarının *D. melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde olası toksik/genotoksik etkileri ve bu etkilerin giderilebilmesi için Koenzim Q10 ve Resveratrol'un koruyucu rolü araştırılmıştır. Üç aşamalı olarak planlanan bu çalışmada, öncelikle poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinlerden 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD ve 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin transheterozigot larvalarda yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisine bakılmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda (1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve 10×10^{-7} µg/mL) dioksin içeren besiyerlerinde yaşayabilen ergin bireylere ait kanatlar kullanılarak, *Drosophila* kanat benek testi ile genotoksik aktivite incelenmiştir. Son olarak dioksinlerin genotoksik/toksik etkilerinin antioksidanlar ile giderilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla, dioksin uygulama gruplarında oksidan sistemlerine, dioksin+antioksidan uygulama gruplarında ise antioksidan sistemlerine ait biyokimyasal testler ve ölçümler yapılmıştır. Dioksin uygulama gruplarında konsantrasyon arttıkça, larvalara ait yaşama yüzdelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Dioksinlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır. Tüm dioksin uygulama gruplarında, artan konsantrasyona bağlı olarak hem normal hem de serrat kanatlı bireylerin tüm klon sayılarında/frekanslarında artış gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel açıdan önemsiz (i) ve negatif fark (-) olarak değerlendirilmiş ve dioksin gruplarının hiçbirinde mutajenik etkinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın son kısmında, *D. melanogaster*'de dioksinlerin toksik etkilerinin giderilebilmesi için, ergin bireylerde total enzim aktiviteleri incelenmiştir. Dioksin uygulama gruplarında çok yüksek olan total oksidan aktivite değerinin dioksin+antioksidan uygulama gruplarında düştüğü; çok düşük olan total antioksidan kapasite değerinin ise yükseldiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca, Koenzim Q10 ve Resveratrol'un dioksinlerin neden olduğu oksidatif hasarı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan aktiviteyi destekler mahiyette artırdığı ortaya konulmuştur.

2013, 154 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, Dioksin, Larval mortalite, Oksidatif stres, SMART, KoenzimQ10, Resveratrol

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

STUDIES REGARDING THE DETERMINATION OF THE TOXIC EFFECTS OF DIOXINS VIA *DROSOPHILA* WING SPOT TEST AND BIOCHEMICAL METHODS AND THE REMOVAL OF THESE EFFECTS USING VARIOUS ANTIOXIDANTS

Deniz ALTUN ÇOLAK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Handan UYSAL

In this study, the possible toxic/genotoxic effects of chronic dioxin applications in various doses on the transheterozygote larvae of *D. melanogaster* along with the protective role of Coenzyme Q10 and Resveratrol for the removal of these effects have been examined. The study has been planned in three stages and firstly the effect of 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD and 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD of the polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins on the larval mortality of transheterozygote larvae have been examined. Afterwards, wings from the adult individuals that can live in various mediums with different concentrations (1×10^{-7} ; $2,5 \times 10^{-7}$; 5×10^{-7} and 10×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$) of dioxin have been used to examine the genotoxic activity via *Drosophila* wing spot test. Lastly, the genotoxic/toxic effects have been tried to be eliminated using antioxidants. To this end, biochemical tests and measurements belonging to oxidant systems for dioxin application groups and antioxidant systems for dioxin+antioxidant application groups were carried out. As the concentration in the dioxin application groups increased, it was observed that the mortality rate of larvae decreased significantly in comparison with that of the control group ($p < 0,05$). Somatic mutation and recombination test was used for the first time in the study for the determination of the genotoxic effects of dioxins. Even though an increase in all the clone numbers/frequencies of both the normal and the serrated winged individuals in all dioxin application groups was observed, this was evaluated to be insignificant (i) and negative difference (-) and it was concluded that there is no mutagenic effect in the dioxin groups. In the last part of the study, the total enzyme activities of adult individuals were examined in order to eliminate the toxic effects of the dioxins on *D. melanogaster*. It was determined that the total oxidant status value which very high for the dioxin application groups decreased for the dioxin+antioxidant application groups and that the lowest total antioxidant status value increased ($p < 0,05$). In addition, it has been put forth that Coenzyme Q10 and Resveratrol decrease the oxidative damage and lipid peroxidation caused by the dioxins and increased antioxidant activity.

2013, 154 pages

Keywords: *Drosophila melanogaster*, Dioxin, Larval mortality, Oxidative stres, SMART, Coenzyme Q10, Resveratrol

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup 2009/79 numaralı proje kapsamında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı ve 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Çalışmalarımın her aşamasında desteğini gördüğüm, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Handan UYSAL'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Biyoloji eğitimimde emeği geçmiş Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI ve Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR başta olmak üzere değerli öğretim üyelerine,

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan AŞKIN, Sayın Arif AYAR, Sayın Sıdıka SEMERDÖKEN GENÇ ve Sayın Melike YILDIZ'a,

Atatürk Üniversitesi'nde tezimle ilgili deneysel çalışmalarımı yapabilmem için gerekli izinleri sağlayan Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Salih DOĞAN ile Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi SEVSAY başta olmak üzere Biyoloji Bölümü'nün değerli öğretim üyesi ve elemanlarına,

Tez çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve ailemin birer parçası olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Burcu Meryem AYDIN, Sayın Arş. Gör. Tuba KILINÇ ve Sayın Arş. Gör. Songül ALŞAN'a,

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük pay sahibi olan, hayatımın her aşamasında beni destekleyen ve bu dünyada bana verilmiş en değerli hediye olan aileme,

İnancı, desteği ve varlığı ile her konuda bana yardımcı olan eşim Sayın Yrd. Doç. Dr. Suat ÇOLAK'a teşekkür ederim.

Deniz ALTUN ÇOLAK
Şubat 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dioksin ve Benzeri Bileşikler.....	1
1.1.1. Tanım ve genel bilgiler.....	1
1.1.2. Dioksinlerin kimyasal yapıları ve özellikleri	2
1.1.3. Dioksin/furan için toksisite denklik faktörü	3
1.1.4. Dioksin kaynakları	4
1.1.4.a. Yanma ürünleri	5
1.1.4.b. Metal eritme, arıtma ve işleme kaynakları	5
1.1.4.c. Kimyasal üretimi	5
1.1.4.d. Biyolojik ve fotokimyasal süreçler.....	5
1.1.4.e. Rezervuar kaynaklardan tekrar dağılım.....	6
1.1.5. Dioksin/furanın besin zincirine girişi	6
1.1.6. Dioksinlerin parçalanma mekanizması	7
1.1.7. Dioksinlerin etki mekanizması	7
1.1.8. Dioksinlerin toksikokinetikleri.....	11
1.1.8.a. Emilim	11
1.1.8.b. Dağılım.....	12
1.1.8.c. Metabolizma	12
1.1.8.d. Atılım.....	13
1.1.9. Dioksinlerin toksik etkileri.....	13
1.2. Hücrede Oluşan Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	15
1.2.1. Serbest radikal türevleri.....	16
1.2.2. Serbest radikal kaynakları	20

1.2.2.a. Biyolojik serbest radikal kaynakları	20
1.2.2.b. Hücrel serbest radikal kaynakları.....	21
1.2.3. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri	23
1.2.3.a. Karbonhidratlar üzerine etkileri.....	24
1.2.3.b. Proteinler üzerine etkileri	24
1.2.3.c. Lipidler üzerine etkileri	25
1.2.3.d. Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri	27
1.3. Dioksin ve Oksidatif Stres.....	28
1.4. Detoksifikasyon Sistemleri.....	29
1.4.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar	32
1.4.1.a. Enzimatik antioksidanlar	32
1.4.1.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar	34
1.4.2. Eksojen kaynaklı antioksidanlar.....	35
1.4.3. Çalışmada kullanılan antioksidan maddeler.....	37
1.4.3.a. Koenzim Q10 (Ubikinon).....	38
1.4.3.b. Resveratrol.....	40
2. KAYNAK ÖZETLERİ	45
2.1. Dioksinlerin Toksik Etkileri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar	45
2.2. Detoksifikasyon Sistemler Üzerine KoenzimQ10 ve Resveratrol'ün Etkileri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	55
3.1. Materyal.....	55
3.1.1. Kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler	55
3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematigi	56
3.1.3. <i>Drosophila</i> 'nın hayat döngüsü	57
3.1.4. <i>Drosophila</i> mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı	58
3.1.5. Deneylerimizde kullanılan dioksinlerin seçimi ve temini	60
3.1.6. Deneylerimizde kullanılan antioksidanların seçimi ve temini	62
3.1.7. Deneylerimizde kullanılan diğer kimyasal maddeler	63
3.2. Yöntem	63
3.2.1. Genotoksisite testleri ile ilgili çalışmalar	63
3.2.1.a. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	64

3.2.1.b. <i>Drosophila</i> hatlarının kültürü	67
3.2.1.c. Çaprazlama için birey temini ve seçimi	68
3.2.1.d. Deney gruplarına uygulanan dioksin konsantrasyonlarının belirlenmesi	70
3.2.1.e. Deney gruplarına dioksinlerin uygulanması	70
3.2.1.f. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	71
3.2.1.g. Kanat preparatlarının mikroskoptaki analizi	72
3.2.1.h. Klonların indüksiyon frekansının hesaplanması	73
3.2.1.i. Kanat benek testi sonuçlarının istatistiksel analizi	73
3.2.1.j. Mikrofotoğrafi	74
3.2.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar	75
3.2.2.a. Deney gruplarına uygulanan dioksin konsantrasyonlarının belirlenmesi	75
3.2.2.b. Deney gruplarına uygulanan antioksidan konsantrasyonlarının belirlenmesi	75
3.2.2.c. Deney gruplarına dioksin ve antioksidanların birlikte uygulanması	75
3.2.2.d. Homojenizasyon ve santrifügasyon	76
3.2.2.e. Enzim aktivite tayini	76
3.2.2.f. Total oksidan aktivite tayini ve hesaplanması	76
3.2.2.g. Total antioksidan kapasite tayini ve hesaplanması	78
3.2.2.h. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması	79
3.2.2.i. Enzim aktivitesi çalışmalarında istatistiksel analiz	79
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	81
4.1. Dioksinlerin Transheterozigot Larvalarının Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Üzerine Etkileri	81
4.2. Dioksinlerin Ergin Bireyler Üzerine Genotoksik Etkileri	87
4.2.1. Distile su, DMSO ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması	88
4.2.2. 2,3,7,8-TCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması	94
4.2.3. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması	97
4.2.4. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması	100
4.2.5. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması	104
4.3. Dioksinlerin Ergin Bireylerde Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri	107
4.3.1. 2,3,7,8-TCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması ...	107

4.3.2. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması	110
4.3.3. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması	113
4.3.4. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması	115
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	119
KAYNAKLAR	136
ÖZGEÇMİŞ	155

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
G	Gram
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μHg	Mikrociva
μM	Mikromolar
pH	Power of hydrogen (Hidrojenin gücü)
ppm	Milyonda bir kısım
ppb	Milyarda bir kısım

Kısaltmalar

AhR	Aril hidrokarbon reseptörü
ANOVA	Varyans analizi
Arnt	Aril nükleer translokatorü
<i>Bd^s</i>	Beaded serrat
CoQ10	Koenzim Q10

DMSO	Dimetil sülfoksit
EMS	Etil metan sülfonat
<i>flr</i> ³	<i>Flare</i> ³ geni
HxCDD	Hekzaklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
KA	Kromozomal aberasyon testi
KİF	Klon indüksiyon frekansı
KKD	Kardeş kromatid değişimi testi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LD ₅₀	Populasyonun %50'sinin ölümüne neden olan doz
MDA	Malondialdehid
MN	Mikronükleus testi
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı geni
OCDD	Oktaklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
PeCDD	Tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
PCB	Poliklorlu bifenil
PCDD	Poliklorludibenzo dioksin
PCDF	Poliklorludibenzo furan
PCDD/F	Poliklorludibenzo- <i>p</i> -dioksin/furan
ROT	Reaktif oksijen türleri
RSV	Resveratrol
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
TCDD	Tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
TEF	Toksik Eşdeğerlik Faktörü
TEQ	Toksik Eşdeğerlik Konsantrasyon
8-OHd	8-hidroksi-2-deoksiguanozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin ve furanın yapısı	2
Şekil 1.2. Hücrede dioksinlerin etkisinin şematik bir modeli	9
Şekil 1.3. Hücrede oksidatif stress oluşum mekanizması	16
Şekil 1.4. Antioksidanlar kaynaklarına göre sınıflandırılması	31
Şekil 1.5. KoenzimQ10'un etkileri	39
Şekil 1.6. Resveratrolün etkileri.....	42
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	57
Şekil 3.2. Dengeleyici kromozomu taşımayan normal ve dengeleyici kromozomu taşıyan serrat bireylerin fenotipleri	59
Şekil 3.3. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki dizilişleri	60
Şekil 3.4. PCCD bileşiklerinin açık formülleri ve kimyasal yapıları	61
Şekil 3.5. KoenzimQ10 ve Resveratrol bileşiklerinin açık formülleri ve kimyasal yapıları.....	62
Şekil 3.6. Farklı tip mutasyonların oluşumuna neden olan genetik mekanizmalar	66
Şekil 3.7. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi	69
Şekil 3.8. Kanatlardaki farklı tip kıllar	73
Şekil 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarına ait transheterozigot larvalardan ergine gelişebilen birey yüzdeleri	84
Şekil 4.2. Yüksek konsantrasyonda PeCDD uygulaması ile ortaya çıkan larva anormalliği	85
Şekil 4.3. Yüksek konsantrasyonda TCDD uygulaması ile ortaya çıkan pupa anormalliği	85
Şekil 4.4. Yüksek konsantrasyonda OCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat anormalliği	86
Şekil 4.5. Yüksek konsantrasyonda HxCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat ve bacak anormalliği	86
Şekil 4.6. Yüksek konsantrasyonda TCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat ve sola yığılmalı toraks anormalliği	87

Şekil 4.7. Normal genetik özelliğe sahip bireydeki kanat kılları (10x40)	88
Şekil 4.8. <i>mwh/mwh</i> hattına sahip bireydeki kanat kılları (10x40).....	89
Şekil 4.9. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)	89
Şekil 4.10. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)	90
Şekil 4.11. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40).....	90
Şekil 4.12. İkiz mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)	91
Şekil 4.13. Kontrol grubu (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları	93
Şekil 4.14. Kontrol grubu (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları	94
Şekil 4.15. 2,3,7,8-TCDD uygulanan (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları	96
Şekil 4.16. 2,3,7,8-TCDD uygulanan (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları	97
Şekil 4.17. 1,2,3,7,8-PeCDD uygulanan (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	98
Şekil 4.18. 1,2,3,7,8-PeCDD uygulanan (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	100
Şekil 4.19. 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulanan (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	101
Şekil 4.20. 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulanan (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	102
Şekil 4.21. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulanan (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	105
Şekil 4.22. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulanan (<i>mwh/TM3</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	105

Şekil 4.23. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi.....	108
Şekil 4.24. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi.....	109
Şekil 4.25. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi.....	110
Şekil 4.26. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi	111
Şekil 4.27. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi.....	112
Şekil 4.28. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi.....	112
Şekil 4.29. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi.....	114
Şekil 4.30. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi.....	114
Şekil 4.31. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi.....	115
Şekil 4.32. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi.....	116
Şekil 4.33. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi	117
Şekil 4.34. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) insanlar ve memeliler için belirlediği toksisite denklik faktörleri	4
Çizelge 1.2. Reaktif oksijen ve azot türevleri	17
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar	63
Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	74
Çizelge 4.1. Dioksinlerin <i>D. melanogaster</i> 'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi üzerine etkisi	82
Çizelge 4.2. Distile su, DMSO ve EMS'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	92
Çizelge 4.3. 2,3,7,8-TCDD'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	95
Çizelge 4.4. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	99
Çizelge 4.5. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	103
Çizelge 4.6. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	106
Çizelge 4.7. TCDD ve TCDD+antioksidan uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler ..	108
Çizelge 4.8. PeCDD ve PeCDD+antioksidan uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler ..	111
Çizelge 4.9. HxCDD ve HxCDD+antioksidan uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler ..	113
Çizelge 4.10. OCDD ve OCDD+antioksidan uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler ..	116

1. GİRİŞ

Günümüzde artan endüstrileşme sonucu endüstriyel kaynaklı atıklar çevre kirliliğini de beraberinde getirmiştir. Hava, su ve toprak gibi kaynaklardaki doğal denge fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerle giderek bozulmaktadır. Kirleticiler çok çeşitli olup birçok kaynaktan meydana gelerek çevreyi kirletmekte ve dolayısıyla ekolojik dengeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu kirleticiler kaynakların en önemlilerinden biri de antropojen (insan müdahalesi sonucu ortaya çıkan) dioksinlerdir.

1.1. Dioksin ve Benzeri Bileşikler

1.1.1. Tanım ve genel bilgiler

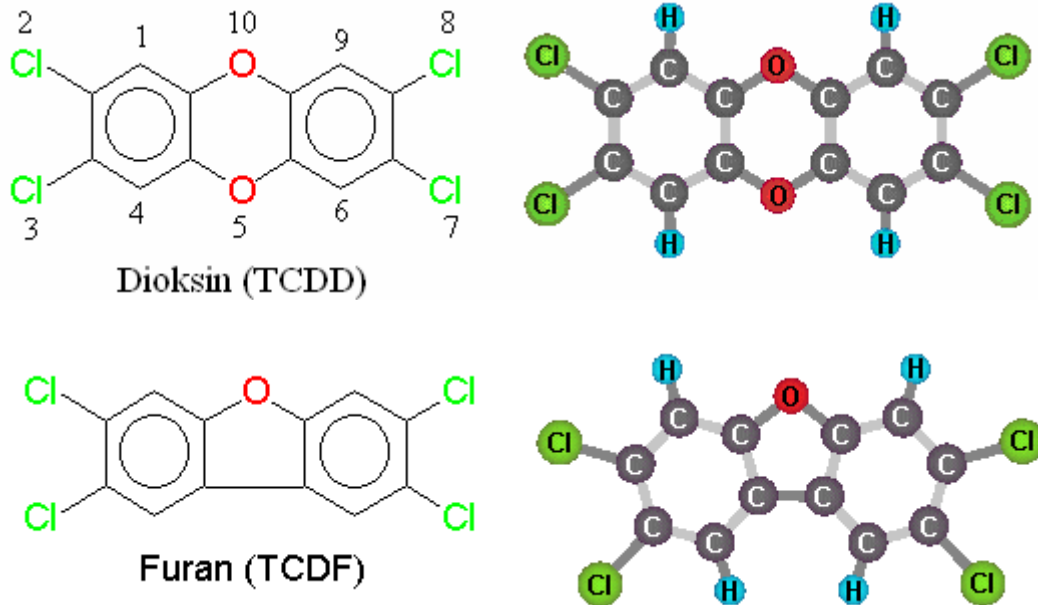
İlerleyen teknoloji ve yeni üretim teknikleri biyokimyasal kirlenmeyi de beraberinde getirmiştir. Birçok toksik maddenin çevre ve canlı organizmalar üzerine etkileri tespit edilmekle birlikte bu maddeler içerisinde dioksin ve dioksin benzeri maddeler en çok karşılaşılan ve en çok toksisiteye sahip olanlar arasındadır (Koç ve Kısa 2005). Genel anlamda “dioksin” terimi; kimyasal yapı olarak benzerlik gösteren poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinler (PCDD veya dioksinler), poliklorlu dibenzo furanlar (PCDF veya furanlar) ve poliklorlu bifenil (PCB) gruplarını kapsayan halojenli aromatik hidrokarbonların bir sınıfı olarak tanımlanmaktadır (Srogi 2008).

Bugüne kadar 75 PCDD, 135 PCDF ve 209 PCB üyesi bileşik tanımlanmıştır. Bunlardan sadece 2,3,7,8 pozisyonuna klor bağlanan 7 PCDD, 10 PCDF ve 12 PCB üyesinin karakteristik olarak dioksin benzeri zehirlenmelere neden olduğu bildirilmiştir (Kulkarni *et al.* 2008). Dioksin ve benzeri bileşikler içerisinde en yüksek toksisiteye sahip olanı 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksindir (2,3,7,8-TCDD veya TCDD). Çoğu kez “dioksin” olarak adlandırılan 2,3,7,8-TCDD bileşiği diğer bileşikler için de bir model olarak kullanılmaktadır. Geri kalan diğer bileşiklerin zehirlilikleri, 2,3,7,8-

TCDD'ye göre hesaplanan Toksik Eşdeğerlik Faktörü (TEF) ile ifade edilmektedir (Mitrou *et al.* 2001; USEPA 2003).

1.1.2. Dioksinlerin kimyasal yapıları ve özellikleri

Halojenli hidrokarbonların bir grubu olarak sınıflandırılan poliklorodibenzo dioksin/furan (PCDD/F), kimyasal olarak 1-4 ve 6-9 karbon atomlarına 8 klor atomu bağlanabilen 1- 8 klor atomlu trisiklik aromatik hidrokarbon yapısındadır (Olie *et al.* 1998). Dioksinin moleküler yapısı, iki benzen halkasının bir çift oksijen atomu ile bağlanması ile oluşurken, furanın moleküler yapısı iki benzen halkasının bir oksijen atomu ile bağlanması sonucu oluşur (Şekil 1.1). Bundan dolayı her iki bileşik konjener (benzer türden bileşikler) olarak adlandırılmaktadır. Her spesifik konjener, aromatik atom çekirdeği etrafındaki klor atomlarının sayısı ve pozisyonu ile ayırt edilebilir. Klor atom sayıları benzer olan gruplar konjener homolog olarak bilinmektedir (Smith and Lopipero 2001).



Şekil 1.1. Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin ve furanın yapısı

Bir, iki veya üç klor atomu içeren konjenerlerin toksikolojik öneminin olmadığı; buna karşın 2,3,7,8 pozisyonuna klor atomu bağlı 17 üyenin (7 PCDD ve 10 PCDF) insan ve çevre sağlığı açısından bir risk oluşturduğu düşünülmektedir (Buckland *et al.* 2001). Bunlar tetra (TCDD, TCDF ya da D4, F4), penta (PCDD, PCDF ya da D5, F5), hexa (HxCDD, HxCDF ya da D6, F6), hepta (HPCDD, HPCDF ya da D7, F7) ve octa (OCDD, OCDF ya da D8, F8)'dir. PCB'ler kimyasal olarak PCDD/F'lere çok benzediğinden "dioksin benzeri" bileşikler olarak adlandırılmaktadır ve tek klorlu üyelerden tamamen klorlanmış 9 klorlu üyelerine kadar 209 üye içermektedir. PCB'lerin de biyolojik ve toksik etkileri PCDD/F'ler gibi hem klor sayılarına hem de aromatik çekirdek etrafındaki klor pozisyonlarına bağlı olarak değişebilmektedir (USEPA 2003).

Poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinler, poliklorlu dibenzo furanlar ve poliklorlu bifeniller biyolojik, fotolitik (ışık etkisiyle bir maddenin ayrışması veya bozunmasına ait özellik) ve kimyasal olarak bozulmaya dirençli, ısıya dayanıklı ve inert, doğada kararlı durumda bulunan, besin zincirinin üst seviyesinde yüksek konsantrasyona ulaşabilen ve atmosferik taşınım mekanizmaları ile kaynaktan çok uzak mesafelere taşınabilen yüksek derecede zehirli çevresel kirleticilerdir (IARC 1997; ATSDR 1998; McKay 2002; Lee *et al.* 2008).

1.1.3. Dioksin/furan için toksisite denklik faktörü

Çevre ortamında PCDD/F'lerin konjenerleri, kompleks karışımlar olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum dioksinler için çevre ve insan sağlığı risklerinin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Toksik eşdeğerlik faktörü yaklaşımının önemi, konjenerlerin kompleks bir karışımının toplam zehirliliğinin tek bir sayısal değer veya "Toksik Eşdeğerlik Konsantrasyon (TEQ)" aracılığıyla gösterilmesine izin vermesidir. Her bir konjenerin TEQ katkısı, o konjenerin TEF değeri ile her bir bileşiğin miktarının çarpılmasıyla hesaplanmaktadır. Bu yaklaşım, bu karışımlara maruziyetin düzenli kontrolü ve risk değerlendirmesini kolaylaştırmaktadır (Smith and Lopipero 2001). TEF değeri, bileşiğe kısa ve uzun süreli maruz kalma durumu ile *in vivo* ve *in vitro*

biyokimyasal reaksiyonlar göz önünde bulundurularak belirlenmektedir (WHO 1998). 2, 3, 7 ve 8 nolu konumlarında klor bulunan 7 adet PCDD ve 10 adet PCDF arasında 2,3,7,8-TCDD en zehirli bileşik olup, bu özelliği ile TEF faktörü toksite sıralamasında 1,0 değerine sahiptir. Diğer 2, 3, 7 ve 8 konumlu konjenere ise 2,3,7,8-TCDD'nin TEF değeri esas alınarak daha düşük TEF değerleri verilmektedir. Uluslararası kabulde dioksin ve benzeri bileşiklerin zehirli dozları ağırlık (g, mg, ng, pg)/TEQ olarak ifade edilmektedir. Periyodik olarak bu TEF değerleri yeni toksikolojik verilere bağlı olarak tekrar düzenlenmektedir. PCDD/F'ler için Çizelge 1.1'de toksite eşdeğerlik faktörleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) insanlar ve memeliler için belirlediği toksite denklik faktörleri

BİLEŞİK	WHO 1998 TEF*	WHO 2005 TEF*
Poliklorludibenzo dioksinler (PCDD)		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,0001	0,0003
Poliklorludibenzo furanlar (PCDF)		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,03
2,3,4,7,8- PeCDF	0,5	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01
1,2,3,6,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,0001	0,0003

*Kaynak: Van den Berg 2006, Değişen değerler koyu renk ile verilmiştir.

1.1.4. Dioksin kaynakları

Dioksinlerin çevreye yayılmalarına neden olan başlıca kaynaklar temelde beş bölüm altında incelenebilir. Bunlar;

1.1.4.a. Yanma ürünleri

Dioksin ve benzeri bileşikler başlıca atık yakma (kentsel katı atıklar, lağım pisliği, tıbbi atıklar ve tehlikeli atıklar gibi), yakıt yakma (kömür, odun, petrol gibi) ve diğer yüksek ısı kaynakları (çimento ocakları, bina yangınları ve herhangi bir klorlu bileşiğin yanması gibi) sırasında açığa çıkma şeklinde en fazla yanma sistemlerinde oluşmaktadır (Chan *et al.* 2004; Coutinho *et al.* 2006).

1.1.4.b. Metal eritme, arıtma ve işleme kaynakları

Dioksin ve benzeri bileşikler demir cevheri katılaştırılması, çelik üretimi, hurda metal geri kazanımını içeren birincil ve ikincil metal işlemlerinin çeşitli tipleri sırasında oluşabilmektedir (McKay 2002; USEPA 2003).

1.1.4.c. Kimyasal üretimi

PCDD/F'ler, kağıt hamurunun klorla beyazlatılması, ayrıca klor ve klorlu fenoller ile PCB'ler ise fenoksi herbisitler, klorlu benzenler, klorlu alifatik bileşikler, klorlu katalizörler ve halojenli difenil eterler gibi klorlu bileşiklerin üretimi sırasında yan ürün olarak oluşabilmektedir (Kulkarni *et al.* 2008).

1.1.4.d. Biyolojik ve fotokimyasal süreçler

Dioksin ve furan oluşumu için, orman yangınları ve volkanlar doğal kaynak olarak kabul edilmektedir. Bunlar hakkında spesifik veriler olmamasına rağmen, 300- 1000 yıllık sedimentten alınan örneklerde daha az toksik dioksin ve furan bulunmuştur (Jansson *et al.* 1987). Son çalışmalar, dioksin ve benzeri bileşiklerin, klorlanmış fenolik bileşikler üzerine mikroorganizmaların etkisiyle oluşabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde dioksinlerin yüksek derecede klorlanmış fenolün fotolizi sırasında oluşabileceği de bildirilmiştir (McKay 2002).

1.1.4.e. Rezervuar kaynaklardan tekrar dağılım

Dioksin ve benzeri bileşiklerin kalıcı ve hidrofobik yapıda olmaları, onların toprakta, sediment ve organik maddelerde birikim yapmalarına ve atıkların toplandığı alanlarda yıllarca bozulmadan kalmalarına neden olmaktadır. “Rezervuar” adı verilen bu ortamlardaki dioksin bileşikleri, tozlar veya sedimentlerin taşınmasıyla doğaya yeniden dağılabilir. Bu bileşikler, küresel anlamda önemli bir kaynak olmamakla birlikte, yerel olarak oldukça önemli bir duruma gelebilir. Örneğin, sedimentlerden havaya karışarak doğal yollardan ya da bir takım sondaj işlemleri sırasında dioksin bileşikleri ortaya çıkabilmektedir (Karademir 2002; USEPA 2004).

1.1.5. Dioksin/furanın besin zincirine girişi

Dioksin/furanlar besinlere çeşitli yollardan bulaşır. Dioksinlerin çevrede dağılımı, çeşitli kaynaklardan (atık yakılması, kimyasal üretim, trafik vb) oluşan emisyonların atmosferik taşınımı ve depolanması ile olur. Toprak, bu bileşikler için doğal çökeltme ve tutulma ortamıdır. Atmosferik depolamanın dışında kanalizasyon çamuru, kompost, dökülmeler ve kontamine olmuş alanlardan erozyon ile bu bileşikler toprağa bulaşabilir. Bitkiler, toprak aracılığıyla bileşikleri absorplar ya da bileşikler depolama (ıslak-kuru) ile bitki üzerinde tutulur. Besin zincirine geçiş ise bu bitkilerin, hayvanlar (koyun, sığır, keçi ve kümes hayvanları) tarafından tüketilmesi ve yağ dokusunda konsantre olması ile olur. Atmosferik taşınım ve depolama, bitkiler ve sebzeler için esas kaynaktır. Dioksin/furan ve benzeri bileşikler suya, depolama (ıslak-kuru), deşarj ve erozyon ile girerler. Dioksin/furan ve benzeri bileşiklerin K_{ow} (oktanol-su bölünme katsayısı) ve K_{oc} (organik karbon bölünme katsayısı) değerleri yüksek olduğu için suda çok az çözünürler. Suda az çözünmelerine rağmen, suda çözünmüş (karbonhidrat, yağ asidi, amino asit, peptit) ve partiküler (canlı ve ölü organizmalar, çevreden deşarj ya da erozyon ile gelen organik maddeler) halde bulunan organik maddeler üzerinde ya da sedimentteki organik madde üzerinde adsorbe olurlar. Suda yaşayan ve bu organik maddelerle beslenen canlıların (fitoplankton, zooplankton ve balıklar ve diğer deniz ürünleri) vücudunda konsantre olurlar (Güneş 2007).

1.1.6. Dioksinlerin parçalanma mekanizması

Bu bileşiklerin gaz fazında giderilme prosesleri, kimyasal oksidasyon, fotokimyasal bozulma (fotodegradasyon) ve hidroksillemedir. Partikül fazında bu proseslerin etkisi azdır. Atmosferde, partikül fazında bulunan PCDD/F'nin fotodegradasyonu ihmal edilir seviyede bulunmuştur (Koester and Hites 1992). Fotodegradasyon, dioksin/furan ve benzeri bileşiklerin organik hidrojen vericilerin varlığında, güneş ışığına ya da ultra viyole ışınına maruz kalması sonucu fotolitik reaksiyonlarla parçalanmasıdır. Fotolitik reaksiyonlar sırasında, bileşikte klor eliminasyonu olur. TCDD'nin gaz fazında yarılanma süresi yaklaşık 200 saat olarak belirlenmiştir (Podoll *et al.* 1986). Dioksinin atmosferde gaz fazında kalma süresi 8 gün, furanın 29 gün olarak belirtilmiştir (Kwok *et al.* 1995). Yine laboratuvar çalışmalarında partikül fazında bulunan dioksin/furanın güneş ışığına 12 saat maruz kaldığında çok yavaş parçalandığı gözlenmiştir (Tysklind and Rappe 1990).

Toprakta parçalanma mekanizmaları fotodegradasyon ve mikrobiyal parçalanmadır. Toprakta mikrobiyal dönüşümü etkileyen faktörler, toprağın su içeriği, organik karbon içeriği, sıcaklık ve PH'dır. Toprakta mikrobiyal parçalanma oldukça yavaştır ve klorinasyon arttıkça daha yavaş olur. Aynı koşullar altında OCDD'nin fotolizinin, TCDD'den daha düşük olduğu gözlenmiştir (Helling *et al.* 1973). Toprakta bulunan beyaz mantar (white rot fungi), dioksin/furanı mineralize edebilir. PCDD/F, kimyasal oksidasyon ve hidroksilleme için oldukça dirençlidir ve bu prosesler akuatik ortamda etkisizdir. Fotodegradasyon ve mikrobiyal dönüşüm sediment ve su yüzeyinde önemli parçalanma yolu olabilir. Su yüzeyinde TCDD'nin fotolizi, kışın 1- 225 gün, yazın 0,4- 68 gün olarak belirtilmiştir (Atkinson 1991). Sediment suyunda ise 2,3,3,7-TCDD'nin yarılanma süresi 550 gün olarak gözlenmiştir (Ward and Matsumura 1979).

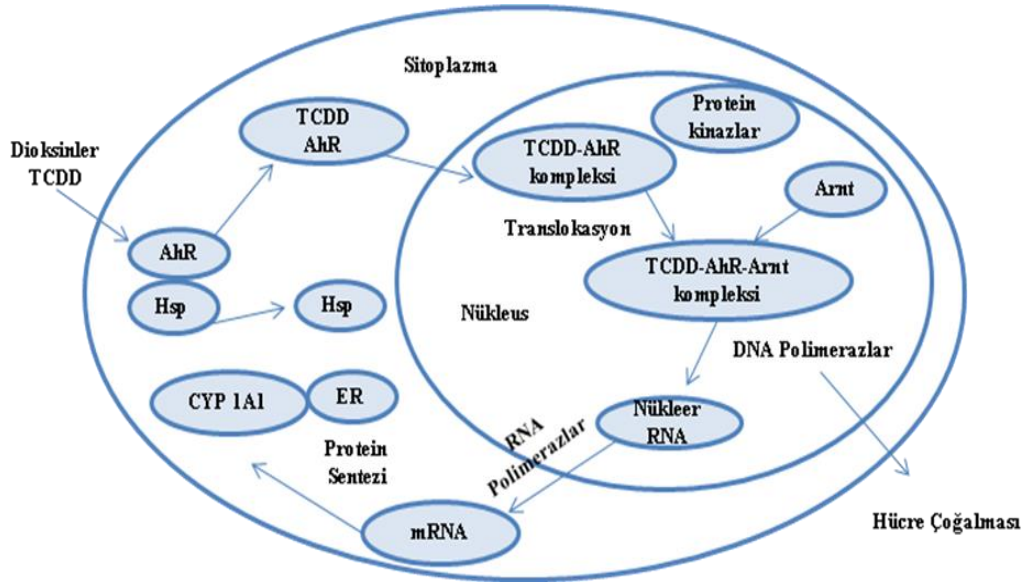
1.1.7. Dioksinlerin etki mekanizması

Dioksin ve benzeri bileşiklerin toksik ve biyokimyasal etkilerinin bir çoğunu, onları yüksek ilgiyle bağlayan aril hidrokarbon reseptörleri (AhR) olarak bilinen spesifik

hücrel bir protein vasıtasıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir (Pohjanvirta and Tuomisto 1994; Hahn 2002; Okey *et al.* 2005; Schecter *et al.* 2006). Ah reseptörleri aracılığında oluşan moleküler olaylar zinciri henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte dioksinlerin neden olduğu akut toksisitenin Ah reseptörlerinin bulunmadığı durumlarda azaldığı belirlenmiştir (Mimura *et al.* 1997). Ah reseptörleri, bHLH-PAS (basic helix-loop helix/Per-Arnt-Sim) ailesinden DNA transkripsiyon faktörlerinden olup, steroid reseptörler gibi hücre sitoplazmasında bulunan ve vücutta 100'den fazla gene ait proteinlerin sentezlenmesine aracılık eden nükleer reseptörlerdir (Hahn 2002). AhR, değiştirilmiş gen ekspresyonlarında bulunan anahtar bir transkripsiyonal düzenleme proteindir ve toksikolojik önemi omurgalı hayvanlarda klorlanmış dioksine maruz kalmalarıyla ilişkilidir. Aril hidrokarbon reseptörünün, kimyasallara maruz kalma dışında, başka fizyolojik fonksiyonları da vardır. (Masuda 2003). Ah reseptörleri, normal şartlarda aktive edildiklerinde hücrede iki önemli olaya aracılık ederler. Etkin reseptörler, sitoplazmadan çekirdeğe geçerek DNA'nın ilgili kısmına bağlanır ve gen transkripsiyonunu sağlar. Ayrıca bu reseptörler aracılığıyla tirozin kinaz enziminin erken uyarılması gerçekleştirilir (WHO 1998).

Dioksinli bileşikler, Ah reseptörlerine, sitoplazmadaki HSP90 (heat shock protein) geni aracılığında bağlanarak reseptörün uyarılmasına neden olur (Okey *et al.* 2005). Bu şekilde oluşan dioksin reseptör dimer yapısı çekirdeğe geçer ve hücre çekirdeğinde aril nükleer translokaz (Arnt) ile bağlanarak heterodimer bir yapı oluşturur. Sitokrom P450 (CYP 1A1) genine bitişik gen dizilerine (dioksin cevap elementleri= DRE) bu kompleksin bağlanması, DNA'nın kırılmasına, kromatinin bozulmasına, promotor aktivitenin artmasına, CYP 1A1 geninin transkripsiyonun artmasına ve sonunda da sitokrom P450 1A1- spesifik mRNA birikmesine sebep olmaktadır. İnsanların da dahil olduğu pek çok organizmada AhR kompleksinin varlığı ve onun bu yeteneği, gen ekspresyonunun bir ligand bağımlı transaktivatörü olarak rol oynamaktadır (Jonosek *et al.* 2005). Dioksinli bileşiklerin Ah reseptörlerini uyarması ile pek çok gen ürününün sentezinde artış olurken, bazı gen ürünlerinin sentezinde ise baskılanma olabilir (Riddick *et al.* 2004). Dioksinlerin neden olduğu gen aktivitesindeki değişimler sonucunda, bu bileşiklerin neden olduğu zehirli etkiler ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı

sıra, dioksinlerin neden olduğu bazı zehirlenme olaylarının da Ah reseptörleri aracılığında oluşmadığı ve bu etkilerin açığa çıkması için bileşiklere daha yüksek dozda maruz kalınması gerektiği bildirilmektedir (Hossain *et al.* 1998). Hücrelerde dioksinlerin etki mekanizmasının şematik bir modeli Şekil 1.2’de verilmiştir (Mandal 2005).



Şekil 1.2. Hücrede dioksinlerin etkisinin şematik bir modeli

Genel olarak dioksinli bileşiklerin toksik etkileri, karaciğerde sentezlenen CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 1B1 ve diğer CYP gen ürünlerinin sentezlenmesindeki artışa bağlı olarak oluşan, gelişme bozuklukları, timus atrofisi, epitelyal bozukluklar, karaciğer hasarı, bağışıklık yetmezliği ve kanser şeklinde ortaya çıkabilmektedir. CYP genlerinin vücuttaki birincil fonksiyonu, ilaçların biyotransformasyonlarında görevli olan faz 1 (sitokrom P450 enzimleri) ve faz 2 (Glutatyon-s-transferaz ve UDP glukronil transferaz) enzimlerinin sentezlenmesidir. Biyotransformasyonda görevli olan bu enzimler, ilaçlar ile bazı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamalarının yanı sıra poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonuna da neden olurlar (Parzefall 2002; Jonosek *et al.* 2005).

Dioksinlerin kanser yapıcı etkileri doğrudan DNA’da mutasyon yapmalarından çok lipit peroksidasyonuna neden olmaları ile ilgilidir ve bu nedenle de anılan bileşiklerin, kanserin başlangıç periyodunda fazla etkili olmadığı; fakat gelişme periyodunda önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Yoshida and Ogawa 2000). Dioksin bileşiklerinin, P450 enzimlerinin sentezini arttırmalarının bir sonucu olarak, moleküler oksijen taşınması artar ve bu da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve lipit peroksidasyona yol açar. Kemirgenlere TCDD uygulanması ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda, oksidatif stres artışına bağlı olarak süper oksit oluşumu ile lipit peroksidasyonun arttığı ve DNA tek sarmalında kırılmaların olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra dioksinlerin CYP 1A1 veya CYP 1B1 genlerini aktive ederek östrojen metabolizmasında bozukluklara neden olduğu ve serbest radikal üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Stohs 1990; Yoshida and Ogawa 2000). Bu konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada (Viluksela 2000) ovariektomi yapılan hayvanlarda, dioksinlerin kanser yapıcı etkilerinin azaldığı, bunun nedeninin ise CYP 1A1 ve CYP 1B1 genlerinin, östrojeni katekol östrojenlere yıkamaması sonucunda serbest radikal üretiminin azalması olduğu belirtilmiştir.

Dioksinli bileşiklerin, dişi üreme sistemindeki etkilerinin antiöstrojenik aktiviteleri aracılığıyla olduğu ve bu bileşiklerin benzer şekilde tiroksin ve α -dihidrotestosteron hormonlarını da etkileyerek tiroid ve erkek üreme sisteminde fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir (Mably *et al.* 1992). Yapılan bir başka çalışmada 2,3,7,8-TCDD’nin erkek ratlarda sperm kalitesinde önemli derecede bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Ciftci *et al.* 2012). Dioksinli bileşiklerin karaciğer kanseri riskini arttırması sonucu, karaciğerde hücre üremesi artar ve fokal hücre kümelerinde apoptosis azalır. Karaciğerde değişikliğe uğramış hepatik odakların oranının artmasıyla epidermal büyüme faktörü baskılanır, gap-junctionlar (nekzus= oluklu bağlantı) arası ileti bozulur ve prokarsinojen bir madde olan rasP21 proteinindeki artışa bağlı olarak deri bozuklukları meydana gelir (Viluksela 2000).

Dioksin ve benzeri bileşiklerin neden olduğu bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerin, yalnızca Ah reseptörleri aracılığıyla değil, bağışıklık sistemini baskılayıcı ve diğer bazı

etkilerin protein kinaz, fosfolipaz ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri aracılığında da olduğu bildirilmektedir (Ishida *et al.* 2005). Dioksinli bileşikler, merkezi sinir sisteminde CYP genleri aracılığı ile serotonin metabolizmasını arttırarak vücut ağırlığında azalmalara sebep olurken, katekolaminler üzerinde herhangi bir etkileri tespit edilememiştir (Unkila *et al.* 1995).

1.1.8. Dioksinlerin toksikokinetikleri

1.1.8.a. Emilim

Dioksin ve benzeri kimyasal maddelerin deri, sindirim ve solunum yolu ile vücuda alınan emilim oranı, bileşiğin türüne, dozuna, emilim yoluna ve ortama bağlı olarak değişir. Yapılan araştırmalar genel olarak bu kirleticilere %90 veya daha fazla oranda gıdalar aracılığı ile maruz kalındığını göstermektedir. Dioksin bileşikleri yağda iyi çözündüklerinden ortamdaki yağ oranı ile emilim arasında pozitif yönde bir ilişki vardır. Bitkisel yağda çözülerek ağız yolu ile verildiğinde %90 oranında emilirken, diyetle karıştırıldığında bu oran %50-60'a kadar düşmektedir (IARC 1998; Hu and Bunce 1999; USEPA 1999).

Bileşiklerin klor iyonu sayısı ve bağlanma şekli, zehirliliklerinde olduğu gibi emilimlerinde de oldukça etkilidir. Daha az klor atomuna sahip dioksinlerin emilimleri, 8 ve 10 klor atomuna sahip üyelerin emilimlerinden daha fazladır (IARC 1997; USEPA 2003).

Dioksinlerin deriden emilimleri çok yavaş ve doza bağımlıdır. Hayvansal ve *in vitro* çalışmalar, bileşiklerin deriden çok yavaş emildiğini ve ratlarda emilimin yaşla ilişkili olduğunu göstermiştir. Buna göre, genç ratlarda yaşlılara göre emilim daha fazla olmaktadır (IARC 1997; ATSDR 1998). Bunlara ilaveten, deriden uygulanan dozun büyük bir kısmı derinin korneum tabakasında yakalanmaktadır. Bu bileşiklere maruz bırakılan ratlarda 3 gün sonra uygulanan dozun yaklaşık %10-40 kadarının emildiği ve geri kalan kısmının da stratum korneum tabakasında alıkonulduğu bildirilmiştir

(USEPA 1994). Buna karşın solunum yoluyla maruz kalma ile ilgili yapılan çalışmalarda, ratlarda trake içi tek doz TCDD uygulanmasıyla dozun %95'nin emildiği bildirilmiştir (ATSDR 1998).

1.1.8.b. Dağılım

Dioksinlerin sindirim sisteminden emildikten sonra vücuda dağılımı öncelikle lenf sistemi ile olmaktadır (USEPA 2003). Emilen bileşikler daha sonra kana geçerek bütün organlara kolayca ulaşabilmektedir. İnsan plazmasında dioksin taşıyıcıları, serum lipitleri ve lipoproteinlerdir. Lipofilik özellikleri sayesinde emilimden sonra, birkaç saat içerisinde karaciğer ve yağ dokuda yüksek yoğunlukta birikim göstermektedir (USEPA 1999). Karaciğerde dioksinlerin diğer dokulara göre daha yüksek düzeylerde olması burada bulunan Ah reseptörlerinin aktivitesinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Emond *et al.* 2004). Karaciğer ve yağ dokuda bulunan depo edilmiş bu bileşiklerin daha sonra akciğer, dalak, timus ve vücudun diğer organlarına dağıldığı bildirilmektedir (Weber *et al.* 1993). Ayrıca, gebelerde plasenta aracılığıyla dioksin benzeri bileşiklerin fetüse de geçebildiği bildirilmiştir (USEPA 1999).

1.1.8.c. Metabolizma

Dioksin bileşiklerinin metabolizmaları bileşik ve canlının türüne göre büyük ölçüde farklılıklar göstermektedir. Bunun yanı sıra, bu bileşikler genel olarak oksidasyon, klorun indirgenmesi ve konjugasyon aracılığıyla metabolize edilmektedir (USEPA 1999). Birçok memeli türünde mikrozomal monooksijenaz sistemi (CYP 1A1) tarafından TCDD'nin yavaş olarak metabolize edildiği bilinmektedir. Bu olaylar sonucunda oluşan polar metabolitler glukuronik asit ve glutatyon ile konjuge edilerek kolayca atılabilecek şekillere sokulabilmektedir (ATSDR 1998; Van Leeuwen and Younes 2000). Metabolizmaları sonucu oluşan metabolitlerin ana bileşikten daha az zehirli oldukları bildirilmiştir (Hu and Bunce 1999; USEPA 1999).

1.1.8.d. Atılım

Dioksinler vücuttan büyük oranda safra ile daha az miktarda da idrar yoluyla atılmaktadır (Kumar *et al.* 2002). Ayrıca, memelilerde laktasyon da bu bileşiklerin vücut yükünü azaltmaktadır. Özellikle laktasyondaki ratlarda yapılan bir çalışmada TCDD'nin yarı-ömrününün %50 azaldığı bildirilmiştir (ATSDR 1998). Dioksin ve benzeri bileşiklerin yarı ömürleri bileşik çeşidine ve canlı türüne göre farklılık göstermektedir. Örneğin, TCDD'nin yarılanma ömrü, yetişkin insanlardaki ortalama 7,5- 7,6 yıl, ratlarda ise 19 gün civarında olduğu bildirilmiştir (EC 2001; FSA 2001; WHO 2001). Ayrıca, obezite ve karaciğer hastalıkları gibi çeşitli hastalıklar, dioksinin yarılanma ömrünü arttırarak vücutta kalış sürelerini ve zehirliliğini arttırmaktadır. Genel olarak, bu bileşiklerin yarı ömürlerinin farelerde 12, ratlarda 20, eşeklerde 73, kobaylarda 90, domuzlarda 94, maymunlarda 365 gün olduğu rapor edilmiştir (Geyer *et al.* 2002). Diğer dioksin konjenerlerinin ise insanlardaki yarı ömürlerinin 2,9- 26,9 yıl arasında değiştiği bildirilmiştir (Hu and Bunce 1999; USEPA 1999).

1.1.9. Dioksinlerin toksik etkileri

Toksisite, organizmada negatif etkiye neden olan bir maddenin etkisi olarak tanımlanabilir. Başka bir ifadeyle toksisite, biyolojik sistem üzerine zararlı etki meydana getiren bir maddeye bağlı olarak ortaya çıkar. Bu biyolojik etkiyi meydana getiren maddeye ise toksikant (zehirleyici) denir. Herhangi bir kimyasal madde belirli bir dozun üzerinde fizyolojik, biyokimyasal, histopatolojik, mutajenik ya da genotoksik etkili olabilir (Hoffman 1991; Ecobichon 1997).

Dioksin ve benzeri kimyasallar immunotoksitite, hepatotoksitite, doğum defektleri, endokrin bozuklukları, çok sayıda enzimin indüksiyonunu (özellikle çoğu mikrozomal CYP 1A1, onunla ilişkili monooksijenaz aktivitesi ve aril hidrokarbon hidroksilaz) içine alan yaygın ve spesifik etkilere neden olmaktadır (Diaz-Ferrero *et al.* 1997). Dioksinler özel bir hücresel protein olan aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) yüksek bir ilgiyle bağlanması sonucu etkilerini oluşturur (Aoki 2001; Mitrou *et al.* 2001; Schecter *et al.*

2006). AhR, son derece yaygın ve kararlı çevresel kirleticilerden biri olan dioksin gibi ksenobiyotiklerin metabolizmada toksik etki göstermesine aracılık eden sitoplazmik reseptördür (Fukunaga *et al.* 1995; Mimura *et al.* 1997).

Dioksinlerin asıl toksik etkisinin ilk basamağı AhR uyarılmasıdır. TCDD gibi bir ligand (biyomoleküle bağlanarak kompleks oluşturan bir bileşik) yokluğunda AhR, küçük ve immünofilin benzeri bir protein olan 2 şaperonlu HSP90 proteini ile kompleks bir formda sitoplazmada mevcuttur. Bunlar yüksek afiniteli ligand ile bağlanmasını takiben ligand-AhR kompleksleri hücre çekirdeğine geçer. Bu kompleks çekirdekte bulunan Aril nükleer translokatorü (Arnt) ile tekrar bir kompleks oluşturmaktadır. Sitokrom P450 (CYP) 1A1 genine bitişik gen dizilerine (ksenobiyotik cevap elementleri) bu kompleksin bağlanması; DNA'nın kırılmasına, kromatinin bozulmasına, promotor aktivitesinin artmasına, CYP 1A1 geninin transkripsiyonun artmasına ve sonunda da sitokrom P450 1A1- spesifik mRNA birikmesine sebep olmaktadır. Pek çok türlerde (insanlar dahil) AhR kompleksinin varlığı ve onun bu yeteneği, gen ekspresyonunun bir ligand bağımlı transaktivatörü olarak rol oynamaktadır. (Mitrou *et al.* 2001; Mandal 2005).

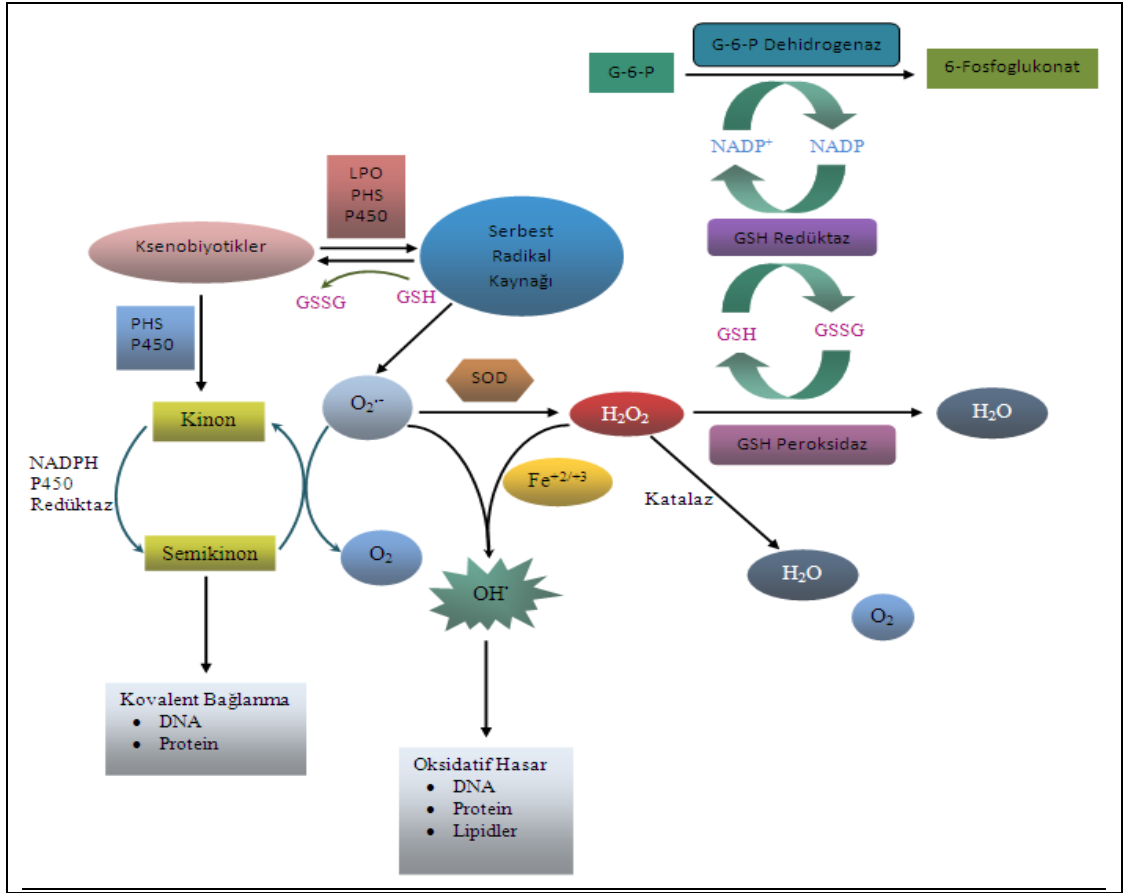
AhR arındırılmış farelerde organ atrofisi ve teratojeniteyi içeren dioksin kaynaklı semptomların görülmemesi bu reseptörlerin önemini açıkça ortaya koymaktadır (Fernandez-Salguero *et al.* 1996). Bu nedenle bu reseptörler dioksin zehirliliğinde hayati bir rol oynamaktadır. Ancak dioksin tarafından oluşturulan immun sistem baskılanması, AhR içermeyen mekanizmalar tarafından da meydana getirilmektedir. Bununla ilgili olarak, protein kinazlar (Brouwer *et al.* 1995; Denison and Heath-Pagliuso 1998), fosfolipaz C (Beebe *et al.* 1990) ve düşük dansiteli lipoprotein (Matsumura *et al.* 1984) reseptörlerindeki dioksin kaynaklı değişikliklerin AhR'den bağımsız bir mekanizma aracılığıyla meydana geldiği ileri sürülmektedir. Bu nedenle dioksin toksitesinin bazı şekillerinin AhR gerektirmediği gözlemlenmiştir (Ishida *et al.* 2005).

Dioksin ve dioksin benzeri bileşikler insan ve diğer omurgalıları başta kanser olmak üzere, immun yetersizlik (Weisglas-Kuperus *et al.* 2000), üreme ve gelişme anomalileri, merkezi ve çevresel sinir sistemi hasarları (Guo *et al.* 2003), diyabetler (Longnecker and Michalek 2000) ve tiroid bozukluklarını (Pavuk *et al.* 2003) içeren endokrin bozukluklar, akciğer fonksiyonlarının azalması ve bronşit (USEPA 2003), serum testosteron seviyesinin değişmesi, mide bulantısı, kusma, iştah kaybı, klorakne veya akneyi içeren deri döküntüleri, hipertirikoze (aşırı tüylenme), karaciğer hasarı, serum kolesterol ve gliseritlerinin yükselmesi ve çocuklarda kalıcı dişlerin mine tabakalarında mineral kayıplarına neden olabilmektedir (Srogi 2008).

1.2. Hücrede Oluşan Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve aktif kimyasal ürün olarak tanımlanan atom ya da moleküllerdir. Oksidatif stres ise başta hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin oluşumu ile vücudun antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres oluşum mekanizması (Anonymous a 2012) Şekil 1.3’de şematik olarak gösterilmiştir. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989). Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türevleri birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır. ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS), bütün aerobik organizmalar tarafından metabolik süreçlerin sonucu olarak üretilen serbest radikal ürünleridir (Gutteridge and Halliwell 2000, Urso and Clarkson 2003).

Serbest radikaller; kovalent bağların homolitik kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle elektron transferi olmak üzere 3 farklı yolla ortaya çıkmaktadır (Halliwell 2001).



Şekil 1.3. Hücrede oksidatif stress oluşum mekanizması

1.2.1. Serbest radikal türevleri

Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli metabolik olaylar sonucu oksijenin indirgenmesiyle oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), peroksit radikali ($ROO^{\bullet}$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve ozon (O_3) gibi türleri içermektedir. Reaktif azot türevleri arasında ise nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) önemli bir yer tutmaktadır (Darley-USmar and Halliwell 1996). Çizelge 1.2’de reaktif oksijen ve reaktif azot türevi bileşikler özet olarak sunulmuştur.

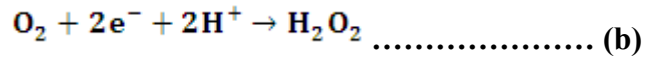
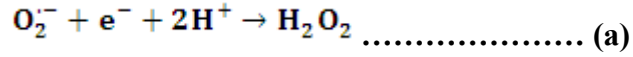
Çizelge 1.2. Reaktif oksijen ve azot türevleri

Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)		Reaktif Azot Türevleri (RNS)	
Radikaller	Radikal olmayan bileşikler	Radikaller	Radikal olmayan bileşikler
Hidroksil (HO [•])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Nitrik oksit (NO [•])	Nitrozil NO ⁺
Alkoksil (RO [•])	Singlet oksijen (¹ O ₂)	Azot dioksit (NO ₂ [•])	Nitroksit NO [•]
Peroksil (ROO [•])	Ozon (O ₃)		Nitröz asit HNO ₂
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Hipoklorik asit (HOCl)		Dinitrojen trioksit N ₂ O ₃
	Lipit hidroperoksit (LOOH)		Dinitrojen tetraoksit N ₂ O ₄
			Peroksinitrit alkil (ONOO [•])
			Peroksinitrit ROONO

Reaktif oksijen türevleri (ROS) radikal ve radikal olmayan bileşikler olmak üzere iki temel grupta incelenebilir. Bunlar;

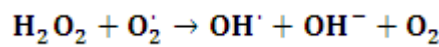
Süperoksit radikali (O₂^{•-}): Süperoksit radikali hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu durum $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ şeklinde formüle edilmektedir. Süperoksit radikali serbest radikal olmasına karşın zayıf oksidan özelliğinden dolayı tek başına önemli hücre hasarlarına yol açmaz. Bu radikal, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte kendiliğinden oluşmaktadır. Süperoksit radikalının diğer bir meydana geliş şekli ise iskemi reperfüzyon (doku kanlanması) ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanması sırasında aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulmasıdır. Ayrıca lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler de süperoksit oluşumuna neden olmaktadır (Zimmerman and Granger 1994; Kontos *et al.* 1999). Süperoksit radikalının asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Kalak 1995).

Hidrojen peroksit (H₂O₂): Hidrojen peroksit (H₂O₂) iki şekilde meydana gelebilir. Bunlardan birincisi süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması ve oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi **(a)**, diğeri ise moleküler oksijenin (O₂) çevresindeki moleküllerden iki elektron alması ve ardından oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi **(b)** sonucu oluşur. Bu basamaklar aşağıda formüle edilmiştir.



Hidrojen peroksit serbest radikal olmasa da yapısında su bulundurduğu için, biyolojik zarlara nüfuz ederek daha etkili reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında rol almasından dolayı önemli bir oksidan ajandır. Burada serbest radikal reaktifleri radikal olmayan ürünler oluşturduğundan, bu olay bir dismutasyon reaksiyonudur (kimyasal bir reaksiyon sonucu aynı maddeden, yapı olarak iki farklı ürünün meydana gelmesi olayı). Bu reaksiyon yavaş ve kendiliğinden meydana gelmektedir ve tepkime süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmektedir. Ayrıca hidrojen peroksit geçiş metal iyonları (Fe, Cu) varlığında, serbest oksijen radikallerinin en yüksek reaktiviteye sahip ve hasar verici özellikte olan, hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolayca parçalanabilmektedir. Diğeri bir önemli görevi ise hücre içi sinyal molekülü olarak işlev görmesidir (Nordberg and Arner 2001).

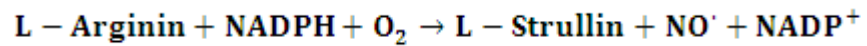
Hidroksil radikali (OH[•]): Yarılanma ömrü oldukça kısa, kararsız ve çok güçlü reaktif bir oksidan radikaldir. Hidroksil radikali (OH[•]) suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla ya da hidrojen peroksitin süperoksit ile tepkimeye girerek yıkılması sonucu oluşmaktadır.



Hidroksil radikalının olduğu bölgede büyük hasarlar meydana gelir. Bu etki, proteinler ve lipitler arası çapraz bağlar oluşturma, proton çıkarma ve elektron transferi gibi yollarla ortaya çıkmaktadır (Bingöl *et al.* 1993).

Singlet oksijen (1O_2): Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur (Gutteridge 1995). Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde fakat ayrı yörüngelerdedir. Singlet oksijende ise elektron dönme yönleri birbirine zıttır ve oluşturdıkları delta (aynı yörüngede) veya sigma (ayrı yörüngelerde) formuna göre aynı veya ayrı yörüngelerde bulunurlar. Sigma formu delta formuna göre daha enerjetik olup kolayca delta formuna dönüşebilir (Ünal 1999).

Nitrik Oksit ($NO^\bullet$): Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyon gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip prooksidatif ve antioksidatif sinyal molekülü olmasının yanı sıra çok reaktif bir radikal olmasından dolayı diğer radikallerden ayrılmaktadır (Archer 1993; Alderton *et al.* 2011). $NO^\bullet$ enzimatik olarak damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi tarafından L-arjininden sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır. Tahmini mekanizma aşağıda gösterilmiştir.



Nitrik oksit bir azot atomu ile bir oksijen atomunun ortaklanmamış elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yapısı nedeniyle de radikaller grubunda yer almaktadır. Bu radikalın işlevi ile ilgili olarak radikal oksijen türleri ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ($ONOOH$) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla $OH^\bullet$ radikalının oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Nitrik oksitin endotel hücre fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak gelişen hipertansiyon ve diyabet gibi bazı önemli hastalıklarda önemli bir etkiye sahiptir (Lüscher *et al.* 1993; Çelik 2005).

1.2.2. Serbest radikal kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri esnasında oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında olduğu gibi, çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da ortaya çıkmaktadır (Fang *et al.* 2002; Valko *et al.* 2006). Serbest radikal kaynakları, oluşma şekillerine göre, biyolojik ve hücrel kaynaklar olmak üzere iki alt başlıkta açıklanabilir.

1.2.2.a. Biyolojik serbest radikal kaynakları

Karmaşık yapıları canlılardaki en aktif ROS kaynağı fagositoz yapan hücrelerdir. Canlı vücudu inflamasyon veya diğer metabolik olaylarla uyarıldıklarında aktive olan fagositler oksijeni indirgemek suretiyle (solunumsal patlama) hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gibi ROS'ların oluşumuna neden olmaktadır (Basu 1999). Canlılarda ROS oluşturan diğer biyolojik kaynaklar arasında antineoplastikler (bleomisin, doksorubisin, andriamisin, nitrofurantoin gibi kanser ilaçları), ekzojen kimyasalların enzimatik yıkımı, radyant enerjinin emilimi (ultraviyole, X ışını), aşırı miktarda ve uzun süre alkol alımı, uyuşturucu maddeler yer almaktadır. Bunun haricinde sigaranın gerek dumanı gerekse katranı çeşitli radikallerin oluşmasına zemin hazırlamakta ve organizmanın antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca ozon, azot dioksit, kükürt dioksit, hidrokarbonlar ve asbest ile ksenobiyotikler radikal oluşturan önemli birer çevresel kaynaktır (Akkuş 1995; Abdollahi *et al.* 2004).

Canlıda artan stres, katekolamin adı verilen hormon grubunun (epinefrin, norepinefrin ve dopamin) sentezini artırmaktadır. Bu hormonların artışı ile oksidasyon meydana gelmekte ve serbest radikal üretimi gerçekleşmektedir. Bu mekanizma, özellikle stres artışına bağlı hastalık oluşumunun serbest radikaller ile ilgili olabileceğinin ve oksidatif stresin hücrel hasarın ortaya çıkmasında çok önemli bir serbest radikal kaynağı olduğunun göstergesidir (Akpola 2000).

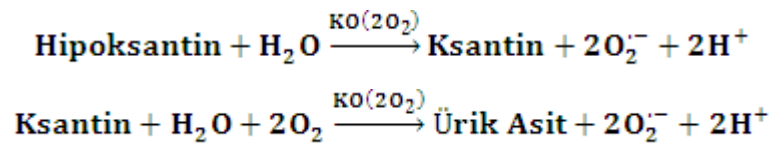
1.2.2.b. Hücresel serbest radikal kaynakları

1) Küçük moleküllerin otooksidasyonu

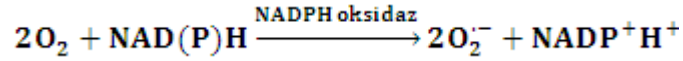
Otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Nawar 1996). Nötral ortamda askorbik asit, tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobioplerinler ve antibiyotikler gibi indirgenmiş elektron transferi yapan pek çok çözünür hücresel bileşiklerin otooksidasyonu serbest radikal oluşmaktadır (Akkuş 1995).

2) Enzimatik oksidasyonlar

Reaktif oksijen türlerinin, hücrelerde ksantin oksidaz (KO), NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P450 gibi birçok enzimin aktivitesi sonucu üretildiği bilinmektedir (Meydani 2001). Hemen hemen bütün canlı türlerinde bulunan KO, hasarlı dokularda özellikle pürinlerin yıkım reaksiyonlarında bir dehidrojenaz enzimi olarak görev yapmaktadır. Dokuda belli stres koşulları altında (iskemi, travma ve intoksikasyon vb) ksantin oksidazın bir tür oksidaz olarak görev yapması durumunda hipoksantin ksantine, ksantin de ürik aside dönüşmektedir. Bu reaksiyonlar sırasında elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanılmaktadır. Moleküler oksijen hidrojen peroksitde indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normal seviyeye ulaşıncaya iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşmaktadır (Parks *et al.* 1988; Akkuş 1995; Borges *et al.* 2002).



Bir diğ er serbest radikal üretimine neden olan enzim özellikle fagosit ve lenfositlerde bulunan önemli bir savunma elamanı olarak sayılan NADPH oksidazdır. Hücrelerde O₂ alımının artmasına bağlı olarak aktif hale gelen NADPH oksidaz, oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürerek ekstraselüler sıvılardaki süperoksit radikal (O₂^{•-}) miktarının artmasına neden olmaktadır (Freeman and Crapo 1982).



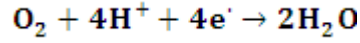
Hücresel oksidan kaynaklarından bir diğ eri nötrofilik miyeloperoksidaz enzimidir. Bu enzim hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu ile hipoklorik asit üretimini katalizlemektedir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon ile savunma sisteminde bakterilerin yok edilmesi sağlanmakta fakat oluşan hipoklorik asit aynı zamanda  1-antiproteinaz enzimini inaktive etmek suretiyle sağlıklı insan dokusunda hasarlara yol açmaktadır (Lavelli 2000).

a) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri

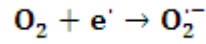
Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda yer alan P450 ve b-5 gibi sitokromlar yağ asitleri ile ksenobiyotiklerin oksidasyonu veya dioksijenin redüksiyonu ile serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu oksidasyon-redüksiyon olayları sırasında elektronların oksijen molekülüne (O₂) geçmesiyle süperoksit radikali (O₂^{•-}) meydana gelmektedir (Pal 1994;  elik 2005). Nükleer membran kaynaklı radikaller özellikle DNA üzerinde hasar meydana getirmektedir (Akkuş 1995; Yanbeyi 1999).

b) Mitokondrial elektron transport zinciri

Mitokondri hücre için gerekli olan enerjinin üretildiği ve hücresel solunumun sağlandığı organeldir. Normal koşullarda makromoleküllerin katabolizmasıyla ortaya çıkan elektronlar, mitokondri iç zarında bulunan elektron taşıyıcıları (NADH, FADH₂) ile moleküler oksijene aktarılıp su oluşturulmaktadır.



Elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijen ile doğrudan reaksiyona girmesi sonucu süperoksit radikali oluşmaktadır (Grisham and Granger 1989; Basaga 1990).



c) Araşidonik asit metabolizması

Araşidonik asit, membran yapısında bulunan önemli fizyolojik fonksiyonları olan eikazonoid ailesinin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılan 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asididir. Araşidonik asit metabolizması, hem reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağı olması hem de radikallerce aktive edilmesinden dolayı radikal kaynaklı hasarlarda önemli bir yer tutmaktadır (Schiller *et al.* 1991; Akkuş 1995).

Hücre membranında Ca^{+2} -ATPaz enziminin çeşitli faktörlere bağlı olarak inhibisyonu ve hücre içi Ca^{+2} depolarının hasara uğramasına bağlı olarak Ca^{+2} konsantrasyonu artmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} seviyesinin artması fosfolipaz enzim aktivitesini artırmakta ve serbest araşidonik asit seviyesini yükseltmektedir. Artan araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolu ile ikincil serbest radikaller, toksik lipid peroksitler ve bunların yanında prostoglandin ve lökotrienler gibi lipid kökenli otakoidlerin (lokal etkili hormon) oluşmasına neden olmaktadır (Schrier *et al.* 1987; Ferrari *et al.* 1991; Schiller *et al.* 1991).

1.2.3. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri

Canlıda artan serbest radikaller, özellikle canlı yaşamında büyük öneme sahip karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi biyolojik moleküller veya tüm hücre komponentleri ile reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin oluştuğu zincirleme bir

reaksiyonu başlatarak hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere yol açmaktadır (Gutteridge 1995; Dikici 1999).

1.2.3.a. Karbonhidratlar üzerine etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerindeki en önemli etkisi, polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkaritlerin (glukoz, mannoz) otooksidasyonudur. Otooksidasyon sonucu süperoksit, hidrojen peroksit ve okzalaldehitler meydana gelmektedir. Özellikle okzalaldehitlerin proteinler, DNA ve RNA'ya çapraz bağlanma yeteneklerinden dolayı antimitotik etki göstermek suretiyle yaşlanma ve kanser patolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Ceballos *et al.* 1992; Yanbeyi 1999).

Bağ dokunun önemli bir parçası olan glikozaminoglikan yapısındaki hiyalüronik asit sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli bir role sahiptir. Hiyalüronik asidin oluşan serbest radikaller tarafından parçalandığı ve bağ dokusu yapısının bozulması ve eklem hastalıklarına neden olduğu bildirilmiştir (Fırat 1997; Hawkins and Davies 1998).

1.2.3.b. Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, canlı hücre yapısında en fazla bulunan makromolekül olmasının yanı sıra enzim ve hormonların yapısına katılması, kasılma, taşıma ve savunma gibi mekanizmalarda aktif rol alması ile de önemli bir yere sahiptir. Proteinler genel olarak 20 farklı tip L- α amino asitin belirli bir diziliş sırasında düz zincirde birbirlerine kovalent bağlar (peptid ve disülfid) ile bağlanması sonucu oluşan polipeptitlerdir. Serbest oksijen radikalleri, proteinler üzerinde önemli etkilere sahiptir. Bunlardan en önemlisi sitoplazma ve membran proteinlerinin çapraz bağlanması sonucu oluşan dimer yapılarıdır. Taşımada görev alan hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda etkilenirler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları

bozulmakta ve fonksiyon kaybına uğramaktadırlar. Enzimler de protein yapısında olduklarından bozulan protein yapısına bağılı olarak enzim aktivitelerinde de bozulmalar meydana gelmektedir. Yapısal olarak proteinler serbest oksijen radikallerine karşı lipidlere göre daha dayanıklıdır. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit dizilimine göre değışiklik göstermektedir. Doymamış bağı ve sülfür içeren amino asitlerin (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) diziliminden oluşan proteinler serbest radikallere karşı daha fazla hassastırlar. Bu tür proteinlerin serbest radikallerle etkileşimi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelmektedir. Oluşan bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar belirlenmektedir (Rice-Evans *et al.* 1991; Akkuş 1995; Dikici 1999; Wu and Cederbaum 2003).

1.2.3.c. Lipidler üzerine etkileri

Canlı yapısına katılan biyomoleküller arasında serbest radikallere en fazla maruz kalan ve en fazla etkilenen yapılar lipidlerdir (Yanbeyi 1999). Serbest radikallerin hücre zarı lipitleri üzerinde meydana getirdiğı hasar, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak adlandırılmaktadır. LPO hücre membran yapısına katılan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehit, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli zararlı ürünlere dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (Valko *et al.* 2006). LPO reaksiyonları üç aşamalı olarak gerçekleşmektedir (Tappel 1972; Frei 1994; Gutteridge 1995).

a) Başlangıç aşaması: Doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle (süperoksit radikali veya hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile LPO zincir reaksiyonları başlamaktadır. Reaksiyonları başlatan hidroksil radikalidir. Radikal lipit molekülünden bir hidrojen atomu çıkartarak karbon merkezli lipid radikalinin oluşmasına neden olmaktadır.

b) Zincir Reaksiyonu: Bu bölümde hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan lipid peroksit radikali membran yapısına katılan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Radikal ise açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite dönüşmektedir. Sonuçta tek bir radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden çok lipid hidroperoksit oluşmasına yol açmaktadır. Tek bir başlangıç reaksiyonu yağ asit zincirlerinin binlerce lipid hidroperoksit şekline dönüşmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu zincir reaksiyonlarının ne zaman biteceği ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

c) Sonlanma aşaması: Serbest radikallerin neden olduğu zincir reaksiyonu ya lipid hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ya da zincir reaksiyonlarını kıran bir antioksidan tarafından lipid perokside bir hidrojen atomu verilmesi ile sonlanmaktadır. Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ürünlerin en önemlileri ve tanınanları malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (Baydas vd 2003). MDA membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olmaktadır. Bu iki olay sonucunda iyon transportu, enzim aktivitesi, deformasyon ve hücre yüzey komponentlerinin agregasyonu gibi membran özellikleri değişmektedir. Bunun yanı sıra MDA, DNA bazları ile de reaksiyona girerek hasara neden olmaktadır. Bütün bu mekanizmalar göz önüne alındığında MDA'nın mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. LPO sonucu oluşan MDA ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Ayrıca bu hasarlar MDA'nın kolay difüze olma yeteneğine bağlı olarak hücrenin diğer bölümlerine de yayılmaktadır (Cross *et al.* 1987; Rice-Evans *et al.* 1991; Gutteridge 1995). LPO zincir reaksiyonun son ürünlerinden MDA seviyesinin ölçülmesi biyolojik sistemlerdeki oksidatif hasarın belirlenmesinde en çok tercih edilen metotlardan birisidir (Valenzuela 1990; De Zwart *et al.* 1999; Uchida 2000).

1.2.3.d. Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır. Bu faktörlerden birisi de serbest oksijen radikalleridir. Bu radikallerden özellikle $\text{OH}^\bullet$, deoksiriboz ve bazlarla çok kolay reaksiyona girebilmekte ve DNA hasarına neden olmaktadır. Bir diğer radikal olan süperoksit anyonu güçlü oksitleyici özeliğine bağlı olarak guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle çok daha kolay etkileşime geçmektedir. Ayrıca reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olmaktadır. Bu iki olay sonucunda kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite meydana gelmektedir (Halliwell and Gutteridge 1984).

DNA hasarlarının oluşumuna neden olan endojen reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyondur. Nitrik oksit veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit ($\text{ONOO}^\bullet$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrik asit (HNO_3) gibi reaktif ürünler nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları sonucunda mutajenik aktivite göstermektedir (Thomas *et al.* 1998). Aktive olmuş nötrofil kaynaklı ortaya çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan geçmek suretiyle hücre çekirdeğine ulaşmaktadır. Sonuç olarak bu radikal DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (Halliwell 1994; Akkuş 1995; Yanbeyi 1999).

Serbest radikaller, özellikle de $\text{OH}^\bullet$ radikali çeşitli mekanizmalarla DNA'da şeker ve baz modifikasyonları, zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağları gibi çok sayıda modifikasyona neden olmaktadır. Özellikle serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarının doğrudan belirlenmesinde günümüzde kullanılan en etkili ve en yaygın yöntem 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyesinin ölçülmesidir. 8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu meydana gelen modifiye bir bazdır (Helbock *et al.* 1999; De Martinis and De Lourdes Pires Bianchi 2002).

1.3. Dioksin ve Oksidatif Stres

Yapılan birçok çalışmada TCDD'nin uzun dönem toksitesinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Hassoun *et al.* 2000; Slezak *et al.* 2000). TCDD'ye maruz kalınmasını takiben oksidatif stres oluşumu ile sonuçlanan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen oksidatif stres göstergelerinden lipid peroksidasyonunu artırdığı, indirgenmiş glutatyon (GSH) içeriğini azalttığı, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) miktarını artırdığı, karaciğer membran akışkanlığını azalttığı, DNA hasarını artırdığı, süperoksit oluşumunu artırdığı, protein olmayan sülfidril ve NADPH içeriğini azalttığı rapor edilmiştir (Kern *et al.* 2002; Senft *et al.* 2002; Chan *et al.* 2004).

Shertzer *et al.* (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, TCDD'nin dişi farelerde 3 gün 5µg/kg dozunda uygulamasını takiben 8 hafta kadar devam eden güçlü bir oksidatif stres cevabına neden olduğu bildirilmiştir. Yine, yapılan başka bir çalışmada, günlük 0,45ng/kg dozunda TCDD verilen hayvanlarda beyinde oksidatif stresin tetiklendiği rapor edilmiştir (Hassoun *et al.* 1998).

Dioksin uygulanmasından sonra oluşan oksidatif strese Ah reseptörlerinin aracılık ettiği bildirilmiştir (Alsharif *et al.* 1994). TCDD kaynaklı serbest oksijen radikallerinin oluşumunun olası bir mekanizmasında sitokrom P450 enzimlerinin gerektiği ileri sürülmektedir (Park *et al.* 1996) ve Ah gen dizisindeki üyelerinden CYP 1A1 ve CYP 1A2'nin TCDD kaynaklı oksidatif stres ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Nebert *et al.* 1993). Dioksin tarafından CYP 1A1, CYP 1A2 ve CYP 1B1'in indüksiyonu serbest radikallerin oluşumunu ve sonuçta lipid peroksidasyonun artması ile sonuçlanmaktadır (Kern *et al.* 2002).

Ah reseptör kaynaklı ksantin oksidaz ve ksantin dehidrojenaz sisteminin de TCDD uygulanmış ratlarda oksidatif stres ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Latchoumycandane and Mathur 2002). İleri sürülen bir diğer mekanizma da TCDD kaynaklı sitokrom P450 enzimleri yoluyla östrojenin metabolik aktivasyonudur. Normal enzim fonksiyonu

süresince serbest oksijen radikallerinin üretiminde sitokrom P450'nin ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir ve östrojen de TCDD'nin neden olduğu bu serbest oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Slezak *et al.* 2000). Sitokrom P450 katalitik siklusunda su ve hidrojen peroksit (H_2O_2) serbest radikalleri açığa çıkmaktadır. Ancak bu fizyolojik olay tam olarak aydınlatılamamıştır (Slezak *et al.* 2002).

Ksenobiyotik kaynaklı oksidatif stresin temel ve doğrudan bir indikatörü olan peritonel lavaj hücreleri başta olmak üzere fagositik hücrelerde serbest oksijen radikal üretiminin arttığı bildirilmiştir. Fagositik hücreler TCDD'nin akut toksitesine karışır ve TCDD'ye oluşan cevapta makrofaj infiltrasyonu meydana gelmektedir. Aynı zamanda, TCDD uygulanmış rat ve farelerin karaciğerlerinde çoğunlukla lenfositler ve polimorfonükleer lökositler başta olmak üzere yangı hücreleri infiltrasyonu görüldüğü bildirilmiştir (Alsharif *et al.* 1994; Kern *et al.* 2002).

1.4. Detoksifikasyon Sistemleri

Canlılar için birçok önemli zararlı etkileri olduğu bilinen serbest oksijen radikalının uzaklaştırılması ve bu radikallerin neden olduğu oksidatif stresi önlemek için canlı vücudunda antioksidan savunma sistemi gelişmiştir. Bu sistemde görev alan endojen veya eksojen kaynaklı tüm moleküllere ise antioksidan adı verilmektedir. Antioksidanlar kendi elektronlarından birini serbest oksijen radikaline vermek suretiyle radikalleri etkisiz hale getirirler. Kararlı bir yapıya sahip olmalarından dolayı antioksidanlar elektron kaybetmelerine rağmen serbest radikale dönüşmezler (Halliwell 1997; Gutteridge and Halliwell 2000; Urso 2003; Abdollahi *et al.* 2004). Antioksidanların serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkilerini dört farklı yolla açıklamak mümkündür (Halliwell and Gutteridge 1990; Gutteridge 1994).

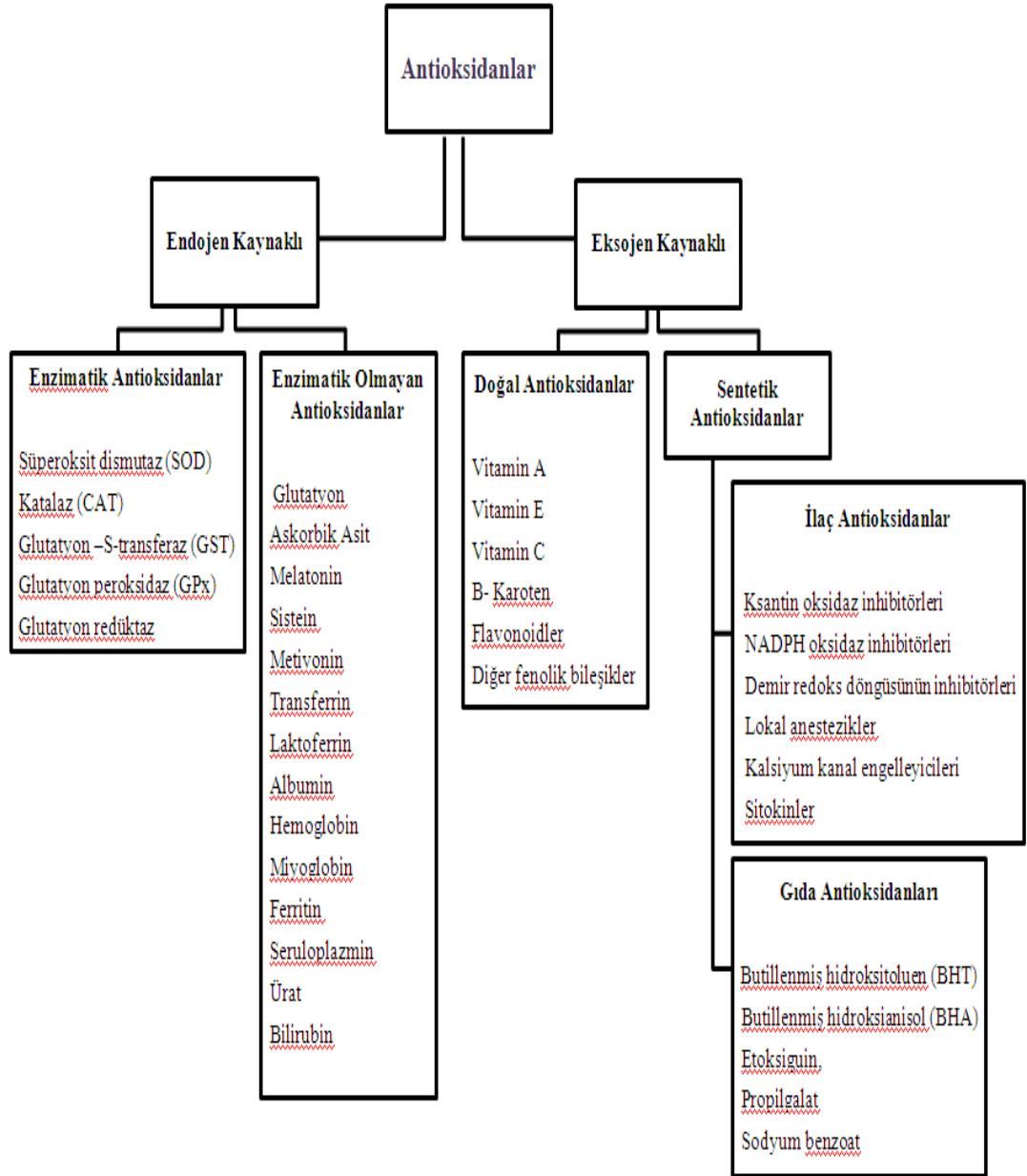
1. Toplayıcı (Süpürücü) etki: Serbest oksijen radikallerin tutularak veya daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürülerek ortamdan uzaklaştırılmasıdır.

2. Baskılayıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürülmesidir (flavonoidler ve vitaminler).

3. Zincir kırıcı (koparma) etki: Serbest oksijen radikallerine metal iyonlarının bağlanması ile zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki göstermesidir. Örneğin; Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4. Onarıcı etki: Radikallerin hedefi olan DNA gibi moleküllerin hasar sonrasında tamir edilmeleridir.

Antioksidanlar kaynaklarına göre, endojen ve eksojen olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlar, kendi içinde enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt başlıkta irdelenmektedir (Yalçın 1998). Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) gibi enzimler yer alırken, vitaminler, glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ise enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları içerisinde yer almaktadır. Ancak bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *Drosophila*'da glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi bulunmamaktadır (Samis *et al.* 1981). Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 1.3'de özet olarak sunulmuştur.

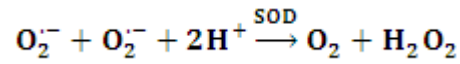


Şekil 1.4. Antioksidanlar kaynaklarına göre sınıflandırılması

1.4.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar

1.4.1.a. Enzimatik antioksidanlar

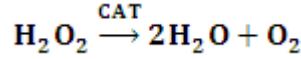
a) Süperoksit Dismutaz (SOD): İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, iki molekül $O_2^{\cdot-}$ 'nin iki molekül proton ile reaksiyona girerek H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen ve lipid peroksidasyonunu inhibe eden bir metalloenzimdir. SOD ile katalizlenen tepkime sonucunda oluşan hidrojen peroksit, oksijenin toksik ürünlerinden biri olup katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ile birikimi önlenmektedir. Bu yüzden SOD ve CAT enzimleri birlikte değerlendirilmektedir. Mikroorganizmalardan en yüksek yapılı canlılara kadar, aerobik koşullarda yaşayan canlıların bütün doku, hücre ve hücre organelleri SOD içermektedir (McCord and Fridovich 1969, 1978; Sun 1998). SOD enziminin 2 mol süperoksit ve 2 mol H^+ ile reaksiyona girerek H_2O_2 'ye dönüşüm mekanizması aşağıda gösterilmiştir.



Aktif merkezlerindeki metalin türüne bağlı olarak SOD enziminin CuZn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç farklı türü tanımlanmıştır (Fridovich 1975; Asada 1976). Hayvan hücrelerinde CuZn-SOD'lar genellikle sitozolde yerleşmiştir. Ayrıca lizozomlarda, çekirdekte ve iç-dış mitokondriyal membran arasındaki boşlukta da bulunmaktadır. Siyanür iyonları CuZn-SOD enzimlerinin güçlü inhibitörleridir. Mn-SOD ise mitokondride yer alır ve siyanür ile inhibe edilemez. Fe-SOD'a ise henüz hiçbir hayvan dokusunda rastlanmamışsa da *Ginkgo biloba*, domates ve hardal yaprağı gibi bazı bitkilerde aktivite gösterdiği bildirilmiştir (McCord and Fridovich 1969; Hekkila *et al.* 1976; Halliwell and Gutteridge 1994; Özden 2006).

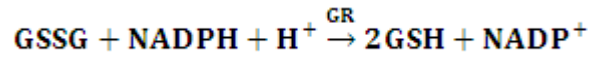
b) Katalaz (CAT): Katalaz (CAT) yapısında dört tane hem grubu barındıran bir hemoproteindir. Solunum yapan tüm organizmalarda bulunan CAT enzimi esas olarak

peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunmaktadır. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve moleküler oksijene parçalamaktır (Paglia and Valentine 1967; Palmer 1990; Frei 1994). Reaksiyon denklemi aşağıda verilmiştir.



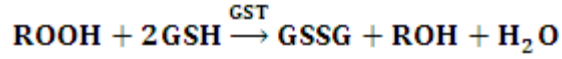
Drosophila'da CAT enziminin yapısal geni 3. kromozomun sol kolu üzerinde 75D1-76A konumunda bulunmaktadır. Katalaz aktivitesi, *Drosophila* gelişimi süresince iki geniş pik yapar. Bu dönemler üçüncü geç instar larva ve pupa aşamalarıdır. Bu dönemde CAT aktivitesi en yüksek düzeydedir. Bireyler erginleştikten sonra CAT aktivitesi durağan hale geçmektedir. CAT *Drosophila*'da glutatyon peroksidaz bulunmadığından H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında temel enzim olarak görev yapmaktadır (Samis *et al.* 1981).

c) Glutatyon Redüktaz (GR): 478 aminoasitten oluşan ve birbirinin aynı olan iki polipeptidin de flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein yapısındaki glutatyon redüktaz (GR), okside glutatyonu (GSSG) NADPH'ya bağımlı olarak redükte glutatyonla (GSH) katalizleyen bir enzimdir. Yapısında bulunan FAD'dan dolayı aktivitesi diyetle alınan riboflavine bağımlıdır (Lehninger 1976; Carlberg and Mannervik 1985). Glutatyon Redüktaz enziminin işlev mekanizması aşağıda verilmiştir.



d) Glutatyon S- Transferaz (GST): Glutatyon S- transferaz enzimi insan vücudunda selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki türü bulunan hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesindendir (Shidhu 2004). GST, H_2O_2 ve lipid peroksitlerin redükte glutatyonla (GSH) reaksiyona girerek, H_2O ve okside glutatyon (GSSG) oluşmasını katalizleyen bir enzimdir (Mills 1957). Ayrıca bu enzim sitokrom P450 tarafından üretilen reaktif ara

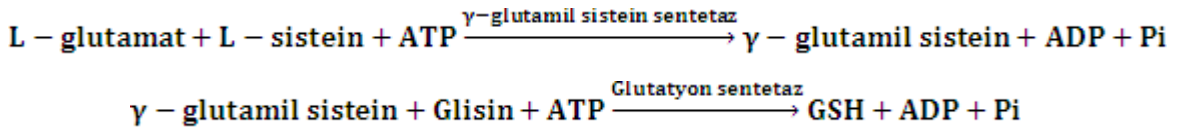
ürünlerin detoksifikasyonunda ve lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının korunmasında da görev almaktadır (Goff *et al.* 2001). Enzimin işlev mekanizması aşağıda denklemle ifade edilmiştir.



Drosophila melanogaster'de GST'in GST D ve GST 2 olmak üzere başlıca iki formu tanımlanmıştır. *Drosophila*'nın diğer bir türü olan *Drosophila simulans*'da ise GST'in üçüncü bir formunun daha varlığı saptanmıştır. GST D'nin (Delta sınıfı), *Drosophila*'da üçüncü formu ile birlikte detoksifikasyonla ilişkili oldukları ve özellikle insektisitlere karşı direnç oluşturmada görev aldıkları bildirilmiştir (Hunaiti *et al.* 1995; Carlini 1998; Agianian *et al.* 2003).

1.4.1.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar

a) Glutasyon (GSH): Reaksiyon sonucu oluşan redükte glutasyon (GSH) tiyol grubu taşıyan glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerini içeren bir tripeptittir. Her basamakta bir mol ATP'nin görev almasıyla δ -glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri aracılığıyla oluşmaktadır. GSH hücrede en fazla sitozolde, nükleusda ve mitokondrilerde bulunmaktadır. Birçok hayvan dokusundaki tüm glutasyon indirgenmiş halde yani GSH formunda bulunurken *Drosophila*'da GSH formunun yanında yaklaşık %20 oranında okside glutasyon (GSSG) da bulunmaktadır (Terpstra 2003). Glutasyon oluşum mekanizması aşağıda iki basamaklı olarak gösterilmiştir.



Glutasyon aerobik yaşamın zararlı yan ürünlerinden hidrojen peroksit ve organik peroksitler ile reaksiyona girerek onların detoksifikasyonunda görev almaktadır. Serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok

enzimin substratı olarak da kullanılmaktadır (Scott *et al.* 1991; Mayers 1993). Ayrıca GSH'nin redükte durumda E ve C vitamini gibi antioksidanlar ve diğer serbest radikal süpürücülerinin çalışmasında da önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Scott *et al.* 1991).

a) Bilirubin: Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı olarak görev yapmaktadır (Stolc *et al.* 1983).

b) Melatonin: Lipofilik özelliği ile hücrenin hemen bütün organallerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilen melatonin hidroksil radikalini ortadan kaldıran güçlü bir antioksidandır (Yalçın 1998).

c) Seruloplazmin: Dolaşımdaki bakır için önemli taşıyıcı protein olan seruloplazmin ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu engellemektedir (Akkuş 1995).

d) Ferritin, Transferrin ve Laktoferrin: Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri taşıyan major proteindir. Bu proteinler serbest demiri bağlayarak hidroksil oluşumu veya lipid peroksidasyonu gibi süreçlere katılmasına engel olmaktadır. Ferritin ise dokudaki demiri bağlayarak benzer etki göstermektedir (Halliwell and Gutteridge 1990).

e) Sistein: Süperoksit ve hidroksil radikaller toplayıcısı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Akkuş 1995).

1.4.2. Eksojen kaynaklı antioksidanlar

Bu gruba dahil olan antioksidanlar arasından en çok kullanılanları vitaminler, β - karoten ve flavonoidlerdir.

a) Vitaminler (E (α -tokoferol), C (Askorbik Asit)): Vitaminler protein, karbonhidrat ve yağların tersine vücuda enerji vermeyen ancak enerji elde edilmesinde görev alan, büyüme, çoğalma ve sağlığın devamı için gerekli organik bileşiklerdir. Vitaminler belirli organizmalar tarafından ya hiç ya da yeterli miktarda sentezlenemediğinden büyük çoğunluğu parental veya sindirim yoluyla metabolizmaya dahil edilmektedir. Vitaminlerden E, C ve A güçlü birer antioksidan moleküldür.

Vitamin E ya da canlı yapıdaki adıyla α -tokoferol membranların lipid tabakaları arasında yer almaktadır (Burlakova *et al.* 1998). E vitamini hücre membran fosfolipitlerinde bulunan yağ asitlerini serbest radikallerin oksitleyici etkisinden koruyan ilk savunma mekanizmasını oluşturmaktadır (Tietz 1995). Bunun yanı sıra süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri de indirmek suretiyle antioksidan savunmada rol almaktadır (Rice–Evans *et al.* 1991; Akkuş 1995; Tanakol 1998). Ketolakton yapısında olan vitamin C suda çözülebilen güçlü bir antioksidandır (Barber and Harris 1994). Vitamin C ya da bilinen adıyla askorbik asit öncelikli olarak prolin, lizin ve dopamin beta hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollajen fibrillerin sentezinde görev almaktadır (Mendiratta *et al.* 1998).

Bir antioksidan olarak askorbik asit süperoksit, peroksil ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluştururken reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirmektedir. Membran içindeki ve ekstraselüler dokulardaki lipid peroksidasyonunu önlemektedir (Akkuş 1995; Carr *et al.* 2000).

Askorbik asidin antioksidan etkisinin yanında oksidan etki gösterdiği de bildirilmiştir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri (Fe^{3+}) uzaklaştırmak ya da doğrudan ferri demiri indirmek yoluyla fenton reaksiyonunda hidroksil radikali ($\text{OH}^{\bullet}$) oluşturmaya uygun ferro demire (Fe^{2+}) dönüştürmektedir. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda

görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği tespit edilmiştir (Block 1991).

b) β - Karoten: A vitamininin metabolik prekürsörü olan β karoten organizmada triplet uyarıcıların zararlı etkilerini ve singlet oksijeni baskılama, süperoksit radikalini temizleme gibi antioksidan etki göstermektedir. Bu özelliklerine ek olarak düşük oksijen kısmi basıncında peroksi serbest radikallerinin dokulara hapsedilmesinde görev alarak da antioksidan etkiye sahiptir. Bununla birlikte karotenoidlerin lipid membranlara lokalizasyonu membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltmaktadır (Niki 1987; Gruszecki and Strzalka 2005). İnsanlarda besin yoluyla alınan β -karotenin oksidatif DNA hasarını ve kanser oluşumunu önleyebileceği bildirilmiştir (Anonymus 1993; Krajcovicova-Kudlackova and Dusinska 2004).

c) Flavonoidler: Flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenol yapıdaki bileşiklerdir. Tüm flavonoidler 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktivite gösterirler. Fenolik bileşikler lipid radikallere hızla $H^{\cdot}$ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşmektedir. Sonuç olarak, $ROO^{\cdot}$ ve $RO^{\cdot}$ radikalini parçalayarak lipid peroksidasyonu (LPO) zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır (Feredioon *et al.* 1992; Avcı 2001).

Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), etoksigin, propilgalat ve sodyum benzoat gibi üretilen sentetik antioksidanların son zamanlarda gıdalara katıldığı bildirilmiştir (Braginskaia *et al.* 1992; Shahidi 2000). Antioksidan ilaçlar arasında ise ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, demir redoks döngüsünün inhibitörleri, lokal anestezikler, kalsiyum kanal engelleyicileri ve sitokinler yer almaktadır.

1.4.3. Çalışmada kullanılan antioksidan maddeler

Bu çalışmada, dioksinlerin oluşturacağı olası oksidatif stresi önleme ya da hasarın önüne geçme noktasında koruyucu ve iyileştirici etkilerinin olup olmadığı araştırılan

antioksidan maddelerden birisi endojen ve ekzojen kaynaklı bir antioksidan olan Koenzim Q10 (CoQ10) ve diğeri de ekzojen kaynaklı doğal antioksidanlardan Resveratrol'dür (RSV).

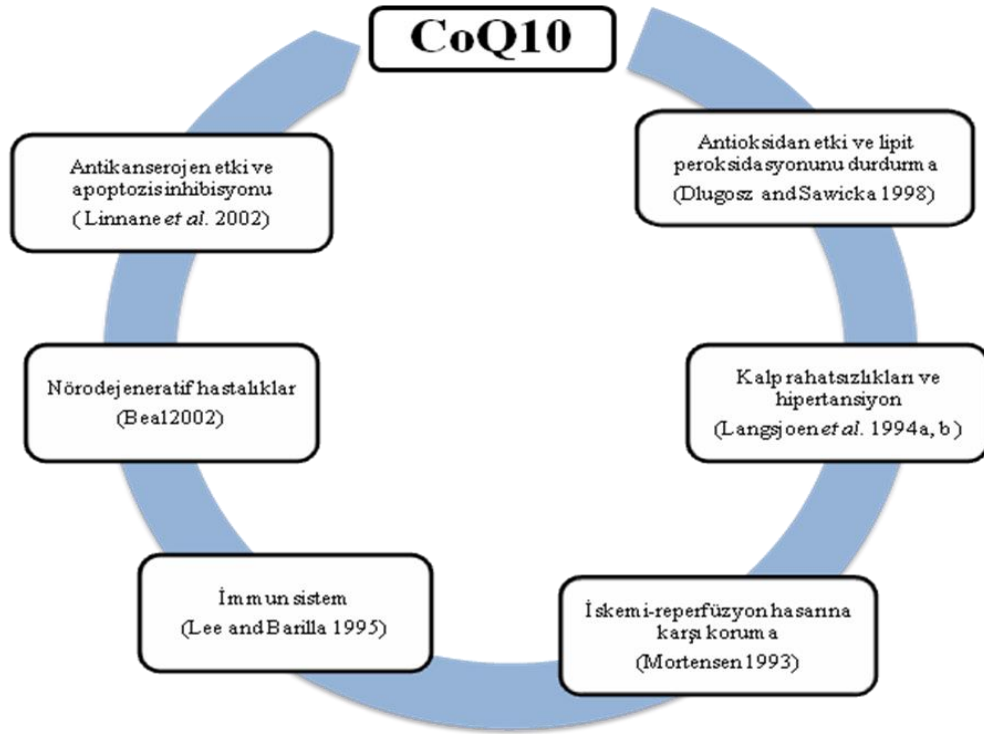
1.4.3.a. Koenzim Q10 (Ubikinon)

Koenzim Q10 (CoQ10) ilk defa 1957 yılında Dr. Frederick Crane ve arkadaşları tarafından sığır kalbinin mitokondrisinden izole edilmiştir (Crane *et al.* 1971). CoQ10 mitokondriyal elektron transport zincirinde koenzim ve NADH dehidrogenaz ve süksinat dehidrogenaz ile sitokrom sistemleri arasında elektron taşıyıcısı olarak görev yapan lipofilik yapıda endojen veya eksojen kaynaklı bir antioksidandır (Kawamukai 2002; Ishrat *et al.* 2006). Yaygın olarak ubiquinon, CoQ veya vitamin Q10 olarak bilinmektedir (Bonakdar and Guarneri 2005). Yapısal olarak vitamin K'ya benzemektedir. Fakat vücutta hemen hemen bütün dokularda sentezlenebildiği için vitaminlere dahil edilmemiştir. (Kawamukai 2002). Kimyasal formülü; 2,3-dimetoksi-5 –metil-6multiprenil-1,4-benzokinon'dur (Molyneux *et al.* 2008). CoQ10, golgi cismi, lizozom, mikrozom, peroksizom ve hücre membranı olmak üzere birçok membranda bulunmaktadır. En fazla iç mitokondriyal membranda bulunur (Altekin 1999; Kawamukai 2002). İnsan vücudunda Koenzim Q10 hem redükte ubikinol (CoQ10H₂) hem de okside ubikinon (CoQ10) halde bulunmaktadır. Plazmada dolaşan CoQ10'nun % 95'i redükte ubikinol olarak taşınmaktadır (Parkhideh 2008).

CoQ10'un biyosentez yolu *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* mutantlarının genetik analizleri sonucunda aydınlatılmıştır. CoQ10 endoplazmik retikulumda başlayan ve golgide sonlanan tirozin ve asetil CoA'nın yer aldığı iki farklı yolun birleşmesi sonucu sentezlenmektedir (Overvad *et al.* 1999). Birinci yol kinon halkasının oluşumu için tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin birkaç basamak sonra 4-hidroksi benzoata dönüşmesi ile sonlanan yoldur. İkinci yol ise proprenil yan zincirinin oluşması için asetil CoA'dan mevalonat yolu olarak da adlandırılan yolun sonunda farnezil pirofosfatın oluşmasıdır. Daha sonra farnezil pirofosfattan transpreniltransferaz enzimi ile dekaprenil pirofosfat oluşmaktadır. Birinci yol sonunda oluşan 4-hidroksi benzoat ile

dekaprenil pirofosfatın birleşerek dekaprenil 4-OH benzoat ve ardından birkaç basamak sonra da Koenzim Q10 meydana gelmektedir (Kawamukai 2002; Turunen *et al.* 2004).

Koenzimler fonksiyonlarına göre büyük ve kompleks enzimlerin kofaktörleri olarak görev yaparlar. CoQ hücrede beş mitokondriyal enzimden üçünün (Kompleks I, Kompleks II ve Kompleks III) kofaktörüdür (Kawamukai 2002). CoQ10 mitokondride solunum zincirinin elektron taşıyıcısı olarak da görev almaktadır. Yapısında bulunan kinon grubu CoQ10'a elektron taşıyıcısı özelliğini kazandırır (Overvad *et al.* 1999; Turunen *et al.* 2004). Redoks özelliği (indirgenme-yükseltgenme) ile elektronların Kompleks I (nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz) ve Kompleks II'den (süksinat dehidrogenaz) kompleks III'e (ubikinon - sitokrom C redüktaz) taşınmasını sağlamaktadır. Bu sırada çok önemli biyolojik enerji olan ATP üretilir. Sonuçta, CoQ10 hücresel enerjinin üretilmesinde önemli bir role sahiptir (Crane 2001; Turunen *et al.* 2004; Bhagavan *et al.* 2007) CoQ10'nun etkileri Şekil 1.5'de özetlemiştir.



Şekil 1.5. KoenzimQ10'un etkileri

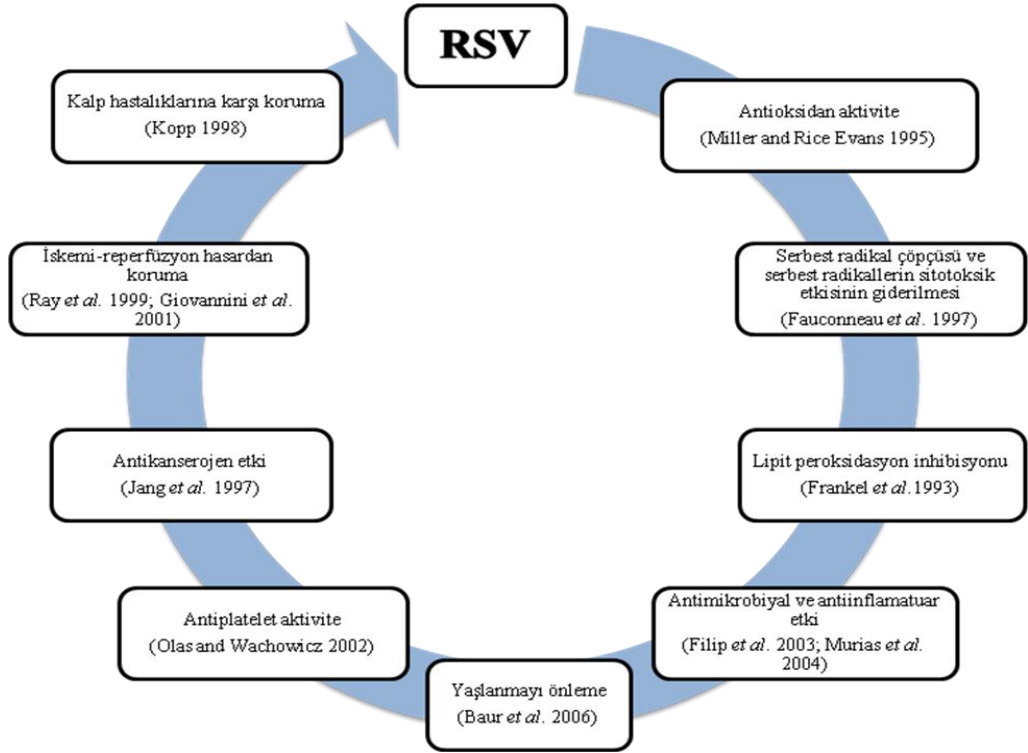
CoQ10 oksijen kaynaklı radikaller ve singlet oksijen ile etkileşerek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve biyomoleküllerin zarar görmesini önlemektedir (Bonakdar and Guarneri 2005). Stabil karakterli olmayan serbest radikaller ubikinondan gelen bir elektronla stabil hale gelmektedir. Bu özelliğinden dolayı CoQ10 membranlarda doymamış lipid zincirlerine yakın olarak bulunan toplayıcı etki gösteren kuvvetli bir antioksidandır (Crane 2001; Turunen *et al.* 2004). Ubikinol α -tokoferoksil radikalinden vitamin E'yi yeniden üretebilme yeteneğindedir. Bu işlem sırasında ubikinol'un antioksidan etkisi α -tokoferol'un varlığından bağımsız olarak çalışmaktadır. Ayrıca CoQ10'un membran stabilitesinin sağlanmasında, hücre sinyalinde, gen ekspresyonunda, hücre büyümesinin ve apoptozisin kontrolünde de etkili olduğu tespit edilmiştir (Crane 2001; Kavas vd 2006).

1.4.3.b. Resveratrol

Resveratrol (RSV) üzüm, yer fıstığı ve dut gibi bitki türlerinin büyüme ve gelişme dönemlerinin herhangi bir anında, bitkilerde stres faktörü olan soğuk hava koşulları, ultraviyole (UV) ışınım, yaralanma, bakteri ve mantar enfeksiyonları gibi dış uyarıcılar ile karşılaştıklarında, dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amacıyla kendilerini korumak için doğal olarak üretilen ve genel olarak non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir (Fremont 2000; Gerogiannaki-Christopoulou *et al.* 2006). Polifenolik bileşikler flavonoid yapıda olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. RSV'nin en fazla bulunduğu üzümde bulunan flavonoidler; quersetin, mirisetin, flavan-3-ols, kateşin, epikateşin ve antosiyaninlerdir. Flavonoid yapıda olmayanlar ise üç alt grupta toplanırlar; **a)** P-hidroksibenzoik asit ve gallik asitten oluşan hidroksibenzoatlar **b)** kafeik, kaftarik ve p-koumerik asitlerden oluşan hidroksisinnamatlar **c)** *trans* resveratrol, *cis* resveratrol ve resveratrol glukozidten oluşan stilbenler (Chiou *et al.* 2007). Fitoaleksinler ise patojenik (fungal) ataklar veya abiyotik strese karşı bitkilerin kendilerini savunmak için ürettikleri antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip sekonder bitki metabolitleri bilinen adıyla bitkisel antibiyotiktir (Li and Signal 2000; Martinez and Moreno 2000; Szewczuk *et al.* 2004).

RSV 3,5,4¹ trihidroksistilben yapısında olup molekül formülü: C₁₄H₁₂O₃ şeklindedir. Bitkilerde polifenoller, RSV de dahil olmak üzere genelde glikozit yapısındadır. Bu nedenle RSV, 3-O-β-D-glikozit “piceid” olarak adlandırılır ve *cis*, *trans* izomerlerin adları sırasıyla *cis*-piceid ve *trans*-piceid’dir (Signorelli and Ghidoni 2005). *Trans* izomerlerinin biyolojik aktivitelerinin *cis* izomerlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Bradamante *et al.* 2004).

RSV ilk olarak 1940’da beyaz hellebore köklerinden (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) izole edilmiştir. 1963 yılında ise geleneksel Çin ve Japon ilacı (Ko-jo-kon) olarak bilinen çoban değneği (*Polygonum cuspidatum*) köklerinden eldesi gerçekleştirilmiştir (Fremont 2000). 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından yapılan bir çalışma ile *trans* resveratrol *Vitis vinifera* bitkisinden izole edilmiş ve bu araştırmacılar bileşiğin genellikle *Botrytis cinerea* adlı mantarın saldırısına karşı veya ultraviyole ışığa maruz kalan bitkinin yaprak dokularında üretildiğini keşfetmişlerdir (Wenzel *et al.* 1998). RSV ilk olarak 1992 yılında gerçekleştirilen çalışma ile dikkatleri üzerine çekmeyi başarmıştır. RSV’nin şaraptaki keşfine bağlı olarak Fransız paradoksunun (Fransızlarda yüksek yağlı beslenmeye rağmen koroner kalp hastalığına düşük oranda rastlanması) açıklanması büyük yankı bulmuştur (Kopp 1998; Fremont 2000). Bu keşiften beş yıl sonra Jang ve arkadaşları RSV’nin antikanserojen özelliği olduğunu bir sayfalık raporla yayınlamışlardır. Bu gelişme üzerine RSV ile yapılan bilimsel çalışmalar ivme kazanmıştır (Jang *et al.* 1997). RSV’nin etkileri Şekil 1.6’da verilmiştir.



Şekil 1.6. Resveratrolün etkileri

RSV antifungal özelliğinden dolayı pek çok bitki tarafından üretilmektedir. RSV çok değişken miktarlarda üzümde (*Vitis vinifera*), kırmızı dut ağacında (*Morus rubra*), ahudududa (*Rubus idaeus*), yer fıstığında (*Arachis hypogea*), fındıkta (*Corylus cinsi*), böğürtlende (*Rubus caesius*), İsveç çamı ve doğu beyaz çamı gibi bazı çam ağaçlarında, Çin’de huzhang olarak bilinen sivri uçlu çoban değneğinde (*Polygonum cuspidatum*) bulunduğu tespit edilmiştir. Sayılan bu kaynaklar arasında ise RSV en fazla üzüm kabuğunda (0,24- 1,25mg/g) ve yer fıstığında (0,01- 0,26mg/g) bulunmaktadır (Lamuela-Raventos 1995; Tokusoglu *et al.* 2005; Gerogiannaki-Christopoulou *et al.* 2006).

RSV sentezi yaprak epidermisinde ve üzüm kabuğunda gerçekleşirken etli meyve de sentezi gerçekleşmez (Gusman *et al.* 2001). Resveratrol biyosentezi fenilalanininden başlar. Fenilalaninin deamilasyonu sonucu sinnamik asit oluşur. Sinnamik asit, 4-kumarik asitle yükseltgenir, 4-kumaril Co-A ile ester yapısına dönüşür. Stilben sentaz enzimiyle resveratrol oluşur. Resveratrol kısaca; stres, travma, enfeksiyon ya da

ultraviyole ışığa maruziyetinde 4-kumarol koenzim A (4-kumarol-CoA) ve malonil koenzim A'dan (malonil-CoA) sentezlenir, yani sentezi yapısal değil indüklenebilir. 4-kumarol-CoA ve malonil-CoA bütün bitkilerde bulunan enzimlerdir. 3 molekül malonil-CoA ve 1 molekül 4-kumarol28 CoA tetraketid yapısını oluşturur. Bu aşamaya kadar sentez basamakları aynı iken bundan sonraki basamakta oluşan ürünün RSV mi yoksa flavonoid mi olduğu uzun yıllar sır olarak kalmış, daha sonra ise ortamda Resveratrol sentaz varsa ürünün RSV ve kalkon sentaz varsa ürünün flavonoid olduğu anlaşılmıştır (Soleas 1997; Fremond 2000; Signorelli and Gihidoni 2005).

Buradan hareketle yapacağımız çalışmanın ana hedeflerini şöyle özetlemek mümkündür:

1. Öncelikle, kimyasal ve tıbbi atıkların oksijence fakir ortamda yakılması, polivinilklorür plastik üretimi, çiftliklerde ve kâğıt endüstrisinde kullanılan klorlu pestisidlerin ve herbisidlerin üretimi sonucu ortaya çıkarak, çoğunlukla hava yoluyla taşınıp su ve toprak ile hayvansal ve bitkisel dokularda biriken dioksinler arasından seçilen 2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin, 1,2,3,7,8- Pentaklorodibenzo-*p*-dioksin 1,2,3,7,8,9- Hekzaklorodibenzo-*p*-dioksin ve 1,2,3,4,6,7,8,9- Oktaklorodibenzo-*p*-dioksin'in, model bir organizma olan *D. melanogaster*'in transheterozigot larvalarının yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisini araştırmaktır.
2. Çalışmanın ikinci basamağında, adı geçen dioksinlerin, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile *D. melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin olup olmadığını belirlemektir.
3. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, genotoksik etkileri değerlendirilen dioksinlerin, total oksidan kapasite analizi ile antioksidan sistemler üzerine olası toksik etkisinin olup olmadığını ve varsa toksik etkinin derecesini tespit etmektir.

4. Çalışmanın son basamağında ise, total antioksidan kapasite analizi ile hem endojen hem de ekzojen kaynaklı antioksidanlara (KoenzimQ10 ve Resveratrol) ait koruyucu ve iyileştirici etkinin olup olmadığını belirleyerek bu konuda yapılacak yeni çalışmalara zemin oluşturması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde, kaynak özetleri, dioksinlerin toksik etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar ve detoksifikasyon sistemler üzerine KoenzimQ10 ve Resveratrol'un etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar olmak üzere iki kısım halinde kronolojik sırayla verilmiştir.

2.1. Dioksinlerin Toksik Etkileri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar

Nilsson and Ramel (1974) tarafından yapılan çalışmada, dioksinlerin bir grubu olan poliklorlu bifenil (PCB) ile Clophen 30 ve Clophen 50 karışımlarına larval evreden ergin bireye kadar tüm gelişim süresince kronik olarak maruz kalan *Drosophila melanogaster*'de, letal etki meydana gelmeden gelişimde gecikmenin yaşandığı, Clophen 50'nin Clophen 30'a göre daha toksik olduğu belirlenmiştir. Ancak ayrılmama (non-disjunction) ve kromozomal aberasyonların bir ölçüsü olan eşey kromozom kayıplarını belirlemek amacıyla yapılan genetik testlerde, bu maddelerin herhangi bir etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir.

Oral yolla TCDD'ye kronik olarak maruz kalan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, Kociba *et al.* (1976) 13 hafta sonunda ratlarda fertilitenin olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir.

Gasiewicz *et al.* (1980), ratlarda dioksin zehirlenmelerine bağlı ölen birey sayısının doz aşımı ile değiştiğini; şöyle ki, 50ng/kg uygulama grubunda hiçbir ratın ölmediğini, 500ng/kg uygulama grubunda ölümlerin 62- 86. günler arasında ve 1000ng/kg uygulama grubunda ise ölümlerin 42- 58. günler arasında meydana geldiğini gözlemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ölen birey sayılarının doza bağlı olarak arttığı ve doz arttıkça ölümlerin daha erken oluştuğu tespit edilmiştir.

National Toksikoloji Programı (1980)'nin raporuna göre, dişi ve erkek Swiss- Webster farelere 13 hafta boyunca haftada 3 kez 0,01- 50µg doz aralığında 1,2,3,6,7,8-HxCDD ve 1,2,3,7,8,9-HxCDD karışımının verildiği dermal uygulama deneylerinde, mortalite ve histopatolojik değişim insidanslarına bakılarak 10µg uygulama dozunda dişi farelerde %80; 25- 50µg uygulama dozlarında ise hem dişi hem de erkek farelerde %100 mortaliteye rastlanılmıştır. Aynı çalışmada, her iki eşeyde de lenfoid ve karaciğer doku harabiyetleri tespit edilmiştir.

Yine, *D. melanogaster*'e çeşitli konsantrasyonlarda (50, 250 ve 500ppm) TCDD verilen bir çalışma sonucunda, Zimmering *et al.* (1985) erkek bireylere ait germ hücrelerinde eşeye bağlı resesif letal bir mutasyon görülmediğini belirtmişlerdir.

Couture *et al.* (1990), 2,3,7,8-TCDD'nin C57BL/6N farelerinde kuvvetli bir teratojen olduğunu belirledikleri bir çalışmada, 0- 24µg/kg doz aralığında uygulanan TCDD'nin doz artışına bağlı olarak renal ve üriner sistem hasarlarından ölüme kadar giden toksik etkilerin olduğunu da gözlemiştir.

Perinatal dönemde TCDD'ye maruz kalan ratların androjen ve üreme sistemleri üzerine yapılan bir seri çalışmada, gebeliğin erken dönemlerinde gerçekleşen TCDD maruziyetinin bu sistemlerde toksik etki meydana getirerek eşey organ malformasyonlarının oluşmasını tetiklediği, Mably *et al.* (1992) tarafından gösterilmiştir.

Alsharif *et al.* (1994) tarafından TCDD'nin neden olduğu toksisitede, oksidatif stres ve DNA hasarının önemli rol oynadığı ve toksik etkinin zamana ve doza bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, oral yolla tek doz 5µg/kg TCDD uygulanan ratlarda oksidatif stres gözlenmezken; 25µg/kg TCDD'nin 12 saat, 50µg/kg TCDD'nin 6 saat ve 125µg/kg TCDD'nin 3- 5 saat sonra konsantrasyon artışına paralel olarak serbest radikal oluşumunu artırdığı ve bunu takiben DNA hasarlarının meydana geldiği tespit edilmiştir.

2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD), 2,3,4,7,8-pentaklorodibenzofuran (PeCDF) ve 3,4,5,3',4'-pentaklorobifenil (Co-PeCB) maddeleri ile insan lenfositlerinde Nagayama *et al.* (1995) tarafından yapılan bir çalışma ile bu maddelerin karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu biyolojik ve genetik hasarın bir göstergesi olan kardeş kromatid değişim frekansını arttırarak genotoksik potansiyelin bir indikatörü sayılabilecek toksisiteye sahip oldukları gösterilmiştir.

Mimura *et al.* (1997)'a göre, farelerde Ah reseptörünün ksenobiyotik metabolizma enzimlerinin düzenlenmesinde doğrudan rolünün aksine, TCDD ve diğer dioksinlerin neden olduğu fizyolojik ve teratojenik etkilerin meydana gelmesinde Ah reseptörünün dolaylı etki göstermektedir.

Subkronik olarak 0,45ng/kg/gün TCDD uygulanan dişi B6C3F1 farelerin beyin dokularında oksidatif stresin arttığını Hassoun *et al.* (1998) ifade etmişlerdir.

Yüksek dozlarda TCDD ve diğer dioksinlere maruz kalan kemiriciler ile balık, kuş ve diğer memeliler üzerinde yapılan çalışmalarla, bu canlılarda wasting sendromu, lenfoid ve ganodal atrofi, klorakne, hepatoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite ve ölüme rastlanılmıştır. Primat ve rodentlerde 30-80ng/kg vücut ağırlığı dozlarında bile gelişim, üreme ve immün sistemler üzerinde gözlenen dioksinlerin yol açtığı bu toksik etkilerin sitokin ekspresyonu ve metabolizma enzimlerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı Birnbaum and Tuomisto (2000) tarafından ifade edilmiştir.

4 farklı herbisitinin genotoksik etkilerinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile Kaya *et al.* (2000a) tarafından araştırıldığı bir çalışma sonucunda elde edilen verilerin, ökaryotik model bir organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in insanlara büyük oranda benzerlik göstermesinden dolayı son derece önemli olduğu vurgulanmıştır.

0,15-150ng/kg doz aralığında subkronik ve 0,001-100µg/kg doz aralığında akut olmak üzere farelere uygulanan 2,3,7,8-TCDD'nin karaciğer, dalak, akciğer ve böbrek dokularında biriken dioksin konsantrasyonu ile serbest radikal oluşum oranının karşılaştırıldığı bir çalışmada, Slezak *et al.* (2000) tarafından dokularda biriken dioksin miktarına bağlı olarak oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir.

Deney hayvanlarının çeşitli dokularında dioksin ve dioksin benzeri bileşiklerin yol açtığı histopatolojik etkilerin incelendiği bir çalışmada, bu etkilerin karbonhidrat ve lipid metabolizması ile endokrin sistemdeki değişimlerden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Mitrou *et al.* 2001).

Thornton *et al.* (2001), 2,3,7,8-TCDD'nin mutajenik etkisini araştırdıkları bir çalışmada, ratlara 2µg/kg TCDD uygulanması üzerinden geçen 6. hafta sonunda ne dişi ne de erkek bireylerde mutasyon frekansında kontrole göre bir farklılık gözlememişlerdir.

Aralarında 2,3,7,8-TCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF ve PCB126 gibi dioksinlerin de bulunduğu çeşitli ksenobiyotiklerin (organizmaya çeşitli yollarla dışarıdan alınan her türlü yabancı maddeye), ratların karaciğer ve beyin dokularında 30 hafta süren kronik maruziyetten sonra oksidatif stresin göstergesi olarak süperoksit anyonlarının oluşmasına, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarlarına neden olduğu, Hassoun *et al.* (2002) tarafından bildirilmiştir.

Dioksinlerin kanser yapıcı etkilerinin doğrudan DNA'da mutasyon yapmalarından çok lipid peroksidasyonuna neden olmaları ile ilgili olduğunu deneylerle ispat eden Yoshida and Ogawa (2000), bu durum sebebiyle de dioksinlerin kanserin başlangıç periyodunda fazla etkili olmazken gelişme periyodunda önemli bir etkiye sahip olduğunu açıklamıştır.

Kern *et al.* (2002), 72 saate kadar 5- 200nM TCDD'ye maruz kalan ratların çeşitli organlarında oluşan oksidatif stresi araştırarak TCDD'nin hem karaciğer hem de yağ

dokuda oksidatif stres enzim seviyelerinde değişiklere yol açmak suretiyle lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu göstermişlerdir.

15µ/kg 2,3,7,8-TCDD uygulanan dişi C57BL/6 farelerinde dioksine bağlı olarak gözlenen toksisite ve hastalıklarda artan mitokondriyal solunuma bağlı olarak oluşan reaktif oksijen üretiminin önemli bir rol oynadığı Senft *et al.* (2002) tarafından bildirilmiştir.

Dioksinlerin çeşitli gruplarının (2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, OCDF, 3,3',4,4'-PCB77, 3,3',4,4',5-PCB126 ve 3,3',4,4',5,5'-PCB169) deney hayvanlarının üreme sistemleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, dioksin karışımlarının hem dişi hem de erkek yavru bireylerde gelişim geriliğine ve onların üreme organlarında çeşitli malformasyonlara neden olduğu görülmüştür (Hamm *et al.* 2003).

Perinatal dönemde dioksinlere maruz kalan deney hayvanlarında, karaciğer enzimlerinin anormal indüksiyonu ile beyin gelişiminde oluşan hasarlara bağlı olarak testesteron ve östrojen seviyesinde de azalmanın meydana geldiği ten Tusscher and Koppe (2004) tarafından bildirilmiştir.

Mandal (2005), çok güçlü çevresel bir kirletici olan 2,3,7,8-TCDD'nin Ah reseptörü ile uyarılan sinyal yollarını etkileyerek biyokimyasal değişikliklere ve çeşitli organlar üzerinde toksik etkilere sebep olduğunu ifade etmiştir.

İşyerinde 2,3,7,8-TCDD maruziyetinden dolayı zehirlenen iki kişi üzerinde TCDD'nin olası genotoksik ve karsinojenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, belirli bir sürede onların kanlarında biriken PCDD ve PCDF seviyeleri ölçülmüştür. Bu hastaların periferik lenfosit hücrelerinde Valic *et al.* (2004) tarafından kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri yapılmış ve MN frekansının kontrol grubu bireylerine göre arttığı ancak KKD frekansında önemli bir artışın olmadığı ayrıca artan PCDD ve PCDF seviyelerinin de 2 aylık bir süre sonunda normal değerlere

döndüğü belirlenmiştir. Yapılan comet testi sonucunda ise pozitif bulgular elde edilmiştir. Tüm bu verilerden TCDD'nin insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etki göstermese de özellikle yol açtığı DNA hasarlarından dolayı muhtemelen karsinojenik olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Perinatal dönemde farklı konsantrasyonlarda (12,5; 50; 200 ve 800ng/kg) tek doz 2,3,7,8-TCDD'ye maruz kalan Long-Evans ratlarında, Yonemoto *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, ergin ve embriyo toksisitesi araştırılmış ve testis ağırlığı, sperm miktarı ve östrojen siklusunda herhangi bir farklılık gözlenmediği ancak yüksek konsantrasyonlarda pubertede gecikmenin yaşandığı belirlenmiştir.

Schecter *et al.* (2006), deney hayvanlarında 2,3,7,8-TCDD ve 2,3,7,8 pozisyonlarında klor atomu bulunduran diğer dioksin ve furanların toksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışmadan elde edilen bulgulara göre, bu bileşiklerin karaciğer hasarı, immün sistemi baskılama, kanser oluşumuna neden olma, fetüs gelişiminde anormallikler, gelişimsel ve üreme üzerine toksik etkiler, cilt lezyonları, büyüme ve diğer hormonlarda değişiklikler ve metabolik enzimlerin indüksiyonu gibi toksik etkilerinin olduğunu rapor etmiştir.

Ao *et al.* (2009) tarafından C57BL/6 farelerinin bağışıklık sistemi üzerine 2,3,7,8-TBDD ve 1,2,3,7,8-PeBDD dioksinlerinin olası immünotoksitesinin aynı dozlardaki 2,3,7,8-TCDD ve 1,2,3,7,8-PeCDD'nin sahip olduğu toksik potansiyel ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, 2,3,7,8-TCDD ve 2,3,7,8-TBDD'nin immünotoksik potansiyelinin hemen hemen aynı olduğu; 1,2,3,7,8-PeCDD'nin sahip olduğu toksik potansiyelin ise bu dioksinlere ait toksisiteye yakın olduğu ve 1,2,3,7,8-PeBDD'ye ait toksik potansiyelin ise diğerlerine göre çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Céspedes *et al.* (2010), canlı organizmalarda dioksinlerin toksik etkilerinin kısmen Ah reseptöründen kısmen de bağımsız mekanizmalar ile meydana geldiğini bildirmiştir. Bu araştırmacılara göre, *D. melanogaster*'de, omurgalılardaki Ah reseptörünün (AhR) homologu olan reseptör protein Spinless (Ss) proteindir ve bu proteinin

transkripsiyonundan sorumlu olan gen bölgesinde bulunan amino asit dizisinin farklılığından dolayı, bu reseptöre dioksin bağlanamamaktadır.

2.2. Detoksifikasyon Sistemler Üzerine KoenzimQ10 ve Resveratrol'ün Etkileri ile İlgili Olarak Yapılan Çalışmalar

Stocker *et al.* (1991) tarafından Koenzim Q10 (Ubikinol-10)'un, insanlarda düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonunu önlemede likopen, β - karoten ve α - tokoferole göre daha güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Uenobe *et al.* (1997), promutajen Trp-P-1'in indüklediği mutasyonlara karşı, resveratrolün baskılayıcı etkisini ames testiyle göstererek bu durumu resveratrolün metabolize edici enzimleri baskılamasıyla ilişkilendirmiştir.

İnsan lenfositleri üzerine yapılan bir çalışmada, hidrojen peroksit'e bağlı oksidatif stresin Koenzim Q10 (Ubikinol-10) ile giderilebildiği Tomasetti *et al.* (1999) tarafından belirtilerek, ancak bu süperoksitin DNA hasarlarında doğrudan bir inhibisyona sebep olmadığı da vurgulanmıştır.

Martinez and Moreno (2000), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, peritoneal makrofajlarının uyardığı lipopolisakkarit (LPS) ve forbol esterler (PMA) tarafından üretilen süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksitin yol açtığı lipid peroksidasyonun yanı sıra araşidonik asit (AA), siklooksijenaz- 2 (COX- 2) ve prostoglandin sentezi (PG) üzerine resveratrolün inhibisyon etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda da resveratrolün etkisiyle oksidatif stresin önlendiği, araşidonik asit salınımı ve siklooksijenaz- 2 ekspresyonu ile prostoglandin sentezinin azaldığı belirtilmiştir.

Ebadi *et al.* (2001), insanlarda Parkinson hastalığına benzer bir rahatsızlığa sebep olarak metabolik enzimleri etkilemek suretiyle oksidatif hasara yol açan 1-metil-4-fenil-1,2,3, 6-tetrahidropiridin (MPTP) nörotoksine ait bu etkinin endojen ve ekzojen kaynaklı CoQ10 ile giderilebileceğini göstermiştir.

Matsuoka *et al.* (2001) tarafından ames testi ile yapılan bir çalışmada, resveratrolün çin hamsterlerinin akciğer hücre hatlarında nokta ve çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmadığı rapor edilmiştir.

Roychowdhury *et al.* (2001) yaptıkları bir çalışma sonucunda, resveratrol içeren üzüm çekirdeği ekstrelerinin (50mg/L) fare beyinine ait glia hücrelerinde nitrik oksit üretimi sonucu oluşan doku hasarının önlenebileceğini belirtmişlerdir.

İnsanlar ve deney hayvanlarında resveratrolün oksidatif DNA hasarlarını önleyerek çoğu genotoksik ajana karşı antimutajenik/antikarsinojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Sgambato *et al.* 2001).

Farklı dozlarda (1, 10 ve 100ng/kg/gün) TCDD uygulanan erkek Wistar ratlarının testislerinde dioksin maruziyeti sonucu oluşan oksidatif hasara karşı vitamin E'nin koruyucu rolünün olduğu, Latchoumycandane and Mathur (2002)'un yapmış oldukları bir çalışma ile gösterilmiştir.

Orallo *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, 1-10µM resveratrolün NAD(P)H ile stimüle olan sıçan aortunda meydana gelen süperoksit oluşumunu neredeyse tümüyle ortadan kaldırdığı gösterilmiştir.

Alsharif and Hassoun (2004) yaptıkları bir çalışmada, vitamin A (50mg/kg/gün) ve vitamin E (150 mg/kg/gün) antioksidanlarının 50µ/kg 2,3,7,8-TCDD maruziyeti sonucu farelerde akut toksisiteyle oluşan doku hasarlarını önlediğini tespit etmiştir.

Resveratrolün *Drosophila*'nın ömür uzunluğu üzerine etkilerinin Bauer *et al.* (2004) tarafından araştırıldığı bir çalışmada, 0,2mM resveratrol konsantrasyonunun ömür uzunluğunu arttırdığı belirtilmiştir.

Çevresel toksik bir ajan olan 2,3,7,8-TCDD'nin neden olduğu tümör oluşum mekanizmasının tam olarak açıklanmamış olmasıyla birlikte Çin hamsterlarının eşey hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda (50, 500 ve 1000pM) TCDD uygulaması sonucu elde edilen bulgulara göre, artan oksidatif stresin, DNA hasarlarının ve tümör oluşumunun Ah reseptör proteinin uyarılması ile gerçekleşmiş olabileceği Chan *et al.* (2004) tarafından rapor edilmiştir.

de la Lastra and Villegas (2007), güçlü bir doğal antioksidan olan resveratrolün koenzim Q10 ile rekabet ederek serbest radikal oluşumunu engelleme, mitokondride oluşan süperoksit anyonlarını süpürme, fenton reaksiyonu ürünlerinin indüklediği lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve detoksifikasyon enzimlerini uyarma özelliği bulunduğunu rapor etmiştir.

Sakin (2008)'e göre bir çeşit gıda antioksidanı olan likopen, ratların karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında dioksinlerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki göstermektedir.

D. melanogaster'in ergin dişi ve erkek bireylerinde, metabolizma ve lipid peroksidasyonu üzerine %3'lük DMSO'da çözünmüş 1µM trans-resveratrolün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Dutra *et al.* (2009) tarafından 21 gün boyunca lipid, trigliserit, kolesterol, glikojen ve proteinlerden oluşan enerji metabolizması ile lipidperoksidasyon değerleri ölçülmüş, her iki eşeye ait değerlerin yakın olduğu, resveratrolün düzenleyici ve koruyucu etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

El-Agamy (2010), kuvvetli bir mikotoksin olan aflatoksin B₁'in ratlar üzerindeki hepatotoksik ve hepatokarsinojenik etkilerinin giderilmesi için kurkumin ve resveratrol ile çalışarak, aflatoksin B₁'in (25µg/kg BW) rat karaciğerinde lipid peroksidasyonuna yol açarak GSH, SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde düşüşe neden olduğunu, buna karşın aflatoksin B₁ ile birlikte verilen resveratrolün (10mg/kg BW) kurkumine (200mg/kg BW) göre daha az etkili olmakla birlikte karaciğer hasarını önleyip enzim

seviyelerinde artışa sebep olarak koruyucu ve iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

10µM Aflatoksin B₁ muamelesi ile insan lenfositlerinde artan kromozomal aberasyon ve kardeş kromatid değişim frekanslarının ve ayrıca doku hasarının farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 15, 25, 40, 75 ve 100µM) resveratrol uygulaması ile önemli ölçüde inhibe edildiği Türkez and Sisman (2012) tarafından yapılan bir çalışma ile belirlenmiştir.

Zhang *et al.* (2012), tütün bitkisinde biriken PCDD/F bileşiklerinin neden olduğu hücresel hasarın endojen kaynaklı antioksidan enzimler tarafından kısmen giderildiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler

Drosophila melanogaster Diptera takımına ait yabani tip (wild type= w.t) bir sinek türüdür. Halk arasında sirke sineği veya meyve sineği olarak tanınan bu tür, ilk kez 1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in farklı mutant soyları kullanılmıştır. *Drosophila melanogaster* çok sayıda yavru döl vermesi, kısa ömürlü olması, arı döl olarak saklanabilmesi, kullanış kolaylıkları (Clark and Rockstein 1964), erginlerin tüm somatik hücrelerinin postmitotik olması (Bozcuk 1972), kolayca tanınabilen ve genetik olarak kontrol edilebilen çok çeşitli morfolojik karakterlere ve mutant soylara sahip olması gibi nedenlerden dolayı günümüzde de tercih edilen bir organizmadır. İlave olarak memelilere genetik mekanizmalar bakımından büyük benzerliği onun genetik toksikoloji çalışmaları için çok uygun bir organizma olmasını sağlamıştır (Tiburi *et al.* 2002). Daha önce birçok çalışmada gösterildiği gibi *Drosophila* birçok kimyasal madde ve kimyasal maddelere ait karışımların metabolize edilmesi için gerekli metabolik yolların çok büyük bir bölümüne sahiptir. Ayrıca insanlar için kanserojenik olan pek çok madde *Drosophila* testlerinde de pozitif sonuçlar vermiştir (Idaomar *et al.* 2002; Osaba 2002; Lehmann 2003). *Drosophila* çalışmalarında promutajen ve prokarsinojenleri test etmek için ilave metabolik enzimlere gerek yoktur. Oysa kültüre alınan mikroorganizmalar ve memeli hücreleri metabolik aktivasyon sistemlerinin birçoğundan yoksundur. Bu nedenle mutajenite testlerinde kültür ortamında mikroorganizmalar ve memeli hücreleri kullanılırken kültür ortamına alternatif metabolik aktivasyon sistemlerinin de eklenmesi gerekir (Würgler and Vogel 1986; Hoffman 1991; Graf and Singer 1992).

3.1.2. *Drosophila melanogaster*'in sistematigi

Phylum (= Şube): Arthropoda (= Eklem bacaklılar). Kitinden yapılmış bir dış iskeletleri vardır ve bacakları eklemlidir.

Subphylum (= Alt Şube): Mandibulata-Antennata. Bu alt şubeye dahil olan hayvanlar antenli olup mandibulları iyi gelişmiş ve kuvvetlidir. İç kısmında sert dişler bulunur.

Classis (= Sınıf): Insecta-Hexapoda (= Böcekler- Altı bacaklılar). Vücut; baş, gövde ve abdomen olmak üzere üç kısma ayrılır. Toraks bölgesinin üç segmentli olması ve her göğüs segmentinde bir çift bacağın bulunması ile tanınırlar. İkinci (mesotoraks) ve üçüncü (metatoraks) göğüs segmentlerinden birer çift kanat çıkar. Başta bir çift anten ve bir çift bileşik göz bulunur. Abdomen 11 segmentten oluşur. Bu segmentler üye taşımaz.

Subclassis (= Alt Sınıf): Pterygota (= Kanatlı böcekler). Meso ve metatoraksta hareketli kanatlar taşırlar.

Superordo (= Üst Takım): Mecopteroidea-Panorpoidea (= Uzun kanatlılar). Arka kanatları körelme eğilimi gösterir.

Ordo (= Takım): Diptera. Göğüs bölgesinden bir çift kanat çıkar. Metatorakstaki ikinci çift kanatlar halter adı verilen topuz şeklinde bir denge organına dönüşmüştür.

Subordo (= Alt Takım): Brachycera (= Sinekler- Kısa antenliler). Larvada ağız çengelleri bulunur. Pupa, üçüncü larva evresinden kalma bir deri ile sarılır. Antenleri çok kısadır ve birbirinden farklı şekilleri olan segmentlerin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Üçüncü anten segmenti ya sadece uç kılı taşır (arista) ya da bu segmenti izleyen anten segmentleri birbiriyle kaynaşarak kamçı oluşturur.

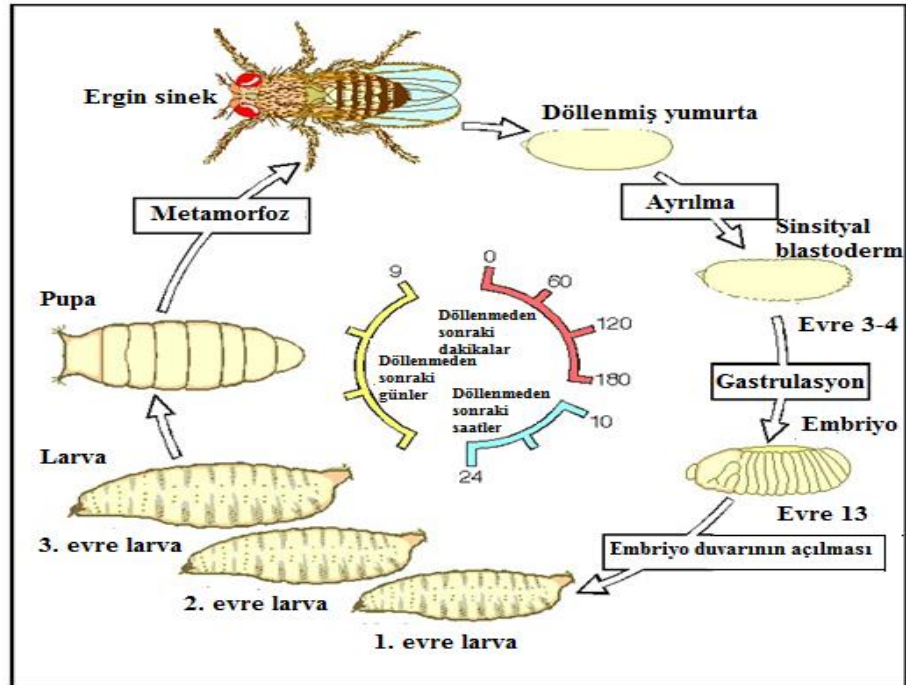
Familia (= Familya): Drosophilidae (= Sirke sinekleri- Meyve sinekleri). Çürümekte olan meyvelerin ve bazı tatlı sıvıların (meyve suyu, şarap, sirke, bira vs) kokusuna pozitif kemotaksi gösterirler. Ayrıca, bitki öz suları, dışkılar ve mantarlar içinde de gelişebilirler.

Genus (= Cins): *Drosophila*. Oldukça küçüktürler. Ev sineğinin 1/3'ü kadardırlar. *Drosophila* cinsi; görünüşlerinde, davranışlarında ve üreme ortamlarında farklılık gösteren yaklaşık 1 500 tür içerir. Renkleri soluk sarıdan kırmızı- kahverengiye ve hatta siyaha kadar değişir. Çoğu türünün kanatlarında belirgin siyah desenler vardır.

Species (= Tür): *Drosophila melanogaster*. Bu tür basit besin ihtiyacı, hızlı üreme özelliği, az sayıda ve büyük kromozomlara sahip oluşu, değişik ekolojik koşullara uyum gösterebilmesi ve küçük yapılu oluşu gibi avantajları nedeniyle genetik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir organizmadır.

3.1.3. *Drosophila*'nın hayat döngüsü

Drosophila'da tam başkalaşım (holometabol) görülmektedir ve *Drosophila* ergin olmadan önce, döllenmiş yumurtadan başlayarak şu evreleri geçirir: Embriyo, üç larva evresi ve pupa. Döllenmeden yaklaşık 22- 24 saat sonra yumurtadan larva (1. larva evresi) çıkar. İki deri değişiminden sonra (2. ve 3. larva evreleri) önce prepupa daha sonra pupa meydana gelir. Yumurtadan ergin bireyin oluşması için geçen süre, yaklaşık 9- 10 gündür (Anonymous b 2012) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü

Drosophila melanogaster'in hayat döngüsü ve ömür uzunluğu sıcaklık (Sorensen and Loeschcke 2002; Sinclair and Roberts 2005; Ayar *et al.* 2009, 2012), beslenme (David *et al.* 1975; Fred and Timothy 1997; Aşkın *et al.* 2007; Uysal *et al.* 2009), populasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon (Clark and Rockstein 1964; Ünlü and Bozcuk 1979; Dalgıç 2003) ve nem gibi faktörler tarafından farklı şekilde etkilenmektedir.

3.1.4. *Drosophila* mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı

Bu çalışmada, *Drosophila*'nın iki mutant ve normal metabolik aktiviteye sahip *multiple wing hair* (*mwh*) ve *flare*³ (*flr*³; *flr*³/*In* (3*LR*) *TM3* *Bd*^s) hatları kullanılmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip hatlar (normal metabolik aktiviteye sahip hatların yanı sıra yüksek metabolik aktiviteye sahip hatlarda bulunmaktadır) Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiş ve bölümümüz Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda standart Lewis besin ortamında (Lewis and Bacher 1968), *Drosophila* için ideal yaşama koşullarında (25°C ve %60 bağıl nem) kültüre alınmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip *multiple wing hair* ve *flare*³ hatlarının genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley and Zimm 1992).

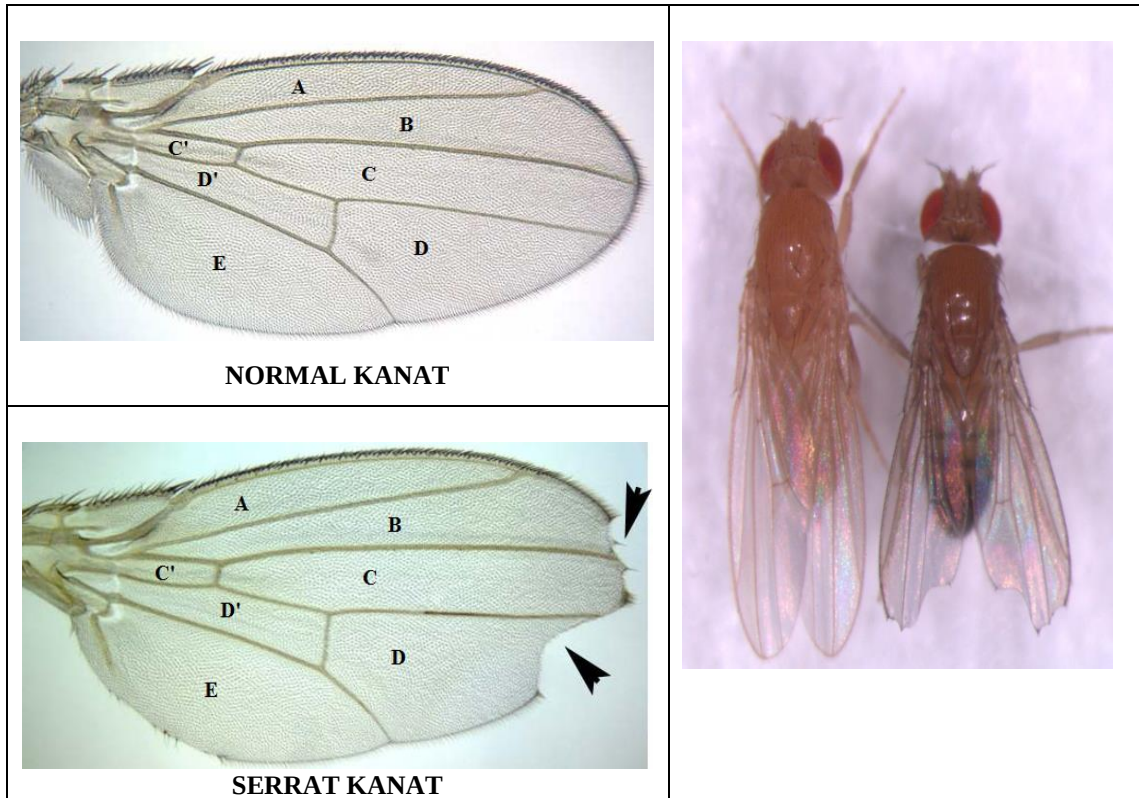
- *Multiple wing hair* (*mwh/mwh*)
- *Flare*³ (*flr*³/*In* (3*LR*) *TM3*, *ri p^p sep I* (3) 89*Aa bx*^{34s} *e*^S). Bu soy genotipik olarak kısaca *flr*³/*TM3*, *Bd*^s şeklinde de gösterilmektedir.

Belirleyici (marker) genlerden çoklu kanat kılı (*multiple wing hair*) geni üçüncü kromozomun telomere yakın bölümünde bulunur (3- 0,3). Bu gen resesiftir ve homozigot durumda (*mwh/mwh*), hücre başına bir kanat trikomu (kılı) yerine çoklu kanat trikomlarının oluşumuna yani aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda kanat trikomunun çıkmasına neden olmaktadır (Würgler and Vogel 1986; Graf *et al.* 1996).

Diğer belirleyici gen olan *flare*³ (*flr*³) geni, yine üçüncü kromozom kolunda, fakat sentromere daha yakın (3- 38,8) olarak yer alır. Bu gen sinek kanatlarındaki normal düz ve uzun kıllar yerine, körelmiş nokta şeklinde, koyu renkli balon şeklinde kıllar veya

kısalmış, kalın ve amorfik kıllar oluşturmaktadır (Graf *et al.*1984). *Flare*³ geni homozigot durumda embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Letalite sebebiyle de ergin bireyler oluşamamaktadır. *Flare*³ genine ait bilinen üç mutant allelin hepsi homozigot durumda letalite gösterir. Fakat heterozigot bir bireyin kanat imajinal disklerinden mutant kanat hücreleri gelişir. Hem bireyleri *flare*³ geninin embriyonik letal etkisinden korumak hem de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici *TM3* kromozomu (*flr*³/*TM3*, *Bd*^s) kullanılmaktadır (Graf *et al.*1998).

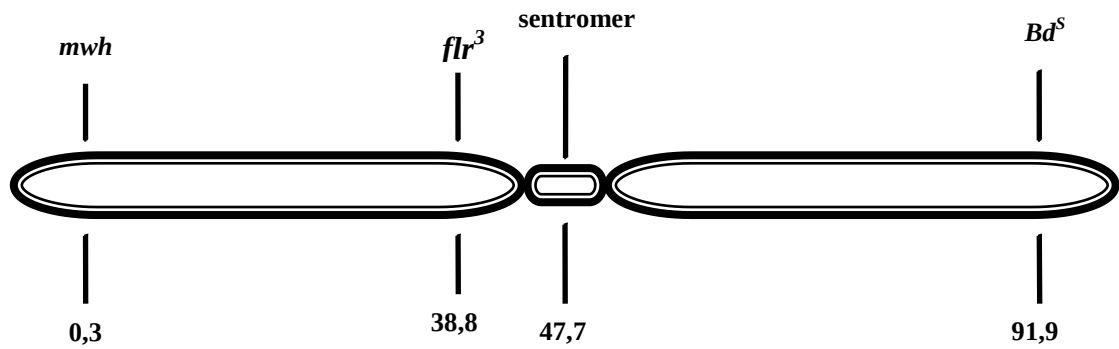
Dominant bir gen olan *Bd*^s geni (beaded–serrat) de belirleyici genlerden birisidir ve homozigot halde iken letal etki gösterir. Normal bireylerde kanatlar düzgün kenarlı iken, *Bd*^s genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklindedir (Graf and Würgler 1996) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Dengeleyici kromozomu taşımayan normal ve dengeleyici kromozomu taşıyan serrat bireylerin fenotipleri

Bd^S geni, dengeleyici kromozom ($TM3$) üzerinde bulunmaktadır. Dengeleyici kromozom letal etkisinden kurtulmak istenilen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde yer almaktadır. Bu kromozom sayesinde, embriyonik evrede homozigot durumda letal etki gösteren genler baskılanmaktadır (Lindsley and Zimm 1992).

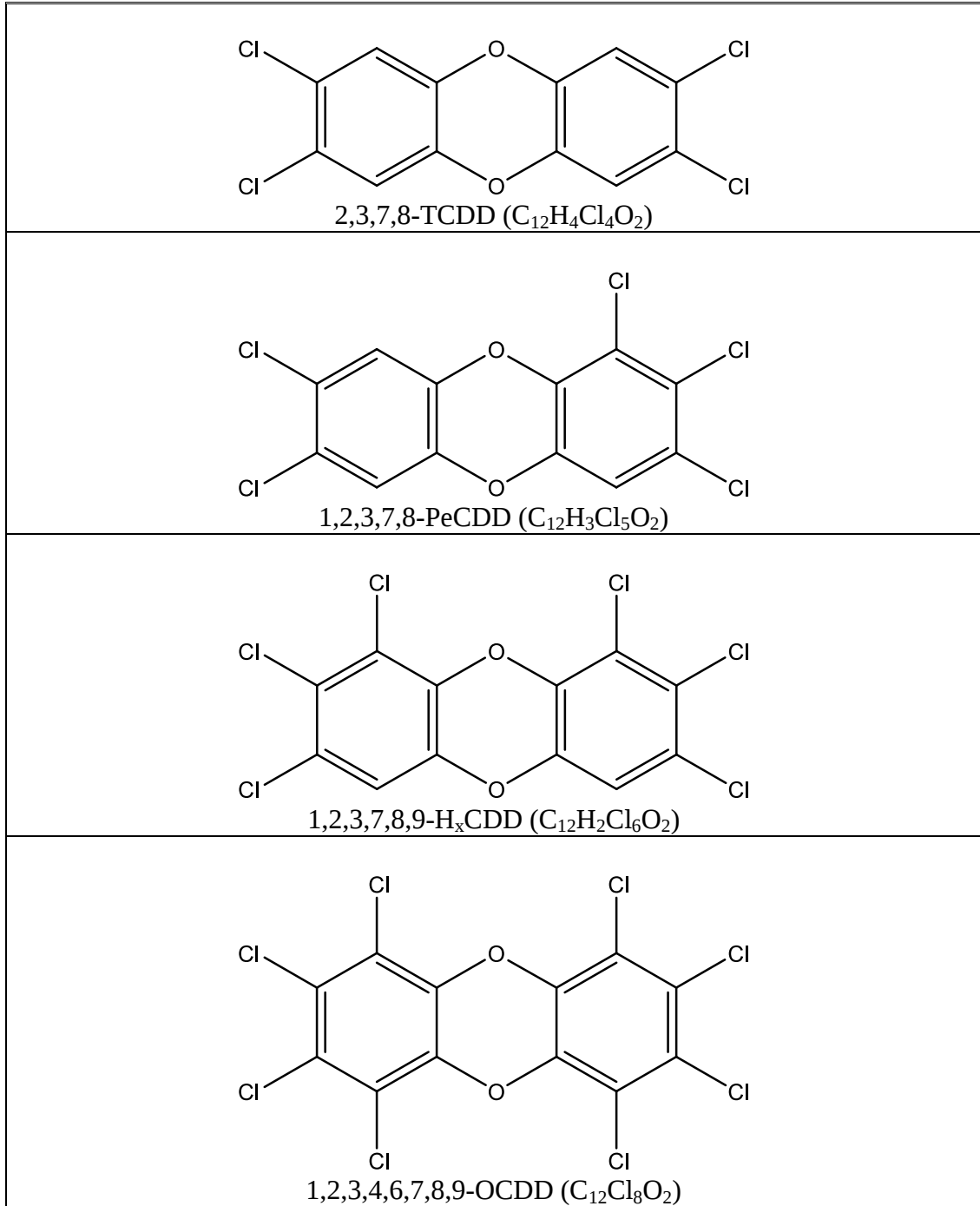
Çalışmada kullanılan mwh , flr^3 ve Bd^S belirleyici genleri, *Drosophila*'nın üçüncü kromozomu üzerinde bulunmaktadır (Graf *et al.* 1984) (Şekil 3.3) ve bu genler arasındaki mesafenin uzak olması rekombinasyon ve mutasyonların büyük aralıkta incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır (Kaya *et al.* 2000b).



Şekil 3.3. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki dizilişleri

3.1.5. Deneylerimizde kullanılan dioksinlerin seçimi ve temini

75 konjeneri bulunan poliklorlu dibenzo-*p*-dioksin (PCDD) bileşiklerinin tamamının araştırmamızda kullanılması mümkün olamayacağından, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından insan ve çevre sağlığı için bir risk grubu oluşturması, klor atom sayıları bakımından toksikolojik önem taşıması, canlılarda birikiminin fazla ve yarılanma ömürlerinin uzun olması gibi bazı kritik nitelikler göz önünde bulundurularak, konjenerler arasından dört tanesi bu çalışma için seçilmiş ve kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PCDD bileşiklerinin açık formülleri ve kimyasal yapıları Şekil 3.4'de verilmiştir.



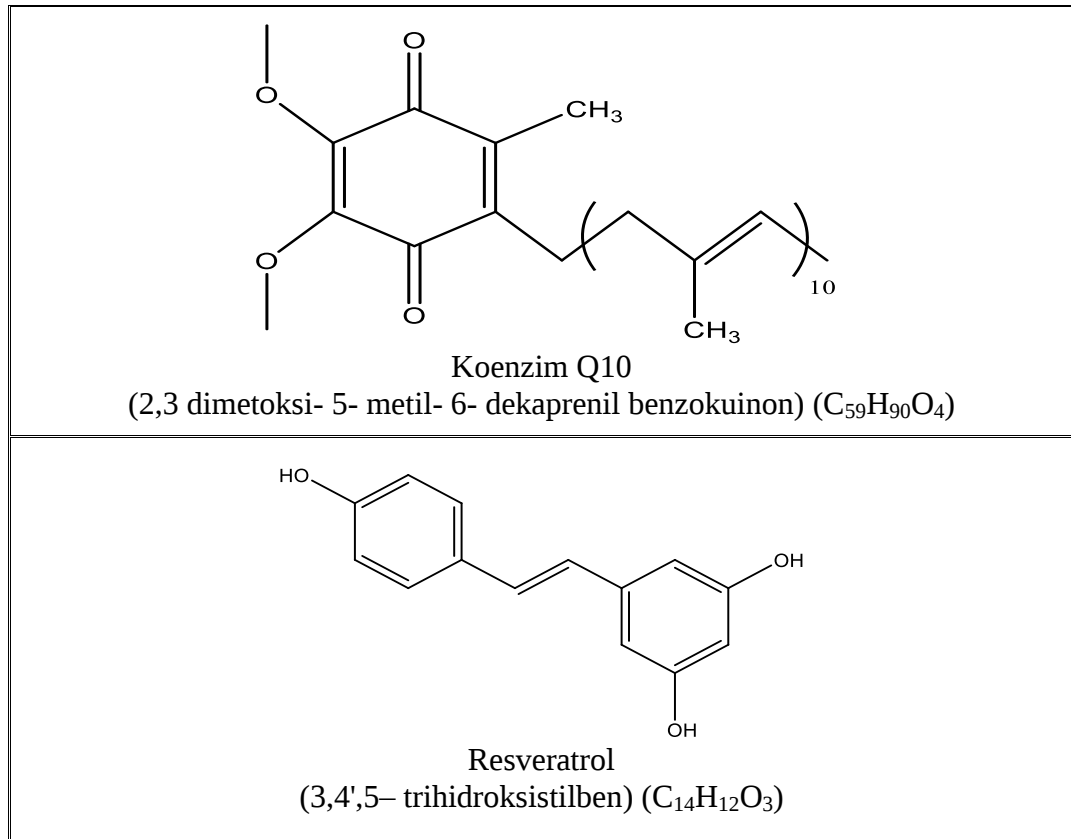
Şekil 3.4. PCCD bileşiklerinin açık formülleri ve kimyasal yapıları

Bu çalışma için seçilen 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin- Accu Standard 1746-01-6), 1,2,3,7,8-PeCDD (1,2,3,7,8-Pentaklorodibenzo-*p*-dioksin- Accu Standard 40321-76-4), 1,2,3,7,8,9-H_xCDD (1,2,3,7,8,9-Hekzaklorodibenzo-*p*-dioksin- Accu Standard 19408-74-3) ve 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD (1,2,3,4,6,7,8,9-

Oktaklorodibenzo-*p*-dioksin- Accu Standard 3268-87-9) maddeleri ticari ambalajlarında Amerika Birleşik Devletleri’den temin edilmiştir.

3.1.6. Deneylerimizde kullanılan antioksidanların seçimi ve temini

Bu çalışma için, dioksinlerin olası toksik etkileri üzerine serbest radikalleri temizleyerek lipid peroksidasyonunu önlemede çok etkili olan ve bu nedenle son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılan Koenzim Q10 (2,3 dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil benzokuinon MP Biomedicals- 303- 98- 0) ve Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben MP Biomedicals- 501- 36- 0) antioksidanları seçilmiştir. Koenzim Q10 ve Resveratrol bileşiklerine ait açık formüller ve kimyasal yapılar Şekil 3.5’de verilmiştir. Bu çalışmada koruyucu etkilerinin araştırılması amacıyla seçilen bu antioksidan maddeler ticari ambalajlarında Fransa’dan temin edilmiştir.



Şekil 3.5. KoenzimQ10 ve Resveratrol bileşiklerinin açık formülleri ve kimyasal yapıları

3.1.7. Deneylerimizde kullanılan diğer kimyasal maddeler

Deneylerimiz süresince dioksinler ve antioksidanların dışında farklı kimyasal maddeler de kullanılmıştır. Bu maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal madde	Firma adı
Argon (%99,99)	Habaş
Dimetil sülfoksit	Sigma 67-68-5
<i>Drosophila</i> Instant Medium	Carolina Biological Supply Company, Formula 4-24
Entellan	Merck 3822 00 00
Etil metan sülfonat	Sigma 52-50-0
Hidrojen peroksit (%35)	Merck 1.08600
NaH ₂ PO ₄ Monosodyum fosfat	Sigma-Aldrich 7558-80-7
K ₂ HPO ₄ Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 4873
Na ₂ HPO ₄ Sodyum dihidrojen fosfat	Sigma-Aldrich 7558-79-4
Sodyum hidroksit	Sigma S-0899
Sodyum klorür	Merck 1.06404.1000

3.2. Yöntem

3.2.1. Genotoksisite testleri ile ilgili çalışmalar

Genetik toksisite ya da kısaca genotoksisite testleri 1970’lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir vd 2004). Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşur (Choy 2001). *İn vivo* ve *in vitro* genotoksisite testlerinde, üreme hücrelerindeki veya somatik hücrelerdeki mutasyonlar temel alınmaktadır. Böylece gelecek nesillerde çeşitli kalıtsal hastalıkları oluşturan, üreme yeteneğini etkileyen ya da somatik mutasyonlar ile karsinojenik etkili olan mutasyonlar belirlenebilmektedir. Genotoksisite testleri yalnızca

genotoksik ajanları ve onların etki mekanizmalarını belirlemez aynı zamanda antigenotoksik ajanların ve bu ajanların antigenotoksisite mekanizmalarını belirlemek amacıyla da yapılmaktadır (Vural 2005).

Çok sayıda test olmasına rağmen genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan testler arasında *Salmonella thyhimurium* mutant suşlarının kullanıldığı bakteriyel ames testi, kromozomal aberasyon (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) frekanslarının araştırıldığı sitogenetik testler, alkali ortamda DNA elektroforezinin yapıldığı tek hücre jel elektroforezi (SCGE) testi ile dominant letalite, resesif letalite, halkasal X kromozom kaybı, bitişik X kromozomu ve somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testlerini içeren çeşitli *Drosophila* testleri bulunmaktadır.

In vivo bir test yöntemi olan *Drosophila* kanat benek testi ya da diğer adıyla kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, kompleks karışımların ve çeşitli maddelerin genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerini belirlemek için son yıllarda sıkça kullanılan güvenli ve çok yönlü bir testtir (Idaomar *et al.* 2002; Fragiorge *et al.* 2007). Sunulan bu çalışmada bazı dioksinlerin *D.melanogaster* üzerine genotoksik etkisi de *Drosophila* kanat benek testi ile araştırılmıştır.

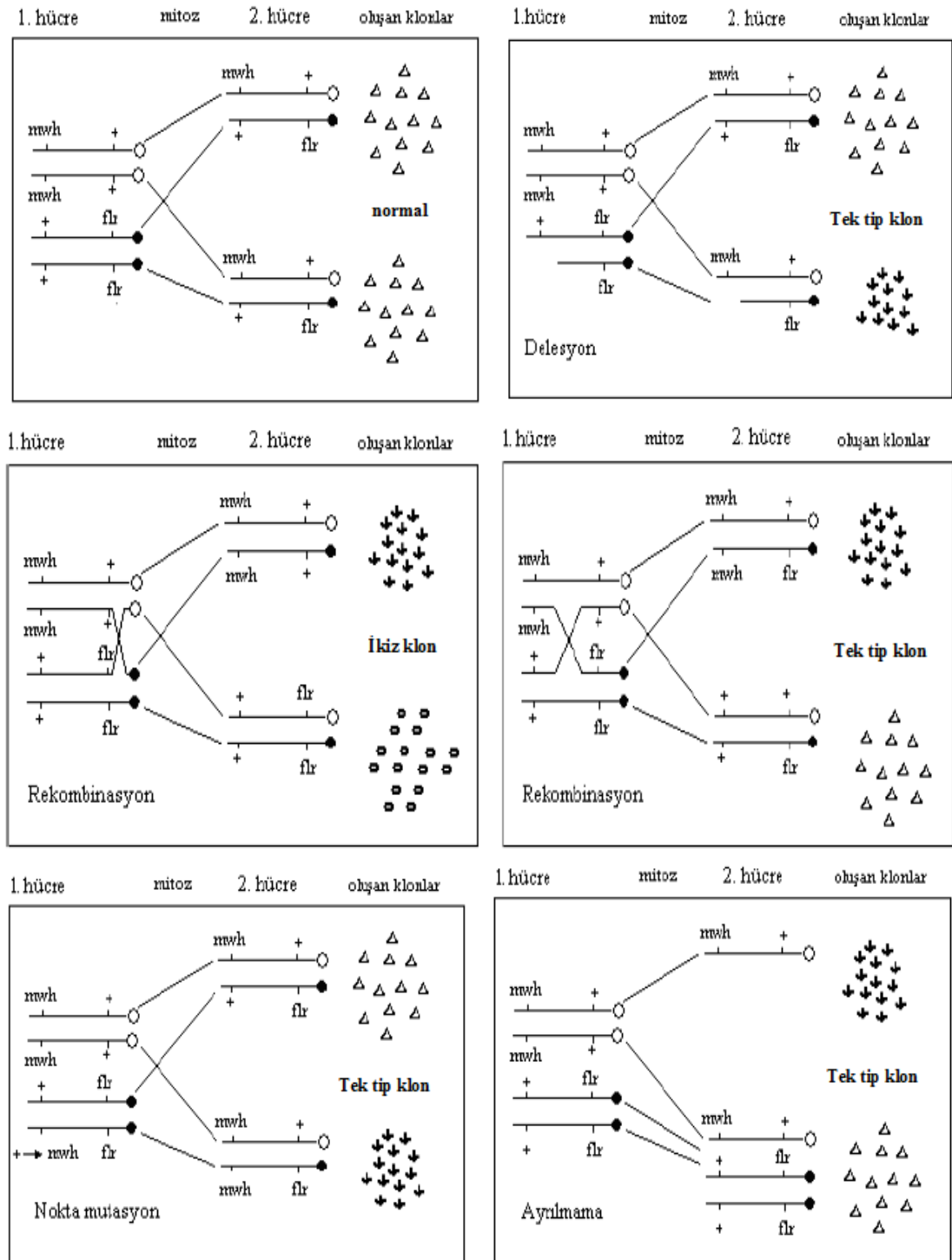
3.2.1.a. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere iki çeşittir. Çalışmada kullanılan kanat benek testi, göz benek testi gibi temel olarak, heterozigotik kayıptan temel alan ve transheterozigot larvalarda delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve rekombinasyon ile kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin fenotipte gözlenmesi esasına dayanmaktadır (Graf *et al.* 1984, 1996). Bu tür genetik değişimlerin fenotipte gözlenebilmesi için *Drosophila melanogaster*'de kanat trikomlarının fenotipini belirleyen *mwh* (*multiple wing hair*) ve *flr*³ (*flare*³) genleri belirleyici (marker) gen olarak kullanılmıştır. Bu belirleyici genleri taşıyan *Drosophila* hatları kullanılarak yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon

testi (SMART), üreme hücrelerindeki mutasyonları belirlemek için kullanılan testlerle karşılaştırıldığı zaman çok sayıda avantaj sunmaktadır (Graf and Würdler 1996). Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir: Bu test sistemi için sadece bir nesil yeterlidir. Bu amaçla kullanılan kanat ve gözlerdeki genetik işaretleri fark etmek oldukça kolaydır ve tek bir bireyde çok sayıda hücrenin analizine olanak sağlamaktadır. Çalışma süresi kısa olup oldukça ekonomiktir ve yapılan çok sayıdaki çalışma ile güvenilirliği kanıtlanmıştır. Bu testlerle nokta mutasyon, delesyonlar, kromozom bozuklukları ve mitotik rekombinasyonlar belirlenebilmektedir (Graf and Würdler 1996).

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde, heterozigotluğun herhangi bir mutasyonla kaybedilmesi yöntemiyle yabancı fenotip yerine mutant fenotip ortaya çıkarılmaktadır (Graf *et al.* 1984; Guzmán-Rincón and Graf 1995). Mutant fenotip, mutant hücre klonlarındaki farklı benek gruplarına göre belirlenmektedir. Tek tip klon (tekli benekler) *mwh* veya *flr³* fenotipinde iken, ikiz klon (ikili benekler) *mwh* ve *flr³* fenotiplerini birlikte taşımaktadır. Tek tip klonda 1-2 hücreli olanlar küçük tek tip klon, 3 veya daha fazla sayıda klon taşıyanlar ise büyük tek tip klon olarak iki gruba ayrılmaktadır (Henderson 2004).

Hem tek tip, hem de ikiz klonların (beneklerin) oluşumu farklı genetik mekanizmalara bağlıdır (Graf *et al.* 1984) (Şekil 3.6). Delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve iki işaret geni olan *mwh* ve *flr³* arasındaki mitotik rekombinasyon tek tip klonların oluşumunu tetiklerken; mitotik rekombinasyon hem tek tip klon hem de ikiz klonların oluşumuna sebep olmaktadır. İkiz klonlar ise 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Kaya *et al.* 2004). Serrat kanatlı (*mwh/TM3*) bireylerde TM3 kromozomunun baskılanmasından dolayı mitotik crossing over gerçekleşmemektedir (Frei and Würdler 1996).



Şekil 3.6. Farklı tip mutasyonların oluşumuna neden olan genetik mekanizmalar

3.2.1.b. *Drosophila* hatlarının kültürü

Çalışmada kullanılan tüm hatlar Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Hatlar bölümümüzde bulunan Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uygun sıcaklık kabinlerinde ($25\pm1^{\circ}\text{C}$), 200mL hacimdeki cam şişelerde Standart *Drosophila* Besini (SDB) ile kültüre alınmıştır. Standart besin ortamı aşağıdaki gibi hazırlanır;

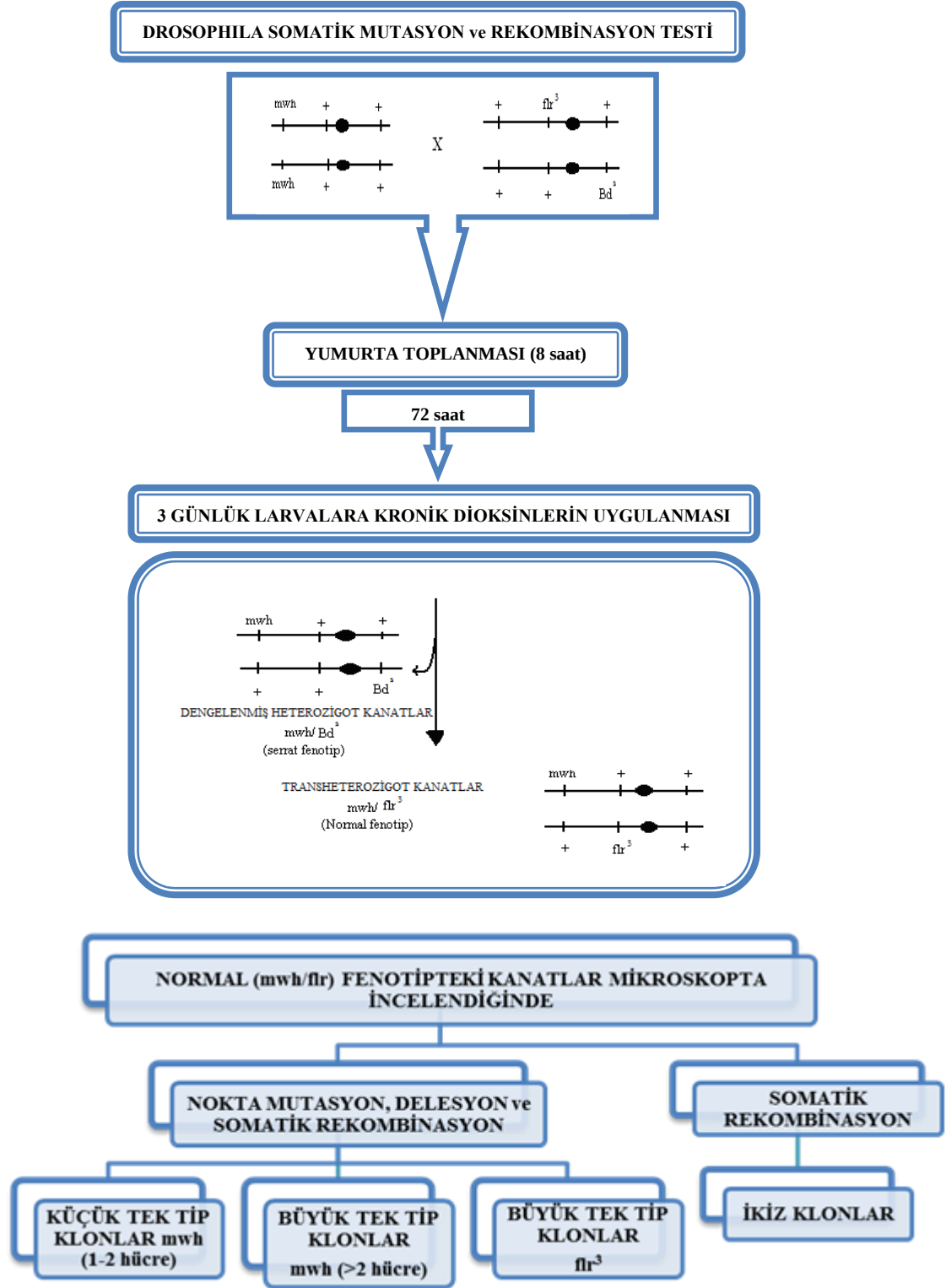
Gereken Malzemeler: 9g agar, 60g toz şeker, 19g bira mayası, 50g mısır unu, 565cc saf su ve 3- 3,5cc propionik asit. 440cc saf su temiz bir beherde kaynatılır. Kaynamaya başlayan saf suya önce 9g agar daha sonra 60g şeker ilave edilip bir cam baget yardımıyla iyice karıştırılır. Bir başka beher içinde 125cc saf suda 50g mısır unu ve 19g bira mayası ezilir. Karıştırılarak ezilen bu karışım kaynayan şeker-agar karışımına ilave edilerek karıştırmaya devam edilir. Karışım kaynamaya başladıktan sonra karıştırma işlemine 15dk daha kısık ateşte devam edilmelidir. Bu safhada karışımın kıvamına dikkat etmek gerekir. Eğer karışım çok sıvı olursa besi ortamı soğuduğu zaman çok katılaşmayacak ve sinekler besi ortamına yapışacaktır. Karışım çok katılaşrsa hem şişelere doldurmak hem de sineklerin beslenmesi güçleşecektir. Bu durumlar göz önüne alınarak hazırlanan besi ortamı ateşten indirilir. Karışım biraz soğuduktan sonra 3- 3,5cc propionik asit (küf inhibitörü olarak kullanılır) ilave edilip hazırlanan besi ortamı daha fazla soğumadan temiz ve steril cam şişelere eşit miktarda (yaklaşık iki parmak yüksekliğinde) dökülür. Besin ortamının kültür şişelerinin ağzına ve kenarlarına bulaşmayacak şekilde konulmasına dikkat edilmelidir. Şişelerin ağzına bir filtre kağıdı kapatılarak bir gün oda sıcaklığında bekletilir (kontaminasyonu engellemek için şişelerin ağızlarının açılmamasına ve şişenin kenarında birikecek su buharının tümüyle çekilmiş olmasına dikkat etmek gerekir). Ertesi gün etrafı tülbentle sarılmış olan steril pamuk tıkaçlar ile kültür şişelerinin ağızları kapatılarak buzdolabında saklanır.

3.2.1.c. Çaprazlama için birey temini ve seçimi

Deneylerimizde kullandığımız larvaların elde edilmesi için, *flare*³ dişiler 4'er saat aralıklarla virgin iken toplanmış ve yeni bir besin ortamına alınmıştır. Yeterince virgin dişi birey toplandıktan sonra uygulamaların yapılacağı transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* erkek, 40 *flr*³diři olacak şekilde çaprazlama yapılmıştır. Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi bireyler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakılmıştır. Uygulama yapılacak olan larvaların aynı evrede olabilmesi için oogenezi gerçekleşmiş olan bireylerin 8 saat boyunca yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanılmıştır.

Çalışmalarda kurulan standart çaprazlarda *flr*³/*TM3*, *Bd*^S hattının dişi bireyleri yüksek yumurta verimi dolayısıyla tercih edilmiştir. Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama şekil 3.7'de gösterilmiştir (Graf *et al.* 1984).

P: ♂♂ *mwh/mwh* x ♀♀ *flr³/TM3, Bd^S*



Şekil 3.7. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi

3.2.1.d. Deney gruplarına uygulanan dioksin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Çalışmanın ilk basamağında, genotoksik etkileri test edilecek olan dört farklı dioksinin (2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin, 1,2,3,7,8- Pentaklorodibenzo-*p*-dioksin, 1,2,3,7,8,9- Hekzaklorodibenzo-*p*-dioksin ve 1,2,3,4,6,7,8,9- Oktaklorodibenzo-*p*-dioksin) her birinin dört farklı derişiminin çalışılması amaçlanmıştır. Dioksinlerin etkin derişim aralıklarının belirlenmesi aşamasında öncelikle genotoksikolojik etkilerin geniş bir spektrumda incelenmesi için daha önceki çalışmalarda kullanılan konsantrasyon aralıklarından yararlanılmıştır. Seçilen dioksinlerin *D. melanogaster* larvaları üzerine LD₅₀ dozunu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (5×10^{-7} , 10×10^{-7} , 15×10^{-7} , 20×10^{-7} , 30×10^{-7} , 40×10^{-7} , 50×10^{-7} ve 100×10^{-7} µg/mL; 5×10^{-5} , 10×10^{-5} , 15×10^{-5} , 20×10^{-5} , 30×10^{-5} , 40×10^{-5} ve 50×10^{-5} µg/mL; 5×10^{-2} , 10×10^{-2} , 15×10^{-2} , 20×10^{-2} , 30×10^{-2} , 40×10^{-2} ve 50×10^{-2} µg/mL; 10×10^{-1} , 15×10^{-1} , 20×10^{-1} , 50×10^{-1} , 10, 15 ve 20 µg/mL) 24 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Deneyler sonucunda tüm dioksin grupları için ortak LD₅₀ dozu 15×10^{-7} µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarda uygulanan konsantrasyonlar, her bir dioksin için LD₅₀ dozundan daha düşük olan 1×10^{-7} ; $2,5 \times 10^{-7}$; 5×10^{-7} ve 10×10^{-7} µg/mL olarak belirlenmiştir.

3.2.1.e. Deney gruplarına dioksinlerin uygulanması

Bu çalışmada etkileri test edilecek olan dört dioksin için dört derişim (1×10^{-7} ; $2,5 \times 10^{-7}$; 5×10^{-7} ve 10×10^{-7} µg/mL) çalışılmıştır. Sekiz saat süresince çiftleştirilen ebeveynlerin bıraktığı döllenmiş yumurtalardan çıkan bireyler, üçüncü larva evresine eriştiğinde, musluk suyu altında yıkanmış ve elekten geçirilerek ayrılmıştır. 72 ± 4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan cam tüpler içerisine yaklaşık 1,5g kadar hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) konulmuş ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanarak dioksinlerin 5mL'si ile nemlendirilmiştir. Toplanan larvalar her bir cam tüp içerisine 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konularak uygulama ortamına alınmıştır. Larvaların uygulama ortamına konulmasından sonra tüplerin ağızları tıkaçlarla kapatılmıştır. Deney grupları sıcaklık kabinlerine konularak larvalar kronik olarak 48 saat boyunca dioksinlere maruz bırakılmıştır. Çalışmalarda kullanılan

dioksinlerin çözücüsü olan toluen, inert bir gaz olan argon ile uzaklaştırıldıktan sonra istenilen dioksin konsantrasyonları %1'lik DMSO ile hazırlanmıştır.

3.2.1.f. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Farklı dioksinlere maruz bırakılan larvalardan, pupa evresini takiben çıkan ergin bireyler günlük olarak eterle bayıltılarak toplanmış ve kanat preparatlarını hazırlamak için bu bireyler %70'lik etil alkole konularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (transheterozigot *mwh/flr³*) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3, Bd^s*) olarak iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr³*) olan kanatlar, hem mutasyon, hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın, serrat (*mwh/TM3*) kanatlar, dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan *et al.* 1994). Bu nedenle, her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilmiştir.

Sonuçların güvenilirliği için gerçek mutant klonların olası varyasyonlardan ayrılması gerekmektedir. Bu sebeple, daha önce yapılan çalışmalarda *flare³* klonlar için dörtten daha az sayıda gözlenen sadece *flare³* fenotipteki trikomların oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle olduğu, bu yüzden *flare³* fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücreler sayıma dahil edilmiştir (Szabad *et al.* 1983). Diğer bir belirleyici gen olan *mwh* (*multiple wing hair*, 3- 0,3) geni, kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla çıkması şeklinde kendini göstermektedir.

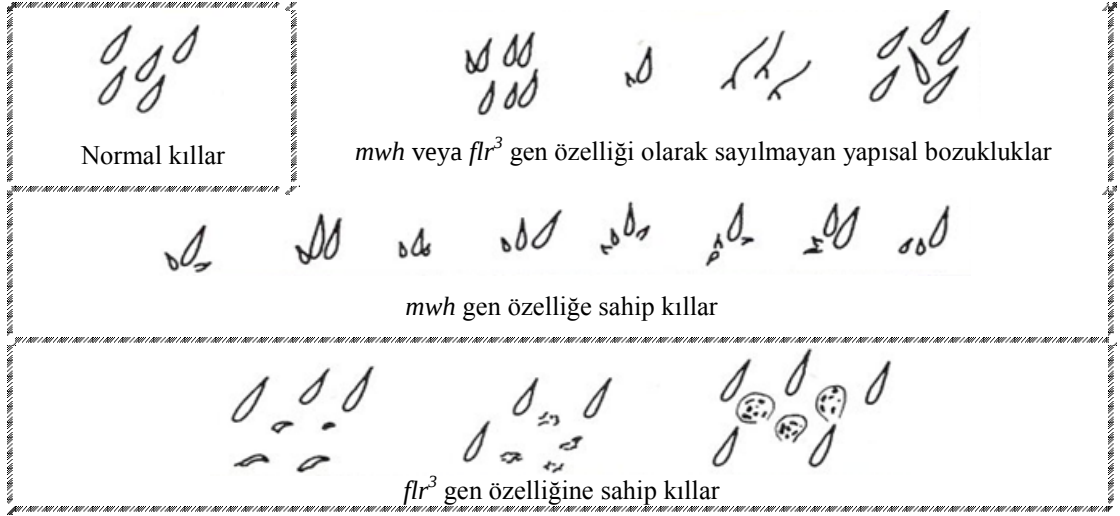
Kanat preparatlarını hazırlamak için Negishi *et al.* (1988) ve Schaik and Graf (1991)'ın çalışmalarında kullandıkları Faure solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyonun içeriği 30g

Gum Arabic, 20mL Gliserol, 50g Kloral hidrat ve 50mL distile su şeklindedir. Kanat preparatları hazırlanırken çukur lam üzerine faure solüsyonundan 1-2 damla konulmuştur. Distile suya alınmış olan her bir sinek, faure solüsyonu damlatılmış çukur

lama alınmıştır. Kanatlar, binoküler mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatların vücuda bağlandığı yerden tutulmak suretiyle kanat üzerindeki kıllara ve kanada zarar verilmeyecek şekilde vücuttan özenle ayrılmıştır. Her bir bireyin kanadı ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (80 kanat) yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletilmiştir (Rizki *et al.* 2006; García-Quispes *et al.* 2009). Preparatlar kuruduktan sonra lamlara bir iki damla entellan damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24x60mm) ile kapatılmıştır. Kanatların düzgün bir şekilde kuruması için kapatılan preparatların üzerine 3- 4g ağırlığında metal vidalar konulmuştur. Birkaç saat bu şekilde bekletilen preparatlar ışık mikroskopunda sayım ve inceleme için hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, 1 saat sonra ksilen ile ıslatılmış tülbent yardımıyla dikkatlice silinerek ışık mikroskopunda kılların görülmesini engelleyen safsızlıklar temizlenmiştir. Preparatlar 3 gün süreyle bekletilerek kurumaları sağlanmıştır.

3.2.1.g. Kanat preparatlarının mikroskoptaki analizi

Hazırlanmış olan kanat preparatları 10x40 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Kanat üzerindeki sektörler, incelemede kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C', D, D' ve E olarak bölümlere ayrılmıştır. Bu sektörlerde yapılan incelemelerde, kanatların hem dorsal hem de ventral yüzündeki hücre tabakalarında mutant klonların oluşup oluşmadığı dikkate alınmıştır. Kanatlar mikroskopta incelenirken özellikle mikro vida kullanılarak her bir sektör ayrı ayrı taranmış *mwh* ve/veya *flr*³ mutant fenotipler sayılarak kaydedilmiştir. Kanatlarda görülen farklı tip kanat kılları (Graf *et al.* 1984) Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Kanatlardaki farklı tip kıllar

3.2.1.h. Klonların indüksiyon frekansının hesaplanması

Kronik uygulamada her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Eğer sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdaki "f" *mwh* klonlarının indüksiyonunun ortalama frekansını, "n" gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını, "N" analiz edilmiş olan kanat sayısını ve "C" bir kanat üzerindeki incelenilebilecek hücre sayısını göstermektedir.

3.2.1.i. Kanat benek testi sonuçlarının istatistiksel analizi

Farklı konsantrasyonlarda dioksinlerin uygulandığı *Drosophila melanogaster* larvalarından ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranlarının hesaplanmasında Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15,0 paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Kanat benek testi sonuçlarının

değerlendirilmesinde ise *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış bir bilgisayar programı olan Microsta kullanılmıştır. Orijinal (null) hipotezde (H_0) uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, alternatif hipotezde (H_a) ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılarak orijinal ve alternatif hipotezlerin Microsta kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; uygulama grubundaki (nt) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 , aynı şekilde, kontrol grubundaki (nc) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse bu kez H_a red edilmiştir. H_0 ve H_a 'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.2 kullanılarak sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Selby and Olsen 1981; Frei and Wügler 1988).

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		Ha (Alternatif)	
		KABUL($1 - \beta$)	RED(β)
Ho (Null)	KABUL ($1 - \alpha$)	ÖNEMSİZ FARK $P = (1 - \alpha)(1 - \beta) = 1 - \alpha - \beta + \alpha\beta$	NEGATİF $P = (1 - \alpha)\beta = \beta - \alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P = \alpha(1 - \beta) = \alpha - \alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P = \alpha\beta$

3.2.1.j. Mikrofotografi

Çalışmalarda, *D. melanogaster*'e ait ergin bireylerin farklı gelişim evrelerinde (larvadan ergine) gözlenen fenotipik anormalliklere ait fotoğraf çekimleri için Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Leica DM 3000, ergin bireylerin kanatlarından hazırlanan preparatlarda gözlenen küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonlara ait fotoğraf çekimleri için ise Leica M165C marka mikroskop kullanılmıştır.

3.2.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar

3.2.2.a. Deney gruplarına uygulanan dioksin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Çalışmanın ikinci aşamasında iki ayrı deney seti hazırlanmıştır. İlk deney setinde, detoksifikasyon sistemleri üzerine dioksinlerin olası toksik etkilerinin araştırılması amacıyla *D.melanogaster* larvalarına *Drosophila* kanat benek testinde her bir dioksin için en yüksek konsantrasyon olarak kullanılan $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu uygulanmıştır.

3.2.2.b. Deney gruplarına uygulanan antioksidan konsantrasyonlarının belirlenmesi

İkinci deney setinde ise, detoksifikasyon sistemleri üzerine muhtemel koruyucu etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan ve literatür bilgisi ışığında en etkili oldukları doz aralıkları belirlenen antioksidanlar arasından KoenzimQ10'un $150 \mu\text{g/mL}$ (Ishii *et al.* 2004) ve Resveratrol'ün $100 \mu\text{M}$ (Bass *et al.* 2007) konsantrasyonları kullanılmıştır.

3.2.2.c. Deney gruplarına dioksin ve antioksidanların birlikte uygulanması

Bu amaçla, *Drosophila* kanat benek testi uygulama gruplarında tüm dioksinler için kullandığımız en yüksek doz ($10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) göz önüne alınmıştır. KoenzimQ10 için $150 \mu\text{g/mL}$ ve Resveratrol için $100 \mu\text{M}$ olarak kullanılan dozlar, dioksinler ile birlikte ayrı ayrı olmak üzere besiyerlerine ilave edilmiştir. Uygulama gruplarında, kullanılan dioksinler ile antioksidanların belirlenen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak $1,5 \text{g}$ *Drosophila* Instant Medium'a $2,5 \text{mL}$ dioksin ve $2,5 \text{mL}$ antioksidan eklenmiştir. Böylece sıcaklığın ve nemin sabit olduğu etüvlerde tutulan tüm deney ve kontrol grupları 48 saat boyunca kronik olarak dioksin+antioksidan uygulamasına maruz bırakılmıştır.

3.2.2.d. Homojenizasyon ve santrifüjasyon

Enzim çalışmaları dioksin ve antioksidan maddeler için yapılmıştır. Her dioksinin toksik aktivitesini araştırmak amacıyla kullanılan dozlardan en yüksek doz ile antioksidan maddelerin antitoksik aktivitesini araştırmak amacıyla seçilen dozlar kullanılmıştır. Standart çaprazdan elde edilen 72 ± 4 saatlik larvaların dioksin ve dioksin+antioksidan içeren besiyerlerinde ergine gelişmeleri beklenilmiştir. Her uygulama grubunda ergine gelişebilen erkek bireyler pupadan çıktıkları ilk 2- 3 saat içerisinde toplanarak enzim çalışmalarında kullanılmak üzere derin dondurucuda (New Brunswick Scientific's Innova U725) -80°C 'de saklanmıştır (Doğan 2008).

Total oksidan kapasite, total antioksidan kapasite ve oksidatif stres indeksinin belirlenmesi için -80°C 'de saklanan bu ergin bireyler tartılarak 1/5 oranında fosfat tamponuyla (PBS= 2,8834g Na_2HPO_4 , 0,6g NaH_2PO_4 , 8,2g NaCl, pH:7) karıştırılarak, buz kabı içinde cam- teflon homojenizatörde (2 000rpm devirde) 10-15 vuruş ile, 30sn aralıklarla 2 kez homojenize edilmiştir. Homojenat eppendorf tüplerine alınarak, 0°C 'de 20 000rpm'de 10dk santrifüj (Hettich Micro220R) edilmiştir. Elde edilen süpernatant mikropipet yardımı ile temiz eppendorf tüplerine alındıktan sonra -80°C 'de enzim aktiviteleri ölçülünceye kadar saklanmıştır.

3.2.2.e. Enzim aktivite tayini

Çalışmalarda enzim kaynağı olarak Bölüm 3.2.2.d'de anlatıldığı gibi hazırlanan süpernatant kullanılarak enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür (Gözükara 1989).

3.2.2.f. Total oksidan aktivite tayini ve hesaplanması

Farklı oksidan türlerinin plazma konsantrasyonları, laboratuvarında ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Ancak bu ölçümler için zaman alıcı, yoğun emek gerektiren, karmaşık ve pahalı teknikleri kullanmak gerekebilir (Tarpey *et al.* 2004). Dolayısıyla

farklı oksidan moleküllerin ölçümünün ayrı ayrı yapılması pratik değildir ve bir numunenin oksidan etkileri katkılı olduğu için; onun toplam oksidan kapasitesi (TOS) için total peroksit (TP) (Halliwell *et al.* 2000; Harma *et al.* 2003; Yanik *et al.* 2004; Yeni *et al.* 2005), serum oksidasyon aktivitesi (SOA) (Nakamura *et al.* 1897), reaktif oksijen metabolitleri (ROM) (Ceylan *et al.* 2005) gibi benzer isimler kullanılmaktadır.

Ölçümü yapılacak numunede demir iyon şelatör kompleksini demir iyonuna okside eden oksidanlar bulunur. Reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan zenginleştirici moleküller ile oksidasyon reaksiyonu uzatılır. Asidik bir ortamda demir iyonu kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numune içinde mevcut toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Analiz hidrojen peroksit ile kalibre edilip alınan sonuçlar litre başına düşen mikromolar hidrojen peroksit (H_2O_2 $\mu\text{mol Equiv./L}$) cinsinden ifade edilir (Erel 2005).

Total oksidan aktivite tayini, Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostics) kullanılarak tam otomatik yöntemle ölçülmüştür. Kit içeriğinde bulunan Reaktif 1 (Test tamponu): 50mLx1, Reaktif 2 (Prokromojen solüsyonu): 10mLx1 ve Standart 2 Solüsyonu (Stok Stabilize Standart Solüsyon (SSSS)): 10mLx1 (800mM H_2O_2 Equiv./L) ile deiyonize su kullanılmıştır.

Tam otomatik yöntemle ölçüm için öncelikle günlük standart solüsyon hazırlanmıştır. Stok Stabilize Standart Solüsyon (SSSS) deiyonize su ile 40 000 kat sulandırılmıştır. 50 μL SSSS solüsyonuna 10mL deiyonize su ilave edilip vortekslenmiştir (İlk dilüsyon basamağı). Hazırlanan bu solüsyondan da 50 μL alınarak 10mL deioyonize su ilave edilerek vortekslenmiştir (İkinci dilüsyon basamağı). Böylece final konsantrasyonu 20 μM H_2O_2 olan solüsyon hazırlanmıştır.

Ölçümü yapılacak süpernatant numune içine 500 μL Reaktif 1 ve 75 μL hazırlanan standart solüsyondan eklenerek spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer) 530nm dalga boyunda ilk absorbans değeri okunmuştur. Daha sonra 25 μL Reaktif 2 eklenerek 10dk oda sıcaklığında ya da 5dk 37°C’de inkübe edilip

530nm dalga boyunda ikinci kez absorbans değeri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Numune Absorbansı} / \Delta \text{Standart 2 Absorbansı}) \times 20 \text{ (Standart 2 Değeri)}$$

Δ Numune Absorbansı = (Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin birinci absorbansı)

Δ Standart 2 Absorbansı = (Std 2'nin ikinci absorbansı - Std 2'nin birinci absorbansı)

Standart 2 Değeri = 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L

3.2.2.g. Total antioksidan kapasite tayini ve hesaplanması

Canlı organizmalarda normal metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu zararlı oksidatif reaksiyonlar, enzimatik ve nonenzimatik olan antioksidatif mekanizmalar ile giderilir (Young and Woodside 2001). Farklı antioksidanların kapasitelerinin ayrı ayrı ölçümü de zaman alıcıdır, yüksek maliyet ve yoğun emek gerektirir. Ayrı ayrı ölçümleri pratik olmayan farklı antioksidan moleküllerinin ölçümü için, bir numunenin total antioksidan kapasitesi ölçülerek total antioksidan kapasite (TAK) (Erel 2004a), total antioksidan aktivite (TAA) (Koracevic *et al.* 2001), toplam antioksidan gücü (TAG) (Benzie and Strain 1996), total antioksidan durumu (TAD) (Aycicek *et al.* 2006), total antioksidan cevabı (Erel 2004b) gibi benzer isimlerle adlandırılır.

Ölçümü yapılacak numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirger. 660nm dalga boyundaki absorpsiyon değişimi, numune içinde mevcut toplam antioksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan zenginleştirici moleküller ile oksidasyon reaksiyonu uzatılır. Asidik bir ortamda demir iyonu kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Analiz bir E vitamini analogu olan Trolox Equivalent olarak adlandırılan sabit bir antioksidan standart solüsyonu ile kalibre edilir.

Total antioksidan aktivitesi Total Antioxidant Status (TAS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostics) kullanılarak tam otomatik yöntemle ölçülmüştür. Kit içeriğinde bulunan Reaktif 1 (Test Tamponu): 50mLx1, Reaktif 2 (Renkli ABTS radikal solüsyonu): 10mLx1 ve Standart 2 (1,0mmol Trolox Equiv./L) Solüsyonu: 10mLx1 (800mM H₂O₂Equiv./L) ile deiyonize su kullanılmıştır.

Tam otomatik yöntemle ölçüm için öncelikle günlük standart solüsyon hazırlanmıştır. Ölçümü yapılacak süpernatant numune içine 500µL Reaktif 1 ve 30µL standart solüsyondan eklenerek spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer) 660nm dalga boyunda ilk absorbans değeri okunmuştur. Daha sonra 75µL Reaktif 2 eklenerek 10dk oda sıcaklığında inkübe edilip 660nm dalga boyunda ikinci kez absorbans değeri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Numune Absorbansı} / \Delta \text{Standart 2 Absorbansı})$$

Δ Numune Absorbansı = (Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin birinci absorbansı)

Δ Standart 2 Absorbansı = (Std 2'nin ikinci absorbansı - Std 2'nin birinci absorbansı)

3.2.2.h. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması

Oksidatif stres indeksi (OSI), oksidatif stres derecesinin bir indikatör parametresi olup, total oksidan aktivitenin (TOS) total antioksidan aktiviteye (TAS) bölünmesi ile hesaplanmıştır ve formülizasyonu aşağıdaki gibidir.

$$\text{OSI} = (\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) / (\text{TAS}, \text{mmol Trolox Equiv./L}) \times 100$$

3.2.2.i. Enzim aktivitesi çalışmalarında istatistiksel analiz

Enzim aktivitesi çalışmalarından elde edilen bulguların analizi için Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15,0 paket programı kullanılmıştır. Enzim aktivitelerinin

uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (ANOVA), deney gruplarının ikili karşılaştırmalarında ise Duncan oklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışma üç aşamalı olarak planlanmıştır. Öncelikle çalışmada poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinlerden 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD ve 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin *Drosophila melanogaster*'in (*mwh x flr*³) 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisine bakılmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda (1x10⁻⁷, 2,5x10⁻⁷, 5x10⁻⁷ ve 10x10⁻⁷ µg/mL) dioksin içeren besiyerlerinde yaşayabilen ergin bireylere ait kanatlar kullanılarak *Drosophila* kanat benek testi ile genotoksik aktivitenin varlığı/yokluğu incelenmiştir. Son olarak dioksinlerin genotoksik/toksik etkilerinin antioksidanlar ile giderilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla dioksin uygulama gruplarında oksidan enzim sistemlerine, dioksin+antioksidan uygulama gruplarında ise antioksidan sistemlerine ait biyokimyasal testler ve ölçümler yapılmıştır.

4.1. Dioksinlerin Transheterozigot Larvalarının Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Üzerine Etkileri

Çalışmada ilk olarak dioksinlerin embriyotoksik etkilerini (larvadan ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranı) araştırmak için; *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları dioksin içeren besiyerlerine alınmıştır. Tüm uygulama gruplarında (*mwh x flr*³) çaprazlamasından elde edilen 72±4 saatlik larvalardan ergine gelişebilen bireyler sayılarak hayatta kalış oranları hesaplanmıştır. Uygulama gruplarında larvalara ait yaşama yüzdelerinin dioksin konsantrasyonu arttıkça kontrol grubuna oranla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu durum dioksinlerin toksik etkilerinin konsantrasyon artışına paralel olarak arttığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Negatif kontrol gruplarında larvaların hayatta kalış oranı distile su için %98 ve dioksinler için çözücü olarak kullanılan DMSO'da %97 olarak bulunmuştur. Pozitif

kontrol grubu olan EMS grubunda ise larvadan ergine gelişebilme oranının negatif kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında %80'e düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Dioksinlerin *D. melanogaster*'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi üzerine etkisi

DENEY GRUPLARI			KONSANTRASYON	HAYATTA KALIŞ (%)*
Kontrol Grupları	Negatif	Distile su		98 ^a
		DMSO	%1	97 ^a
	Pozitif	EMS	1mM	80 ^d
Uygulama Grupları	2,3,7,8-TCDD		1x10 ⁻⁷ µg/mL	79 ^d
			2,5x10 ⁻⁷ µg/mL	77 ^d
			5x10 ⁻⁷ µg/mL	64 ^f
			10x10 ⁻⁷ µg/mL	51 ⁱ
	1,2,3,7,8-PeCDD		1x10 ⁻⁷ µg/mL	80 ^d
			2,5x10 ⁻⁷ µg/mL	79 ^d
			5x10 ⁻⁷ µg/mL	69 ^e
			10x10 ⁻⁷ µg/mL	55 ^h
	1,2,3,7,8,9-HxCDD		1x10 ⁻⁷ µg/mL	84 ^c
			2,5x10 ⁻⁷ µg/mL	83 ^c
			5x10 ⁻⁷ µg/mL	70 ^e
			10x10 ⁻⁷ µg/mL	57 ^h
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD		1x10 ⁻⁷ µg/mL	88 ^b
			2,5x10 ⁻⁷ µg/mL	85 ^c
			5x10 ⁻⁷ µg/mL	71 ^e
			10x10 ⁻⁷ µg/mL	60 ^g

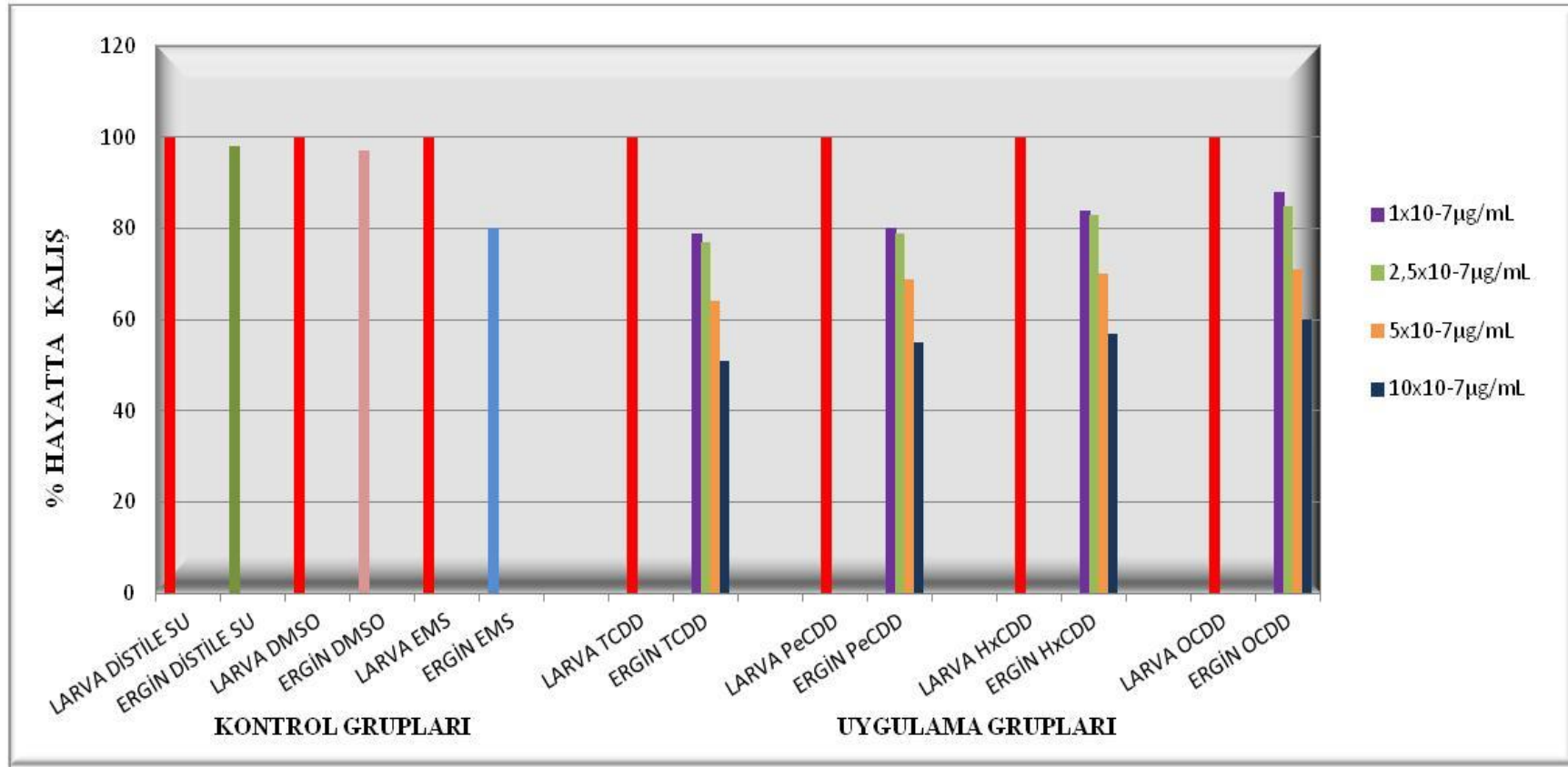
* Farklı harflerle gösterilen deney gruplarına ait değerler p<0,05 düzeyinde önemlidir.

Dioksin uygulama gruplarından elde edilen bulgulara göre, larvaların hayatta kalış oranının tüm dioksin uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. 2,3,7,8-TCDD uygulama grubunda larvaların ergine gelişebilme oranı, kullanılan en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru (1x10⁻⁷-

$10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) sırasıyla %79, %77, %64 ve %51; 1,2,3,7,8-PeCDD uygulama grubunda %80, %79, %69 ve %55; 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulama gruplarında %84, %83, %70 ve %57 ve 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulama grubunda ise %88, %85, %71 ve %60 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Dioksinlerin kullanıldığı hayatta kalış uygulamalarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etkinin arttığı ve larvadan ergine gelişebilen birey sayısının azaldığı yönünde negatif bir korelasyon görülmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirmelere göre, bu değerler TCDD uygulama grubu için $r = -0,962$, PeCDD uygulama grubu için $r = -0,948$, HxCDD uygulama grubu için $r = -0,923$ ve OCDD uygulama grubu için de $r = -0,900$ olarak bulunmuştur. r değerleri dikkate alındığı zaman, dioksinlerin toksisite bakımından sıralanması $\text{TCDD} > \text{PeCDD} > \text{HxCDD} > \text{OCDD}$ şeklindedir (Şekil 4.1).

Larval evreden itibaren tüm gelişim evrelerini farklı konsantrasyonlarda dioksin içeren besiyerinde geçiren bireylerde, larvadan pupaya, pupadan ergine gelişirken çeşitli malformasyonlar gözlenmiştir. Larva evresini ya da pupal evreyi tamamlayamayan bireyler özellikle yüksek konsantrasyonlardaki uygulama gruplarında görülmüştür (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Örneğin TCDD için en düşük uygulama grubunda ($1 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) 100 larvadan 79'u erginleşirken en yüksek uygulama grubunda ($10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) yalnızca 51 birey erginleşebilmiştir. PeCDD uygulama grubunda bu değerler 80- 55, HxCDD uygulama grubunda 84- 57 ve OCDD uygulama grubunda da 88- 60 şeklinde bulunmuştur (Çizelge 4.1). Larvadan ergine gelişebilen bireylerde ise toraks bölgesinde, kanat ve bacaklar gibi ekstremitelerde eksik gelişim ya da gelişemeyen yapılara rastlanılmıştır (Şekil 4.4, Şekil 4.6).



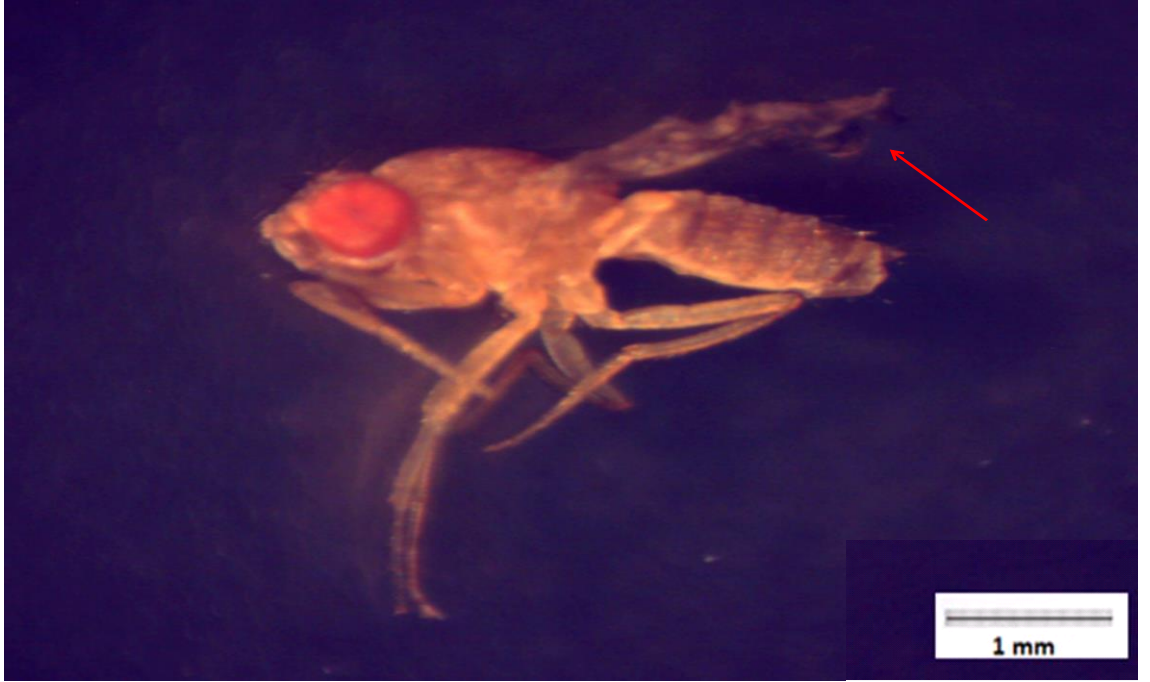
Şekil 4.1. Kontrol ve uygulama gruplarına ait transheterozigot larvalardan ergine gelişebilen birey yüzdeleri



Şekil 4.2. Yüksek konsantrasyonda PeCDD uygulaması ile ortaya çıkan larva anormalliği



Şekil 4.3. Yüksek konsantrasyonda TCDD uygulaması ile ortaya çıkan pupa anormalliği



Şekil 4.4. Yüksek konsantrasyonda OCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat anormalliği



Şekil 4.5. Yüksek konsantrasyonda HxCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat ve bacak anormalliği



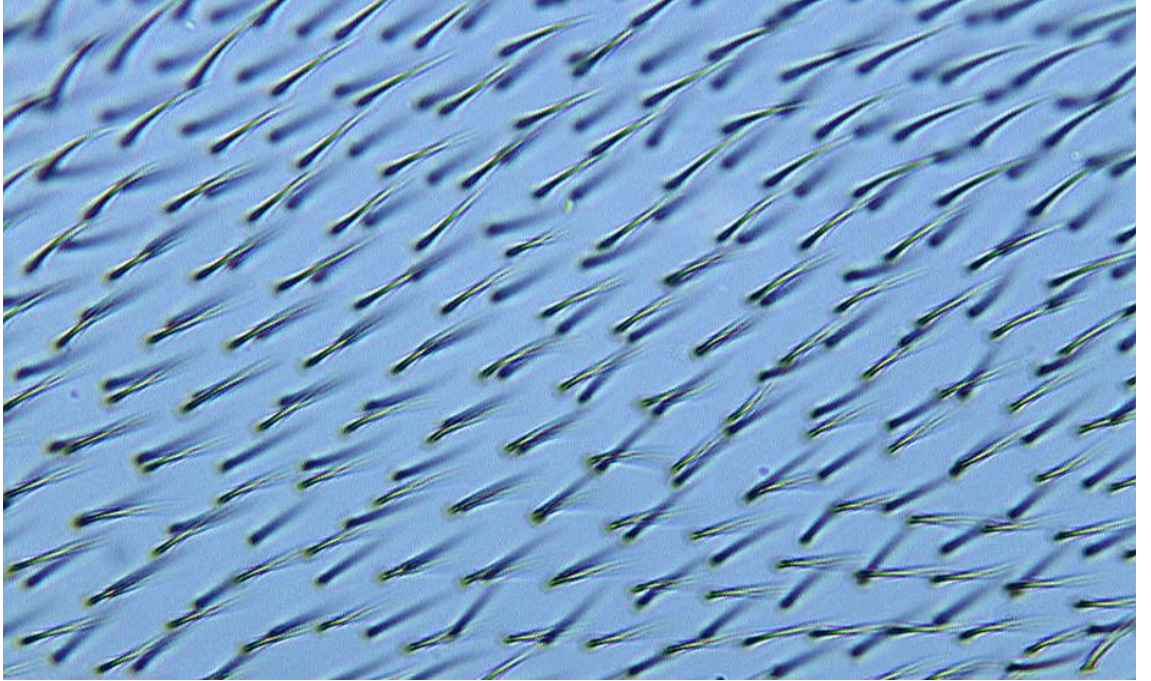
Şekil 4.6. Yüksek konsantrasyonda TCDD uygulaması ile ortaya çıkan kanat ve sola yığılmalı toraks anormalliği

4.2. Dioksinlerin Ergin Bireyler Üzerine Genotoksik Etkileri

Çalışmanın ikinci aşamasında *Drosophila* kanat benek testi ile dioksinlerin genotoksik etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılırken, dioksinlerin tümü için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldığından DMSO kontrol grubu da çalışmalara eklenmiştir. Pozitif kontrol grubu için de yine etil metil sülfonat (EMS) kullanılmıştır. Her bir uygulama grubu için transheterezigot larvalardan elde edilen ergin bireylerden seçilen 80 kanat, beneklerin varlığını araştırmak için, ışık mikroskopunda 400x büyütmeyle incelenmiştir. İncelemeler sırasında kanat benekleri istatistiki analizlerde kullanılmak üzere tekli benekler (*mwh* veya *flr*³ fenotipinde) ve ikili benekler (*mwh* ve *flr*³ fenotipinde) olmak üzere sınıflandırılarak kaydedilmiştir. Ayrıca tekli benekler de kendi aralarında küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek (3≤ hücreli) olmak üzere ayrılmıştır.

4.2.1. Distile su, DMSO ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması

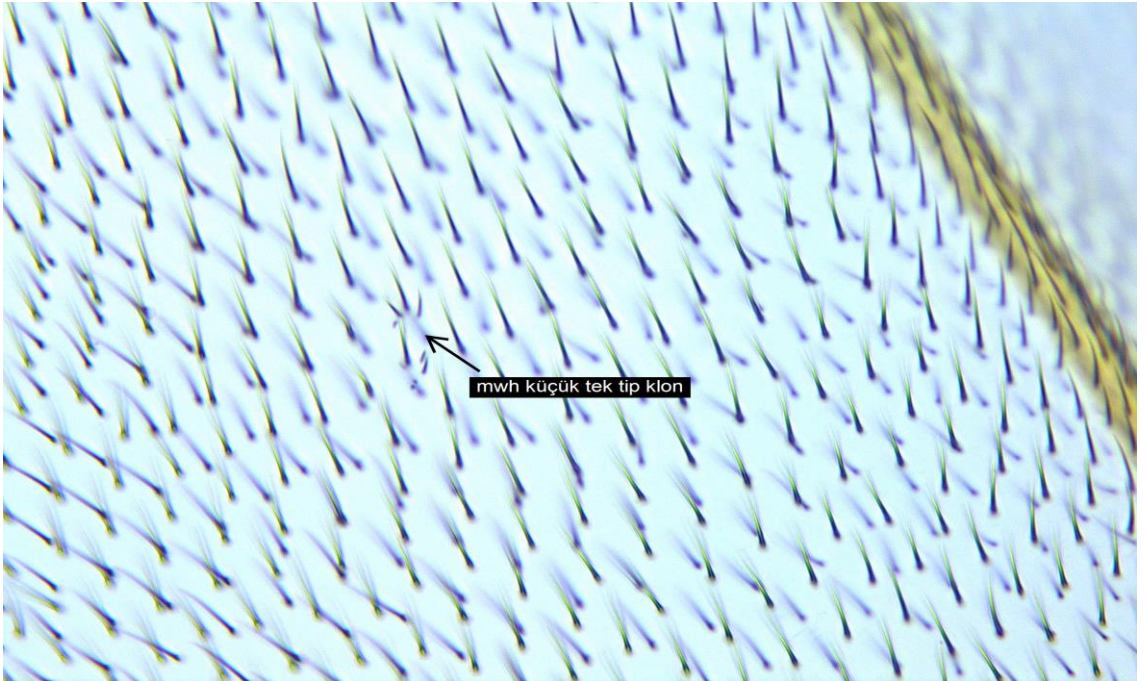
Çalışmalarda distile su ve DMSO negatif kontrol, mutajenik ve rekombinojenik aktiviteleri bilinen EMS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. F₁ neslinde elde edilen hem normal kanatlı hem de serrat kanatlı bireylere ait kanat preparatları hazırlanarak mikroskopik analizleri yapılmıştır. Preparatların incelenmesinde kolaylık olması açısından, kanatlar A, B, C, C¹, D, D¹, E olmak üzere sektörlere ayrılmıştır. Her bir sektör ayrı ayrı taranıp *mwh* ve/veya *flr*³ mutant fenotipler bakımından incelenmiştir. Sayılan küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonların kayıtları tutulmuştur. Kontrol ve tüm dioksinleri içeren uygulama gruplarından elde edilen bireylerin kanatlarından hazırlanan preparatlarda gözlediğimiz küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonların fotoğrafları Şekil 4.7 ve Şekil 4.12'de toplu halde gösterilmiştir.



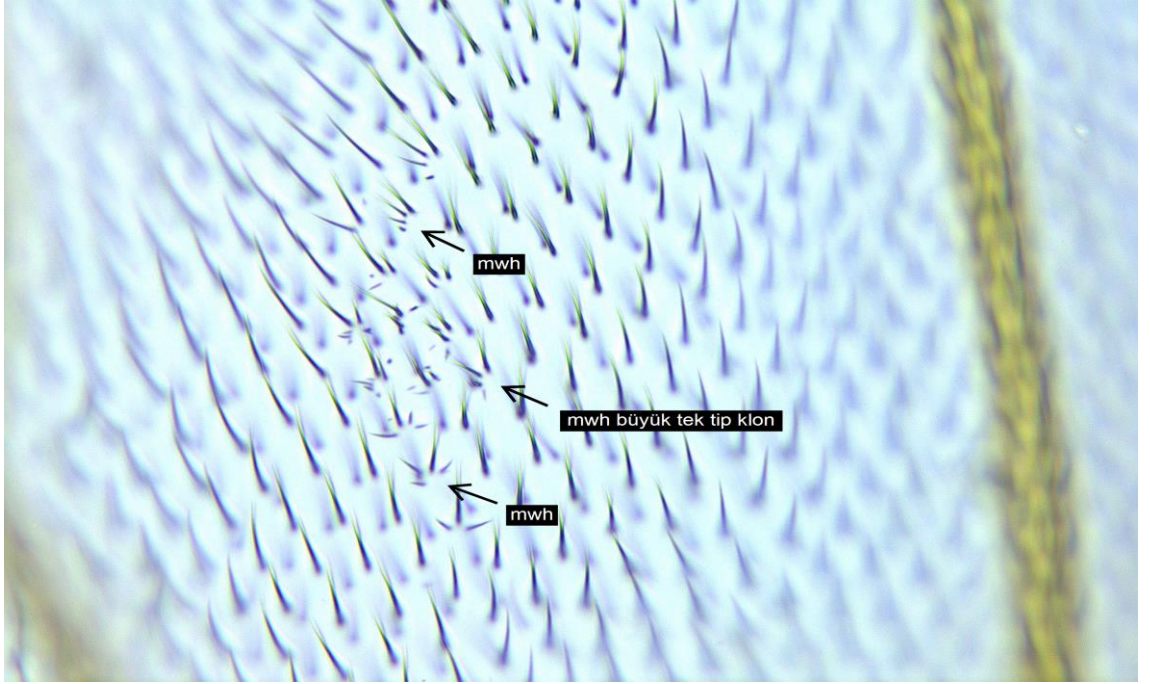
Şekil 4.7. Normal genetik özelliğe sahip bireydeki kanat kılları (10x40)



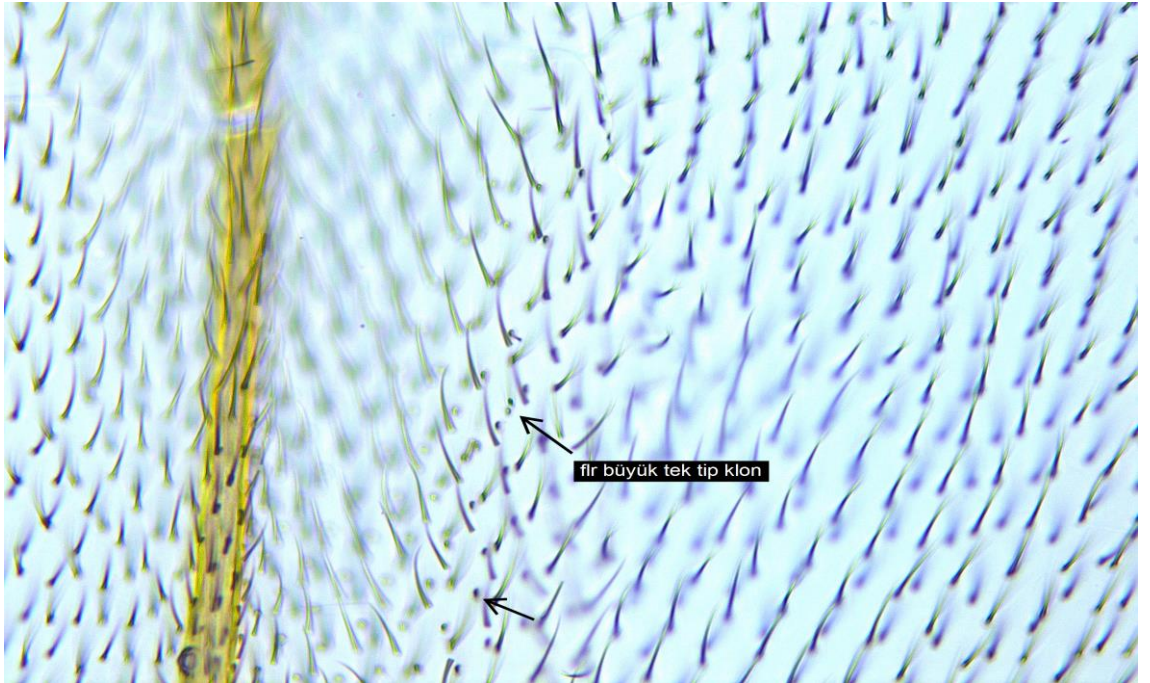
Şekil 4.8. *mwh/mwh* hattına sahip bireydeki kanat kılları (10x40)



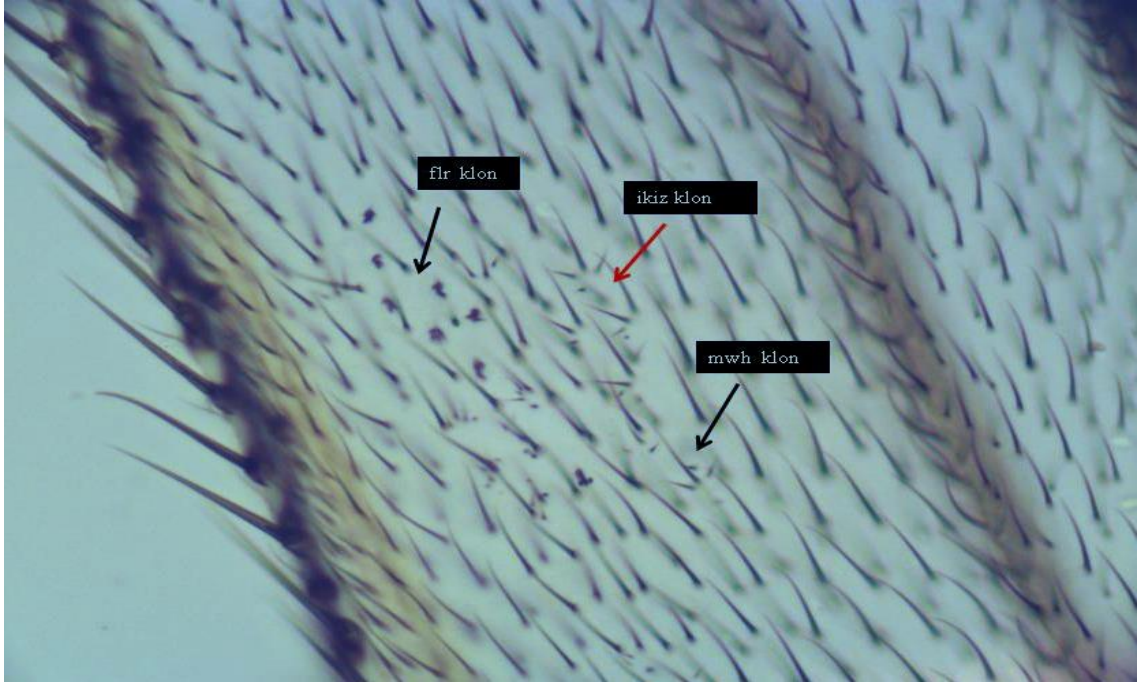
Şekil 4.9. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)



Şekil 4.10. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)



Şekil 4.11. Büyük tek tip *flr*³ mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)



Şekil 4.12. İkiz mutant klonların mikroskoptaki görünümü (10x40)

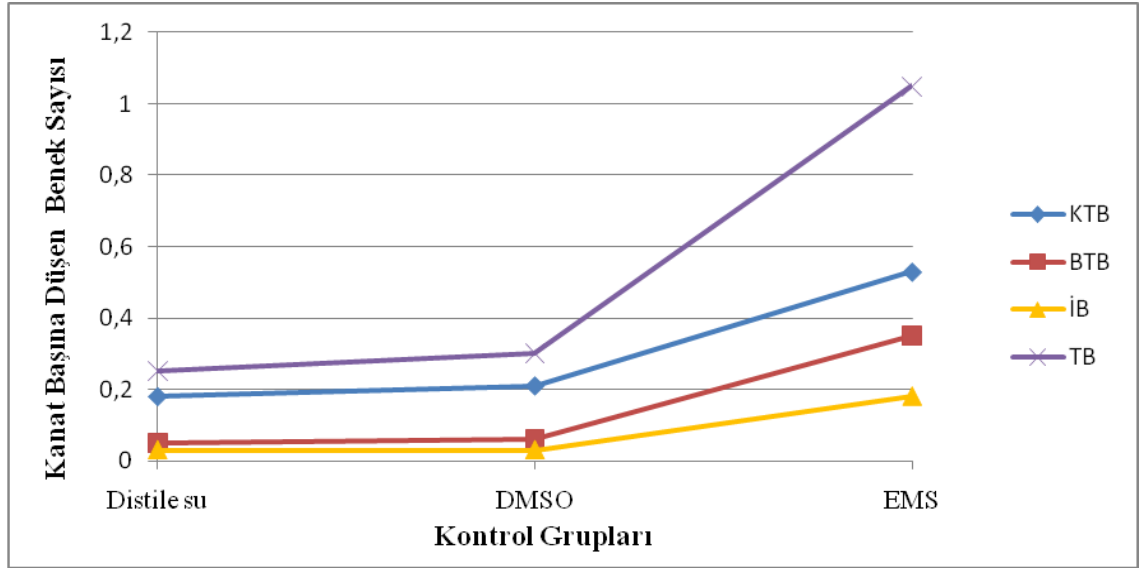
Negatif (distile su ve DMSO) ve pozitif (EMS) kontrol gruplarının muhtemel etkilerinin, hem *mwh/flr³* genotipli normal bireyler hem de *mwh/TM3* genotipli serrat kanatlı bireyler için belirlenmesi amacıyla istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (Çizelge 4.2).

Negatif kontrol grubu olan distile su grubuna ait normal kanat fenotipinde küçük tek tip klon frekansı 0,18; büyük tek tip klon frekansı 0,05; ikiz klon frekansı 0,03; toplam *mwh* klon frekansı 0,21 ve toplam klon frekansı 0,25 iken DMSO negatif kontrol grubu için bu değerler sırasıyla 0,21; 0,06; 0,03; 0,25; 0,30 olarak bulunmuştur. EMS pozitif kontrol grubunda ise bu değerler sırasıyla 0,53; 0,35; 0,18; 0,88 ve 1,05'dir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.13). Elde edilen klon frekansı değerlerine göre, DMSO kontrol grubunda negatif ya da önemsiz fark, EMS pozitif kontrol grubunda ise tüm klon tiplerinde pozitif fark gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Distile su, DMSO ve EMS'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam <i>mwh</i> klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10^5 hücre)
			No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat	Distile su	80	14	(0,18)		4	(0,05)		2	(0,03)		17	(0,21)		20	(0,25)		0,87
	DMSO (%1)	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
	EMS (1mM)	80	42	(0,53)	+	28	(0,35)	+	14	(0,18)	+	70	(0,88)	+	84	(1,05)	+	3,58
Serrat Kanat	Distile su	80	12	(0,15)		3	(0,04)		*			15	(0,19)		15	(0,19)		0,76
	DMSO (%1)	80	15	(0,19)	i	3	(0,04)	i				18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
	EMS (1mM)	80	40	(0,50)	+	25	(0,32)	+				65	(0,82)	+	65	(0,82)	+	3,32

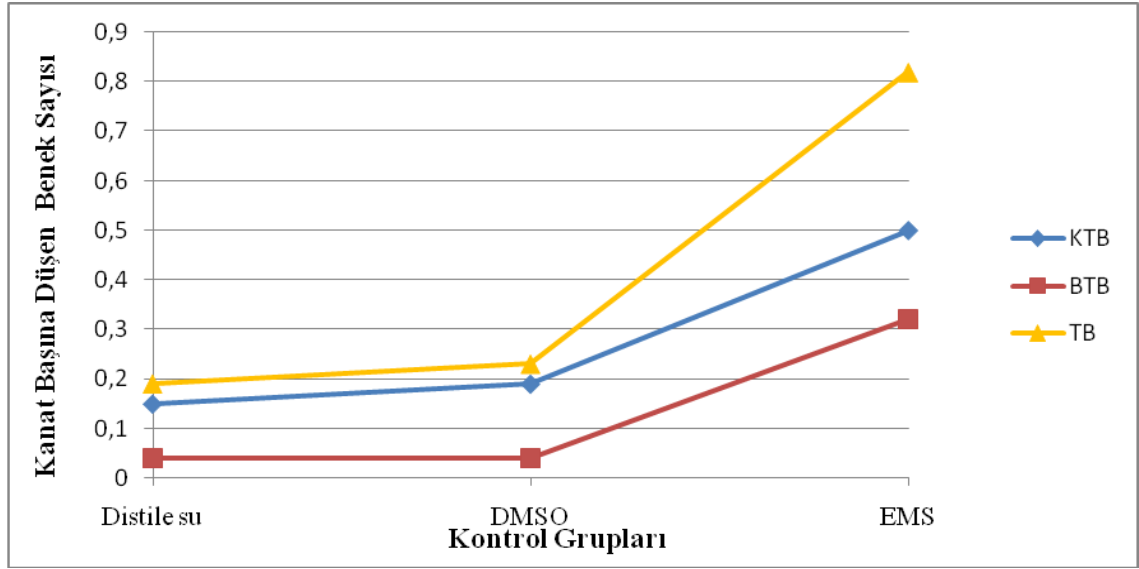
No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würdler, 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$



Şekil 4.13. Kontrol grubu (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, İB: İkiz benek, TB: Toplam benek

Transheterozigot larvalardan gelişen serrat kanat fenotipinde negatif kontrol grubu olan distile su için küçük tek tip klon frekansı 0,15; büyük tek tip klon frekansı 0,04; toplam *mwh* klon frekansı 0,19 ve toplam klon frekansı 0,19 iken DMSO negatif kontrol grubunda bu değerlerin sırasıyla 0,19; 0,04; 0,23; 0,23 ve EMS pozitif kontrol grubunda da 0,50; 0,32; 0,82 ve 0,82 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.14). Yine, normal kanat fenotipinde olduğu gibi negatif kontrol grubu olan DMSO tüm klon tiplerinde negatif ya da önemsiz fark gösterirken pozitif kontrol grubu EMS’de pozitif fark gözlenmiştir.



Şekil 4.14. Kontrol grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, TB: Toplam benek

Klon indüksiyon frekansına (KİF) ait değerler, distile su negatif kontrol grubunda normal kanat için 0,87, serrat kanat için 0,76 iken DMSO negatif kontrol grubunda normal kanat için 1,02, serrat kanat için ise 0,92 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin EMS pozitif kontrol grubunda ise normal kanat için 3,58, serrat kanat için 3,32 olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. 2,3,7,8-TCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması

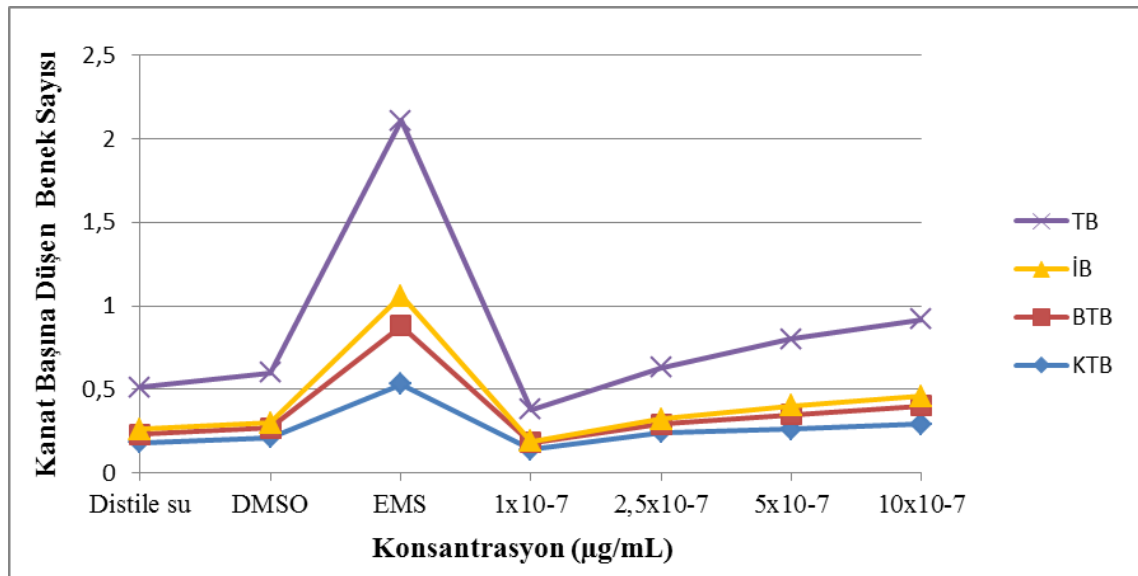
Genotoksik etkisi değerlendirilen 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin) için, 1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenen konsantrasyonlarda uygulamalar yapılmıştır. 2,3,7,8-TCDD'ye ait uygulama gruplarındaki hem dengeleyici kromozom (*TM3*) taşıyan serrat kanatlı bireylerin hem de dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerin kanat preparatları hazırlanmış ve uygulamalardan elde edilen sonuçlar ile istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. 2,3,7,8-TCDD'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (<i>m</i> = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Toplam klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
			No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal Kanat	Distile su	80	14	(0,18)		4	(0,05)		2	(0,03)		17	(0,21)		20	(0,25)		0,87
	DMSO (%1)	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
	EMS (1mM)	80	42	(0,53)	+	28	(0,35)	+	14	(0,18)	+	70	(0,88)	+	84	(1,05)	+	3,58
	2,3,7,8-TCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	11	(0,14)	-	3	(0,04)	-	1	(0,01)	i	13	(0,16)	-	15	(0,19)	-	0,66
	2,5x10 ⁻⁷	80	19	(0,24)	i	4	(0,05)	-	2	(0,03)	i	19	(0,24)	-	25	(0,31)	-	0,97
	5x10 ⁻⁷	80	21	(0,26)	i	7	(0,09)	-	4	(0,05)	i	24	(0,30)	i	32	(0,40)	i	1,22
	10x10 ⁻⁷	80	23	(0,29)	i	9	(0,11)	i	5	(0,06)	i	31	(0,39)	i	37	(0,46)	i	1,58
Serrat Kanat	Distile su	80	12	(0,15)		3	(0,04)		*			15	(0,19)		15	(0,19)		0,76
	DMSO (%1)	80	15	(0,19)	i	3	(0,04)	i				18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
	EMS (1mM)	80	40	(0,50)	+	25	(0,32)	+				65	(0,82)	+	65	(0,82)	+	3,32
	2,3,7,8-TCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	11	(0,14)	-	3	(0,04)	i	*			14	(0,18)	-	14	(0,18)	-	0,71
	2,5x10 ⁻⁷	80	18	(0,23)	i	3	(0,04)	i				21	(0,26)	i	21	(0,26)	i	1,07
	5x10 ⁻⁷	80	20	(0,25)	i	6	(0,08)	i				26	(0,32)	i	26	(0,32)	i	1,33
	10x10 ⁻⁷	80	21	(0,26)	i	7	(0,09)	i				28	(0,35)	i	28	(0,35)	i	1,43

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler, 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi, 2,3,7,8-TCDD uygulama gruplarından elde edilen verilerin hiçbirinde pozitif sonuç gözlenmemiştir. 4 farklı konsantrasyona ait uygulama grubunda normal ve serrat kanatlara ait klon tipleri, negatif kontrol grubu olan DMSO ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, 2,3,7,8-TCDD uygulama gruplarına ait normal kanat fenotipinde en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru (1×10^{-7} - $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) sırasıyla küçük tek tip klon frekansı 0,14; 0,24; 0,26 ve 0,29; büyük tek tip klon frekansı 0,04; 0,05; 0,09 ve 0,11; ikiz klon frekansı 0,01; 0,03; 0,05 ve 0,06; toplam *mwh* klon frekansı 0,16; 0,24; 0,30 ve 0,39, toplam klon frekansı 0,19; 0,31; 0,40 ve 0,46 olarak bulunurken (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.15), serrat kanat fenotipinde bu değerler sırasıyla küçük tek tip klon frekansı için 0,14; 0,23; 0,25 ve 0,26; büyük tek tip klon frekansı için 0,04; 0,04; 0,08 ve 0,09; toplam *mwh* klon frekansı ile toplam klon frekansı için 0,18; 0,26; 0,32 ve 0,35 şeklindedir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.16).

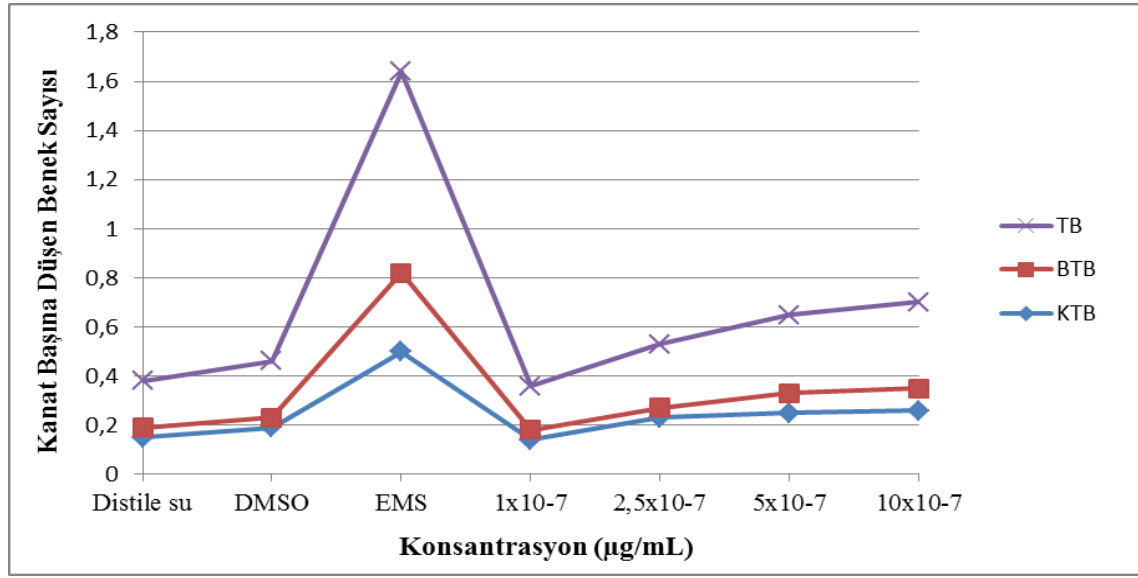


Şekil 4.15. 2,3,7,8-TCDD uygulanan (*mwh/flr*³) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, İB: İkiz benek, TB: Toplam benek

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.15 ile Şekil 4.16 dikkatle incelendiği zaman, uygulama grupları için hem normal hem de serrat kanat fenotipinde özellikle son üç uygulama grubuna ait ($2,5 \times 10^{-7}$ - $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) klon sayılarının DMSO grubuna göre arttığı görülmektedir. Örneğin normal kanat için toplam klon sayısı DMSO’da 24 iken uygulama gruplarında

25- 37; serrat kanat için toplam klon sayısı DMSO'da 18 iken uygulama gruplarında 21-28 aralığındadır. Konsantrasyon artışına paralel olarak bir artış gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.16. 2,3,7,8-TCDD uygulanan (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, TB: Toplam benek

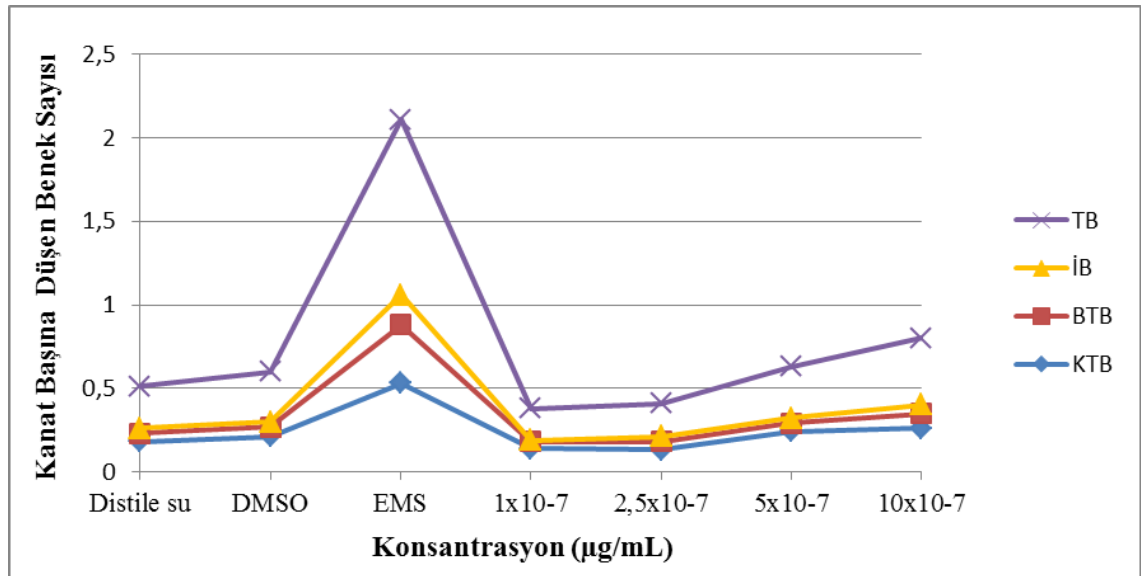
2,3,7,8-TCDD uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak normal kanat fenotipi için klon indüksiyon frekansı (KİF) sırasıyla 0,66; 0,97; 1,22 ve 1,58 ve serrat kanat fenotipi için de bu değerler 0,71; 1,07; 1,33 ve 1,43 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

4.2.3. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması

Genotoksik etkisi değerlendirilen dioksinlerden bir diğeri 1,2,3,7,8-PeCDD'dir (1,2,3,7,8- Pentaklorodibenzo-*p*-dioksin). Yapılan ön denemeler ile belirlenen 4 farklı konsantrasyon (1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) ile uygulama grupları oluşturulmuştur. 1,2,3,7,8-PeCDD'ye ait uygulama gruplarındaki hem dengeleyici kromozom (*TM3*) taşıyan serrat kanatlı bireylerin hem de dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerin kanat preparatları hazırlanmıştır. İncelenen her iki

kanat fenotipine ait tüm klon tipleri sayılmış ve istatistiksel olarak frekansları belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Bu değerlere göre, 1,2,3,7,8-PeCDD uygulama gruplarına ait normal kanat fenotipinde en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru (1×10^{-7} - $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) sırasıyla küçük tek tip klon frekansı 0,14; 0,13; 0,24 ve 0,26; büyük tek tip klon frekansı 0,04; 0,05; 0,05 ve 0,09; ikiz klon frekansı 0,01; 0,03; 0,03 ve 0,05; toplam *mwh* klon frekansı 0,16; 0,18; 0,24 ve 0,30 ile toplam klon frekansı 0,19; 0,20; 0,31 ve 0,40 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.17). Normal kanatlara sahip *mwh/flr³* genotipindeki bireylerin tüm uygulama gruplarından elde edilen sonuçlar, küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon ile toplam *mwh* ve toplam klon sayısı açısından DMSO kontrol ile karşılaştırıldığı zaman klon frekansları istatistiksel düzeyde önemsiz ve negatif sonuç vermiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 1,2,3,7,8-PeCDD uygulanan (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

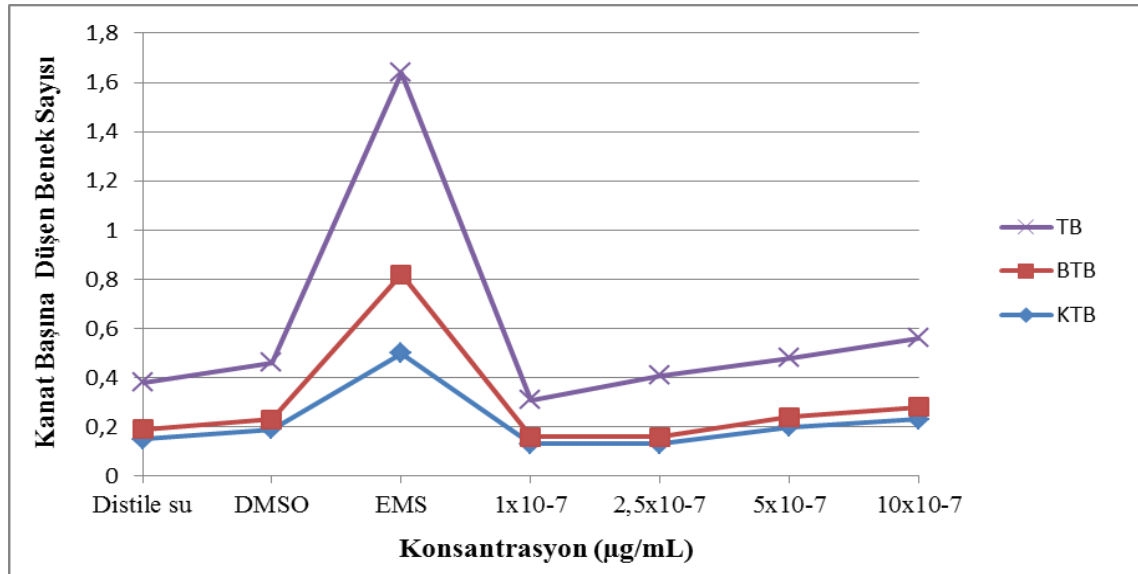
*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, IB: İkiz benek, TB: Toplam benek

Çizelge 4.4. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (<i>m</i> = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Toplam klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
			No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal Kanat	Distile su	80	14	(0,18)		4	(0,05)		2	(0,03)		17	(0,21)		20	(0,25)		0,87
	DMSO (%1)	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
	EMS (1mM)	80	42	(0,53)	+	28	(0,35)	+	14	(0,18)	+	70	(0,88)	+	84	(1,05)	+	3,58
	1,2,3,7,8-PeCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	11	(0,14)	-	3	(0,04)	-	1	(0,01)	i	13	(0,16)	-	15	(0,19)	-	0,66
	2,5x10 ⁻⁷	80	10	(0,13)	-	4	(0,05)	-	2	(0,03)	i	14	(0,18)	-	16	(0,20)	-	0,71
	5x10 ⁻⁷	80	19	(0,24)	i	4	(0,05)	-	2	(0,03)	i	19	(0,24)	-	25	(0,31)	-	0,97
	10x10 ⁻⁷	80	21	(0,26)	i	7	(0,09)	-	4	(0,05)	i	24	(0,30)	i	32	(0,40)	i	1,22
Serrat Kanat	Distile su	80	12	(0,15)		3	(0,04)		*			15	(0,19)		15	(0,19)		0,76
	DMSO (%1)	80	15	(0,19)	i	3	(0,04)	i				18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
	EMS (1mM)	80	40	(0,50)	+	25	(0,32)	+				65	(0,82)	+	65	(0,82)	+	3,32
	1,2,3,7,8-PeCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	10	(0,13)	-	2	(0,03)	-	*			12	(0,15)	-	12	(0,15)	-	0,61
	2,5x10 ⁻⁷	80	10	(0,13)	-	2	(0,03)	-				12	(0,25)	-	12	(0,25)	-	0,61
	5x10 ⁻⁷	80	16	(0,20)	i	3	(0,04)	i				19	(0,24)	-	19	(0,24)	-	0,97
	10x10 ⁻⁷	80	18	(0,23)	i	4	(0,05)	i				22	(0,28)	i	22	(0,28)	i	1,12

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler, 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: $TM3$ dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

Serrat kanat fenotipinde ise klon frekans değerleri sırasıyla küçük tek tip klon frekansı için 0,13; 0,13; 0,20 ve 0,23; büyük tek tip klon frekansı için 0,03; 0,03; 0,04 ve 0,05; toplam *mwh* klon frekansı ile toplam klon frekansı için de 0,15; 0,25; 0,24 ve 0,28'dir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.18). En yüksek uygulama grubu ($10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) için tüm klon tiplerinde ve $5 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ uygulama gruplarında küçük tek tip ve büyük tek tip klon frekansları istatistiksel düzeyde önemsiz iken diğer konsantrasyonlar için tüm klon frekansları negatif sonuç vermiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.18). Serrat kanatlara (*mwh/TM3*) sahip bireylerden elde edilen sonuçlar da normal kanat fenotipinden elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir. Tüm klonlar gözönüne alındığı zaman, 1,2,3,7,8-PeCDD uygulama gruplarında artan doza bağlı olarak normal kanat fenotipi için klon indüksiyon frekansı (KİF) sırasıyla 0,66; 0,71; 0,97 ve 1,22 ve serrat kanat fenotipi için de sırasıyla 0,61; 0,61; 0,97 ve 1,12 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).



Şekil 4.18. 1,2,3,7,8-PeCDD uygulanan (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

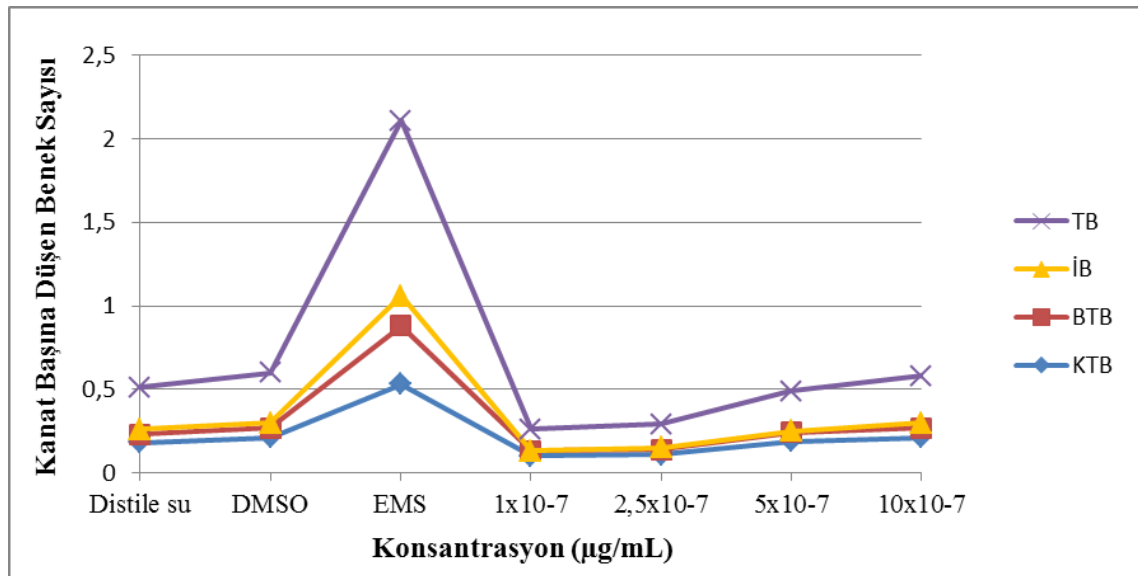
*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, TB: Toplam benek

4.2.4. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması

Genotoksik etkisi değerlendirilen üçüncü maddemiz 1,2,3,7,8,9-HxCDD (1,2,3,7,8,9-Hekzaklorodibenzo-*p*-dioksin) içinde 1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ olarak

belirlenen 4 farklı uygulama grubu hazırlanmıştır. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'ye ait uygulama gruplarındaki hem dengeleyici kromozom (*TM3*) taşıyan serrat kanatlı bireylerin hem de dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerin kanat preparatları hazırlanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 incelendiği zaman, 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulama gruplarına ait normal kanat fenotipinde en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru (1×10^{-7} - $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) sırasıyla küçük tek tip klon frekansı 0,10; 0,11; 0,19 ve 0,21; büyük tek tip klon frekansı 0,03; 0,03; 0,05 ve 0,06; ikiz klon frekansı 0,00; 0,01; 0,01 ve 0,03; toplam *mwh* klon frekansı 0,11; 0,14; 0,14 ve 0,18 ile toplam klon frekansı 0,13; 0,14; 0,24 ve 0,28 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.19).

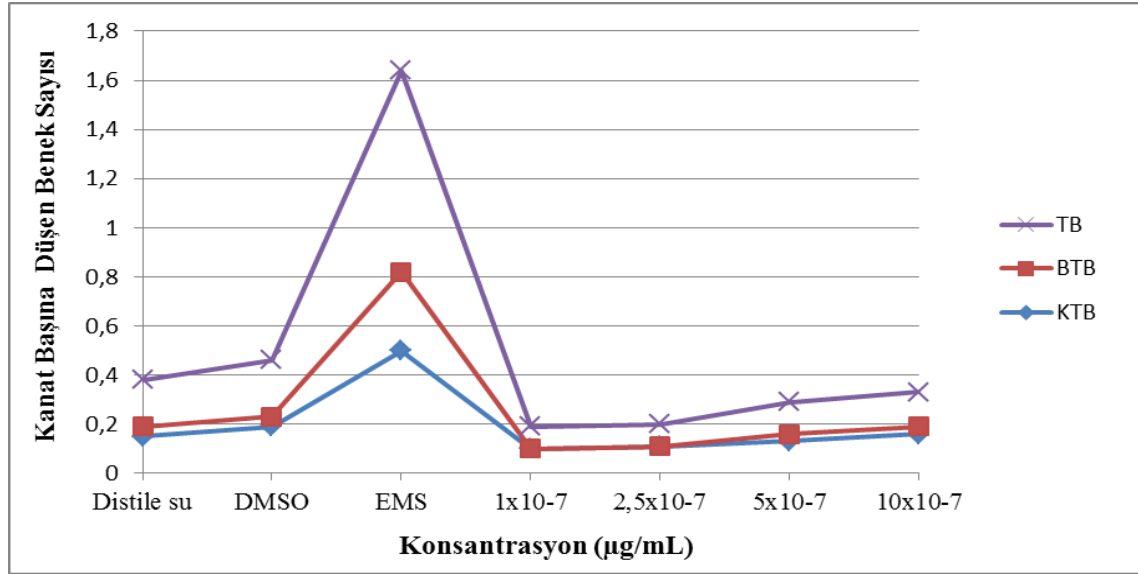


Şekil 4.19. 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulanan (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, İB: İkiz benek, TB: Toplam benek

Serrat kanat fenotipinde bu değerler sırasıyla küçük tek tip klon frekansı için 0,10; 0,11; 0,13 ve 0,16; büyük tek tip klon frekansı için 0,00; 0,00; 0,03 ve 0,03; toplam *mwh* klon frekansı ile toplam klon frekansı için 0,09; 0,09; 0,13 ve 0,14 şeklindedir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.20).

1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulama grubunda artan konsantrasyona bağı olarak hem normal hem de serrat kanatlı bireylerin tüm klon sayılarında artış gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel açıdan negatif fark olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.20. 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulanan (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, TB: Toplam benek

Ayrıca elde edilen tüm veriler gözönüne alınarak normal ve serrat kanat için klon indüksiyon frekansları da hesaplanmıştır. 1,2,3,7,8,9-HxCDD uygulama gruplarındaki normal kanat fenotipinde klon indüksiyon frekansı değerlerinin konsantrasyon artışına paralel olarak sırasıyla, 0,46; 0,56; 0,56 ve 0,71; serrat kanat fenotipinde ise bu değerlerin 0,35; 0,35; 0,51 ve 0,56 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (<i>m</i> = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Toplam klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
			No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal Kanat	Distile su	80	14	(0,18)		4	(0,05)		2	(0,03)		17	(0,21)		20	(0,25)		0,87
	DMSO (%1)	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
	EMS (1mM)	80	42	(0,53)	+	28	(0,35)	+	14	(0,18)	+	70	(0,88)	+	84	(1,05)	+	3,58
	1,2,3,7,8,9-HxCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	8	(0,10)	-	2	(0,03)	-	0	(0,00)	-	9	(0,11)	-	10	(0,13)	-	0,46
	2,5x10 ⁻⁷	80	9	(0,11)	-	2	(0,03)	-	1	(0,01)	i	11	(0,14)	-	11	(0,14)	-	0,56
	5x10 ⁻⁷	80	15	(0,19)	-	4	(0,05)	-	1	(0,01)	i	11	(0,14)	-	19	(0,24)	-	0,56
	10x10 ⁻⁷	80	17	(0,21)	-	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	14	(0,18)	-	22	(0,28)	-	0,71
Serrat Kanat	Distile su	80	12	(0,15)		3	(0,04)		*			15	(0,19)		15	(0,19)		0,76
	DMSO (%1)	80	15	(0,19)	i	3	(0,04)	i				18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
	EMS (1mM)	80	40	(0,50)	+	25	(0,32)	+				65	(0,82)	+	65	(0,82)	+	3,32
	1,2,3,7,8,9-HxCDD (µg/mL)																	
	1x10 ⁻⁷	80	8	(0,10)	-	0	(0,00)	-	*			7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35
	2,5x10 ⁻⁷	80	9	(0,11)	-	0	(0,00)	-				7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35
	5x10 ⁻⁷	80	10	(0,13)	-	2	(0,03)	-				10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
	10x10 ⁻⁷	80	13	(0,16)	-	2	(0,03)	-				11	(0,14)	-	11	(0,14)	-	0,56

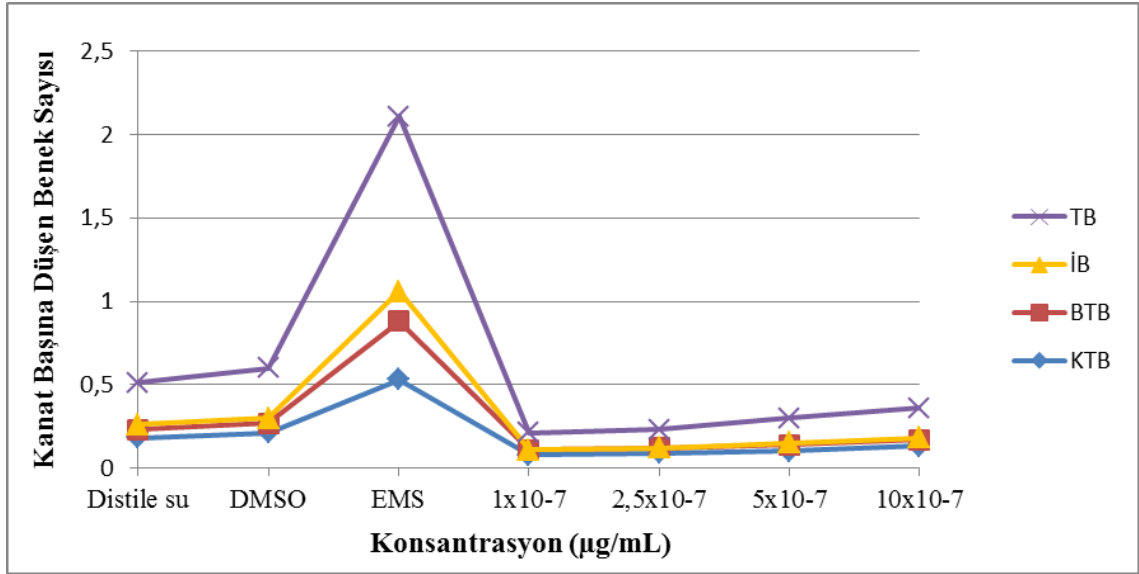
No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler, 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: $TM3$ dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.2.5. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin genotoksik etkisinin araştırılması

Bu çalışmada, genotoksik etkisi değerlendirilen son dioksin 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD' dir (1,2,3,4,6,7,8,9-Oktaklorodibenzo-*p*-dioksin). İlk üç dioksin grubunda olduğu gibi bu dioksin için de transheterozigot larvalara 1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve 10×10^{-7} µg/mL olarak belirlenen 4 farklı konsantrasyonda uygulamalar yapılmıştır. Uygulama gruplarında elde edilen bireylerden hem dengeleyici kromozom (*TM3*) taşıyan serrat kanatlı hem de dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı erginlere ait kanat preparatları yapılmış ve bu preparatlar incelenerek Çizelge 4.6 hazırlanmıştır.

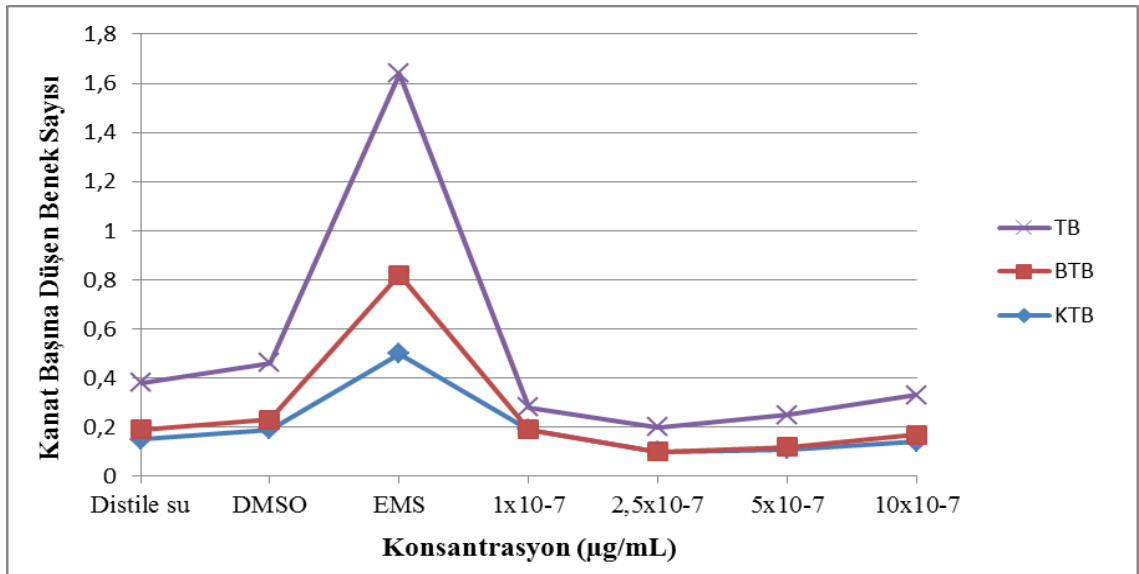
Çizelge 4.6 incelendiği zaman, normal kanat fenotipinde en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru (1×10^{-7} - 10×10^{-7} µg/mL) sırasıyla küçük tek tip klon frekansı 0,08; 0,09; 0,10 ve 0,13; büyük tek tip klon frekansı 0,03; 0,03; 0,04 ve 0,04; ikiz klon frekansı 0,00; 0,00; 0,01 ve 0,01; toplam *mwh* klon frekansı 0,10; 0,10; 0,13 ve 0,16 ile toplam klon frekansı 0,10; 0,11; 0,15 ve 0,18 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Normal kanatlara sahip (*mwh/flr³*) bireylerin küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon ile toplam *mwh* ve toplam klon frekansları negatif kontrol olan DMSO ile karşılaştırıldığı zaman tüm konsantrasyonlar için istatistiksel düzeyde negatif fark gözlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.21).

Serrat kanat fenotipinde ise klon frekans değerleri sırasıyla küçük tek tip klon frekansı için 0,19; 0,10; 0,11 ve 0,14; büyük tek tip klon frekansı için 0,00; 0,00; 0,01 ve 0,03; toplam *mwh* klon frekansı ile toplam klon frekansı için de 0,09; 0,10; 0,13 ve 0,16 şeklindedir (Çizelge 4.6). Benzer şekilde serrat kanatlara (*mwh/TM3*) sahip bireylerin tüm uygulama gruplarında gözlenen klon frekansları da DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel düzeyde önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.22). 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulama grubunda KİF değerleri normal kanat fenotipinde 0,40; 0,40; 0,51 ve 0,66; serrat kanat fenotipinde 0,35; 0,40; 0,51 ve 0,66 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.21. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulanan (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, İB: İkiz benek, TB: Toplam benek



Şekil 4.22. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD uygulanan (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

*KTB: Küçük tek tip benek, BTB: Büyük tek tip benek, TB: Toplam benek

Çizelge 4.6. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10^5 hücre)
			No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat	Distile su	80	14	(0,18)		4	(0,05)		2	(0,03)		17	(0,21)		20	(0,25)		0,87
	DMSO (%1)	80	17	(0,21)	i	5	(0,06)	-	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
	EMS (1mM)	80	42	(0,53)	+	28	(0,35)	+	14	(0,18)	+	70	(0,88)	+	84	(1,05)	+	3,58
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD ($\mu\text{g/mL}$)																	
	1×10^{-7}	80	6	(0,08)	-	2	(0,03)	-	0	(0,00)	-	8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
	$2,5 \times 10^{-7}$	80	7	(0,09)	-	2	(0,03)	-	0	(0,00)	-	8	(0,10)	-	9	(0,11)	-	0,40
	5×10^{-7}	80	8	(0,10)	-	3	(0,04)	-	1	(0,01)	i	10	(0,13)	-	12	(0,15)	-	0,51
	10×10^{-7}	80	10	(0,13)	-	3	(0,04)	-	1	(0,01)	i	13	(0,16)	-	14	(0,18)	-	0,66
Serrat Kanat	Distile su	80	12	(0,15)		3	(0,04)		*			15	(0,19)		15	(0,19)		0,76
	DMSO (%1)	80	15	(0,19)	i	3	(0,04)	i				18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
	EMS (1mM)	80	40	(0,50)	+	25	(0,32)	+				65	(0,82)	+	65	(0,82)	+	3,32
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD ($\mu\text{g/mL}$)																	
	1×10^{-7}	80	7	(0,19)	-	0	(0,00)	-	*			7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35
	$2,5 \times 10^{-7}$	80	8	(0,10)	-	0	(0,00)	-				8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
	5×10^{-7}	80	9	(0,11)	-	1	(0,01)	-				10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
	10×10^{-7}	80	11	(0,14)	-	2	(0,03)	-				13	(0,16)	-	13	(0,16)	-	0,66

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler, 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: $TM3$ dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.3. Dioksinlerin Ergin Bireylerde Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmada, kullandığımız tüm dioksinlere ait uygulama gruplarında artan konsantrasyona bağlı olarak transheterozigot larvalardan elde edilen ergin birey sayıları önemli ölçüde azalma ($p<0,05$) göstermiştir (Çizelge 4.1). Bu noktadan yola çıkılarak dioksinlerin olası toksik etkisinin antioksidan sistemler üzerine olup olmadığını belirlemek için, *Drosophila melanogaster*’in ergin bireylerinde total enzim aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla, dioksinler ve dioksin+antioksidan uygulama grubu olmak üzere iki ayrı deney seti hazırlanmıştır. Dioksinler ile dioksin+antioksidanlara maruz bırakılan *D. melanogaster*’in ergin bireylerinde oksidatif parametrelerin belirlenmesi amacıyla, *Drosophila* kanat benek testi çalışmalarında kullanılan dioksinlere ait en yüksek konsantrasyon ($10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) ile antioksidanlardan Koenzim Q10 (CoQ10) için $150 \mu\text{g/mL}$ ve Resveratrol (RSV) için $100 \mu\text{M}$ dozları kullanılmıştır (Bölüm 3.2.2.a ve Bölüm 3.2.2.b).

4.3.1. 2,3,7,8-TCDD’nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması

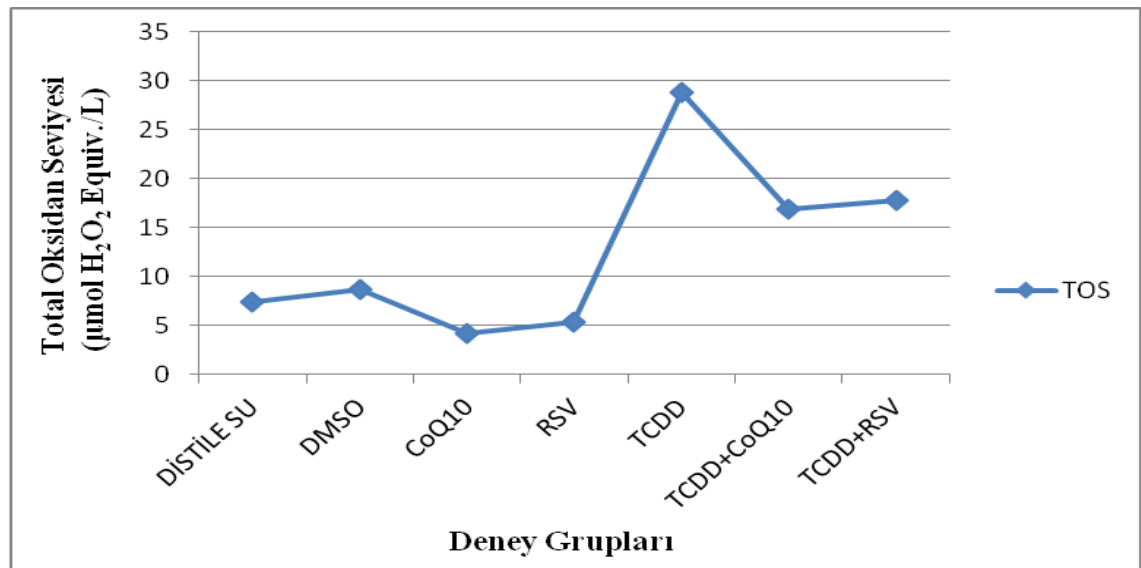
2,3,7,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDD+CoQ10 ve 2,3,7,8-TCDD+RSV uygulamalarına maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*’in transheterozigot larvalarından elde edilen bireylerin total oksidan seviye (TOS), total antioksidan kapasite (TAK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) verileri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 incelendiği zaman TCDD uygulama grubunda $28,81 \pm 1,62 \mu\text{mol/L}$ olan total oksidan seviyesinin (TOS) distile suda $6,37 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ ve DMSO kontrol grubunda $7,61 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ olduğu belirlenmiştir. Bu değerlere göre, TCDD uygulamaları ile TOS değerinin arttığı görülmektedir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.23). Antioksidan uygulama gruplarında TCDD+CoQ10 ve TCDD+RSV’de ise bu değerler sırasıyla $16,87 \pm 1,55 \mu\text{mol/L}$ ve $17,81 \pm 0,61 \mu\text{mol/L}$ ’dir. TCDD için ölçülen $28,81 \pm 1,62 \mu\text{mol/L}$ değerine göre total oksidan seviyesinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.7. TCDD ve TCDD+antioksidan uygulanan *D. melanogaster*'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler

DENEY GRUPLARI		TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L)	TAK (mmol Trolox Eqv./L)	OSİ (AU)
Kontrol Grupları	Distile su	6,37 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,98 $\pm$ 0,10 ^c	6,64 $\pm$ 0,70 ^{ab}
	DMSO	7,61 $\pm$ 0,16 ^b	0,93 $\pm$ 0,12 ^c	8,42 $\pm$ 0,94 ^b
	CoQ10	4,13 $\pm$ 0,60 ^a	1,83 $\pm$ 0,08 ^e	2,23 $\pm$ 0,22 ^a
	RSV	5,32 $\pm$ 0,62 ^{ab}	1,56 $\pm$ 0,10 ^d	3,38 $\pm$ 0,16 ^a
Uygulama Grupları	TCDD	28,81 $\pm$ 1,62 ^d	0,34 $\pm$ 0,00 ^a	84,62 $\pm$ 3,35 ^d
	TCDD+CoQ10	16,87 $\pm$ 1,55 ^c	0,68 $\pm$ 0,07 ^b	24,91 $\pm$ 0,46 ^c
	TCDD+RSV	17,81 $\pm$ 0,61 ^c	0,64 $\pm$ 0,04 ^b	27,98 $\pm$ 1,06 ^c

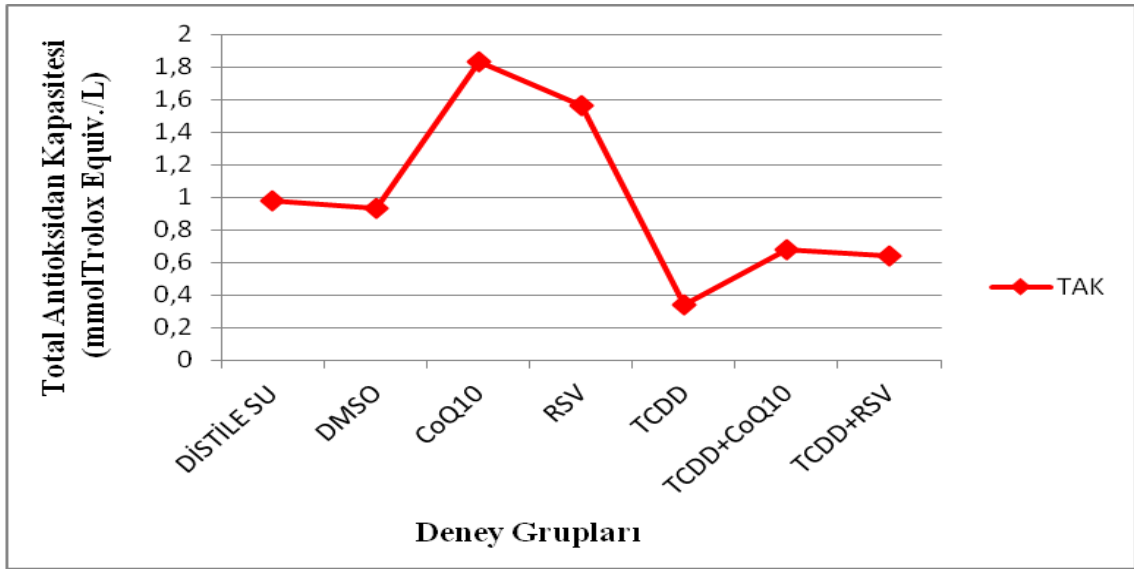
* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen deney gruplarına ait değerler $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.23. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi

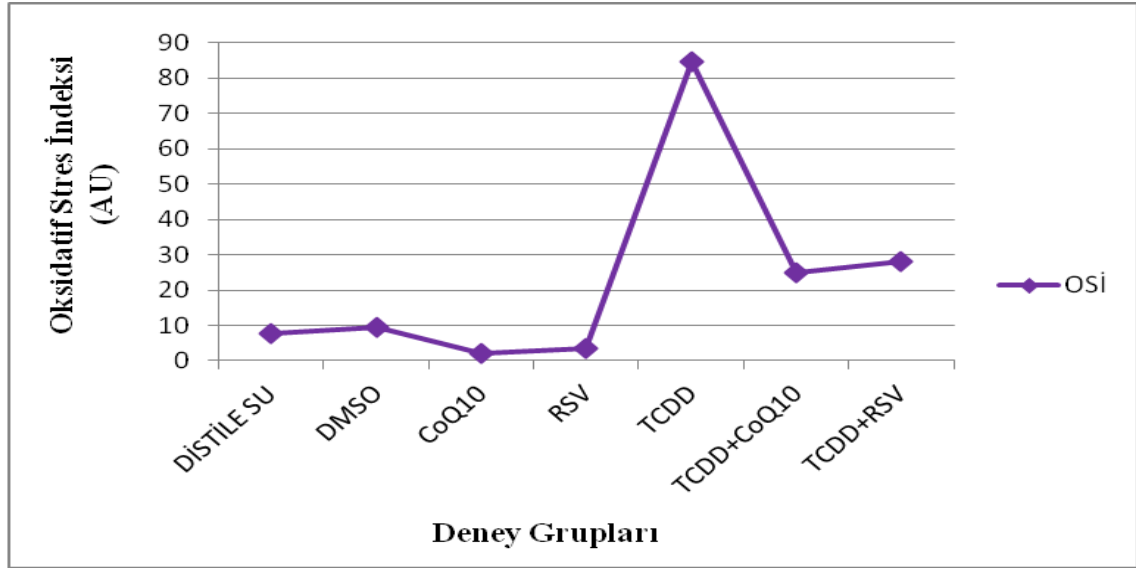
TCDD için total antioksidan kapasitesi (TAK) 0,34 $\pm$ 0,00mmol/L'dir. Bu değer distile su kontrol grubunda 0,98 $\pm$ 0,10mmol/L ve DMSO kontrol grubunda 0,93 $\pm$ 0,12mmol/L olarak hesaplanmıştır. Her iki kontrol grubu arasında gözlenen fark istatistiki olarak $p > 0,05$ düzeyinde önemsizdir. Ancak TCDD için bu değer kontrolle göre daha düşük

olması istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Antioksidan uygulama gruplarından TCDD+CoQ10 ve TCDD+RSV’de TAK değerleri ayrıca belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla $0,68\pm0,07\text{mmol/L}$ ve $0,64\pm0,04\text{mmol/L}$ ’dir (Şekil 4.24). Dioksin ve dioksin+antioksidan uygulama grupları arasında total antioksidan kapasitesi bakımından gözlenen bu farklılık $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.



Şekil 4.24. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi

TCDD için ayrıca oksidatif stres indeksi (OSİ) de hesaplanmıştır. Bu değer $84,62\pm3,35$ ’dir. Distile su ($6,64\pm0,70$) ve DMSO ($8,42\pm0,94$) kontrol gruplarında OSİ değeri oldukça düşük olup uygulama ve kontrol grupları arasındaki bu fark önemlidir ($p<0,05$). Antioksidan uygulama gruplarında TCDD+CoQ10 ve TCDD+RSV’de ise bu değerler sırasıyla $24,91\pm0,46$ ve $27,98\pm1,06$ ’dır ve iki grup arasındaki fark $p>0,05$ düzeyinde önemsizdir (Şekil 4.25). Ancak TCDD uygulama grubuna ait OSİ değeriyle ($84,62\pm3,35$) karşılaştırıldığı zaman dioksin+antioksidan gruplarındaki düşüş istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.25. TCDD ve TCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi

4.3.2. 1,2,3,7,8-PeCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması

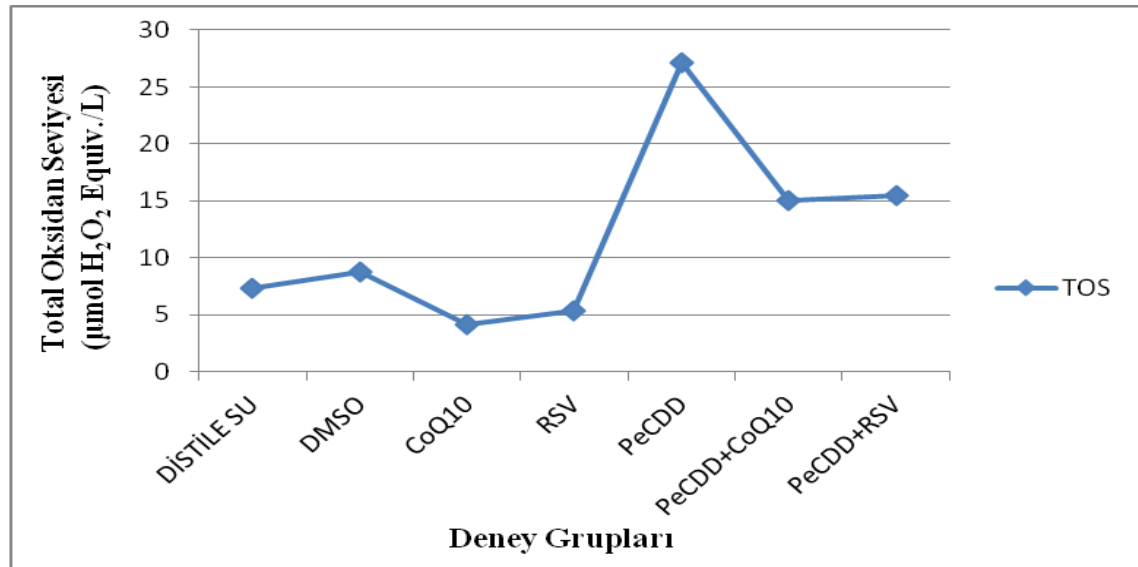
1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD+CoQ10 ve 1,2,3,7,8-PeCDD+RSV uygulamalarına maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* transheterozigot larvalarından elde edilen bireylerin total oksidan seviyeleri (TOS), total antioksidan kapasite (TAK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) verileri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Antioksidan uygulama gruplarından PeCDD+CoQ10 ve PeCDD+RSV'de TOS ve TAK değerleri ayrıca ölçülmüştür. TOS için PeCDD+CoQ10 ve PeCDD+RSV uygulama gruplarındaki değerler $15,04 \pm 1,68 \mu\text{mol/L}$ ve $15,42 \pm 1,28 \mu\text{mol/L}$; TAK için yine PeCDD+CoQ10 ve PeCDD+RSV'de $0,72 \pm 0,04 \text{mmol/L}$ ve $0,69 \pm 0,07 \text{mmol/L}$ 'dir. TOS değerleri her iki kontrol grubuna göre son derece yüksek, TAK değerleri ise daha düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). PeCDD ile PeCDD+CoQ10 ve PeCDD+RSV uygulama gruplarının TOS değerleri birbiriyle karşılaştırıldığı zaman, her iki antioksidan gruba ait değerlerin daha düşük ve TAK değerlerinin de daha yüksek olması istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).

Çizelge 4.8. PeCDD ve PeCDD+antioksidan uygulanan *D.melanogaster*'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler

DENEY GRUPLARI		TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L)	TAK (mmol Trolox Eqv./L)	OSİ (AU)
Kontrol Grupları	Distile su	6,37±0,01 ^{ab}	0,98±0,10 ^c	6,64±0,70 ^{ab}
	DMSO	7,61±0,16 ^b	0,93±0,12 ^c	8,42±0,94 ^b
	CoQ10	4,13±0,60 ^a	1,83±0,08 ^e	2,23±0,22 ^a
	RSV	5,32±0,62 ^{ab}	1,56±0,10 ^d	3,38±0,16 ^a
Uygulama Grupları	PeCDD	27,18±1,55 ^d	0,36±0,04 ^a	76,47±4,35 ^d
	PeCDD+CoQ10	15,04±1,68 ^c	0,72±0,04 ^b	20,75±1,00 ^c
	PeCDD+RSV	15,42±1,28 ^c	0,69±0,07 ^b	22,47±0,58 ^c

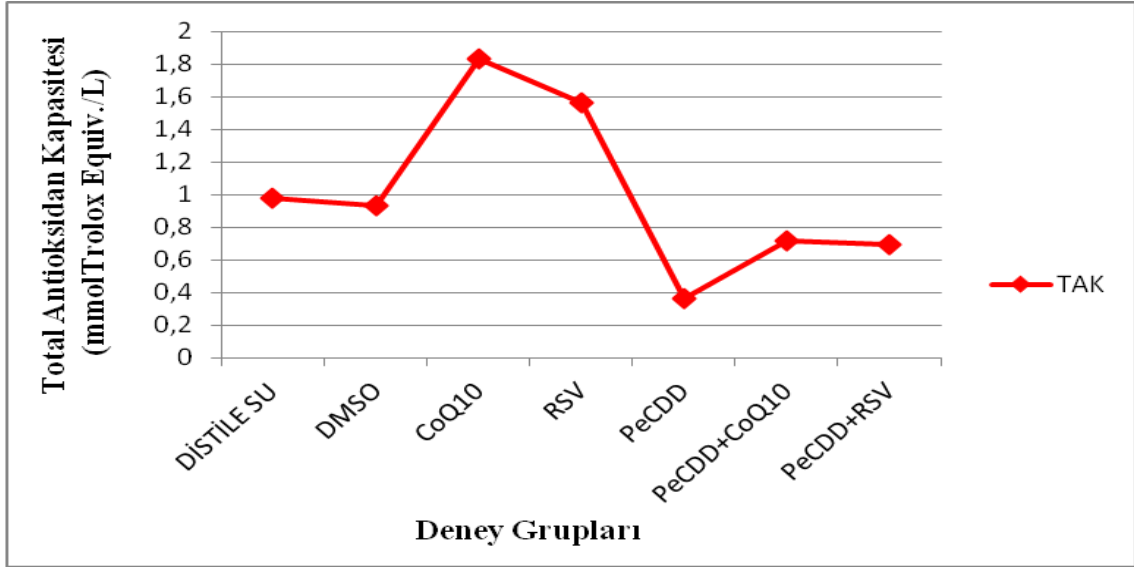
* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen deney gruplarına ait değerler $p<0,05$ düzeyinde önemlidir.



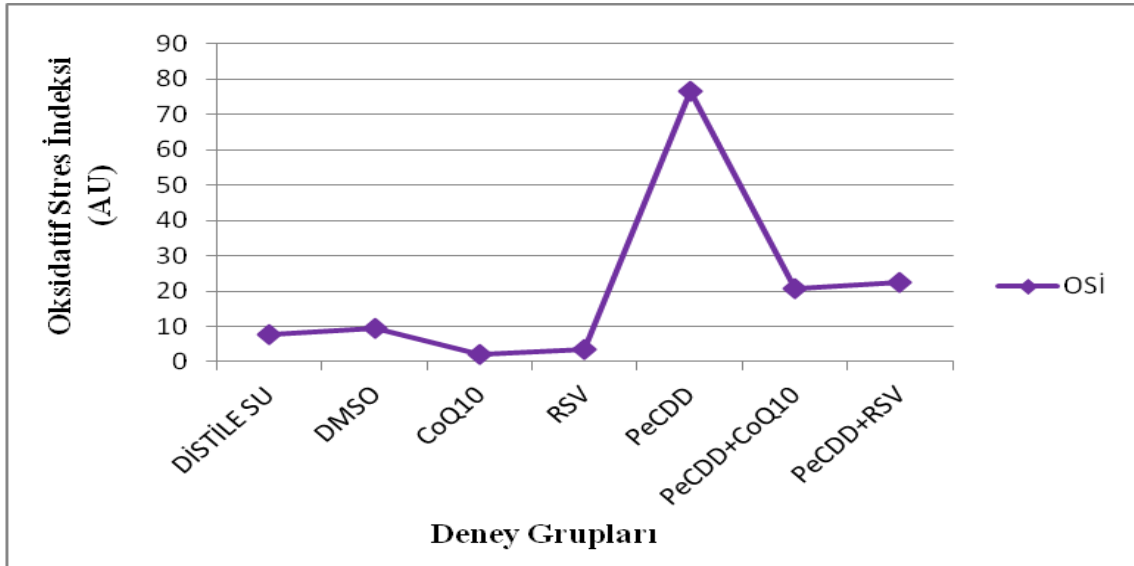
Şekil 4.26. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi

PeCDD için 76,47±4,35 olan oksidatif stres indeksi (OSİ) ise distile suda 6,64±0,70, DMSO'da 8,42±0,94'dür. Her iki kontrol grubu arasındaki fark önemsiz ($p>0,05$) iken kontrol ve PeCDD arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$). PeCDD+CoQ10 ve PeCDD+RSV uygulama gruplarında bu değerlerin sırasıyla 20,75±1,00 ve 22,47±0,58

olması da PeCDD'nin artırdığı oksidatif stresin oldukça düşürüldüğünü göstermektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi



Şekil 4.28. PeCDD ve PeCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi

4.3.3. 1,2,3,7,8,9-HxCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması

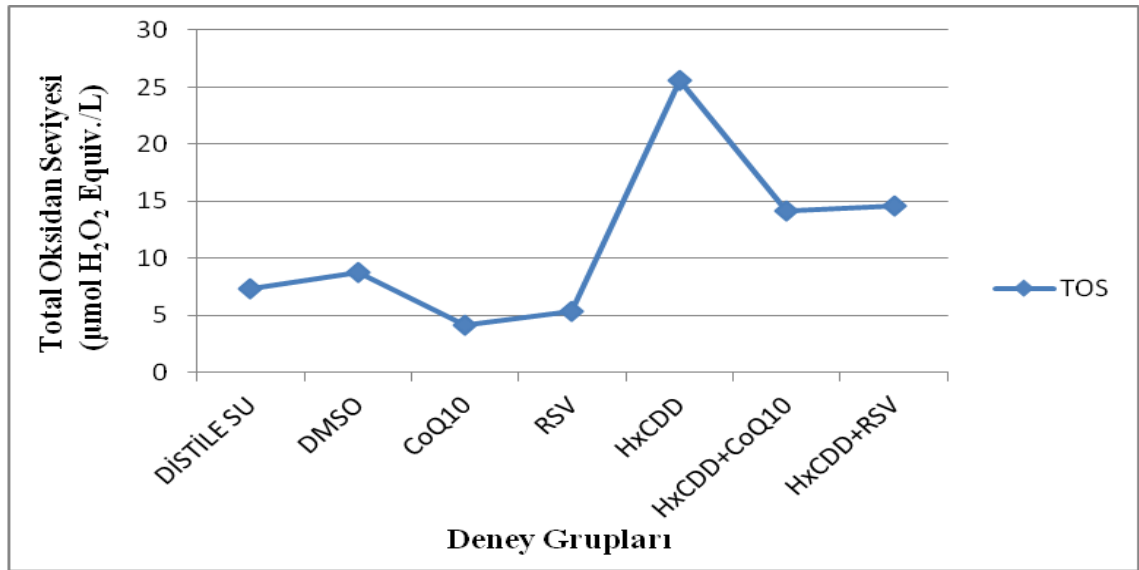
1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD+CoQ10 ve 1,2,3,7,8,9-HxCDD+RSV uygulamalarına maruz bırakılan *D. melanogaster*'in transheterozigot larvalarından elde edilen bireylerin total oksidan seviyeleri (TOS), total antioksidan kapasite (TAK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) verileri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. HxCDD ve HxCDD+antioksidan uygulanan *D. melanogaster*'in (*mwh x flr³*) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler

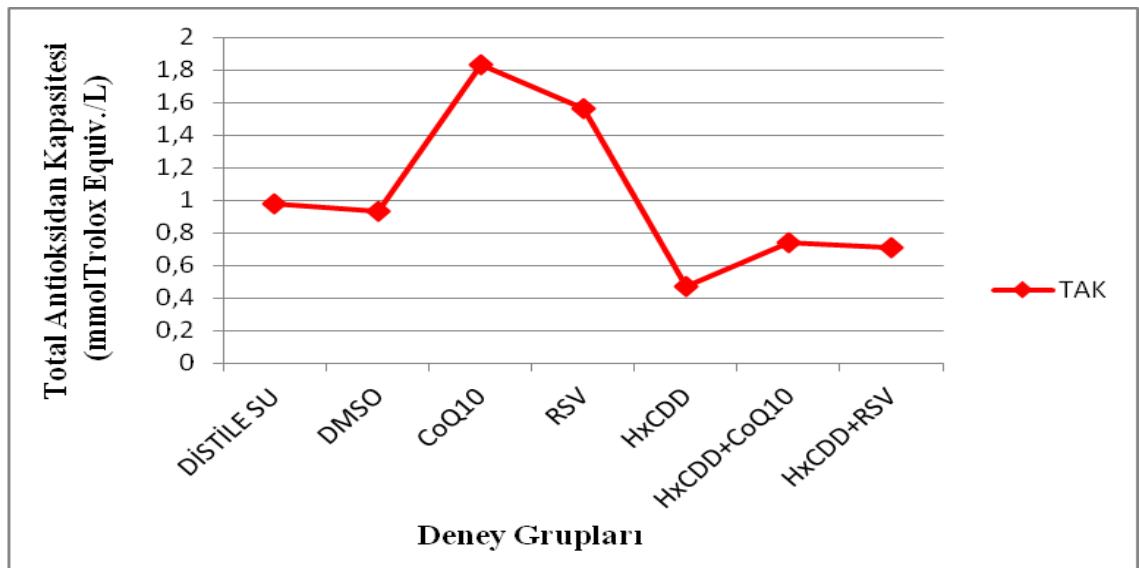
DENEY GRUPLARI		TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L)	TAK (mmol Trolox Eqv./L)	OSİ (AU)
Kontrol Grupları	Distile su	6,37 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,98 $\pm$ 0,10 ^c	6,64 $\pm$ 0,70 ^{ab}
	DMSO	7,61 $\pm$ 0,16 ^b	0,93 $\pm$ 0,12 ^c	8,42 $\pm$ 0,94 ^b
	CoQ10	4,13 $\pm$ 0,60 ^a	1,83 $\pm$ 0,08 ^e	2,23 $\pm$ 0,22 ^a
	RSV	5,32 $\pm$ 0,62 ^{ab}	1,56 $\pm$ 0,10 ^d	3,38 $\pm$ 0,16 ^a
Uygulama Grupları	HxCDD	25,63 $\pm$ 1,17 ^d	0,47 $\pm$ 0,02 ^a	54,63 $\pm$ 0,85 ^d
	HxCDD+CoQ10	14,11 $\pm$ 0,64 ^c	0,74 $\pm$ 0,04 ^b	19,08 $\pm$ 0,17 ^c
	HxCDD+RSV	14,63 $\pm$ 1,00 ^c	0,71 $\pm$ 0,05 ^b	20,61 $\pm$ 0,09 ^c

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen deney gruplarına ait değerler $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.9'da diğer dioksin gruplarında olduğu gibi HxCDD uygulama grubuna ait 25,63 $\pm$ 1,17 $\mu\text{mol/L}$ olan TOS değerinin kontrol gruplarına ait TOS değerlerinden (distile su için 6,37 $\pm$ 0,01 $\mu\text{mol/L}$ ve DMSO için 7,61 $\pm$ 0,16 $\mu\text{mol/L}$) yüksek; 0,47 $\pm$ 0,02mmol/L olan TAK değerinin ise kontrol gruplarına (distile su için 0,98 $\pm$ 0,10mmol/L ve DMSO için 0,93 $\pm$ 0,12mmol/L) göre düşük olduğu ($p < 0,05$) görülmektedir (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.29. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi

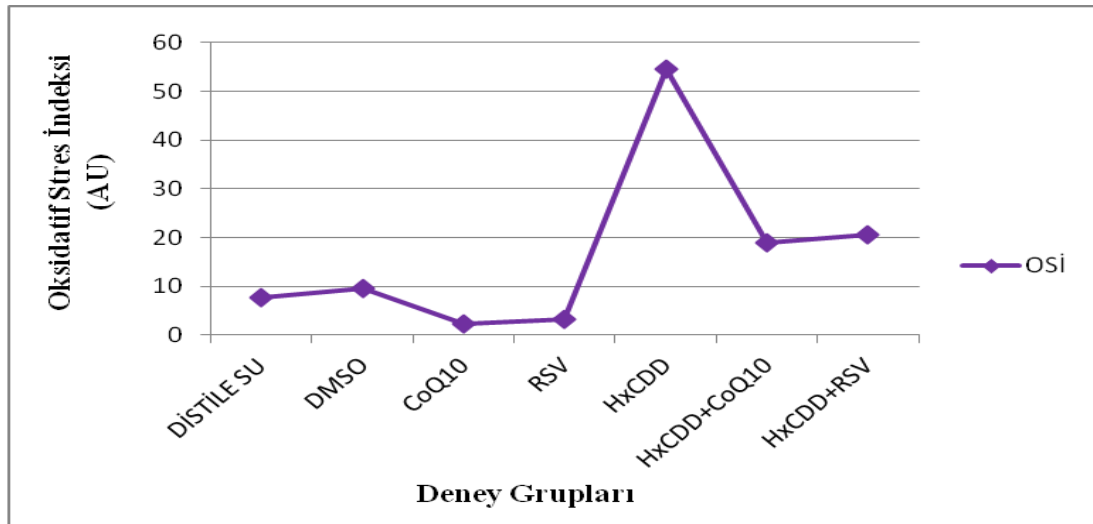


Şekil 4.30. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi

Antioksidan uygulama grupları olan HxCDD+CoQ10 ve HxCDD+RSV içinde TOS ve TAK değerleri ölçülmüştür ve $25,63 \pm 1,17 \mu\text{mol/L}$ olan HxCDD'ye ait TOS değerinin HxCDD+CoQ10'da $14,11 \pm 0,64 \mu\text{mol/L}$ 'ye ve HxCDD+RSV'de ise $14,63 \pm 1,00 \mu\text{mol/L}$ 'ye kadar düştüğü gözlenmiştir ($p < 0,05$). TAK değerleri ise

HxCDD'de $0,47 \pm 0,02 \text{ mmol/L}$ iken HxCDD+CoQ10'da $0,74 \pm 0,04 \text{ mmol/L}$ 'ye ve HxCDD+RSV'de de $0,71 \pm 0,05 \text{ mmol/L}$ 'ye kadar yükselmiştir ($p < 0,05$).

HxCDD uygulama grubu için, oksidatif stres indeksi $54,63 \pm 0,85$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer distile su ve DMSO'da $6,64 \pm 0,70$ ve $8,42 \pm 0,94$ 'dür. Aradaki fark istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir. HxCDD+CoQ10 ve HxCDD+RSV'de uygulama grupları için yine OSİ değerleri hesaplanmış ve sırasıyla $19,08 \pm 0,17$ ve $20,61 \pm 0,09$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.31). İki antioksidan grup arasındaki fark önemsizken ($p > 0,05$), HxCDD uygulama grubuna ait değerle ($54,63 \pm 0,85$) karşılaştırıldığı zaman aradaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.31. HxCDD ve HxCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi

4.3.4. 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD'nin oksidatif parametreler üzerine etkilerinin araştırılması

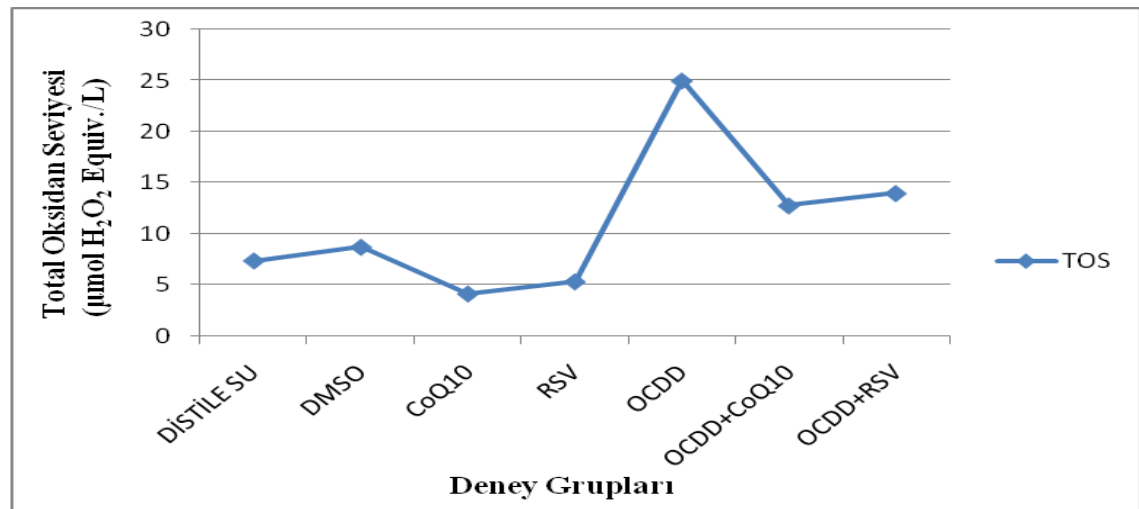
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD, 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD +CoQ10 ve 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD +RSV uygulamalarına maruz bırakılan *D. melanogaster*'in transheterozigot larvalarından elde edilen bireylerin total oksidan seviyeleri (TOS), total antioksidan kapasite (TAK) ve oksidatif stres indeksine (OSİ) ait veriler Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.10 dikkatle incelendiği zaman, OCDD uygulama grubuna ait total oksidan seviyenin

25,01±1,21µmol/L olduğu görülmektedir. Bu değer distile su kontrol grubunda 6,37±0,01µmol/L ve DMSO kontrol grubunda 7,61±0,16µmol/L olarak ölçülmüştür. Her iki kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark yok iken ($p>0,05$) kontrol ve dioksin uygulama grupları arasında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmiştir (Şekil 4.32).

Çizelge 4.10. OCDD ve OCDD+antioksidan uygulanan *D. melanogaster*'in ($mwh \times flr^3$) kontrol ve uygulama gruplarına ait oksidatif parametreler

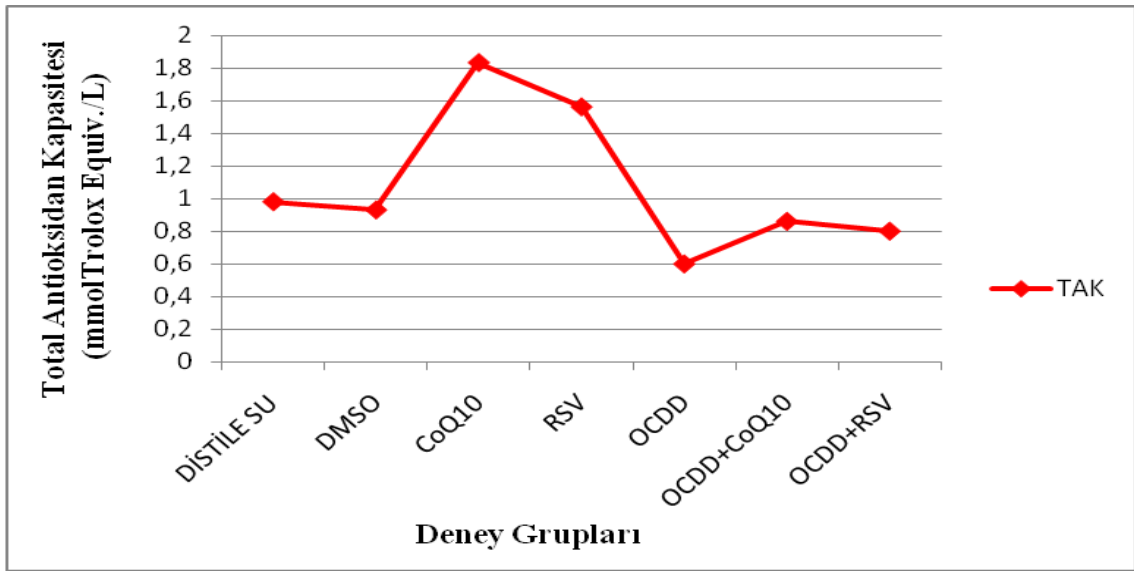
DENEY GRUPLARI		TOS (µmol H ₂ O ₂ Eqv./L)	TAK (mmol Trolox Eqv./L)	OSİ (AU)
Kontrol Grupları	Distile su	6,37±0,01 ^{ab}	0,98±0,10 ^c	6,64±0,70 ^{ab}
	DMSO	7,61±0,16 ^b	0,93±0,12 ^c	8,42±0,94 ^b
	CoQ10	4,13±0,60 ^a	1,83±0,08 ^e	2,23±0,22 ^a
	RSV	5,32±0,62 ^{ab}	1,56±0,10 ^d	3,38±0,16 ^a
Uygulama Grupları	OCDD	25,01±1,21 ^d	0,60±0,05 ^a	42,07±2,04 ^d
	OCDD+CoQ10	12,77±0,99 ^c	0,86±0,06 ^b	14,83±0,06 ^c
	OCDD+RSV	13,98±0,67 ^c	0,80±0,02 ^b	17,45±0,34 ^c

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen deney gruplarına ait değerler $p<0,05$ düzeyinde önemlidir.



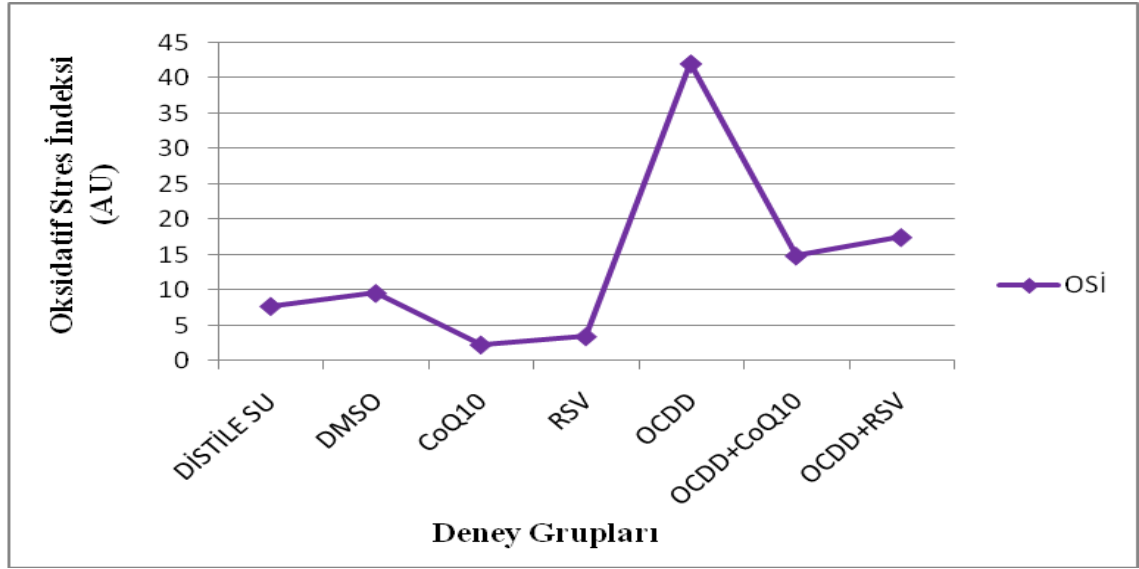
Şekil 4.32. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait TOS eğrisi

OCDD için $0,60 \pm 0,05 \text{ mmol/L}$ olan total antioksidan kapasitesi OCDD+CoQ10 ve OCDD+RSV uygulama gruplarında sırasıyla $0,86 \pm 0,06 \text{ mmol/L}$ ve $0,80 \pm 0,02 \text{ mmol/L}$ düzeyine kadar yükselmiştir ($p < 0,05$). Oksidatif stres indeksi ise OCDD uygulama grubunda $42,07 \pm 2,04$ iken OCDD+CoQ10'da $14,83 \pm 0,06$ ve OCDD+RSV'de de $17,45 \pm 0,34$ 'e kadar düşmüştür. OCDD'ye ait oksidatif stres indeksinin antioksidanlara bağlı olarak düşmüş olması istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).



Şekil 4.33. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait TAK eğrisi

OCDD'nin sebep olduğu total oksidan seviyesindeki artış ($25,01 \pm 1,21 \mu\text{mol/L}$), OCDD+CoQ10 uygulama grubu ile $12,77 \pm 0,99 \mu\text{mol/L}$ ve OCDD+RSV ile de $13,98 \pm 0,67 \mu\text{mol/L}$ düzeyine düşmüştür ve bu düşüş de $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir. Ancak OCDD+CoQ10 ve OCDD+RSV uygulama gruplarına ait TOS, TAK ve OSİ değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak $p > 0,05$ düzeyinde anlamlı farklar gözlenmemiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.34. OCDD ve OCDD+antioksidan deney gruplarına ait OSİ eğrisi

Deneylerimizde kullanılan 4 ayrı dioksin+CoQ10 ve dioksin+RSV uygulama grupları kendi aralarında da TOS, TAK ve OSİ değerleri bakımından istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Ancak antioksidanlarla ilgili hiçbir uygulama grubunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.10).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde başta kanser olmak üzere birçok kronik hastalığın temelinde çevresel kirleticilerin neden olduğu toksitenin rol oynadığı iyi bilinmektedir. Ekosistemin hemen her bölümünde eser miktarlarda bulunabilen, güçlü zehirli etkiye sahip çevresel kirleticilerden birisi olan dioksin ve benzeri bileşiklerin insan ve hayvanlar tarafından alınmasına bağlı olarak birçok olumsuz etki meydana gelmekte ve en kötüsü de bu olumsuz etkilerin giderek artan bir şekilde devam etme potansiyeline sahip olmasıdır. Çünkü bu bileşiklerin doğaya salıverilmeleri günden güne artmakta ve bu tür zehirlenme vakalarının çok daha ciddi problemler doğurmasını beklemekten daha önemlisi, sebep sonuç ilişkilerini dikkatle gözden geçirmek ve sebeplerin ortadan kaldırılabilmesi için alınacak önlemleri belirlemektir (USEPA 2004).

Bu çalışmada, ilk hedefimiz dioksinlerin olası toksik/genotoksik etkilerini belirleyebilmektir. Genotoksisite çalışmalarında yapılması gereken öncelikli işlem, çalışılacak maddenin uygulanacağı organizmanın yaşayabileceği doz aralığını belirlemektir. Çalışmalar için seçilen tüm dioksinler farklı konsantrasyonlarda olmak üzere besiyerlerine katılmış ve transheterozigot larvalar kronik muameleye tabi tutulmuştur. Amacımız, 72 ± 4 saatlik larvaların ergin bireye dönüşüncüye kadar tüm gelişim evrelerini bu besiyerinde geçirmelerini sağlamak ve dioksinler ile kronik beslenmeye bağlı olarak ergine dönüşüp dönüşemediklerini belirleyebilmektir. Belirli sayıda larvanın prepupaya, prepupadan pupa evresine geçip geçemediği, larva ya da pupa evresinde meydana gelen çeşitli malformasyonlar ve erginleşebilen/erginleşemeyen bireylerin sayıları/oranları canlılık deneyleri yapılarak belirlenmiştir. Ön çalışmalar ile belirlenen doz aralıkları kullanılarak yapılan yaşama yüzdesi (larval mortalite) deneylerinden elde edilen bulgulara göre, dioksin uygulama gruplarının tümünde larvadan ergine gelişebilen birey sayısını belirten hayatta kalış oranının kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Tüm dioksin uygulama grupları ayrı ayrı olmak üzere kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, konsantrasyon artışına paralel olarak hayatta kalış oranında gözlenen bu azalma istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Tüm uygulama gruplarında gözlenen bu

toksik etki, larvaya ve pupaya ait anormallikler (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3) ile ergine ait kanat, bacak ve toraks gibi çeşitli ekstremitelerde malformasyonlara sebep olmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.6). Açılamayan yumurta, gelişemeyen larva ve pupa, malformlu ergin bireylerin zayıf yapılı ve ömür uzunluklarının kısa olması (Altun Çolak vd 2012) gibi sebepler, *D. melanogaster*'e ait transheterozigot larvaların hayatta kalış oranlarını azaltmıştır. Aynı zamanda ergin birey sayısında da kontrol gruplarına göre önemli bir düşüş ($p<0,05$) gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Dioksin uygulama gruplarında, doz artışına bağlı toksisite sıralaması ise TCDD> PeCDD> HxCDD> OCDD olarak bulunmuştur.

Dioksinlerin rat ve fareler gibi çeşitli organizmalar üzerine olası etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, gelişimin erken dönemlerinde çok düşük dozlarda bile dioksin maruziyetinin yavru yaşayabilirliğinde azalmaya, yaşayabilen bireylerde yapısal malformasyonlara, gelişim geriliklerine ve fonksiyon kayıplarına sebep olduğu görülmüştür (Theobald *et al.* 2003).

Deney hayvanlarında dioksinlerin sebep olduğu toksik etki, hem canlı türüne hem de canlının gelişim dönemlerine özgü farklı etkiler göstermektedir (Sweeney and Mocarelli 2000; Martinez *et al.* 2003). Ergin hamsterlar için 1157- 5051 μ g/kg olan LD₅₀ değeri, en hassas tür olan Gine domuzları için 0,6- 1 μ g/kg olarak bulunmuştur. Ergin hamsterlar için bulunan bu değerin Gine domuzları için bulunan değere göre yaklaşık 1000 kat fazla olduğu görülmektedir. Organizmanın türüne bağlı olarak LD₅₀ değerinde gözlenen bu farklılık, embriyonal dönemde de gözlenmiştir. Ergin hamsterların embriyosunu etkileyen dioksin konsantrasyonunun, tıpkı ergin bireylerde olduğu gibi Gine domuzlarının embriyolarından da 12 kat fazla olduğu bulunmuştur (Olson *et al.* 1991; Theobald *et al.* 2003; Yonemoto *et al.* 2005). Couture (1990) tarafından yapılan bir çalışmada, gebeliğin 6. gününde tek doz (24 μ g/kg) TCDD verilen C57BL/6 farelerinde ölü doğum sayısının arttığı, buna karşın gebeliğin 12. veya 14. gününde yapılan uygulamalarda herhangi bir teratojenik etkinin olmadığı gözlenmiştir.

Gebeliğin 15. gününde oral olarak tek doz (0,064 μ g/kg) TCDD verilen dişi Holtzman ratlarından doğan erkek bireylerin üreme sistemi üzerinde yapılan bir çalışmada ise,

erkek ratlarda spermatogeneziste azalma ve eşey organ malformasyonları görülmesine rağmen fertilitenin etkilenmediği bildirilmiştir (Mably *et al.* 1992a, b, c). Benzer şekilde, perinatal dönemde TCDD'ye maruz kalan dişi Long- Evans ratlarında da gelişim gerilikleri ile eşey organ anomalileri gözlenmiş ancak östrojen seviyesinde, ovaryum fonksiyonlarında ve fertilitede bir farklılık görülmemiştir (Gray *et al.* 1997).

Yapılan başka bir çalışmada, dişi ve erkek hamsterlara intraperitoneal olarak tek doz 0, 5, 25, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000/3000µg/kg vücut ağırlığı dozlarında TCDD verilmiş ve 500µg/kg vücut ağırlığından daha yüksek dozlarda ölüm gerçekleştirdiği saptanmıştır (Olson 1980). Gasiewicz *et al.* (1980) ise yaptığı bir çalışmada, 50ng/kg dioksin uygulanan ratlarda hiçbir hayvanın ölmediğini, 500ng/kg uygulamasında ölümlerin 62-86. günler arasında oluştuğunu, 1000ng/kg uygulamasında ise ölümlerin 42- 58. günler arasında meydana geldiğini gözleyerek doz artışına bağlı erken ölümlerin oluşabileceğini bildirmiştir.

Dişi ve erkek Swiss-Webster farelere 13 hafta boyunca haftada 3 kez 0,01- 50µg doz aralığında 1,2,3,6,7,8-HxCDD ve 1,2,3,7,8,9-HxCDD karışımının verildiği dermal uygulama deneylerinde, mortalite ve histopatolojik değişim insidanslarına bakılmış, 10µg uygulama dozunda dişi farelerde %80; 25- 50µg uygulama dozlarında ise hem dişi hem de erkek farelerde %100 mortaliteye rastlanılmıştır. Ayrıca her iki eşeyde de lenfoid ve karaciğer doku harabiyetleri tespit edilmiştir. Dişi ve erkek farelerin HxCDD karışımlarına maruz bırakıldığı bu çalışmada, pozitif kontrol olarak kullanılan TCDD'nin karsinogenik olduğu ancak HxCDD'nin dişi ve erkek fareler için karsinogen etkili olmadığı da gözlenmiştir (National Toxicology Program 1980).

Kociba *et al.* (1976) ratlarda TCDD'ye kronik maruz kalmanın fertilitiyi etkilediğini bildirmişlerdir. TCDD ve diğer dioksinler, erkek ratlarda spermatogenezisi bozmakta ve testis ağırlığında azalmaya neden olmaktadır. Dişilerde ise uterus ve ovaryumlarda görülen morfolojik lezyonların östrus siklusunu baskıladığı ve buna bağlı olarak plazma progesteron ve östrojen düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (ten Tusscher and Koppe 2004). Bileşiminde TCDD ve PeCDD'nin bulunduğu bir karışımın dişi ve erkek ratlara

verildiği bir çalışmada, kilo kaybı, sperm miktarında azalma, pubertede gecikme ve morfolojik yapıda birtakım anomaliler gözlenmiştir (Hamm *et al.* 2003). Deney fareleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise TCDD toksisitesinin cinsiyete göre farklılık gösterdiği ve toksik etkinin erkek farelerde dişi farelere göre daha az olduğu, bu durumun ise dioksinlerin dişilerin dokularında daha fazla birikmesi ve birikime bağlı olarak yarılanma ömürlerinin daha uzun olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Pohjanvirta 2009).

Dioksinlerin bir grubu olan poliklorlu bifenil (PCB) ve Clophen 30 ve Clophen 50 karışımları, *D. melanogaster*'de larval evreden itibaren ergin bireye kadar tüm gelişim süresince kronik muameleye bağlı olarak, gelişim geriliğine neden olmuştur (Berit and Ramel 1974). Bu bilgiler, bizim deneylerimizden elde ettiğimiz larval mortalite artışı, malformlu bireylerin oluşması ve gelişim geriliği gibi sonuçlarla büyük ölçüde uyushmaktadır.

İnsanlarda da, TCDD/F ve PCB maruziyetinin testosteron seviyesinde düşüşe sebep olarak üreme sistemi üzerine olumsuz etki yaptığı ve bu maddeye maruz kalan kişilerde ve onların çocuklarında bazı doğumsal anomalilerin olduğu tespit edilmiştir (Erickson 1984). Yine, Japonya (1968) ve Tayvan'da (1978/1979) pirinç yağının PCDD/F ve PCB ile kontaminasyonu ile meydana gelen zehirlenmelerden sonra yeni doğan bebeklerde prenatal mortalite, düşük doğum ağırlığı, azalmış kas ve geniş alın yapısı ile topuk anomalisi gibi bazı yapısal bozuklukların görüldüğü bildirilmiştir (Rogan *et al.* 1988).

İnsanlar ve deney hayvanları üzerinde 2,3,7,8-TCDD ve 2,3,7,8 pozisyonlarında klor atomu bulunduran diğer dioksin ve furanların toksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışmadan elde edilen bulgular, bu bileşiklerin; karaciğer hasarı, immün sistemi baskılama, kanser oluşumuna neden olma, fetus gelişiminde anormallikler, gelişim ve üreme üzerine toksik etkiler, cilt lezyonları, büyüme ve diğer hormonlarda değişiklikler ve metabolik enzimlerin indüksiyonu gibi toksik etkilerinin olduğunu göstermektedir (Schechter *et al.* 2006; Ao *et al.* 2009). Deney hayvanlarında dioksinlere bağlı akut toksisiteden kaynaklanan ölüm olaylarının wasting sendromu (glukoneojenezinin

inhibisyonu ile gıda alımının azalması ve kilo kaybı ile seyreden hastalık), anemi, hemoraji, timik atrofi, kemik iliğinde hücresel yoğunluk, vücut yağı ve kas kütlesindeki azalmalarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (USEPA 1999, 2003). Hayvanlarda dioksin zehirlenmelerinin en önemli belirtilerden birisi olan yağ ve kas doku kütlesindeki azalma, canlı ağırlık kaybına sebep olmaktadır. Bu durumda kilo kayıpları ölüme kadar yavaş yavaş devam eder ve ölüm anında deney organizmalarında yaklaşık %50 düzeyinde ağırlık kayıpları görülür. Ancak ağırlık kayıpları, tek başına ölümlerin nedeni olarak gösterilemez. Mitrou *et al.* (2001)'a göre, dioksin toksisitesine bağlı olarak gıda ve su alımının azalmasıyla birlikte sindirim kanalından gıdaların geri emiliminin bozulması da ölümleri tetiklemektedir.

Peters *et al.* (1999) tarafından aril hidrokarbon reseptörlerine (AhR) sahip olan ve bu reseptörü taşımayan dişi farelere gebeliğin 10. günü tek seferde 25mg/kg TCDD uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, Ah reseptörüne sahip olan farelerde prenatal dönemde herhangi bir mortalite görülmezken, Ah reseptörünü taşımayan dişi farelerde prenatal mortalite artmış ve fetüslerde de büyük oranda hasar gözlenmiştir. Mimura *et al.* (1997)'a göre, Ah reseptörüne sahip olan dişi farelerde TCDD'ye bağlı teratojenik hasar, Ah reseptörünü taşımayan dişi farelere göre daha az olmuştur. Bu bilgilere göre, TCDD ve diğer dioksinlerin sebep olduğu prenatal mortalitedeki artış, kısmen Ah reseptöründen kısmen de bu mekanizmadan farklı bağımsız mekanizmalar ile meydana gelmektedir.

Bu çalışmada, *D. melanogaster*'in çeşitli gelişim dönemlerinde gözlenen ve dioksinlerin neden olduğu toksik etkinin, organizmanın hormon seviyelerinde ve/veya hücreler arası sinyal yollarında doğrudan ya da dolaylı olarak meydana gelen birtakım değişiklikler sonucu serbest radikal oluşumunun artmasıyla oluşabilecek metabolik oksidasyon ve oksidatif stres kaynaklı olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmaların ikinci aşamasında, çeşitli dioksinlerin genotoksitesi *in vivo olarak Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile ilk kez değerlendirilmiştir. Dioksinlerle daha önceden gerçekleştirilmiş kanat benek testi

alışmasına literatür taramalarında rastlanılmaması, ayrıca ökaryotik model bir organizma olan *D. melanogaster*'in insana büyük oranda benzerlik göstermesi elde edilen veriler açısından son derece önemlidir (Valencia *et al.* 1984; Kaya 2000).

Dioksinlere ait genotoksik etkilerin *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması amacıyla, dioksin uygulama grupları (TCDD, PeCDD, HxCDD ve OCDD) ile birlikte negatif ve pozitif kontrol grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak ise EMS kullanılmıştır. Ayrıca dioksinlerin DMSO ile çözündüğü dikkate alınarak DMSO kontrol grubu da çalışmalara eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (1×10^{-7} , $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} ve 10×10^{-7} µg/mL) hazırlanan dioksinler, 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalara uygulanmıştır. Dioksinlerin 10×10^{-7} µg/mL dozundan daha yüksek dozları (15×10^{-7} - 20 µg/mL) da yapılan ön çalışmalar esnasında transheterozigot larvalara uygulanmış, ancak dioksinlerin bu yüksek dozları larval dönemde toksik etki gösterdiğinden hiç canlı birey elde edilememiştir. Bu nedenle, 10×10^{-7} µg/mL dozdan daha yüksek uygulamaların mutajenik aktiviteleri çalışılamamıştır. Dioksin uygulamalarından elde edilen sonuçlar DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında, hem *mwh/flr³* hem de *mwh/TM3* genotipine sahip bireylerin kanatlarında gözlenen küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekanslarının konsantrasyon artışına paralel olarak artmasına (Çizelge 4.3, Çizelge 4.6) rağmen istatistiksel olarak önemli olmadığı ve çalışılan dioksinlerin mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir.

Çalıştığımız organizma ile ilgili olarak bu konuda daha önce yapılan çalışmalara rastlanmadığı için, dioksinlerden kaynaklanan sonuçlarımızı diğer organizmalar ile karşılaştırmak zorundayız.

Klasik genotoksisite testleri ile çeşitli organizmalar üzerinde dioksinler ve bu grubun bir üyesi olan TCDD'nin genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, pozitif sonuçların yanı sıra, negatif sonuçların olduğu yönünde de literatür bilgisi mevcuttur (IARC 1997; Huff *et al.* 1994; Whysner and Williams 1996). Daha önce yapılan bir çalışmada, TCDD'nin Aroclor 1221 ve Aroclor 1260 maddeleri ile birlikte verildiği fare

embriyolarında kromozomal delesyonlar tespit edilmiştir (Schiestl *et al.* 1997). Ancak bir başka çalışmada, dioksinlerin L5178Y farelerinin lenfoma ve C57Bl/6J ile DBA/21 farelerinin kemik iliği hücrelerinde kromozomal hasarlara yol açmadığı gözlenmiştir (Meyne *et al.* 1985; McGregor *et al.* 1991). Thornton *et al.* (2001) tarafından yapılan bir çalışmada da, 6 hafta boyunca tek seferde 2µg/kg TCDD uygulanan dişi ve erkek ratlarda herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Yine 0,8µg/mL TCDD uygulanan Çin hamster ovaryum hücrelerinde, kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri yapılarak kromozomal aberasyonların (KA) olup olmadığı incelenmiştir. Sonuçta yapısal olarak herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (Galloway *et al.* 1987).

Fahrig (1993), vücut rengi bakımından heterozigot genotipe sahip farelerle yapmış olduğu bir çalışmada, TCDD ve iki farklı PCDD karışımının (PCDD 1 ve PCDD 2) genotoksik aktivitesini test etmiştir. Çalışmaların sonucunda ne TCDD ne de PCDD tek başına herhangi bir toksik etki göstermezken karsinojenik bir mutajen olan etil nitrozüre (ENU) ile birlikte genotoksositeye sebep olmuşlardır. Aynı çalışmada, PCDD'ye ait genotoksik etkinin az olmasına rağmen TCDD'nin hem mutajenik ve hem de ENU ile eş değerde rekombinojenik etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca TCDD ENU'nun genotoksik etkisini arttırarak tümör promotörü olarak etkili bir rol oynamıştır.

Yine, Rhesus maymunlarının diyetine 4 yıl boyunca günlük 25ppt TCDD'nin eklendiği *in vivo* bir çalışmada, TCDD'ye maruz kalmış maymun lenfositlerinde kromozomal aberasyon (KA) ve kardeş kromatid değişim (KKD) testi sonucunda herhangi bir genotoksik etki gözlenmemiştir (Lim *et al.* 1987).

D. melanogaster'in larva ve ergin bireylerinin halojenli aromatik hidrokarbonlardan olan poliklorlu bifenil (PCB) karışımı ile beslendiği çalışmada, kromozom aberasyonu ve ayrılmamanın bir ölçüsü olarak eşey kromozom kaybı ölçülmüş ancak genetik toksisite testleri sonucunda PCB'nin klastojenik bir etkisi gözlenememiştir (Berit and Ramel 1974). Yine, *D. melanogaster*'e çeşitli konsantrasyonlarda (50, 250 ve 500ppm) TCDD verilen bir çalışma sonucunda erkek bireylere ait germ hücrelerinde eşeye bağlı resesif letal bir mutasyon görülmemiştir (Zimmering *et al.* 1985).

Dioksin maruziyetinden sonra kan lipid seviyesindeki dioksin miktarının 40pg'ın çok üstünde olduğu belirlenen 27 işçi üzerinde yapılan bir başka çalışmada da, lenfosit hücrelerinde kromozomal aberasyona ve kardeş kromatid değişimine rastlanılmamıştır (Zober *et al.* 1993). Valic *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada ise, işyerinde 2,3,7,8-TCDD maruziyetinden dolayı zehirlenen iki kişi üzerinde TCDD'nin olası genotoksik ve karsinojenik etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, hastaların periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testlerini kullanmışlardır. Sonuçta, MN frekansının kontrol grubu bireylerine göre arttığı ancak KKD frekansında önemli bir artışın olmadığı ve bu verilerin 13 aylık bir süre sonunda normal değerlere döndüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte, comet testi sonucunda DNA'da kırıkların meydana gelmesine bağlı olarak pozitif bulgular da elde edilmiştir. Tüm bu verilerden yola çıkarak, TCDD'nin insan kanı lenfosit hücrelerinde genotoksik etki göstermese de özellikle DNA üzerindeki etkilerinden dolayı muhtemelen karsinojenik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Buna ilaveten, Nagayama *et al.* (1995), insan lenfositlerinde 2,3,7,8-TCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF ve 3,4,5,3',4'-Co-PeCB gibi dioksinlerin karsinojenik ve mutajenik maddelerin neden olduğu biyolojik ve genetik hasarın bir göstergesi olan kardeş kromatid değişim frekansını artırarak genotoksik potansiyelin bir indikatörü sayılabilecek toksisiteye sahip olduklarını göstermiştir.

Dioksinlerin canlılar üzerindeki etkileri ile ilgili literatür bilgileri incelendiği zaman, onların doğrudan genotoksik etkili olmadıkları ancak kanseri başlatıcı ve teşvik edici özellik gösterdikleri bilgisi hakimdir. Dioksin ve benzeri bileşiklerin toksik ve biyokimyasal etkilerinin bir çoğunu, onları yüksek ilgiyle bağlayan aril hidrokarbon reseptörleri (AhR) olarak bilinen spesifik hücresel bir protein vasıtasıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir (Schechter *et al.* 2006). TCDD gibi yüksek afiniteli ksenobiyotiklerin ligand ile bağlanmasını takiben oluşan ligand-AhR kompleksleri sitoplazmadan hücre çekirdeğine geçer. Bu kompleks, çekirdekte bulunan Aril nükleer translokatoru (Arnt) ile tekrar bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin, Sitokrom P450 CYP 1A1 genine bitişik gen dizilerine (ksenobiyotik cevap elementleri) bağlanması; DNA'nın kırılmasına, kromatinin bozulmasına, promotor aktivitesinin artmasına, CYP

1A1 geninin transkripsiyonun artmasına ve sonunda da sitokrom P450 1A1- spesifik mRNA birikimine sebep olmaktadır (Mitrou *et al.* 2001; Mandal 2005).

Ah reseptörünün gelişimsel ve homeostatik süreçlerde önemli bir faktör olduğunu düşündüren pek çok kanıt bulunmaktadır. Ah reseptörü, bHLH-PAS (basic helix-loop helix/Per-Arnt-Sim) ailesinin bir üyesi olan ligand aktive edici bir transkripsiyon faktörüdür (Hahn 1998). Ancak bir istisna olarak yuvarlak solucanlardan *Caenorhabditis elegans*, yumuşakcalardan *Mya arenaria* ve eklem bacaklılardan *Drosophila melanogaster*'de, omurgalılardaki Ah reseptörünün homoloğu olan reseptör proteinin gen bölgesindeki amino asit dizilerinin farklılığından dolayı bu reseptöre dioksin bağlanamamaktadır (Butler *et al.* 2001). Omurgalılardaki Ah reseptörünün homoloğu *D. melanogaster*'de Spineless (Ss), aril nükleer translokaz (Arnt) homoloğu ise Tango (Tgo) proteinidir. Ah reseptörü, PAS-A ve PAS-B olmak üzere iki domain içermektedir. *D. melanogaster*'de ligand bağlanma bölgesi olan PAS-B domaini, muhtemelen diğer omurgasızlarda olduğu gibi, omurgalıların PAS-B domaininden amino asit dizisi farklı olduğu için, AhR homoloğu olan Ss proteini dioksin bağlayamamaktadır (Duncan *et al.* 1998; Emmons *et al.* 1999; Hahn 2002; Qin *et al.* 2006; Céspedes *et al.* 2010). Dioksinlerin, kanat benek testi ile genotoksik etkisinin araştırıldığı bu çalışmada herhangi bir mutajenik etkinin gözlenmemiş olması literatür bilgileri ile de desteklenmektedir.

Literatürde *in vivo* ve *in vitro* dioksin maruziyetinden sonra, doğrudan genotoksik etkinin gözlenmediği ancak sekonder bir etki ile oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarlarının gözlemlendiğine dair pek çok çalışma mevcuttur. Bu noktadan hareketle, bu çalışmanın bir diğer aşamasında, dioksin uygulama gruplarında artan konsantrasyona bağlı olarak transheterozigot larvalardan elde edilen ergin birey sayılarının azalmasına ve hem *mwh/flr³* (normal kanat fenotipli) hem de *mwh/TM3* (serrat kanat fenotipli) genotipine sahip kanatlarda çeşitli klonların frekansının artışına neden olan toksik etkinin, antioksidan sistemlerin baskılanmasıyla ilişkili olup olmadığını belirlemek amacıyla biyokimyasal analizler yapılmıştır. Bu analizlerde *D. melanogaster*'in transheterozigot larvalarından erginleşebilen bireylerin total enzim aktiviteleri

incelenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2.2.a ve 3.2.2.b’de belirtildiği gibi, *Drosophila* kanat benek testi çalışmalarında kullanılan dioksinlere ait en yüksek konsantrasyon olan $10 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ ile antioksidanlardan Koenzim Q10 için $150 \mu\text{g/mL}$ ve Resveratrol için $100 \mu\text{M}$ dozları kullanılarak, dioksinler ve dioksin+antioksidan uygulama grubu olmak üzere iki ayrı deney seti hazırlanmıştır.

Oksidatif parametrelerinin belirlenmesi amacıyla, dioksin uygulanan transheterozigot larvalardan erginleşebilen bireylerin, total oksidan seviyesi (TOS), total antioksidan kapasite (TAK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerine bakılmıştır. Tüm dioksinlere ait uygulama gruplarında kontrol grubuna göre TOS değerlerinin oldukça yüksek, TAK değerlerinin ise düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.10). TOS ve TAK değerlerinde kontrol grubuna göre gözlenen bu değişiklikler istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir. Ayrıca total oksidan aktivitenin total antioksidan kapasiteye bölünmesi ile elde edilen OSİ değerinin kontrol grubuna göre yüksek olması (Çizelge 4.7, Çizelge 4.10) da toksik etkinin varlığını göstermektedir.

Çalışmada, biyokimyasal testlerle ilgili olarak yapılan dioksin+antioksidan uygulama gruplarında da yine TOS, TAK ve OSİ değerleri ölçülmüştür. Ekzojen kaynaklı kullanılan KoenzimQ10 ve Resveratrol antioksidanlarını da içeren uygulama gruplarında, yalnızca dioksin içeren uygulama gruplarına göre TOS değerlerinin düşerek, TAK değerlerinin artması istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7, Çizelge 4.10). Yine bu grup için, oksidatif stres indeksinin kontrol grubuna göre daha düşük çıkmış olması da çalışmalarda dioksinlere bağlı olarak gözlemiş olduğumuz toksik etkinin antioksidanlar ile inhibe edilebildiğini göstermektedir. Bizim bu bulgularımızı destekleyen pek çok literatür bilgisi mevcuttur.

Yapılan birçok çalışmada, dioksinlerin uzun süreli uygulanmasına ya da uzun süreli maruziyetlere bağlı toksisitede, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı, dioksin bileşiklerinin, P450 enzimlerinin sentezini arttırmalarının bir sonucu olarak; moleküler oksijen taşınmasının arttığı ve bu durumun reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve lipid peroksidasyona yol açtığı bildirilmiştir (Alsharif *et al.* 1994; Hassoun *et al.* 2002;

Slezak *et al.* 2000). TCDD ve dioksin çeşitlerine maruziyetinden sonra oksidatif stres oluşumu ile sonuçlanan ve Ah reseptöründen bağımsız bir başka mekanizma daha bulunmaktadır. Mekanizmanın henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, dayanağı oksidatif stres göstergesi sayılan süperoksit oluşumudur. Hücrede süperoksitlerin oluşumu, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) miktarını, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını arttırmakta; indirgenmiş glutatyon (GSH) içeriğini, karaciğer membran akışkanlığını, protein olmayan sülfhidril ve NADPH içeriğini de azaltarak oksidatif stresi uyarmaktadır. Bu bilgiler çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Kern *et al.* 2002; Senft *et al.* 2002; Chan *et al.* 2004).

Ayrıca, TCDD'ye maruz kalan gebe deney hayvanlarında amniyon sıvısında malondialdehit, formaldehit, asetaldehit ve aseton seviyelerinin kontrole göre artması sonucu prenatal ölümlerin meydana gelmesi ve bu durumun serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olduğu da rapor edilmiştir (Hassoun 1995). Farklı dozlarda subkronik TCDD uygulamalarının, ratlarda oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkileri ve bu etkiler üzerine bir çeşit gıda antioksidanı olan likopenin koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada, likopenin karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında TCDD'nin neden olduğu lipid peroksidasyonu azaltarak antioksidan aktiviteyi destekler mahiyette koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Sakin 2008).

Shertzer *et al.* (1998) tarafından yapılan bir başka çalışmada, dişi farelere 3 gün 5µg/kg TCDD uygulamasının 8 hafta kadar devam eden güçlü bir oksidatif stres cevabına neden olduğu bildirilmiştir. Yine, yapılan bir çalışmada, 13 hafta boyunca oral yolla 0; 0,45; 1,5; 15 ve 150ng/kg/gün TCDD verilen dişi B6C3F1 farelerin beyin dokularında oksidatif stresin tetiklendiği rapor edilmiştir (Hassoun *et al.* 1998). Yine Sprague–Dawley ratlarının ve C57BL/6 farelerinin karaciğerinde, ratların peritoneal lavaj hücrelerinde, fetüs ve plasentasında ve fare beyin dokularında oksidatif stres kaynaklı DNA hasarları gözlenmiştir (Yoshida and Ogawa 2000). Yapılan çalışmalarda, poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinlere maruz bırakılan deney hayvanlarında oksidatif stresin artmasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin oluştuğu, lipid peroksidasyonunun

hızlandığı, bunların sonucunda da DNA hasarlarının sayısında önemli derecede artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Dioksin bileşiklerinin, P450 enzimlerinin sentezini artırmalarının bir sonucu olarak, moleküler oksijen taşınması artar ve bu da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve lipid peroksidasyonuna yol açar (Kern *et al.* 2002). TCDD uygulanan rodentlerde, oksidatif stres artışına bağlı olarak süperoksit oluşumu ile lipid peroksidasyonun arttığı ve DNA tek sarmalında kırılmaların olduğu belirlenmiştir (Wahba *et al.* 1988; Bagchi and Stohs 1993).

2,3,7,8-TCDD ile uyarılmış rat karaciğer hücrelerinin yaşayabilirliği üzerine antioksidan bir madde olan astaksantin (ASTA) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, çeşitli oksidatif stres parametrelerine (laktat dehidrogenaz aktivitesi, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin miktarı, total antioksidan kapasitesi ve oksidatif stres seviyesi) ve karaciğer hücrelerinde mikronükleus oranlarına bakılmıştır. TCDD'nin hücre yaşayabilirliğini önemli ölçüde düşürdüğü, rat karaciğerinde TOS değerinin artarak TAK değerinin düştüğü, artan dioksin dozuyla kontrole göre mikronükleus oranının ve 8-OHgd miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ayrıca ASTA'nın TCDD'nin karaciğer üzerindeki toksik etkisini en aza düşürdüğü de belirtilmiştir (Türkez *et al.* 2012).

2,3,7,8-TCDD ile uyarılmış rat böbrek hücreleri üzerine kuersetin (Q) ve krisin (CH) koruyucu etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, tiyobarbitürik asit reaktifi, glutatyon (GSH), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçta, TCDD'nin lipid peroksidasyonuna yol açarak ratlardaki antioksidan aktivitesini düşürdüğü, kuersetin ve krisin ile TCDD'nin sebep olduğu enzim seviyelerindeki (GSH, CAT, GPx ve SOD) düşüşün önlendiği ve artan tiyobarbitürik asit reaktifi oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca TCDD'nin sebep olduğu böbreklerdeki doku hasarı da giderilmiştir (Ciftci *et al.* 2012).

Dioksinlerin bitkiler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, PCDD/F'lerin bütün bitki hücrelerinde birikerek malondialdehit (MDA) miktarını artırdığı ve hücre yapısının bozduğu gözlenmiştir. Ayrıca oksidatif hasara bağlı olarak bitki

hormonlarından jasmonat (JA) seviyesi azalırken indol asetik asit (IAA) ve absisik asit (ABA) seviyeleri artmıştır. Artan çeşitli enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz) ve hormon seviyeleri sayesinde bitki hücreleri dioksin toksisitesine karşı hücrel bir koruma sağlamıştır (Zhang *et al.* 2012)

Dioksin tarafından oluşturulan toksik etkinin, Ah reseptörü içermeyen mekanizmalar tarafından da meydana getirildiği gözlemlenmiştir (Ishida *et al.* 2005). Bu mekanizmalarla ilgili olarak; protein kinazlar, fosfolipaz C ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörlerinde meydana gelen dioksin kaynaklı değişikliklerin de oksidatif strese neden olabileceği ileri sürülmektedir (Srogi 2008).

Dioksinlerin neden olduğu oksidatif stres ve diğer toksik etkileri üzerine endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanların koruyucu ve iyileştirici etkileri ile CoQ10 ve Resveratrol'ün çeşitli ksenobiyotiklere karşı antioksidan etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır.

2,3,7,8-TCDD, büyüme hormonlarını etkileyerek oksidatif strese, hücreler arası ilişkileri etkileyerek hücre proliferasyonuna, apoptozise, sitotoksik hasara ve immün sistemi düzenleyen bazı maddelere etki ederek tümör oluşum proseslerinin harekete geçmesine neden olabilmektedir (Rao and Balachandran 2003). Antioksidan tedavisi, TCDD gibi çeşitli dioksinlerin toksik etkilerine karşı koruyucu etki yapmaktadır (Latchoumycandane and Mathur 2002; Hassoun *et al.* 2003; Alsharif and Hassoun 2004). Suda çözünabilir bir antioksidan olan butillenmiş hidroksi anisolün ratlara enjekte edilmesi ile TCDD'nin letal bir dozundan kısmi korunma sağlandığı ve lipid peroksidasyonunun baskılandığı tespit edilmiştir (Hassan *et al.* 1985). Vitamin A, vitamin C, karotenoidler ve doğal bitkisel bir fenolik bileşik olan ellagik asitin de TCDD'nin oksidatif etkilerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Hassoun *et al.* 2003).

4- 13 hafta boyunca diyetlerine CoQ10 (150mg/kg/gün) eklenen sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, beyin dokusunda antioksidan

potansiyelin artarak oksidatif strese karşı koruyucu etki olduğu belirlenmiştir (Kwong *et al.* 2002). *Drosophila* üzerinde parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ve bileşiminde CoQ10'un da bulunduğu antioksidan ve antienflamatuar nöroprotektif ilaçların test edildiği bir çalışmada, CoQ10'un dopamin seviyesi ve nöron sayısında herhangi bir değişikliğe sebep olmadan oksidatif stresi önleyerek hastalık üzerine güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Faust *et al.* 2012).

İnsan lenfositlerinde hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif DNA hasarı comet testi ile araştırılmış ve CoQ10'un doğrudan DNA hasarını onarmada etkili olmayıp oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir (Tomasetti *et al.* 1999). Başka bir çalışmada ise, endojen ve ekzojen kaynaklı CoQ10'un düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonu önlemede α - tokoferol, likopen ve beta-karotene göre daha etkili olduğu görülmüştür (Stocker *et al.* 1991). Yine, parkinson hastalarının beyin dokularında görülen oksidatif stres ve doku harabiyeti üzerine endojen ve ekzojen kaynaklı CoQ10'un koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ebadi *et al.* 2001)

Aflatoksin B1'in (25 μ g/kg vücut ağırlığı) rat karaciğerinde neden olduğu oksidatif stres üzerine Curcumin (200mg/kg vücut ağırlığı) ve Resveratrol'un (10mg/kg vücut ağırlığı) koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, lipid peroksidasyonu ile azalan GSH, SOD, CAT ve GSH-Px enzim seviyelerinin Curcumin'e göre daha az oranda olmakla birlikte Resveratrol tarafından yükseltildiği ve doku hasarının önüne geçildiği belirlenmiştir (El-Agamy 2010).

Martinez and Moreno (2000), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, peritoneal makrofajlarının uyardığı lipopolisakkarit (LPS) ve forbol esterler (PMA) tarafından üretilen süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksitin yol açtığı lipid peroksidasyonunun, resveratrolün oksidatif stresi düşürerek doku hasarının inhibe edilmesi şeklinde önlendiğini bildirmişlerdir.

Matsuoka *et al.* (2001) tarafından ames testi ve *in vitro* KKD, MN ve KA testleri ile yapılan bir çalışmada, bakteriyel geri mutasyon testi ile resveratrolün mutajenik olmadığı

ve diğer genotoksi testler ile de Çin hamsterlarının akciğer hücre hatlarında nokta mutasyonlarına ve çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmadığı rapor edilmiştir.

Resveratrolün vitamin C ve vitamin E ile kombinasyonu, okside lipoproteinlerle oluşturulan hücre ölümünü, bu antioksidanların tek başlarına kullanılmalarından çok daha etkin bir şekilde önlemektedir (Chanvitayapongs *et al.* 1997). Resveratrol içeren üzüm çekirdeği ekstralarının, fare beynindeki glia hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğu da gösterilmiştir (Royshowdhury *et al.* 2001). 100µM NADH/NADPH oksidaz ile sıçan aort damarında meydana gelen süperoksit oluşumunun ise 1- 10µM resveratrol ile neredeyse tümüyle ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Orallo *et al.* 2002).

Resveratrolün ames testiyle ve fare kemik iliği mikronükleus testiyle *in vivo* olarak N-metil N- nitrozoüre (MNU), promutajen kuinolin ve aflatoksin B₁'e karşı metabolize edici enzimleri baskılayarak veya bu maddelerin DNA kırıkları oluşturmalarını engelleyerek antigenotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Langova *et al.* 2005). Bir başka çalışmada, resveratrol uygulamasının, insan ve deney hayvanlarında reaktif oksijen türlerinin birikmesini engelleyerek sigara bileşenlerinin indüklediği DNA kırıklarını önlediği gösterilmiştir (Sgambato *et al.* 2001). Sıçanlarda 16mg/kg resveratrol uygulamasının, potasyum bromatın (KBrO₃) neden olduğu oksidatif DNA hasarını tümüyle önlediği belirtilmiştir (Cadenas and Barja 1999). Uenobe *et al.* (1997), *Salmonella typhimurium*'da ames testi ile promutajen Trp-P-1'in indüklediği mutasyonlara karşı resveratrolün baskılayıcı etkisini göstermişler ve bu durumu resveratrolün metabolize edici enzimleri baskılamasıyla ilişkilendirmişlerdir.

D. melanogaster'in ergin dişi ve erkek bireylerinde metabolizma ve lipid peroksidasyonu üzerine %3'lük DMSO'da çözünmüş 1µM trans-resveratrolün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 21 gün boyunca lipid, trigliserit, kolesterol, glikojen ve protein miktarları ile lipid peroksidasyon değerleri ölçülmüş her iki eşeye ait değerlerin yakın olduğu ve resveratrolün düzenleyici ve koruyucu etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Dutra *et al.* 2009). Öte yandan resveratrolün *Drosophila*'da ömür uzunluğu

üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, 0,2mM resveratrolün ömür uzunluğunu arttırdığı da belirtilmiştir (Bauer *et al.* 2004; Bass *et al.* 2007).

Yapılan bir başka çalışmada, insanlarda düşük dansiteli lipoproteine eklenen trans-resveratrolün bakırla katalizlenen oksidasyonu önlediği gösterilmiş, 10µmol/L resveratrol konsantrasyonunun LDL peroksidasyonunu kırmızı şarabın polifenolik eksraktına göre daha güçlü şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. Kırmızı şarabın polifenolik ekstraktlarından resveratrolün, epikateşin ve kersetinden daha güçlü bir şekilde LDL peroksidasyonunu önlediği de gösterilmiştir (Frankel *et al.* 1993). Resveratrolün LDL oksidasyonunu önleyici etkisinin, esas olarak bakırla şelasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Belguendouz *et al.* 1997).

İnsan lenfositlerinde aflatoksin B₁'in neden olduğu DNA hasarı üzerine resveratrolün antigenotoksik etkisi çalışılmış, kromozomal aberasyon, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus frekanslarında kontrole göre düşüş gözlenerek resveratrol varlığında aflatoksin B₁'in neden olduğu genotoksisitenin en aza indirildiği rapor edilmiştir (Türkez and Sisman 2011).

Güçlü bir doğal antioksidan olan resveratrolün koenzim Q10 ile rekabet ederek serbest radikal oluşumunu engelleme, mitokondride oluşan süperoksit anyonlarını süpürme, fenton reaksiyonu ürünlerinin indüklediği lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve detoksifikasyon enzimlerini uyarma özelliği bulunmaktadır (de la Lastra and Villegas 2007). Ayrıca, resveratrolün çeşitli moleküllerin metabolize edilmesi sırasında oluşan, serbest radikal içeren reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini, radikal süpürücü aktivitesiyle engellediği de belirtilmektedir (Athar *et al.* 2007).

Dioksinlerin son derece kararlı bir sentetik hormon gibi davranıp hücrede önemli fizyolojik sinyalleşme sistemlerini bozduğu ve bu tür toksik davranışın, özellikle hücre gelişimi, farklılaşması ve düzenlenmesi gibi bir dizi biyolojik değişikliklere yol açtığı bilinmektedir (Schechter and Thomas 2003). Dioksinlerin, konsantrasyon artışına bağlı

olarak muhtemelen serbest radikal oluşumunu artırdığı, oluşan bu radikal artışlarının lipit peroksidasyonunu tetiklediği daha önce yapılan çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Artan lipit peroksidasyonuna karşın endojen antioksidan seviyelerinin ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ki bu sonuç yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. KoenzimQ10 ve Resveratrol antioksidanlarının ise *Drosophila*'da meydana gelen lipit peroksidasyonunu ve oksidatif hasarı önemli ölçüde bertaraf ettiği yine dioksin+antioksidan uygulama sonuçlarımızda da açıkça gözlenmiştir. Bu önemli etkilerine ilaveten; dışarıdan alınan antioksidanların vücutta antioksidan savunma sistemini destekler özellik göstererek total antioksidan kapasite değerlerini dikkate değer ölçüde artırarak endojen antioksidanların aktivitesini de arttırmaktadır.

Bu olumlu etkilerin hepsi bir bütün olarak değerlendirildiği zaman, günümüzde başta kanser olmak üzere birçok kronik hastalığın en önemli sebebi olarak görülen oksidatif strese karşı bu antioksidanların, Faz I enzimlerini baskılama, dioksinlerin DNA'ya bağlanmalarını engelleme, dioksinlerin metabolizasyonu sonucu oluşan radikalleri süpürme veya DNA tamir mekanizmalarını teşvik etme gibi çeşitli yollarla koruyucu ve iyileştirici aktivite gösterdiklerini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S. and Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 10 (6), 141-147.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya, 1-15 s.
- Akpolat, M., 2000. Alkolün Oluşturduğu Serbest Radikaller Üzerine Ibuprofen ve Erusik Asidin Etkileri. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthesis: structure, function and inhibition, *The Biochemical Journal*, 357, 593-615.
- Alsharif, N.Z., Schlueter, W.J. and Stohs, S.J., 1994. Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat peritoneal lavage cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26 (3), 392-397.
- Alsharif, N.Z. and Hassoun, E.A., 2004. Protective effects of Vitamin A and Vitamin E succinate against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-Induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 95 (3), 131-138.
- Altun Çolak, D., Uysal, H. ve Toktay, E., 2012. *Drosophila melanogaster*'in Oregon R yabanıl soyuna ait dişi ve erkek popülasyonlarında bazı dioksinlerin ömür uzunluğu üzerine etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir.
- Anonymous a, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/oxidative-stress.html> (29.11.2012).
- Anonymous b, <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO02/ch02f01.jpg> (29.11.2012).
- Ao, K., Suzuki, T., Murai, H., Matsumoto, M., Nagai, H., Miyamoto, Y., Tohyama, C. and Nohara, K., 2009. Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-*p*-dioxins in mice. *Toxicology*, 256 (1-2), 25-31.
- Aoki, Y., 2001. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters what we have learned from Yusho disease. *Environmental Research*, 86 (1), 2-11.
- Archer, S., 1993. Measurement of nitric-oxide in biological models. *Faseb Journal*, 7, 349-360.
- Aşkın, H., Uysal, H. and Altun, D., 2007. Preventive role of folic acid on the developmental toxicity of phenol in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Industrial Health*, 23, 591-598.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R. and Kim, A.L., 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224 (3), 274-283.
- Atkinson, R., 1991. Atmospheric life times of dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *The Science of the Total Environment*, 104 (1-2), 17-33.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)., 1998. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- Ayar, A., Uysal, H. and Altun, D., 2009. The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild *Vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Ekoloji*, 19 (74), 38-44.
- Ayar, A., Uysal, H., Altun, D. and Aşkın, H., 2012. The effects of heat shock on the longevity in some strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 6 (1), 51-55.
- Aycicek, A., Iscan, A., Erel, O., Akcali, M. and Selek, S., 2006. Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatric Neurology*, 35 (6), 382-386.
- Bagchi, M. and Stohs, S.J., 1993. *In vitro* induction of reactive oxygen species by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, endrin, and lindane in rat peritoneal macrophages, and hepatic mitochondria and microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 14 (1), 11-18.
- Basaga, H.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 68, 989-998.
- Bass, T.M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D. and Partridge, L., 2007. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128 (10), 546-552.
- Basu, T.K., 1999. Potential Role of Antioxidant Vitamins. Part, Antioxidants in Human Health and Disease. New York: CABI Publishing, 15-17 s.
- Bauer, J.H., Goupil, S., Garber, G.B. and Helfand, S.L., 2004. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (35), 12980-12985.
- Baydas, G. and Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yaşar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., 2003. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Letters*, 137 (3), 169-174.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş. ve Alvur, M., 2004. DNA hasarı analizinde μ -FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Beebe, L., Park, S.S. and Anderson, L.M., 1990. Differential enzyme induction of mouse liver and lung following a single low or high dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Journal of Biochemical Toxicology*, 5 (4), 211-219.
- Belguendouz, L., Fremont, L. and Linard, A., 1997. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, 53 (9), 1347-1355.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70-76.
- Berit, N. and Ramel, C., 1974. Genetic tests on *Drosophila melanogaster* with polychlorinated biphenyls (PCB). *Hereditas*, 77.

- Bingöl, F., Aydın, S. ve Açıkgöz, Ş., 1993. Serbest radikaller. Ankara Hastanesi Tıp Dergisi, 28, 1-23.
- Borges, F., Fernandes, E. and Roleira, F., 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 9, 195-217.
- Bozcuk, A.N., 1972. DNA synthesis in the absence of somatic cell division associated with ageing in *Drosophila subobscura*. Experimental Gerontology, 7, 147-156.
- Brouwer, A., Ahlborg, U.G., Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Boersma, E.R., Bosveld, B., Denison, M.S., Gray, L.E., Hagmar, L. and Holene, E., *et al.* 1995. Functional aspects of development toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. European Journal of Pharmacology, 293 (1), 1-40.
- Buckland, S.J., Bates, M.N., Garrett, N., Ellis, H.K. and Van Maanen, T., 2001. Concentrations of selected organochlorines in the serum of the non-occupationally exposed New Zealand population. Ministry for the Environment Wellington.
- Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E. and Van Beneden, R.J., 2001. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and beta-naphthoflavone binding. Gene, 278 (1-2), 223-234.
- Cadenas, S. and Barja, G., 1999. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. Free Radical Biology and Medicine, 26 (11-12), 1531-1537.
- Cebellos, P.I., Trivier, J.M. and Nicole, A., 1992. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. Clinical Chemistry, 38 (1), 66-70.
- Céspedes, M.A., Galindo, M.I. and Couso, J.P., 2010. Dioxin toxicity *in vivo* results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. PloS one. 5 (11), e15382.
- Ceylan, E., Gulsun, A., Gencer, M. and Aksoy, N., 2005. A new parameter in the detection of tuberculosis activity: reactive oxygen metabolites. Respiration, 72 (2), 156-159.
- Chan, C.Y.Y., Kim, C.P. and Winn, L.M., 2004. TCDD-induced homologous recombination: The role of the Ah receptor versus oxidative DNA damage. Mutation Research, 563 (1), 71-79.
- Chanvitayapongs, S., Draczynska-Lusiak, B. and Sun, A.Y., 1997. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. Neuroreport, 8 (6), 1499-1502.
- Cheeseman, K.H. and Slater T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin, 49, 481-493.
- Choy, W.N., 2001. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Ed: Dekker, M., New York, 29-187 p.
- Ciftci, O., Aydın, M., Ozdemir, I. and Vardi, N., 2012. Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced testicular damage in rats. Andrologia, 44 (3), 164-173.
- Clark, A.M. and Rockstein, M., 1964. Aging in Insects. In the Physiology of Insecta, Ed: Rockstein, M., 1, 227-281 p.

- Coutinho, M., Pereira, M., Rodrigues, R. and Borrego, C., 2006. Impact of medical waste incineration in the atmospheric PCDD/F levels of Porto. Portugal the Science of the Total Environment, 362 (1-3), 157-165.
- Couture, L.A., Harris, M.W. and Birnbaum, L.S., 1990. Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology, 15 (1), 142-150.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M. and Harman, D., 1987. Oxygen radicals and human disease. Annual International Medicine, 107, 526-545.
- Çelik H., 2005. Malarya (Sıtma) Hastalarında Oksidatif Stres ve Mononükleer Lenfosit DNA Hasarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- de la Lastra, C.A. Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Biochemical Society Transactions, 35, 1156-1160.
- Doğan, E.E., 2008. Bazı Flavonoidlerin *Drosophila melanogaster*'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Dalgıç, B.Ş., 2003. Mikrodalga Frekansındaki Elektromanyetik Radyasyonun *Drosophila melanogaster*'in Bazı Mutant Soylarında Ömür Uzunluğuna Etkisi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Darley-Usmar, V. and Halliwell, B., 1996. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. Pharmaceutical Research, 13, 649-662.
- David, J., Cohet, Y. and Fovillet, P., 1975. The variability between individuals as a measure of senescence: A study of the number of eggs laid and the percentage of hatched eggs in the case of *Drosophila melanogaster*. Experimental Gerontology, 10, 17-25.
- de Martinis, B.S. and de Lourdes Pires Bianchi, M., 2002. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. Pharmacology Research, 46 (2), 129-131.
- Denison, M.S. and Heath-Pagliuso, S., 1998. The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61 (5), 557-568.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen, N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology and Medicine, 26, 202-226.
- Diaz-Ferrero, J., Rodriguez-Larena, M.C., Cornellas, L. and Jimenez, B., 1997. Bioanalytical methods applied to endocrine disrupting polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans: A review. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 16 (10), 563-573.
- Dikici, İ., 1999. Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Duncan, D.M., Burgess, E.A. and Duncan, I., 1998. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes and Development*, 12 (9), 1290-1303.
- Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Luis da Cunha, G. and Oliveira, G.T., 2009. Effects of *trans*-resveratrol and dimethyl sulfoxide on intermediate metabolism and lipoperoxidation in *Drosophila melanogaster*. *Brazilian Journal of Biosciences*, 7 (4), 387-394
- Ebadi, M., Govitrapong, P., Sharma, S., Muralikrishnan, D., Shavali, S., Pellett, L., Schafer, R., Albano, C. and Eken, J., 2001. Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease. *Biological Signals and Receptors*, 10 (3-4), 224-253.
- EC (European Commission), 2001. Opinion of the scientific committee on food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Update based on new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000. CS/CNTM/DIOXIN/20 final. Adopted on 30 May 2001.
- Ecobichon, D.J., 1997. *The Basis of Toxicity Testing*. CRC Press, New York, 1-7 p.
- El-Agamy, D.S., 2010. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. *Archives of Toxicology*, 84 (5), 389-396.
- Emond, C., Birnbaum, L.S. and de Vito, M.J., 2004. Physiologically based pharmacokinetic model for developmental exposures to TCDD in rat. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 80 (1), 115-133.
- Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I. and Crews, S.T., 1999. The spineless-aristopedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 126 (17), 3937-3945.
- Erel, O., 2004a. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277-285.
- Erel, O., 2004b. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37 (2), 112-119.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103-1111.
- Erickson, J.D., Mulinare, J., McClain, P.W., Fitch, T.G., James, L.M., McClearn, A.B. and Adams, M.J.J., 1984. Vietnam veterans' risks for fathering babies with birth defects. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 252 (7), 903-912.
- Fahrig, R., Genetic effects of dioxins in the spot test with mice. 1993. *Environmental Health Perspectives*, 101, 257-261.
- Fang, YZ., Yang, S. and Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Faust, K., Gehrke, S., Yang, Y., Yang, L., Beal, M.F. and Lu, B., 2009. Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of parkinson's disease. *BMC Neuroscience*, 10, 109.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J., 1996. Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-

- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140, 173-179.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargononi, A., Pasini, E., de Giuli, F. and Alberini, A., 1991. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 215-222.
- Fırat, S., 1997. Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutatyon, Glutatyon Peroksidaz, Glutatyon-S-Transferaz Düzeyleri ve N-asetil Sistein'in Bu Sistem Üzerindeki Etkisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fragiorgis, E.J., Rezende, A.A., Graf, U. and Spanó, M.A., 2008. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 (1), 393-401.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Kinsella, J.E., 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341 (8852), 1103-1104.
- Fred, H. and Timothy, J.B., 1997. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43 (8), 779-788.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Frei, B., 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins mechanism of actions. *American Journal of Medicine*, 97 (3A), 5-13.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11, 315-325.
- Freeman, B. and Crapo, J.D., 1982. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 47, 412-426.
- FSA (Food Standard Agency), 2001. Statement on the tolerable daily intake for dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Food Standards Agency, London.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O., 1995. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (49), 29270-29278.
- Galloway, S.M., Deasy, D.A., Bean, C.L., Kraynak, A.R., Armstrong, M.J. and Bradley, M.O., 1987. Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutation Research*, 189 (1), 15-25.
- García-Quispes, W.A., Carmona, E.R., Creus, A. and Marcos, R., 2009. Genotoxic evaluation of two halonitromethane disinfection by products in the *Drosophila* wing-spot test. *Chemosphere*, 75, 906-909.
- Gasiewicz, T.A., Holscher, M.A. and Neal, R.A., 1980. The effect of total parenteral nutrition on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 54 (3), 469-488.

- Geyer, H.J., Schramm, K.W., Feicht, E.A., Behechti, A., Steinberg, C., Bruggemann, R., Poiger, H., Henkelmann, B. and Kettrup, A., 2002. Half-lives of tetra-, penta-hexa-, hepta-, and octachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats, monkeys, and humans: a critical review. *Chemosphere*, 48 (6), 631-644.
- Gözükara, E., 1989. *Biyokimya*. İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6 (2), 153-188.
- Graf, U. and Singer, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista International de Contamination Ambiental*, 8 (1), 15-27.
- Graf, U. and Würigler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27 (3), 219-226.
- Graf, U., Spanó, M.A., Rincón, J.G., Abraham, S.K. and Andrade, H.H., 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxic. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*, 6, 9-13.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J. and Würigler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 402, 203-209.
- Gray, L.E., Wolf, C., Mann, P. and Ostby, J.S., 1997. *In utero* exposure to low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*- dioxin alters reproductive development of female Long Evance hooded rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146, 237-244.
- Grisham, M.B. and Granger, D.N., 1989. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clinics in Chest Medicine*, 10 (1), 71-81.
- Guo, Y.L., Yu, M.L. and Hsu, C.C., 2003. The Yucheng Rice Oil Poisoning Incident. Eds: Schecter, A., Gasiewicz, T.A., *Dioxins and Health*. Wiley, Hoboken, NJ, 893-920 p.
- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41, 1819-1828.
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147.
- Guzmán-Rincón, J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a Biomonitor. *Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Eds: Butterworth, F.M., Corkum, L.D. and Guzmán-Rincón, J. Plenum Press, New York, 169-181 p.
- Güneş, G., 2007. Dioksin ve Furan'ın Oluşum Mekanizmaları ve Giderilme Teknolojileri. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Hahn, M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121 (1-3), 23-53.

- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions*, 141 (1-2), 131-60.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344 (8924), 721-724.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2th ed. Oxford: Clarendon Press, 125 p.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford Science Publications, 617-624 p.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford Science Publications, 22-24 p.
- Hamm, J.T., Chen, C.Y. and Birnbaum, L.S., 2003. A mixture of dioxins, furans, and non-ortho PCBs based upon consensus toxic equivalency factors produces dioxin-like reproductive effects. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 74 (1), 182-191.
- Harma, M., Harma, M. and Erel, O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatiform mole. *Swiss Medical Weekly*, 133 (41-42), 563-566.
- Hassan, M.Q., Stohs, S.J. and Murray, W.J., 1985. Effects of vitamins E and A on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced lipid peroxidation and other biochemical changes in the rat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14, 437-442.
- Hawkins, C.L. and Davies, M.J., 1998. Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24 (9), 1396-1410.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B. and Ames, B.N., 1999. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymology*, 300, 156-166.
- Helling, C.S., Isensee, A.R., Woolson, E.A., Ensor, P.J.D., Jones, G.E., Plimmer, J. and Rand Kearney, P.C., 1973. Chlorodioxins in pesticides, soils, and plants. *Journal of Environmental Quality*, 2, 171-178.
- Henderson, D.S., 2004. *Drosophila* Cytogenetic Protocols, Humana Press, 389 p.
- Hoffman, G.R., 1991. Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons. Pergamon Press, New York, 201-217 p.
- Hossain, A., Tsuchiya, S., Minegishi, M., Osada, M., Ikawa, S., Tezuka, F.A., Kaji, M., Konno, T., Watanabe, M. and Kikuchi, H., 1998. The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (31), 19853-19858.
- Hassoun, E.A., Bagchi, D. and Stohs, S.J., 1995. Evidence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced tissue damage in fetal and placental tissues and changes in amniotic fluid lipid metabolites of pregnant CF1 mice. *Toxicology Letters*, 76, 245-250.
- Hassoun, E.A., Wilt, S.C., de Vito, M.J., Van Birgelen, A., Alsharif, N.Z., Birnbaum, L.S. and Stohs, S.J., 1998. Induction of oxidative stress in brain tissues of mice

- after subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 42 (1), 23-27.
- Hassoun, E.A., Li, F., Abushaban, A. and Stohs, S.J., 2000. The relative abilities of TCDD and its congeners to induce oxidative stress in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure. *Toxicology*, 145 (2-3), 103-113.
- Hassoun, E.A., Wang, H., Abushaban, A., and Stohs, S.J., 2002. Induction of oxidative stress in the tissues of rats after chronic exposure to TCDD, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65 (12), 825-842.
- Hassoun, E.A., Al-Ghafri, M. and Abushaban, A., 2003. The role of antioxidant enzymes in TCDD induced oxidative stress in various brain regions of rats after subchronic exposure. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1028-1036.
- Hu, K. and Bunce, N.J., 1999. Metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related dioxin-like compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*, 2 (2), 183-210.
- Huff, J., Lucier, G. and Tritscher, A., 1994. Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 343-372.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)., 1997. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)., 1998. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 106 (2), 755-760.
- Idaomar, M., El-Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Muñoz-Serrano, A., Liemans, V. and Alonso-Moraga, A., 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 513 (1-2), 61-68.
- Ishida, T., Hori, M., Ishii, Y., Oguri, K. and Yamada, H., 2005. Effects of dioxins on stress-responsive systems their relevance to toxicity. *Journal of Dermatological Science Supplement*, 1, 105-112.
- Ishii, N., Senoo-Matsuda, N., Miyake, K., Yasuda, K., Ishii, T., Hartman, P.S. and Furukawa, S., 2004. Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125 (1), 41-46.
- Jansson, B., Alsberg, T., Bergman, A., Renberg, L. and Reutergardh, L., 1987. Persistent Organic Compounds in The Marine Environment, National Swedish Environmental Protection Boards.
- Jonosek, J., Hilscherova, K., Blaha, L. and Holoubek, I., 2005. Environmental xenobiotics and nuclear receptors- interactions, effects and *in vitro* assessment. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 20 (1), 18-37.
- Kalak, S., 1995. Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Lökosit Zarı Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Savunma Sistemlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Konya.

- Karademir, A., 2002. Tehlikeli Atık Yakma Tesisi Dioksin Emisyonlarının Doğadaki Dağılımlarının Modellenmesi ve Risk Değerlendirmesi. Doktora Tezi. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Kaya, B., Yanıkoglu, A., Creus, A. and Marcos, R., 2000. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 465 (1-2), 77-84.
- Kaya, B., 2000. Bazı Pestisidlerin *Drosophila melanogaster* Hatlarında Mutajenik ve Rekombinojenik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Kaya, B., Markos, R., Yanıkoğlu, A. and Creus, A., 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, 557, 53-66.
- Kern, P.A., Fishman, R.B., Song, W., Brown, A. and Fonseca, V., 2002. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver. *Toxicology*, 171 (2-3), 117-125.
- Kociba, R.J., Keeler, P.A., Park, C.N. and Gehrich, P.J., 1976. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): results of a 13-week oral toxicity study in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 35 (3), 553-574.
- Koç, F. ve Kısa, F., 2005. Dioksinler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 16 (1-2), 57-62.
- Koester, C.J and Hites, R.A., 1992. Photodegradation of PCDDs and PCDF Adsorbed to Fly Ash *Environmental Science and Technology*, 26, 502-507.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Ellis, E.F., Jenkins, L.W., Povlishock, J.T., Rowe, G.T. and Hess, M.L., 1985. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circulation Research*, 57, 142-151.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V., 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54 (5), 356-361.
- Kulkarni, P.S., Crespo, J.G. and Afonso, C.A., 2008. Dioxins sources and current remediation Technologies: a review. *Environment International*, 34 (1), 139-153.
- Kumar, K.S., Kannan, K., Giesy, J.P. and Masunaga, S., 2002. Distribution and elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, and p, p'-DDE in tissues of bald eagles from the Upper Peninsula of Michigan. *Environmental Science and Technology*, 36 (13), 2789-2796.
- Kwok, E.S.C., Atkinson, R. and Arey, J., 1995. Atmospheric chemical loss processes for PCDDs and PCDFs. *Organohalogen Compounds*, 24, 163-166.
- Kwong, L.K., Kamzalov, S., Rebrin, I., Bayne, A.C., Jana, C.K., Morris, P., Forster, M.J. and Sohal, R.S., 2002. Effects of coenzyme Q (10) administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (5), 627-638.
- Latchoumycandane, C. and Mathur, P.P., 2002. Effects of vitamin E on reactive oxygen species mediated 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in rat testis. *Journal of Applied Toxicology*, 22 (5), 345-351.
- Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A., 2000. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and

- copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5), 1442-1448.
- Lee, V.K., Cheung, W.H. and McKay, G., 2008. PCDD/PCDF reduction by the co-combustion process. *Chemosphere*, 70 (4), 682-688.
- Lehmann, M., Franco, A., de Souza Prudente Vilar, K., Luźa Reguly, M. and de Andrade, H.H., 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 539 (1-2), 167-175.
- Lewis, E.B. and Bacher, F., 1968. Methods of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila* Information Service, 43, 193.
- Lim, M., Jacobson-Kram, D., Bowman, R.E. and Williams, R.J., 1987. Effect of chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on sister chromatid exchange levels in peripheral lymphocytes of the rhesus monkey. *Cell Biology and Toxicology*, 3 (3), 279-284.
- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA, 1133 p.
- Langova, M., Polivkova, Z., Šmerak, P., Bartova, J. and Barta, I., 2005. Antimutagenic effect of resveratrol. *Czech Journal of Food Science*, 23, 202-208.
- Longnecker, M.P. and Michalek, J.E., 2000. Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among air force veterans with background levels of exposure. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 11 (1), 44-48.
- Lüscher, T.F., Tanner, F.C., Tschudi, M.R. and Noll, G., 1993. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annual Review of Medicine*, 44, 395-418.
- Mably, T.A., Moore, R.W. and Peterson, R.E., 1992a. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 114 (1), 97-107.
- Mably, T.A., Moore, R.W., Goy, R.W. and Peterson, R.E., 1992b. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: 2. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 114, 108-117.
- Mably, T.A., Bjerke, D.L. and Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E., 1992c. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 114, 118-126.
- Mandal, P.K., 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology, B, Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 175 (4), 221-230.
- Martinez, J. and Moreno, J.J. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59, 865-870.
- Martinez, J.M., de Vito, M.J., Birnbaum, L.S., and Walker, N.J., 2003. Toxicology of Dioxins and Dioxin like Compounds. Eds: Schecter, A., Gasiewicz, T.A., Dioxins and Health. Wiley, Hoboken, NJ, 137-157 p.
- Masuda, Y., 2003. The Yusho Rice Oil Poisoning Incident. Dioxins and Health, Eds: Schecter, A., Gasiewicz, T.A. Wiley, Hoboken, NJ, 855-892 p.

- Matsumura, F., Brewster, D.W., Madhuker, B.V. and Bombick, D.W., 1984. Alteration of rat hepatic plasma membrane function by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 13 (5), 509-515.
- Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K. and Miyata, N., 2001. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. Mutation Research, 494 (1-2), 107-113.
- McGregor, D.B., Partensky, C., Wilbourn, J. and Rice, J.M., 1998. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. Environmental Health Perspectives, 106, 755-760.
- McKay, G., 2002. Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review. Chemical Engineering Journal, 86 (3), 343-368.
- Meydani, M., 2001. Antioxidants and cognitive function. Nutrition Reviews, 59 (8), 75-80.
- Meyne, J., Allison, D.C., Bose, K., Jordan, S.W., Ridolpho, P.F. and Smith, J., 1985. Hepatotoxic doses of dioxin do not damage mouse bone marrow chromosomes. Mutation Research, 157 (1), 63-69.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. and Fuji- Kuriyama, Y., 1997. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-TCDD in mice lacking the Ah receptor. Genes to Cells: Devoted to Molecular and Cellular Mechanisms, 2 (10), 645-654.
- Mitrou, P.I., Dimitriadis, G. and Raptis, S.A., 2001. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. European Journal of Internal Medicine, 12 (5), 406-411.
- Nagayama, J, Nagayama, M., Haraguchi, K., Kuroki, H. and Masuda, Y., 1995. Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and its analogues on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. Fukuoka Igaku Zasshi, 86 (5), 184-189.
- Nakamura, K., Endo, H. and Kashiwazaki, S., 1997. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. International Journal of Tissue Reactions, 9 (4), 307-316.
- National Toxicology Program., 1980. Bioassay of a Mixture of 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (Dermal Study) for Possible Carcinogenicity (CAS No. 57653-85-7; CAS No. 19408-74-3). National Toxicology Program Technical Report Series, 202, 1-109.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids. In "Food Chemistry". Ed: Dekker, M., New York, 225-319 P.
- Nebert, D.W., Puga, A. and Vasiliou, V., 1993. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. Annals of the New York Academy of Sciences, 685, 624-640.
- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S., 1988. The genotoxicity of N⁴-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test. Mutagenesis, 3 (1), 11-13.
- Nordberg, J. and Arner, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine, 31 (11), 1287-1317.

- Okey, A.B., Franc, M.A., Moffat, I.D., Tijet, N., Boutros, P.C., Korkalainen, M., Tuomisto, J. and Pohjanvirta, R., 2005. Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: The case aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207 (2), 43-51.
- Olie, K., Addink, R. and Schoonenboom, M., 1998. Metals as catalysts during the formation and decomposition of chlorinated dioxins and furans in incineration processes. *Air and Waste Management Association*, 48, 101-105.
- Olson, J.R., Holscher, M.A. and Neal, R.A., 1980. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the golden Syrian hamster. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 55 (1), 67-78.
- Olson, J., Geiger, L., Rucci, G. and Neal, R., 1991. Comparative developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Chemosphere*, 25, 71-74.
- Orallo, F., Alvarez, E., Camiña, M., Leiro, J.M., Gómez, E. and Fernández, P., 2002. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61 (2), 294-302.
- Osaba, L., Rey, M.J., Aguirre, A., Alonso, A. and Graf, U., 2002. Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutation Research*, 518 (1), 95-106.
- Qin, H., Zhai, Z. and Powell-Coffman, J.A., 2006. The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Developmental Biology*, 298 (2), 606-615.
- Pal, Y.B., 1994. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews*, 74 (1), 139-162.
- Park, J.Y., Shigenaga, M.K. and Ames, B.N., 1996. Induction of cytochrome P450 1A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo (3,2-b)-carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2322-2327.
- Parks, D.A., Williams, T.K. and Beckman, J.S., 1988. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *The American Journal of Physiology*, 254 (5), 768-774.
- Parzefall, W., 2002. Risk assesstment of dioxins contamination in human food. *Food And Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40 (8), 1185-1189.
- Pavuk, M., Schecter, A.J., Akhtar, F.Z. and Michalek, Z.E., 2003. Serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) levels and thyroid function in air force veterans of the Vietnam War. *Annals of Epidemiology*, 13 (5), 335-343.
- Peters, J.M., Narotsky, M.G., Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P.M., Gonzalez, F.J. and Abbott, B.D., 1999. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicological sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 47 (1), 86-92.
- Podoll, R.T., Jaber, H.M. and Mill, T., 1986. Tetrachlorodibenzodioxin: rates of volatilization and photolysis in the environment. *Environmental Science and Technology*, 20 (5), 490-492.

- Pohjanvirta, R. and Tuomisto, J., 1994. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms and animal models. *Pharmacological Reviews*, 46 (4), 483-549.
- Pohjanvirta, R., 2009. Transgenic mouse lines expressing rat Ah receptor variants-a new animal model for research on Ah receptor function and dioxin toxicity mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 166-182.
- Rao, A.V. and Balachandran, B., 2003. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutritional Neuroscience*, 5 (5), 291-309.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. and Symons, M.C.R., 1991. *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam.
- Riddick, D.S., Lee, C., Bhathena, A., Timsit, Y.E., Cheng, P.Y., Morgan, E.T., Prough, R.A., Ripp, S.L., Miller, K.K., Jahan, A. and Chiang, J.Y., 2004. Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 32 (4), 367-375.
- Rizki, M., Kossatz, E., Velazquez, A., Creus, A., Farina, M., Fortaner, S., Sabbioni, E. and Marcos, R., 2006. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethyl arsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 162-168.
- Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Koong, S.L., Shih, L.Y., Taylor, J.S., Wu, Y.C., Yang, D., Ragan, N.B. and Hsu, C.C., 1988. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*, 241, 334-336.
- Roychowdhury, S., Wolf, G., Keilhoff, G., Bagchi, D. and Horn, T., 2001. Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stress. *Nitric Oxide*, 5 (2), 137-149.
- Sakin, F., 2008. Farklı Dozlarda 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin Tarafından Ratlarda Beyin, Karaciğer, Böbrek ve Kalp Gibi Dokularda Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Likopen'in Koruyuculuğu. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazgı.
- Schaik, V.N. and Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. *Mutation Research*, 260, 99-104.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J. and Constable, J.D., 2006. Dioxins: An overview. *Environmental Research*, 101 (3), 419-428.
- Schiestl, R.H., Aubrecht, J., Yap, W.Y., Kandikonda, S. and Sidhom, S., 1997. Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induce intrachromosomal recombination *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*, 57 (19), 4378-4383.
- Schiller, H.J., Andreoni, K.A. and Bulkley, G.B., 1991. Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Klinische Wochenschrift*, 69, 1083-1094.
- Schrier, R.W., Arnold, P.E., Putten, V.J.V. and Burke, T.J., 1987. Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers. *Kidney International*, 32, 313-321.

- Selby, P.B. and Olsen, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Senft, A.P., Dalton, T.P., Nebert, D.W., Genter, M.B., Hutchinson, R.J. and Shertzer, H.G., 2002. Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178 (1), 15-21.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I. and Cittadini, A., 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496 (1-2), 171-180.
- Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Puga, A., Ary, M., Sonntag, D., Dixon, K., Robinson, L.J., Cianciolo, E. and Dalton, T.P., 1998. Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253 (1), 44-48.
- Sinclair, B.J. and Roberts, S.P., 2005. Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of Thermal Biology*, 30, 557-562.
- Slezak, B.P., Hatch, G.E., De Vito, M.J., Diliberto, J.J., Slade, R., Crissman, K., Hassoun, E. and Birnbaum, L.S., 2000. Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicological sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 54 (2), 390-398.
- Slezak, B.P., Hamm, J.T., Reyna, J., Hurst, C.H. and Birnbaum, L.S., 2002. TCDD-mediated oxidative stress in male rat pups following perinatal exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16 (2), 49-52.
- Smith, A.H. and Lopipero, P., 2001. Evaluation of the Toxicity of Dioxins and Dioxin-like PCBs: A Health Risk Appraisal for the New Zealand Population. Final Report Released by the Ministry for the Environment.
- Sorensen, J.G. and Loeschcke, V., 2002. Decreased heat shock resistance and down-regulation of hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 16, 379-384.
- Srogi, K., 2008. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6 (1), 1-28.
- Stocker, R., Bowry, V.W. and Frei, B., 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (5), 1646-1650.
- Stohs, S.J., 1990. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-TCDD. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 79-90.
- Sweeney, M.H. and Mocarelli, P., 2000. Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Additives and Contaminants*, 17 (4), 303-316.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejia, G., 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex-linked recessive lethal test. *Mutation Research*, 113, 117-133.
- Tappel, A.L., 1972. Free radical peroxidation of lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 203, 12-28.

- Tarpey, M.M., Wink, D.A. and Grisham, M.B., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286 (3), R431–444.
- ten Tusscher, G.W. and Koppe, J.G., 2004. Perinatal dioxin exposure and later effects: a review. *Chemosphere*, 54 (9), 1329-1336.
- Theobald, H.M., Kimmel, G.L. and Peterson, R.E., 2003. Developmental and Reproductive Toxicity of Dioxins and Related Chemicals. Eds: Schecter, A., Gasiewicz, T.A., *Dioxins and Health*. Wiley, Hoboken, NJ, 329-432.
- Thomas, S., Lowe, J.E., Knowles, R.G., Green, I.C. and Green, M.H., 1998. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation Research*, 402 (1-2), 77-84.
- Thornton, A.S., Oda, Y., Stuart, G.R., Glickman, B.W. and de Boer, J.G., 2001. Mutagenicity of TCDD in Big Blue transgenic rats. *Mutation Research*, 478 (1-2), 45-50.
- Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann, G., Cunha, K.S., Lehmann, M. and Rodrigues de Andrade, H.H., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 519 (1-2), 141-149.
- Tomasetti, M., Littarru, G.P., Stocker, R. and Alleva, R., 1999. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (9-10), 1027-1032.
- Turkez, H., Geyikoglu, F., Yousef, M.I., Togar, B., Gurbuz, H., Celik, K., Akbaba, G.B. and Polat, Z., 2012. Hepatoprotective potential of astaxanthin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Toxicological Industrial Health*, (Epub ahead of print).
- Türkez, H. and Sisman, T., 2012. The genoprotective activity of resveratrol on aflatoxin B₁-induced DNA damage in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology Industrial Health*, 28 (5), 474-480.
- Tysklind, M. and Rappe, C., 1990. Photolytic transformation of polychlorinateddibenzo-*p*-dioxins and furans in complex mixtures. *Organohalogen Compounds*, 1, 385-388.
- Uchida, K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1685-1696.
- Uenobe, F., Nakamura, S. and Miyazawa, M., 1997. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutation Research*, 373 (2), 197-200.
- Unkila, M., Pohjanvirta, R. and Tuomisto, J., 1995. Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 27 (5), 443-455.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189 (1-2), 41-54.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 1994. Health Assessment document for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds. External Review Draft. United States Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment and Office of Research and Development, EPA, Washington, D.C.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 1997. Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Related Compounds Update: Impact on Fish Advisories. Office of Water, EPA, Washington, D.C.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 1999. Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Related Compounds Update: Impact on Fish Advisories. Office of Water, EPA, Washington, D.C.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 2003. Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds National Academy Sciences (NAS) Review Draft. Part I: Estimating Exposure to Dioxin-Like Compounds. Volume 2: Properties, Environmental Levels, and Background Exposures, Chapter 2: Physical and Chemical Properties and Fate. Exposure Assessment and Risk Characterization Group National Center for Environmental Assessment – Washington Office Office of Research and Development U.S. EPA, Washington, DC.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 2004. Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds. National Academy Sciences (NAS) Review Draft, Part I: Estimating Exposure to Dioxin-Like Compounds, Volume 1: Sources of Dioxin-Like Compounds in the United States, Washington, D.C., National Center for Environmental Assessment, U.S. EPA, Washington, DC.
- Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H. and Aslan, A., 2009. The effects of water extract of *Usnea longissima* Ach. on the longevity of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Fresenius Environmental Bulletin, 18 (5a), 699-703.
- Ünal, B.B., 1999. Talasemi ve G6PD Enzim Eksikliğinde MDA Düzeyi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Ünlü, H. and Bozcuk, A.N., 1979. Genetics of longevity in *Drosophila* I: The effects of w, m and f mutant genes in various genotype combinations. Experimental Gerontology, 14, 117-124.
- Valencia, R., Abrahamson, S., Lee, W.R., Von Halle, E.S., Woodruff, R.C., Würigler, F.E. and Zimmering, S., 1984. Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research, 134 (1), 61-88.
- Valenzuela, A., 1990. The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidative stress. Life Science, 48, 301-309.
- Valic, E., Jahn, O., Pöpke, O., Winker, R., Wolf, C. and Rüdiger, W.H., 2004. Transient increase in micronucleus frequency and DNA effects in the comet assay in two patients after intoxication with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. International Archives of Occupational and Environmental Health, 77 (5), 301-306.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J. and Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres- induced canser. Chemical Biological Interactions, 160, 1-40.
- Van Leeuwen, F.R. and Younes, M., 2000. Food Additives and Contaminants, Assessment of the Health Risk of Dioxins: Re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). Taylor and Francis, London.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., DeVito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N. and

- Peterson, R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 93 (2), 223-241.
- Viluksela, M., Bager, Y., Tuomisto, J.T., Scheu, G., Unkila, M., Pohjanvirta, S.F., Kosma, V.M., Paakkanen, J.M., Vartiainen, T., Klimm, C., Schramm, K.W., Warngard, L. and Tuomisto, J., 2000. Liver tumor promoting activity of 2,3,7,8-TCDD in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains. *Cancer Research*, 60, 6911-6920.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- Wahba, Z.Z., Lawson, T.A. and Stohs, S.J., 1988. Induction of hepatic DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Cancer Letters*, 39, 281-286.
- Ward, C.T. and Matsumura, F., 1979. Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a model aquatic ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 7, 349-357.
- Weber, L.W., Ernst, S.W., Stahl, B.U. and Rozman, K., 1993. Tissue distribution and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats after intravenous injection. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 21 (4), 523-534.
- Weisglas-Kuperus, N., Patandin, S., Berbers, G.A.M., Sas, T.C.J., Mulder, P.G.H., Sauer, P.J.J. and Hooijkaas, H., 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environmental Health Perspectives*, 108 (12), 1203-1207.
- WHO (World Health Organization), 1998. Executive Summary Report of Assessment of Health Risks of Dioxins; Re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI).
- WHO (World Health Organization), 2001. Summary and Conclusions, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Fifty-Seventh Meeting, Rome.
- Whysner, J. and Williams, G.M., 1996. 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin mechanistic data and risk assessment: gene regulation, cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology and Therapeutics*, 71, 193-223.
- Wu, D. and Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Research and Health: The Journal of The National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27, 277-284.
- Würgler, F.E. and Vogel, E.W., 1986. *In vivo* Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. In *Chemical Mutagens, Principle and Medhods for Their Detection*. Eds: Würgler, F.E. and Vogel, E.W. Plenum Pres, New York, 10, 1- 73.
- Yanbeyi, S., 1999. Aspirin ve Antioksidan Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutatyon Peroksidaz aktiviteleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Yanik, M., Erel, O. and Kati, M., 2004. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica: Officieel Wetenschappelijk Orgaan Van Het IGBP (Interdisciplinair Genootschap voor Biologische Psychiatrie)*, 16 (4), 200-203.

- Yeni, E., Gulum, M., Selek, S., Erel, O., Unal, D., Verit, A. and Savas, M., 2005. Comparison of oxidative/antioxidative status of penil corpus cavernosum blood and peripheral venous blood. *International Journal of Impotence Research*, 17 (1), 19-22.
- Yonemoto, J., Ichiki, T., Takei, T. and Tohyama, C., 2005. Maternal exposure to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and the body burden in offspring of long-evans rats. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 10 (1), 21-32.
- Yoshida, R. and Ogawa, Y. 2000. Oxidative stres induced by 2,3,7,8- TCDD: An application of oxidative stres markers to cancer risk assesment of dioxins. *Industrial Health*, 38 (1), 5-14.
- Young, I.S. and Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54 (3), 176–186.
- Zhang, B., Zhang, H., Jin, J., Ni, Y. and Chen, J., 2012. PCDD/Fs-induced oxidative damage and antioxidant system responses in tobacco cell suspension cultures. *Chemosphere*, 88 (7), 798-805.
- Zimmering, S., Mason, J.M., Valencia, R. and Woodruff, R.C., 1985. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental Mutagenesis*, 7 (1), 87-100.
- Zimmerman, B.J. and Granger, D.N., 1994. Mechanisms of reperfusion injury. *American Journal Medicinal Science*, 307, 284-292.
- Zober, A., Ott, M.G., Fleig, I. and Heidemann, A., 1993. Cytogenetic studies in lymphocytes of workers exposed to 2,3,7,8-TCDD. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65, 157-161.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M. and Costa, R., 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 322, 111-116.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erzurum’da tamamladı. 2000 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2004 yılında birincilikle mezun oldu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans’ını tamamladı. 2009 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı görevine devam eden yazar evlidir.