

**DİŞİ SİÇANLARDA KRONİK  
TCDD (2,3,7,8 TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXİN)  
UYGULAMASININ OLUŞTURDUĞU OVARYUM HASARI  
ÜZERİNE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Semir GÜL**

**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Mehmet GÜL**

**Yüksek Lisans Tezi - 2015**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİŞİ SIÇANLARDA KRONİK  
TCDD (2,3,7,8 TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN)  
UYGULAMASININ OLUŞTURDUĞU OVARYUM HASARI  
ÜZERİNE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Semir GÜL**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Mehmet GÜL**

**Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2014/13 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA**

**2015**

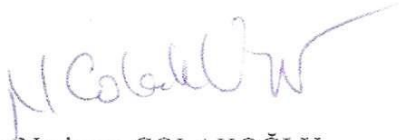
## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Semir GÜL'ün "Dişi Sıçanlarda Kronik TCDD (2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioksin) Uygulamasının Oluşturduğu Ovaryum Hasarı Üzerine Melatoninin Koruyucu Etkileri "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/08/2015



Prof. Dr. Nigar VARDI  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU  
Fırat Üniversitesi  
Üye



Doç. Dr. Mehmet GÜL  
İnönü Üniversitesi  
Tez Danışmanı  
Üye

### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ....../....../2015 tarih ve 2015/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	vi
ABSTRACT .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dişi üreme sistemi .....	3
2.1.1. Ovaryum.....	4
2.1.1.1. Ovaryum anatomisi.....	4
2.1.1.1. Ovaryum histolojisi.....	4
2.1.1.3. Ovaryum folikülleri.....	5
2.1.2. Ovaryum embriyolojisi.....	7
2.2. Dioksinler ve TCDD .....	9
2.2.1. Çevreye yayılma ve maruziyet.....	11
2.2.2. Emilim.....	12
2.2.3. Dioksinin metabolizması ve atılımı.....	13
2.2.4. TCDD'nin etki mekanizması.....	14
2.2.5. TCDD ve oksidatif stres .....	14
2.2.6. TCDD'nin üreme sistemi üzerine etkileri .....	15
2.2.8. Toksikite durumunda tedavi .....	16
2.3. Melatonin.....	17
2.3.1. Fonksiyonları.....	17
2.3.1.1. Sirkadyan ritim.....	18
2.3.1.2. Antioksidan.....	18
2.3.1.3 İmmun sistem.....	18
2.3.1.4 Tıbbi kullanımı.....	18
2.4. Oksidatif stres ve serbest radikaller.....	19
2.4.1. Serbest oksijen radikal kaynakları.....	20
2.4.2. Serbest radikallerin hücrelerdeki etkileri .....	20

2.4.3. Serbest radikallerle oluşan lipid peroksidasyonu .....	20
2.4.4. Serbest radikallerle protein ve nükleik asitlerde oluşan değişiklikler .....	21
2.5. Antioksidan sistem .....	21
2.5.1. Nonenzimatik antioksidanlar .....	21
2.5.2. Enzimatik antioksidanlar .....	22
3. MATERYAL METOT .....	23
3.1. Deney düzeni ve planı .....	23
3.1.1. TCDD ve Melatonin hazırlanışı .....	23
3.1.2. Deney uygulama süreci .....	24
3.2. Işık mikroskopik teknikler .....	24
3.2.1. Mayers'in hematoxylen- eozin metodu .....	25
3.3. Transmisyon elektron mikroskopisi .....	25
3.3.1. % 2,5 Gluteraldehit solüsyonu .....	26
3.3.2. % 1 Osmium tetroksit solüsyonu .....	26
3.3.3. Fosfat tamponu .....	26
3.3.4. Araldit .....	26
3.3.5. Uranil asetat boyası .....	27
3.3.6. Kurşun sitrat boyası .....	27
3.4. Biyokimya yöntemi .....	27
3.4.1. Ovaryum dokularının analizlere hazırlanması .....	27
3.4.2. Ovaryum dokusunda yapılan analizler .....	28
4. BULGULAR .....	32
4.1. TCDD'nin sıçan vücut ağırlıklarına etkisi .....	32
4.2. Histolojik bulgular .....	34
4.3. Ovaryum dokuları folikül ve korpus luteum sayıları .....	70
4.4. Biyokimyasal bulgular ve istatistiksel analiz .....	71
5. TARTIŞMA .....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	86
KAYNAKLAR .....	87
EKLER .....	100
Ek 1: Özgeçmiş .....	100
Ek 2: Etik kurul kararı 1 .....	101
Ek 3: Etik kurul kararı 2 .....	102

## TEŐEKKÜR

Yoğun tez dönemimde yaptığım deneysel çalıőmalarımnda ve bu tezin hazırlanıő aşamalarında bana büyük bir titizlikle ve sabırla yol gösteren tez danıőmanım sayın Doç. Dr. Mehmet GL'e, yine her konuda fikirleri ile bana destek olan Anabilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. Nigar VARDI hocama, benden desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali OTLU, Doç. Dr. Meltem KURUŐ ve Yard. Doç. Dr. Aslı ÇETİN hocama, her konuda yardımcı olan Ar. Gör. Azibe YILDIZ, Birgl YİğİTCAN, Hilal ŞAHİN ve Feride KARAHAN'a, çalıőmamın istatiksels analizinde bana yardımcı olan Ar. Gör. Ahmet Kadir ARSLAN'a, biyokimya çalıőmalarımnda yardımcı olan Ar. Gör. Kevser TANBEK'e ve deney hayvanları merkezi çalıőanlarına sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca 2014/13 nolu projeme maddi yönden katkılarından dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teőekkür ederim.

## ÖZET

### **Dişi Sıçanlarda Kronik TCDD (2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) Uygulamasının Oluşturduğu Ovaryum Hasarı Üzerine Melatoninin Koruyucu Etkileri**

**Amaç:** TCDD ve benzeri toksik maddeler insan sağlığını önemli derecede tehdit eden çevresel faktörlerdir. TCDD'nin kadınlarda üreme sistemi organları üzerinde toksik etki göstererek infertiliteye, meme ve endometriyum kanserlerine sebep olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı kronik TCDD uygulamasının dişi sıçanların ovaryumlarında oluşturduğu histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine melatoninin koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metot:** 72 adet *Wistar Albino* cinsi dişi sıçan kullanılan çalışmamızda sıçanlar aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır.

1. Kontrol grubu
2. Yağ grubu (0,5 ml/kg/hafta x 16, g.g.)
3. Alkol grubu (0,5 ml/kg/gün x 115 i.p.)
4. Mel (melatonin) grubu (10 mg/kg/gün x 115 i.p.)
5. TCDD grubu (g.g. 1µg/kg/hafta x 16 hafta TCDD)
6. TCDD + Mel grubu ((g.g. 1µg/kg/haftaTCDD + i.p. 10mg/kg/gün mel) x 16).

Çalışma sonunda elde edilen ovaryum dokuları, rutin histolojik doku takip prosedürlerinden geçirildikten sonra hazırlanan kesitler boyama işlemleri ardından ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Doku biyokimya parametreleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçüldü.

**Bulgular:** Elde edilen biyokimyasal bulgulara göre, TCDD grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda oksidatif stres gözlenirken, TCDD + mel grubunda oksidatif stresin baskılandığı gözlenmiştir. Histolojik olarak, TCDD grubunda primordiyal sonrası aşamalarda folikül ve korpus luteum sayısında belirgin bir azalma saptanmıştır. TCDD + mel grubunda ise folikül ve korpus luteum sayıları kontrol grubuna yakın bulunmuştur. Ayrıca, TCDD grubunda morfolojisi ve bütünlüğü bozulmuş hücreler, apoptoz ve nekroz gözlenirken, TCDD + mel grubunda normal hücre yapılarının korunduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Kronik TCDD uygulamasının dişi sıçanların ovaryum dokularında oluşturduğu biyokimyasal ve histopatolojik hasara karşı melatonin belirgin bir şekilde koruma ve iyileştirme sağladığı gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Melatonin, ovaryum, TCDD.

# ABSTRACT

## Protective effects of melatonin on ovarium damage in female rats exposed to chronic TCDD (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioksin)

**Aim:** TCDD and congeners are very dangerous and threatening environmental agents for human health. Additionally, in women, TCDD causes toxic effects on reproductive tissues and causes to infertility, breast and endometrium cancers. The purpose of this study was to determine the protective effects of melatonin on histopathological and biochemical changes in female rat ovary exposed to chronic TCDD.

**Material and Method:** 72 *Wistar Albino* female rats were used in the study and they were grouped as follow:

1. Control group
2. Oil group (0,5 ml/kg/week x 16, g.g.)
3. Alcohol group (0,5 ml/kg/day x 115 i.p.)
4. Mel group (10 mg/kg/day x 115 i.p.)
5. TCDD group (g.g. 1 $\mu$ g/kg/week x 16 TCDD)
6. TCDD + Mel group ((g.g. 1 $\mu$ g/kg/week TCDD + i.p. 10 mg/kg/day mel) x 16)

The tissues that were taken at the end of the experimental application were examined by light microscopy and electron microscopy after routine tissue processing and staining procedures. Biochemical parameters were measured by spectrophotometric methods.

**Results:** According to the biochemical results, oxidative stress was observed in the ovary of TCDD group rats. However, oxidative stress was repressed in TCDD + mel group. Histologically, there was a significant decrease in the number of follicle after the primordial phase and corpus luteum in TCDD group, whereas this number was similar to control group in TCDD + mel group. While monitoring morphologically and structurely disturbed, apoptotic and necrotic cells in the ovarian tissues of TCDD group, normal cellular structures was observed in TCDD + mel group.

**Conclusion:** All in all, it is concluded that melatonin has a significant protective and ameliorative effect on biochemical and histopathological damage of female rat ovaries exposed to chronic TCDD.

**Key Words:** Melatonin, ovary, TCDD



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BDMA</b>	: Benzyl dimethylamine
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>DDSA</b>	: Dodecenly Succinic Anhydride
<b>Diox</b>	: Dioksin
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>g</b>	: Gram
<b>GSH</b>	: Total Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>g.g.</b>	: Gastrik Gavaj
<b>HCl</b>	: Hidroklorür
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen - Eosin
<b>i.p.</b>	: İntraperitonal
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MEL</b>	: Melatonin
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Superoksit radikali
<b>OSİ</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PCB</b>	: Poli-klorlü bifeniller
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>SD</b>	: Standart Sapma

<b>SF</b>	: Serum Fizyolojik
<b>SOD</b>	: Superoksit Dismutaz
<b>SRY</b>	: Seks (eşey) Determining Region
<b>TAS</b>	: Toplam Antioksidan Durum
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürat Reaktif Maddeler
<b>TCDD</b>	: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskopi
<b>TOS</b>	: Toplam Oksidan Durum
$\bar{X}$	: Ortalama Simgesi
<b>X</b>	: Objektif Büyütmesi
<b>XO</b>	: Ksantin oksidaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1: Dişi üreme sisteminin şematik çizimi.....	3
Şekil 2.2: Ovaryum kesitinin şematik çizimi.....	5
Şekil 2.3: Poliklorlu dibenzo -p- dioksinin (PCDD) kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4: 2,3,7,8 TCDD'nin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.5: Dioksinin insana maruziyet yolları.....	12
Şekil 2.6: Melatoninin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 4.2: Sıçan ağırlıkları artış miktarlarının gruplar arası karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.3: Kontrol over folikülü, korpus luteum.....	36
Şekil 4.4: Kontrol: over folikülü, korpus luteum, germinatif epitel.....	36
Şekil 4.5: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	37
Şekil 4.6: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	37
Şekil 4.7: Granuloza lutein hücre, teka hücresi.....	38
Şekil 4.8: Granuloza hücresi, sekonder lizozom.....	38
Şekil 4.9: Düz kas hücresi.....	39
Şekil 4.10: Endotel hücresi, eritrosit.....	39
Şekil 4.11: Stromal hücre.....	40
Şekil 4.12: Yağ grubu: over folikülü, korpus luteum.....	41
Şekil 4.13: Yağ: Over folikülü, korpus luteum, germinatif epitel.....	42
Şekil 4.14: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	42
Şekil 4.15: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	43
Şekil 4.16: Granuloza lutein hücre.....	43
Şekil 4.17: Granuloza hücresi.....	44
Şekil 4.18: Düz kas hücresi.....	44
Şekil 4.19: Ovaryum stromal hücre.....	45
Şekil 4.20: Kapiller endotel hücresi.....	45
Şekil 4.21: TCDD grubu: Over folikülleri.....	47
Şekil 4.22: TCDD grubu over parankimi.....	47
Şekil 4.23: Over folikülü granuloza hücreleri.....	48
Şekil 4.24: Granuloza lutein hücre, inflamatuvar infiltrasyon.....	48
Şekil 4.25: Ovaryum parankiminde diffüz inflamatuvar infiltrasyon ve parankimal hücre dejenerasyonu.....	49

Şekil 4.26: Korpus luteum granuloza lutein hücrelerde piknozis ve kromatolizis, inflamatuvar hücre infiltrasyonu.....	49
Şekil 4.27: Granuloza hücrelerinde dejenerasyon ve apoptotik cisimcikler.....	50
Şekil 4.28: Granuloza hücreleri arasında apoptotik cisimcikler.....	50
Şekil 4.29: Korpus luteumda hücre sitoplazmasında büyük otofagozom, hücre nükleus sınırında düzensizlik ve piknotik nükleus.....	51
Şekil 4.30: Granuloza hücrelerinde nekroz, eritroit.....	51
Şekil 4.31: Granuloza lutein hücrelerde piknotik, düzensiz sınırlı nükleus ve perinükleolar alanda dilatasyon.....	52
Şekil 4.32: Korpus luteum parankimal hücreleri arasında eozinofil, piknotik nükleus..	52
Şekil 4.33: Stromal hücrelerde piknotik ve düzensiz sınırlı nükleus, vakuolizasyon....	53
Şekil 4.34: Düz kas hücre nükleus sınırlarında düzensizlik, periferik kromatin yoğunlaşması.....	53
Şekil 4.35: Alkol grubu: Over folikülü, korpus luteum.....	54
Şekil 4.36: Over folikülü korpus luteum, germinatif epitel.....	55
Şekil 4.37: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	55
Şekil 4.38: Granuloza lutein hücre, kapiller.....	56
Şekil 4.39: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	56
Şekil 4.40: Granuloza hücresi.....	57
Şekil 4.41: Endotel hücresi, eritrosit.....	57
Şekil 4.42: Düz kas hücresi.....	58
Şekil 4.43: Stromal hücre.....	58
Şekil 4.44: Melatonin grubu: Over folikülü, korpus luteum.....	59
Şekil 4.45: Over folikülü, germinatif epitel.....	60
Şekil 4.46: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	60
Şekil 4.47: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	61
Şekil 4.48: Granuloza lutein hücresi, teka hücresi.....	61
Şekil 4.49: Granuloza lutein hücre, endotel hücresi.....	62
Şekil 4.50: Granuloza hücresi.....	62
Şekil 4.51: Düz kas hücresi.....	63
Şekil 4.52: Stromal hücre.....	63

Şekil 4.53: TCDD + Mel grubu: Over folikülü, korpus luteum.....	65
Şekil 4.54: Korpus luteum, germinatif epitel.....	65
Şekil 4.55: TCD + Mel grubu: Over folikülü, korpus luteum.....	66
Şekil 4.56: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücre.....	66
Şekil 4.57: Granuloza lutein hücre, teka lutein hücreleri.....	67
Şekil 4.58: Granuloza lutein hücre.....	67
Şekil 4.59: Granuloza hücresi, mitoz figürü.....	68
Şekil 4.60: Granuloza hücresi.....	68
Şekil 4.61: Düz kas hücresi.....	69
Şekil 4.62: Ovaryum stromal hücre.....	69
Şekil 4.63: Endotel hücresi, eritrosit.....	70
Şekil 4.64: Ovaryum dokuları primordiyal evresi sonrası folikül ve korpus luteum sayısı karşılaştırması.....	71
Şekil 4.65: Ovaryum dokuları MDA seviyesi.....	72
Şekil 4.66: Ovaryum dokuları SOD aktiviteleri.....	72
Şekil 4.67: Ovaryum dokuları GSH düzeyleri.....	73
Şekil 4.68: Ovaryum dokuları TAS değerleri.....	73
Şekil 4.69: Ovaryum dokuları TOS değerleri.....	74
Şekil 4.70: Ovaryum dokuları OSI değerleri.....	74

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 4.1: Gruplar içi haftalık hayvan ağırlıkları ortalamaları.....	32
Tablo 4.2: Haftalık ağırlık değişiminin gruplar arası korelasyonu.....	33
Tablo 4.3: Deney başlangıç ile deney sonu ağırlık karşılaştırması.....	34
Tablo 4.4: Ovaryum dokuları gruplar arası ortalama folikül ve korpus luteum sayıları.....	70
Tablo 4.5: Biyokimya sonuçları istatistiksel analizi.....	71

# 1. GİRİŞ

İnsanlar, besin zincirinin en üstünde bulunmaları nedeniyle, biyolojik olarak biriken toksik maddelere en çok maruz kalan canlılardır. Bu nedenle kuvvetli bir toksik ajan olan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD) ve benzeri dioksinler, birçok hastalığın yanı sıra, kadınlarda üreme sistemini de etkileyerek dokularda defektlere ve ayrıca kısırlığa sebep olmaktadır.

Poli-klorlülü bifeniller (PCB) içerisinde en çok toksik etkiye sahip bileşik olan TCDD, arazi ve orman yangınları, kağıt vb. maddelerde kullanılan klorin beyazlatma gibi bazı kimyasal işlemler ve endüstriyel uygulamalar sonucu ortaya çıkmaktadır (1). Ayrıca, evsel atıkların kontrolsüzce yakılmasının çevresel dioksin emiliminin en geniş kaynağını oluşturduğu düşünülmektedir (2). Poli-klorlülü bifeniller, lipofilik özellikleri ve kimyasal kararlılıkları nedeniyle çevresel kontaminasyon oluşturmakta ve besin zincirinde birikerek insan sağlığını tehdit etmektedirler (3). Degredasyona dayanıklı lipofilik bir bileşik olan TCDD, besin zinciri yoluyla insan ve hayvan dokularında biyolojik olarak birikmektedir (4). PCB'ler başta sindirim olmak üzere deri yoluyla da organizmaya girebilmektedirler. PCB'lerin %90'ına oral yolla maruz kalınırken, %10'una ise diğer yollarla maruz kalınmaktadır (5). Sindirim yoluyla maruziyet, besin zincirinin üst sıralarında bulunan ve bu toksinlerin en çok biriktiği balıkların (6) ve kümes hayvanlarının tüketimiyle olmaktadır. Yüksek klorlanmış PCB bileşiklerine mesleki aktiviteler sırasında sürekli maruz kalınması ise dermal absorpsiyon riskini artırabilmektedir (7). PCB'lerin plasenta yoluyla fetüse ve süt yoluyla yeni doğana transfer olduğu tespit edilmiştir (3). Besin zincirine girerek, insanlar da dahil olmak üzere yeryüzündeki her canlıya taşındığı bilinen (8) bu çevre kirletici ajanların, immün sistemi baskılayıcı, endokrin sistemi bozucu (9), nörotoksik (10), kanserojenik (11), teratojenik (12) etkilerinin olduğu ve ayrıca davranış bozukluklarına sebep olduğu (13) saptanmıştır. Aynı zamanda kadınlarda infertilitenin yanısıra, özellikle meme ve endometriyum kanserlerinin ortaya çıkmasında önemli çevresel faktörlerden birisi de bu çevresel kirleticilere maruz kalınmasıdır (14,15). Özet olarak, PCB çeşitlerinin en toksik olan TCDD çevresel faktörlerle ve gıdalarla doğrudan veya dolaylı olarak alınması sonucu vücutta birikerek çeşitli doku ve organlarda çok sayıda patolojik durumun ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. TCDD ve dioksin benzeri toksik maddelerin özellikle endokrin sistemi ve ovaryum steroidogenezini etkileyerek hem erkek hem de dişilerde üreme sistemi organlarında ciddi hasarlar oluşturduğu gösterilmiştir (16,17).

Yapılan alışmalarda TCDD'nin serum melatonin konsantrasyonunu hızlı ve etkin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (18). Melatonin, kimyasal olarak N-acetyl-5-methoxytryptamine (19) diye bilinen, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunan bir hormondur (20,21). Melatonin, memelilerde primer olarak pineal bezden salgılanan ve kan dolaşımına geçip endokrin hormon olarak fonksiyon gösteren bir moleküldür (22). Tıbbi alanda melatonin, kanser, immun hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon ve üreme bozuklukları gibi birçok hastalığın tedavisinde potansiyel teröpatik ajan olarak üzerinde çalışılan bir moleküldür (23). Melatonin, tedavi ve araştırma amaçlı insan ve hayvanlarda kullanılmaktadır, ancak melatoninin TCDD'ye maruz kalan dişi sıçanların üreme sistemi dokularındaki bozukluklarında koruyucu ve iyileştirici rolü üzerine deneysel bir çalışma bulunmamaktadır.

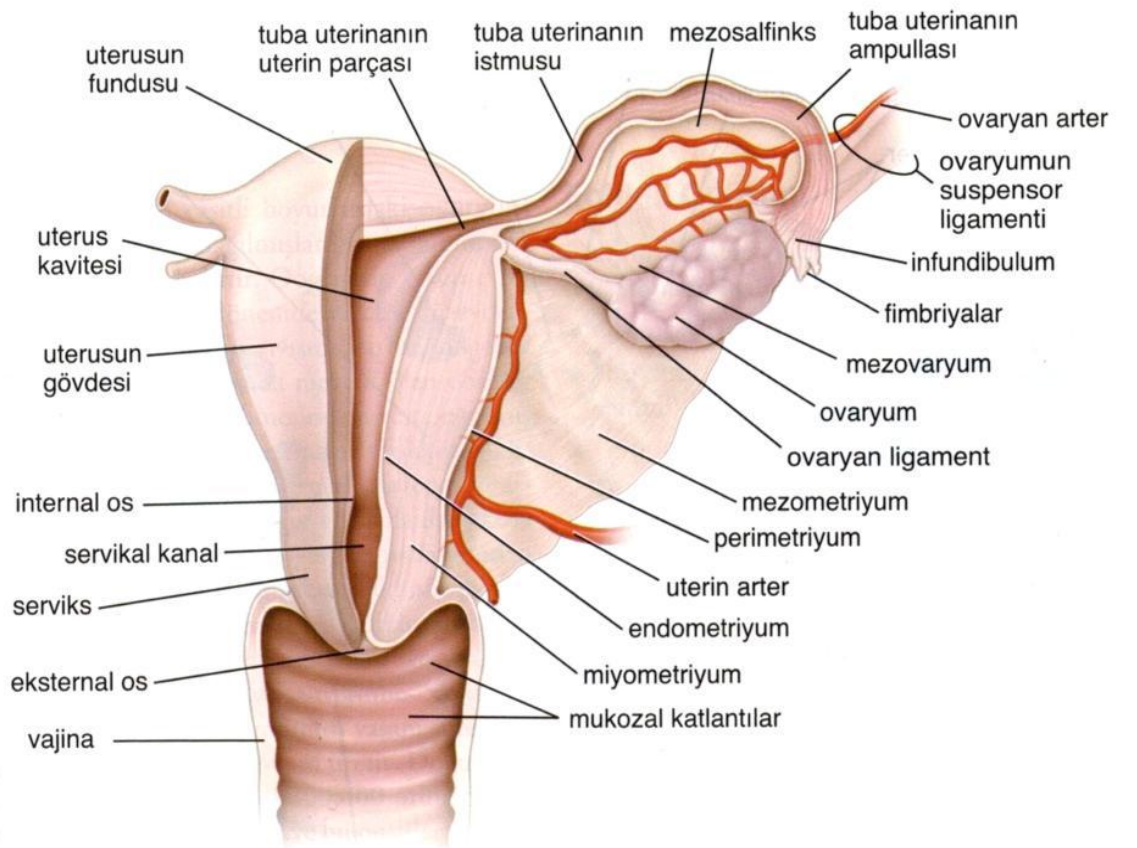
TCDD'nin kan serumdaki melatonin konsantrasyonunu etkin bir şekilde düşürdüğü gözönüne alındığında (19), yaptığımız çalışmayla melatonin takviyesinin TCDD'ye bağlı üreme dokuları hasarlarında koruyucu rol oynayabileceği düşünülmüştür. Yapılacak ileriki çalışmalarla ve insan üzerinde yapılacak çalışmalardan sonra, TCDD maruziyeti nedeniyle üreme sistemi üzerinde oluşabilecek hastalıklar ve kısırlık üzerine dioksinin etkileri ortaya konarak, bu sorunlarla ilgili etkin bir korunma ve tedavi alternatifini oluşturulabilir. Yaptığımız bu çalışmada, dişi sıçanlarda TCDD'nin ovaryumda oluşturduğu histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine melatoninin koruyucu ve iyileştirici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dışı Üreme Sistemi

Dışı genital sistemi, iç ve dış genital organlardan oluşur. İç (internal) üreme organları pelvikte yer alırken, dış (eksternal) genital yapılar perineumun vulva adı verilen anterior bölgede yer alırlar. İç üreme organları, ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus ve vajinadır (Şekil 1). Bunlar, pelviks kavitenin içinde ve perineumda yer almaktadırlar. Dışı genital organlar ise, mons pubis, labiyum majuslar ve minuslar, klitoris, vestibül ve vajina açıklığı, himen ve dış üretra ağzıdır (24).



Şekil 2.1: Dışı üreme sisteminin şematik çizimi (25).

Ovaryum ve tuba uterina biri sağda diğeri solda olmak üzere çifttir, diğere organlar ise tektirler. Ovaryumlarda dışı cinsiyet hücreleri olan gametler (oositler) ile üreme sisteminin organlarını kontrol eden ve vücudun diğere organları üzerinde etkileri olan cinsiyet hormonları (östrojen ve progesteron) üretilir. Ovaryumda ayrıca oositin atılmasını sağlayan ekzokrin salgı da üretilir. Bu özelliği ile ovaryum hem endokrin hem ekzokrin salgı yapan bir bezdir (26). Dışı üreme organları puberteden menopoza kadar düzenli sıklık değişikliklere uğramaktadır. Cinsel olarak yetişkin dişilerde ovaryumlar,

tuba uterinalar ve uterus belirgin yapısal ve fonksiyonel değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler nöral aktivite ve hormon seviyelerinin her menstrual siklusta ve gebelik sırasında değişimleriyle ilişkilidir. Bu mekanizmalar aynı zamanda dişi üreme sisteminin erken gelişimini de düzenlemektedirler. Menstrual siklusun menarş denem ilk başlangıcı, 9-14 yaş aralığında başlar. Menarş, pubertenin bitişini ve reproduktif yaşamın başlangıcını işaret eder. Menstrual siklusun uzunluğu ortalama 28-30 gündür. 45 ile 55 yaş arasında menstrual siklus seyrekleşir ve durur. Üreme fonksiyonundaki bu değişim ‘menapoz’ olarak adlandırılır. Bu dönemden sonra ovaryumlar, üreme fonksiyonları olan oosit üretimini ve endokrin fonksiyonları olan üreme aktivitesini düzenleyen hormonların üretimini durdurur. Diğer organlar (vajina ve meme bezleri) özellikle salgı aktivitelerinde değişen derecelerde fonksiyonlarında azalma gösterirler (26).

### **2.1.1. Ovaryum**

#### **2.1.1.1 Ovaryum Anatomisi**

Dişide pelvis duvarına yaslanmış olarak bulunan iki çift ovaryum vardır. Ovaryumlar, pembemsi beyaz renkli, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1,5 cm ve kalınlığı 1 cm olan, 4-8 gram ağırlığında badem biçiminde yapılardır (24). Hilus bölgesinden bir periton katlantısı olan mezovaryum ile uterusun geniş ligamentinin arkasına tutunurlar. Üstten ligamentum suspensory ovary aracılığı ile pelvik duvarına, alttan ligamentum ovary ile uterusu bağlanmışlardır (27). Ovulasyonun başladığı ergenlik dönemine kadar üzeri düzdür, bundan sonra, yani yumurtlama başladıktan sonra, üzerinde girinti ve çıkıntılar oluşur. Menstrual siklusun sonlanmasından sonra üzeri yine düzleşir (28).

Sıçanlarda böbreğin gerisinde lokalize olan ovaryumlar bursa ovarika ile sarılmıştır ve uterus kornuları ile bağlantılıdır (29). Organa damar ve sinirlerin girip çıktığı bölge olan hilus, mezovaryum olarak adlandırılan bir bağ dokusu ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılıdır (28).

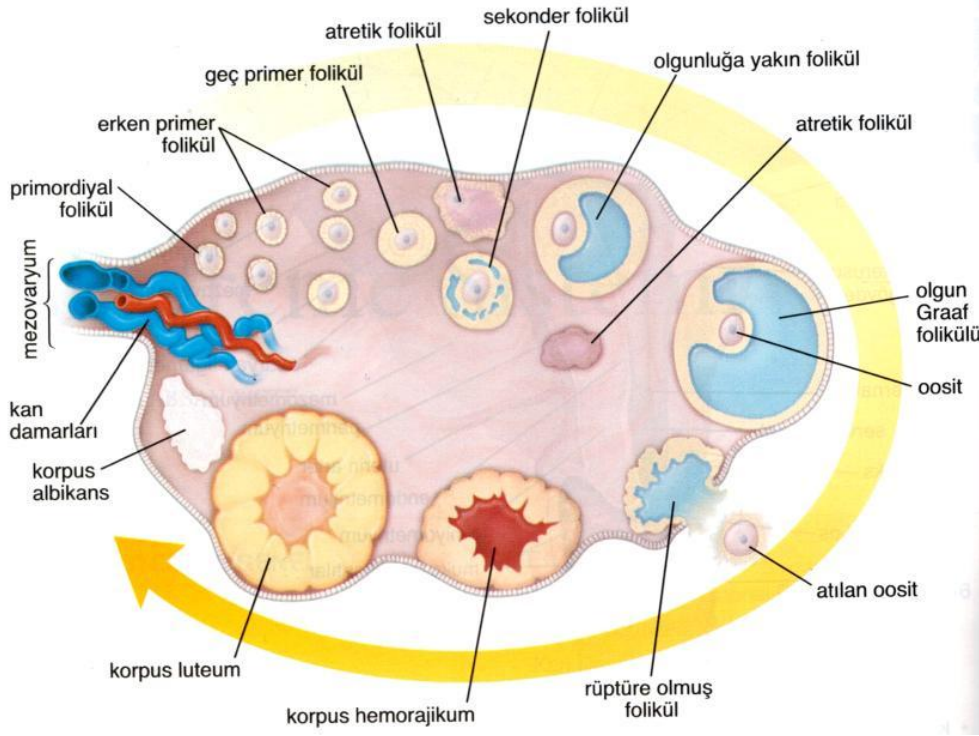
#### **2.1.1.2. Ovaryum Histolojisi**

Ovaryum yüzeyi tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Bu hücre tabakası germinal epitelyum olarak adlandırılır ve mezovaryumu kaplayan mezotelyumla devam eder. Hilusta mezovaryum, ovaryum yüzeyini kaplayan tek katlı kübik, yer yer tek katlı yassı bir epitel olan germinal epitel ile devam eder (27). Gençlerde kübik, yaşlılarda yassı olan bu epiteller kuvvetli bir bazal membran üzerine oturmuşlardır. Germinal epitelyumun altında bulunan, yaklaşık 100 mikron kalınlığında, kollagen ipliklerden zengin sıkı bağ doku tabakasına tunika albuginea adı verilir (24).

Ovaryum kesitlerinde içte medulla (substantia medullaris), dışta korteks (substantia corticalis) olmak üzere iki bölge gözlenir. Tunika albugineanın altında korteks tabakası başlar. Korteks, ovaryumun periferal kısmında, merkezdeki medullanın çevresinde bulunur. Korteks puberteye kadar sadece primordiyal foliküller içerirken, puberteden sonra farklı gelişim aşamalarındaki overyan folikülleri içerir. Foliküller etrafında stroma içinde dağınık düz kas fibrilleri bulunur (27). Doğumda sağlıklı bir bireyin her iki ovaryumda yaklaşık toplam 600000 ila 800000 primer oosit bulunur, ancak bunlardan yaklaşık sadece 400 tanesi ovulasyon safhasına ulaşır (25). Geriye kalanlar atreziye uğrayıp dejenere olurlar. Korteks tabakasından sonra, organın merkezinde medulla tabakası bulunur. Medulla, gevşek bağ dokusu, kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler içerir. Ara ara düz kas telleri bulunur. Bu tabakaya, kan damarlarından zengin olması nedeniyle zona vaskuloza da denir. Medulla ile korteks arası ise ayırt edilebilir bir yapıya sahip değildir (27).

### 2.1.1.3. Ovaryum folikülleri

Bir ovaryum folikülü, bir oosit ve bu oositi çevreleyen folikül hücresi ya da granüloza hücresi katmanından oluşur. Primordial folikül, primer folikül, sekonder folikül ve graaf folikülü olarak adlandırılan dört farklı aşamada gözlenirler (Şekil 2).



Şekil 2.2: Ovaryum kesitinin şematik çizimi (25)

### **Primordial Folikül**

Primordial foliküller en basit folikül yapılarıdır. Tunika albugineanın altında, korteksin stroma kısmı içinde bulunurlar. Primordial foliküller, tek sıralı yassılaştırılmış folikül hücreleri ile çevrelenmiş bir primer oositten meydana gelir. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile çevrilidir. Primer oosit, germinal vezikül olarak isimlendirilen eksantrik yerleşmiş bir nükleusa sahip, yuvarlak bir hücredir. Oosit sitoplazmasında, golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozomların kümelenmesi ile oluşan Balbiani cisimciği bulunur. Az miktarda da ribozom ve nükleer membran yapısına özdeş bir ince yapı gösteren seyrek lameller bulunur. Primer oositi çevreleyen folikül hücreleri birbirlerine desmozomlar aracılığıyla bağlanır (26, 30).

### **Primer Folikül**

Primordial foliküllerin gelişmesiyle birlikte, oosit, folikül hücreleri ve komşu stromada bazı değişiklikler meydana gelir. İlk olarak, oosit hacmi artar ve oositi çevreleyen folikül hücrelerinin sayısında artış olur ve tek katlı kübik halinin alır. Bu aşamadaki foliküle unilaminer primer folikül denir. Bu evrede primer oosit, zona pelusidayı oluşturmaya başlar. Folikül hücreleri çoğalır ve oosit etrafı çok tabakalı bir şekil alır. Bu foliküle multilaminer primer folikül denir ve bu aşamadan sonraki folikül hücreleri, granüloza hücreleri olarak isimlendirilir. Olgunlaşmakta olan primer oositin boyutu 100-150 µm'ye kadar gelişir ve Balbiani cisimciğinden Golgi elemanları sitoplazmaya salınır. Foliküler gelişim sırasında granüloza hücreleri ile oolemma arasında "gap junction" bağlantıları kurulur. Multilaminer primer folikül etrafında stroma hücreleri de organize olarak, 'teka folikülü tabakası'nı oluşturur (26, 31).

### **Sekonder Folikül**

Multilaminer primer foliküllerde granüloza hücreleri arasında içi folikül sıvısı ile dolu boşluklar görülmeye başladığında artık bu foliküller 'sekonder folikül' adını alır. Folikül duvarındaki küçük boşluklar giderek birleşirler ve antrum adı verilen tek bir büyük boşluk oluşur (26, 31). Folikül içinde eksantrik yerleşim gösteren oosit, yaklaşık 125 µm boyutuna ulaştıktan sonra, granüloza hücreleri tarafından folikül sıvısı içine salgılanan oosit maturasyon inhibitörünün (OMİ) ile büyümesi durdurulur. Granüloza hücreleri, oosit ile bağlantılı olduğu bölgede kumulus ooforus adı verilen küçük bir tümsek oluştururlar. Oositi saran ve zona pelusidaya komşu olan granüloza hücreleri ise korona radiatayı oluşturur. Korona radiata kumulus hücrelerinden gelişir. Bu aşamada

teka tabakası ise iç kısımda zengin damarlanmaya sahip teka internayı ve dış kısımda da stromaya benzer teka eksterna tabakalarını oluşturur (26, 32).

### **Graaf Folikülü**

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve folikül sıvısının artması ile çapı 10 mm ve daha fazla hacme ulaşan foliküle Graaf folikülü denir. Graaf folikülü ovaryum korteksini boyunca uzanır ve ovaryum yüzeyinde çıkıntılar oluşturur. Foliküller maksimum boyuta ulaştığında, granüloza hücrelerinin proliferasyon yetenekleri azalır. Granüloza tabakasında yer alan antrum boşluğu genişlerken, kumulus ooforus ile folikül duvarı arasındaki bağlantı gittikçe zayıflar ve zamanla oosit, etrafındaki korona radiata hücreleri ile birlikte antral boşluğa bırakılır (26).

### **Folikül Atrezisi**

Ovaryum foliküllerinin doğumda ortalama sayısı 400.000 iken, üreme hayatı boyunca yalnız ortalama 400 tanesi olgunlaşıp ovulasyonla sonuçlanır. (32). Büyük orandaki bu sayısal azalma, fetal gelişim sırasında başlayıp, pubertede, erişkin dönemde ve menapozda devam eden folikül atrezisinden kaynaklanmaktadır. Foliküler atrezi, folikül gelişiminin herhangi bir aşamasında (primordiyal, primer, preantral ve antral) meydana gelebilir (26). Atrezi durumunda, ilk olarak oosit büzülür, foliküler hücreler piknotikleşir, birbirlerinden ayrılır ve otolize uğrarlar. Zona pellusida siser ve uzun süre bu şekilde kalabilir. Teka hücreleri vasküler kordonlar şeklinde düzenlenip, dejenere olurlar. Atretik foliküllerde genel olarak granüloza hücreleri ile teka interna arasında bazal lamina kalıntıları görülür (32). Hücre ölümünden sonra ise, kalıntıları fagosite etmek üzere makrofajlar folikülü istila eder. (26). Üreme periyodunun sona erdiği menapozdan sonra ovaryumlar artık oosit atamaz ve menapozdan sonraki zamanda ovaryumların hacmi küçülür. Yaşla birlikte stroma daha da yoğunlaşır, tunika albuginea kalınlaşır ve ovaryum yüzey epiteli çok incilir. Yaşlı ovaryumlarda büyük, anormal, sıvıyla dolu kistik foliküller yaygın olarak görülür (32).

### **2.1.2.Ovaryum Embriyolojisi**

Embriyonun cinsiyeti genetik olarak fertilizasyon ile belirlenmesine rağmen 7. haftadan önce her iki cinstede genital sistem benzerdir. Genital sistem gelişiminin bu başlangıç periyoduna ‘farklılaşmamış dönem’ denir (33).

### **2.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar**

Gonadlar, mezodermal sölom epiteli (mezotel), mezenkim, ve primordial germ hücreleri olmak üzere üç farklı yapıdan oluşmaktadır. Gonadal gelişme mezonefrozun medial kenarındaki sölom epitelinin çoğalarak kalınlaşması ile başlar. Bu epitel altındaki mezenşimde çoğalar, sıklaşır ve mezenkimal blastemi oluşturur. Böylelikle mezonefroz ve dorsal mezenter arasında, orta çizginin herbir kenarında, longitudinal bir çift kabartı oluşur ki bunlara gonadal (genital) kabartılar denir (33, 34).

Primordial germ hücreleri embriyonik yaşamın 21. gününden itibaren allantois orijinine yakın vitellüs kesesinin kaudal duvarındaki endodermal hücreler arasında ortaya çıkar. 5. haftada bu hücreler arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca embriyonun lomber bölgesindeki gonadal kabartıya göç ederler 6. Hafta sırasında primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içine girerler ve bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Hem erkek hem dişi embriyoda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle bu evredeki gonada ‘farklılaşmamış gonad’ denir. (33, 34) Böylelikle oluşan farklılaşmamış gonada bir korteks ve bir medulla ayırtdedir. Gonadal seks, Y kromozomundaki Testis Determinig (Belirliyen) Faktör (TBF) tarafından belirlenir ve TDF testiküler farklılaşmayı yönlendirir. (34)

### **2.1.2.2. Ovaryumların Gelişmesi**

Y kromozomu ihtiva etmiyen embriyoda gelişme oldukça yavaş olur ve farklılaşmamış gonaddan gelişimin 10. haftasında ancak belirgin bir ovaryum gelişir. Primer germ kordonları medullaya uzanırlar ve mezenşim vasıtasıyla koparılarak kordon karakterini kaybeder ve düzensiz hücre kümeleri haline geçerek körelmiş bir rete ovariyi oluştururlar. Primordial germ hücrelerini ihtiva eden bu kümeler medulla kısmında belli bir süre yerleştikten sonra dejenere olup kaybolurlar. Kortikal kordonlar, erken fetal dönemde overin yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel, mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordiyal germ hücreleri onların içlerine girerler. 16. haftada kortikal kordonlar mezenşimle bir ya da birçok primordial germ hücrelerini saran izole olmuş hücre kümelerine bölünürler. Primordial germ hücrelerinden oogoniumlar, kortikal germ kordonlarından da tek tabakalı yassı folikül hücreleri oluşur. Böylelikle primordial folikül oluşur. Oogoniumlar fetal yaşam süresince devamlı mitozlarla çoğalırlar. 3. ayda bir kısmı 1. mayoz bölünmeye girerek primer oosit oluşur. 8. ayda oogoniumların tamamı,

primer oositlerin bir kısmı dejenere olur. Kalan primer oositler kortikal germ kordonlarından oluşan tek katlı yassı epitelle birlikte primordial folikülleri oluşturur. Postnatal yaşamda hiçbir oogonia oluşmaz. Primer oositler doğuma yakın 1. mayoz bölünmenin profazını bitirirler, metafaza gireceklerine istirahat durumuna (dikotene) geçerler. 1. mayoz bölünmeyi pubertadan biraz önce bitirirler. Primordial folikül hücreleri oosit olgunlaşmasını baskılayıcı bir madde (oosit maturation inhibitor – OMİ) salgılayarak primer oositlerin 1. mayoz bölünmeyi puberteden önce bitirmesini engellerler. (27, 33, 34)

Postnatal dönemde oogonium meydana gelmez. Her ne kadar doğumdan önce pek çoğu dejenere olsa da iki milyon civarında hücre, doğum öncesi primer oosit haline gelir. Doğumdan sonra ovaryumun yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, over hilumunda periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Yüzey epiteli, korteksteki foliküllerden, tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsülle ayrılır. Överler, gerileyen mezonefrozdaki mezenterilerden ayrıldıktan sonra, mezenterilerden, mezovaryum ile bağlanırlar (33)

### **Ovaryumların göçü**

Tuba uterinalar başlangıçta vertikaldir. Uterus gelişirken abdominal boşluğun interioruna doğru hareket eder ve horizontal durum alırlar. Ovaryumlar kısıtlı olarak yer değiştirirler. Körelmiş mezonefrosun posterior kenarında, tuba uterina kranialinde bulunur ve tuba uterinaya posterior olan bir durumda hareket ederek pelvis içindeki esas yerlerini alırlar. Gubernakulum, tuba uterinaların uterusla bağlanma yerleri yakınında organa yapışır. Gubernakulumun kranial parçası overyal ligament, kavdal parçası da uterusun yuvarlak ligamentini yapar. Yuvarlak ligament inguinal kanallardan geçer ve labia majora içinde sonlanır. Dişilerde daha küçük bir proses vajinalis oluşur ve oblitere olarak doğumdan önce kaybolur. Eğer kalıcı olursa ‘Nuck kanalı’ adını alır (33, 34).

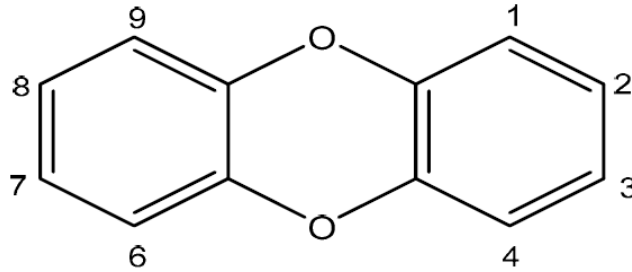
### **2.2. Dioksinler ve TCDD**

Çeşitli türevleri bulunan ‘poliklorlu dibenzo -p- dioksin’ (PCDD) bileşikler, yapılarında karbon, hidrojen, oksijen atomlarını bulunduran ve karbon atomlarının klorlanmasıyla oluşan kalıcı bir organik maddedir. Benzer kimyasal yapıya ve canlılar üzerinde benzer etkilere sahip olduklarından bu bileşikler dioksinli veya dioksin ve benzeri bileşikler olarak isimlendirilirler. PCDD, poliklorlu dibenzo furanlar (PCDF) ve poliklorlu bifeniller (PCB) ve bunların türevleri suda çok az çözündüklerinden metabolik

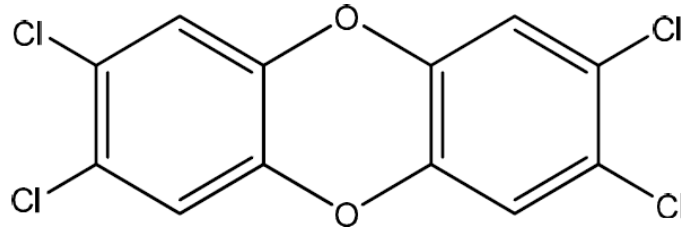
ve çevresel yıkımlara dayanıklı olup, doğada kararlı durumda bulunan yüksek derecede zehirli, geniş yayılım alanına sahip çevresel kirleticilerdir (35).

Geçmişte yaşanan endüstriyel kazalar çevresel TCDD kontaminasyonunun ana kaynağını oluşturmuştur. Bununla beraber, TCDD ve benzeri bileşikler 1978 yılına kadar herbisit olarak kullanılmıştır. İnsanlar için TCDD'nin en önemli direkt maruziyet kaynağı günlük yiyecekler, et, ve balık olmak üzere besinlerdir (36). TCDD'nin besin zincirindeki birikme potansiyeli düşünüldüğünde bu durumun normal olduğu belirtilmektedir (37). İleri düzey etkilerinden ve yaygın çevresel kontaminasyonundan dolayı TCDD'nin üreme sistemi üzerine etkileri merak konusu olmuştur.

TCDD kimyasal olarak iki benzen halkası içerir ve bu benzen halkaları bir çift oksijen atomu ile birbirlerine bağlanmıştır (Şekil 2.4) (38, 39). Doğada 75 farklı PCDD bulunmaktadır ve bu bileşiklerden 17 tanesi en fazla toksik etkiye sahip dioksin grubudur. Dioksinler arasında ise en fazla toksik etkiye sahip olanı 2,3,7,8 tetrakloro dibenzo *-p-* dioksindir (2,3,7,8 TCDD) (Şekil 2.4) (38, 39). Dioksinler atmosferik koşullar altında katı halde bulunurlar (33). Günümüze kadar 75 çeşit PCDD, 135 çeşit PCDF ve 209 çeşit PCB türevi tanımlanmıştır ve bu bileşikler toprak, su, hava ve canlıların özellikle yağ dokularında birikim gösterirler (38, 39).



Şekil 2.3: Poliklorlu dibenzo *-p-* dioksinin (PCDD) kimyasal yapısı (38).



Şekil 2.4: 2,3,7,8 TCDD'nin kimyasal yapısı (38).

2,3,7,8 TCDD'nin moleküler formülü:  $C_{12}H_4Cl_4O_2$  olup, moleküler ağırlığı: 321,97 gr/mol'dür. Erime noktası: 305-306 °C ve buhar basıncı:  $1,50 \times 10^{-9}$  mmHg, 25 °C'dir. 2,3,7,8 TCDD, hidrofobik yapıda bir bileşik olduğundan fiziksel, kimyasal ve



biyolojik bozunmalara karşı dirençli bir moleküldür. Bu nedenle çevrede birçok alanda bulunup, ekosistem üzerinden hayvan ve insan dokularında birikim gösterebilir (42).

### **2.2.1. Çevreye Yayılma ve Maruziyet**

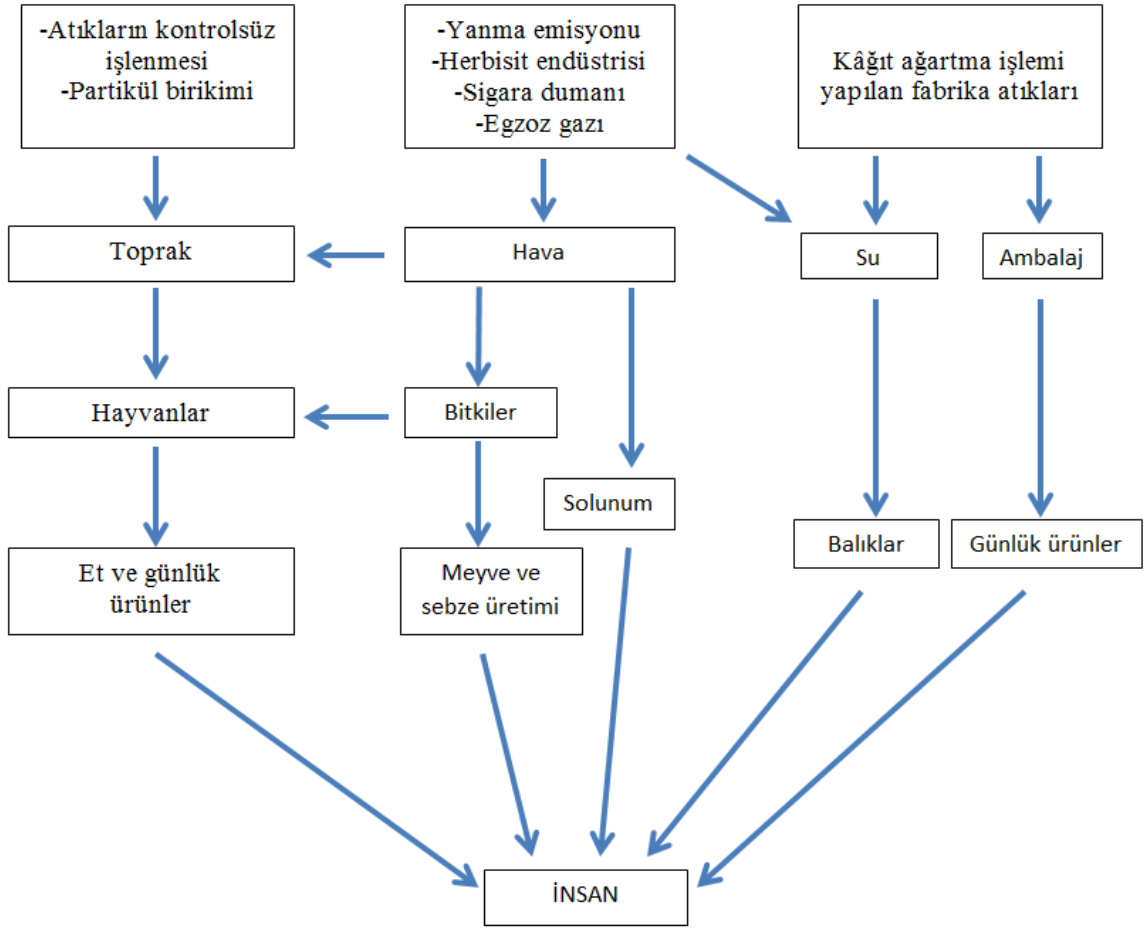
1920'li yıllarda yapılan çalışmalar insan doku örneklerinde dioksin konsantrasyonunun oldukça düşük miktarda olduğunu gösterirken, 1970'li yıllardan sonra yapılan çalışmalar bu oranda hızlı ve yüksek bir artış olduğunu göstermektedir. Ortaya çıkan bu bulguların, endüstriyel faaliyetlerde klorofenol içeren ürünlerin üretilmesinden kaynaklandığı söylenebilir (43).

Genel olarak dioksin bileşiklerinin kaynakları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir(43);

- Atık yakılması
- Tıbbi atıklar
- Demirli ve demirsiz metal üretimi
- Elektrik üretimi ve ısınma
- Mineral (kireç, çimento, seramik, cam ve asfalt karışımı) üretimi
- Motorlu taşıtlar
- Kontrolsüz yanma prosesleri
- Kağıt, tekstil, deri ve kimyasal endüstrisi
- Düzenli depolama ve biriktirme (çamur arıtımı, kompostlama, atık yağların birikimi)
- Sigara dumanı
- Orman yangınları, volkanik patlama gibi doğa olayları
- Hayvan yemleri

Dioksin çoğunlukla insan vücuduna et, süt ve balık ürünlerinin tüketimiyle alınmaktadır (44). Günde 30g süt ürünü tüketildiğinde vücuda yaklaşık 6 pg düzeyinde 2,3,7,8-TCDD alımı söz konusu olmaktadır. Balıkların TCDD'yi memelilere göre çok daha yavaş metabolize etmeleri nedeniyle deniz ürünlerinde daha fazla oranda dioksin birikimi olmaktadır. Tavuk, sığır ve domuz ürünlerinde yapılan çalışmalar, tavuklara ait örneklerin diğer türlere göre daha çok dioksin içerdiğini ve bunu domuz ve sığır örneklerinin izlediğini göstermiştir. (45). Ülkemizde Kocaeli yöresinde yapılan bir çalışmada da Kocaeli'deki atık yakma tesisi çevresinde beslenen hayvanların yumurta ve sütlerinde oldukça yüksek miktarlarda dioksin olduğu tespit edilmiştir (46).

Ekosistemde dioksinlerin canlılar arası geçişi ve insana ulaşması aşağıdaki gibi şematize edilebilir.



Şekil 2.5: Dioksinin insana maruziyet yolları (47)

### 2.2.2. Emilim

Dioksinler vücuda sindirim, solunum ve deri yolu olmak üzere 3 farklı yol ile alınırlar. Dioksinlerin vücuttaki emilim oranları, kimyasal bileşenin yapısı, emilim yolu, ve ortam koşullarına bağlı olmak üzere farklılık gösterebilir. TCDD bileşiğinde klor atomu moleküllerinin 2,3,7 ve 8. karbon atomlarına bağlı olması bu bileşiğin yağda çözünürlüğünü artırır. Yağda çözünürlüğün artması ile emilim arasında doğru orantı bulunması nedeniyle 2,3,7,8 TCDD bileşiğinin yağla emilim oranı oldukça yüksektir (48,49). Dioksin zehirlenmelerinde maruziyet %90 oranında ağız yoluyla olmakla birlikte; fabrika patlamaları, orman yangınları gibi durumlarda her üç yoldan da bulaşma olabilir. TCDD ağız yolu ile bitkisel yağda çözdürülerek verildiğinde %90 oranında emilirken diyetle karıştırıldığında bu oran %50-60'a kadar düşmektedir. Hayvan türleri arasında sindirim kanalındaki emilim oranları açısından çok büyük farklılıklar yoktur (50). Dioksinler vücuda alındıktan sonra temel olarak kan, kaslar, karaciğer ve yağ dokuda dağılırlar. Ancak, bu bileşikler özellikle karaciğer ve yağ dokuda birikme özelliği gösterirler (51).

### **2.2.3. Dioksinin metabolizması ve atılımı**

Dioksinlerin vücuttan atılımı 3 farklı yolla gerçekleşmektedir: dışkı ile atılım, idrar ile atılım ve sebüm ile atılım. Dışkı ile atılım diğer atılım yöntemlerine göre daha fazla gözlenmektedir. Dioksinlerin vücuttan atılımı süresi ortalama yarılanma ömürlerine denk gelmekte ya da daha uzun sürmektedir. Özellikle sebüm ile atılım genellikle yarılanma ömründen daha fazla sürede gerçekleşmektedir (52). Dioksinlerin bir başka atılım yolu da anne sütü ile olmasına rağmen bu yolla atılım anneden yavruya nakil olduğu için atılım olarak değerlendirilmemektedir. Süt ile atılımda yavrunun dioksine maruz kalma oranının anneden daha yüksek olduğu bulgusuna rastlanılmamasına rağmen; yeni doğanlarda anne sütünden kaynaklı zehirlenmelerin olduğu bildirilmektedir (46).

Bu bileşiklerin metabolizmaları da emilim ve dağılımlarında olduğu gibi bileşik ve canlı türüne göre oldukça önemli farklılıklar gösterir. Dioksinli bileşikler karaciğer mikrozomlarında bulunan ve ilaçların metabolizmasında görevli sitokrom p-450 enzimleri tarafından oldukça yavaş bir şekilde polar maddelere metabolize edilirler (53). Metabolizma sırasında hidroksil metabolitler ile sülfür taşıyan metabolitler tespit edilmiş ve açığa çıkan metabolitlerin konjuge edilerek idrar veya safrayla atıldığı bildirilmiştir (54). Yapılan bir çalışmada (55) 2,3,7,8-TCDD veya metabolitleri ile proteinler veya nükleik asitler arasında kırılması oldukça güç olan ve yüksek enerji gerektiren kovalent bağla bağlanmanın hemen hemen hiç olmadığı tespit edilmiştir. Dioksinlerin temel atılımı dışkı yoluyla olup, idrarla atılan oran dışkıdakine göre oldukça düşüktür. Klorlanmanın artması ile dışkı ile atılım artarken süt ve yağ dokuda depolanma azalır (46).

Dioksinli bileşiklerin yarı ömürleri bileşik çeşidine ve canlı türüne göre farklılık gösterir. Örneğin; TCDD' nin yetişkin insanlardaki yarı ömrü, ortalama 2840 gün iken sıçanlarda 19 gün civarındadır. Ayrıca, obezite ve tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıklar, dioksinin yarılanma ömrünü arttırarak vücutta kalış sürelerini ve zehirliliklerini arttırmaktadır. Genel olarak bu bileşiklerin sıçanlardaki yarı ömrü 12-24, maymunlarda 365 gün ve insanlarda 5.8-9.8 yıl olduğu belirlenmiştir (56). İnsanlarda bazı dioksin türevlerinin yarılanma ömürleri ise, 1,2,3,7,8-PeCDD için 12.6 yıl, 1,2,3,4,7,8-HxCDD için 26-45 yıl, 1,2,3,4,6,7,8- HpCDD için 80-102 yıldır (46).

### **2.2.4. TCDD'nin etki mekanizması**

Hücre içerisine giren dioksin ve benzeri bileşikler DNA transkripsiyon faktörlerinden steroid yapılı aril hidrokarbon reseptörleri (AhR) aracılığı ile etkileşim

gösterirler. AhR reseptörleri, yüksek afinite ve hücre içi bağlama özelliğine sahip bir protein grubudur. İnsan lenfosit kültürlerinde bulunan AhR reseptörleri timus ve bademciklerde üretilir (57). Hücre içerisine nüfuz eden TCDD bileşikleri, sitoplazmaya girdiklerinde Hsp90 geni aracılığı ile, aktif olmayan AhR reseptörlerine bağlanarak bir AhR-TCDD kompleksi oluştururlar ve böylece reseptörler aktif forma geçer. Bu şekilde hücre çekirdeğine giren kompleks, aril nükleer translokaz (Arnt) ile bağlanarak TCDD-AhR-Arnt üçlü kompleksini oluşturur. Hücre çekirdeğinde meydana gelen bu metabolik yolak bazı gen bölgelerinin sentezinde baskılanmaya sebep olurken, karaciğerde bulunan CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 ve diğer CYP genlerinin sentezinde artışa sebep olmaktadır (57).

Dioksin maruziyeti sonucunda meydana gelen en önemli biyolojik cevaplardan birisi AhR reseptör mekanizması iken, ikinci önemli mekanizma buna bağlı olarak hücrede P450 enzimlerinin indüksiyonudur. Dioksin toksisitesi ile meydana gelen P450 enzim indüklenmesi, letalite, wasting sendromu, karaciğer hasarı, bağışıklık yetmezliği, gelişme bozuklukları ve kanser gibi sebeplere yol açmaktadır (58). Dioksinlerin metabolize edilmeleri oldukça yavaştır. Karaciğer mikrozomlarında bulunan P450 enzimi ile polar maddelere metabolize edilirler (38).

### **2.2.5. TCDD ve oksidatif stres**

Reaktif oksijen türevleri çevresel toksinlere yanıt olarak üretilir. Yapılan çalışmalar TCDD'nin bazı hedef organlar üzerinde oksidatif stres üzerinden ve serbest oksijen radikalleri üreterek hasara neden olduğunu öngörmektedir.

Hücrel redoks dengesinde oksidatif sıçrama, genellikle hücrel antioksidan savunmasına oranla reaktif oksijen türlerindeki artışın daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Bu açıdan, TCDD aracılı AHR aktivasyonu, hücrel redoks dengesini bozarak oksidatif stres yanıtı oluşturur (59) ve TCDD'nin toksisitesinde oksidatif stresin önemli bir yeri olduğu geniş bir kabul görmektedir ve bu durum birkaç laboratuvar tarafından gösterilmiştir (60).

Oksidatif stres, TCDD ve türevlerinin toksisiteleri için belirleyici bir etmen olarak kullanılmaktadır (61) TCDD'ye karşı toksik yanıtlar farklı hayvan türlerinde geniş farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, moleküllerin sayısı, doku spesifitesi, biyokimyasal ve fizyolojik karakteristik değişikliklere dayandırılabilir (61).

Çok yüksek oranda TCDD maruziyeti dolaylı olarak kansere neden olur ki, öngörülen mekanizmalardan birisi TCDD'nin oksidatif strese sebep olmasıyla ortaya

çıkan oksijenin DNA hasarına sebep olmasıdır (62). Diğer mekanizmalar ise, endokrin sistemi veya sinyal yollarını bozmasıdır (63).

TCDD ve benzeri poliklorl  bifenillerin 30 haftalık kronik maruziyete uğrayan sıçanların hepatik ve beyin dokularında süperoksit anyon oranında önemli ölçüde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, 26 ila 46 ng/kg/d ve 3 ila 46 ng/kg/d dozluk maruziyette hepatik ve beyin dokularında yaklaşık olarak 1,5 katlık artış gözlenmiştir. Hepatik ve beyin dokularında bu dozda 1,5 katlık bir artış gözlenirken, 100 ng TCDD/kg/d oranındaki uygulamada hepatik ve beyin dokularında sırasıyla 8 ve 3.8 katlık bir artış gözlenmiştir (64).

Yapılan alışmalar ve literatür bilgileri gözönüne alındığında, TCDD'nin önemli ölçüde oksidatif strese neden olduğu ve oksidatif stres üzerinden toksisiteye neden olduğu anlaşılmaktadır.

#### **2.2.6. TCDD'nin üreme sistemi üzerine etkileri**

Uteral ve laktasyonel TCDD maruziyetinin dişi üreme sistemi üzerine etkileri erkek üreme sistemi üzerine olan etkileri kadar detaylı araştırılmamıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar gestasyonel TCDD maruziyeti etkilerinin sadece erkek üreme sistemi üzerine özgü olmadığını göstermiştir.

TCDD'ye maruz kalan bireylerin üreme organlarında olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır. Yapılan alışmalar hem dişi hem de erkek bireyler üzerinde farklı etkilerin ortaya çıktığını göstermiştir. Erkek bireylerde sperm sayısında azalma, prostat büyüklüğünde k c lme, dişileştirilmiş davranışlar, dişi bireylerde ise rahim ve yumurtalıklarda bazı morfolojik değişimlerin olduğu gözlenmiştir (65).

Uterus üzerinden veya laktasyonel TCDD maruziyetinde sıçanlarda ovaryum ağırlığında azalma gözlenir (66). Yapılan başka bir çalışmada sıçanlarda gestasyonun 4. günü ila 15. günleri arası 1 g/kg/gün dozunda maruziyette estradiol sirkülasyon seviyelerinde değişim gözlenmemiştir (67). Benzer Şekilde, gestasyonun 15. gününde 1 g TCDD/kg dozunda maternal olarak uygulanan Long Evant sıçanlarının serum estradiol seviyesinde etki bulunmamıştır (66). Histolojik incelemede maternal olarak uteral yoldan tek doz (1 g TCDD/kg) uygulanan ve laktasyonel olarak maruz olan 21-22 günlük sıçanların ovaryumlarında, taşıyıcı bir sıvı aracılığıyla maruz kalan sıçanlarla kıyaslandığında folikül sayısında azalma gözlenirken, ovaryum hacminde ve etkilenen folikül bölgelerindeki apoptotik hücre sayısında değişim gözlenmemiştir (68). Benzer Şekilde, gestasyonun 1. gününde tek doz 0.6 mg/kg of 3,3',4,4',5,5'-HCB (PCB 169) ve

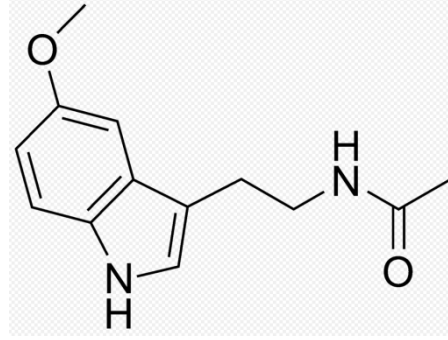
devamında 2.-18. günler arası hergün 1 mg/kg dozunda 3,3',4,4'-TCB (PCB 77) maternal olarak uygulandığında, ovaryan foliküllerde kistik genişlemede istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlenmiştir (69).

### **2.2.8. Toksikite durumunda tedavi**

Dioksinlerin vücutta birikme özelliği göstermesinden dioksin zehirlenmelerinde daha çok vücutta birikiminin önlenmesi ve atılımını hızlandırarak uzun olan yarı ömrünü düşürmeye yönelik yaklaşımlar denenmiştir. Dioksin zehirlenmeleri sonucu oluşan klor akne için normal akne tedavisi uygulanmaktadır (70). Dioksinlerin atılımını hızlandırmak için daha çok hayvan çalışmalarında bitkisel gıdalar denenmiştir. Yapılan çalışmalar pirinç kepeği (71), chitosan (72), deniz yosunu (73) gibi bitkisel diyet maddelerinin dioksin atılımını artırdığını göstermiştir. Ayrıca, klorella gibi klorofil bakımından zengin gıda maddelerinin de böyle bir etkisi olduğu bildirilmiştir (73). Bunlara ilave olarak alifatik doymuş bir hidrokarbon olan skualan (70) ve yağ yerine kullanılan sindirimi güç bir madde olan olestra'nın (74) da TCDD'lerin atılımını hızlandığı ortaya konulmuştur. Kolesterol düşürücü bir ajan olan kolesitraminin dioksinlerin vücut yükünü azaltıcı etkileri ispatlanmıştır. Aktif kömürle rodentlerde yapılan çalışmalarda ise PCB'lerin bağırsaklarda emilimini azalttığı bildirilmiştir (70). Antioksidan tedavisi TCDD'nin toksik etkilerinin çoğuna karşı koruyucu etki yapmaktadır (73). Örneğin, suda çözünebilir bir antioksidan olan butillenmiş hidroksiaanisol'ün sıçanlara uygulanması TCDD'nin lethal bir dozundan kısmi koruma sağladığı ve lipid peroksidasyonu baskıladığı tespit edilmiştir (59,60). Vitamin A, karatenoidler ve doğal bitkisel bir fenolik bileşik olan ellagik asitin de TCDD'nin oksidatif etkilerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (75).

### **2.3. Melatonin**

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxy tryptamine) (76), hayvanlarda, bitkilerde, mantar ve bakterilerde karanlıkta salgılanan bir hormondur (77). Hayvan hücreleri tarafından doğrudan triptofan amino asitinden sentezlenir (78).



Şekil 2.6: Melatoninin kimyasal yapısı (76)

Hayvanlarda melatonin, uyku zamanlamasının belirlenmesi, kan basıncının ayarlanması, mevsimsel üreme ve daha birçok fizyolojik olayların sirkadyal ritimlerinin düzenlenmesinde görev alır (76). Melatoninin birçok biyolojik etkisi melatonin reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşirken, diğer özellikleri kuvvetli anti oksidant özelliğinden kaynaklanmaktadır (79). Bu özelliği ile mitokondriyal ve nükleer DNA'nın korunmasında önemli rol oynar(80). Melatonin oral yolla kapsül, tablet veya sıvı olarak alınabildiği gibi, dilaltı ve transdermal olarak da kullanılabilir. İnsanlarda bazı durumlarda uzun dönemli terapötik amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Omurgalılarda melatonin, beynin merkezinde yerleşik ama kan-beyin bariyerinin dışında kalan, küçük bir endokrin bez olan pineal bezden genellikle geceleri salgılanan bir hormondur. İnsanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan mevsimsel olarak günlük, farklı farklı sürelerde ve miktarlarda melatonin üretimi yaparlar (81). Bu nedenle salgılama süresinin farklılığı, gün uzunluğuna göre değişen üreme, davranış, deri/kabuk büyümesi, ve kamuflaj gibi foto-periyodik olaylar için bir sinyal olarak fonksiyon gösterir (82).

### 2.3.1. Fonksiyonları

#### 2.3.1.1. Sirkadyan Ritim

Hayvanlarda melatoninin birncil fonksiyonu gece-gündüz siklusunun regülasyonudur. Yeni doğan bebeklerin melatonin seviyesi üçüncü aydan itibaren normal seviyesine ulaşır ve gece yarısı ile sabah 08.00 arası en yüksek düzeye ulaşır (83). İnsanlarda melatonin miktarı yaşla birlikte azalmaktadır (84). Ayrıca çocukluktan gençliğe geçtikçe melatoninin gecelik salınım süresi gecikir ve daha geç uyumaya neden olur (85).

### **2.3.1.2. Antioksidan**

Biyolojik saatin düzenlenmesi işlevinin yanında, melatonin güçlü bir serbest radikal süpürücü ve geniş spektrumlu bir antioksidandır (86). Melatonin, hücre zarları ve kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen bir antioksidandır (87). Bu antioksidant, OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ve NO gibi molekülleri içeren radiakal oksijen ve nitrojen türlerinin doğrudan temizleyicisidir (88). Melatonin diğer bütün antioksidanlarla beraber her bir antioksidanın etkisini artırma yönünde fonksiyon gösterir (88). Melatoninin vitamin E'nin iki katı kadar etkili olduğu ve en etkili lipofilik antioksidan olduğu ispatlanmıştır (89). Melatonin diğer antioksidanlardan ayıran en önemli özelliklerden birisi de, metabolitlerinin de radikal süpürücü/uzaklaştırıcı olmasıdır (90). Ayrıca, vitamin C ve vitamin E gibi klasik antioksidanlardan farklı olarak amfifilik özelliğe sahiptir. Sentetik ve mitokondriyal hedefli MitoQ ve MitoE antioksidanları ile kıyaslandığında, mitokondriyal oksidatif strese karşı daha iyi bir koruyucu olduğu ispatlanmıştır (91).

### **2.3.1.3. İmmun Sistem**

Melatoninin immün sistemle reaksiyona girdiği bilinmektedir ancak bu reaksiyonların detayları henüz net değildir (92). Anti-inflammatör etkisi literatürde belirtilen en belirgin özelliğidir (93). Melatoninin immünolojik pozitif etkisinin immünokompatent hücreler tarafından sentezlenen yüksek afiniteli MT1 ve MT2 reseptörleri üzerindeki fonksiyonundan düşünülmektedir. Preklinik çalışmalarda, melatonin sitokin üretimini arttırmaktadır ve bu nedenle kazanılmış immün yetmezlikleri etkisizleştirebilir (94). Ayrıca bazı çalışmalarda melatoninin, viral (HIV gibi), ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı mücadelede ve kanser tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (95).

### **2.3.1.4. Tıbbi Kullanımı**

Melatonin yaşlılarda uykusuzluk için kullanılmaktadır (96). Uzun süreli melatonin salınımının yaşlılarda uykusuzluğun tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir (96). Bazı çalışmalar kokain gibi bazı ilaçların etkilerini kırmada melatoninin rol aldığını göstermektedir (97). Genel olarak tıbbi alanda melatonin, kanser, immün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon ve üreme bozuklukları gibi birçok hastalığın tedavisinde potansiyel bir teröpatik ajan olarak üzerinde çalışılan bir moleküldür (98).

Birkaç klinik çalışmada melatoninin migren ve diğer birtakım baş ağrılarında etkili bir tedavi olabileceği gösterilmiştir (99).



Melatoninin safradaki konsantrasyonu geceleyin gündüze göre 2-3 kat daha fazladır (100). Safra kesesinde melatonin varlığı, kolesterolün safraya çevrilmesi, oksidatif stresi önleme ve safra kesesinden safra taşı hareketliliğini arttırma birçok koruyucu özelliklere sahiptir (101). Melatonin ayrıca, intestinal duvardan geçen kolestrolü düzenleyerek safra kesesinde üretilen kolestrol miktarının azalmasını sağlar (100).

Hem insan hem de hayvan çalışmaları melatoninin potansiyel bir radyoprotektif olduğunu göstermiştir (102). Dahası, bu amaçla yaygın olarak kullanılan bir ajan olan amifostinden daha etkilidir. Biyolojik hasarların yaklaşık %70'nin nedenini, iyonize radikallerin oluşturduğu ve DNA, protein ve hücre membranlarına karşı afinitesi olan özellikle hidroksil gibi serbest radikallerdir. Melatoninin iyonize radyasyondan koruma mekanizması serbest radikallerin uzaklaştırılması ile gerçekleşir (103).

Melatonin, akut nikotin yoksunluğu nedeniyle ortaya çıkan anksiyete, huzursuzluk, gerginlik, depresyon ve öfke gibi semptomları anlamlı derecede ortadan kaldırmaktadır (104).

#### **2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller**

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilirler (105,106).

Çiftlenmemiş elektron, serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği, kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (105, 107).

Biyolojik sistemler için serbest radikallerin kaynağı moleküler oksijendir ( $O_2$ ). Reaktif ara ürünlerinin hepsi radikal olmadığı için; serbest radikal terimi yerine “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri” (ROP) terimleri de kullanılabilir (105, 108).

Reaktif oksijen partikülleri iki şekilde sınıflandırılır (109). Birinci sınıf radikal olan ROP'ler; süperoksit radikal ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal ( $OH^-$ ), peroksil radikal ( $ROO^-$ ), alkoksil radikal ( $RO^-$ ), semikinon radikal (HQ), hemoproteine bağlı serbest radikallerdir. İkinci sınıf radikal olmayan ROP'ler; hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), lipid hidroperoksit

(LOOH), hipohaloz asit (HOX), N-halojenli aminler (R-NH-X), singlet oksijen ( $1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve azotdioksit ( $NO_2$ )'dir (109).

Artmış reaktif oksijen partikülleri zararlı etkilerini; hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarak, hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirerek, DNA'yı tahrip ederek, mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarak, elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederek, hücrenin potasyum kaybını artırarak, trombosit agregasyonunu artırarak, dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırarak, hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarak gösterirler (105, 107, 108).

#### **2.4.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları**

Alkol, uyuşturucu gibi bağışıklık yapan maddeler, radyasyon, hava kirliliği, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara ve antineoplastikler eksojen radikal kaynakları olarak sayılabilir. Mitokondrial elektron transport sistemi, iskemi, travma, intoksikasyona bağlı oksidatif stres durumları, peroksizom enzimleri, tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, endoplazmik retikulum ve nukleus membranındaki elektron transport sistemleri, NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz gibi hücre içi enzimler de endojen radikal kaynaklarıdır (110).

#### **2.4.2. Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri**

Fizyolojik şartlarda oluşan reaktif oksijen türleri; sinyal proteinleri, fagositozdaki savunma mekanizmaları, nötrofil fonksiyonları gibi olaylara müdahil olur. Aşırı oluşan oksidatif stres ise proteinler, lipidler ve DNA üzerinde zararlı etkiler yapar (111).

#### **2.4.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu**

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özellikle hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest oksijen ürünleri ile yüksek oranda tepkimeye girer ve peroksidasyon meydana gelir. Membran akışkanlığını sağlayan bu doymamış yağ asitlerinin hasarı sonucu akışkanlıkta azalma olur. Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan malondialdehit (MDA) oluşur (112).

#### **2.4.4. Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler**

Protein oksidasyonu; reaktif oksijen türleri ve oksidatif stresin ikincil ara ürünlerinin proteinlerin kovalent modifikasyonuna neden olması ile oluşur. Proteinlerdeki bu değişiklikler sonrasında çeşitli hücre fonksiyonları (sinyal iletimi mekanizmaları, transport ve enzim sistemleri) etkilenir (113). Ayrıca DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar da serbest oksijen türlerinden etkilenirler (114). DNA molekülünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (115).

#### **2.5. Antioksidan Sistem**

Antioksidan sistemde görev yapan moleküller; organizmada sentezlenen (endojen) veya dışarıdan alınan (eksojen), oksidan moleküllerin hücreye zarar vermesini önleyen, enzimatik veya nonenzimatik yapılardır (116).

##### **2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar**

Vitamin C, Nitrik oksit sentaz tetrahidrofolatı stabilize ederek nitrik oksit (NO) üretimini artırır. Vitamin E, yağda çözünen bir vitamin olup lipid peroksidasyonunu önler (111). Karoten, serbest radikalleri temizler, peroksitleri inaktif hale getirir (117). Koenzim Q10, yağda çözünen bir antioksidan olup  $O_2^{\cdot-}$ 'i temizleyerek endotelial disfonksiyonu azaltır (111).

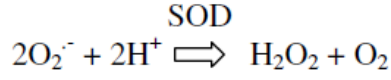
Serüloplazmin, iki değerlikli demirin üç değerlikli demire yükseltgenmesini, böylece fenton reaksiyonunu inhibe eder. Serbest radikal oluşumu da inhibe edilmiş olur (118). Transferrin, dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak fenton reaksiyonunu önler (119). Melatonin, triptofandan sentezlenir, lipofiliktir, OH radikalini temizler (120).

Glutatyon (GSH), tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu gibi) yanı sıra antioksidan olarak da görev yapar (121). Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girip oksidatif hasara karşı koruma yapar. Karaciğer vücuttaki glutatyonun en önemli kaynağıdır (122). Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan bir antioksidan olup, redükte glutatyon/okside glutatyon oranı oksidatif streste azalır (123). Diğer nonenzimatik antioksidanlar lipoik asit, bakır, çinko, selenyum gibi elementler, folik asit, ürik asit, albümin gibi kofaktörler, B1, B2, B6, B12 gibi vitaminlerdir (111).

## 2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar

### 2.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

$O_2^-$  anyonunun  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu gerçekleştiren enzimdir (124).



Bu tepkime sonucunda oluşan ürünler ya lizozomlardaki CAT tarafından ya da mitokondrideki glutatyon peroksidaz tarafından  $H_2O$ 'ye detoksifiye edilir (111).

### 2.5.2.2. Katalaz (CAT)

Glikoprotein yapıda bir hemoprotein olup,  $H_2O_2$ 'nin yüksek yoğunlukta olduğu durumlarda yüksek aktivite gösterir (125).  $H_2O_2$ 'yi suya dönüştürür (111).

### 2.5.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutatyon Redüktaz (GR):

GSH-Px, yapısında selenyum metali bulunan bir metalloenzimdir. Redükte glutatyonu okside glutatyonla dönüştürürken aynı zamanda  $H_2O_2$ 'yi de suya çevirir. Okside glutatyon ise glutatyon redüktaz (GR) enzimi aracılığı ile NADPH kullanılarak yeniden redükte glutatyonla dönüştürülür (126). Ortamda  $H_2O_2$  düşük yoğunlukta ise GSH-Px, CAT'a göre daha aktiftir (127).

### 3. MATERYAL METOT

#### 3.1. Deney düzeni ve planı

Yapılan bu çalışmada, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 72 adet, 75 günlük genç, 150-180 g ağırlığında *Wistar albino* cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney hayvanları merkezinde, havalandırması olan, 22 + 2 °C' lik ısı ve mevsimsel gün ışığı ritmindeki aydınlatmalı odalarda özel kafeslerde beşerli gruplar halinde konuldu. Bütün sıçanlar standart pelet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Sıçanlar aşağıdaki şekilde 6 gruba ayrıldı ve tartılarak deney başlangıcındaki ağırlıkları kaydedildi.

Gruplar;

1. Grup: Kontrol grubu,
2. Grup: Yağ grubu (0,5 ml/kg, gg)
3. Grup : TCDD grubu (gastrik gavajla 1µg/kg/hafta x 16 hafta TCDD)
4. Grup: %5 Alkol grubu (0,5 ml/kg- 115 gün i.p.)
5. Grup: Mel grubu (10 mg/kg melatonin - 115 gün i.p.)
6. Grup: TCDD + Mel grubu ((gg 1µg/kg/hafta TCDD + 10mg/kg/gün Melatonin) x 16 hafta).

#### 3.1.1. TCDD ve Melatonin Hazırlanışı

Deneyde kullanılan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin / TCDD (%98 saflık oranı) (Wellington Laboratories, Canada) kullanıldı. Ortalama hayvan ağırlığı 160 gr olarak ölçülüp, hayvan ağırlıklarına göre uygulanacak TCDD doz oranı 1µg/kg olacak şekilde hesaplanılarak, 16µl TCDD alınıp (stok: 60µg/1.2 ml), 100ml mısır yağı içerisinde çözülerek üç haftalık stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stoktan her bir hayvana 0,5 ml gavajla haftada bir kez verildi. Stok çözeltisi bittikçe aynı prosedürle yeni TCDD stok solüsyonları hazırlandı.

Çalışmada kullanılan melatonin ise enjeksiyon aşamasında seyreltilmiş hali 10 mg/kg doz oranında olacak şekilde (336 mg), önce %100'lük 3,15ml alkolde çözüldü. Bu çözelti daha sonra ependorf tüplerine (450 µl) bölünerek stoklandı. Hayvanlara uygulama esnasında bir ependorf tüpündeki çözelti, son alkol oranı %5 olacak şekilde serum fizyolojik sıvısıyla seyreltilip (9 ml) her bir hayvana 30µl olarak i.p. yolla enjekte edildi.

### 3.1.2. Deney uygulama süreci

Çalışma başlangıcından itibaren kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. Yağ grubuna haftada bir gün gastik gavajla (gg) 0,5 ml/kg mısır yağı verildi. TCDD grubuna haftada bir kez gg. 1µg/kg TCDD uygulandı. Alkol grubuna günlük i.p. olarak 0,5 ml/kg olacak şekilde %5'lik alkol verildi. Mel grubuna günlük i.p. olarak 10 mg/kg melatonin uygulandı. TCDD + mel grubuna haftada bir kez gg ile 1µg/kg TCDD ve günlük olarak i.p. 10 mg/kg melatonin uygulandı. Tüm deney gruplarındaki uygulama süresi 115 gün olup 116. günden sonra tüm deney gruplarındaki sıçanların, ketamin/ksilazin anestezisi altında histolojik ve biyokimyasal incelemeler için her iki ovaryumları alındı. Alınan ovaryum doku örnekleri histolojik inceleme için %10'luk formaldehit ve elektron mikroskopik incelemeler için %2,5 gluteraldehit içerisine konuldu. Biyokimyasal incelemeler için alınan doku örnekleri -80 °C de donduruldu.

### 3.2. Işık Mikroskopik Teknikler

Formaldehit ile tespit edilen ovaryum, doku örnekleri 48 saatlik tespit süresi sonunda Tissue-Tek VIP / SAKURA otomatik doku takip cihazında aşağıdaki protokole göre doku takip basamaklarından geçirildi.

1. %10 Formalin	40 dk
2. %10 Formalin	40 dk
3. %80 alkol	1 saat
4. %96 alkol	1 saat
5. %96 alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1 saat
8. Ksilen	1 saat
9. Ksilen	1 saat
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	1 saat
12. Parafin II	1 saat
13. Parafin III	1 saat
14. Parafin IV	1 saat

Doku takip işlemleri tamamlanan doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotomla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitlere Hematoksilen-eosin (H&E) boyama yöntemi uygulandı.

### **3.2.1. Mayers'in Hematoxylen- Eozin Metodu**

Doku örneklerinden alınan kesitlere otomatik boya cihazı (Leica Autostainer XL) ile aşağıdaki prosedürdeki şekilde H&E boyaması uygulandı.

1. İnkübasyon	(60°C, 1 saat)
2. Ksilen	5 dakika x 3 defa
3. %96 alkol	3 dakika
4. %96 alkol	3 dakika x 2 defa
5. Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
6. Çeşme suyunda yıkama	5 dakika
7. Mayer's Hematoxylen	10 dakika
8. Çeşme suyunda yıkama	5 dakika x 3 defa
9. Eosin	2 dakika
10. %96 alkol	3 dakika x 2 defa
11. Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
12. Ksilen	5 dakika x 3 defa

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Boyanan ovaryum kesitleri Nikon Optik Hot ışık mikroskobu ve DS L3 görüntü analiz sisteminde, DS F2 Nikon Kamera (Nikon, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı. Ayrıca her bir sıçana ait üç farklı ovaryum kesitinde tüm kesit alanında primordial sonrası aşamalardaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapıları sayıldı.

### **3.3. Transmisyon Elektron Mikroskopi**

Sıçanların ovaryumlarından alınan yaklaşık 1 mm<sup>3</sup> hacmindeki doku örnekleri ilk olarak %2,5'lük gluteraldehit (Glutardialdehyde solution 25% for electron microscopy 250 ml, MERCK, Germany) ve ikincil olarak da %1 Osmium tetraoksit (Osmium (VIII) oxide for microscopy 500 mg, MERCK, Germany) (OsO<sub>4</sub>) ile tespit edildi. Aseton ile dehidratasyonu takiben araldit (CY212, TAAB, E006, England) içine gömüldü.

Elektron mikroskobik takip basamaklarında kullanılan solüsyonlar:

### 3.3.1. % 2,5 Gluteraldehit Solüsyonu

0,2 M fosfat tamponu	50 ml
%25 Gluteraldehit	12 ml
Distile su	38 ml

### 3.3.2. % 1 Osmium Tetroksit solüsyonu

5 ml %4'lük Osmium tetraoksit solüsyonu ışık almaması için kahverengi cam şişede kırılır. Üzerine 5ml distile su ve 0.2 M fosfat tamponu eklenir.

### 3.3.3. Fosfat tamponu

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.2 M) 38 ml (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>için: 3,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 ml deiyonize su içinde çözüldü.)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.2 M)12 ml (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>için: 3,56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 ml deiyonize su içinde çözüldü.)

Deiyonize Su 50 ml

### 3.3.4. Araldit

DDSA 20 ml

Araldit CY212 20 ml

BDMA 1 ml

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki EM takip prosedürü uygulandı:

1. Gluteraldehit 2 saat (+4oC)
2. Fosfat tampon 0.1 M 15 dk x 4 defa
3. Osmium tetroksit 1,5 saat (+4oC)
4. Fosfat tampon 0.1 M 15 dk x 4 defa
5. Aseton % 30 2 dk
6. Aseton % 50 20 dk
7. Aseton % 70 20 dk
8. Aseton % 90 20 dk x 2 defa
9. Aseton % 100 20 dk x 2 defa
10. Propilenoksit % 100 20 dk x 2 defa
11. Araldit 1 gece (rotatorda)



Jelatin kapsüllerde araldit içine gömme işlemini takiben, 45 °C etüvde 4 saat, 60 °C etüvde 24 saat polimerizasyon uygulandı.

Jelatin kapsüller içinde hazırlanan araldit bloklar trimer (Leica EM trim) cihazında trimlendikten sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile 80 nm kalınlığında ovaryum kesitleri bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra Zeiss Libra 120 TEM ile incelenerek fotoğraflar alındı.

### **3.3.5. Uranil Asetat Boyası**

80 ml Metil Alkol

2 g Uranil Asetat

20 ml Distile Su

Gridler bu karışımda 10 dakika boyandı.

### **3.3.6. Kurşun Sitrat Boyası**

0,266 g kurşun sitrat

0,352 g trisotyum sitrat

1,6 ml (1 M) sodyum h,droksit

8,4 ml distile su

Gridler bu karışımda 5 dakika boyandı.

## **3.4. Biyokimya Yöntemi**

### **3.4.1. Ovaryum Dokularının Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması**

Deneilerin yapılacağı gün derin dondurucudan çıkarılan ovaryum dokuları (+4 °C) bekletilerek buzlarının çözülmesi sağlandı ve sonrasında tartılarak her bir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. Homojenizasyon öncesi doku örnekleri, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktarılarak soğukluğu muhafaza edildi. Daha önce ikiye ayrılmış olan dokuların bir bölümünün üzerine soğuk 2 ml Tris-HCl tamponu (pH 7,4, 0.2 mM) eklenerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 1 ml daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200xg'de +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar TAS, TOS, SOD, GSH ve protein tayinlerinde kullanıldı.

### 3.4.2. Ovaryum dokusunda yapılan analizler

#### 3.4.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini

**Kullanılan Reaktifler:** Substrat solüsyonu (0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L. Na<sub>2</sub>EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g/L sığır serum albümini (BSA), ksantin oksidaz (XO:167 u/L), 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>.

**Deneyin prensibi:** Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan, (128) NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı. Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_K - A_N) / A_K \times 100$$

A<sub>K</sub>: Kör absorbansı

A<sub>N</sub>: Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 u denildiği için

$$\text{Aktivite (u/ml)} = ((\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1 / 0.1)) \text{ ml}$$

Spesifik aktivite (u/mg protein) = (u/ml/mg/ml protein). Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

#### Deneyin yapılışı

Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 1 saat süreyle 2200xg'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

	Kör	Numune
Substrat solüsyonu	2.85 ml	2.85 ml
Kloroform-Etanol Ekstraktı	-	0.100 ml
Bidistile su	0.100 ml	-
XO (167 Ü/l)	0.050 ml	0.050 ml

25 C°'de 20 dakika inkübasyon süresi başlatıldı.

CuCl <sub>2</sub>	1 ml	1 ml
-------------------	------	------

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm’de okundu.

#### 3.4.2.2. Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini

**Kullanılan reaktifler:** % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, %10 triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ve 20 mM/L 1,1,3,3- tetrametoksiopropan (standart).

**Prensibi:** Esterbauer ve Cheeseman’nin metodu ile çalışıldı. (129). En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 90-95 C° de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

#### Deneyin Yapılışı

	NUMUNE	KÖR
Homojenat	0.5 ml	-
TCA %10	2.5 ml	2.5 ml
Deiyonize su	-	0.5 ml

90 C° 15 dakika bekletildikten sonra 3000×g ‘de 10 dakika santrifüj

Süpernatant	2 ml	2 ml
TBA %675	1 ml	1 ml

90 C° 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm ‘de okunur.

**Hesaplama:** 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışılı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

#### 3.4.2.3. Ovaryum Doku Süpernatantından TAS -TOS ve OSI Analizi

TAS (toplam antioksidan durum) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TAS kit seti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile asidik bir ortamda (asetat buffer 30 mmol/L; pH 3.6) sadece

hidrojen peroksidi kullanarak redükte ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, ABTS<sup>•+</sup> okside forma dönüşür. Asetat buffer solüsyonundaki konsantre (koyu yeşil) ABTS<sup>•+</sup> molekülleri uzun bir süre daha kararlı kalır. Yüksek pH daha yoğun bir asetat buffer (asetat buffer 0,4 mol/L; pH 5,8) ile dilüe edildiği zaman, rengi yavaş yavaş kendiliğinden daha açık hale dönüşür. Analiz yapılan örnekteki mevcut antioksidanlar konsantrasyonlarıyla orantılı olarak bu renkteki azalmayı bir dereceye kadar arttırır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenebilir ve renkteki açılma oranı örnekteki toplam antioksidan kapasitesi ile (TAC) orantılıdır. Mikroplate reader da 660 nm de okunan absorbans değişimindeki deney sonuçları TAC ölçüm testleri için kullanılan standart antioksidan ve bir vitamin E analogu olan trolox solüsyonunuyla kalibre edilir. sonuçlar mmol Trolox Equivalent /M biriminde ifade edilir (130).

TOS (toplam oksidan durum) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TOS kit seti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile örnek mevcut oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksi ferrik iyonla oksitler. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon mediumunda bulunan gliserol moleküller tarafından gerçekleştirilir. asidik ortamda ferrik iyonlar xyleneol orange ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen, renk yoğunluğu örnekteki toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalent/L) ifade edilir.(131)

Oksidatif stres indeksi (OSI) oksidatif stres derecesinin bir indikator parametresi olup, hesaplanması formüldeki gibidir. Total Antioxidant Status ve Total Oxidant Status Kitlerini kullanarak OSI hesaplanabilmektedir.

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}}{\text{TAS, } \mu\text{mol Trolox Equivalent/L}}$$

#### **3.4.2.4. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini**

**Kullanılan reaktifler:** A reaktifi: 20 mmol CuSO<sub>4</sub>, 34 mmol Na<sub>3</sub>Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı

**Deneyin prensibi:** Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi. (132). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir: Bu reaktif sadece asit ortamda

dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

**Deneyin yapılışı:** Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. "OD-mg/ml protein konsantrasyonu" grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

	Numune	Kör
Numune	10 µl	-
Deiyonize su	490 µl	500 µl
C Reaktifi (5/1:B/A)	2.5 ml	2.5 ml

Karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.

D Reaktifi (1/1:FCF/d.s.)	0.25 ml	0.25 ml
---------------------------	---------	---------

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm'de köre karşı OD okunur.

**Hesaplama:** Protein (mg/ml) =  $(K_{st}/A_{st}) \times A_N$

$K_{st}$ : Standardın konsantrasyonu

$A_{st}$ : Standardın absorpsiyonu

$A_N$ : Numunenin absorpsiyonu

## 4. BULGULAR

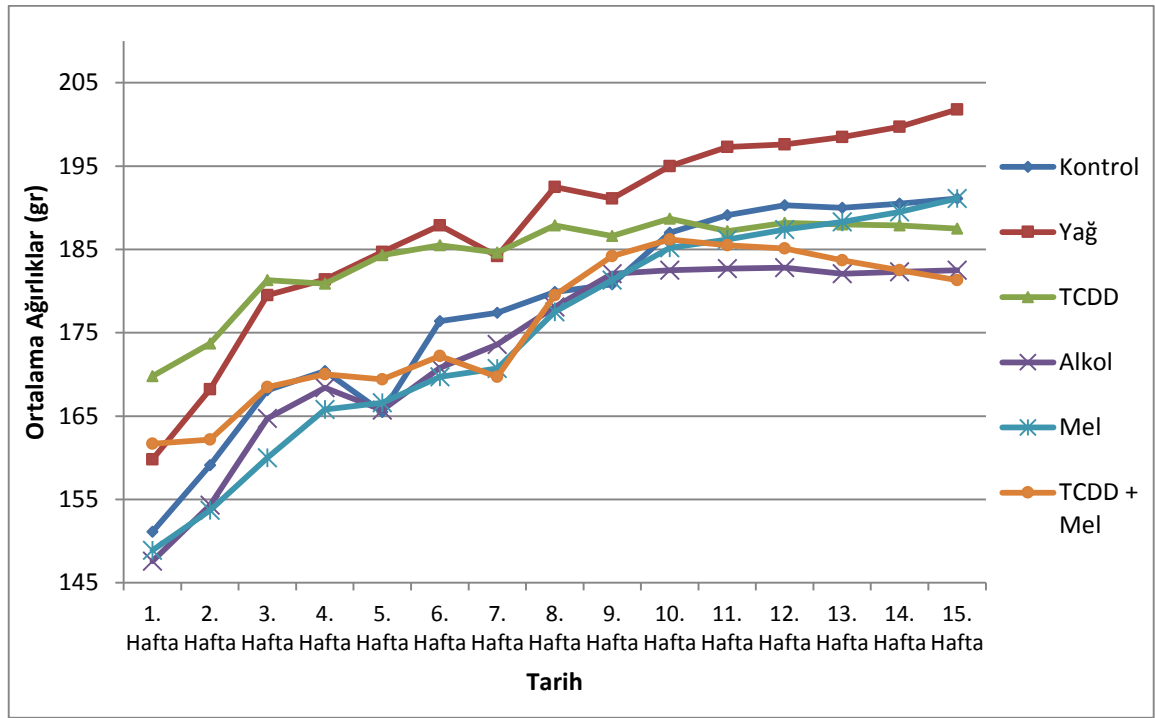
### 4.1. TCDD'nin Sıçan Vücut Ağırlıklarına Etkisi

Deney başlangıcından itibaren her hafta tüm hayvanlar düzenli olarak tartılıp, tüm gruplardaki sıçanların ağırlık değişimleri kaydedilmiştir (Tablo 4.1). Ağırlık ölçümlerine göre, kontrol, yağ, mel, ve alkol gruplarında 15. haftaya kadar düzenli ağırlık artışı gözlenirken, dioksin+yağ ve dioksin+mel gruplarında 10. haftadan itibaren sabitleme ve sonrasında sıçanların ağırlıklarında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.1). Gruplar arası haftalık ağırlık artışı istatistiksel olarak incelendiğinde, tüm gruplar arasında yüksek oranda korrelasyon izlenmektedir. Bununla birlikte, TCDD ve TCDD +mel gruplarının diğer gruplarla olan korelasyon katsayısı, son beş haftadaki ağırlık azalışına bağlı olarak düşmektedir (Tablo 4.2). Her bir grupta, deney başlangıç ve bitiş ağırları arasındaki ağırlık farklarına bakıldığında, kontrol, yağ, mel, ve alkol gruplarındaki artışın, TCDD ve TCDD + mel gruplarından önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.2).

**Tablo 4.1: Gruplar içi haftalık hayvan ağırlıkları ortalamaları**

Hafta	Kontrol (g)	Yağ (g)	TCDD (g)	Alkol (g)	Mel (g)	TCDD + Mel (g)
1. Hafta	151,1	159,8	169,8	147,6	148,9	161,7
2. Hafta	159,1	168,2	173,7	154,3	153,7	162,2
3. Hafta	168,1	179,5	181,3	164,7	160	168,5
4. Hafta	170,4	181,4	180,9	168,4	165,8	170
5. Hafta	165,5	184,7	184,3	165,7	166,6	169,4
6. Hafta	176,4	187,9	185,5	170,8	169,7	172,2
7. Hafta	177,4	184,2	184,6	173,6	170,7	169,7
8. Hafta	179,9	192,5	187,9	178,1	177,5	179,5
9. Hafta	180,8	191,1	186,6	182,1	181,3	184,2
10. Hafta	187	195	188,7	182,5	185,2	186,2
11. Hafta	189,1	197,3	187,2	182,7	186,2	185,5
12. Hafta	190,3	197,6	188,2	182,8	187,4	185,1
13. Hafta	190	198,5	188	182,1	188,3	183,7
14. Hafta	190,5	199,7	187,9	182,3	189,5	182,5
15. Hafta	191,1	201,8	187,5	182,5	191,1	181,3

Şekil 4.1: Haftalık ortalama sıçan ağırlıkları değişimi



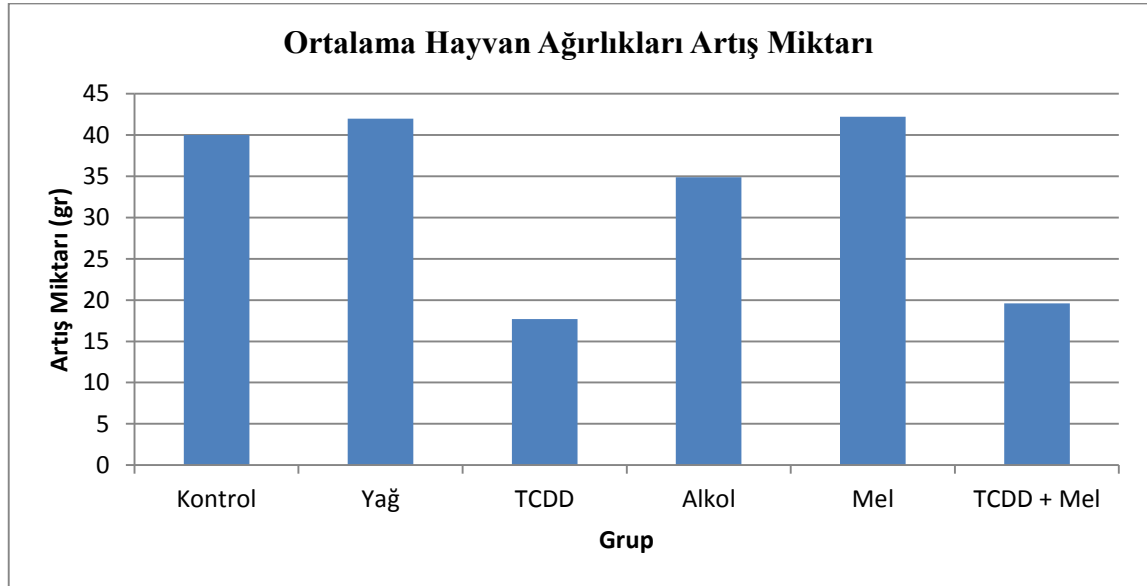
Tablo 4.2: Haftalık ağırlık değişiminin gruplar arası korrelasyonu

		Correlations						
		Kontrol	Yağ	TCDD	Alkol	Mel	TCDD + Mel	
Spearman's rho	Kontrol	Correlation Coefficient (r)	1,000	,964**	,847**	,923**	,986**	,814**
		P		,000	,000	,000	,000	,000
		N	15	15	15	15	15	15
	Yağ	Correlation Coefficient (r)	,964**	1,000	,867**	,884**	,986**	,793**
		P	,000		,000	,000	,000	,000
		N	15	15	15	15	15	15
	TCDD	Correlation Coefficient (r)	,847**	,867**	1,000	,868**	,854**	,869**
		P	,000	,000		,000	,000	,000
		N	15	15	15	15	15	15
	Alkol	Correlation Coefficient (r)	,923**	,884**	,868**	1,000	,903**	,932**
		P	,000	,000	,000		,000	,000
		N	15	15	15	15	15	15
	Mel	Correlation Coefficient (r)	,986**	,986**	,854**	,903**	1,000	,804**
		P	,000	,000	,000	,000		,000
		N	15	15	15	15	15	15
	TCDD + Mel	Correlation Coefficient (r)	,814**	,793**	,869**	,932**	,804**	1,000
		P	,000	,000	,000	,000	,000	
		N	15	15	15	15	15	15

**Tablo 4.3: Deney başlangıç ile deney sonu ağırlık karşılaştırması**

Gruplar	1. Hafta Ağırlık Ortalaması (g)	15. Hafta Ağırlık Ortalaması (g)	Ortalama Ağırlık Artışları (g)
Kontrol	151,1	191,1	40
Yağ	159,8	201,8	51
TCDD	169,8	187,5	17,7
Alkol	147,6	182,5	34,9
Mel	148,9	191,1	42,2
TCDD + Mel	161,7	181,3	19,6

**Şekil 4.2: Sıçan ağırlıkları artış miktarlarının gruplar arası karşılaştırılması**



#### **4.2. Histolojik Bulgular**

Kontrol grubundaki sıçan ovaryumlarının ışık mikroskopik incelenmesinde ovaryum dokusunun çok sayıda korpus luteum ve farklı gelişim evrelerinde ovaryum folikülleri içerdiği görüldü. Bu yapılar nedeniyle ovaryum konturları oldukça girintili çıkıntılı görünmekteydi. Ovaryum kesitlerinde korteks medulla bölgeleri genellikle ayırt edilmekle birlikte korteks alanları medulla alanlarına göre çok daha geniş yer tutmaktaydı. Ovaryum yüzeyi genellikle tek katlı kübik şekilli germinatif epitel ile döşeli olarak izlendi. Yer yer germinatif epitelin dökülmüş olduğu alanlara da rastlandı. Ovaryum korteks dokusunun büyük kısmını korpus luteum ve değişik gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri işgal etmişti, ancak bu yapılar arasında kalan alanların yoğun şekilde primordial foliküller içerdiği görüldü. Ovaryum parankimi içinde



izlenen farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerde granuloza hücreleri, teka yapıları normal histolojik yapıda değerlendirildi. Foliküller içinde izlenen antrumlar açık, hafif eozinofilik boyanmış, partiküler yapı içermeyen alanlar şeklinde görüldü. Korpusluteum yapıları parankima içinde medullar bölgeye ve ovaryum yüzeyine doğru çıkıntı yapmış, geniş oval, sınırları belirgin olarak izlendi (Şekil4.3, 4). Korpus luteum yapısı içinde granuloza lutein hücreleri iri, poligonal şekilli, ökromatik, iri hücreler olarak izlenildi. Teka lutein hücreleri ise, özellikle korpus luteumun periferinde ve yer yer de granuloza lutein hücrelerinin arasında, daha heterokromatik, daha küçük ve düzensiz şekilli hücreler şeklinde görüldü. Korpus luteum yapısı içinde hücreler arasında çok sayıda kapiller yapısı mevcuttu (Şekil4.5).

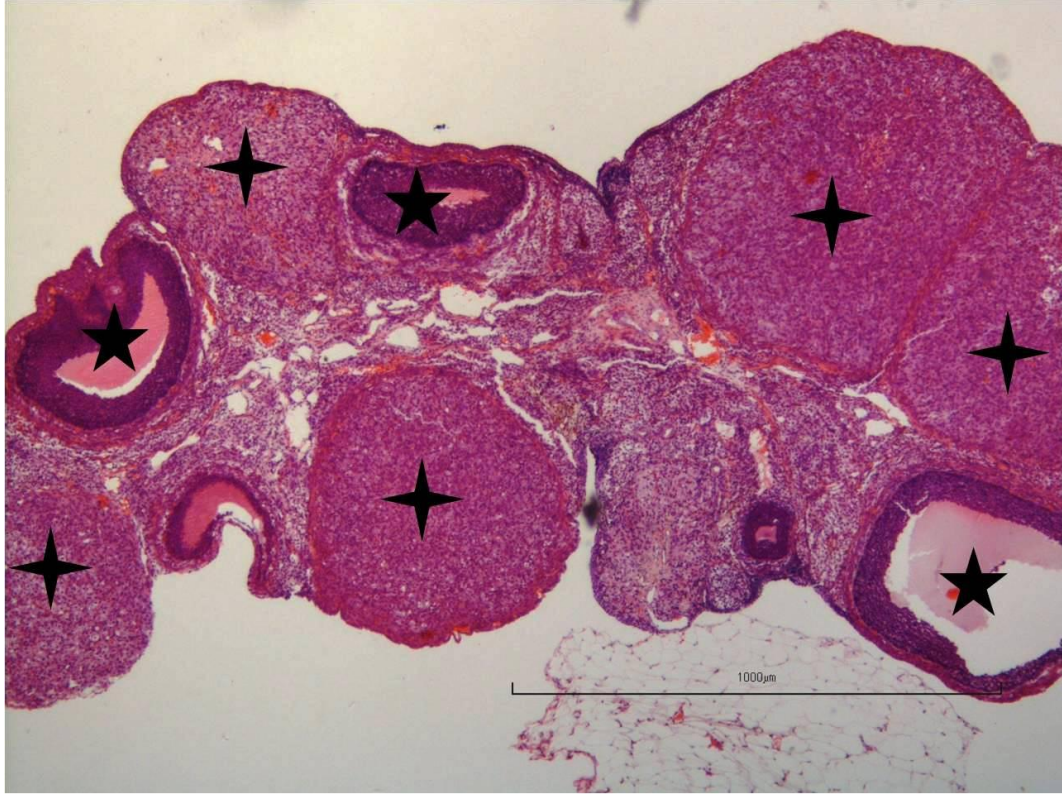
Transmission elektron mikroskobik incelemede korpus luteum hücrelerinden granuloza lutein hücrelerinin sitoplazmasında çok sayıda, düşük elektron yoğunluğa sahip vakuoller içermekteydi. Nukleus oval şekilli ve ökromatik yapıda izlendi (Şekil4.6, 7). Teka lutein hücreleri genellikle yassı-mekik şekilli, granuloza lutein hücrelere göre daha heterokromatik nukleuslu hücreler şeklinde görüldü (Şekil4.6). Korpus luteum periferinde izlenen teka hücreleri yassı mekik şekilli, heterokromatik nukleus yapısına sahipti (Şekil4.7). Her üç hücre grubu da sitoplazmik yoğunluk ve organel içeriği açısından normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.

Kontrol grubunda granuloza hücreleri genellikle poligonal şekilli, orta derecede ökromatik nukleuslu hücrelerdi. Yer yer bazı hücrelerin sitoplazmasında küçük vakuoller ve lizozomal yapılar görüldü. Bu hücrelerde ultrastrüktürel olarak normal görünümde değerlendirildi (Şekil4.8).

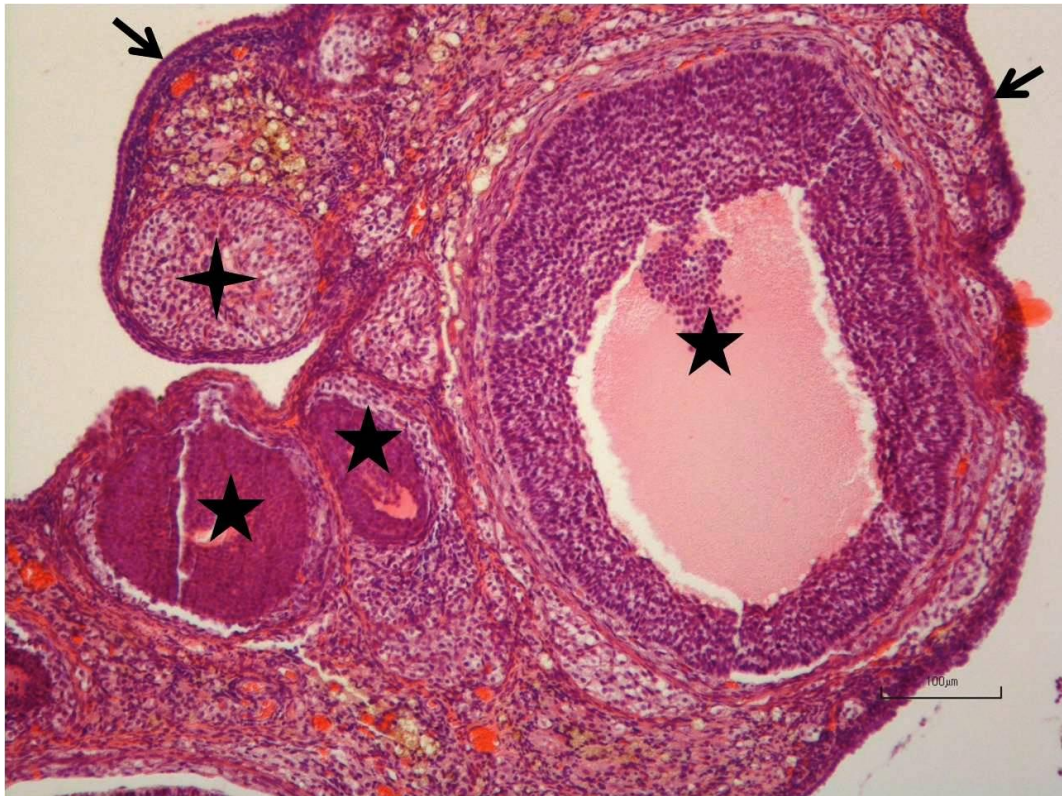
Ovaryum stroma dokusu içinde ve damar duvarlarında mekik şeklinde düz kas hücreleri tespit edildi. Düz kas hücreleri sitoplasmasında düzenli, yoğun miyofibril demetleri dikkati çekti. Nukleuslar genellikle düzgün konturlu, yassı şekilli ve heterokromatik özellikte görülüp, normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi (Şekil4.9).

Kontrol grubundaki ovaryum doku kesitlerindeki kan damarları kesitlerinde endotel ve diğer damar duvarına ait hücre yapıları normal ultrastrüktürel yapıda gözlemlendi. Damar lümenlerinde yer yer eritrositler mevcuttu (Şekil4.10).

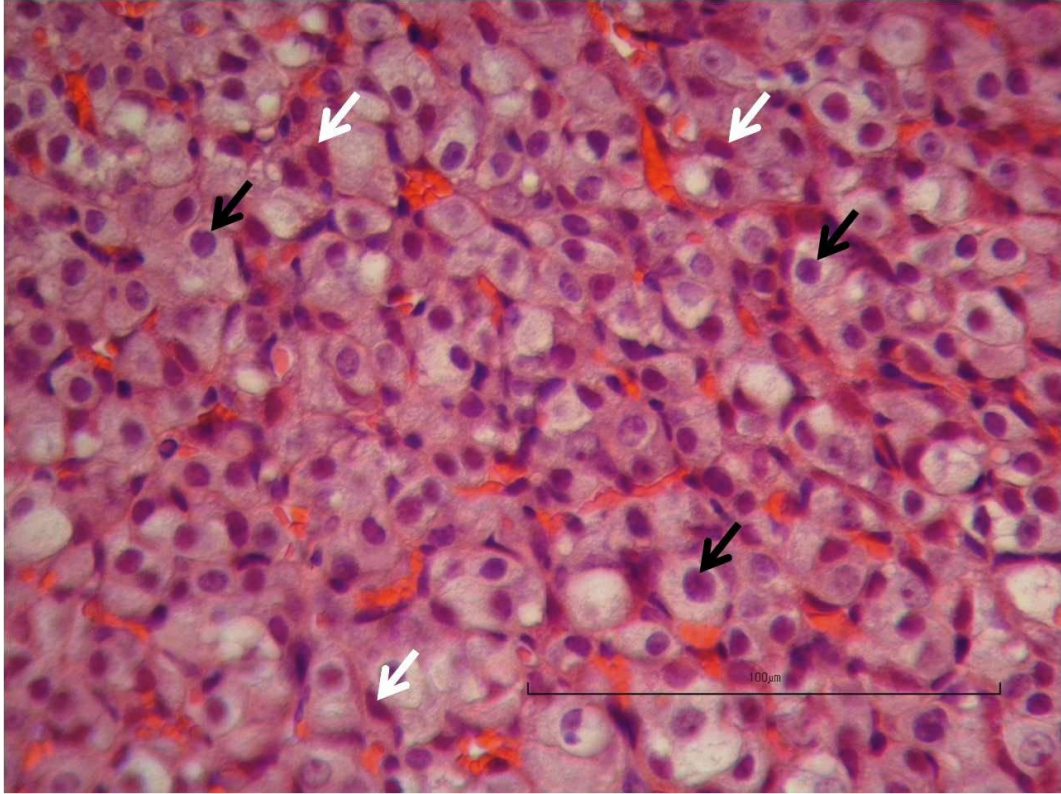
Ovaryum dokusu stromal hücreleri orta derecede elektron yoğunluğa sahip olup, oval-elipsoid şekilli nukleuslara sahipti. Sitoplazma yoğunluğu ve organel ultrastrüktürü normal yapıda saptandı. Hücrelerin periferinde düzenli kollajen lif demetleri saptandı (Şekil 4.11).



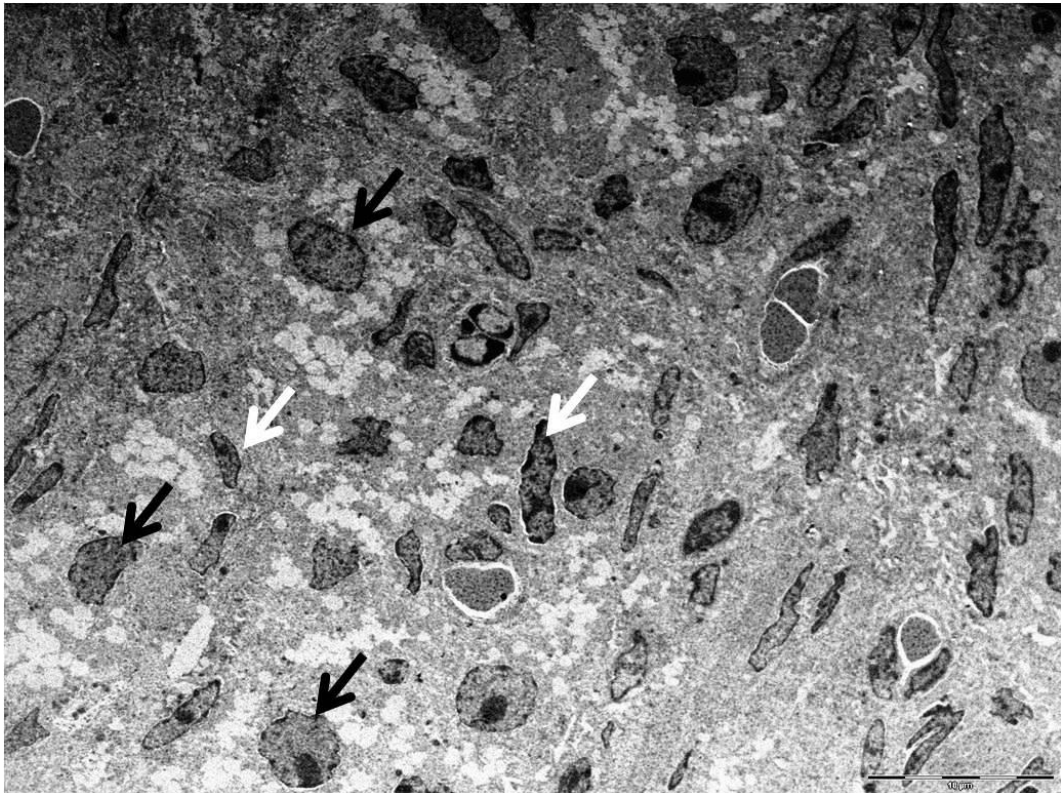
Şekil 4.3: Kontrol Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000µm



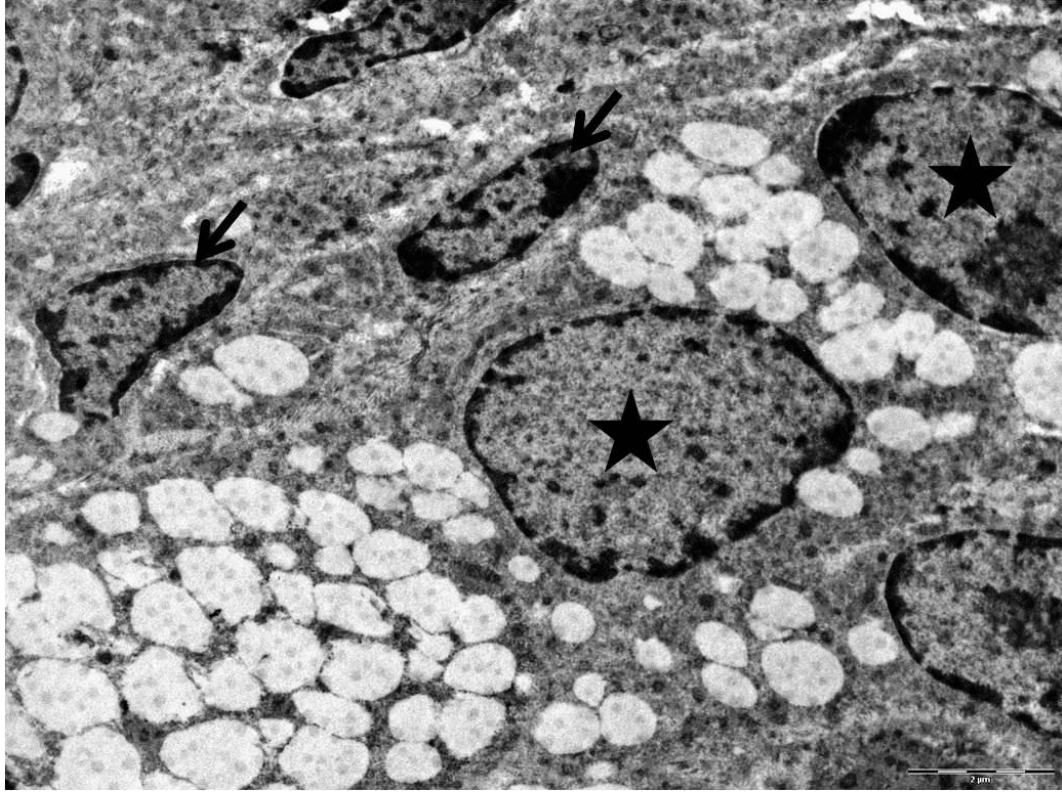
Şekil 4.4: Kontrol: Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız), germinatif epitel (ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



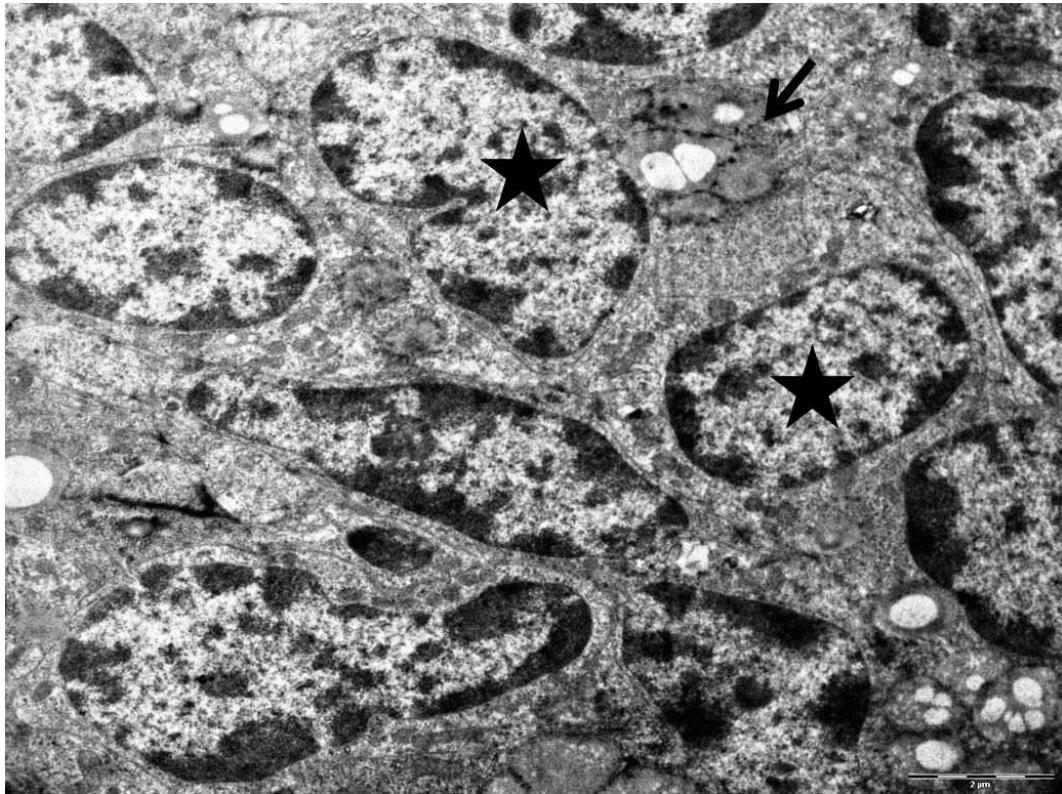
Şekil 4.5: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



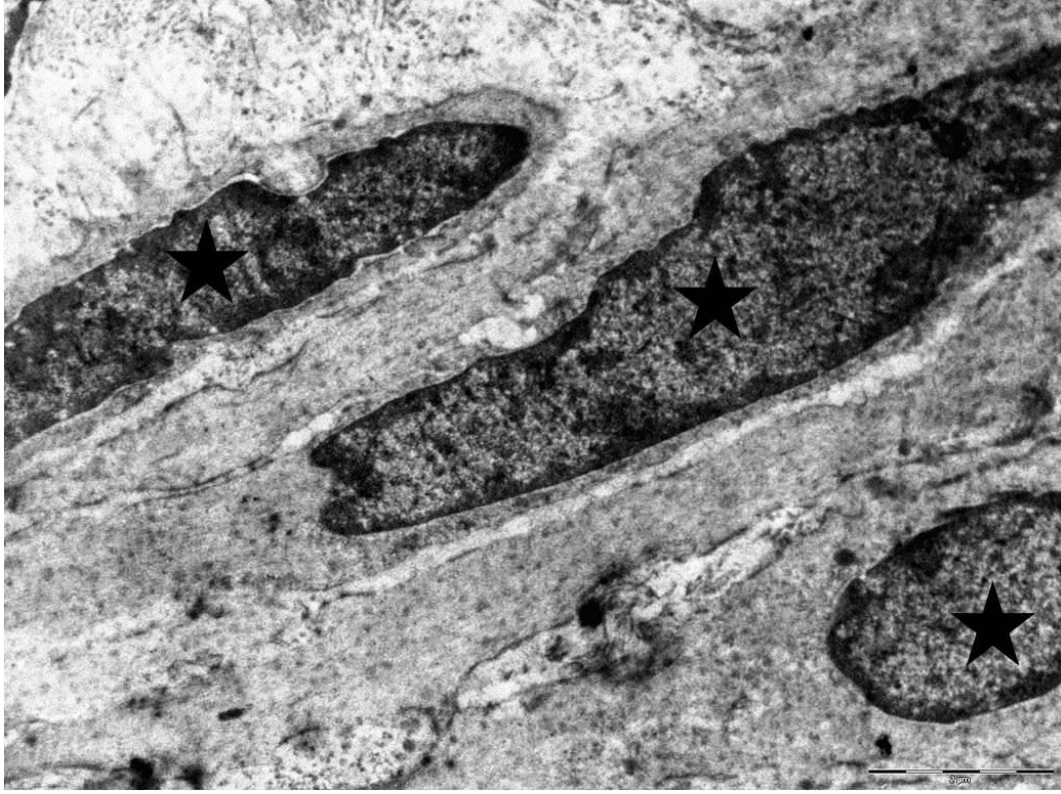
Şekil 4.6: (TEM), Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). Ölçü cetveli = 2µm



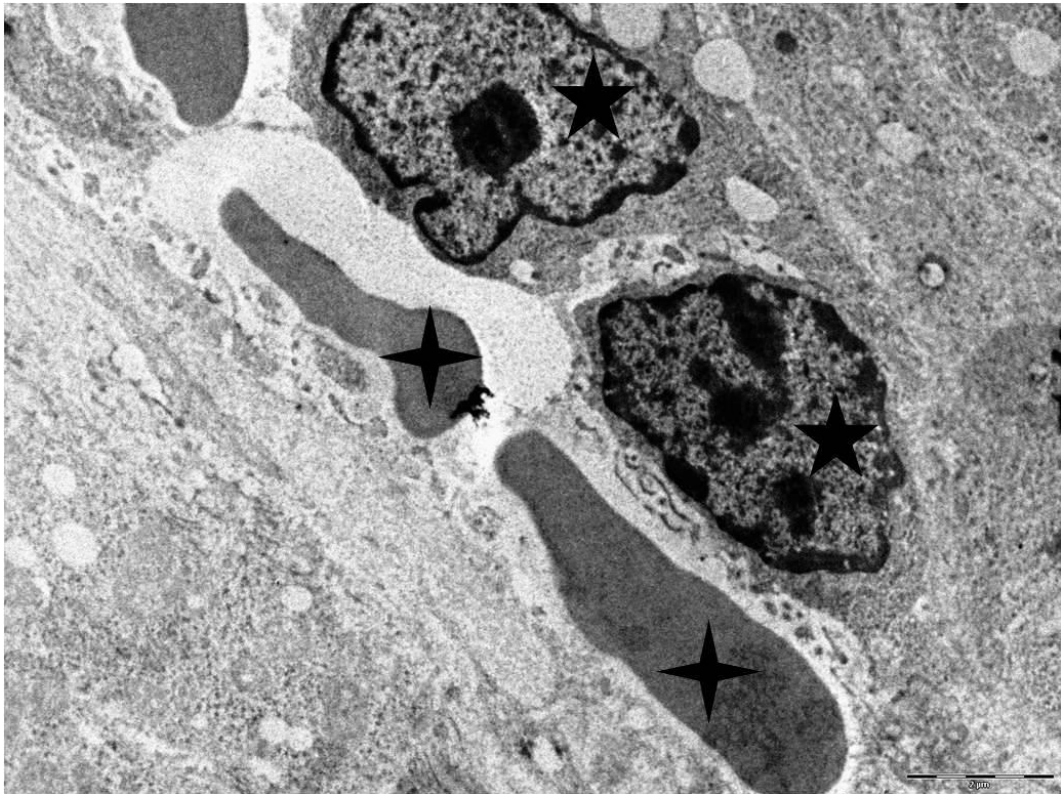
Şekil 4.7: Granuloza lutein hücre (yıldız), teka hücresi (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



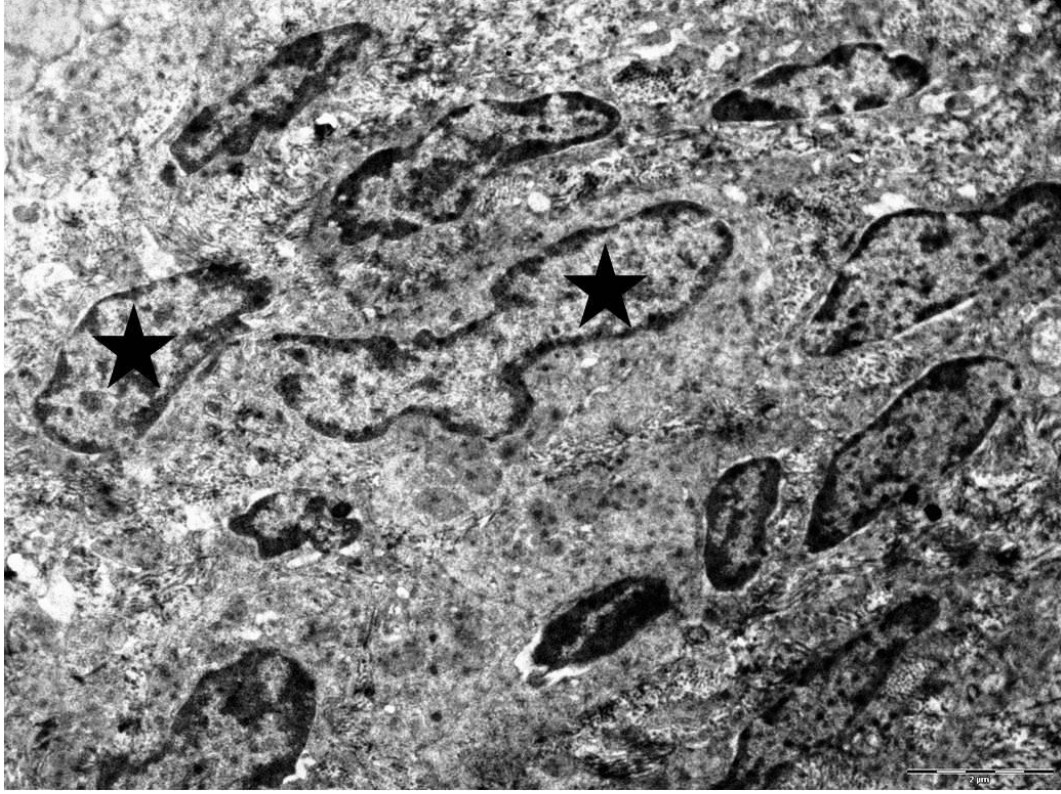
Şekil 4.8: Granuloza hücresi (yıldız), sekonder lizozom (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.9: Düz kas hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.10: Endotel hücresi (beş nokta yıldız), eritrosit (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



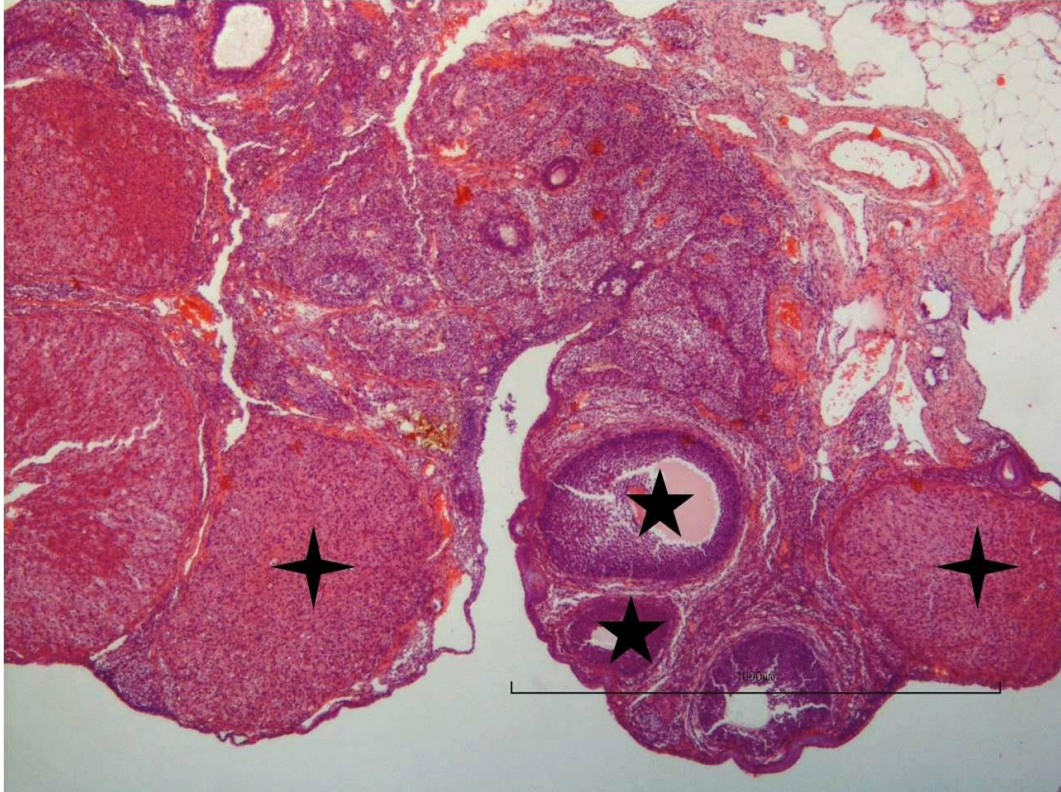
**Şekil 4.11: Stromal hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm**

Yağ grubundaki sıçan ovaryumlarının ışık mikroskopik incelenmesinde kontrol grubu ile benzer şekilde kesitlerde çok sayıda korpus luteum ve farklı gelişim evrelerinde ovaryum folikülleri saptandı. Ovaryum konturları oldukça girintili çıkıntılı olduğu görüldü. Ovaryum kesitlerinde korteks bölgesinin medulla bölgesine oranla çok daha geniş olduğu saptandı (Şekil 4.12). Ovaryum yüzeyinin tek katlı kübik şekilli germinatif epitel ile döşeli olduğu ancak epitelde yer yer dökülmeler tespit edildi (Şekil 4.13). Ovaryum korteks alanları içerisinde korpus luteum yapıları, farklı gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri, primordial folikül grupları ve kan damarları gözlemlendi. Ovaryum folikülleri granuloza hücreleri, antrum yapıları ve çevre teka yapıları normal histolojik yapıda değerlendirildi. (Şekil 4.12, 13). Korpus luteum yapısı kontrol grubu ile benzer şekilde normal yapıda izlendi (Şekil 4.14).

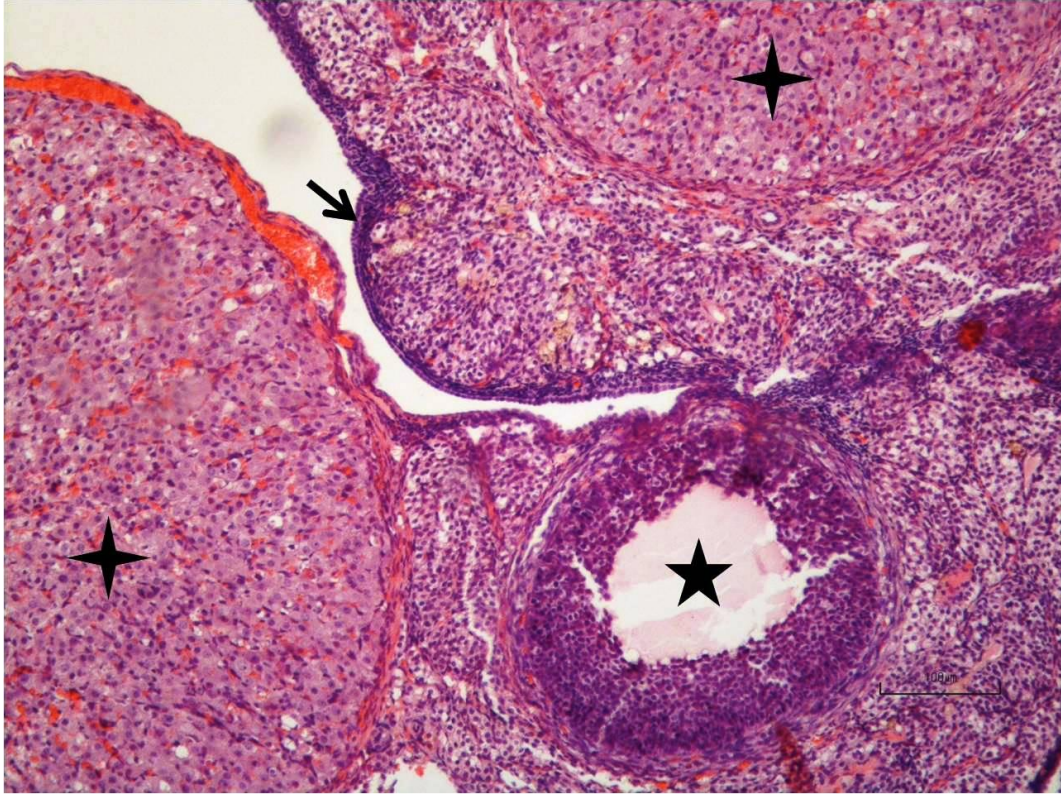
Transmission elektron mikroskopik incelemede korpus luteumun granuloza lutein hücreleri oval şekilli ve ökromatik nukleusa sahipti. Sitoplazmalarında çok sayıda, düşük elektron yoğunluğa sahip vakuoller mevcuttu (Şekil 15). Teka lutein hücreleri, granuloza lutein hücreleri arasında, yassı-mekik şekilli, heterokromatik nukleuslu hücreler şeklinde görüldü (Şekil 4.15, 16). Her iki hücre grubu da sitoplazmik yoğunluk ve organel içeriği açısından normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.

Yağ grubuna ait ovaryum kesitlerinde gözlenen granuloza hücreleri poligonal şekilli, orta derecede ökromatik nukleuslu hücrelerdi. Bazı granuloza hücreleri arasındaki intersellüler alanlardaminimal düzeyde dilatasyon saptandı. Granuloza hücreleri genel olarak normal ultrastrütürel yapıya sahipti (Şekil 4.17).

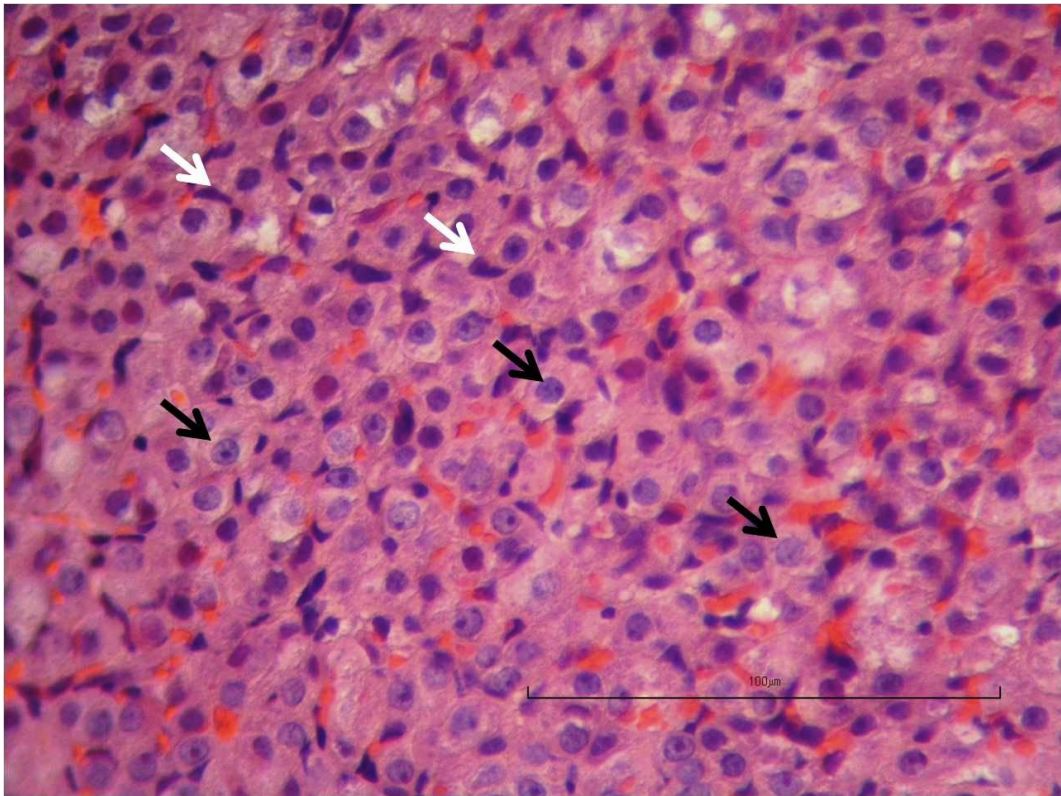
Ovaryum stromal doku ve kan damarları duvarlarındaki düz kas hücreleri (Şekil 4.18), ovaryum stromal hücreleri (Şekil 4.19) ve damar endotel hücreleri (Şekil 4.20) kontrol grubu ile benzer şekilde normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.



Şekil 4.12: Yağ grubu; Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000 $\mu$ m

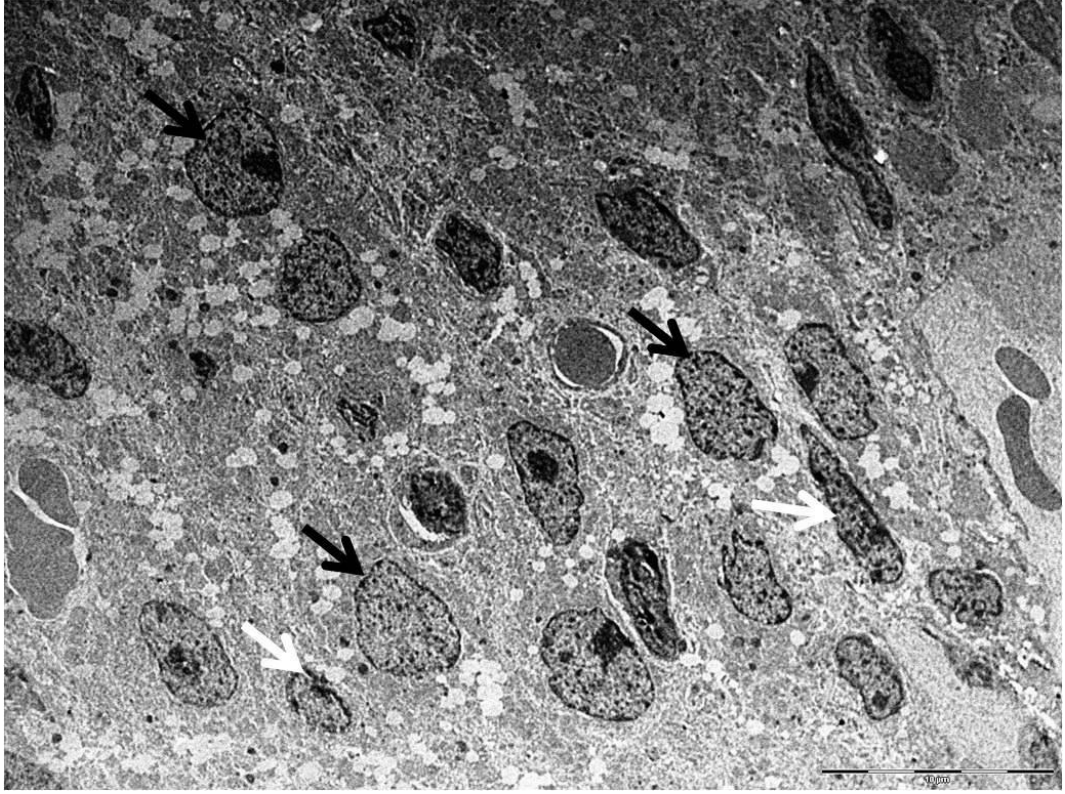


Şekil 4.13: Yağ: Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız), germinatif epitel (ok). (HE), Ölçü cetveli = 100μm

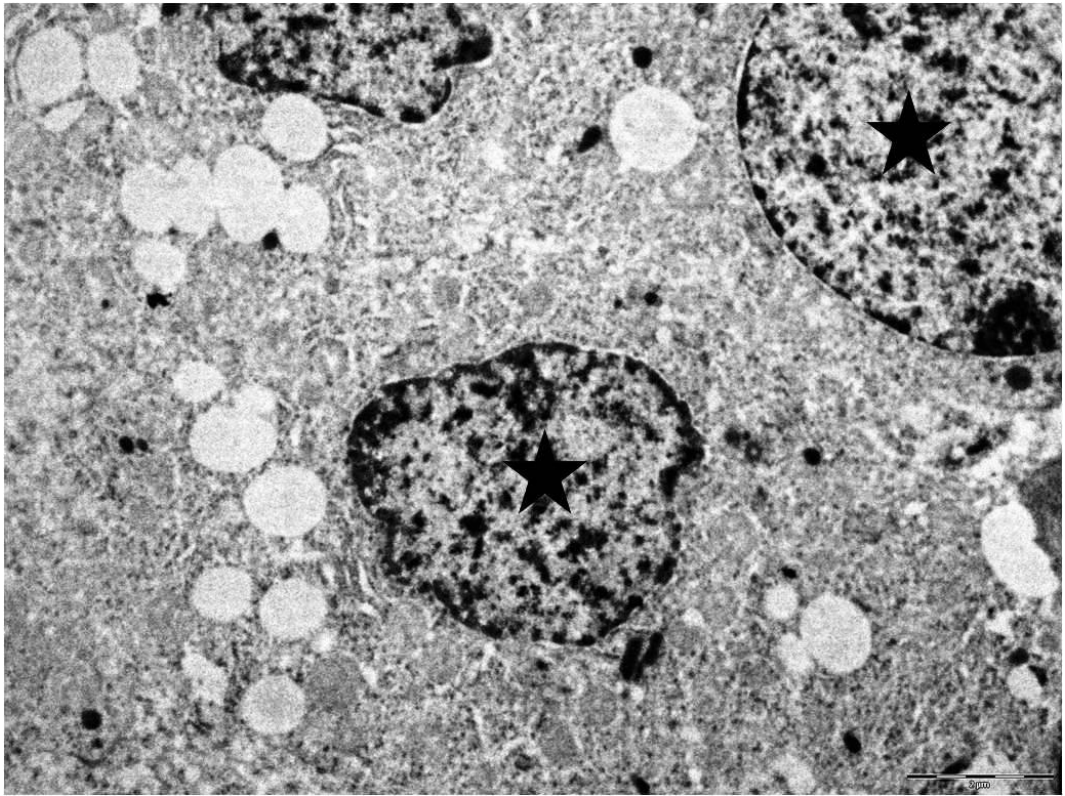


Şekil 4.14: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (HE), Ölçü cetveli = 100μm

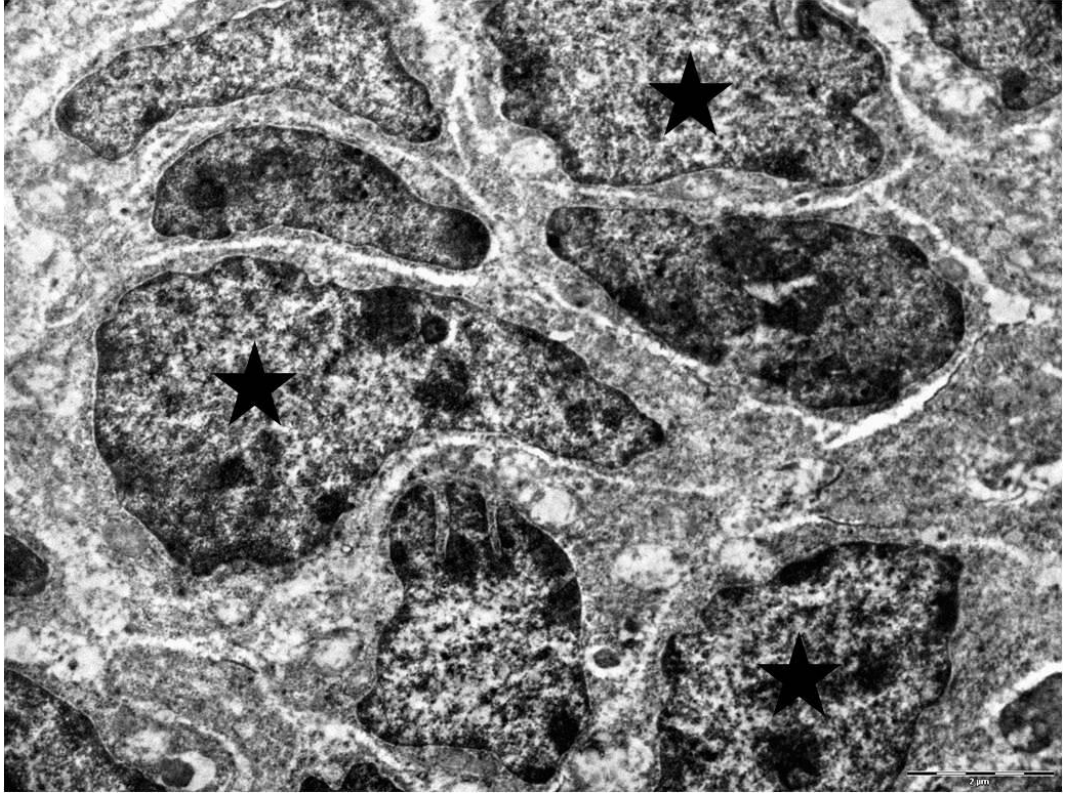




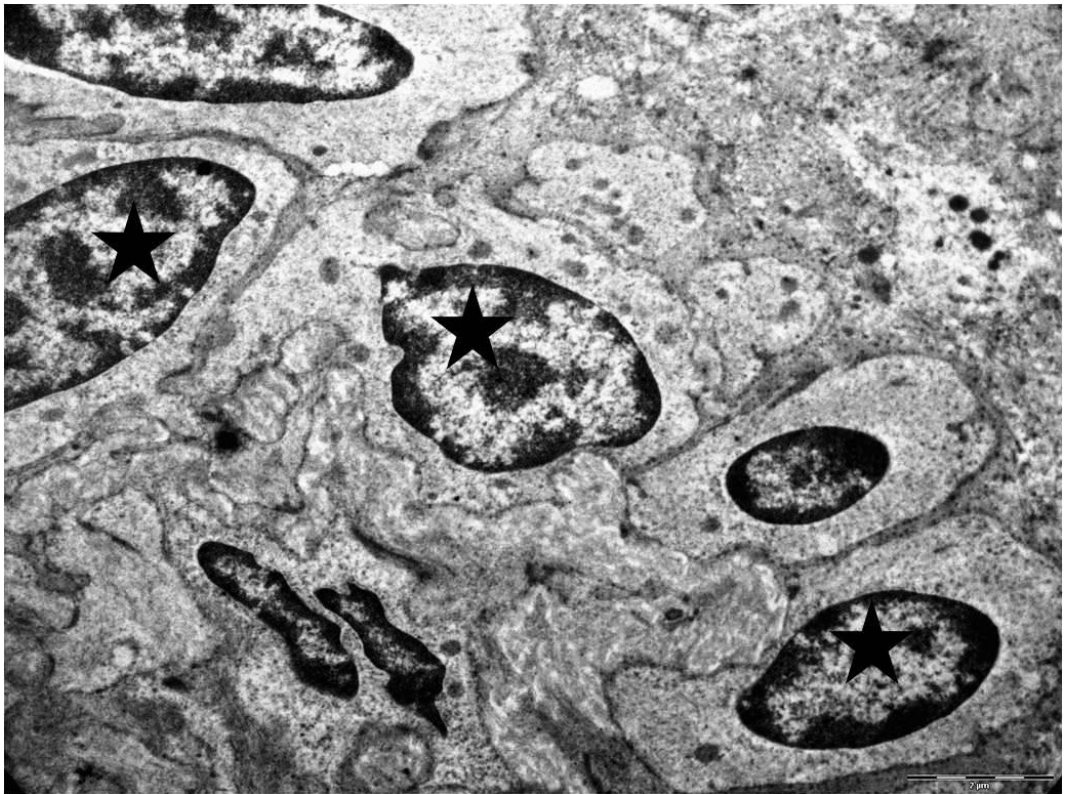
Şekil 4.15: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



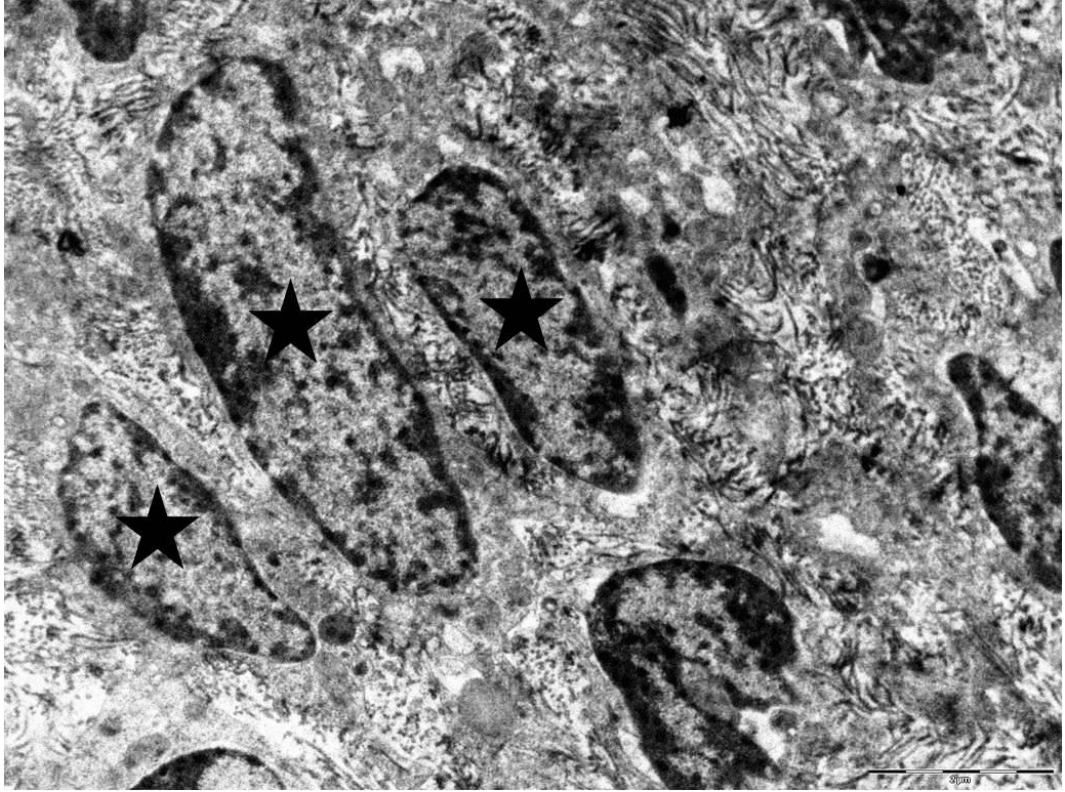
Şekil 4.16: Granuloza lutein hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.17: Granuloza hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm



Şekil 4.18: Düz kas hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm



Şekil 4.19: Ovaryum stromal hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



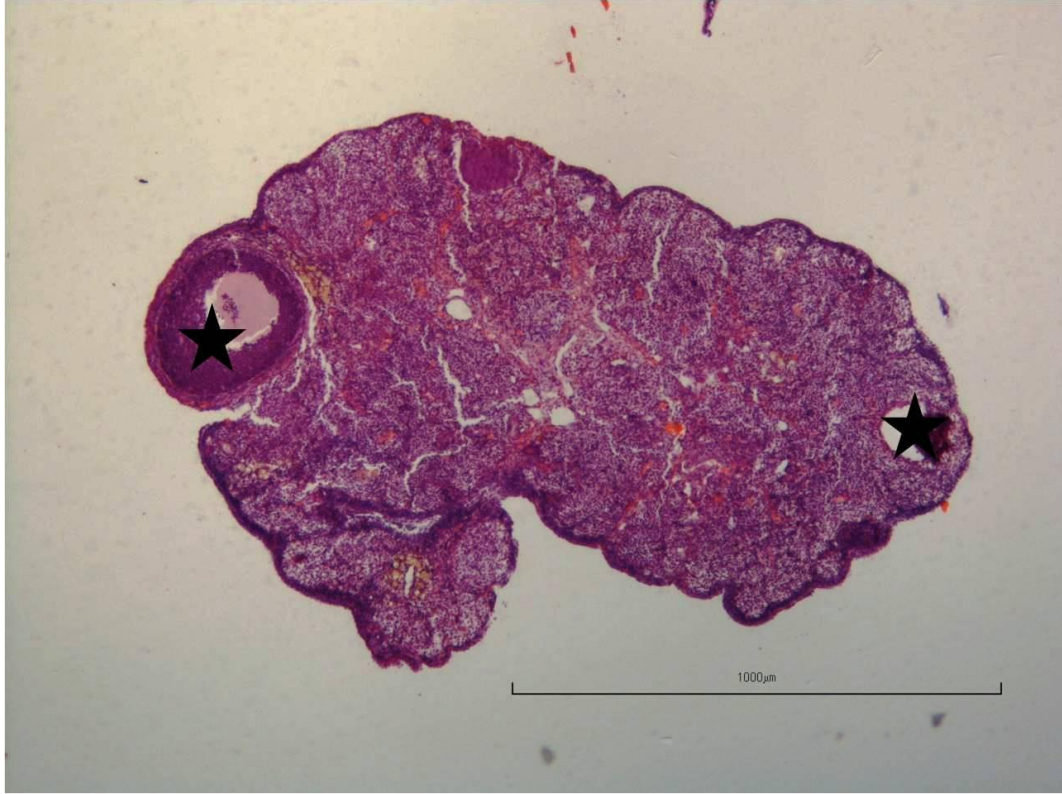
Şekil 4.20: Kapiller endotel hücresi (beş nokta yıldız), eritrosit (dört nokta yıldız).(TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m

TCDD grubundaki sıçanların ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde primordial folikül sonrası gelişim aşamalarındaki ovaryum foliküllerinin kontrol, yağ ve melatonin gruplarındakine göre daha az olduğu olduğu dikkati çekti (Şekil 4.21,63 ). Ovaryum germinatif epitelinin bazı alanlarda dökülmüş olduğu, ancak izlenebildiği alanların büyük kısmında yassılaştığı olduğu tespit edildi. Korpus luteum hücrelerinde diffüz ve belirgin düzeyde heterokromazi ve piknozis gözlemlendi (Şekil 4.22, 23). Birçok korpus luteum yapısında heterokromazi artışı ve piknozise bağlı olarak hücre tipleri ayırt edilemedi. Bazı korpus luteum yapıları içinde inflamatuvar infiltrasyon odakları ve ödem saptandı (Şekil 4.24, 25). Yer yer korpus luteum hücrelerinde heterokromazi, piknotik nükleus yapısı ile birlikte vakuoler dejenerasyon gözlemlendi (Şekil 4.26).

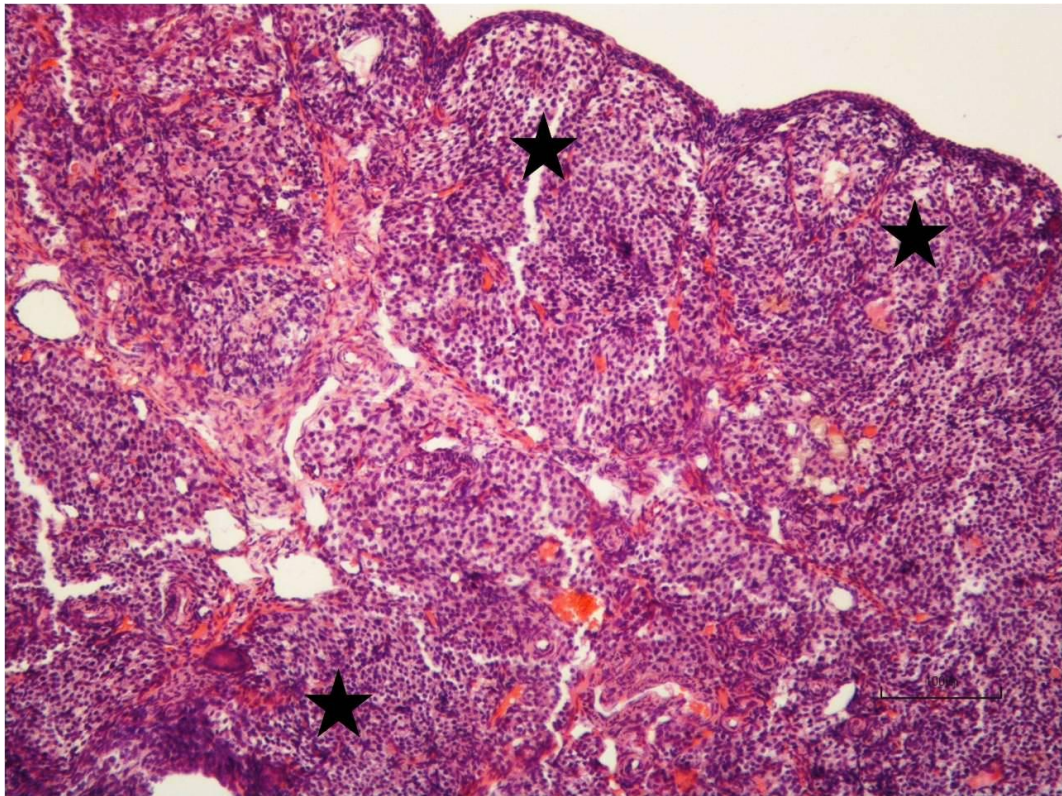
Dioksin grubundaki sıçanların ovaryum kesitlerinin transmission electron mikroskopik incelenmesinde, granuloza hücrelerinde dejenerasyon ve granuloza hücreleri arasında çok sayıda apoptotik cisimcikler tespit edildi (Şekil 4.27, 28). Ayrıca granuloza hücrelerinin sitoplazmasında yaygın olarak otofagozomlar saptandı (Şekil 4.29). Bazı kesitlerde granuloza hücre nekrozu ve granuloza hücreleri arasında eritrositlere rastlandı (Şekil 4.30).

Korpus luteum hücrelerinde yaygın olarak piknotik nükleus, kromatin yoğunlaşması, nükleus sınırlarında düzensizleşme ve perinükleer alanda dilatasyon görüldü. Teka hücrelerinde geniş hidropik vakuoller saptandı (Şekil4.31). Ayrıca korpus luteum hücrelerinde otofagozomlar ve lizozomal artış tespit edildi. Yer yer korpus luteum hücreleri arasında eozinofiller tespit edildi (Şekil 4.32).

Ovaryum stromal hücrelerinde piknotik nükleus ve nükleus sınırlarında ondulasyon izlendi. Stromal ücreler arasında geniş ve düzensiz sınırlı hidropik vakuoller mevcuttu (Şekil 4.33). Ovaryum stromal düz kas hücrelerinde ileri derecede piknotik nükleuslar, nükleus sınırlarında düzensizlik, periferik kromatin yoğunlaşması ve ve myofibril organizasyonunda bozulma izlendi (Şekil 4.34).



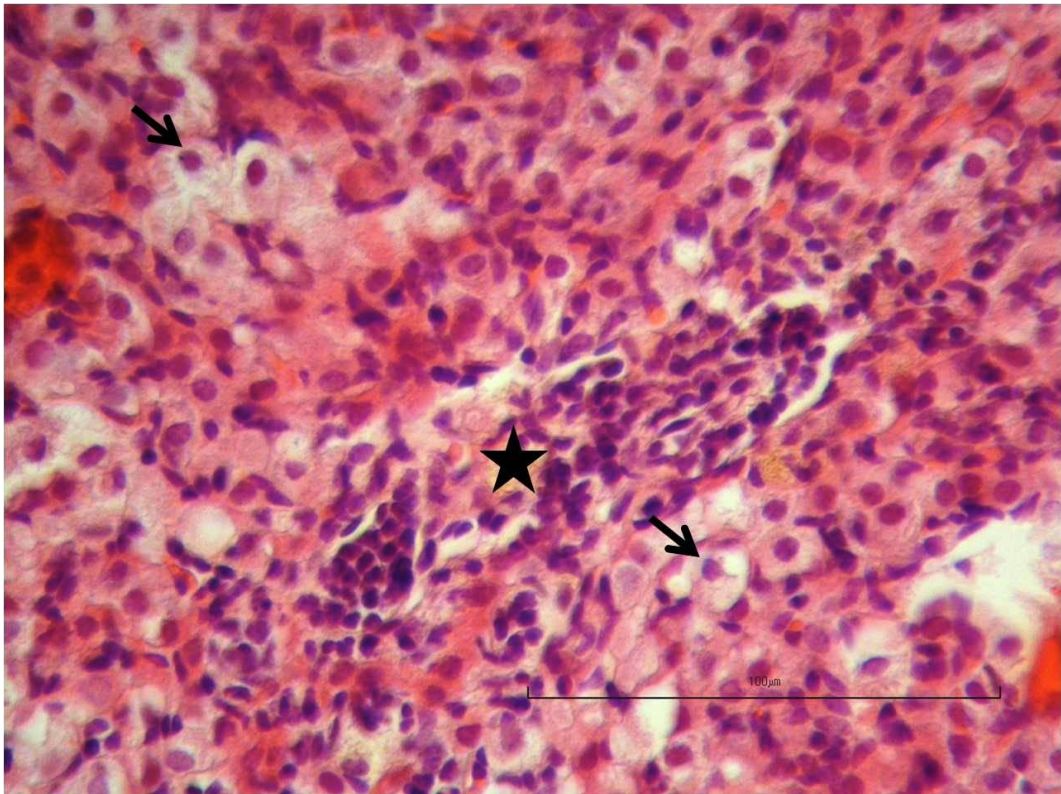
Şekil 4.21: TCDD grubu; Over folikülleri (yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000µm



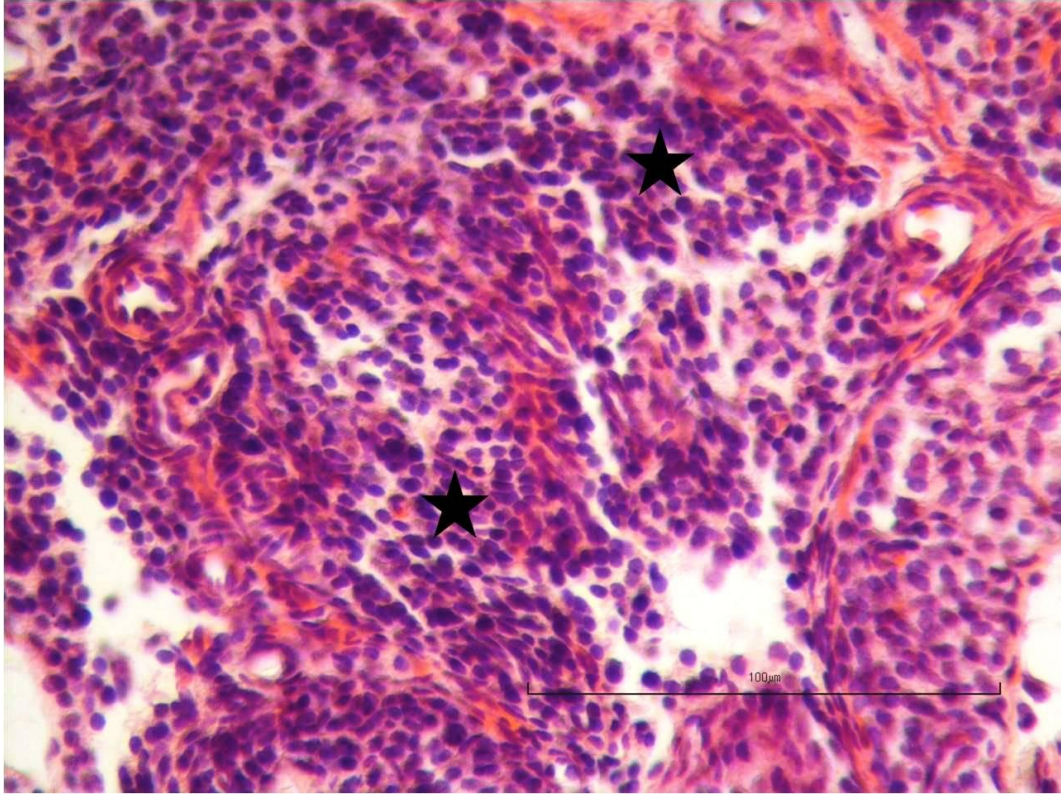
Şekil 4.22: TCDD grubu over parankimi (yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



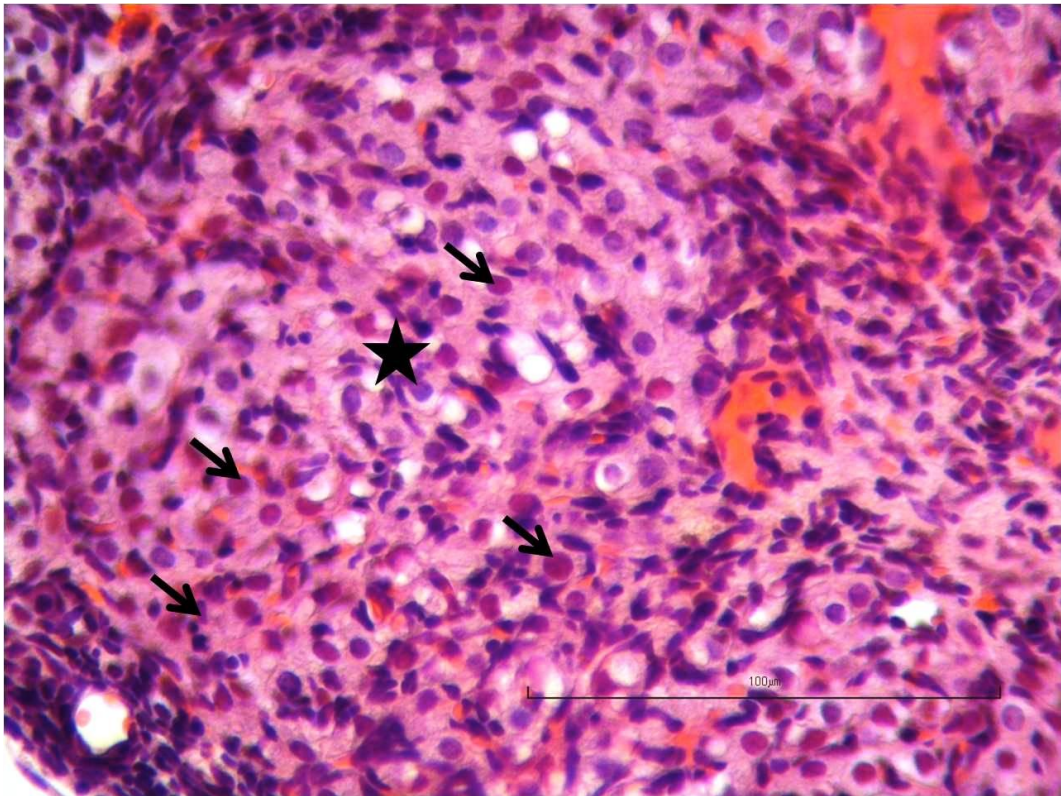
Şekil 4.23: Over folikülü granuloza hücreleri. (HE), Ölçü cetveli = 100µm



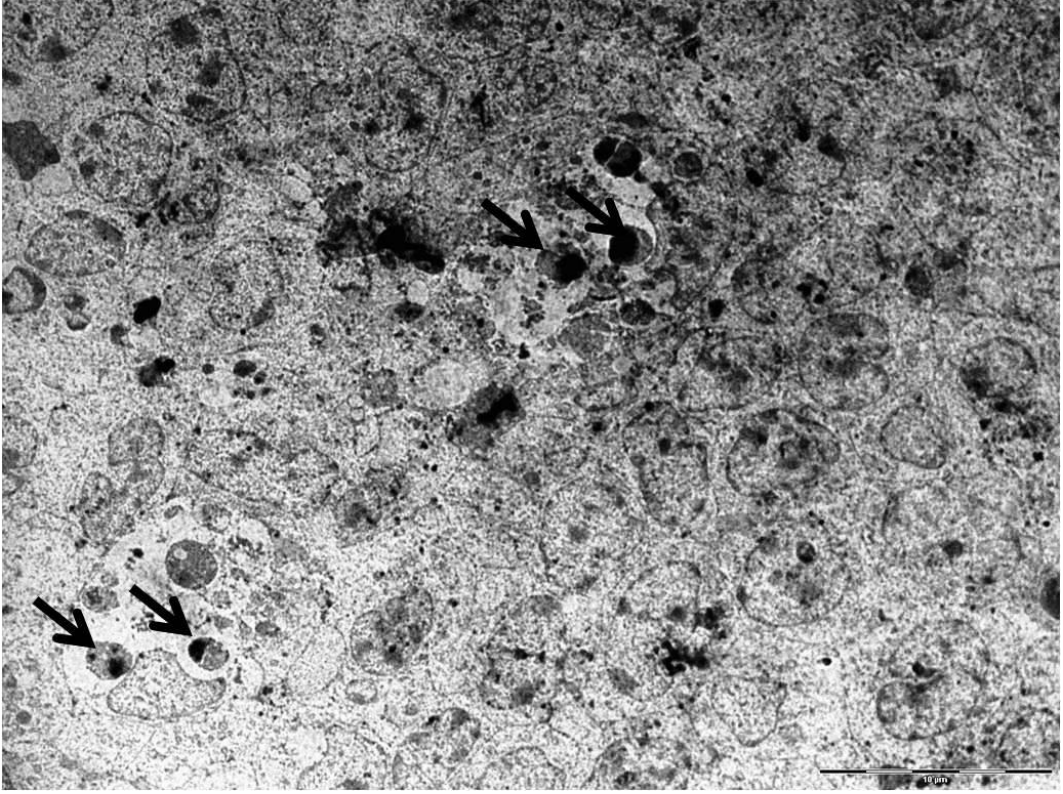
Şekil 4.24: Granuloza lutein hücre (ok), inflamatuvar infiltrasyon (yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



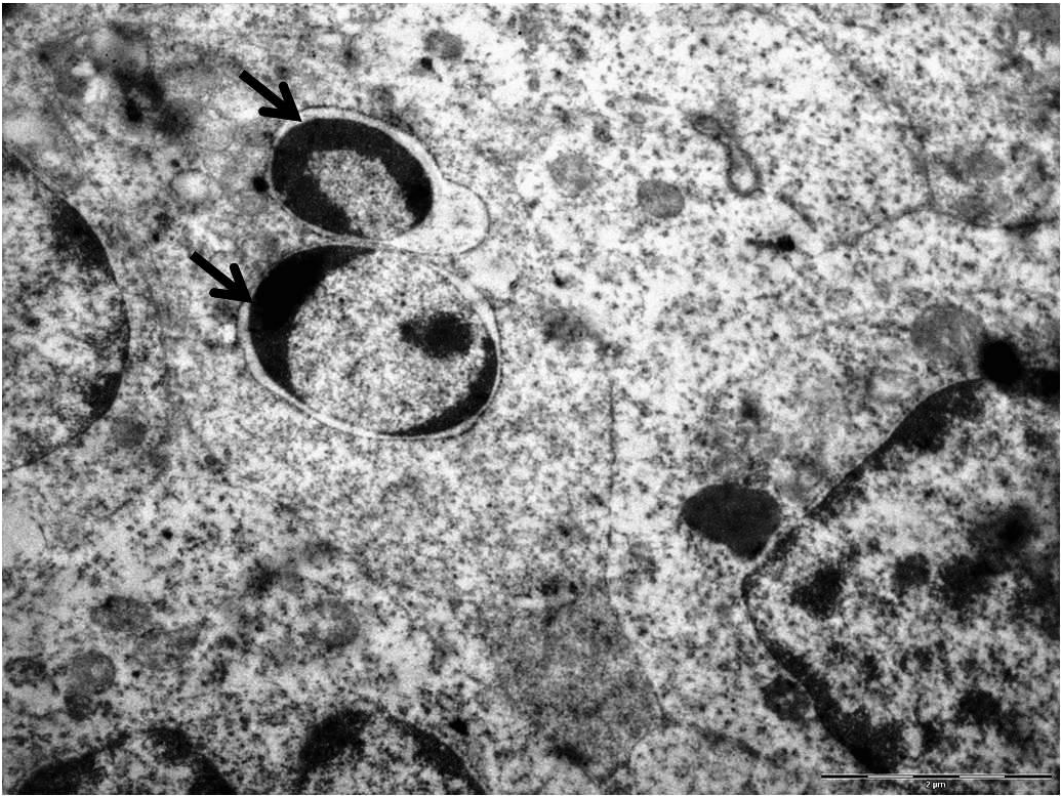
Şekil 4.25: Ovaryum parankiminde diffüz inflamatuvar infiltrasyon ve parankimal hücre dejenerasyonu (yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



Şekil 4.26: Korpus luteum granuloza lutein hücrelerde piknozis ve kromatolizis (ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonu. (HE), Ölçü cetveli = 100µm

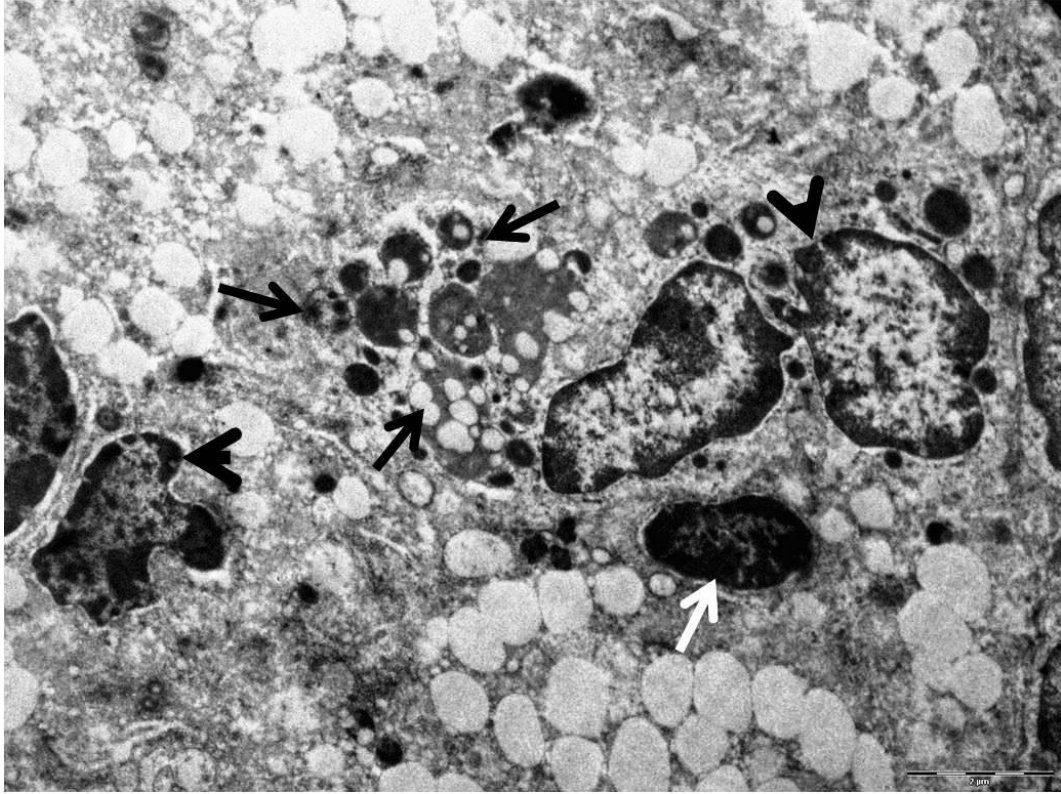


Şekil 4.27: Granuloza hücrelerinde dejenerasyon ve apoptotik cisimcikler (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm

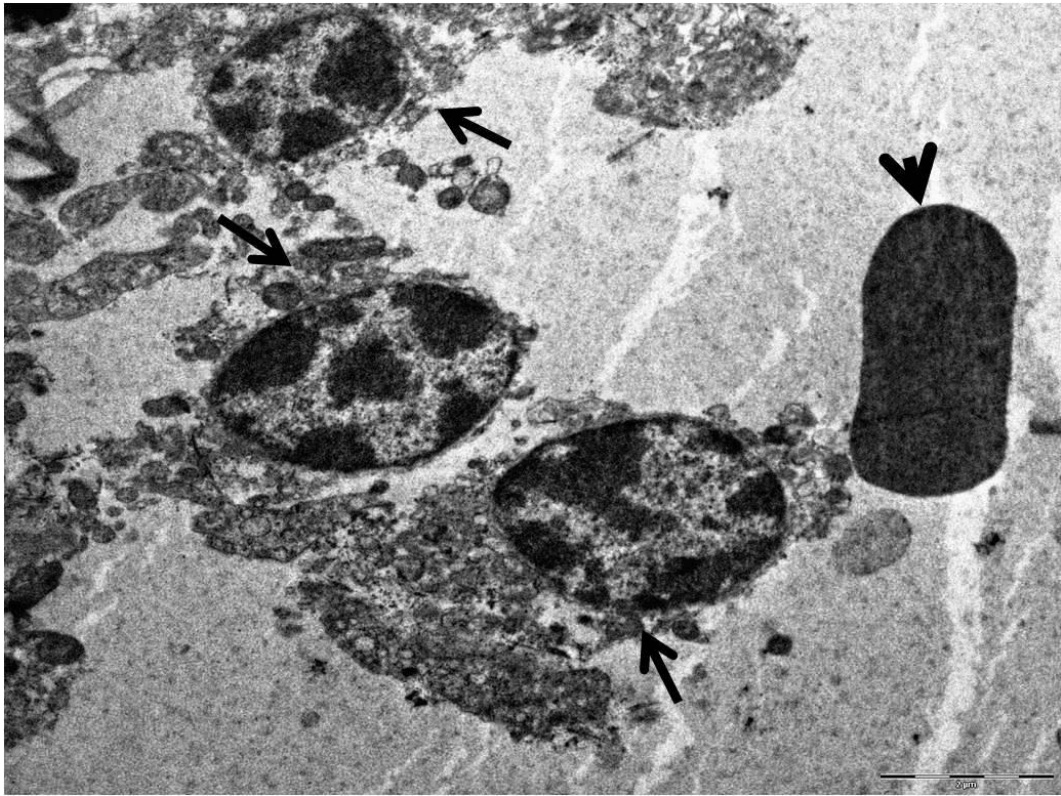


Şekil 4.28: Granuloza hücreleri arasında apoptotik cisimcikler (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm

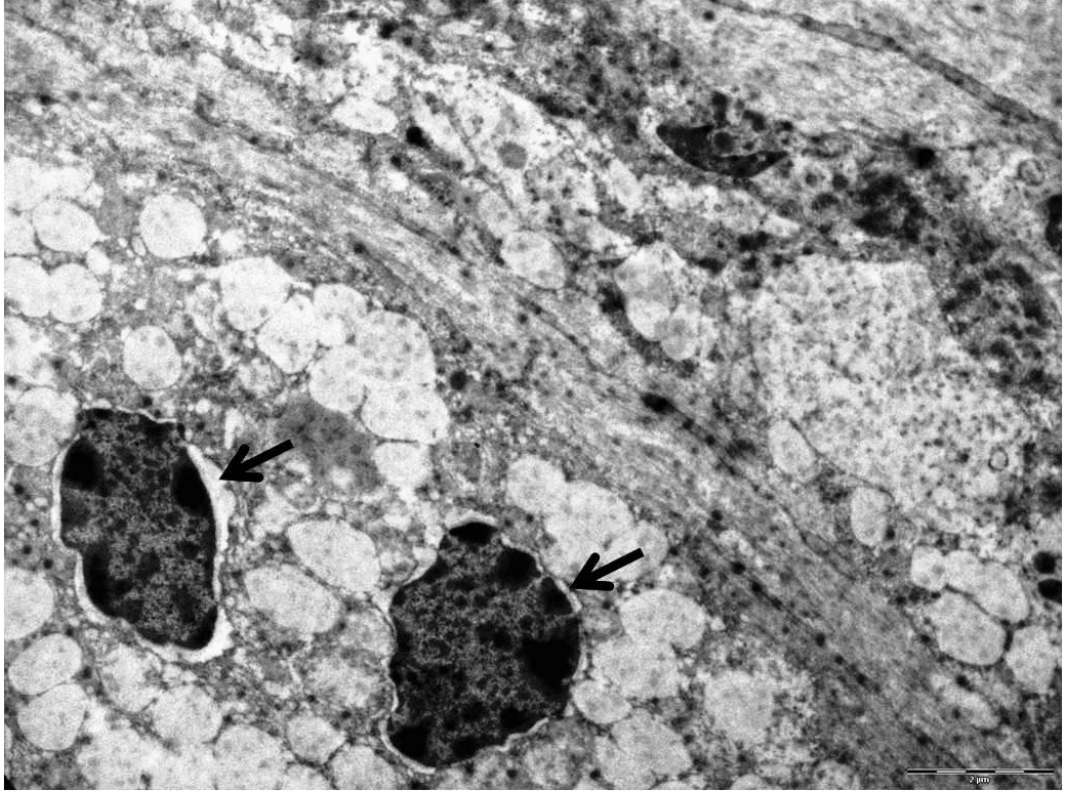




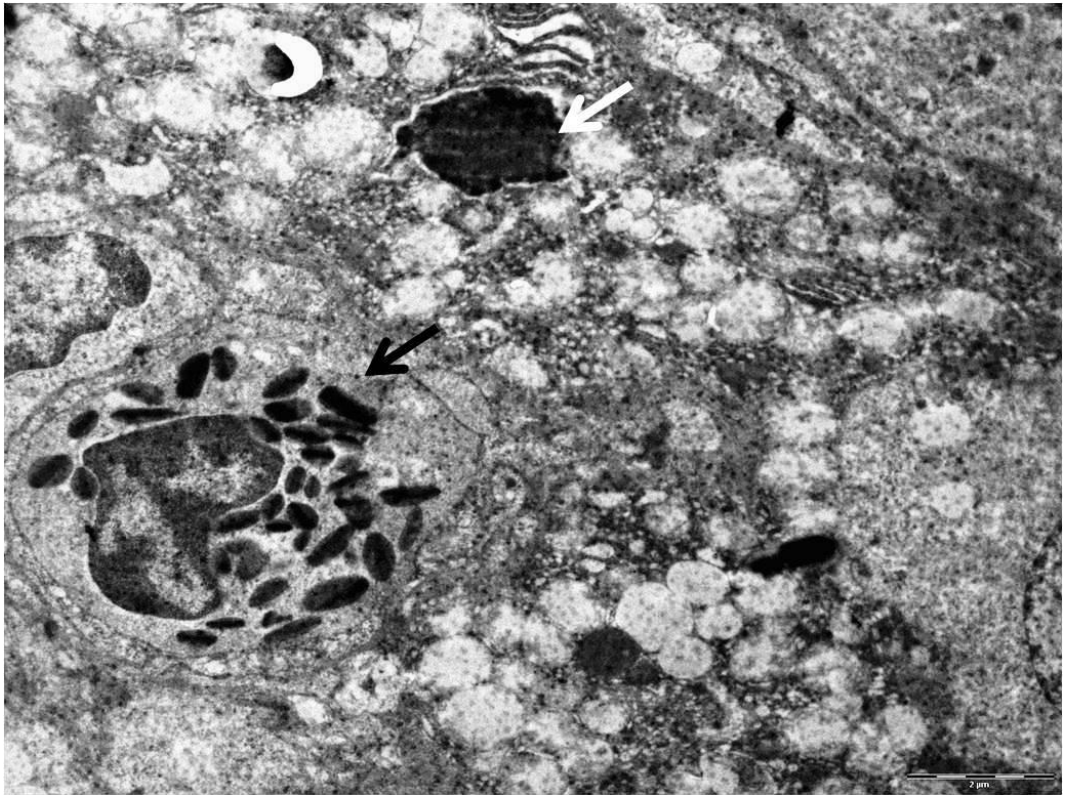
Şekil 4.29: Korpus luteumda hücre sitoplazmasında büyük otofagozom (siyah ok), hücre nukleus sınırında düzensizlik (ok başı) ve piknotik nukleus (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



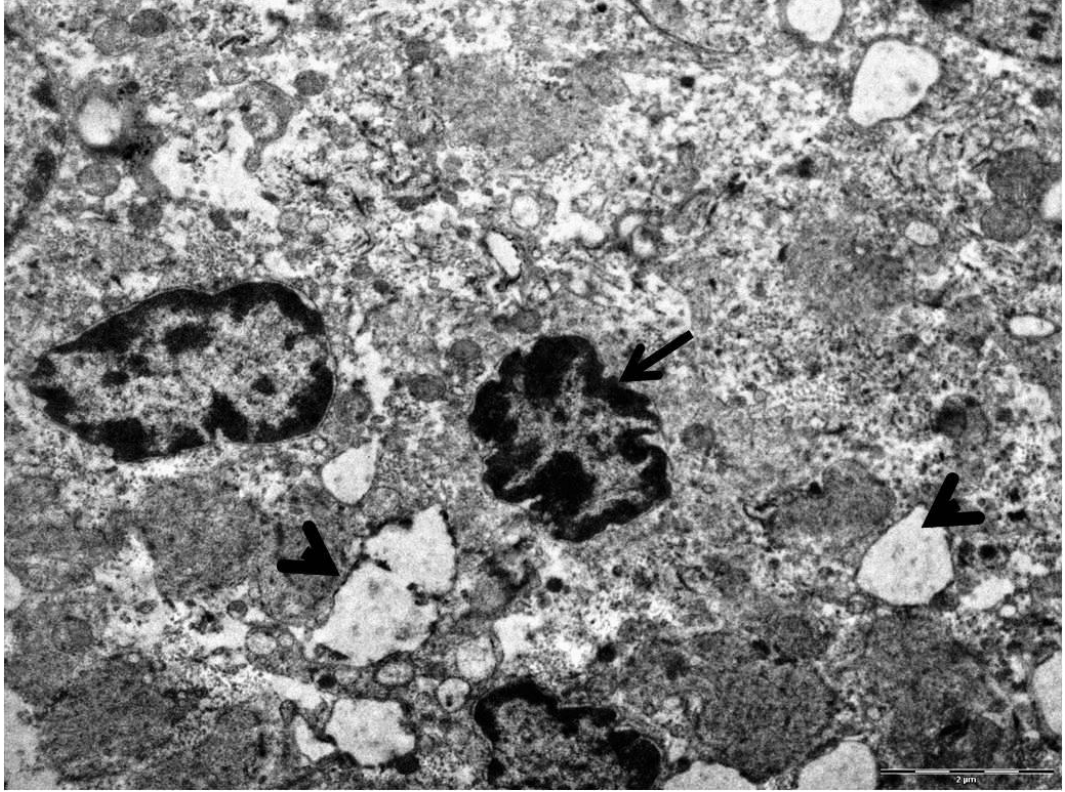
Şekil 4.30: Granuloza hücrelerinde nekroz (ok), eritroit (ok başı). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.31: Granuloza lutein hücrelerde piknotik, düzensiz sınırlı nukleus ve perinuklear alanda dilatasyon (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm



Şekil 4.32: Korpus luteum parankimal hücreleri arasında eozinofil (siyah ok), piknotik nukleus (beyaz ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2μm



Şekil 4.33: Stromal hücrelerde piknotik ve düzensiz sınırlı nukleus (ok), vakuolizasyon (ok başı). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



Şekil 4.34: Düz kas hücre nukleus sınırlarında düzensizlik, periferal kromatin yoğunlaşması (ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm

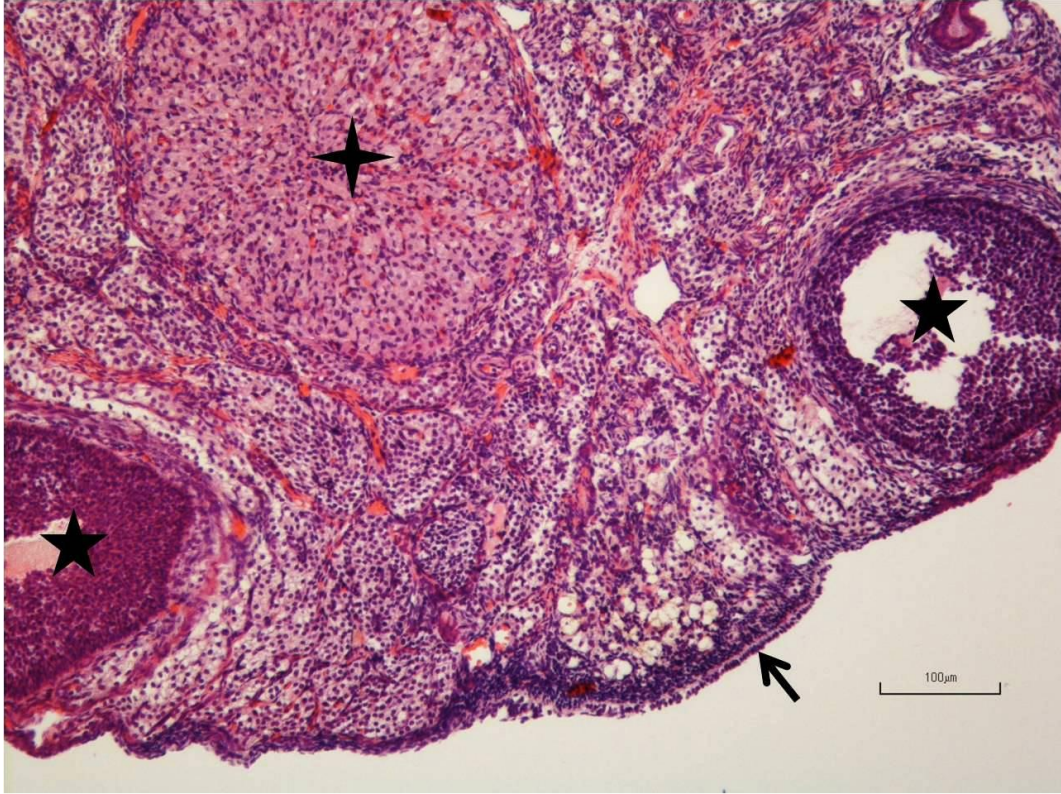
Alkol grubuna ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, ovaryum germinatif epitelinin kontrol, yağ ve melatonin gruplarındakine benzer şekilde normal yapıda olup over dış yüzeyini örtüyordu. Ovaryum korteks bölgesinde korpus luteum yapıları ve farklı gelişim aşamalarında over folikülleri ile bunların dışındaki alanlarda primordial folikül grupları normal histolojik görünümde izlendi. Medulla bölgesi stromal doku içerisinde yerleşik çok sayıda vasküler yapı ile karakterize olup normal histolojik yapıda görüldü (Şekil 4.35, 36). Korpus luteum yapılarında granuloza lutein ve teka lutein hücreleri normal yapı ve dağılımda izlendi (Şekil 4.37). Bu gruba ait ovaryum kesitleri izlenen kontrol, yağ ve melatonin grupları ile benzer şekilde normal histolojik görünümdeydi.

Alkol grubuna ait ovaryum kesitlerinin transmission elektron mikroskopik incelemesinde teka kılıfı hücreleri, teka lutein (Şekil 4.38), granuloza lutein (Şekil 4.39) ve granuloza hücreleri (Şekil 4.40) kontrol, yağ ve melatonin gruplarında olduğu gibi normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.

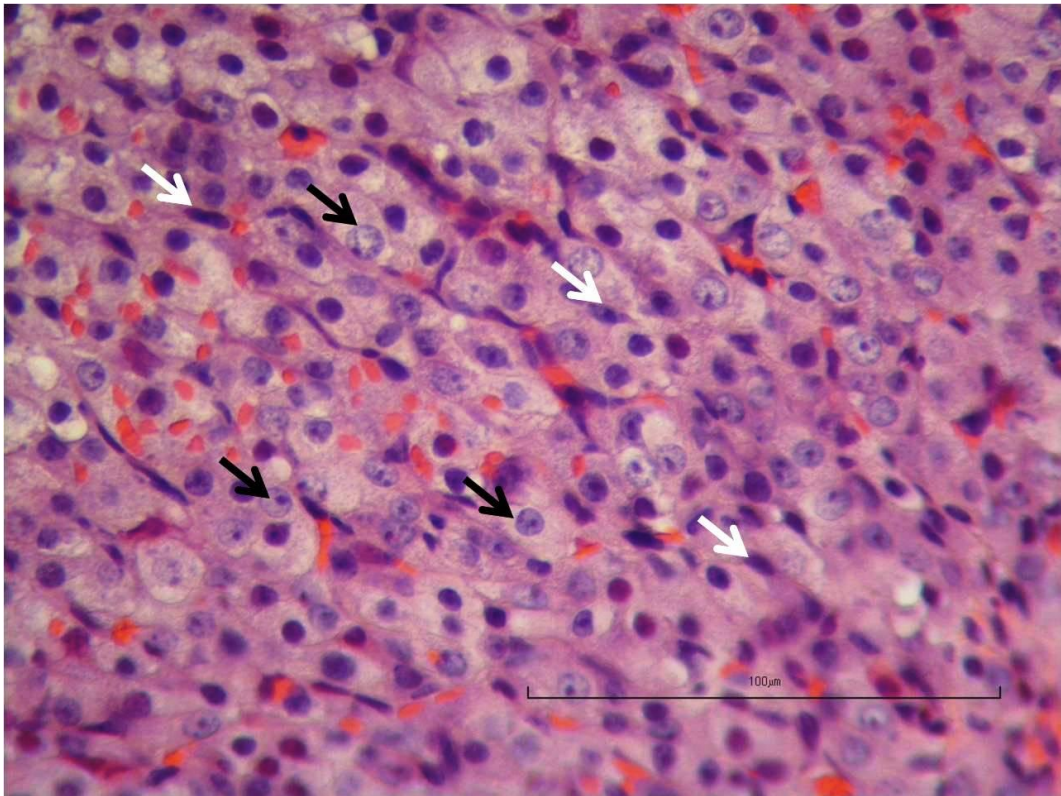
Ovaryum dokusuna ait kan damarları endotel hücreleri (Şekil 4.41), düz kas hücreleri (Şekil 4.42), ovaryum stromal hücreleri (Şekil 4.43) kontrol, yağ ve melatonin gruplarındaki ultrastrüktürel görünüm ile benzer olup, normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.



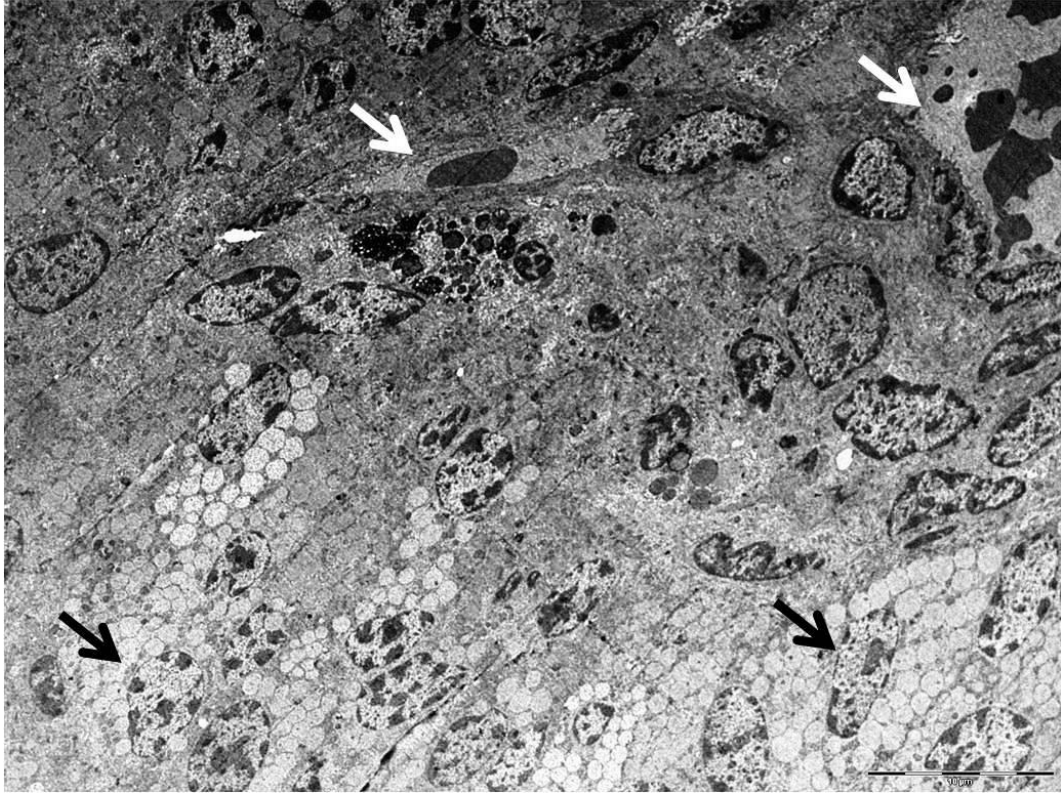
Şekil 4.35: Alkol grubu; Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000µm



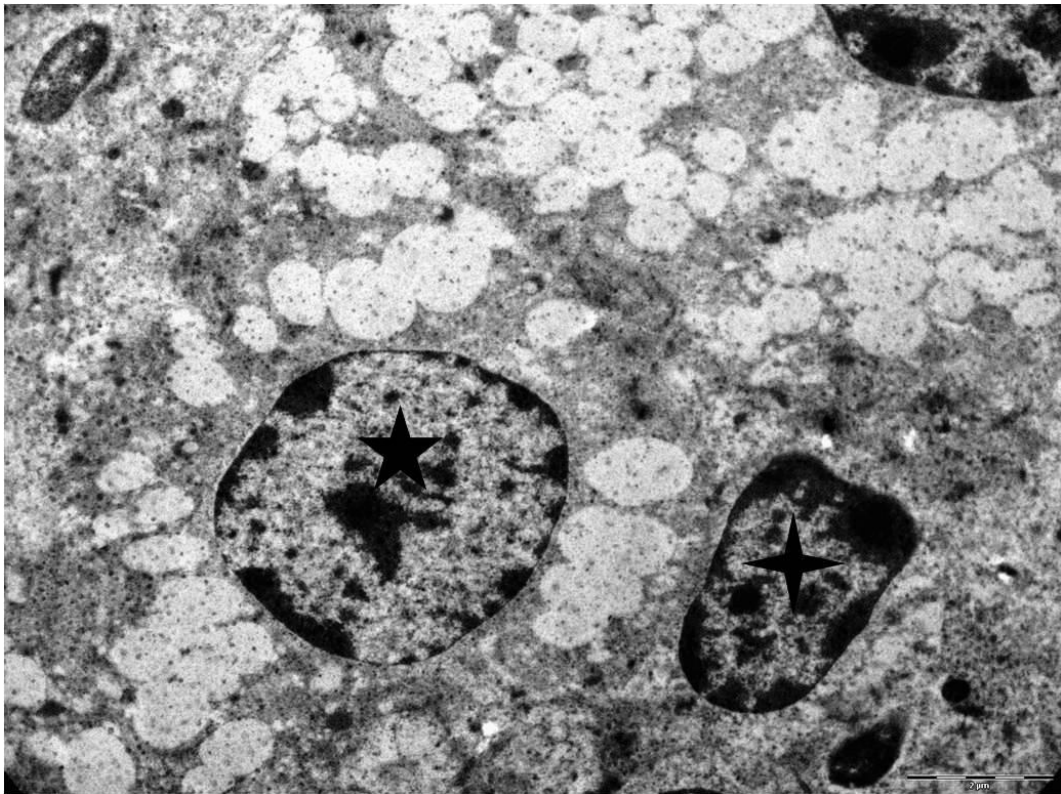
Şekil 4.36: Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız), germinatif epitel (ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



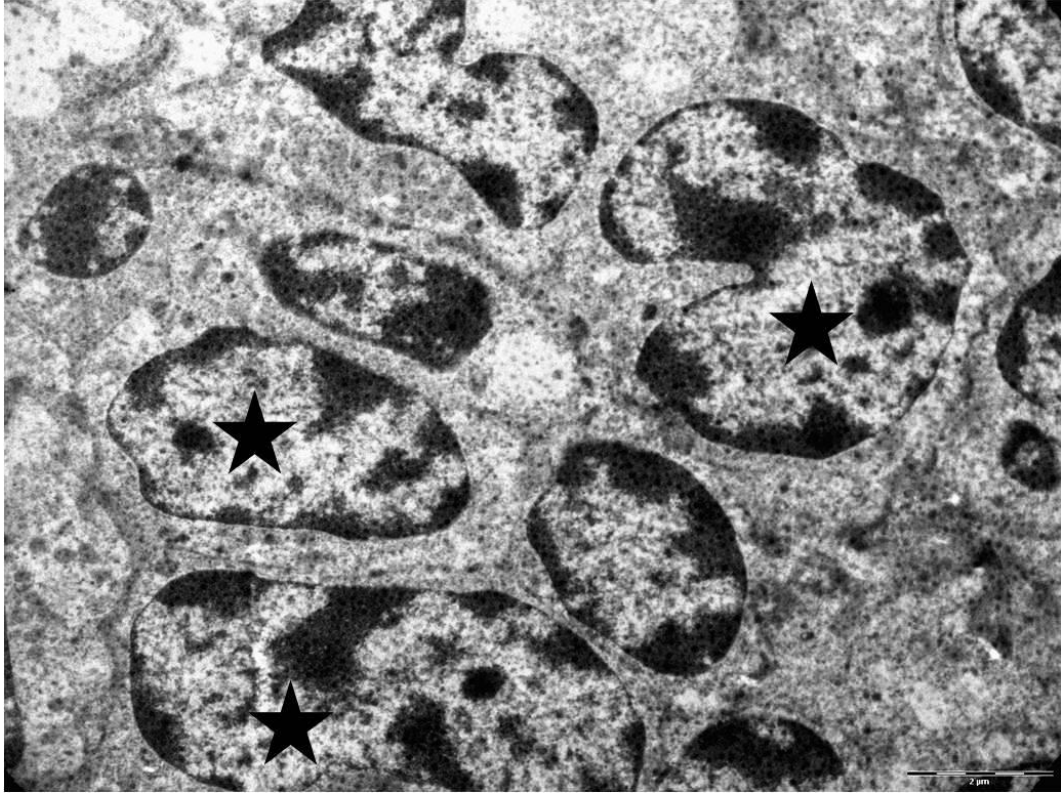
Şekil 4.37: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



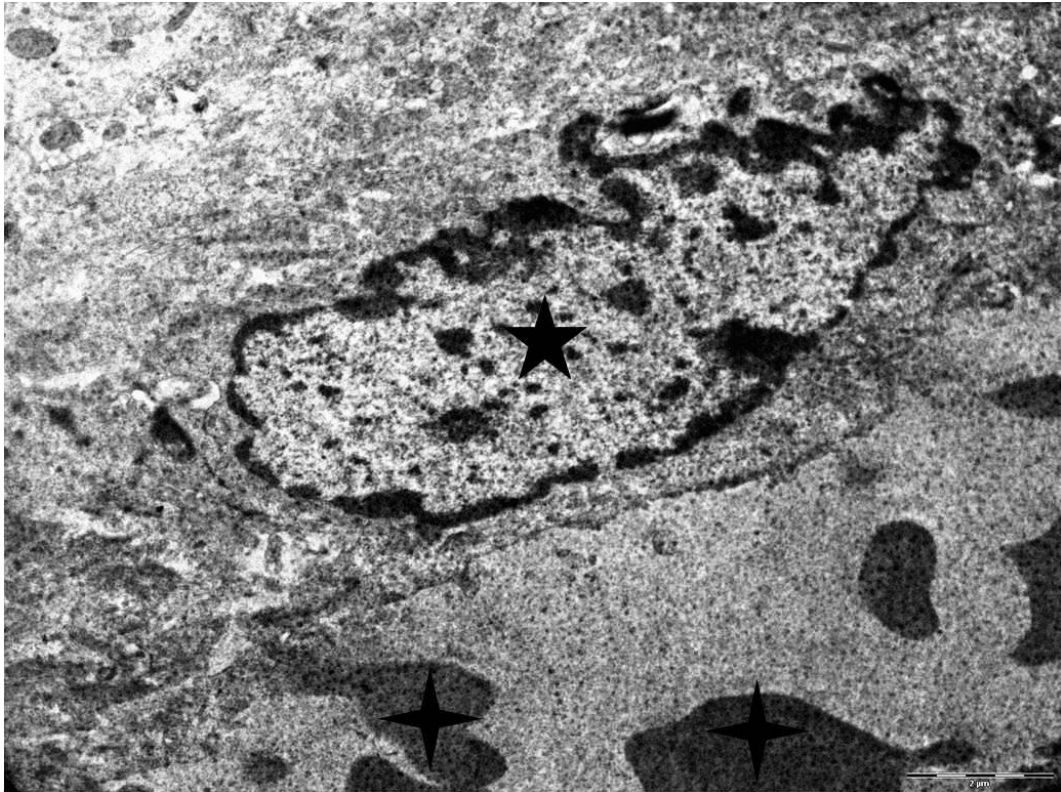
Şekil 4.38: Granuloza lutein hücre (siyah ok), kapiller (beyaz ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



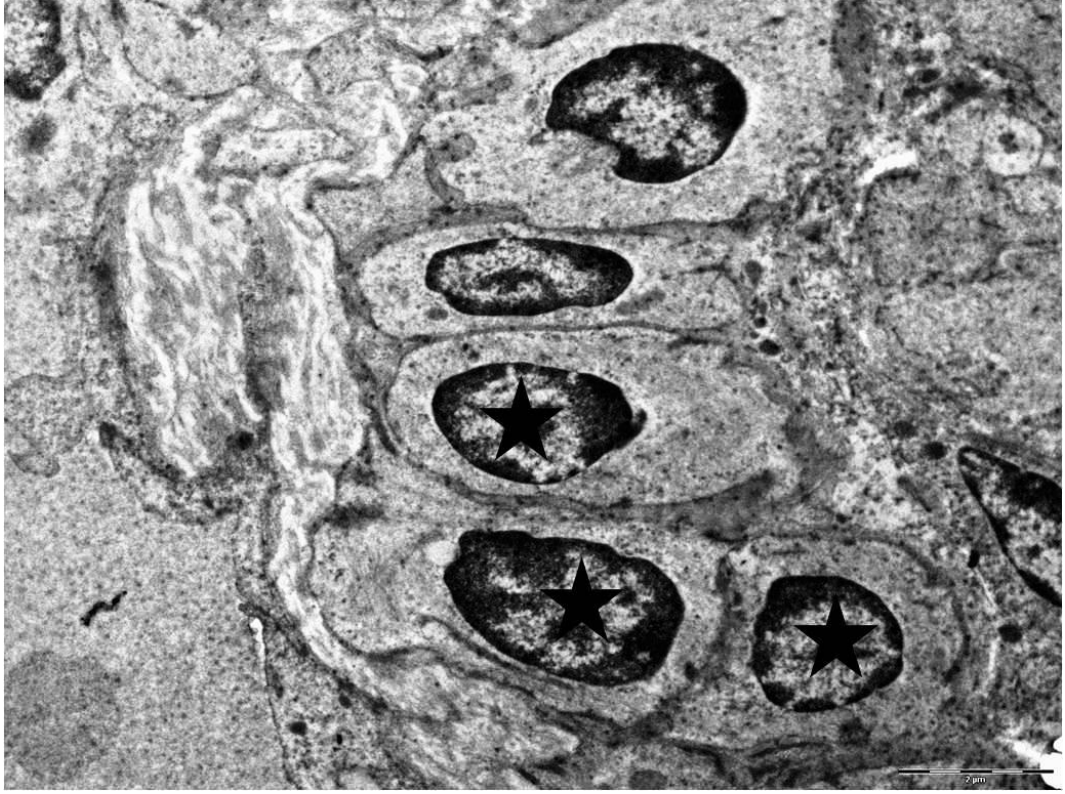
Şekil 4.39: Granuloza lutein hücre (beş nokta yıldız), teka lutein hücre (dört nokta yıldız)



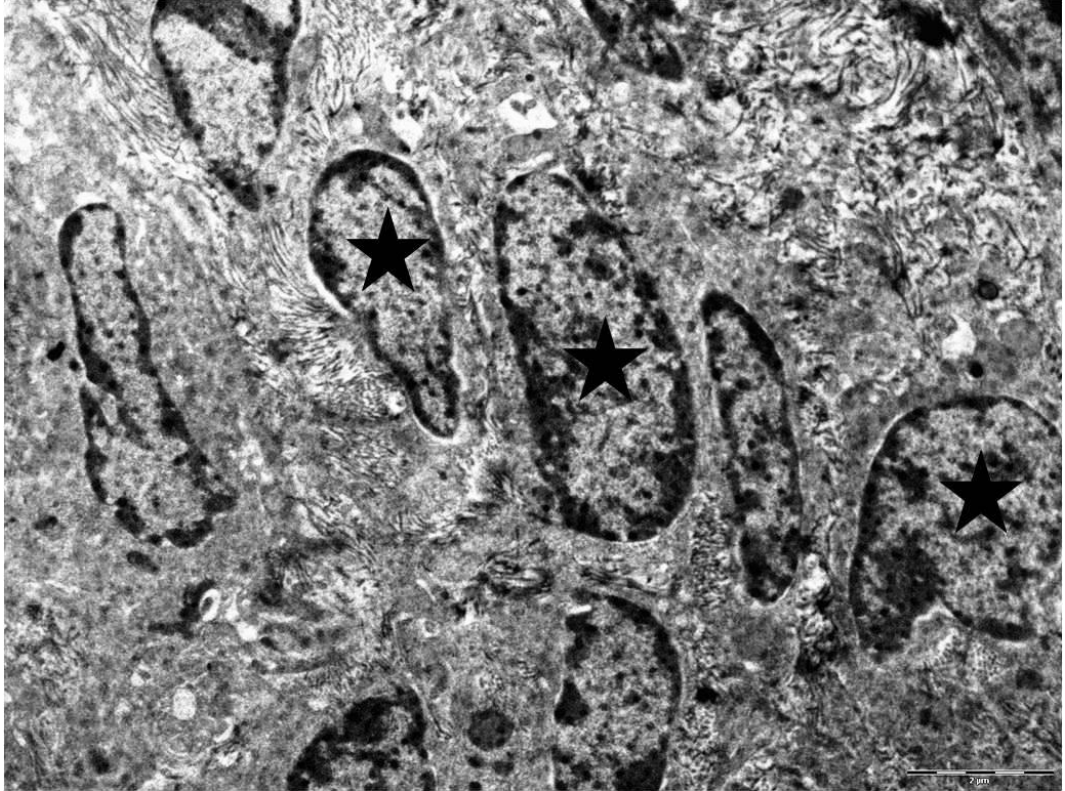
Şekil 4.40: Granuloza hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.41: Endotel hücresi (beş nokta yıldız), eritrosit (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.42: Düz kas hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



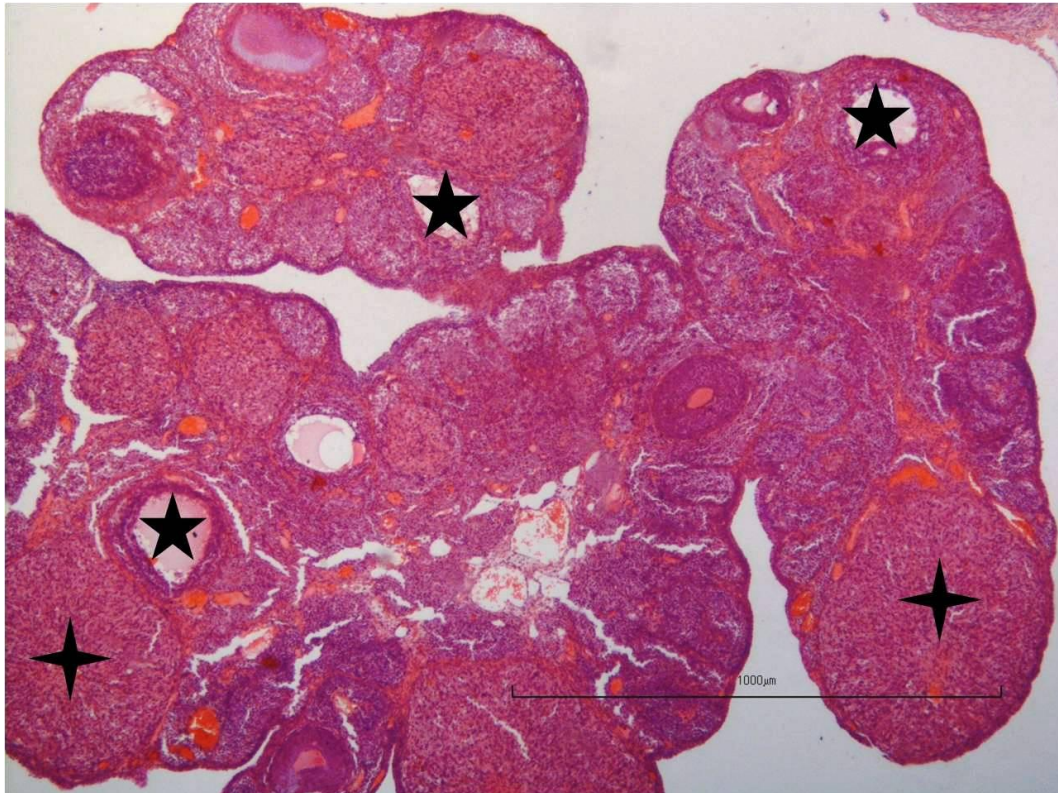
Şekil 4.43: Stromal hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



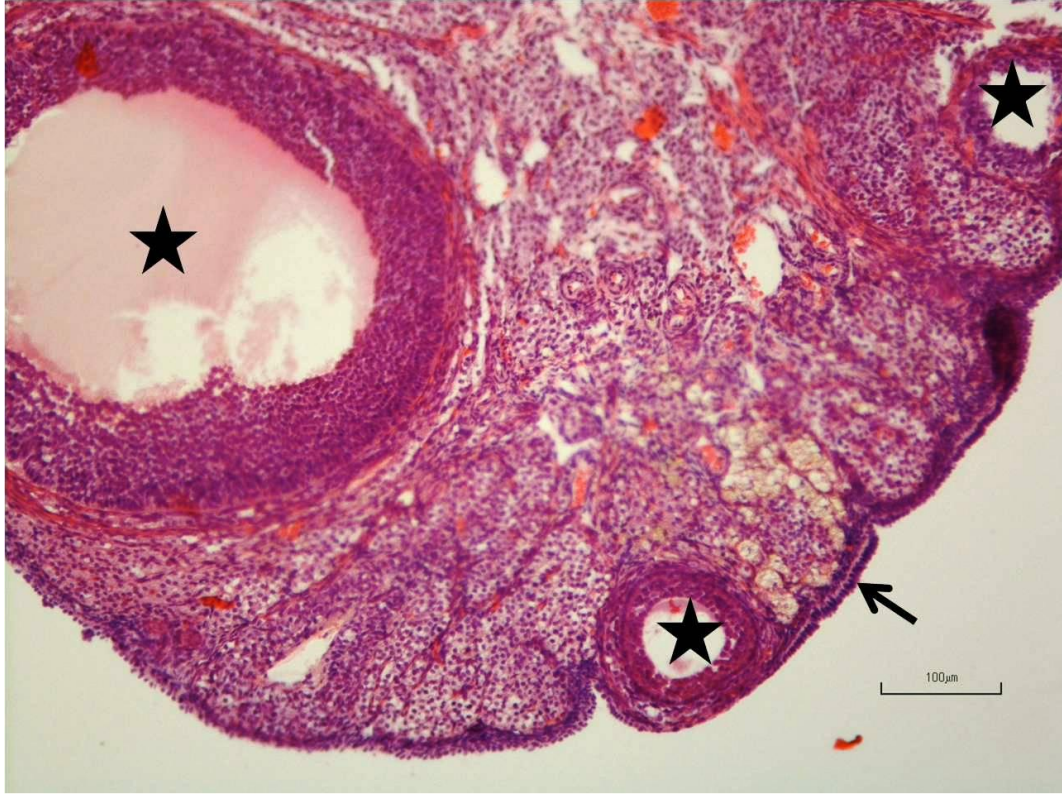
Melatonin grubuna ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, ovaryum yüzeyinin germinatif epitel ile örtülü olduğu görüldü. Ovaryum kesitlerinde korteks ve medulla bölgeleri açıkça ayırt edilebiliyordu. Korteks içinde farklı gelişim aşamalarında over folikülleri, korpus luteum yapıları ile kan damarları ve primordial folikül grupları izlendi. Medulla bölgesi kan damarları ve çevre stromal dokudan oluşmaktaydı (Şekil 4.44, 45). Korpus luteum yapıları içinde granuloza lutein ve teka lutein hücreleri normal yapı ve dağılımda görüldü (Şekil 4.46). Işık mikroskopik düzeyde ovaryum kesitlerinde izlenen yapıların kontrol ve yağ grupları ile benzer şekilde normal histolojik yapıda olduğu görüldü.

Transmission elektron mikroskopik incelemede korpus luteumteka lutein hücreleri (Şekil 4.47, 48) granuloza lutein hücreleri (Şekil 4.47, 48, 49) ve teka hücreleri (Şekil 4.48) granuloza hücreleri (Şekil 4.50), kontrol ve yağ gruplarındakine benzer şekilde normal ultrastrüktürel yapıda görüldü.

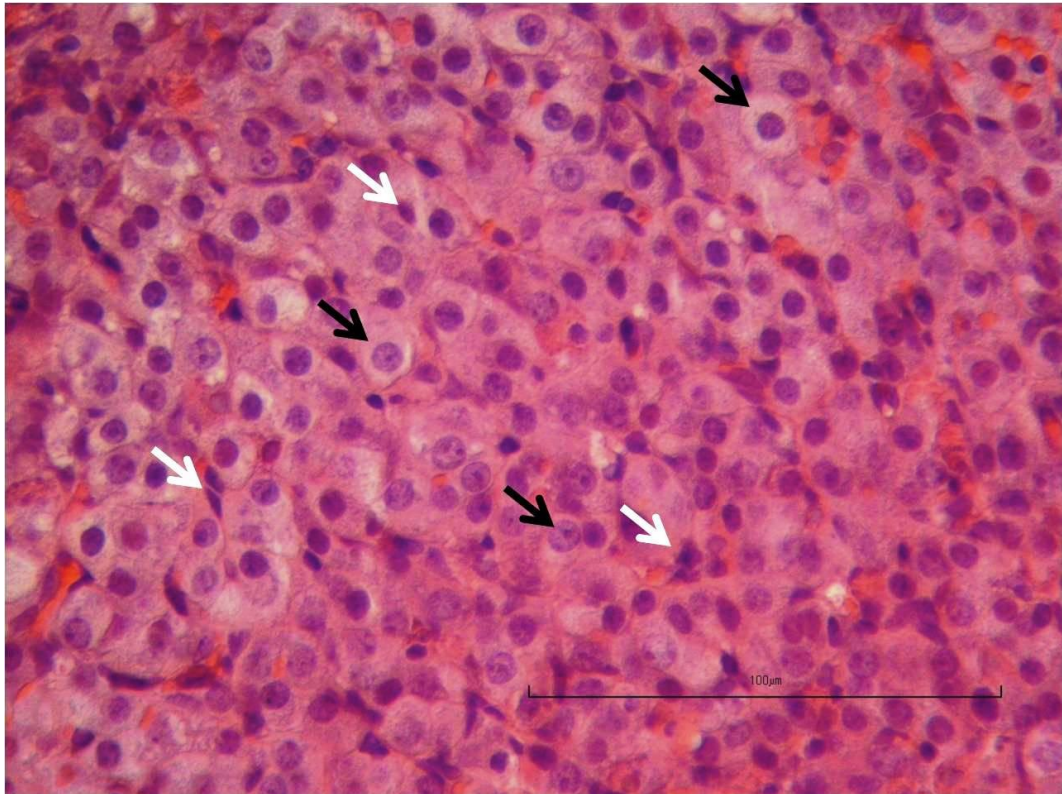
Kan damarları endotel hücreleri (Şekil 4.49), düz kas hücreleri (Şekil 4.51) ovaryum stromal hücreleri (Şekil 4.52) kontrol grubu ile benzer şekilde normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.



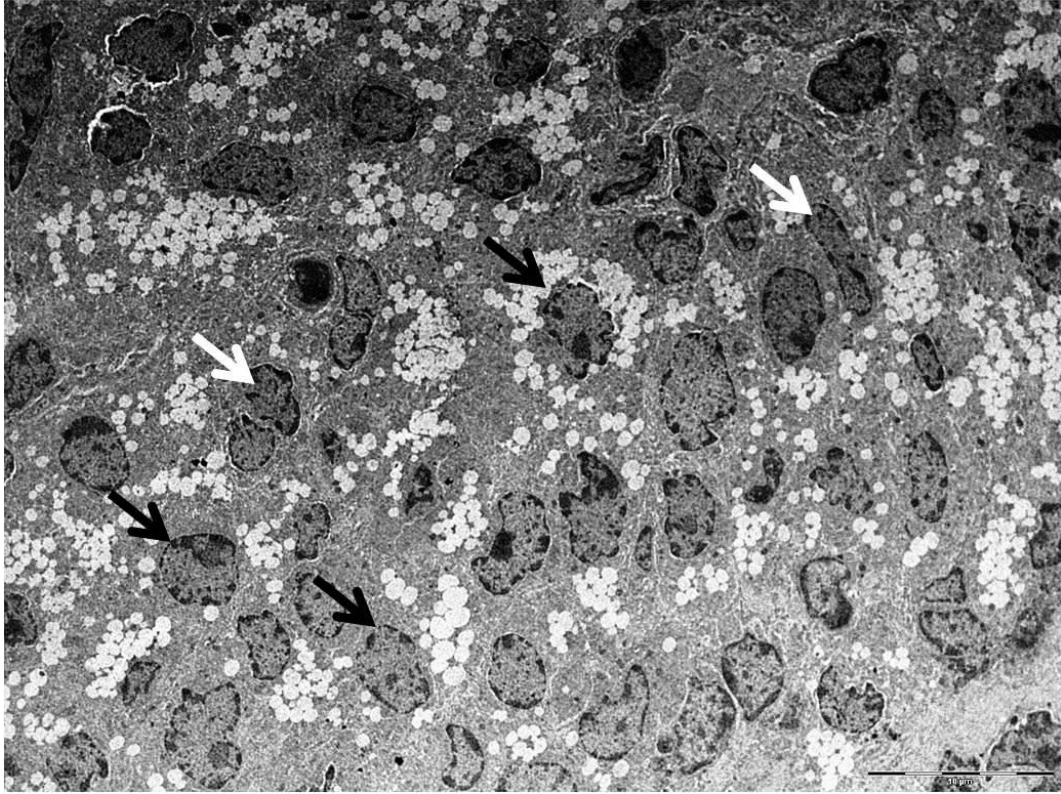
**Şekil 4.44: Melatonin grubu; Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000µm**



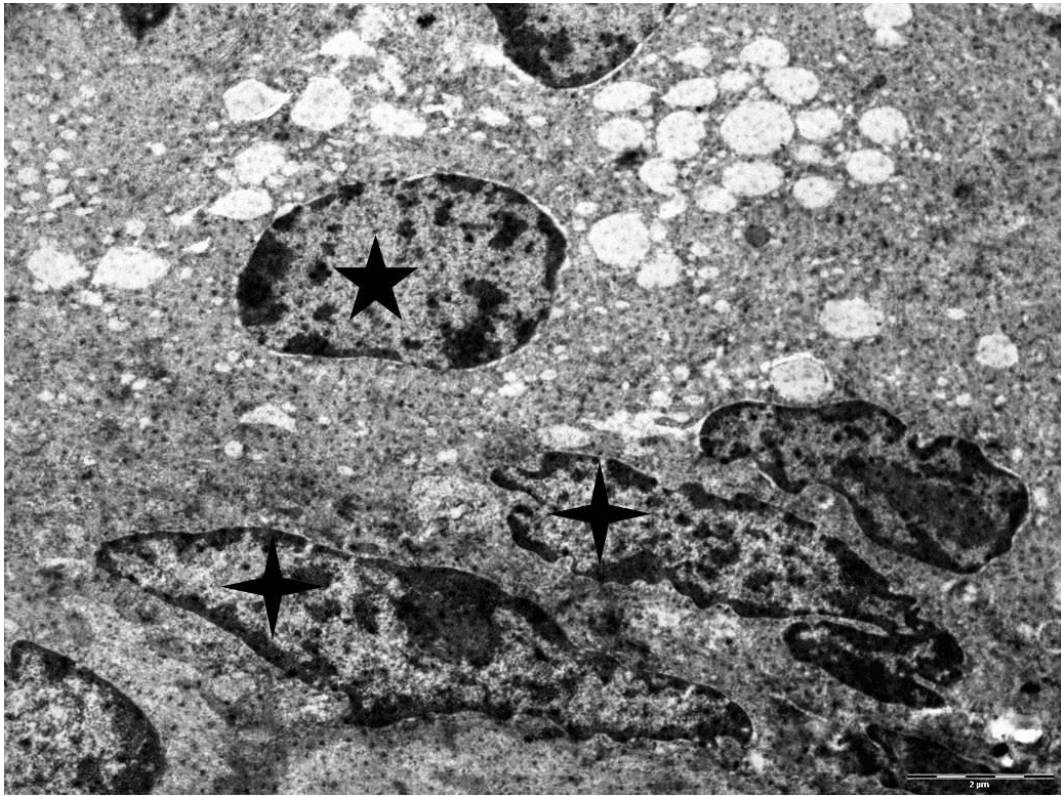
Şekil 4.45: Over folikülü (yıldız), germinatif epitel (ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



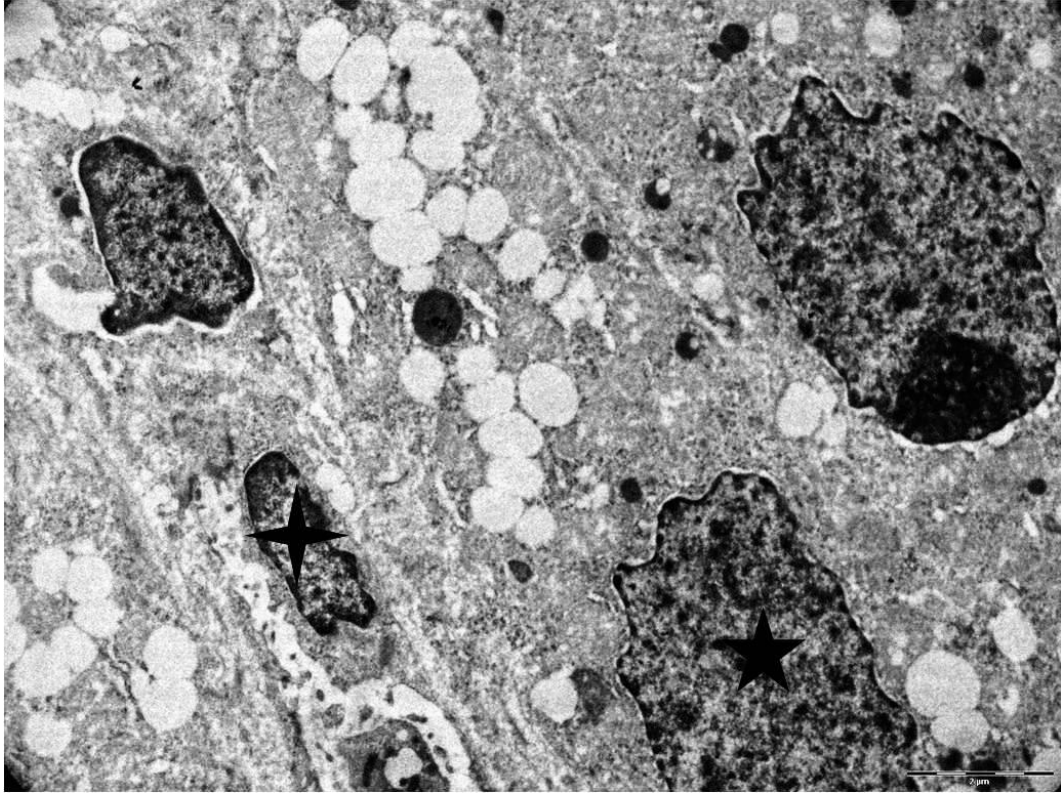
Şekil 4.46: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm



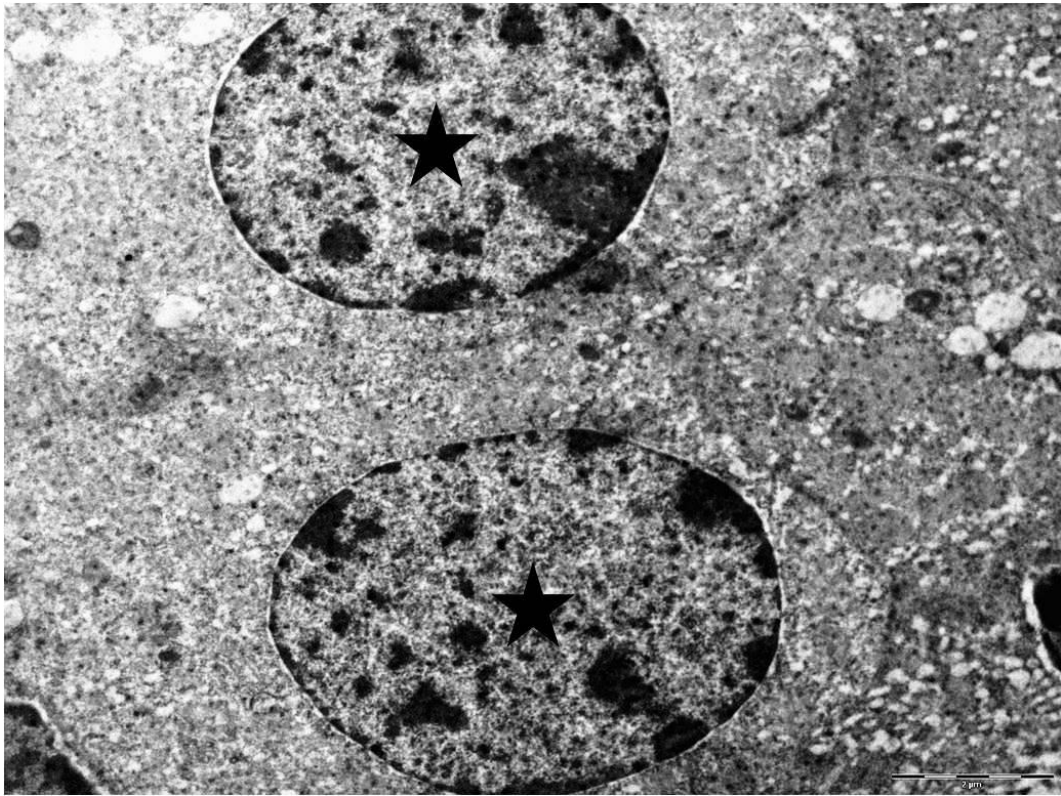
Şekil 4.47: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



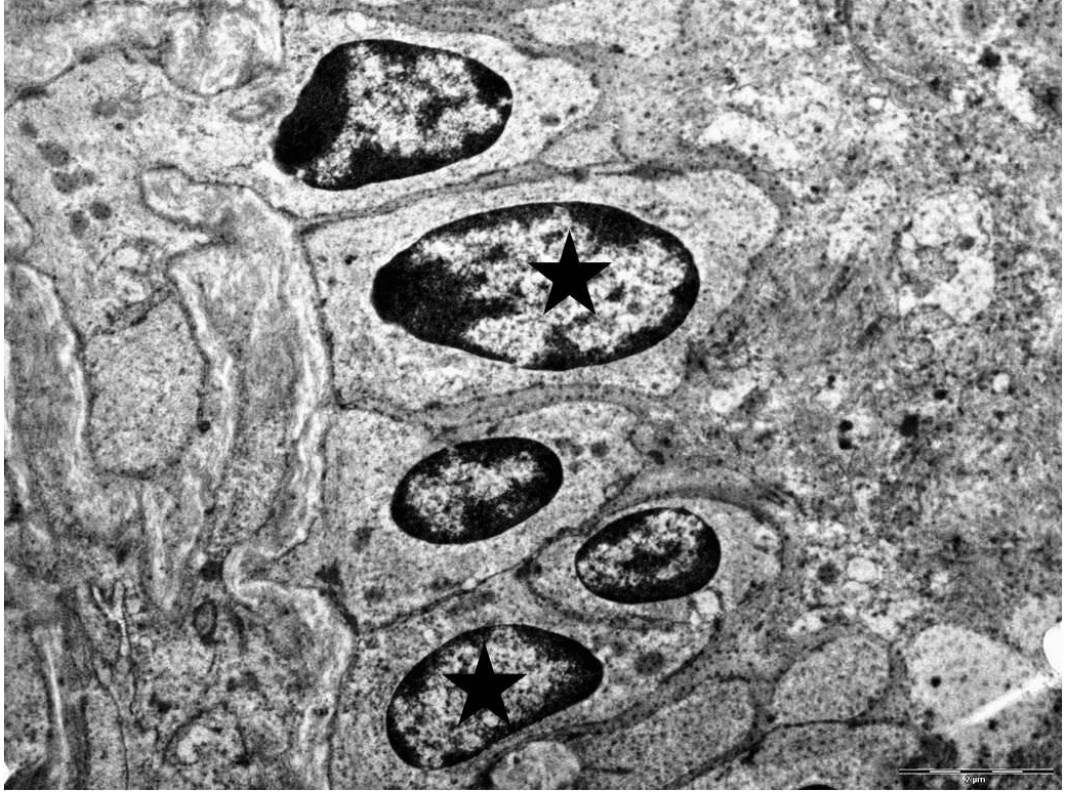
Şekil 4.48: Granuloza lutein hücresi (beş nokta yıldız), teka hücresi (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



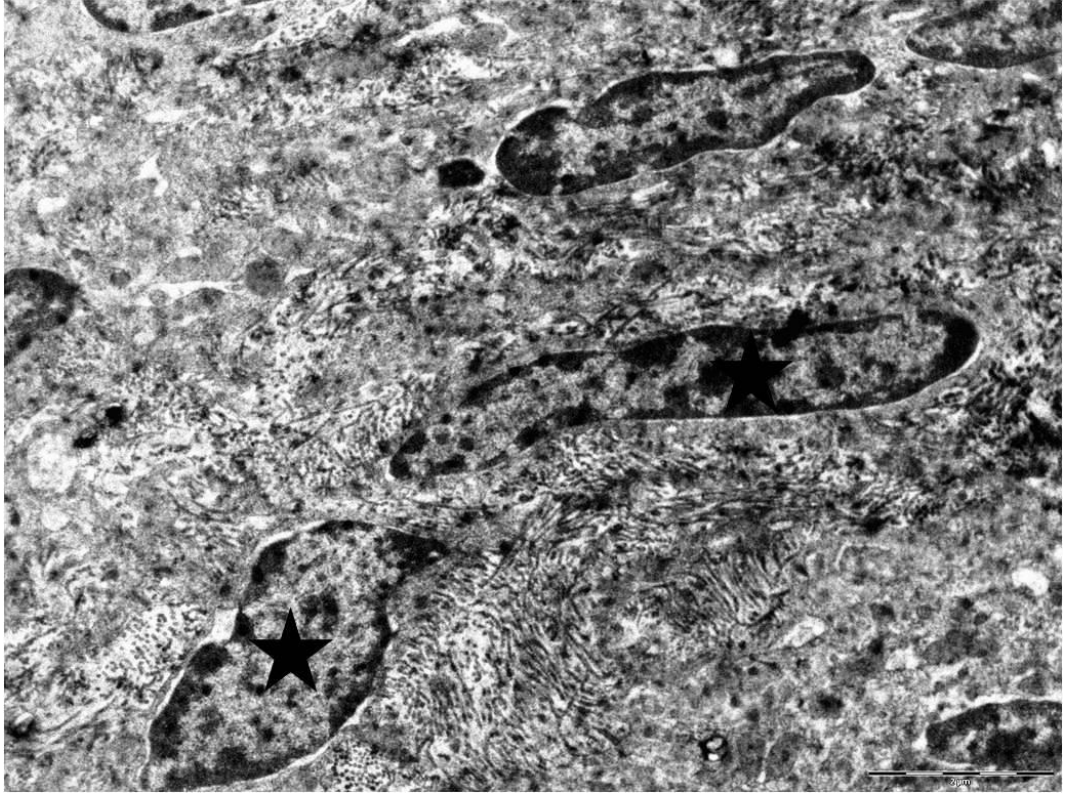
Şekil 4.49: Granuloza ltein hücre (beş nokta yıldız), endotel hücresi (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



Şekil 4.50: Granuloza hücreleri (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



Şekil 4.51: Düz kas hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



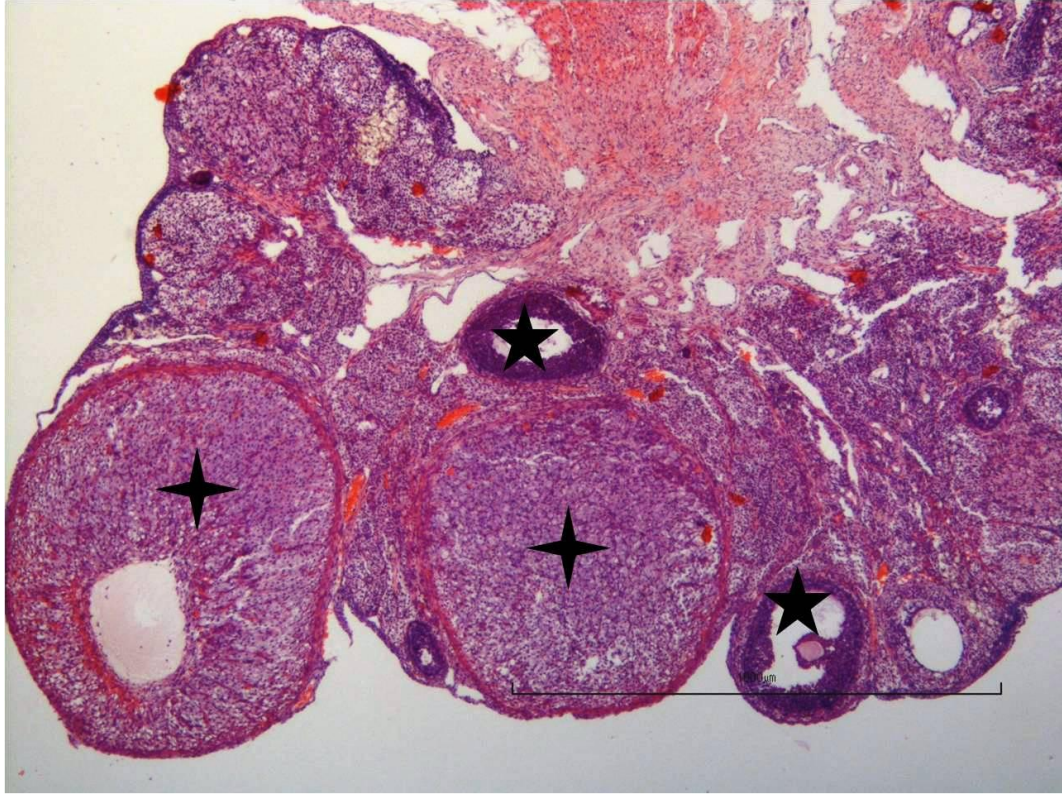
Şekil 4.52: Stromal hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m

TCDD + Mel grubuna ait ovaryum dokularının ışık mikroskopik incelenmesinde dioksin grundaki ovaryumlarda görülen hasar ve dejenerasyon bulgularına rastlanmadı. Ovaryum yüzeyinde tek katlı, kübik şekilli germinatif epitel izlendi. Ovaryum parankiminin büyük oranda kontrol, yağ, melatonin ve alkol gruplarındakine benzer şekilde farklı gelişim aşamalarındaki over folikülleri ve korpus luteum yapıları içerdiği görüldü. Bu yapılar arasında kalan korteks bölgelerinde primordial folikül grupları izlendi. Ovaryum foliküllerinde granuloza hücreleri genel olarak normal histolojik görünümde olmakla birlikte yer yer minimal düzeyde heterokromatik nükleus yapısı izlendi. Ayrıca bazı foliküllerde granuloza hücreleri arasında minimal düzeyde interselüler alanlarda dilatasyon mevcuttu (Şekil 4.53, 54, 55). Korpus luteumun granuloza lutein hücreleri iri, ökromatik nükleuslu, açık renk sitoplazmalı olup normal yapıda değerlendirildi. Bu hücreler arasında teka lutein hücreleri de normal yapıda izlendi (Şekil 4.56). Ovaryum medulla bölgesinde stromal bağ dokusu içinde çok sayıda kan damarları olağan yapısında görüldü.

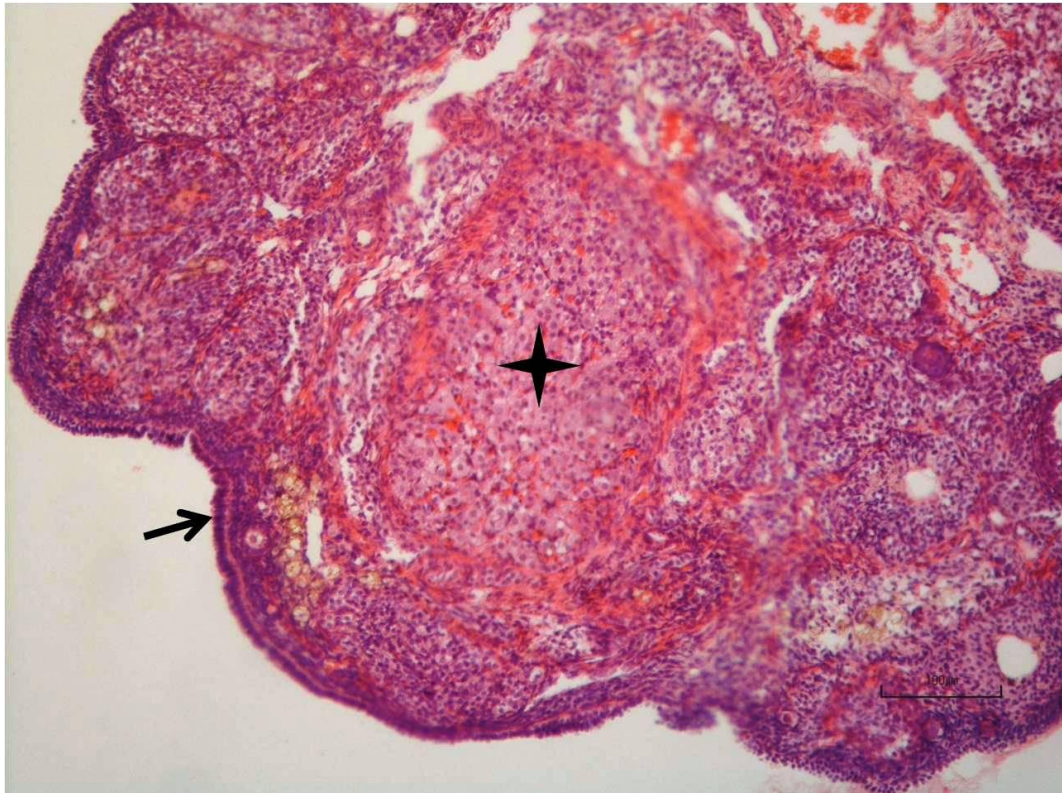
Transmission elektron mikroskopik incelemede korpus luteumun granuloza lutein hücreleri, düşük elektron yoğunluğa sahip sitoplazmik vakuoller içermekteydi. Nükleus oval şekilli ve ökromatik yapıda izlendi. Ancak yer yer piknotik nükleuslu korpus luteum hücrelerine rastlandı. Ayrıca minimal düzeyde perinükleer alanda minimal dilatasyon ve nükleus konturlarında ondulasyon izlendi (Şekil 4.57, 58). Korpus luteum teka lutein hücreleri kontrol, yağ, melatonin ve alkol gruplarındakine benzer olarak yassı-mekik şekilli, granuloza lutein hücrelere göre daha heterokromatik nükleuslu hücreler şeklinde görüldü (Şekil 4.57).

Dioxin + Mel grubunda granuloza hücreleri genellikle poligonal şekilli, ökromatik nükleuslu hücrelerdi. Granuloza hücreleri arasında yer yer mitoz figürlerine rastlandı. Granuloza hücreleri periferinde teka kılıfı içinde kapiller yapılar ve teka hücreleri normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi (Şekil 4.59, 60).

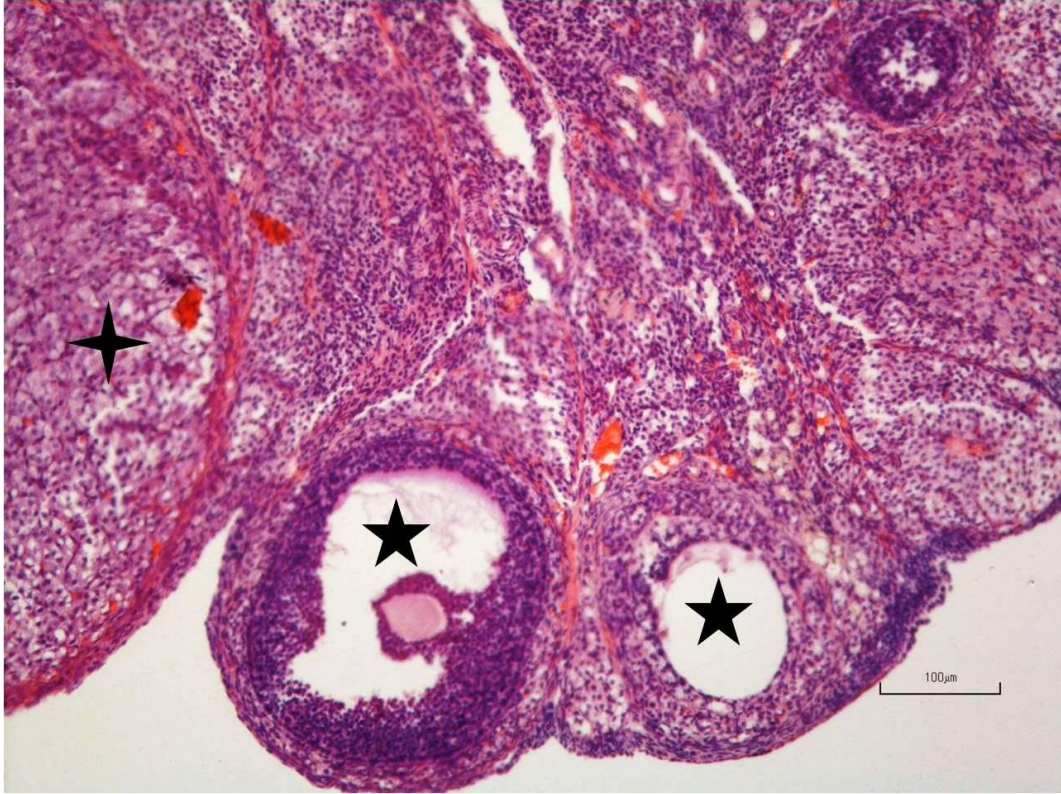
Ovaryum kesitlerinde izlenen düz kas hücreleri (Şekil 4.61), stromal hücreler (Şekil 4.62) ve vasküler endotel hücreleri (Şekil 4.63) normal ultrastrüktürel yapıda görüldü.



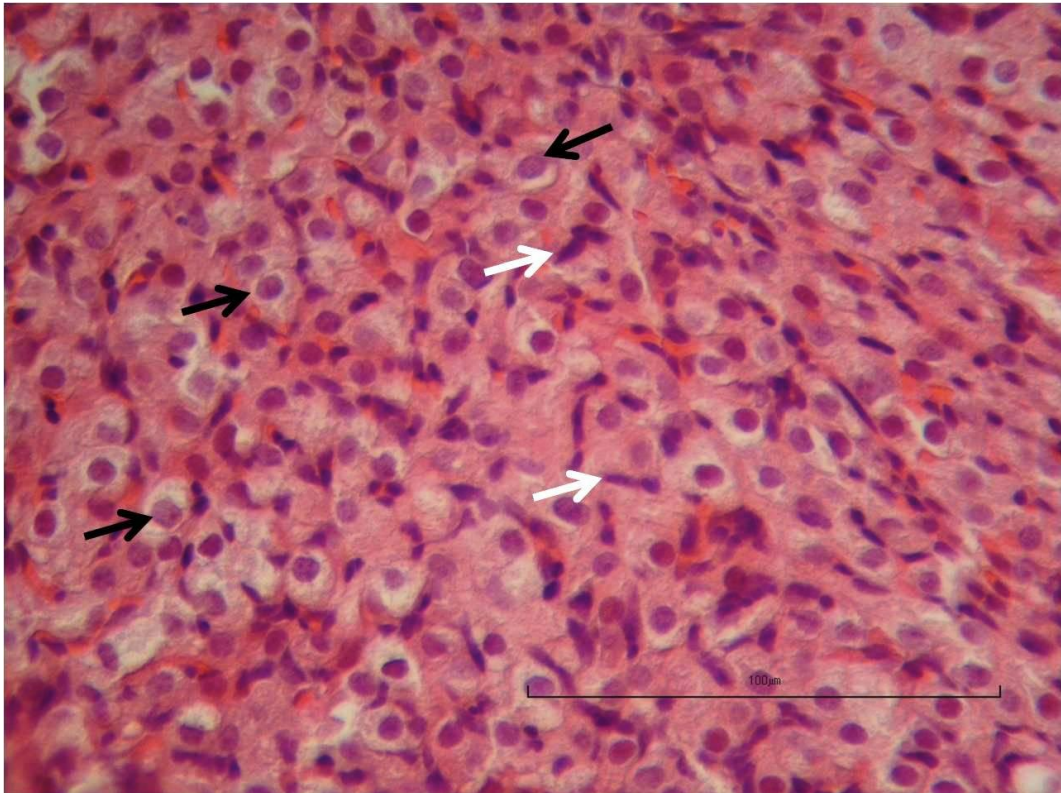
Şekil 4.53: TCDD +Mel grubu; Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 1000 $\mu$ m



Şekil 4.54: Korpus luteum (dört nokta yıldız), germinatif epitel (ok). (HE), Ölçü cetveli = 100 $\mu$ m

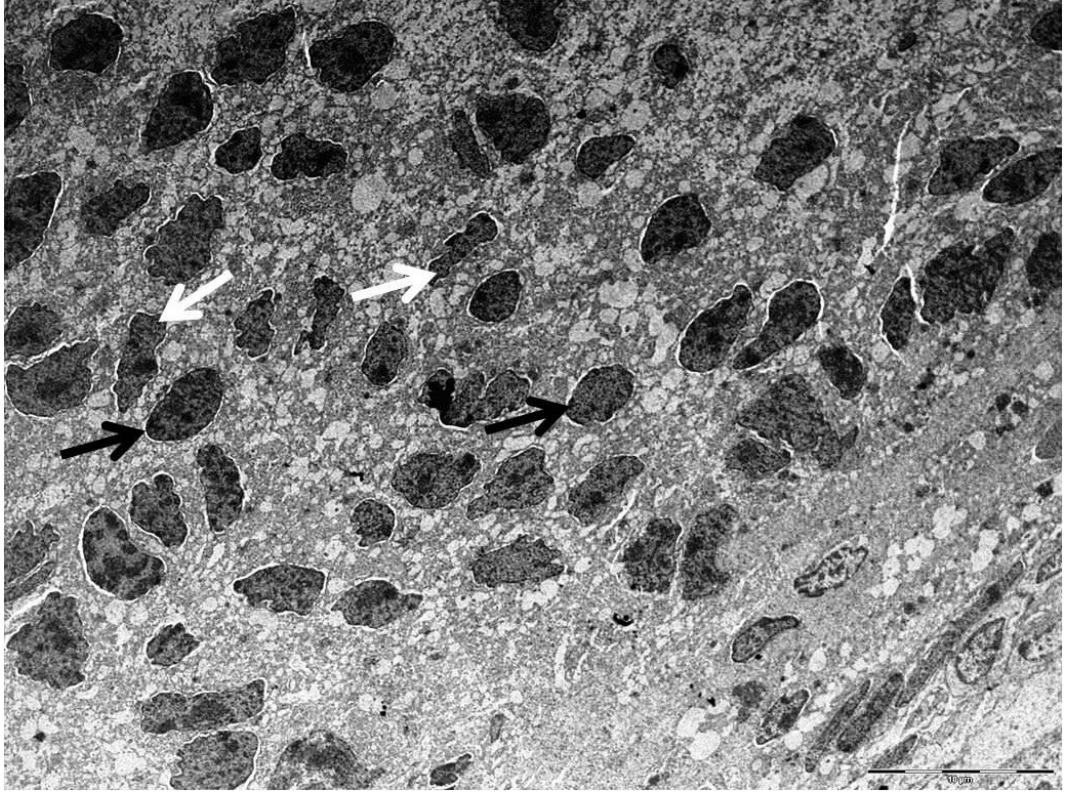


Şekil 4.55: TCDD + Mel grubu; Over folikülü (beş nokta yıldız), korpus luteum (dört nokta yıldız). (HE), Ölçü cetveli = 100µm

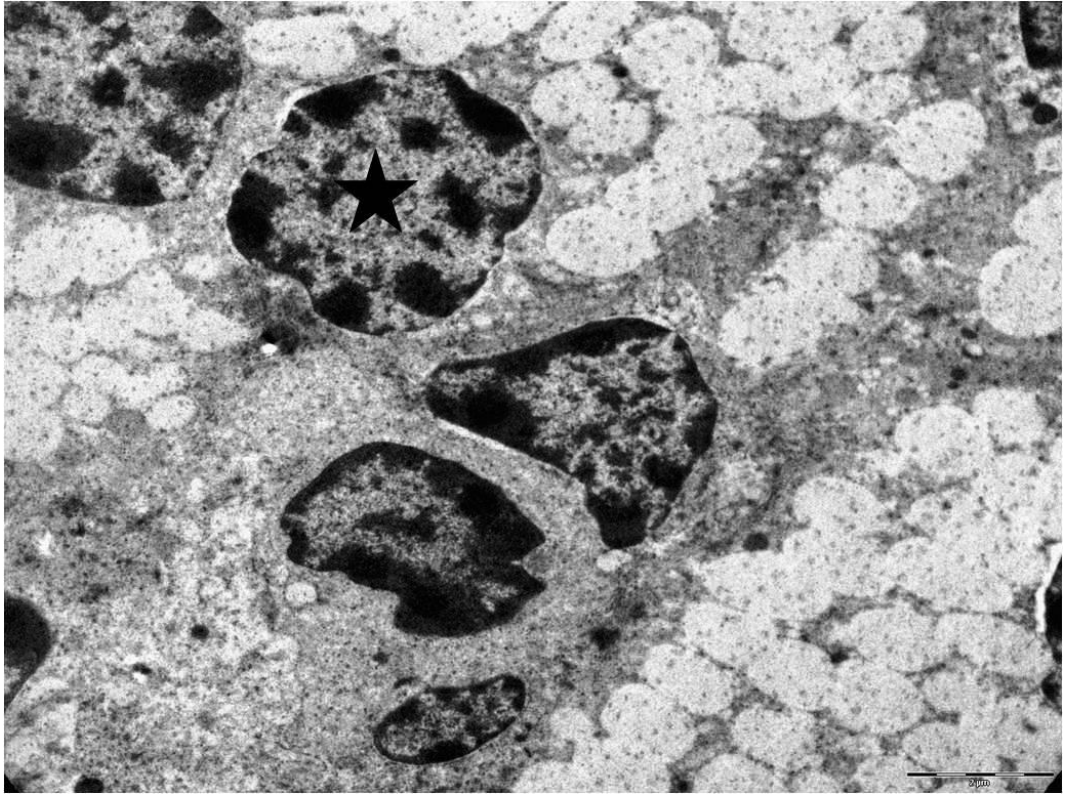


Şekil 4.56: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücre (beyaz ok). (HE), Ölçü cetveli = 100µm

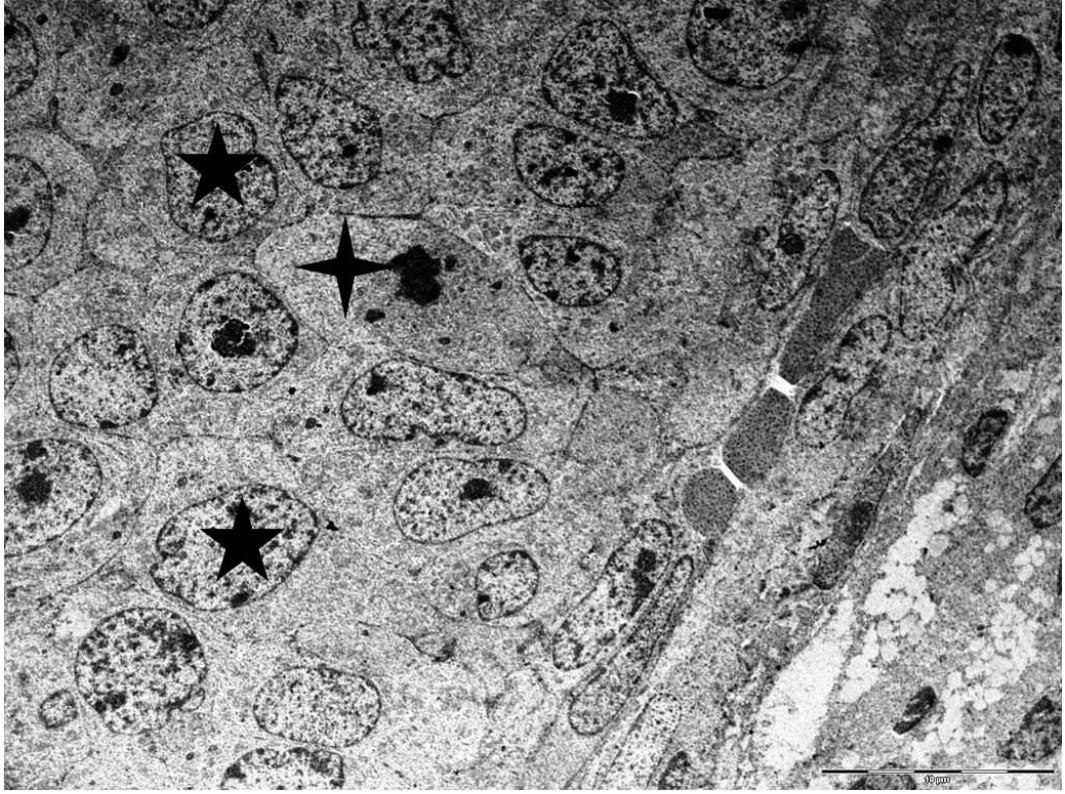




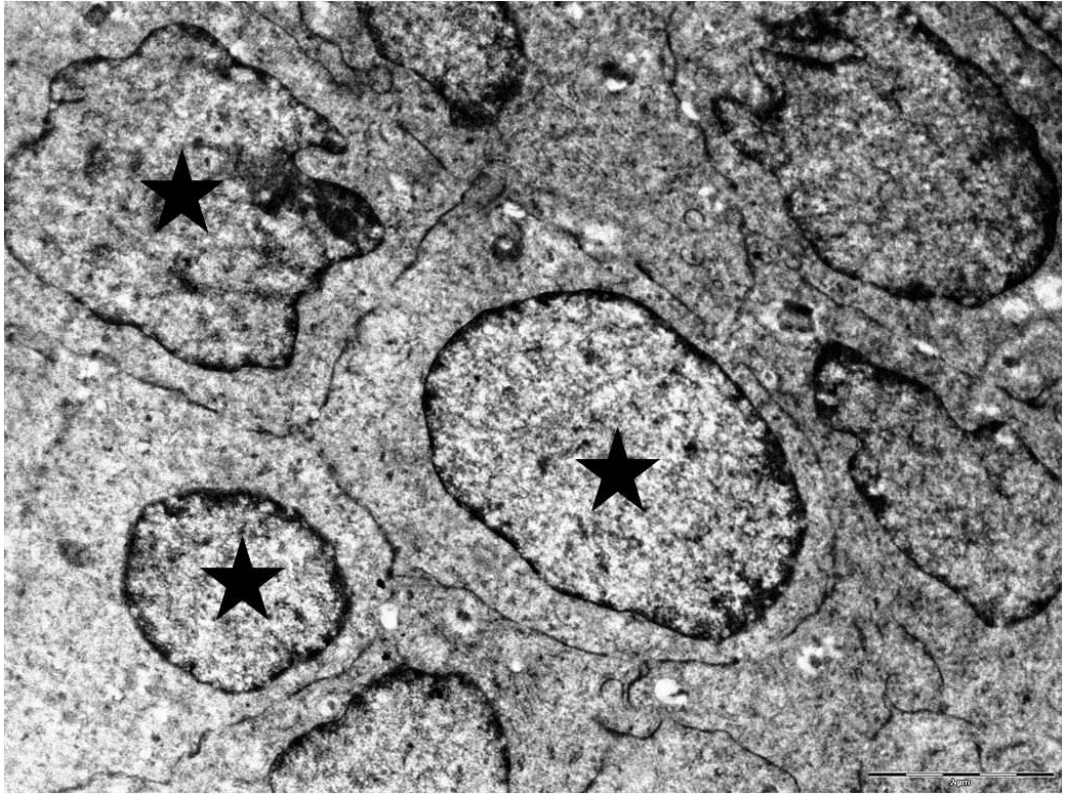
Şekil 4.57: Granuloza lutein hücre (siyah ok), teka lutein hücreleri (beyaz ok). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.5816: Granuloza lutein hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



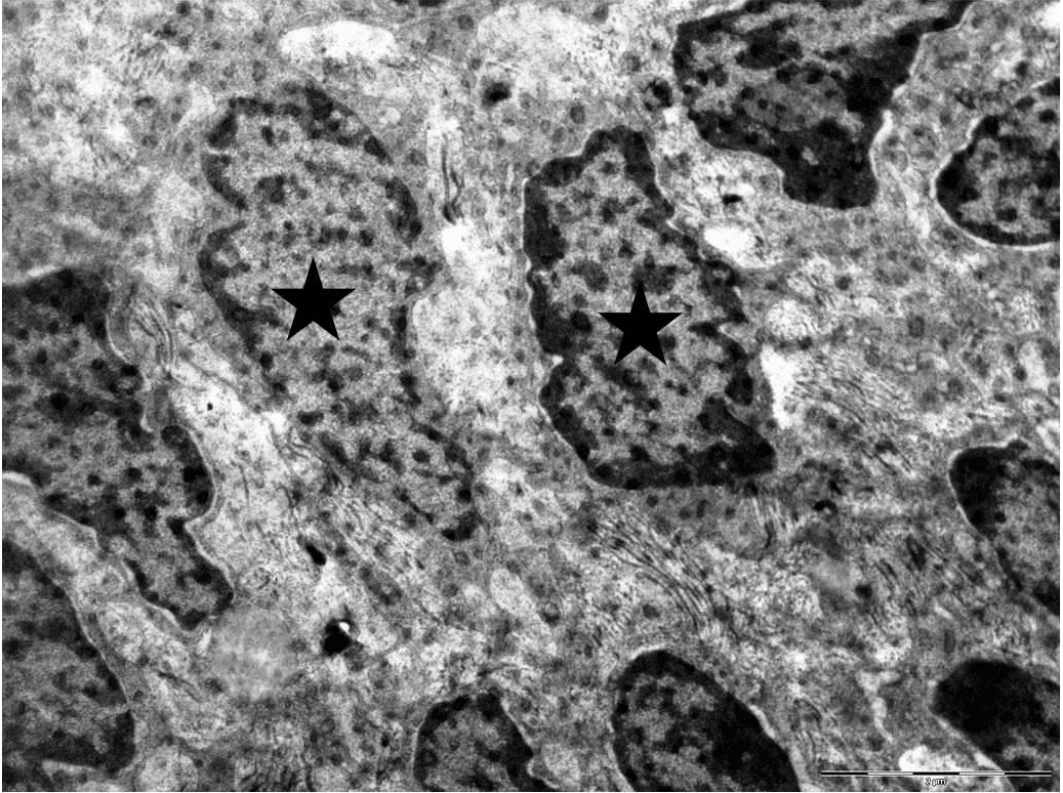
Şekil 4.59: Granuloza hücresi (beş nokta yıldız), mitoz figürü (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



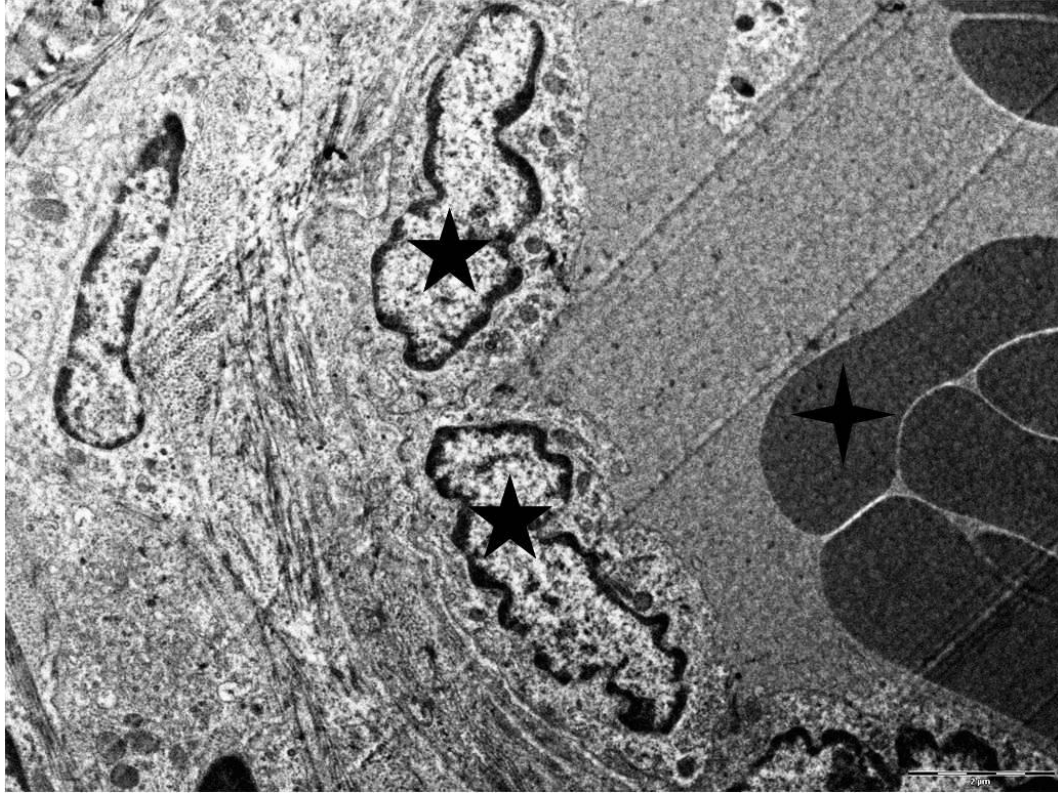
Şekil 4.60: Granuloza hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm



Şekil 4.61: Düz kas hücresi (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.62: Ovaryum stromal hücre (yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2 $\mu$ m



Şekil 4.63: Endotel hücresi (beş nokta yıldız), eritrosit (dört nokta yıldız). (TEM), Ölçü cetveli = 2µm

#### 4.4. Ovaryum dokuları folikül ve korpus luteum sayıları

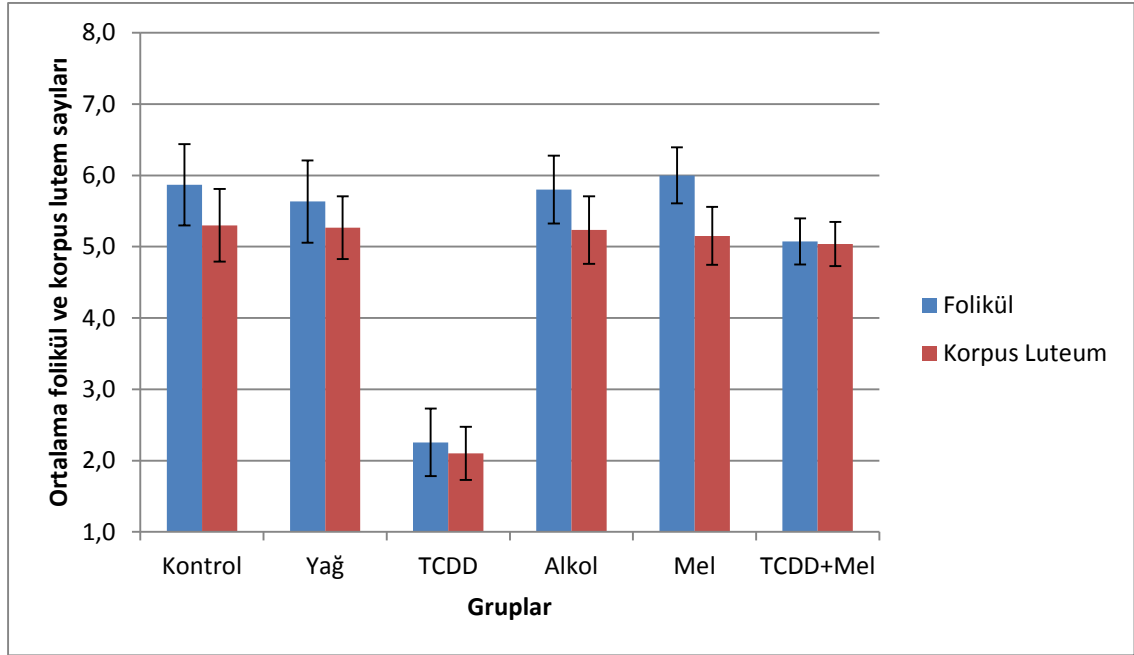
Tablo 4.5: Ovaryum dokuları gruplar arası ortalama folikül ve korpus luteum sayıları

Gruplar	Folikül	Korpus Luteum
Kontrol	5,9	5,3
Yağ	5,6	5,3
TCDD	2,3	2,1
Alkol	5,8	5,2
Mel	6,0	5,2
TCDD+Mel	5,1	5,0

Primordiyal folikül evresi sonrası folikül sayısı açısından, TCDD grubu kontrol, yağ, alkol, mel ve TCDD + mel gruplarına göre  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklılık göstermektedir (Tablo 4.5, Şekil 4.63).

Korpus luteum sayıları karşılaştırıldığında da TCDD grubu kontrol, yağ, alkol, mel ve TCDD + mel gruplarına göre  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

**Şekil 4.64: Ovaryum dokuları primordiyal evresi sonrası folikül ve korpus luteum sayısı karşılaştırması**



**Şekil 4.64: Gruplar arası primordiyal evresi sonrası folikül ve korpus luteum sayısı karşılaştırması.**

#### 4.5. Biyokimyasal bulgular ve istatistiksel analiz

**Tablo 4.6: İstatistiksel Analiz**

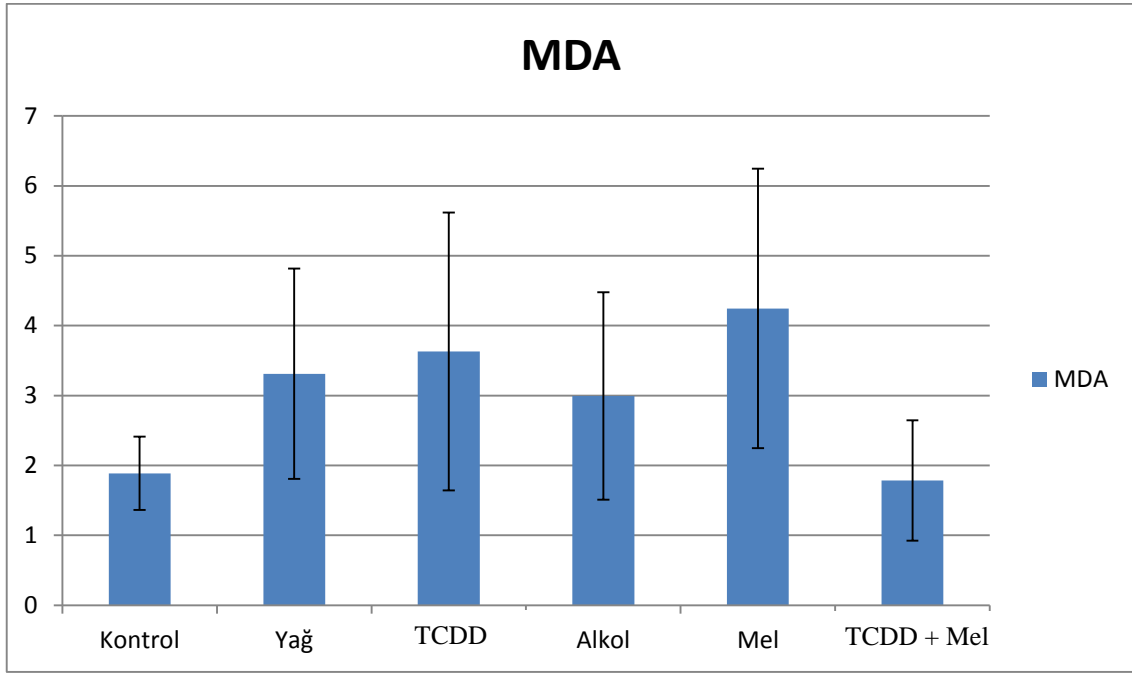
Grup	SOD	GSH	MDA	TAS	TOS	OSI
1	0.209 (0.047-1.023)	1.890 <sup>(a,c,d)</sup> (0.8-2.93)	1.991 <sup>(a,b,d)</sup> (1.149-2.987)	3.225 (2.39-13.02)	51.010 (27.85-214.05)	12.250 <sup>(c)</sup> (6.510-18.270)
2	0.156 (0.077- 0.873)	1.005 <sup>(b,e)</sup> (0.56-1.7)	2.638 <sup>(e)</sup> (2.024-6.128)	4.090 (1.5-7.21)	41.570 (19.12-252.32)	10.143 <sup>(c)</sup> (6.724-14.36)
3	0.181 (0.053- 0.558)	2.880 <sup>(c,d,e)</sup> (1.52-4.7)	3.115 <sup>(e)</sup> (1.368-7.717)	5.000 (2.53-11.031)	58.490 (32.63-111.9)	11.774 (9.568-15.068)
4	0.187 (0.015- 0.478)	1.160 (0.54-5.2)	2.519 (0.925-4.832)	7.100 (2.51-14.7)	61.355 (22.58-130.06)	8.570 (5.744-12.231)
5	0.208 (0.101- 0.521)	1.160 (0.39-4.23)	3.993 <sup>(e)</sup> (1.228-7.246)	6.970 (3.81-13.8)	68.890 (34.97-127.83)	9.681 (8.232-13.203)
6	0.339 (0.081- 0.808)	1.430 (0.74-5.6)	1.781 (0.411-2.987)	4.750 (1.73-20.02)	59.140 (16.25-174.42)	9.744 (8.021-14.177)
P değeri	0.192	0.001	0.003	0.105	0.455	0.031

Tablo 4.6: Grup 1; Kontrol, Grup 2; Yağ, Grup 3; TCDD, Grup 4; Alkol, Grup 5; Mel, Grup 6; TCDD + Mel.

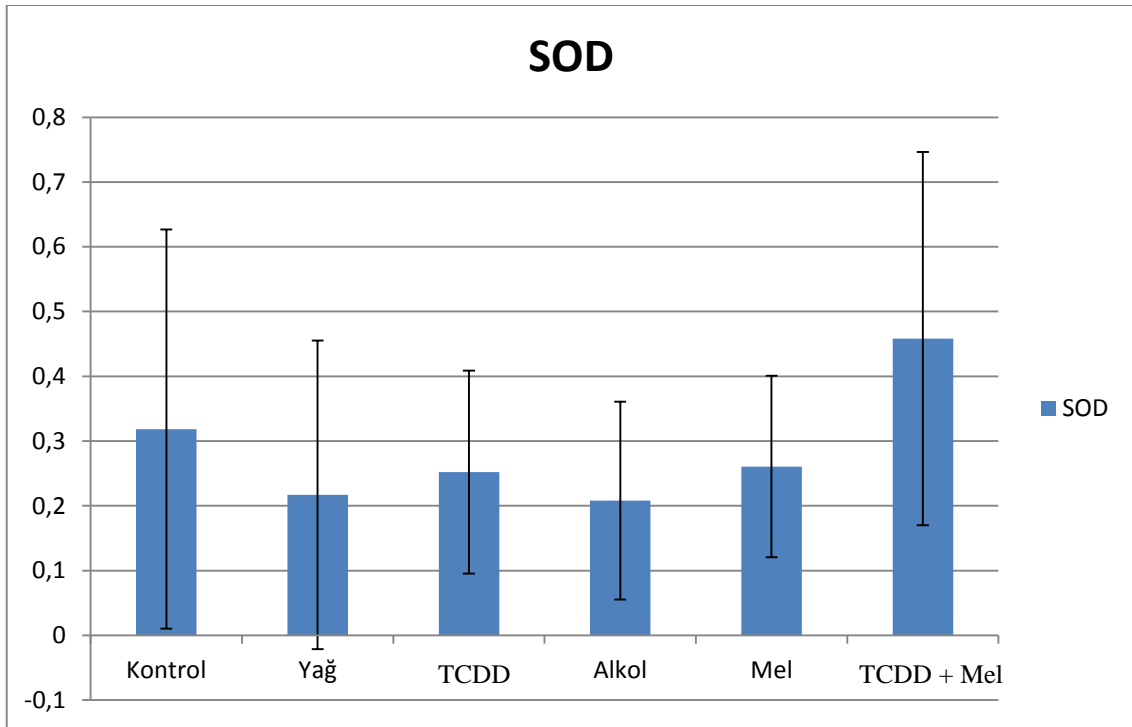
a: 2'e göre farklıdır; b: 3' ye göre farklıdır; c: 4'e göre farklıdır; d: 5'e göre farklıdır;

e: 6'ya göre farklıdır.

Şekil 4.65: Ovaryum Dokuları MDA Seviyesi

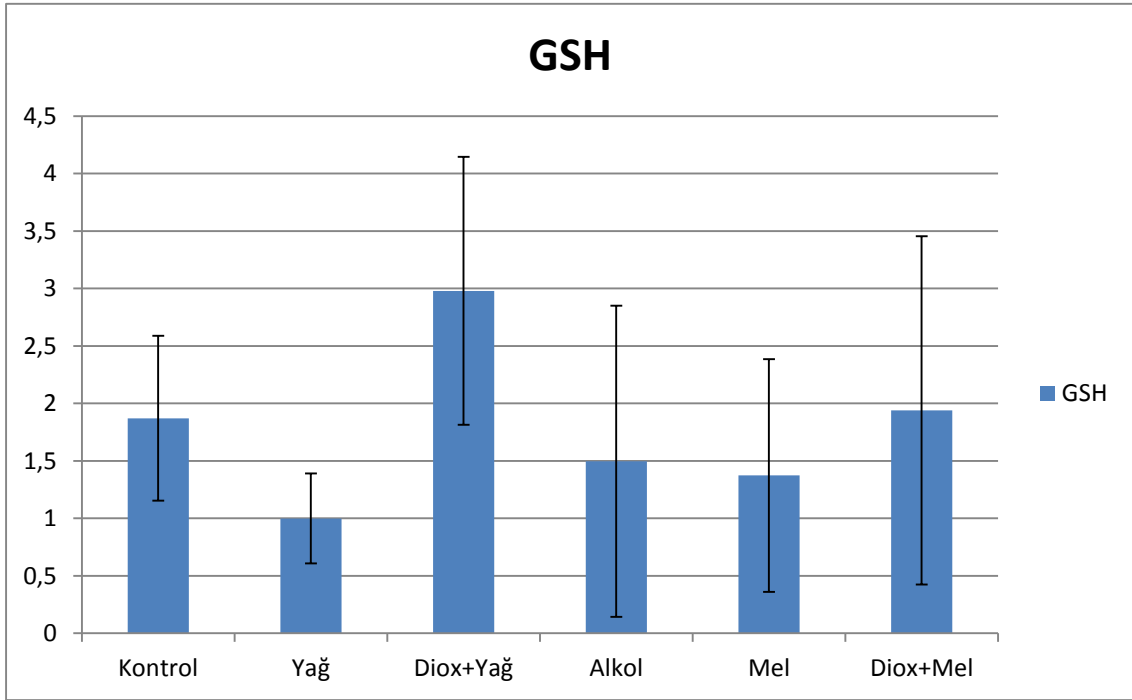


Şekil 4.66: Ovaryum Dokuları SOD Aktiviteleri

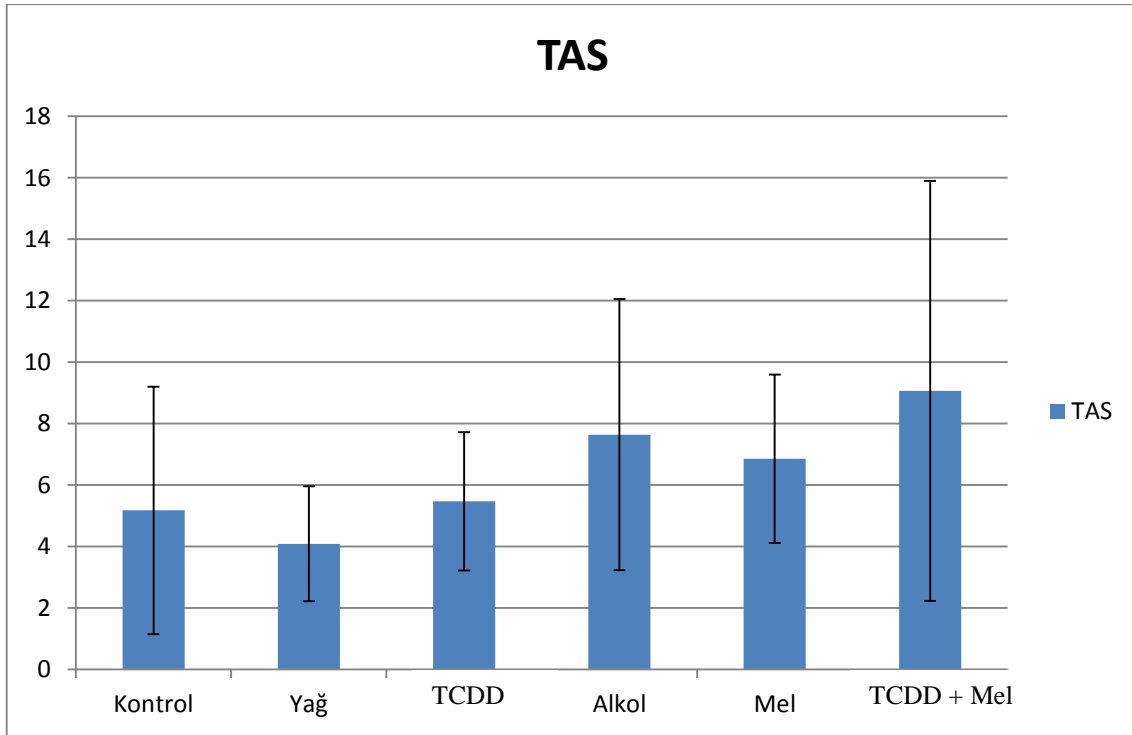


Şekil 4.67: Ovaryum Dokuları TCDD zeyleri

TCDD + Mel

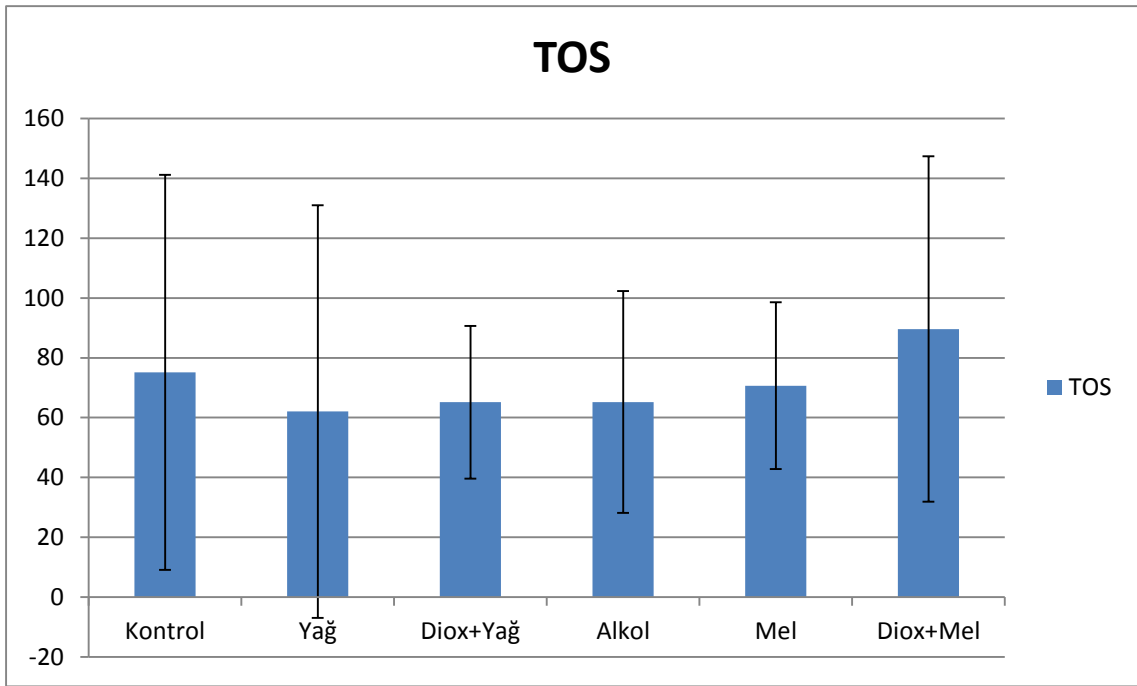


Şekil 4.68: Ovaryum Dokuları TAS Değerleri

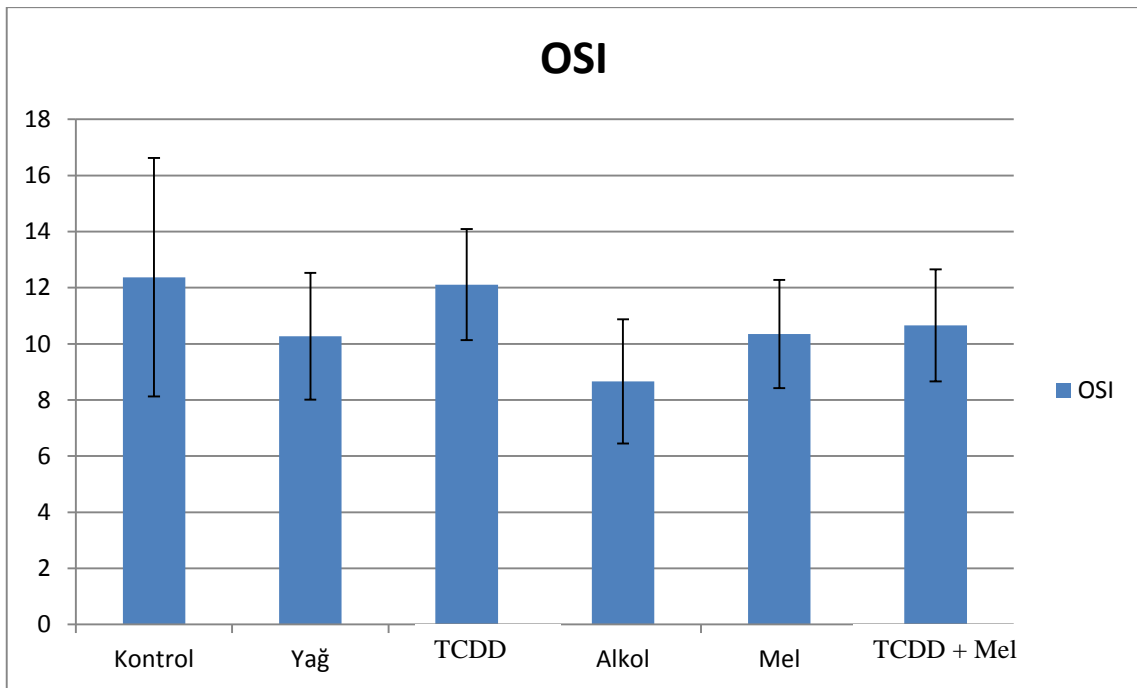


TCDD  
Şekil 4.69: Ovaryum Dokuları OSI Değerleri

TCDD + Mel



Şekil 4.70: Ovaryum Dokuları OSI Değerleri





## 5. TARTIŞMA

Son yüz yılda gelişen sanayi ile birlikte, çevreye salınan ve ekosistemde biriken toksik maddelerde yüksek oranlarda artış gözlenmektedir. Bu toksik maddelerin başında da dioksin türevleri gelmektedir. Canlılar üzerinde ciddi olumsuz etkileri olan bu dioksinler içerisinde en fazla toksik etkiye sahip olan TCDD'dir (38,39). TCDD besin zincirine girerek, insanlar da dâhil olmak üzere yeryüzündeki hemen her canlıyı etkilemektedir. TCDD'nin insanlar üzerinde başta immün sistemi baskılayıcı, endokrin sistemi bozucu, nörotoksik, kanserojenik, teratojenik etkilerinin yanı sıra tüm doku ve organlarda hasarlayıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (1, 9, 10, 11, 12).

TCDD ve dioksin benzeri toksik maddelerin özellikle endokrin sistemi ve ovaryum steroidogenezini etkileyerek hem erkek hem de dişilerde üreme sistemi organlarında ciddi hasarlar oluşturduğu gösterilmiştir. Kadınlarda özellikle infertilitenin yanı sıra meme ve endometriyum kanserlerine sebep oldukları bilinmektedir (16, 17)

TCDD, hücre içerisinde AhR reseptörü üzerinden etki göstererek bazı genlerin ekspresyonunu baskılayarak, bazı genlerin ekspresyonunu artırıp, hücrenin normal fonksiyonlarını etkiler. Ayrıca hücrelerde oksidatif strese neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (57). Bunların yanı sıra TCDD'nin serum melatonin düzeyini de önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir (18). Memelilerde primer olarak pineal bezden salgılanan ve hormonal fonksiyon gösteren melatonin tıbbi olarak birçok hasatalığın tedavisinde teröpatik bir ajan olarak da çalışılan, kuvvetli bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü bir moleküldür (81,98).

Çalışmamızda kronik TCDD maruziyetinin dişi sıçan ovaryum dokusunda oluşturduğu doku ve hücre hasarına ile oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkileri incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda TCDD veya diğer dioksin grubu toksinlerin doz ve maruziyet süresine bağlı olarak canlıların vücut ağırlıklarında önemli ölçüde azalmaya neden oldukları gösterilmiştir (133). Wasting Sendromu olarak tanımlanan bu durumda kilo kayıpları ölüme kadar ilerleyebilir ve ölüm anında yaklaşık %50 oranında ağırlık kayıpları söz konusu olabilir. Ancak bu kilo kayıplarının ve ölümlerin nedeni olarak sadece gıda ve su alımının azalması değil, aynı zamanda sindirim kanalından gıdaların emiliminin de bozulması ve diğer birçok faktörün de etkili olabileceği düşünülmektedir (134).

Xuelin Li ve ark. üreme evresindeki sıçanlara tek doz 10 µg/kg TCDD uygulayarak yaptıkları çalışmada TCDD uygulanan gruptaki sıçanların ağırlıkları artışında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede azalma olduğunu göstermişlerdir (133). Wolf ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada da, gebelik aşamasındaki hamstirlara tek doz olarak 2 µg/kg TCDD uygulanmış ve gebelik sonrası yavru hamstirların ağırlık değişimleri haftalık olarak ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre, kontrol gruplarına göre TCDD uygulanan gruptaki deneklerin ağırlık artışlarının %25-30 daha az olduğu gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada deneklerin yaşları ilerledikçe kontrol grubu ile TCDD grupları arasındaki ağırlık farkının giderek arttığı gösterilmiştir (135). Audrey M. ve ekibi tarafından TCDD ve endometriozis üzerine yaptıkları çalışmada, 3 µg/kg, ve 10 µg/kg TCDD uygulanan gruplarda sıçanların ağırlıklarının 2 ila 12 haftalık ağırlık ölçümlerine göre, kontrol gruplarına göre TCDD uygulanan gruptaki deneklerin ağırlık artışlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma kaydetmişlerdir. Ayrıca kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µg/kg dozunda TCDD uygulanan grupta, 3 µg/kg dozunda TCDD uygulanan gruba göre ağırlık artışı azalışının daha fazla olduğu gösterilmiştir (136). Yapılan bu çalışmalar ve literatür bilgileri, TCDD'nin vücut ağırlığı kaybına neden olduğu veya ağırlık artışında azaltıcı yönde etkisi olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada literatür bilgileri ile uyumlu olarak TCDD uygulanan gruptaki sıçanların ağırlık artışlarında zamanla azalma gözlenmiştir. Haftalık 1 µg/kg TCDD uygulanan gruplarda ve diğer tüm kontrol gruplarında 10. haftaya kadar hayvan ağırlıklarındaki artış düzenli olarak artmaktadır. Onuncu haftadan itibaren, TCDD + yağ ve TCDD + mel gruplarındaki sıçanların ağırlıklarında sabitleme ve sonrasında 15. haftaya kadar azalma gözlenmiştir (Tablo 4.1). Birinci ile 15. hafta arasındaki ağırlık artışı farkları TCDD (17,7 g) ve TCDD + mel (19,6 g) uygulanan gruplarda, kontrol (40 g), yağ (51 g), alkol (34,9 g) ve melatonin (42,2 g) uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. TCDD + mel grubunda ise TCDD uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da daha fazla ağırlık artışı olduğu gözlenmiştir. (Tablo 4.3) (Şekil 4.2). Gruplar arası ağırlık artışı incelendiğinde kontrol, yağ, alkol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle birlikte ağırlık artışında kuvvetli bir korelasyon izlenmiştir. TCDD ve TCDD + mel grupları ile kontrol, yağ, alkol ve melatonin grupları arasında az da olsa korelasyon katsayısının düştüğü gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Yapılan çalışmalarda TCDD maruziyetine karşı, uygulanan doz miktarına bağlı olarak ağırlık kaybı veya ağırlık artışındaki azalışın iki nedenden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Birincil olarak, TCDD veya diğer dioksin türevlerinin canlılarda metabolizmayı etkileyerek, alınan besinlerin gastrointestinal emilimini azaltmaktadır. İkinci görüş ise 'Wasting Sendrom' denilen, TCDD ve diğer dioksinlerin canlılarda iştahsızlığa neden olup daha az besin alımına neden olduğu olduğu görüşüdür. Yapılan çalışmalar ikinci görüşün daha doğru olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmanın da TCDD'nin merkezi sinir sistemi, özellikle de hipotalamus üzerine etki ederek iştahsızlığa ve sonuç olarak da daha az besin tüketimine neden olması olarak belirtilmektedir (137).

Çalışmamız sonucunda TCDD nin sıçanlarda ağırlık artışını yavaşlattığı ve kilo kaybına neden olduğu kesin olarak gözlenmiştir. Ancak bu ağırlık artışı azalması ve kilo kaybının, besinlerin gastrointestinal emiliminin yavaşlamasından mı yoksa sıçanların besin alımının azalmasından mı olduğu metabolik kafes kullanılmadığından belirlenememiştir.

Reaktif oksijen türevleri bazı metabolik yollarda ortaya çıkmakla birlikte çevresel toksinlere yanıt olarak da aşırı düzeyde üretilir. Aşırı miktarlarda oluşmaları sonucunda organizmadaki oksidan/antioksidan sistem dengesinin oksidatif stres yönünde bozulmasına neden olur. Yapılan çalışmalar TCDD'nin bazı doku ve organlarda serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını aşırı dercede arttırarak oksidatif stres hasarına neden olduğunu göstermektedir. Aril hidrokarbon (AHR) ligandı olan TCDD ve diğer polihalojen aromatik hidrokarbonlar doğrudan mutajen değildirler, ancak mutajenik etkilerini oksidatif stres üzerinden ve karsojenik etkileriyle gösterirler. Oksidatif stres, dioksin ve türevlerinin toksisitesi için bir marker olarak kullanılmaktadır (61). Toksik maddelerin maruziyetlerinden sonraki süreç dokuların hasarında oldukça önemlidir. Bu süreçte özellikle serbest oksijen radikalleri ve artmış hidrojen peroksit gibi yapılar ile birlikte profibrojenik yapıları bazı mediatörler de hasarın artmasına neden olur. Bu açıdan hücrel oksijenaz, NADPH oksidaz veya hücrel antioksidanların miktarını ve aktivitelerini arttırmak yoluyla veya antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile oksidatif hasarın engellenmesi gerekmektedir (138). Bu nedenle, dokulardaki toksik hasarı önleme ve düzeltme açısından antioksidan özelliklere sahip melatonin gibi mediatörlerin kullanılması önemlidir. Yaptığımız çalışmada da ovaryumda TCDD maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkabilecek oksidatif strese ve bunun neticesinde de oluşabilecek hasarlarına karşı kuvvetli bir antioksidan olan melatonin kullanılmıştır. Çalışmamızda,

oksidatif stres ve antioksidan parametreleri olarak SOD, GSH, MDA, TAS, TOS ve OSI değerleri ölçülmüştür.

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunu göstermek için en çok kullanılan indikatörlerden birisidir. MDA  $CH_2(CHO)_2$  moleküler formüllü organik bir bileşiktir ve doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu sonucu oluşur (139). Reaktif oksijen türevleri doymamış yağları parçalayarak malondialdehiti oluşturur. Bu molekül reaktif bir aldehit olduğundan hücre içinde toksik strese neden olur. Aldehit molekülünün oluşumu organizmada oksidatif stres seviyesini ölçmek için bir biyomarkır olarak kullanılır (139, 140). Malondialdehit ve diğer tiobarbiturik reaktif maddeler (TBARS) yoğunlaşarak kırmızı florasan renk verdiklerinden spektrofotometrik olarak ölçölüp, hücre hasarı üzerine bilgi verirler (141, 142).

Yapılan çalışmalarda TCDD'nin doku homejenatlarında MDA seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (143). Literatürde TCDD maruziyeti sonrasında ovaryum dokusunda MDA seviyesine dair çalışma bulunmamakla birlikte, diğer doku ve organlarda TCDD'nin belirgin bir şekilde MDA seviyesini arttırdığını gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Kalp ve damar dokuları üzerinde TCDD'nin oksidatif stres etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada TCDD uygulamasının kalp ve damar dokularında MDA seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdığı saptanmıştır. Aynı çalışmada TCDD'nin hem kalp hem de damar dokularında SOD ve GSH aktivitelerini kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşürdüğü gösterilmiştir (143, 154).

Karaciğer üzerine yapılan bir çalışmada da, TCDD uygulaması sonucu karaciğer SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve GSH düzeylerinde önemli düzeyde azalma gözlenirken, MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar gözlenmiştir. Diğer birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da deneklere antioksidan etkili moleküllerin uygulanması ile genel olarak MDA seviyesinin azaldığı; SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve GSH düzeylerinin ise arttığı gösterilmiştir (143).

Yapılan diğer bir çalışmada, TCDD uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında, uygulanan TCDD dozlarıyla orantılı olarak SOD aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, GSH-Px aktivitelerinde TCDD uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı azalmalar olduğu tespit edilmiştir (103). Genel olarak literatürde, dokularda artmış lipid peroksidasyonu belirteci olan MDA oluşumunu engellemek veya seviyesini düşürmek için birçok antioksidan molekül etkili olduğu bildirilmiştir (103, 143).

Çalışmamızda TCDD uygulanan sıçanların ovarium dokularındaki MDA seviyelerinin değişimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre TCDD grubunda MDA seviyesi kontrol, yağ ve alkol gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da artmıştır. TCDD + mel grubuyla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. TCDD uygulaması yapılmayan yağ, alkol ve melatonin gruplarındaki MDA seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum beklenmeyen bir sonuç olarak görülse de bu gruplardaki sıçanlara deney süresince periyodik olarak enjeksiyon işlemi uygulanmış, kontrol grubundaki sıçanlara ise deney süresince herhangi bir girişim yapılmamıştır. Bu gruplardaki MDA seviyesinin kontrol grubundaki MDA seviyesinden yüksek olmasının sık ve uzun peryotta enjeksiyon işlemine bağlı travma ve stres olabileceğini düşünmekteyiz. Konu ile ilgili çalışmaların çoğunda yalnızca yağ, alkol ve melatonin grupları oluşturulmamış olduğundan bu noktada bir kıyaslama yapılamamıştır. TCDD + mel grubunun MDA seviyesi yağ, alkol, melatonin ve TCDD gruplarındaki MDA seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Kontrol grubu MDA seviyesi ile TCDD + mel grubu MDA seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.6, Şekil 4.64).

Yapılan bu çalışma ile TCDD'nin sıçanların ovariumları üzerinde oksidatif stres ile hücre hasara sebep olarak MDA seviyelerini arttırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte, melatoninin ise TCDD maruziyetine bağlı olarak yükselen MDA seviyesini etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlara ve literatür bilgilerine göre TCDD'nin hücrelerde oksidan/antioksidan dengesini oksidanlar yönünde artırarak toksik strese neden olduğu bilinmektedir (59, 60). Melatonin gibi antioksidan moleküllerin ise bu dengeyi antioksidanlar lehine artırarak toksik etkiyi ve lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmektedir (59, 60, 73). Çalışmamızda TOS değeri en yüksek TCDD + mel grubunda ölçülmüştür. Her ne kadar TOS değerinin en yüksek TCDD grubunda olması beklense de, uzun süreli TCDD uygulaması hücre membran sistemlerinde oluşabilecek lipid peroksidasyonu kapasitesinin azalmasına neden olmuş olabilir. TCDD + mel grubunda TOS değerinin en yüksek olması melatoninin hücre membran sistemleri üzerine koruyucu etkisi sayesinde membranların oksidan sistem oluşturma potansiyelinin yüksek olmasına bağlanabilir. Gruplar arasında ölçülen SOD aktivitesi en yüksek TCDD + mel grubunda belirlenmiştir. Bu grupta TCDD'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı melatoninin hücre membranların korunmasını desteklediği ve SOD aktivitesinde artış sağladığına işaret etmektedir. Ayrıca

en yüksek GSH seviyesinin TCDD grubunda görülmesi, GSH'in dokularda ve tüm hücrelerde membran ve sitoplazmik yapılarda en yüksek düzeyde sentezlenip salgılanan antioksidan molekül olması ve oluşan oksidatif strese karşı GSH seviyesinin yükselmesi şeklinde yorumlanabilir. Bu karşın TAS seviyesi en yüksek TCDD + mel grubunda belirlenmiştir. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. Glutatyonun organizmada bol miktarda bulunması oluşacak bir oksidatif stres hasarına karşı yüksek seviyede GSH oluşumuna neden olur (144). Çalışmamızda gruplar arasındaki GSH seviyesi en yüksek TCDD grubunda belirlenmiştir. TCDD + mel grubunda GSH seviyesi kontrol grubundakine yakın değerinde bulunmuştur. Bu durum melatoninin lipid peroksidasyonunu engelleyici ve serbest radikal süpürücü etkisine bağlı olarak azalmış oksidatif hasarla birlikte GSH oluşumunun azalması şeklinde yorumlanabilir. Dolayısı ile melatonin TCDD'nin oluşturduğu toksik ve oksidatif stres hasarına sekonder olarak total antioksidan sistemi güçlendirmektedir. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, yaptığımız çalışmada TCDD maruziyeti sonucu ortaya çıkan toksik hasar ve oksidatif stresle birlikte oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulduğu ve butoksik etkiye karşı melatonin uygulamasının oksidan/antioksidan dengesini antioksidanlar lehine tekrar kurarak lipid peroksidasyonunu azalttığı sonucuna varılmıştır.

Ovaryum, organ ve doku olarak fonksiyonel ve yapısal değişimler açısından bir çok organa göre çok daha dinamiktir. Endokrin sistem ve sinir sistemi kontrolü altında periyodik değişimlere maruz kalır. Bu periyodik değişim sürecinde ovaryum içerisinde folikül gelişimi ve korpus luteum gelişimi gibi oldukça hassas yapılar gelişir (24). Ovaryumun bu aktif ve dinamik yapısı organı ve oluşturduğu yapıları çevresel toksik etkilere karşı çok daha hasas kılar. TCDD diğer birçok doku ve organ için olduğu gibi özellikle ovaryum üzerine oldukça hasarlayıcı etkiye sahip çevresel bir toksik maddedir (67, 68, 69). Çalışmamızda TCDD'nin ovaryum üzerine hasarlayıcı etkileri ışık ve elektron mikroskopik olarak da incelenmiştir.

Yapılan çalışmaların birçoğunda TCDD çözücüsü olarak uygulanan yağ, melatonin çözücüsü olarak uygulanan %5 etanol ve terapötik dozlarda yalnızca melatonin uygulanan sıçanların ovaryumlarında histolojik ve ultrastrüktürel olarak herhangi bir patolojik bulgu bildirilmemiştir (68, 69, 143).

Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak kontrol, yağ, alkol ve melatonin gruplarındaki sıçanlara ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde

ovaryum dokuları normal histolojik yapıda görüldü. Bu gruplardaki ovaryum kesitlerinde ovaryum germinatif epiteli basit tek katlı kübik epitel olarak görüldü. Bu epitel tipi literatürde bildirildiği şekilde genç dişi sıçan ovaryumu germinatif epiteli ile uyumludur. Ovaryum kesitlerinde korteks medulla bölgeleri açıkça ayırt edilebilmekteydi. Korteks içerisinde parankimin büyük kısmını kaplayacak şekilde çok sayıda farklı gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapıları normal histolojik yapıda görülmüştür. Korteks bölgesinde ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapıları dışındaki alanlarda çok sayıda primordial folikül izlenmiştir. Ovaryum medulla bölgesi ise çok sayıda vasküler yapılar stromal bağ dokusu yapısında olup normal histolojik görünümde değerlendirilmiştir.

Farklı dozlarda ve sürelerde TCDD uygulamasının ovaryumlarda folikül gelişimini ve hormonal salgılamayı olumsuz etkilediği bildirilmektedir (67, 68, 69). Xuelin Lia ve ark yapmış oldukları bir çalışmada günlük 1 µg/kg/gün TCDD uygulanan sıçanların ovaryumlarında belirgin hasar bulgularına rastlanmıştır. Bu çalışmada TCDD'nin ovaryan siklusu bozduğu ve özellikle primordial sonrası folikül sayısını azalttığı bildirilmektedir. Ayrıca gonodotropinlerin salgılanmasında yetersizliğe sebep olmaktadır (133). Katherine F. Roby tarafından yapılan bir çalışmada immatür sıçanlara gonodotrofin indüklü folikül gelişiminden önce TCDD uygulanarak folikül gelişimi ve sayıları gözlenmiştir. Çalışma sonunda TCDD uygulanan grupta sekiz sıçandan dördünde ovulasyon bulgusuna rastlanmazken, üç sıçanda birer yumurta, bir sıçanda ise iki yumurta ovulasyonu tespit edilmiştir. Bu sayılar kontrol ve yağ grubundaki ovulasyon sayısından oldukça düşüktür (145).Ira Heimler ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmanın sonuçlarına göre TCDD'nin, diğer çalışmalarda olduğu gibi geniş hacimli folükül sayısında istatistiksel olarak anlamlı derece azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (146).

Çalışmamızda TCDD uygulanan gruptaki ovaryum kesitlerinde primordial folikül evresinden daha ileri evrelerdeki folikül sayısında azalma tespit edilmiştir. Buna rağmen primordial folikül yoğunluğunda belirgin bir azalma farkedilmemiştir. Bu durum TCDD'nin ovaryum parankiminde mevcut primordial foliküllerin dejenerasyonundan ziyade gonodotropinlerin yetersiz salgılanmasına bağlı olarak folikülogenezisi baskılamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle TCDD granuloza hücreleri, teka hücreleri ve korpus luteum hücrelerinin endokrin foksiyonlarını bozuyor olabilir. Benzer şekilde Katherine F. Roby TCDD'nin anti-östrojenik etkiyle, foliküler gelişimin kritik aşamalarında kesintiye neden olduğunu ve normal folikül gelişimini engelleyerek olgun folikül oluşumunu ve ovulasyonu engellediğini belirtilmektedir (145). Çalışmamızın

kontrol, yağ, alkol ve melatonin ve TCDD + Melatonin gruplarındaki sıçanlara ait ovaryum kesitlerinde primordial sonrası folikül sayıları ve korpus luteum sayıları benzerken TCDD grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti.

Literatürdeki TCDD'nin ovaryum üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar hemen hemen tamamıyla ovaryum folikül gelişimi üzerine odaklanmış durumdadır. Ancak TCDD'nin ovaryum dokusunda folikül gelişimi ve yapısını etkilememenin yanında, korpus luteum, stromal hücreler, vasküler yapılar ve düz kas hücrelerini de hasarlaması kaçınılmazdır. Işık mikroskopik incelemede TCDD grubunda granuloza hücre organizasyonunda bozulma, korpus luteum hücrelerinde yaygın şekilde piknotik nükleus, vakuolizasyon ve korpus luteum parankiminde fokal inflamasyon odakları izlenmiştir. Kontrol, yağ, alkol ve melatonin gruplarında bu yapılar normal olarak değerlendirilmiştir. TCDD + Melatonin grubunda ise TCDD grubunda gözlenen hasar bulgularının yer yer minimal düzeyde izlenmiş olup genel görünüm normale yakın olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre melatoninin ovaryum histolojik yapısını TCDD hasarına karşı etkin şekilde koruduğu düşünülmektedir. Melatonin bu koruyucu etkisini bilinen endokrin sistem düzenleyici, sitoprotektif, antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliği (86) sayesinde gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

Ovaryum dokusunda TCDD'ye bağlı oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ultrastrüktürel düzeyde hücre ve doku bileşenlerinde daha çarpıcı bir şekilde görülmektedir. Kontrol, yağ, alkol ve melatonin gruplarına ait ovaryum kesitlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde granuloza hücreleri, korpus luteum granuloza lutein ve teka lutein hücreleri ile teka hücreleri normal ultrastrüktürel yapıda görülmüştür. Ayrıca stromal hücreler, vasküler yapılar ve endotel hücreleri, düz kas hücreleri de normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirilmiştir. Bu gruplara ait bulgular ışık mikroskopik bulgularda olduğu gibi literatür ile uyumludur (133, 135, 145).

TCDD'nin timositlerde (147), nöronlarda (148), kondrositlerde (149), karaciğerde (150) ve birçok dokuda apoptozisi uyardığı gösterilmiştir. I. Heimler ve ark. yapmış oldukları invitro çalışmada hücre kültüründe insan luteinize granuloza hücrelerinde değişik dozlarda ve sürelerde TCDD'nin ultrastrüktürel düzeyde hücre hasarı bulguları bildirmişlerdir. Bu bulgular, uygulanan TCDD dozu ve süresi ile orantılı olarak granuloza hücrelerinde apoptozun artışı, DNA fragmentasyonu, periferik kromatin yoğunlaşması şeklindedir. Ayrıca 24 saat sonunda gözlenen değişiklikler apoptotik sürecin ilk evreleri ile uyumlu olduğu, 48 saat sonundaki değişikliklerin ise sürecin ileri evre bulguları ile



uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (146). Çalışmamızdaki apoptotik bulgular ileri evre bulguları ile benzerdir.

TCDD grubuna ait ovaryum kesitlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde granuloza hücreleri arasında ve yer yer diğer granuloza hücreleri sitoplazmasında otofagozomlar içinde çok sayıda apoptotik cisimcik belirlenmiştir. Her ne kadar granuloza hücrelerinde apoptotik değişiklikler folikül gelişim sürecinde atretik foliküllerde görülebiliyor olsa da burada çok sayıda olması, diğer granuloza hücrelerinde çok sayıda sekonder lizozom ve otofagozomların bulunması bu apoptotik cisimciklerdeki artışın TCDD toksikasyonuna bağlı olarak geliştiğinin işaretidir.

Apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı faktörler ya da genetik faktörlerle aktive edilen programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Nekroz ise hücrenin kendi içinde gerçekleşen olaylardan ziyade dış faktörler sonucu ortaya çıkar. Bu faktörler ise sıklıkla olumsuz şartlar anlamına gelir (151).

I. Heimler ve ark. hücre kültür ortamında TCDD uygulamasının insan lütinize granuloza hücrelerinde hücre zarının parçalanarak nükleer ve sitoplazmik materyalin hücre dışına dağılmış olduğunu bildirmişlerdir (146). Bu tip hücresel dejenerasyon bulguları hücre nekrozu ile uyumlu gözükmektedir. Çalışmamızda granuloza hücrelerinde apoptozisin yanı sıra birçok alanda nekrotik dejenerasyona da rastlanmıştır. Bu alanlarda granuloza hücre sitoplazmalarının parçalandığı, organellerin bütünlüğü ve birlikteliğinin bozulduğu ve granuloza hücreleri arasında eritrositlerin varlığı tespit edilmiştir. Ultrastrüktürel bulgulara göre TCDD, granuloza hücrelerinde nekrotik dejenerasyona yol açmaktadır. Bu durumda granuloza hücrelerinde apoptotik değişikliklerdeki artış, hücrelerin TCDD toksikasyonunun yıkıcı etkisini minimize etmeye yönelik olarak hücre nekrozundan daha az travmatik bir hücre ölüm yolu olarak seçilmiş olabilir. Sonuç olarak TCDD uygulaması ovaryum granuloza hücreleri üzerine kuvvetli toksik etki göstererek hem apoptozu arttırmış hem de yoğun şekilde nekrozu tetiklemiştir. Çalışmamızda TCDD + mel grubunda apoptotik cisimciklere ve nekroz bulgusuna rastlanmamıştır. Ancak yer granuloza hücrelerinde ve korpus luteum hücrelerinde lizozomal yapılar tespit edilmiştir. Bu gruptaki ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik özellikleri büyük oranda kontrol, yağ, alkol ve melatonin grupları ile benzer görünümdeydi.

Granuloza hücreleri gibi korpus luteum hücreleri de TCDD nin zararlı etkilerine karşı yapısal değişiklikler göstermektedir. Yapılan çalışmaların bir çoğunda TCDD

uygulamasının korpus luteumun hormon sentezini, özellikle de progesteron sentezini azalttığı bildirilmektedir (152, 153). Gregoraszcuk EL tarafından yapılan farklı dozlarda ve sürelerde TCDD uygulaması sonucu doz ve süreye bağımlı olarak progesteron sentezinde azalma bildirilmiştir (153). Ewa L. Gregoraszcuk tarafından yapılan invitro çalışmada ise TCDD uygulamasının lutel hücrelerde progesteron, folikül hücrelerinden östrodiol salgılanmasının doza bağımlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Hormonal sentezdeki bu azalma TCDD'nin steroidogenezi ve steroid sentezinde görev alan enzimler ile mitokondriyal enzimlerin yapısını bozmasıyla oluştuğu bildirilmiştir (152, 153). Literatürde TCDD'nin ovaryum hormonları sentezi üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmakta iken korpus luteum hücreleri morfolojisi üzerine etkilerine dair bilgiye ulaşılamamıştır. Çalışmamızda ışık mikroskopik olarak TCDD grubunda korpus luteum hücrelerinde yaygın piknotik nukleus yapısı, yer yer hidropik dejenerasyon ve korpus luteum parankiminde inflamasyon görülmüştür. Elektron mikroskopik olarak korpus luteum hücrelerinde kromatin yoğunlaşması, nukleus sınırlarında düzensizlik, perinukleer alanda ödem ve lizozom artışı tespit edilmiştir. Bu bulgular TCDD'nin hemen hemen tüm hücrelerde oluşturduğu yapısal değişikliklerle uyumludur. Hücre ve organellerindeki bu değişikliklerin korpus luteum hücrelerinde steroidogenezinin yavaşlamasına, sentezlenen hormon miktarının düşmesine neden olduğu düşünülmektedir.

TCDD ovaryumdaki hormon sentezinin esas hücreleri olan granuloza hücreleri ve korpus luteum hücreleri yanında, düz kas hücrelerini, stromal hücreleri ve endotel gibi birçok hücreleri de olumsuz etkilemektedir. Renal proksimal tübül hücrelerinde granülsüz endoplasmik retikulum miktarını önemli ölçüde arttırmaktadır (155). Larry Johnson ve ark tarafından TCDD maruziyetinde Leydig hücreleri üzerine yapılan araştırmada, TCDD'nin sitoplazma miktarının azalmasına, organel içeriğinin azalmasına ve Leydig hücrelerinin hacimsel olarak küçülmesine neden olduğu bildirilmektedir (156). Fowler BA ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada oral olarak tek doz 5 µg/kg ve 25 µg/kg TCDD uygulanan sıçanların karaciğer hücreleri üzerindeki ultrastrüktürel değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre karaciğer hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak granülsüz endoplasmik retikulumda ve yer yer bazı hücrelerde hem granüllü hem granülsüz endoplasmik retikulumda artış olduğu bildirilmiştir. TCDD uygulamasından sonraki süreç uzadıkça karaciğer hücrelerinde hücre zarına yakın daha da yoğun granülsüz endoplasmik retikulum ve nükleusa yakın granüllü endoplasmik retikulum varlığı gösterilmiştir. Bu artışın da TCDD maruziyeti sonrasında artan RNA ve protein

senteziyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (157). TCDD'nin ayrıca düz kas hücrelerini de etkileyerek, corpus cavernosum dokusunda düz kas miktarının artmasına ve trabeküler düz kas içeriğinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (158). Hücre içi bu gibi etkilerinin yanı sıra TCDD hücre zarı bütünlüğünü ve geçirgenliğini de bozmaktadır (159, 160). Bu çalışmalar akut ve kısa süreli uygulamaları içeriyor olup, TCDD hücre organellerinde proliferasyon oluşumuna neden olmaktadır. Kronik maruziyet durumunda ise hücre ve organel hasarı oluşturmaktadır.

Çalışmamızda TCDD grubundaki ovaryum kesitlerinin ultrastrüktürel incelenmesinde ovaryum stroması düz kas hücrelerinde yoğun olarak periferel kromatin yoğunlaşması, nukleus sınırlarında ondulasyon ve miyofibril ağında düzensizlik saptandı. Stromal hücrelerde ve endotel hücrelerinde düz kas hücrelerinde olduğu gibi periferel kromatin yoğunlaşması ve nukleus sınırlarında ondulasyon belirgindi. Ayrıca stromal hücreler arasında düzensiz sınırlı vakuoller tespit edildi.

TCDD + melatonin grubunda ise, ovaryum stroması düz kas hücreleri, stromal hücreler ve endotel hücreleri kontrol, yağ, alkol ve melatonin gruplarındaki bu hücrelerle benzer ultrastrüktürel yapıda olduğu gözlemlendi.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada sıçanlarda kronik TCDD uygulaması ile oluşturulan ovaryum toksitesi ve hasarı üzerine melatoninin ovaryumu koruyucu ve ovaryum hasarını azaltıcı

etkinliğinin olup olmadığı ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen biyokimyasal bulgulara göre, TCDD'nin ovaryum dokusunda oksidatif stres oluşturmaktadır. Ayrıca overde granuloza hücreleri, korpus luteum hücreleri, düs kas hücreleri, stromal hücreler üzerien sitotoksik etki gösterek ovaryum folikülü ve korpus luteum gelişimini olumsuz etkilemektedir. Yapılan histolojik incelemelerde ise TCDD'nin ovaryum dokusunda primordiyal sonrası aşamalarda folikül ve korpus luteum sayısını belirgin bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Bunun yanısıra, hücre morfolojisini ve bütünlüğünü bozarak apoptoza ve nekroza neden olduğu gözlenmiştir. TCDD'nin bu hasarlayıcı etkilerine karşılık, melatoninin bu çalışmada belirlenen histolojik, ultrastrüktürel ve biyokimyasal hasar parametrelerini önemli derecede düzeltici etkinliği olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir.

Kaçınılması çok zor olan çevresel TCDD maruziyetinin zararlı etkilerine karşı,yapılacak daha kapsamlıçalışmalarlada desteklendiği takdirde, melatoninin koruyucu ve iyileştirici bir ajan olarak kullanım potansiyeli yüksek gözükmetedir.

## **KAYNAKLAR**

1. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CA. Dioxin sources and current remediation Technologies. *Environ. Int.*, 2008, 34: 139-53.

2. Sechmana A, Antosa P, Katarzy' D, Grzegorzewskaa A, Wojtysiakb D, Hrabiaa A. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on secretion of steroids and STAR, HSD3B and CYP19A1 mRNA expression in chicken ovarian follicles. *Toxicol Lett.*, 2014, 225(2): 264-74.
3. Lilienthal H, Fastabend A, Hany J, et al. Reduced levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicological sciences*, 2000, 57: 292-301.
4. Aylward LL, Brunet RC, Carrier G, Hays SM, Cushing CA, Needham LL, Patterson DG, Gerthoux PM, Brambilla P, Mocarelli P. Concentration dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 2005, 15: 51-65.
5. Piotr A, Agnieszka G, Anna H, Małgorzata B, Andrzej S. Antiestrogenic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in chicken ovarian follicles. *Reproductive Biology*, 2013, 13: 17-19.
6. Katsuhiko Y, Amy EB, Donald MS, Micheal PJ, Michael W, Denis PO, Grace EK, Nigel JW, Abraham N. Reproductive lesions in female Harlan Sprague-Dawley rats following two-year oral treatment with dioxin and dioxin-like compounds. *Toxicologic Pathology*, 2009, 37: 921-937.
7. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health*, 1998, 11: 291-303.
8. Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, et al. Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspect*, 1998, 106: 1263-70.
9. Apostoli P, Mangili A, Carasi S, Manno M. Relationship between PCBs in blood and D-glucaric acid in urine. *Toxicol Lett*, 2003, 144: 17-26.
10. Rogan WJ, Gladen BC. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurol Toxicol*, 1992, 13: 27-36.
11. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9: 1285-92.
12. Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, et al. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere*, 1994, 28: 1049-67.
13. Shain W, Overmann SR, Wilson LR, Kostos J, Bush B. A congener analysis of polychlorinated biphenyls accumulating in rat pups after perinatal prenatal exposure.

- Arch Environ Contam Toxicol*, 1986, 15:678-707.
14. Safe S. Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health*, 2002, 17: 253-62.
  15. Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*, 2003, 111: 389-94.
  16. Arcaro F and Gierthy F. Assessing modulation of estrogenic activity of environmental and pharmaceutical compounds using MCF-7 focus assay. *Methods Mol Biol*, 2001, 176: 341-51.
  17. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Draft toxicological profile for polychlorinated biphenyls. *Research Triangle Institute*, 1995, 363.
  18. Linden J, Pohjanvirta R, Rahko T, Tuomisto J. TCDD decreases rapidly and persistently serum melatonin concentration without morphologically affecting the pineal gland in TCDD-resistant Han/Wistar rats. *Pharmacol Toxicol*, 1991, 69: 427-32.
  19. <http://www.sleepdex.org/melatonin.htm> "Melatonin"*Sleepdex*. Retrieved 2011, 08-17.
  20. Caniato R, Filippini R, Piovan A, Puricelli L, Borsarini A, Cappelletti EM. "Melatonin in plants". *Adv. Exp. Med. Biol. Advances in Experimental Medicine and Biology* 2003, 527: 593-97.
  21. Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. "Phytomelatonin: a review". *J. Exp. Bot.*, 2009, 60: 57-69.
  22. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobioti. *Sleep Med Rev*, 2005, 9: 25-39.
  23. <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/melatonin/evidence/hrb-20059770>"Mela-tonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine): Evidence". *Drugs and Supplements*, 2012.
  24. Ross MH, Wojciech P. *Histology A Text And Atlas*. 2011, 830-70.
  25. Ross MH, Wojciech P. *Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas*. (Baykal B. Çev.) Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, 830-60.
  26. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, (Aytekin Y, Solakoğlu S. Çev.) 10. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2009, 435-55.
  27. Eşrefoğlu M, *Özel Histoloji*. Medipress, 2009, 222-44.
  28. Özer A. *Diği Genital Sitem Veteriner Özel Histoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, 2010, 219-21.

29. Krinke GJ. *The Handbook Of Experimental Animals The Laboratory Rat*. Academic Press, Usa, 2000, 302-03.
30. Hung K, Liu S, Kao S, Huang J, Chiang C, Tsai T. N-Acetylcysteine- Mediated Antioxidation Prevents Hyperglycemia-İnduced Apoptosis And Collagen Synthesis İn Rat Mesangial Cells. *Am J Nephrol*,2009, 29: 192-202.
31. Low W, Sun L, Tan M, Chua A, Wang Dy. L-N-Acetylcysteine Protects Against Radiation-İnduced Apoptosis in A Cochlear Cell Line. *Acta Oto-Laryngologica*, 2008, 128: 440-45.
32. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji*. (S. Müftüoğlu Çev.) Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009, 400-25.
33. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi*. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev.). 8. Baskı, İstanbul: Nobel, 2009.
34. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji* (9. Baskı). (A.C. Başaklar Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 2005
35. Koç F. and Kısa F. Dioksinler. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 2005,16: 1-2
36. Fries GF, Paustenbach DJ. Evaluation of potential transmission of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-contaminated incinerator emissions to humans via food. *J Toxicol Environ Health*, 1990, 29: 1-43
37. Opperhuizen A, Sijm DTHM. Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish. *Environ Toxicol Chem*, 1990, 9:175-186.
38. Çiftçi O. Dioksinli bileşiklerin etki mekanizması, kimyasal yapısı ve toksikokinetik özelliklerinin incelenmesi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2010, 17(4): 413-22.
39. Schecter A, Birnbaum L, Ryan JJ, Constable JD. Dioxins: An Overview. *Environmental Research*, 2006, 101: 419-28.
40. Arıkan D, Yetim H, Sağdıç O, Kesmen Z. Gıdalarda dioksin kontaminasyonu ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2009, 12(2): 9-15.
41. Güneş G. Dioksin ve furan'ın oluşum mekanizmaları ve giderilme teknolojileri. *Yıldız Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı*. İstanbul, 2007.
42. Lin PH, Lin CH, Huang CC, Chuang MC, Lin P. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-Pdioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly(adp-ribose)

- polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology Letters*, 2007, 172: 146-58.
43. Mitrou P, Dimitriadis G, Raptis SA. Toxic effects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo -p-dioxin and related compound. *European Journal Of Internal Medicine* 2001, 12:406-11.
  44. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM. Dioxins sources and current remediation technologies - A Review. *Environment International*, 2008, 34:139–53.
  45. Vural H. Gıda kirliliği açısından dioksin ve furan izomerleri. *Ekoloji Çevre Dergisi*. 1995, 15: 45-49.
  46. Aslan S, Korucu M, Karademir K, A, Durmuşoğlu E. Kocaeli’nde yerel olarak üretilen yumurtalarda dioksin ve furan (pcdd/f) seviyelerinin belirlenmesi. 7. *Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Yaşam Çevre Teknoloji*, İzmir, 2007.
  47. Güler ÜA, Kundakçı Ö. Dioksin ve benzeri bileşiklerin insan ve çevre sağlığına etkileri. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2014, 4 (1): 71-75.
  48. Hébert CD, Birnbaum LS. The influence of aging on intestinal absorption of tcdd in rat. *Toxicology Letters*, 1987, 37(1): 47-55.
  49. Hoffman DJ, Rattner BA, Bunck CM, Krynitsky A, Ohlendorf HM, Lowe RW. Association between PCBs and lower embryonic weight in black-crowned night herons *In San Francisco Bay* 19, (1986), 383-91.
  50. Pier Alberto B, Carlo Z, Angela C, Pesatori, Stefano G, Maurizio S and Laura R, Ten-year mortality study of the population involved in the seveso incident in 1976. *Am. J. Epidemiol.*, 1989, 129, 1187-200.
  51. Çiftçi O. 2,3,7,8-TCDD’nin ratlarda bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri ve bu etkilerin curcumin tarafından engellenmesinin araştırılması, Fırat Üniversitesi, Farmakoloji ve toksikoloji Anabilim Dalı doktora tezi, Elazığ, 2008.
  52. Ogura I. “Half-life of each dioxin and PCB congener in the human body.” *Organohalogen Compounds*, 2004,66.
  53. Vena J, Boffetta P, Becher H, Benn T, Bueno-De-Mesquita HB, Coggon D, Colin D, Flesch-Janys D, Green L, Kauppinen T, Littorin M, Lynge E, Mathews JD, Neuberger M, Pearce N, PesatorAC, Saracci R, Steenland K, Kogevinas M. Exposure to dioxin and nonneoplastic mortality in the expanded IARCinternational cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers. *Environ. Health Perspect*, 1998, 106: 2, 645-53.



54. Calvert GM, Wall DK, Sweeney MH, MA Fingerhut, Evaluation Of Cardiovascular Outcomes Among U.S. Workers exposed to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p -dioxin, *Environ. Health Perspect*, 1998, 106: 2, 635-43.
55. Vural H. Gıda kirliliği açısından dioksin ve furan izomerleri. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 1995, 15, 45-49.
56. Scott JA, Incardona JP, Pelkki K, Shepardson S, Hodson PV, Ahr2-mediated, cyp1a-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (danio rerio) embryos exposed to retene. *Aquat. Toxicol.*, 2011, 17:165-74.
57. Yang JH, Rhim J.S. “2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: molecular mechanism of carcinogenesis and its implication in human in vitro model.” *Critical Reviews In Oncology/Hematology*,1995, 18:111-27.
58. Watanabe MX, Kunisue T, Ueda N, Nose M, Tanabe S, Iwata H. “Toxicokinetics of dioxins and other organochlorine compounds in japanese people: association with hepatic Cyp1a2 expression levels” *Environment International*, 2013, 53:53-61.
59. Hassoun EA, Al-Ghafri M, Abushaban A. The role of antioxidant enzymes in TCDD induced oxidative stress in various brain regions of rats after subchronic exposure. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 35:1028-036
60. Hassan MQ, Stohs SJ, Murray WJ. 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. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 1985, 14:437-42.
61. Reichard JF, Timothy PD, Howard GS, Puga A. Induction of oxidative stress responses by dioxin and other ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Dose-Response*, 2005, 3:306–31.
62. Viluksela M. et al. Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD resistant rat strains. *Cancer Res.*, 2000, 60 (24): 6911–20.
63. Dragan YP, Schrenk D. Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Additives and Contaminants*, 2000,17 (4): 289–302.
64. Hassoun EA, Wang H, Abushaban A. 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, 2002, 65:825–42.

65. Maruyama W, Yoshida K, Tanaka T, Nakanishi J. Simulation of dioxin accumulation in human tissues and analysis of reproductive risk. *Chemosphere*, 2003, 53:301–13.
66. Gray LJ, Ostby Js. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, 133(2):285-94.
67. Shiverick K, Muther T. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on serum concentrations and the uterotrophic action of exogenous estrone in rats. *Toxicol appl pharmacol*, 1982, 65:170-76.
68. Heimler I, Trewin A, Chaffin R, et al. Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod Toxicol*, 1998, 12(1):69-73.
69. Prooijje A, Waalkens-Berendsen D, Wijnands M. Oral two-generation reproduction study with pcbs in rats. *Tno-Report*, Zeist, The Netherlands: Tno Nutrition And Food Research Institute. 1994,V 92.503.
70. Mochida Y, Fukata H, Matsuno Y, Mori C. Reduction of dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBS) in human body. *Fukuoka Acta Med.*2007, 98: 106-13.
71. Morita K, Hirakawa H, Matsueda T, Iida T, Tokiwa H. Stimulating effect of dietary fiber on fecal excretion of polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated dibenzo-pdioxins (PCDD) in rats. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 1993, 84:273-81.
72. Kimura Y, Nagata Y, Buddington RK. Some dietary fibers increase elimination of orally administered polychlorinated biphenyls but not that of retinol in mice. *J. Nutr*, 2004, 34:135-42.
73. Morita K, Ogata M, Hasegawa T. Chlorophyll derived from chlorella inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. *Environ. Health Perspect*, 2001, 109:289-94.
74. Moser GA, Mclachlan MS. A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. *Chemosphere*, 1999, 39:1513-21.
75. Hassoun EA, Vodhane J, Abushaban A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin e succinate on tcdd-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, 2004, 18:196-203.

76. <http://www.sleepdex.org/melatonin.htm>"Melatonin". Sleepdex. Retrieved 17 August 2011.
77. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. "Melatonin". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38 (3): 313–16.
78. Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int. J. Clin. Pract.* 2007, 61(5): 835–45.
79. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 2005, 27(2): 119-30.
80. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. "Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001, 939:200-15.
81. Lincoln GA, Andersson H, Loudon A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *J. Endocrinol.*2003, 179 (1):1-13.
82. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med* 2005, Rev 9 (1): 25-39.
83. Ardura J, Gutierrez R, Andres J, Agapito T. Emergence and evolution of the circadian rhythm of melatonin in children. *Horm. Res.*2003, 59 (2):66-72.
84. Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J. Pineal Res.*1986. 3 (4):379-88.
85. Gavin ML, Scaivina MT. "Why Aren't Teens Getting Enough Sleep?". How Much Sleep DoI, Need?2009[http://kidshealth.org/teen/your\\_body/take\\_care/how\\_much\\_sleep.html](http://kidshealth.org/teen/your_body/take_care/how_much_sleep.html)
86. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1993, 1: 57-60.
87. Pohanka M. Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *Journal of Applied Biomedicine* 2011, 9 (4): 185-96.
88. Arnao MB, Hernández-Ruiz J. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav*, 2006, 1(3): 89–95.
89. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth*, 2013, 110 (3): 472-80.

90. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 2007, 42 (1): 28-42.
91. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 2005), 27 (2): 189-200.
92. Arushanian EB, Beier EV. Immunotropic properties of pineal melatonin. *Eksp Klin Farmakol*, 2002, 65 (5): 73-80.
93. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006, 7 (5): 423-31.
94. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 2001, 10 (3): 467-76.
95. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* March 2001 10 (3): 467-76.
96. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trahkt I, Spence DW, Poeggeler B, Hardeland R, Cardinali DP. Melatonin and melatonergic drugs on sleep: possible mechanisms of action. *Int. J. Neurosci.* 2009 119 (6): 821-46.
97. Sircar R. Effect of melatonin on cocaine-induced behavioral sensitization. *Brain Res.* 2000 857 (1-2): 295-9.
98. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine): Evidence. *Drugs and Supplements.* MayoClinic.com. 2012.
99. Dodick DW, Capobianco DJ. Treatment and management of cluster headache. *Curr Pain Headache Rep* 2001, 5 (1): 83-91.
100. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 1999, 65 (23): 2523-9.
101. Koppiseti S, Jenigiri B, Terron MP, Tengattini S, Tamura H, Flores LJ, Tan DX, Reiter RJ. Reactive oxygen species and the hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: a review. *Dig. Dis. Sci.* 2008, 53 (10): 2592-603.
102. Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS, Kumar KS. Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Mutat. Res.* 1999, 425 (1): 21-7.
103. Topkan E, Tufan H, Yavuz AA, Bacanlı D, Onal C, Kosdak S, Yavuz MN. Comparison of the protective effects of melatonin and amifostine on radiation-induced epiphyseal injury. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008, 84 (10): 796-802.

104. Zhdanova, Irina V; Piotrovskaya, Veronika R. "Melatonin treatment attenuates symptoms of acute nicotine withdrawal in humans". *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2000, 67 (1): 131–35.
105. Günaldı M. Kan Selenyum Düzeyi Ve Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Akut Miyokart Enfarktüsü Gelişimi Üzerine Etkisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ok Meydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi. İç Hastalıkları Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2009, İstanbul.
106. Erden M. Serbest Radikaller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 1992, 12 (3): 201-07.
107. Koca N, Karadeniz F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 2003, 16: 32-37.
108. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi*, 1997, 3(4): 92-95.
109. Günaydın B, Çelebi H. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller Ve Antioksidanlarla İlişkileri. *Anestezi Dergisi*, 2003, 11(2): 87-98.
110. Çam H. Sıçanlarda Aspirin İle Uyarılan Gastritin Önlenmesinde Kafeik Asit Fenetil Esterin Etkinliğinin Araştırılması. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi 2007, Isparta.
111. Johansen Js, Harris Ak, Rychly Dj, Ergul A. Oxidative Stress And The Use Of Antioxidants İn Diabetes: Linking Basic Science To Clinical Practice. *Cardiovasc Diabetol*, 2005, 29: 4(1):5.
112. De Zwart Ll, Meerman Jhn, Commandeur Jnm, Vermeulen Npe. Biomarkers Of Free Radical Damage Applications İn Experimental Animals And İn humans. *FreeRadic Biol Med*, 1999; 26:202-226.
113. Reznick A.Z, Packer L. Oxidative Damage To Proteins: Spectrophotometric Method For Carbonyl Assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
114. Wiseman H, Halliwell B. Damage To Dna By Reactive Oxygen And Nitrogen Species: Role İn İnflammatory Disease And Progression To Cancer. *Biochem J*, 1996; 313: 17- 29.
115. Cooke Ms, Olinski R, Evans Md. Does Measurement Of Oxidative Damage To Dna Have Clinical Significance? *Clin Chim Acta*, 2006; 365: 30-49.
116. Jerry P, Liu L, Zeng M, Stamler J.S. An apoptotic model for nitrosative stres. *Biochemistry*, 2000; 39: 1040-47.

117. Drisko Ja, Chapman J, Hunter Vj. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol Oncol*, 2003; 88: 434-39.
118. Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms To Clinical Consequences. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.
119. Halliwell B. Tell me about free radicals, Doctor: A Review. *J R Soc Med*, 1989; 82: 747-52.
120. Tan Dx, Manchester Lc, Reiter Rj, Plummer Rf, Limson J, Weintraub St, Qi Wb. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med*, 2000; 29: 1177-85.
121. Me\_Ster A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl*, 1994; 954: 1969-75.
122. Cochrane C.G. Cellular injury by oxidants. *Am J Med*, 1991; 23-30.
123. Urso MI, Clarkson Pm. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003;189: 41-54.
124. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes Cj, Telser J. Role of oxygen radicals in dna damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004; 266: 37-56.
125. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto*, 1974; 73: 1075-86.
126. Urso MI, Clarkson Pm. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003;189: 41-54.
127. Gilbert DI, Colton Ca. Reactive Oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. *Kluwer Academic Publishers*, 2002.
128. Sun Y, Oberley L.W, Li Y.A. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.*, 1988;34, 497-500.
129. Esterbauer H, Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In Packer L. Glazer AN, editors. *Methods in enzymology: V 186, oxygen radicals in biological systems. Methods Enzymol.*, California:Academic Press;. 1990: 16, 407-21.
130. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 2004; 37: 277-85.
131. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 2005; 38: 1103-11.

132. Lowry O.H, Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 1951: 193, 265-75.
133. Xuelin Lia, Donald C. Johnsonb, Karl K. Rozman. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on estrous cyclicity and ovulation in female Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*, 1995: 78 219-22.
134. P.I. Mitrou, G. Dimitriadis, S.A. Raptis, Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Eur. J. Intern. Med.*, 2001: 12, 406-11.
135. Wolf C.J, Ostby J.S., and Gray L.E. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicological Sciences*, 1999: 51, 259–64.
136. Cummings AM., Hedge JM, Birnbaum LS. Effect of prenatal exposure to TCDD on the promotion of endometriotic lesion growth by TCDD in adult female rats and mice. *Toxicol Sci.* 1999: Nov;52(1):45-9.
137. Tuomisto JT, Pohjanvirta R, Unkila M, Tuomisto J. TCDD-induced anorexia and wasting syndrome in rats: effects of diet-induced obesity and nutrition. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1999: Apr;62(4):735-42.
138. Üstündağ B, Bahçecioglu İ.H, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özercan İ.H, Gürsu MF. Soyizoflavonların karbon tetraklorüre (CCL<sub>4</sub>) bağıkaraciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. *Fırat üniversitesi sağlık bil. Dergisi*, 2005: 19(4), 263-71.
139. Nair V, O'Neil C.L, Wang P.G. Malondialdehyde. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, NewYork, 2008.
140. Davey MW, Stals E, Panis B, Keulemans J, Swennen RL. "High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues". *Analytical Biochemistry*, 2005, 347 (2): 201-07.
141. Moore K., Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.*, 1998. 28 (6): 659–71.
142. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15 (4): 316–28.
143. Çakır O. 2,3,7,8-TCDD (Tetraklorodibenzo-p-dioksin)'nin ratlarda olusturduğu oksidatif stres üzerine quercetin koruyucu etkisinin araştırılması., *Yüksek lisans tezi*, 2011, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

144. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66 (8): 1499–503.
145. Roby KF. alterations in follicle development, steroidogenesis, and gonadotropin receptor binding in a model of ovulatory blockade. *Endocrinology*, 2000, Vol. 142, No. 6.
146. Heimler I, Amanda L., Trewin, Charles L., Chaffin, Richard G., Raw l., Ins and Reinhold J.H. Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-ioxin (TCDD). *Reproductive Toxicology.*, 1998, V 1269-73.
147. Park JH, Hahn EJ, Kong JH, Cho HJ, Yoon CS, Cheong SW, Oh GS, Youn HJ. TCDD-induced apoptosis in EL-4 cells deficient of the aryl hydrocarbon receptor and down-regulation of IGFBP-6 prevented the apoptotic cell death. *Toxicology Letters*, 2003, V 145, Issue 1, 55–68.
148. Morales-Hernández A, Sánchez-Martín FJ, Hortigón-Vinagre MP, Henao F, Merino JM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis by disruption of intracellular calcium homeostasis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Apoptosis*, 2012, 17:1170–81.
149. Yang JH, Lee HG. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis of articular chondrocytes in culture. *Chemosphere*, 2010, 79(3): 278-84.
150. Sakamoto MK, Mima S, Tanimura T. A morphological study of liver lesions in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with special reference to apoptosis of hepatocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncpl*, 1995;14(2):69-82.
151. Altunkaynak B.Z, Elvan Özbek. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tip Araştırmaları Dergisi*: 2008 : 6 (2) :93 -104.
152. Gregoraszcuk EL, Wójtowicz AK, Zabiłny E, Grochowalski A. Dose-and-time dependent effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) on progesterone secretion by porcine luteal cells cultured in vitro. *J Physiol Pharmacol.*, 2000, 51(1):127-35.
153. Gregoraszcuk EL. Dioxin exposure and porcine reproductive hormonal activity. *Cad Saude Publica.*, 2002: 18(2):453-62.
154. Fatih S, Farklı dozlarda 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin tarafından ratlarda beyin, karaciger, böbrek ve kalp gibi dokularda olusturulan oksidatif stres üzerine



likopenin koruyuculuğu, *Doktora Tezi*, 2008, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Elazığ.

155. Fowler B.A, Hook G.E. and Lucier G.W. Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of renal microsomal enzyme systems: ultrastructural effects on pars recta (S3) proximal tubule cells on the rat kidney. *Pharmacol Exp Ther*, 1977: 712-21.
156. Johnson L, Dickerson R., Safe S.H., Nyberg C.L., Lewis R.P., Welsh T.H. Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis. *Toxicology*, 1992 V 76, Issue 2, 103-18.
157. Fowler B.A., Lucier G.W., Brown H.W., and McDaniel O.S. Ultrastructural changes in rat liver cells following a single oral dose of TCDD. *Environ Health Perspect.*, 1973: Sep; 5: 141–48.
158. Moon D.G., Lee K.C., Kim Y.W., Park H.S., Cho H.Y. and Kim J.J. Effect of TCDD on corpus cavernosum histology and smooth muscle physiology. *International Journal of Impotence Research*, 2004: 16, 224–30.
159. Matsumura F, Brewster D.W., Madhukar B.V., Bombick D.W. Alteration of rat hepatic plasma membrane functions by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p -dioxin(TCDD). *Environmental Contamination and Toxicology*, 1984, V 13, Issue 5, pp 509-15.
160. Enan E, Liu P.C.C., Matsumura F. TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte. *Journal of Environmental Science and Health*, 1992.

## **EKLER**

### **Ek 1: Özgeçmiş**

#### **ÖZGEÇMİŞ**

Adı-Soyadı : Semir GÜL

Doğum tarihi ve yeri: 27/ 05/ 1985 - Turhal/TOKAT

Uyruğu : T.C.

İletişim adresleri : [semir.gl@gmail.com](mailto:semir.gl@gmail.com)

#### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Tokat Atatürk Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)

**Lisans:** İzmir Yüksek teknoloji Enstitüsü

**Yüksek Lisans:** İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Eğitimi

**Yabancı Dil:** İngilizce

## Ek 2: Etik Kurul Kararı 1



**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 31-01-2014  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-11  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : *Wistar albino*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 72 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 12 aylık, 180-200 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Mehmet GÜL'ün yürütücüsü olduğu "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'nin dişi sıçanlarda üreme sistemi (ovaryum, endometrium) üzerindeki etkileri ve melatoninin koruyucu etkisi" isimli 2014/A-11 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
Katılımdı Salih AVCI Sivil Üye	Katılımdı Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	

## Ek 3: Etik Kurul Kararı 2



T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 60161673-01/37

Konu : 2014/A-11 nolu çalışma

MALATYA

08 / 06 / 2015

Sayın: Doç.Dr. Mehmet GÜL  
Tıp Fakültesi Histoloji AD

2014/A-11 protokol nolu "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'nin dişi sıçanlarda üreme sistemi (ovaryum, endometrium) üzerindeki etkileri ve melatoninin koruyucu etkisi" isimli çalışmanın başlığının "Dişi sıçanlarda kronik TCDD (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioksin) uygulamasının oluşturduğu ovaryum hasarı üzerine melatoninin koruyucu etkileri." şeklinde değiştirilmesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı