



**BİR HERBİSİT OLAN 2,4 D (DİKLOROFENOKSİ ASETİK
ASİT) İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA
KLOROJENİK ASİDİN MUHTEMEL KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gülizar İNGEÇ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL

Tez No: 2024-004

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİR HERBİSİT OLAN 2,4 D (DİKLOROFENOKSİ ASETİK ASİT) İLE
OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA
KLOORJENİK ASİDİN
MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Gülizar İNGEÇ**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL**

Tez No:

2024-004

AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "23. SAĞ. BİL.10"

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK

BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Gülizar İNGEÇ
	Numarası	213358012
	Anabilim Dalı	Fizyoloji
	Programı	Veteriner Fizyoloji
	Program Düzeyi	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
Tezin Başlığı	Bir Herbisit Olan 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) İle Oksidatif Stres Oluşturulan Ratlarda Klorojenik Asidin Muhtemel Koruyucu Etkisinin Araştırılması	
Tez Savunma Sınav Tarihi	30.12.2024	
Tez Savunma Sınav Saati	10.00	
Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.		
Başkan	Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL	
Üye	Prof. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ	
Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.		
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.		

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

30/12/2024

Gülizar İNGEÇ

ÖZET

BİR HERBİSİT OLAN 2,4 D (DİKLOROFENOKSİ ASETİK ASİT) İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN RATLARDA KLOROJENİK ASİDİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yapılan bu tez çalışmasındaki amaç; subkronik toksisiteye neden olan 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) bazlı herbisit tarafından eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokularında oluşturulan oksidatif stres, histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler üzerine Klorojenik asidin (Kloro) iyileştirici etkisini belirlemektir. Uygulama için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul'undan E-60758568-020-255262 sayılı onay alınarak başlandı. Çalışmada 300-350 g 10-12 haftalık toplam 28 Wistar erkek rat, her kafeste 7'şerli hayvan olacak şekilde rastgele örnekleme yöntemiyle 4 gruba ayrıldı. Grup I 'e (kontrol grubu) çalışma süresince normal rodent yemi ve çeşme suyu ad libitum verildi. Ayrıca serum fizyolojik oral olarak uygulandı. Uygulanan ajanlar ise Grup II'ye (KLOORO) Klorojenik asit 10 mg/kg, Grup III'e (2,4-D) 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) bazlı herbisit 50 mg/kg ve Grup IV'e (2,4-D+KLOORO) 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) bazlı herbisit 50 mg/kg ve Klorojenik asit 10 mg/kg birlikte 28 gün boyunca günde birkez olacak şekilde oral gavaj ile verildi. 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit); kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokularında MDA düzeylerini önemli oranda arttırırken, bu dokulardaki GSH düzeylerini ile dokulardaki ve eritrositlerdeki SOD ve CAT aktivitelerini azalttığı belirlendi. Buna zıt şekilde KLOORO verilen grupta bu parametrelerin düzeldiği görüldü. Ayrıca KLOORO'nun rat dokularında 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) tarafından oluşturulan histopatolojik değişiklikleri düzelttiği görüldü. Sonuç olarak Klorojenik asit, 2,4 D ile oluşturulan lipid peroksidasyonu engelleyerek ve antioksidan savunma sistemini aktive ederek oksidatif stresi önlediği ve 2,4-D'nin sıçanların kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokularında yaptığı hasarı iyileştirdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit), oksidatif stres, klorojenik asit, rat

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF CHLOROGENIC ACID IN RATS SUBJECTED TO OXIDATIVE STRESS INDUCTED BY 2,4- D (DICHLOROPHENOXY ACETIC ACID), A HERBICIDE

The aim of this thesis study is to determine the curative effect of Chlorogenic acid (Chloro) on oxidative stress, histopathological and immunohistochemistry changes induced in blood, liver, heart, kidney, brain and ovary tissues by 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) based herbicide causing subchronic toxicity. Approval was obtained from Pamukkale University Animal Experiments Ethics Committee for the application with the number E-60758568-020-255262. In the study, a total of 28 Wistar male rats (300-350 g, 10-12 weeks old) were divided into 4 groups by random sampling method with 7 animals in each cage. Group I (control group) was given normal rodent feed and tap water ad libitum during the study and saline was administered orally. Chlorogenic acid 10 mg/kg was given to Group II (KLORO), 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) based herbicide 50 mg/kg was given to Group III (2,4-D) and 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) based herbicide 50 mg/kg and chlorogenic acid 10 mg/kg were given to Group IV (2,4-D+KLORO) by oral gavage once a day for 28 days. 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) significantly increased MDA levels in blood, liver, heart, kidney, brain and ovarian tissues, while it decreased GSH levels in these tissues and SOD and CAT activities in tissues and erythrocytes. In contrast, these parameters were found to improve in the KLORO-treated group. In addition, KLORO corrected the histopathological changes induced by 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) in rat tissues. In conclusion, KLORO prevented oxidative stress by inhibiting lipid peroxidation induced by 2,4 D and activating the antioxidant defence system and improved the damage caused by 2,4 D in blood, liver, heart, kidney, brain and ovarian tissues of rats.

Keywords: 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid), oxidative stress, chlorogenic acid, rat

ÖNSÖZ

Tezimin planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Yüksek Lisans eğitimim sırasındaki değerli katkılarından dolayı da Prof. Dr. Recep ARSLAN, Prof.Dr. Abdullah ERYAVUZ ve Arş. Gör. Hülya ATİK'e, tez çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Son olarak her zaman yanımda olan ve beni bu günlere getiren aileme ve hep yanımda olan eşime teşekkür etmeyi borç bilirim.

Gülizar İNGEÇ

Afyonkarahisar

2024

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

ÖZET

i

SUMMARY

ii

ÖNSÖZ

iii

İÇİNDEKİLER

iv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

vii

ŞEKİLLER

viii

ÇİZELGELER

ix

RESİMLER

x

1. GİRİŞ

1

1.1. Pestisitler

2

1.1.1. Herbisitler

4

1.1.2. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)

4

1.1.2.1. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)'in Genel Özellikleri

4

1.1.2.2. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)'nin Toprakta Emilimi ve Atılımı

6

1.2. Serbest Radikal

7

1.3. Oksidatif Stres

8

1.4. Nekroz ve Apoptoz Tanımı

10

1.4.1. Apoptoziste Meydana Gelen Hücre Ölümünün Aşamaları

11

1.4.1.1. Tümör Nekrozis Faktör Süperailisi Reseptörleriyle Hücre Dışından Kaynaklanan Apoptozis

12

1.4.1.2. Hücre içinden kaynaklanan ve mitokondriyal yol aracılığıyla düzenlenen apoptoz

12

1.4.2. Apoptozu Ortaya Çıkarma Yöntemleri

13

1.4.2.1. TUNEL yöntemi kullanılarak DNA parçalanmasının tespiti

14

1.4.2.2. In situ hibritizasyon tekniği kullanılarak belirleme

14

1.4.2.3. Anneksin V Tekniği Kullanılarak Belirleme

14

1.4.2.4. Apoptoz özgü proteinlerin belirlenmesi

15

1.5. Klorojenik Asit

15

2. MATERYAL ve METOT

18

2.1. Materyal

18

2.1.1. Araç ve Gereçler

18

2.1.2. Hayvan Materyali

18

2.2. Metot

19

2.2.1. Deneysel Aşama

19

2.2.1.1. Deney Aşamasının Planlanması ve Uygulanması

19

2.2.1.2. Deney Aşamasının Sonlandırılması	20
2.2.2. Kalpten Kan Örneği Alınması ve Alınan Numunelerin Saklanması	20
2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	20
2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu	20
2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması	21
2.2.3.3. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini	21
2.2.3.4. Glutasyon (GSH) Tayini	22
2.2.3.5. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	23
2.2.3.6. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	25
2.2.3.7. Hemoglobin (Hb) ve Protein Konsantrasyonları Ölçümü	25
2.2.4. Biyokimyasal Parametreler	26
2.2.5. Histopatolojik Değerlendirme	26
2.2.5.1. Histopatolojik Değerlendirme İçin Dokuların Hazırlanması	26
2.2.5.2. Hemotoksilen Eosin Boyama Prosedürü	27
2.2.5.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler	27
2.2.5.3.1. TUNEL Uygulama Protokolü	28
2.2.6. İstatistiksel Analiz	29
3. BULGULAR	30
3.1. MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi	30
3.2. SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi	30
3.3. Biyokimyasal Parametre Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi	33
3.4. Hormonal Parametreler Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi	37
3.5. Canlı Ağırlık Artışı	37
3.6. Patolojik değişiklikler	38
3.6.1. Klinik Bulgular	38
3.6.2. Makroskopik Bulgular	38
3.6.2.1. Kontrol Grubu	38
3.6.2.2. Klorojenik Asit Grubu	38
3.6.2.3. 2,4-D Grubu	38
3.6.2.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu	39
3.6.3. Histopatolojik Bulgular	39
3.6.3.1. Kontrol Grubu	39
3.6.3.2. Klorojenik Asit Grubu	42
3.6.3.3. 2,4-D Grubu	46
3.6.3.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu	49
3.6.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	55

3.6.4.1. Kontrol Grubu	55
3.6.4.2. Klorojenik Asit Grubu	56
3.6.4.3. 2,4-D Grubu	58
3.6.4.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu	60
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
6. KAYNAKLAR	70



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde
°C: Santigrad derece
μ : Mikron
2,4-D:Diklorofenoksi Asetik as
ALP: Alkalen fosfataz
ALT: Alanin aminotransferaz
ANG II: Anjiyotensin II
ANOVA: Analysis of variance
Apaf-1: Proteaz aktive edici faktör 1
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenosin trifosfat
BUN: Kan Üre Nitrojeni
CAT: Katalaz
cm²: Santimetreka
CTL: Sitotoksik T hücreleri
DCJW: N- dekarbokmetoksile indoksakarb
dk: Dakika
Er: Endoplazmik retikulum
FasL: Fas Ligandı
g: Gram
GSH: İndüklenmiş glutatyon
H&E: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂: Hidrojen peroksit
LPO: Lipid peroksidasyon
MDA: Melondialdehid
NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
SOD: Süper oksit dismutaz
NMDA: N-metil-D-aspartik asit
NOAEL: Olumsuz etki tespit edilmeyen doz
SPSS: Statiscal package for the social sciences
TNFR: Tümör nekroz faktör reseptör

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1.2,4-D'nin kimyasal formülü	5
Şekil 1.2.Klorojenik asitin kimyasal formülü	16
Şekil 3.1.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri üzerine etkisi.	33
Şekil 3.2.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma alanin aminotransferaz ALT düzeyleri üzerine etkisi.	34
Şekil 3.3.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri üzerine etkisi.	35
Şekil 3.4.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma kan üre azotu (BUN) düzeyleri üzerine etkisi.	35
Şekil 3.5.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma glukoz düzeyleri üzerine etkisi.	36
Şekil 3.6.2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D 50 mg/kg ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik Asidin (Kloro) sıçanların plazma total protein düzeyleri üzerine etkisi.	36

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 3.1. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında malondialdehid (MDA) düzeyleri üzerine etkisi.	31
Çizelge 3.2. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında GSH seviyeleri üzerine etkisi.	31
Çizelge 3.3. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında SOD seviyeleri üzerine etkisi.	32
Çizelge 3.4. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında CAT seviyeleri üzerine etkisi.	32
Çizelge 3.5. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların FSH, LH, PG ve E2 hormon düzeylerine ait verilerin istatistiksel değerlendirmesi	37
Çizelge 3.6. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) canlı ağırlık değişimlerine ait verilerin istatistiksel değerlendirilmesi.	38
Çizelge 3.7. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi.	53
Çizelge 3.8. Dişi sıçanlara 2,4-D (2,4-D) ve 2,4-D ile beraber 10 mg/kg miktarlarında uygulanan klorojenik asidin (Kloro) karaciğer ve böbrek dokularında TUNEL boyama yöntemi ile belirlenen immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.	62

RESİMLER

	SAYFA
Resim 3.1. Dişi sıçanların kontrol grubu karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	40
Resim 3.2. Dişi sıçanların kontrol grubu böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	40
Resim 3.3. Dişi sıçanların kontrol grubu kalp dokularının histopatolojik değerlendirmesi	41
Resim 3.4. Dişi sıçanların kontrol grubu beyin dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	41
Resim 3.5. Dişi sıçanların kontrol grubu ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	42
Resim 3.6. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	43
Resim 3.7. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	44
Resim 3.8. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu kalp dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	44
Resim 3.9. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu beyin dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	45
Resim 3.10. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	45
Resim 3.11. Dişi sıçanların 2,4-D grubu karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	46
Resim 3.12. Dişi sıçanların 2,4-D grubu böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	47
Resim 3.13. Dişi sıçanların 2,4-D grubu kalp dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	47
Resim 3.14. Dişi sıçanların 2,4-D grubu beyin dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	48
Resim 3.15. Dişi sıçanların 2,4-D grubu ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	48
Resim 3.16. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	50
Resim 3.17. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	51
Resim 3.18. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun kalp dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	51
Resim 3.19. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun beyin dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	52

Resim 3.20. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	52
Resim 3.21. Dişi sıçanların kontrol grubu karaciğer dokularının histopatolojik TUNEL(-) değerlendirmesi.	56
Resim 3.22. Dişi sıçanların kontrol grubu böbrek dokularının histopatolojik TUNEL(-) değerlendirmesi.	56
Resim 3.23. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu karaciğer dokularının histopatolojik TUNEL(-) değerlendirmesi.	57
Resim 3.24. Dişi sıçanların klorojenik asit grubu böbrek dokularının histopatolojik TUNEL(-) değerlendirmesi.	57
Resim 3.25. Dişi sıçanların 2,4-D grubu karaciğer dokularının histopatolojik TUNEL(+) değerlendirmesi.	58
Resim 3.26. Dişi sıçanların 2,4-D grubu böbrek dokularının histopatolojik TUNEL(+) değerlendirmesi.	59
Resim 3.27. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun karaciğer dokularının histopatolojik TUNEL(+) değerlendirmesi.	60
Resim 3.28. Dişi sıçanların 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grubun böbrek dokularının histopatolojik TUNEL(+) değerlendirmesi.	61

1. GİRİŞ

Son teknolojik değişimler ile canlılar çok fazla kimyasala maruz kalmaktadır. Bu gelişmeler ile birlikte her sene yeni kimyasallar üretilmektedir. İnsanların bu kimyasallara çok farklı alanlarda ve farklı şekillerde maruz kalması nedeniyle birçok farklı sağlık sorunu da ortaya çıkmaktadır. Kimya endüstrisinin gelişmesiyle birlikte tarım ve sanayinin yanı sıra günlük hayatta da birçok kimyasal ürün kullanılmaktadır. Bu maddeler yararlarının yanı sıra, gerek doğrudan temas yoluyla gerekse kullanım sonrasında çevreye yayılma yoluyla çeşitli nedenlerle çevre kirliliği (insanlar ve tüm ekosistemler için) üzerinde olumsuz etkilere de sahiptirler. Çünkü çevrenin tüm unsurları birbirine bağımlıdır. Tarımda kullanılan çeşitli maddeler başta su ve toprak olmak üzere tüm biyolojik çevreyi kirlletmektedir. (Polat, 1999).

Pek çok böcek zararlısı tarımda birçok olumsuz etkiye neden olduğundan, insanlar ve hayvanlar üzerindeki toksik etkileriyle bilinen pestisitler çevresel ekosistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Mossa vd., 2018). Pestisitler birçok organizmada öldürücü özelliklere sahip olmasına rağmen, kontrolsüz kullanımlarının hedef dışı organizmalarda olumsuz etkilere neden olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. (Hanazato, 2001; Alavanja vd., 2004; Braak vd., 2018).

Yapılmış olan bu tez çalışmasında da rutinde kullanılan herbisitlerden birisi olan 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) Wistar-albino ratlar üzerindeki subakut uygulanması sonucunda klorojenik asitin oksidan- antioksidan savunma sistemine ve dokular üzerindeki değişikliklerine etkilerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

1.1 Pestisitler

Tarımsal kirliliğin en büyük nedeni pestisitlerdir. Herbisitler ve pestisitler günlük yaşamımızda yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde doğaya zararlı maddelerden daha az zarar veren çeşitli maddeler üzerine araştırmalar hızla devam etmektedir. (Gomez vd., 2001). Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu araştırmalarda dünya nüfusunun %80'i hâlâ doğal yöntemlerle keşfedilen bitkisel kaynaklı ilaçlara güvenmektedir. Ancak günümüzde çeşitli amaçlarla kullanılan çoğu sentetik olmak üzere 80.000'den fazla kimyasal bulunmaktadır. Bu maddeler aynı zamanda insan sağlığına da zararlıdır. Bu kimyasallar arasında; aktif farmasötik bileşenler, kozmetikler, gıda katkı maddeleri ve pestisitler başta gelmektedir (WHO, 1990).

Tarım alanlarında pestisit kullanımında “bitki büyüme düzenleyicileri” önemli faydalar sağlamaktadır. Pestisitlerin tarihine baktığımızda, 19. yüzyılın sonlarına kadar mekanik ve insani mücadelenin daha baskın olduğu görülmektedir. Bitkilerde yabancı ot kontrolü, demir veya bakır sülfat ve hatta sülfürik asit gibi basit inorganik maddelerin kullanılmasıyla başlamıştır. Bu bileşikler kontrollü bir şekilde uygulanmadığı için çoğunlukla bitki örtüsünün tamamına uygulanmakta ve bunun yüzünden de hem bitkilere, hem doğal hayata, hem de insanlara zararlı etkileri bulunmaktadır. (Buchel, 1977).

Pestisitler, gıdaların tüm üretim ve tüketim aşamaları ile muhafazası sırasında gıdaların üretimini olumsuz etkileyen ve ürünlere zarar veren mikroorganizmaları, böcekleri ve diğer parazitleri öldürmek için üretilmiş ürünlerdir (Özcan, 2003). Bu amaçla tarımda zararlılarla savaşmak amacıyla kullanılmaktadırlar (Öncüer, 1991). Pestisitler; görünüşlerine, fiziksel yapılarına ve kimyasal oluşumlarına, içerdikleri etken maddelere, cins ve grubuna, toksik değerlerine ve kullanım alanlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılırlar (Yönten, 2006). Kaçak yapılaşmanın en büyük sorunlarından biri de yerleşim alanında halen varlığını sürdüren endüstriyel ve tarımsal faaliyetler oluşturmaktadır. Bu durumlardan kaynaklanan kirleticilerin aşırı ve kontrolsüz kullanımı, kontrolsüz arıtma işlemleri nedeniyle atık su kanallarına bırakılması zehirlenmelere neden olmaktadır. Atık suyun içerdiği istenmeyen kimyasallar veya çeşitli arıtma formülasyonları bu ortamda yaşayan organizmaları

tehdit ettiği gibi, gıda kirliliği riski nedeniyle insan sağlığını da tehlikeye atmaktadır. (Gomez vd., 2001).

Günümüzde insanlar pek çok türde toksik madde ile karşı karşıya kalabilmektedir. Bunlardan birisi de pestisit gruplarından oluşmaktadır. Çeşitli yollarla (gıdalarda ve içme suyunda birikmesi gibi) pestisitlerin etkilerine maruz kalındığında, bu toksik maddelerle ilişkili riskler canlılar için olumsuzluklar meydana getirmektedir. (Abdollahi vd., 2004). Bu tehlikelerin başlıcaları ise baş ağrıları, mide bulantısı, cilt ve göz tahrişi ile baş dönmesi gibi kısa süreli etkilerin yanı sıra; astım, kanser, diyabet vb. yaşam boyu süren hastalıklar da görülebilmektedir (Kim vd., 2017). Pestisitlere maruz kalma dört ana yolla gerçekleşmektedir. Bunlar cilt, ağız, gözler ve solunum yollarıdır. Pestisit zehirlenmesi çoğunlukla ağız yoluyla meydana gelmektedir. Bunu daha az oranda deri emilimi takip etmektedir. Uçucu bileşenlerin varlığı nedeniyle yapılan çalışmalar inhalasyon yoluyla maruz kalmanın yüksek risk oluşturduğunu göstermektedir (Lushchak vd., 2018).

Pestisit kaynaklı zehirlenmeler genellikle pestisitlerin üretimi, hazırlanması ve bitkilere uygulanması sırasında maruz kalınabileceği gibi; ayrıca pestisit içeren gıdaların kazara yutulması sırasında da meydana gelmektedir. En yaygın olanı, ilaçlı gıdaların tüketilmesinden sonra ortaya çıkan olgulardan oluşmaktadır. Pestisit zehirlenmesi durumunda; sinir, solunum, kalp-damar, mide ve bağışıklık sistemlerinde pek çok sorun ortaya çıkmaktadır. Gıdalardaki pestisit kalıntılarından kaynaklanan kronik zehirlenmeler sonucunda akciğer hastalıkları, karaciğer ve böbreklerde nekroz görülebilmektedir. Uzun süre pestisitlere maruz kalan kişilerde dolaşım sistemi, karaciğer ve böbrekler gibi iç organların yanı sıra cilt ve gözlerde tahrişe neden olduğu belirlenmiştir (Tatlı, 2006).

Pestisitler çevreye salındıktan sonra belli bir süre içerisinde güneşin etkisiyle parçalanmazsa ya da bakteri aktivitesi ile kimyasal yapısı değiştirilmezse belli bir süre sonra meyvelerin yüzeylerinde birikim gösterir. Toprakta biriken pestisitler belirli bir süre içerisinde topraktaki mikroorganizmaların ve bazı zararlı hayvanların yok olmasına veya etkisiz hale gelmesine sebep olur. Bunun yanı sıra bakır, alüminyum ve kalay gibi ağır metal içeren ürünlerle piyasaya sunulmuş pestisitler uzun yarı ömürlere sahip olduğundan bitkiler tarafından kolaylıkla emilmekte ve

insanlar bu bitkileri tükettiğinde sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Yönten, 2006).

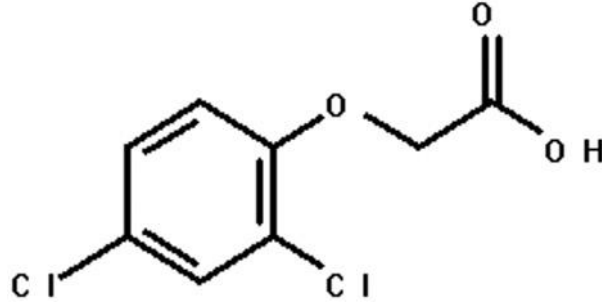
1.1.1. Herbisitler

Zararlı ürünleri ve yabancı otları ortadan kaldırmak için kullanılan tarımsal pestisitlere herbisit adı verilmektedir. Herbisitler bitkiler üzerindeki etkilerine göre iki kategoriye ayrılır: "Türe özgü olmayan (yani tüm bitki türlerini etkileyenler)" ve "türe özgü olanlar" yani yalnızca belirli türler için toksik olanlardan oluşmaktadır. Herbisitler bitkilere etki ettikleri yere ve uygulanma şekline göre üç farklı şekilde sınıflandırılır: Kontakt herbisitler (yaprak ve gövdelerle temas yoluyla bitkilere zarar veren maddeler; örneğin bipiridil grubu), "sistemik herbisitler" "(bitkinin yaprak ve gövde gibi damar sistemine yayılarak bitkilere zarar veren maddeler) köklerle temas ettiğinde bitkinin damarları (örn. klorofenoksiasetik asit türevleri) tarafından hızla emilenler ve son olarak "bitkinin kök sistemi veya "tohum çimlenmesini etkileyen herbisitler" (pentaklorofenol-PCB gibi toprağa karışan ve istenmeyen bitki tohumlarını yok eden maddeler) olarak sınıflandırılır (Vural, 1996).

1.1.2. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)

1.1.2.1. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)'in Genel Özellikleri

2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit), bitki büyüme aktivatörü olarak ilk kez 1942 yılında Zimmerman ve Hitchcock tarafından keşfedilmiş ve 1944 yılında Hammer ve Tukes tarafından herbisit olarak piyasaya sürülmüştür (Yönten, 2006). 2,4-D, geniş kullanım alanına sahip olan fenoksialkanoik asit herbisitlerdendir (Vroumsia vd., 2005; Güngör, 2007). 2,4-D asidi, 2,4-D asit dimetilamin tuzu ve 2,4-D asit isooktilester'in kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 2,4-D'nin kimyasal yapısı (Washington State Department of Ecology, 2001)

2,4-D keşfedildiğinde hormonların biyolojik aktivitesine benzer organik etkiler yaratması beklenirken sonrasında ot öldürücü özellikleri açığa çıkmıştır. Araştırmacılardan Zimmerman ve Hithooock yaptıkları tarla denemelerinde bu ürünün geniş yaprak oluşumuna sahip yabancı otlara karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ancak bu çalışmalar bir süre gizlice yürütülmüştür (Ecevit vd., 1999). Çünkü Amerika; Tarımsal amaçların yanı sıra, Vietnam Savaşı'nda 2,4-D ve 2,4,5-T karışımı bitkileri öldürmek için kullanmıştır (Westing, 1979). 2,4-D, klorofenoksi bileşik ailesine aittir ve beyaz bir toz halinde bulunur. Yaygın olarak amino tuzları ve esterleriyle birlikte kullanıma sunulmuştur. Diklorofenoksi asetik asitin ester formu buharlaşmayla kaybolduğu için, diğer formu olan amin tuzları daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu iki farklı form geniş yapraklı yabancı otlara karşı etkilidir. Ancak ester formu uçucu olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle karma üretim yapılan tarım alanlarında kullanılması önerilmez. Ayrıca farklı coğrafi ulaşım yoluyla buğday yetiştirme alanlarının yakınında bulunan diğer mahsullere de ciddi hasarlar verebilir. Üretime sunulmuş olan ester formları ağırlıklı olarak tahıl tarımının yoğun olarak yapıldığı Anadolu'nun orta, doğu ve güneydoğu bölgelerinde kullanılmaktadır. Ester formlarının yoğun kullanılmasının sebebi ise yabancı otlara karşı daha etkili olması ile açıklanabilmektedir. Bir diğer formu olan amin formları ise daha az etkili olmasına rağmen uçucu olmadıkları için karma yetiştirme alanlarında güvenle kullanıma sunulabilmektedir (Tepe, 1997). 2,4-D; toz, kristaller ve sarı-beyaz bir katı halinde bulunabilir. Aktif olan maddesi serbest asit formudur. Fenoksi herbisitler, amin türevleri, esterler ve tuzlar halinde ticari preparatlarda mevcuttur (Sota vd., 2003; Güngör, 2007).

2,4-D'nin yaygın kullanımı ile birlikte yabancı otların mekanik olarak yok edilmesinin

yerini almıştır. (Khalil, 2003; Kwan ve Chu, 2004). Bitkiler ilaçlamadan sonra 4 ila 6 saat içinde 2,4-D'nin emilimi gerçekleşir. 2,4-D, bitkilerdeki istenmeyen ot oluşumlarının kök ve sürgünlerinin büyüme noktalarına etki ederek büyümeyi engellemektedir (Shankar vd., 2006; Güngör, 2007). Metabolik özelliklerine bakıldığında kullanım alanları şunlardır: Geniş yapraklı bitkiler (Sariot, Gökbaş, Hardal, Köygöçüren, Pelemir, Akhindiba, Arap fasulyesi, Atkuyruğu, Ballıbaba, Çoban Çantası, Bitki Çoban Asası, Demir Diken, Dön Baba, Düğün Çiçeği, Fare Kulağı), Haşhaş, Ayçiçeği, Kavancı Otu, Sirke, Kekre, Mürdüm, Papatya, Sirke, Öküz Dili, Tarla Sarımsağı, Yonca, Ekmek tavşanı, turna gagası, yabani su teresi, kanarya otu, kuş yemi, veneperus tırağı). 2,4-D, bitkiler tarafından kökler ve yapraklar yoluyla emilir, ardından diğer bölgelerine doğru taşınır (Yalçinkaya, 2006).

1.1.2.2. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)'nin Toprakta Emilimi ve Atılımı

2,4-D'lerin uygulandıktan sonra 1-18 ay arasında toprakta kalabildiklerini belirlenmiştir (Öztürk, 1997). Bazı klorofenoksi asitler, bunların tuzları ve esterleri; cilt, göz, solunum ve sindirim sistemlerinde zararlı etkilere neden olmaktadır. 2,4-D sindirim sisteminden yüksek oranda emilirken akciğerlerden emilimi zayıftır. Deri yoluyla emilim ise minimum düzeydedir (Arnold vd., 1989). Klorofenoksi bileşiklerinin yağ dokusunda birikimi oldukça düşüktür. Domuzlara 1 mg/kg dozunda 2,4-D enjekte edildiğinde, 6 ila 8 saat içinde dalakta, kanda, karaciğerde, böbreklerde ve akciğerlerde birikim gösterdiği belirlenmiştir. Ancak beyin ve kas dokusunda düşük seviyelerde biriktiği bulunmuştur. Ayrıca 24 saat sonrasında dokularda 2,4-D tespit edilememiştir. Farelerde ve domuzlarda 2,4-D'nin plasentadan herhangi bir değişikliğe uğramadan geçiş yaptığı belirlenmiştir. Ratların uterus dokusu ile plasenta, fetus ve amniyotik sıvısında %20 oranında 2,4-D tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise tavuk yumurtasında az miktarda biriktiği tespit edilmiştir. (EXTOXNET, 1996). 2,4-D oral olarak uygulanmasından sonra sekiz saat içerisinde yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır (Erne, 1966). İnsanlarda 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 2,4-D emiliminin tam ve hızlı olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada 4 saat sonra plazma konsantrasyonlarında yükselme gözlenirken, benzer bir çalışmada bunun 7 saat içinde ortaya çıktığı rapor edilmiştir. (Kohli vd., 1974; Sauerhoff vd., 1977). Gebe hayvanlarda tek bir herbisit dozunun %17'si plasentayı geçip embriyoya ulaşabilmiştir.

Tüm türlerde 2,4-D'nin idrarla atılımı gerçekleşmektedir. İnsan vücudundaki ortalama yarılanma ömrü 13 ila 39 saattir. 2,4,5-T'nin yarı ömrü 24 saatten oluşmaktadır. Yarılanma ömrü artan dozlarda ve ani toksikasyon olduğu durumlarda uzamaktadır (Prescott vd., 1979; Keller vd., 1994; Ftiesen vd., 1990). 2,4-D'nin ortalama beş gün sonra idrarla insan vücudundan uzaklaştırıldığı yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Feldman vd., 1974).

1.2. Serbest Radikal

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlara sahip olan atomlar veya bileşikler son derece aktiftir ve bu elektronları paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girebilir. Ömürleri kısa, reaktifler, hücrelerde enerji üretmek için solunum yolu gibi birçok reaksiyonla üretilebilen moleküllerdir. Dünya atmosferinde serbest radikal olarak süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, peroksinitrit ve demir, bakır gibi geçiş metalleri bulunmaktadır. Bunların en güçlü oksidanı olan hidroksil radikalının yarı ömrü kısadır ve çoğu biyolojik moleküle zarar verecek şekilde reaksiyona girer. Serbest radikaller canlı organizmalarda birçok farklı nedenden dolayı ortaya çıkabilir. Üretilen serbest radikaller, genetik materyalin yapı taşları olan hücre içi proteinlere, özellikle de membran lipitlerine veya nükleik asitlere bağlanarak yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve hücre hasarına neden olur (Hu vd., 2019).

Bu radikal oluşumları endojen ve eksojen olarak sınıflandırılır. Endojen kaynaklı olanlar, yangısal olguların oluşumu sırasında sitokinlerin salınmasını takiben bu serbest radikallerin üretimini tetikleyen nötrofiller ve makrofajlardır. Benzer şekilde mitokondride serbest radikaller, aerobik solunum sırasında elektron taşıma sistemi tarafından aktiflenen oksijenin yan ürünleri olarak üretilir. Pestisitler, özellikle UV ışınları, X ışınları, gama ışınları, kloroform, alkol ve tütün gibi su kirleticileri de eksojen kaynaklara bağlı serbest radikallere örnek olarak verilebilir (Altınar vd., 2018).

Oksijen yaşamın temel unsurunu oluşturmaktadır. Birçok organik molekülün (hidrojen, kükürt, karbon, nitrojen)'de temelini oluşturmaktadır. Canlı

organizmalarda reaksiyonların oluşumunda oksijen kullanılır. Bunun %90'ı enerji deposu olarak bilinen mitokondride oksidatif fosforilasyonda kullanılır. Mitokondri suda kullanılan oksijenin ortalama %1 ile 3'ü arasındaki bir değeri ROS (reaktif oksijen türleri)'a dönüştürmektedir (Muller vd., 2004).

Oluşan ROS türleri kendi içerisinde üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit radikalleri ve hidroksil radikallerinden oluşmaktadır. ROS türleri son derece reaktif moleküller olduğundan hücrelerin yapı taşı olan lipid, protein ve karbonhidrat yapılarında fonksiyon bozukluklarına neden olurlar. Bu nedenle antioksidan sistem veya antioksidanlar olarak bilinen savunma sistemi, hücre yapılarının zarar görmesini önlemek için mevcuttur. Bu antioksidanlar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar ise endojen (antioksidan enzimler) ve eksojen (vitaminler)'den oluşmaktadır. Antioksidanların başlıca görevi, ROS'u bulunduğu yerden uzaklaştırmak ya da onları daha zararsız moleküllere indirgemektir (Li vd., 2021).

Vücutta oksidan ve antioksidan ilişkisi hep bir denge halindedir. Ancak bazı endojen ve eksojen kaynaklara bağlı olarak ROS'taki artış dengeyi oksidanlar lehine değiştirmeye başlar (Flora, 2007). Bu durumda antioksidanlar oksidan artışını engellemediğinde oksidatif stres diye adlandırdığımız durum ortaya çıkar. Dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stres, hücresel metabolizma sırasında oluşan ROS'un neden olduğu bir patolojidir ve tüm aerobik hücrelerde görülür. ROS miktarının artması ve antioksidan savunma sisteminin detoksifikasyon kapasitesinin azalması nedeniyle serbest radikallerin birikmesi, hücre zarlarının lipid yapısında oksidatif hasara neden olmaktadır.

1.3. Oksidatif Stres

Antioksidan savunma sistemi ile reaktif oksijen türleri arasındaki dengesizliğe oksidatif stres adı verilmektedir. Oksidatif stresin memelilerde ve diğer canlılarda reaktif oksijen türlerini (ROS) ürettiği bilinmektedir. Antioksidanların ROS'u temizlemeye yeterli olmadığı durumlarda vücutta farklı olumsuz durumlar ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif stres aynı zamanda vücuttaki redoks eşleşmesindeki uyumsuzluk olarak da tanımlanabilir. Bu şekillenen uyumsuzluğun nedeninin çok

faktörlü olduğu görülmektedir (DSouza, 2017).

Hava kirleticileri, hücrel metabolik aktivite veya sigara dumanı gibi çevresel faktörler ROS üretimine neden olur. Bundan dolayı yapılarında bulunan eşleşmemiş elektronlar sebebiyle yüksek reaktif moleküller olarak görünür. ROS oluşumunun temel kaynağı, mitokondriyal solunum zincirinden elektronların sızması ve bunların ardından moleküler oksijene aktarılmasıdır. Bu oluşum da süperoksit anyonunun (O_2^-)'e dönüşümüne yol açar. ROS'un kendisi, O_2 üreten nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimini aktive ederek üretilen nitrik oksit (NO) fizyolojik üretimini artırır ve endotelial fonksiyon bozukluğu durumunda, peroksinitritin enzimatik oksidasyonu yoluyla NO üretimini nötralize eder. Çoklu doymamış yağ asitleri metabolize edildikten sonra malondialdehit (MDA) dahil olmak üzere lipid peroksidasyonunun birçok son ürününün üretilmesine sebep olur (Rehman ve Akash, 2017).

Bunun yanı sıra ROS redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin yukarı regülasyonu ve histon asetilasyonunu değiştirerek kromatinin yeniden düzenlenmesi yoluyla çeşitli genlerin ekspresyonunu da etkiler. Redoks durumunun düzenlenmesi organın hayatta kalması, aktivasyonu, çoğalması ve işlevi için gereklidir. ROS ara maddeleri olan süperoksit ve hidroksil radikallerinin yanı sıra hidrojen peroksit ilave olarak pek çok radikal oluşumu lipid ve protein peroksidasyonu ve nükleik asit hasarı başta olmak üzere direkt olarak hücrel tahribat oluşturabilir (Manda vd., 2009). Oksidatif stres, antioksidanların tükenmesiyle başlar ve oksidan reaktiflerin birikiminin zamanla artması nedeniyle oksidan ve antioksidan arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar. Oksidatif stres başladığında hücreler, birçok mekanizmayı aktifleyip; yapısal proteinleri kodlayan genleri aktive ederek veya inhibe ederek oksidatif etkileri ortadan kaldırmaya ve redoks dengesini eski sağlıklı durumuna döndürmeye çalışır (Dalton vd., 1996). Vücuttaki daha yüksek ROS üretimi DNA'nın yapısını değiştirebilir. Bu, protein ve lipid modifikasyonları yoluyla pro- ve anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artmasına ve ayrıca çeşitli transkripsiyon faktörlerinin stres kaynaklı aktivasyonuna yol açar. Bununla birlikte oksidatif stres aynı zamanda doku hasarının ve hatta esas olarak nekroz, apoptoz ve inflamasyon mekanizmaları yoluyla meydana gelebilen hücre ölümünün de önemli bir nedenidir. Ayrıca yaşlanma sürecini de hızlandırır ve birçok farklı dejeneratif değişime neden olur (Sies vd.,

2020).

Tarımda yaygın olarak kullanılan UV ışınları, kimyasallar ve pestisitler strese neden olabilir. Bu oluşan oksidatif stres, lipitler, modifiye proteinler, DNA ve moleküler ağırlıklı antioksidanlar dahil olmak üzere ROS'un indüklediği hücresel bileşenlerdeki yüksek veya düşük değişiklikler yoluyla izlenebilir (Lushchak vd., 2018). Fazla oluşan hidroksil radikalleri ve peroksinitrit, lipit tabakasının hasarına yol açabilir ve dolayısıyla hücre zarlarına ve lipoproteine zarar vererek kan ve dokularda malondialdehit (MDA) bileşiklerinin oluşumuna sebep olabilir. Radikaller, hızla yayılan lipit peroksidasyonuna neden olur ve çok sayıda lipit molekülünü etkiler. LPO, serbest radikal ara ürünleri oluşturmak ve yarı kararlı peroksitler oluşturmak için lipitlerin ve oksijenin direkt reaksiyonunun oluşmasına neden olur (Pizzino vd., 2017). Patolojide hücre boyutunda inceleme yapıldığında serbest radikal mekanizması, toksisitede ve hücre zarı bütünlüğünün kaybında önemli bir faktör olan fosfolipidlerin parçalanması yoluyla doku dejenerasyonuna ve nekrozuna neden olmaktadır (Forman ve Zhang, 2021)

1.4. Nekroz ve Apoptoz Tanımı

Birbirinden iki farklı yol ile hücreler ölüme sürüklenmektedir. Bu yöntemler ise apoptoz ve nekrozdur. Nekroz terimi; O₂ eksikliği, sıcaklık değişiklikleri, çeşitli zehirlenmeler gibi hücre dışındaki faktörlere maruz kalma sonucu oluşabilecek çeşitli fiziksel ve kimyasal sebeplere bağlı olarak oluşabilecek travmatik olaylar nedeniyle oluşan hücre ölümleridir. Apoptoz, metabolizma için gerekli olmayan, biyolojik işlevini tamamlamış veya hasar görmüş hücrelerin zararsız bir şekilde yok edilmesini sağlarken aynı zamanda genetik olarak da ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümü sürecidir. Nekroz ise; patolojide tanım olarak kabul edilir (Thompson, 1999). Apoptoz, kelimenin tam anlamıyla bir ağacın yapraklarının dökülmesini tanımlayan latince bir terimdir. Apo, farklı; pitoz ise düşme anlamına geldiği kabul edilir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalara göre günümüzde apoptoz olarak bilinen tanım, çeşitli yönleriyle canlılardaki metabolik olayların bir fonksiyonunu oluşturan döngü olarak kabul görmektedir.

Apoptoz olgusu, metabolizmaya zarar veren hücre ve yapıların ortadan kaldırılmasında, embriyonik gelişim aşamasındaki farklılaşmada, savunma sisteminin gelişim aşamasında, inflamatuvar sürecin çözülmesinde, organ ve sistemlerdeki hücrelerinin kontrolünde, fonksiyonel ve sistemik yıkımda önem kazanmaktadır. Hasarlı hücreler, vücudun homeostazisinin devamlılığında ön plana çıkmaktadır. Bu fonksiyonların bozulması organ fonksiyonlarını yavaşlatabilir ve tümörlerin oluşmasına neden olabilir. Nekroz ve apoptozun hücre ölümünü tetikleme yöntemleri olarak tanımlanmasına rağmen, iki ölüm tipinin histopatolojik ve fizyolojik nedenleri arasında farklılıklar vardır. Nekrozun kendine özgü bir özelliği de ölümün hücre gruplarında meydana gelmesidir. Nekrozun en fazla karşılaşılan nedeni oksijen eksikliğidir. Aynı şekilde arsenik ve kadmiyum gibi ağır metaller, tarım ilaçları ve siyanür gibi toksik ürünler de nekroza neden olmaktadır. Nekrotik olaylar zinciri, hücre geçirgenliğinin arttırılmasında rol oynarken, hücrelerin ve organel yapılarının parçalanmasına ve ardından sitoplazmanın ve nükleer bütünlüğün hücreler arasındaki boşluklara salgılanmasına neden olur (Özoran, 1992). Hücre ölümünden sonra, temel faktörlerin hücreden hücreler arası boşluğa salgılanması ile inflamasyona neden olabilir. Bu olayın asıl özelliği makrofaj ve nötrofil dediğimiz inflamatuvar hücrelerin nekroz olmuş bölgeye göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder ve yangı oluşumunda nekrozun önemli bir işareti olarak kabul edilir. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon olmadan gerçekleşen, düzenlenen, genetik olarak programlanan, protein ve enerji sentezi gerektiren, metabolik dengeyi sağlayan bir olay olarak kabul edilmektedir. (Öztürk, 2002).

Bazı hastalık durumlarında da apoptoz görülebilmektedir. Aşırı apoptoz, nörodejeneratif değişikliklere, AIDS'te görülen lenfosit kaybına, malignitelerin ve otoimmün lezyonların azalması gibi durumlara neden olur. Embriyonik ve fetal gelişim sırasında normal gelişimi tamamlayan bazı hücreler apoptoza yönlendirilir. Derinin keratin hücreleri dermisten epidermise doğru hareket ederek epiderminin en dış tabakası olan stratum korneum katmanını oluşturur. Tümörlerde gerileme aşamasında hücreler ölmektedir. Çalışmalar apoptozun Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, reperfüzyon hasarı, hepatit ve otoimmün hastalıklarda yaygın olarak karşılaşıldığını göstermiştir. (Guerrero ve Arias, 2001).

1.4.1. Apoptoziste Meydana Gelen Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz tanımı, hücreden içsel veya dışsal olarak gelen iletilerle tetiklenen ve takip edilen olaylar bütünü olarak nitelendirilebilmektedir. Sonunda hücrenin fagositozuyla sona erer. Programlanmış hücre ölümü, hücre içi proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ile başlar. Bu süreç, hücrede çeşitli biyokimyasal, fiziksel ve histopatolojik değişikliklere yol açar ve son olarak fagositoz ile tamamlanır. Bir hücrede apoptozun gerçekleşebilmesi için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçiren bir sinyal ile karşılaşması gerekir (Thompson, 1999).

1.4.1.1. Tümör Nekrozis Faktör Süperailisi Reseptörleriyle Hücre Dışından Kaynaklanan Apoptozis

Hücre yüzeyindeki reseptörleri, değişik reseptörleri aktive ederek hücre fonksiyonunda değişikliklere neden olabilir (Franco vd., 2009). Hücre yüzeyi reseptörleri de hücre ölümüne sebep olabilir. Apoptoza bağlı olan önemli bir grup reseptör, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) olarak adlandırılır. Bu reseptör ailesinin en az 19 üyesi bulunmaktadır. Bu reseptörlerin biyolojik işlevleri çeşitlidir; bazıları hücre ölümüne (apoptoz) yol açarken, diğerleri hücre çoğalmasını (proliferasyon) teşvik eder. Her ikisinin de görülebildiği durumlar bulunmaktadır (Thompson., 1999). Apoptozdan sorumlu en önemli TNFR reseptörleri Fas ve TNFR1'dir. Uyarıyı aldıktan sonra hücrenin sitoplazmasının bazı kısımları adaptör proteinlere tutunmaya çalışır. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine bağlandığında apoptotik mekanizmaları harekete geçirir ve sinyali hücre dışından hücre içine iletir. Bu yollardan en önemlisi Fas proteindir. Fas, sadece Fas ligandı (FasL) adı verilen hücre dışı bir sinyal tarafından başlatılır. FasL, Fas'a bağlandığında kaspaz 8'i aktive eder ve kaspaz zinciri bu sürece dahil olur (Guerrero, 1998).

1.4.1.2. Hücre içinden kaynaklanan ve mitokondriyal yol aracılığıyla düzenlenen apoptozis

Mitokondri, hücre içindeki iletilerle başlatılan apoptozda önemli bir rol oynar. Sinyal yolu, dış mitokondriyal membranın geçirgenliğinin artmasına yol açar. Bu zarın geçirgenliğine de çeşitli proteinler eşlik eder. Bunlardan en önemlileri Bcl-2 grubu proteinleridir. Bu gruptaki bazı proteinler anti-apoptotik, diğerleri ise pro-apoptotik

olarak sınıflandırılır (Gastman, 2001). Bcl-2 proteininin anti-apoptotik olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin dış zarına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör 1'e (apaf 1) bağlanarak çalışır. Hücre içindeki apoptotik yol, APAF 1'in mitokondriyi terk etmesine sebep olur. Bu ayrışma sonucunda dış mitokondri zarının geçirgenliği artar. Artan geçirgenlik, mitokondrinin iki zarı arasındaki sitokrom c'nin sitozole bölünmesine neden olur. Apoptoz hücrede sitokrom c'nin salınmasıyla başlar. Sitokrom c, sitoplazmada Apaf 1, kaspaz 9 ve adenosin trifosfata (ATP) bağlanma eğilimindedir. Bu yapıya apoptozom adı verilir. Apoptozomlar, sonlandırma kaspaz olarak bilinen kaspaz 3 reaksiyonunu başlatarak apoptozu indükler (Gastman., 2001). Apoptoz ayrıca viral enfeksiyonlara karşı ana savunma mekanizması olarak kabul edilen sitotoksik T hücreleri (CTL'ler), virüsle enfekte olmuş hücrelerde apoptozu uğrama eğiliminde olduğunda da ortaya çıkar (Mountz ve Zhou, 2001). Yabancı antijenleri tespit ettiklerinde yüzeylerinde FasL oluşur ve hedef hücreler Fas reseptörlerine bağlanır. Sitotoksik T hücrelerinin sitoplazmik bölgesinde, sonuçta apoptozu indükleyen granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen proteinleri içeren sitoplazmik granüller bulunur. Perforin, transmembran gözenek oluşturan bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin yüzeyinde gözenekler oluşturarak granzim B'nin sitoplazmalarına salgılanmasına neden olur. Granzim B hedef hücrelere eklenir ve kaspazları aktive eder (Mountz ve Zhou, 2001). Hücre apoptozunu indükleyen iç veya dış uyaranlara bağlı olarak hücrede DNA hasarı olduğunda belirli genetik bölgeler aktive olur. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Bu gen aynı zamanda apoptozdan sorumlu gen olarak da bilinmektedir. Normalde aktif olmayan p53 geni, DNA hasarı olduğunda aktifleşerek p21 geninin aktif hale gelmesini sağlar. Bu p21 geni hücrelerin S fazına girmesini G1 fazının sonunda durdurarak engellemesine sebep olur. Bunun sonucunda hücre döngüsü bozulur ve DNA hasarlı hücrelerin çoğalması engellenir (Mountz ve Zhou, 2001). p53 geni DNA onarım proteinlerinin transkripsiyonunu indükler. Bu proteinler DNA hasarını ortadan kaldırırsa hücre döngüsündeki bozulma da ortadan kalkar. Hücre hasarının onarımı istenilen oranda gerçekleşmezse, p53 geni Bax proteinini (bir grup apoptotik BCL-2 proteini) aktive ederek mitokondri ile birlikte apoptoz ve hücre ölümüne neden olur. Bu sayede DNA'sı zarar görmüş hücreler yok edilir (Ferri, 2001).

1.4.2. Apoptozu Ortaya Çıkarma Yöntemleri

Apoptoz, temel hücre fonksiyonuna dayanarak veya fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak hücredeki DNA kırılmalarının tespit edilmesiyle belirlenebilir. Hücre morfolojisine bağlı olarak floresan bazlı boyalarla (Hoechst boyası, DAPI, propidyum, iyodür) floresan ataçmanlı mikroskop ile incelendiğinde, kültür ortamında üremiş olan hücreleri test etmek için faz kontrast mikroskobu da kullanılarak belirlenebilmektedir. Apoptotik hücrelerdeki farklılıklar yine faz kontrast mikroskobu ile belirlenebilir. Işık mikroskobu altında ayrıntılı olarak incelendiğinde apoptotik hücrelerin benzersiz özellikleri arasında sitoplazmanın azalması ve çekirdekteki değişiklikler yer alır. Bunlar, kromatinin nükleer membran etrafında birikmesi, çekirdeğin büzülmesi ve birçok parçaya bölünmesi sonucu oluşan morfolojik değişikliklerdir (Schneider ve Tschoop., 2000). Elektron mikroskobu kullanarak çekirdek ve hücre organelleri düzeyinde apoptozdaki farklılıklar tespit edilebilmektedir.

1.4.2.1.TUNEL yöntemi kullanılarak DNA parçalanmasının tespiti

Belirli nükleotidlerin tek veya çift sarmallı DNA kırıklarına bağlanmasına dayanan bir yöntem olarak bilinmektedir. Apoptoz oluşmuş hücrelerin DNA'sı hızla parçalandığından, hücre içindeki kromatinin bütünlüğü bir anda kaybolur ve 3'-OH içeren DNA parçalarının sayısı artar. Hücrelerde, Tdt enzimi (terminal deoksिनükleotidil transferaz), ortama eklenen dUTP biyotini parçalanmış DNA fragmanlarının serbest 3'-OH uçlarına bağlanmasına neden olur. Biotin etiketli DNA fragmanları, ortama FITC gibi bir floresan ajanla birlikte avidin eklendiğinde belirgin hale gelir (Hilton vd., 1997).

1.4.2.2. In situ hibritizasyon tekniği kullanılarak belirleme

Bu, apoptozu belirlemek için etiketli bir poli(A) probu kullanılarak gerçekleştirilen yöntem olarak bilinir. Apoptotik DNA'sı bulunan hücrelerin formalin denatürasyonuna hassasiyetinin tespit edilmesi ve bunların parafine gömülmüş dokularda incelenmesi prensibine dayanmaktadır (Hilton vd., 1997).

1.4.2.3. Anneksin V Tekniği Kullanılarak Belirleme

Hücre zarının sitoplazmik tarafında fosfatidilserin bulunur. Hücrenin apoptoza uğrama eğilimi varsa iç yüzeyinde yer alan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzeyine aktarılacaktır. Bu, floresan etiketli Annexin V (örn. FITC) kullanılarak fosfatidilserinin görünür karakterlere dönüştürülmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilir ve floresan mikroskobu kullanılarak incelenebilir (Hilton vd., 1997).

1.4.2.4. Apoptoza özgü proteinlerin belirlenmesi

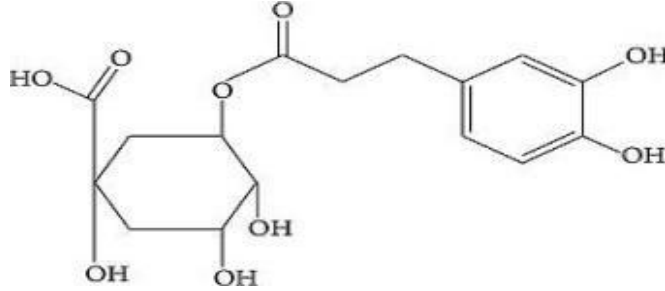
Bu yöntem, kaspazlar gibi yalnızca aktif olan veya apoptotik hücrelerde eksprese edilen belirli proteinlerin (örn. Bcl-2 vb.) dokularda Western blot veya immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak tespit edilmesine dayanan bir yöntemdir.

1.5. Klorojenik Asit

Fenolik bileşikler, oksidan ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengeyi koruyarak insanlarda oksidatif stresle mücadelede önemli bir rol oynarlar. Aromatik halkalarına birden fazla hidroksil grup bağlanmış olan fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler ve tanninler olarak sınıflandırılabilir. Fenolik asitler, benzoik asit ve sinamik asit türevleridir. En yaygın hidroksisinnamik asitler arasında kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asit bulunur. Hidroksisinnamik asitlerin ana temsilcisi olan klorojenik asit, kafeik asit ve kinik asidin bir esteri olarak fenolik bileşiklerin önemli bir sınıfını oluşturur (Van, 2016).

Gıda endüstrisinde kullanılan kimyasal koruyucuların olumsuz sağlık etkilerine dair artan kaygılar, doğal ve bitkisel maddelere olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. Fenolik asitler, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri nedeniyle çeşitli faydalı kullanımları ile son dönemde araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir (Naveed vd, 2018). Klorojenik asit, kahve ve çay gibi içeceklerle bol miktarda tüketilen ve en iyi bilinen fenolik asit bileşiklerinden biridir (Farah ve de Paula Lima, 2019). Ayrıca yeşil kahve çekirdekleri, kakao, dut meyveleri, turuncgiller, elma, patates ve diğer tarım ürünlerinde de bulunan bir polifenolik bileşiktir (Al-Rasheed vd., 2016). Oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda terapötik veya

koruyucu rol oynadığı birçok deneysel hayvan modeli çalışmasında rapor edilmiştir (Feng vd., 2016; AL-Megrin vd., 2020; Dkhil vd., 2020). İn vitro bir çalışmada, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH) analizi ile güçlü bir serbest radikal süpürücü özelliği ortaya konmuştur (Kataria ve Khatkar, 2019).



Şekil 1.2. Klorojenik asitin kimyasal yapısı (Naveed vd., 2018)

Son yıllarda klinik ve bilimsel çalışmalar klorojenik asitin; lipid ve glukoz metabolizmasında etkili olduğunu, kardiyovasküler hastalıklarda, karaciğer hasarında ve nörotoksisite tedavisinde başarılı sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Klorojenik asit veya metabolitlerinin kan-beyin bariyerini geçerek nöroprotektif sonuçlar ürettiği bildirilmiştir. Mantarlar, bakteriyel toksinler, farmasötikler, metaller, pestisitler vb. gibi çeşitli kimyasalların neden olduğu toksisitelere karşı da klorojenik asitin koruyucu etkileri bulunmaktadır (Rashidi vd., 2022).

Klorojenik asit, vücutta antioksidan aktivite başta olmak üzere antibakteriyal, antienflamatuar ve antipiretik etkilere sahiptir (Ji vd., 2013; Naveed vd., 2018). Klorojenik asitin antioksidan aktivitesi, orto-dihidroksil veya 4-hidroksi-3-metoksil grubunun varlığına bağlanmıştır. Klorojenik asitin antioksidan etkisi ile radikal yakalama etkinliği iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Birincisi serbest radikalin klorojenik asitten bir hidrojen atomu çıkardığı hidrojen atomu transfer reaksiyonu; ikincisi serbest bir radikalin klorojenik asite bağlanarak ara ürün ürettiği eklenti oluşumudur (Rashidi vd., 2022). Klorojenik asitin oluşan oksidatif stresi azaltmak için antioksidan enzim düzeyini yukarı regüle ederek ROS aracılığıyla üretilen NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivasyonlarını baskılar. (Yun vd., 2012). Antienflamatuar etki olarak da Nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim ve IL-6, IL-1 β , TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin düzeyini

azaltır (Hwang vd.,2014 92).

Klorojenik asit, hücreleri iki ayrı mekanizma yoluyla etkiler. Oksidatif stresten hasar görmüş hücrelerde, antiapoptotik sinyal üretimini desteklerken; kanser hücrelerinde apoptotik sinyal üretimini tetikler. Hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rolü olan siklin D1 ekspresyonunun ise klorojenik asit tedavisi sonrasında belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Kronik myeloid lösemi (KML) hücre hatlarında ise sağlıklı hücrelerin tersine apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile ters farmakolojik etki görülmüştür (Luo vd., 2020; Liu vd., 2013; Domitrović vd., 2014).

Doğal ve bitkisel ürünler; güvenli, yüksek etkinlik ve düşük maliyet gibi özelliklerinden dolayı tercih edilen önemli antioksidan kaynaklarıdır. Klorojenik asidin farklı ksenobiyotiklere karşı terapötik ve/veya/koruyucu etkinliğini gösteren çalışmalar vardır. Ancak tarım alanlarında ve bahçe bitkilerinde yabancı otlara karşı mücadele amacıyla en çok kullanılan bir herbisit olan 2,4-D'nin ratlarda oluşturduğu oksidatif hasara karşı klorojenik asitin kullanımlarının terapötik etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya daha önce hiç rastlanılmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada 2,4-D ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda kan ve dokulardaki hasara bağlı oksidan/antioksidan denge, biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler üzerine klorojenik asidin kullanımının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araç ve Gereçler

Ependorf tüpü (1,5 mL'lik, Roth) Cerrahi eldiven (Dolphin) Polietilen enjektör (5 mL, Ayset)

Spekrofotometre (Shimadzu 1601 Uv-Visible)

Mikrotom (Leica, RM 2245)

Su banyosu (Leica, HI 1210)

Değişik hacimlerde otomatik pipet (Socorex-Acura 825; 10–100 µl; 100– 1000 µl)

Sarı ve mor kapaklı kan tüpleri (Isolab)

Cam malzemeler [Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), mezür, tüp]

Cerrahi malzemeler (pens, makas)

Distile su cihazı (GFL, 2202) Buzdolabı (Beko, .D 8459 SM)

Derin dondurucu (Uğur, UDD300BK)

Santrifüj (Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio) Vorteks (IKA, MS2)

Hassas terazi (Precisa 205 ASCS) Su banyosu (Nüve BM 402)

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica) Dijital pH metre (Inolab, WTW)

Etüv (Thermo, Heraterm)

Işık mikroskobu (Nikon, Eclipse Ci, .Tokyo, Japan)

Kamera (Nikon DS Fİ3, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan)

2.1.2. Hayvan Materyali

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden 6-8 haftalık, 200/250 g ağırlığında 28 adet sağlıklı erkek Sprague-Dawley sıçan temin edildi. Hayvanlar oda sıcaklığında (25°C) ve bağıl nemde (%50-55) standart rat yemi ve su ile 12 saatlik karanlık/aydınlık periyotta tutuldu. Sıçanlara standart rat yemi ve

su ad libitum olarak verildi. Deneye başlamadan önce ratlar çevreye uyum sağlamaları için en az 7 gün tutuldu. Yapılan bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Yerel Etik Kurul'undan 13.09.2022 tarih ve 60758568-020-255262 sayılı onay alınarak başlandı (EK-1).

2.2. Metot

2.2.1. DeneySEL Aşama

2.2.1.1. Deney Aşamasının Planlanması ve Uygulanması

Yapılan çalışmanın deney hayvanlarıyla çalışılacak kısmı 28 gün olarak uygulanmıştır. Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Merkezinden temin edilen 10-12 haftalık yaşta 28 dişi sıçan (yaklaşık 300-350gr), her grupta 7 sıçan olacak şekilde rastgele örnekleme metodu ile 4 gruba ayrılmıştır. Serum fizyolojik içinde süspansiyon halinde hazırlanan 2,4-D için uygulanan dozlar LD 50'sinin ($> 2000 \text{ mg/kg}$) $1/40$ 'ı (50 mg/kg) (Gorzinski ve ark., 1987) ve klorojenik asit 10 mg/kg (Tanyeli, A. ve Güzel, D., 2018) oranları kullanılmıştır. Bu dozlar 28 gün süresince hergün tek doz halinde toplam hacim 2,4-D ve klorojenik asit için $0,5 \text{ ml}$ miktarda olacak şekilde uygulanmıştır. Gruplar ve yapılan uygulamalar detaylı bir şekilde aşağıda belirtilmiştir.

Grup I- Kontrol grubu- İçme suyu ve standart rat yemi verildi. Serum fizyolojik $0,5 \text{ ml}$ gastrik gavaj ile uygulandı.

Grup II- Klorojenik asit grubu- Klorojenik asit salin solüsyonunda çözdürüldü ve 10 mg/kg dozunda $0,5 \text{ ml}$ miktarında gastrik gavaj ile oral olarak verildi. (Tanyeli ve Güzel, 2018).

Grup III- 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit grubu 50 mg/kg -2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit 500 g/L 'den alınıp 50 mg/kg dozunda hesaplanarak $0,5 \text{ ml}$ miktarında gastrik gavaj ile verildi. (Gorzinski vd., 1987; Kalıpcı, 2011).

Grup IV- 2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) 50 mg/kg + Klorojenik Asit- 10 mg/kg grubu-2,4 D (Diklorofenoksi Asetik Asit) 50 mg/kg dozunda 500 g/L 'lik solüsyondan alınıp sulandırılarak $0,5 \text{ ml}$ miktarında; klorojenik asit ise 10 mg/kg dozunda salin solüsyonunda çözdürülerek $0,5 \text{ ml}$ miktarında gastrik gavaj ile uygulandı.

2.2.1.2. Deney Aşamasının Sonlandırılması

28 günlük deney süresinin bitiminden sonra sıçanlara kas içinden ksilazin 87 mg/kg ve ketamin 13 mg/kg dozunda kas içi enjeksiyon yapıldı. Ksilazin ile preanestezi, ketamin ile genel anestezi sağlandı. Biyokimyasal ve histopatolojik analizlerde kullanılan dokular için hayvanlar servikal dislokasyonla yaşamlarına son verilerek karaciğer, böbrek, beyin, kalp, ve ovaryum dokuları alındı. Bu dokular % 0,9 NaCl ile yıkanıp sonra boş tüplere yerleştirildi.

2.2.2. Kalpten Kan Örneği Alınması ve Alınan Numunelerin Muhafaza Edilmesi

Anestezi uygulandıktan sonra, göğüs kafesi açılarak kalpten etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren enjektörle 3-4 cc kan alındı. Toplanan kan örnekleri, yaklaşık yarım saat içinde 4°C’de 20 dakika süreyle 3000 devirde santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra plazma ve serum örnekleri ayrı ayrı eppendorf tüplerine alındı ve analizler yapılincaya kadar -80°C’de saklandı. Kan alma işlemi tamamlandıktan sonra, ratların karın bölgesi cerrahi metotlarla açılarak karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokuları örnek tüplerine aktarıldı. Bu dokuların bir kısmı biyokimyasal analizler için -80°C’de muhafaza edildi, kalan kısmı ise histopatolojik inceleme için % 10’luk formaldehitli kavanozlara yerleştirildi. Dokular alındıktan sonra geri kalan hayvansal atıklar tıbbi atık ünitesinin sağladığı özel ambalajlara konularak uygun şekilde imha edilmek üzere tıbbi atık ünitesine bırakıldı.

2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler

2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu

Hazırlanmış olan dokular 0,5 g olarak tartılmış ve üzerine 50 mM olacak şekilde 5 ml miktarında pH’sı 7’ye ayarlanmış soğuk KH₂PO₄ ilave edilmiştir. Ardından mekanik ve ultrasonik homojenizatör kullanılarak bir örnek parçalanması yani homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben dokular 3000 devirde

20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve üstte birikim gösteren süpernatantlar tüm biyokimyasal işlemlerde kullanılmıştır.

2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Tam kan santrifüj edilip plazmaları ayrıldıktan sonra geriye kalan eritrosit bütünlüğünün üzerine eşit miktarda olacak şekilde KH_2PO_4 tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Sonrasında 5 dakika santrifüj edilmek suretiyle bu işlem en az üç kez tekrar edilmiştir. Bu işlemi takiben üzerindeki sıvı alınarak kalan eritrosit yoğunluğundan 0,5 ml alınarak aynı oranda (0,5 ml) hazırlanmış 0,5 ml KH_2PO_4 solüsyonlarıyla karıştırılarak eppendorflara aktarılmıştır. Kullanılincaya kadar da -80°C de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman buzdolabındaki bu eppendorflar alınarak hemolizat hazırlanması için eritrosit paketinden 0,8 ml alınarak üzerine soğuk distile su ilave edilmiştir. Bu hazırlanan hemolizatlar SOD ve CAT ölçümleri için kullanılmıştır (Winterbourn vd., 1975).

2.2.3.3. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA kanda Draper ve Hardley (1990) ve dokuda ise Ohkawa vd, 1979 da belirlediği yöntemlere göre ölçülmüştür. Kanda yapılan bu metodta MDA, TBA ile reaksiyona girer ve 532 nm boyunda spektrofotometrede absorbans değerinin okunması prensibine dayanmaktadır. Kanda MDA ölçülürken aşağıda verilen metod kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler:

% 10'luk Trikloroasetik asit (TCA): 10g miktarındaki TCA 100 ml distile suda çözündürülmüştür.

%0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): Öncelikle TBA 1g miktarındaki NaOH 500 ml distile suda çözündürülerek işleme başlandı. Sonra 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözündürülmüştür.

Deneyin Yapılması:

0,5 ml miktarındaki eritrosit paketi üzerine 2,5 ml % 10'luk TCA eklenerek işleme başlandı. 0,5 ml eritrosit paketi üzerine 2,5 ml %10'luk TCA eklendi. Homojen bir karışım elde edildikten sonra 10 dakika kaynatıldı. Bunu takiben hemen soğuk suya alınarak soğutma işlemi tamamlandı ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek berrak hale gelmiş olan homojenattan 2 ml miktarında deney tüpüne aktarılmıştır. Bunun üzerine de % 0,8'lik TBA eklenerek 10 dakika kaynatma işlemi yapılmıştır. Sonra tekrar buz kalıpları ile soğutularak elde edilen pembe renkli kısım 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede distile suya karşı ölçüm işlemi tamamlanmıştır.

Dokuda MDA ölçümü (Ohkawa vd, 1979'a göre)

Kullanılan Çözeltiler:

1.50 mM KH_2PO_4 : 3,4 g KH_2PO_4 hassas terazide tartılarak 500 ml'ye tamamlandı.

2. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 2,02 g SDS hassas terazide tartılarak 250 ml distile suda çözdürüldü.

3. Glasiyel asetik asit: %20'lik glasiyel asetik asit tekniğine uygun oranda hazırlanmıştır

4. % 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): 1 g TBA NaOH içeren beherde 500 ml'lik distile suda çözdürüldü.

5. N butanol-pirin karışımı: 750 ml n- butanol 50 ml piridinle karıştırılarak hazırlanmıştır.

Metodun Uygulanması:

Dokulardan elde edilmiş olan süpernatanttan 0,2 ml alınarak temiz bir deney tüpüne aktarılmıştır. Bunun üzerine sırasıyla; 0,2 ml % 8,1 lik SDS, 1,5 ml % 20 lik glasiyel asetik asit, 1,5 ml % 0,8 lik TBA konuldu ve 0,6 ml distile su ile birlikte karıştırıldı. 100°C'lik ısıtılmış suda 1 saat kaynatma işlemine tabi tutuldu. Süre dolduktan sonra soğuk suda soğutma işlemi uygulandı. Bunun üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol-piridin karışımı eklendi ve çalkalandı. Santrifüje aktarılarak 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek sonrasında oluşan pembe renk 532 nm'lik dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm işlemi tamamlandı.

2.2.3.4. Glutasyon (GSH) Tayini

5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sülfidril grupları ile reaksiyona girerek sarı renkli bir disülfid kompleksi oluşturur. Bu kompleksin absorbansı, 412 nm'de spektrofotometre ile ölçülerek GSH miktarı belirlenir (Beutler vd., 1963). GSH tayini, dokularda ve eritrosit paketlerinde aşağıdaki yöntemle yapılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: 5 g metafosforik asit, 1 g EDTA ve 90 g NaCl, 300 ml distile suda çözülmüştür.

Fosfat çözeltisi (0,3 M): 40,02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 ml distile suda çözülmüştür.

DTNB çözeltisi: 40 mg DTNB, 100 ml sodyum sitrat çözeltisinde çözülmüştür.

GSH standardı: 10 mg GSH, 25 ml distile suda çözülmüştür.

Uygulanan Yöntem:

- 1.0,2 ml doku homojenatından veya eritrosit paketinden örnek alınır.
- 2.Üzerine 3 ml çöktürücü eklenir, karıştırılır ve 5 dakika bekletilir, ardından adi süzgeç kâğıdından süzülür.
- 3.1 ml filtrat başka bir tüpe alınır. Üzerine 4 ml fosfat tamponu ve 0,5 ml DTNB çözeltisi eklenir, iyice karıştırılır.
- 4.Karışım, 412 nm'de 10 dakika boyunca spektrofotometre ile ölçülür.
- 5.Standart tüpünde doku homojenatı yerine 0,2 ml GSH standardı kullanılır.
- 6.Kör tüpüne 2 ml distile su ve 3 ml çöktürücü eklenir, sonra adi süzgeç kâğıdından süzülür.

2.2.3.5. Süperoksid dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi, ortamdaki nitroblue tetrazolium (NBT) indirgeme reaksiyonunun, numunelerdeki SOD ile indirgenme prensibine dayanır. Bu süreçte, süperoksid grupları ksantin oksidaz enzimi ile reaksiyona girerek maddeyi indirger ve 560 nm'de absorbans gösteren formazon yapısını oluşturur. Ortama eklenen SOD enzimi, süperoksid gruplarını dismutasyona uğratarak NBT indirgeme reaksiyonunun hızını yavaşlatır. Sonuç olarak, spektrofotometredeki absorbans değeri düşer (Sun vd., 1988). Bu aktiviteyi ölçmek için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PSB): 1 litre tridistile suda 8,06 g NaCl, 0,201 g KCl, 12,636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,2 g KH_2PO_4 çözülüp pH 7,4'e ayarlanmıştır.

Ksantin Stok Çözeltisi (3 mmol/l): 23 mg ksantin, 50 ml'lik balon jojede, 5 ml 0,1 N NaOH ile hafifçe ısıtılarak çözülmüş ve distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanım öncesi 10 kat sulandırılır.

EDTA Çözeltisi (0,6 mmol/l): 0,249 g EDTA (dihidrat), distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Nitroblue Tetrazolium (NBT) Çözeltisi (150 mmol/l): 12,3 mg NBT, 100 ml'lik balon jojede distile su ile çözülüp hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Na_2CO_3 Çözeltisi (400 $\mu\text{mol/l}$): 4,2 g Na_2CO_3 , 100 ml'lik balon jojede distile su ile çözülüp hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sığır Albümini Çözeltisi (1 g/l): 100 mg sığır albümini, 100 ml'lik balon jojede distile su ile çözülüp hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

CuCl_2 Çözeltisi (0,8 mmol/l): 10,7 mg CuCl_2 , 100 ml'lik balon jojede distile su ile çözülüp hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enziminden 20 μmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırılmıştır.

Reaktif Karışım: 20 tüplük analiz serisi için, 100 ml'lik bir erlen içerisinde 20 ml 10 kat sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır.

Uygulanan Yöntem:

- 1.Kör ve test tüplerine sırasıyla 2,45 ml reaktif karışımı eklenir.
- 2.Kör tüpüne 0,5 ml distile su, test tüpüne ise 0,5 ml numune ilave edilir.
- 3.Her tüpe 50 μl ksantin oksidaz ekleyip sonrasında karıştırılır.
- 4.Tüpleri 20 dakika boyunca 20°C'de su banyosunda inkübe edilir.

5.İnkübasyon sonunda tüplere 1 ml CuCl_2 eklenir, böylece reaksiyon durdurulmuş olur ve oluşan rengin absorbanı 560 nm'de ölçülür.

6.Reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi, ünitelere dönüştürülerek hesaplanır.

2.2.3.6. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Tampon çözeltisi içinde bulunan H_2O_2 , örnekteki CAT etkisiyle parçalanır ve bu spektrofotometrede 570 nm'de ölçülen absorbanın azalmasına yol açar. Absorbansdaki bu azalma hızı, CAT aktivitesiyle doğru orantılıdır (Sinha, 1972). Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat tamponu: 0,3 g Sodyum Hidrojen Fosfat ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) tartıldı ve 1 litreye tamamlandı.

Hidrojen peroksit ($\text{H}_2 \text{O}_2$; %30): 1 ml $\text{H}_2 \text{O}_2$ alındı ve üzerine 49 ml su eklenerek seyreltilti.

Potasyum bikromat ($\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$): %5'lik $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$ çözeltisinden 5 g alındı ve 100 ml çözücüsünde çözüldü.

Glasiyel asetik asit dikromat çözeltisi: 1 ml %5'lik $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$ çözeltisi ile 3 ml glasiyel asetik asit 1:3 oranında karıştırıldı.

Uygulanan Yöntem:

1.Hazırlanan dilüe numunenin 0,1 ml'si bir ependorf tüpüne konuldu. Kontrol numunesi olarak, numune yerine distile su kullanıldı.

2.Üzerine 0,1 ml Fosfat Tamponu (0,01 M) eklendi.

3.0,5 ml Hidrojen Peroksit ($\text{H}_2 \text{O}_2$) eklendi.

4.0,1 ml Dikromat çözeltisi eklendi.

5.Karışım, kaynar su banyosundarfujy 10 dakika bekletildi.

6.570 nm'de, distile su ile sıfırlanarak ölçüm yapıldı.

2.2.3.7. Hemoglobin (Hb) ve Protein Konsantrasyonları Ölçümü

Hemoglobin (Hb), Drabkin ve Austin (1935) yöntemine göre siyanomethemoglobin yöntemiyle kalorimetrik olarak ölçüldü. Dokudaki protein içeriği ise Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından geliştirilen kalorimetrik yöntemle belirlendi. Test sırasında, örnek ve standart tüplerine 1 mL homojenizat çözeltisi ve standart çözelti eklendi, kör tüpüne ise 1 mL saf su ilave edildi. Her tüpe 3 mL C reaktifi ilave edildi (C reaktifi, A ve B reaktifi karışımından %100:1 oranında hazırlanır. A reaktifi, % 2 Na₂CO₃, % NaOH ve %0.16 Na-tartarat içerirken, B reaktifi %4 CuSO₄.5H₂O içerir). Tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından her tüpe 300 µL Folin-Fenol reaktifi eklenip, tüpler vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi. Absorbans değerleri 660 nm'de, kör tüpe göre ölçüldü. Protein miktarları, oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden faydalanarak hesaplandı.

2.2.4. Biyokimyasal Parametreler

Plazma örneklerinden AST, ALT, ALP, üre, total protein ve glukoz parametreleri, Shimadzu 1601-UV Visible spektrofotometresi (Tokyo, Japonya) kullanılarak, Human LiquiUV ticari test kitleri ile belirlendi. Glukoz, Biolabo (Ref 87109, Fransa) test kiti ile ve total protein (TP) ise Human (Ref 157004, Almanya) ticari test kiti ile ölçüldü. Ayrıca FSH, LH, PG ve E2 parametreleri microplate reader kullanılarak rat ticari test kitleriyle ölçümü yapıldı. FSH, (Catalog no: E-EL-R0391, Çin), LH, (Catalog no: E-EL-R0026, Çin), PG, (Catalog no: E-EL-0090, Çin), E2, (Catalog no: E-EL-0065, Çin) ticari test kitleri kullanıldı.

2.2.5. Histopatolojik Değerlendirme

2.2.5.1. Histopatolojik Değerlendirme İçin Dokuların Hazırlanması

Deney için kullanılan sıçanlar anestezi edilip kanları alındıktan sonra karın boşluğu cerrahi olarak açılmış ve karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovarium dokuları çıkarılmıştır. Elde edilen organlar, histopatolojik analiz için hazırlığa alınmıştır. Bu amaçla, organların makroskopik olarak hasar gösteren bölgelerinden 0,5-1 cm² büyüklüğünde küçük doku örnekleri alınmış ve uygun boyutlarda doku takip

kasetlerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler, fiksasyon işlemi için %10'luk nötral tamponlu formalin içine konulmuş ve 5 gün süreyle bekletilmiştir. Sonrasında dokulardaki fazla formaldehitten arındırmak amacıyla akarsu içinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ardından, dokulardaki suyun giderilmesi için farklı alkol çözücülerinden geçirilmiştir. Şeffaflaştırma işlemi için ise, iki ayrı ksilen solüsyonunda her biri birer saat olmak üzere bekletilmiştir. Ksilen solüsyonlarında bekletilen örnekler, sırasıyla yumuşak parafin içinde 2 saat ve sert parafin içinde 1 saat bekletilmiş, daha sonra parafin bloklarına alınmıştır. Parafine gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak normal ve polilizinli lamalar üzerine aktarılmıştır. Alınan kesitler, histolojik incelemeler için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyasıyla boyanmış ve hücre ölümünü tespit etmek amacıyla TUNEL yöntemi ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır (Fleming, 1997).

2.2.5.2. Hemotoksilen Eosin Boyama Prosedürü

Lam üzerine alınan doku örneklerinin deparafinasyonu, 65 °C'de etüvde 2 saat bekletilerek parafinin sıvı hale gelmesi sağlandı. Ardından örnekler, toplamda 20 dakika süreyle üç kez ksilende bekletildi. Örneklerin hidratasyonu için sırasıyla birinci absolü alkolde 5 dakika, ikinci absolü alkolde, %96'lık alkolde, %80'lik alkolde ve %70'lik alkolde her biri 3 dakika süreyle bekletildikten sonra, distile suda 5 dakika süreyle yıkama işlemi uygulandı. Sonrasında, Harris Hematoksilen ile 10 dakika bekletilerek çekirdek boyaması yapıldı. Boya fazlası, çeşme suyu altında iyice yıkandıktan sonra eozin solüsyonuna alındı ve 5 dakika süreyle boyama işlemi tamamlandı. Boyama sonrası örnekler, sırasıyla %80, %96'lık alkol ve iki kez absolü alkolden geçirilerek, şeffaflaştırma için 5'er dakika süreyle üç farklı ksilende bekletildi ve son olarak entellan ile kapatıldı (Demirel vd, 2023)

2.2.5.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücreleri tanımlamak için immunohistokimyasal teknikler ile DNA fragmentasyonu gösterilmiştir. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotidler, deoksinnükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. İşaretli streptavidin daha sonra bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanarak boyamanın sonunda parçalanmış çekirdekler koyu kahverengi siyaha yakın bir renge

sahip olur.

2.2.5.3.1. TUNEL Uygulama Protokolü

Bu çalışmada apoptoz tespiti için ApopTag® Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kiti (Milipore S7101, ABD) kullanılmıştır. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme (TUNEL) yöntemi, hücrelerdeki apoptoz oranlarını belirlemede yaygın bir şekilde tercih edilen bir tekniktir. TUNEL prosedürü sırasında şu adımlar izlenmiştir: Üretici firmanın yönergelerine uygun olarak, ApopTag Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA, Merck Millipore) kullanılarak apoptozisi gösteren hücreler tespit edilmiştir. Karaciğer ve böbrek dokularından 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak lizinli lamlar üzerine yerleştirilmiştir. Kesitler, etüvde (Nüve EN 500) bir gece bekletilmiştir. Ksilol ile deparafinize edilen kesitler, sırasıyla %100, %96 ve %80 alkollerde 5'er dakika süreyle rehidre edilip ardından distile su ile yıkanmıştır. Bu adımın ardından, kesitler PBS çözeltisinde 5 dakika bekletilmiştir. Kesitlerin çevresi sınırlayıcı kalem (Pap Pen) ile çizildikten sonra, 1:500 oranında proteinaz K çözeltisiyle 25 dakika inkübe edilmiştir. Proteinaz K uygulamasının ardından, kesitler PBS ile 3 defa, her biri 5 dakika süresince yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi amacıyla, kesitler %3'lük H₂O₂ çözeltisinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında, kesitler tekrar tampon çözeltisiyle 3 kez, her biri 5 dakika süresince yıkanmıştır. Kesitler, 10 dakika boyunca dengeleme tampon çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından, kesitler %70 Reaction Buffer ve %30 TdT Enzyme karışımında 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresinin sonunda, kesitler Stop/Wash Buffer çözeltisinde 10 dakika bekletilmiştir. Sonraki aşamada, kesitler 10 dakika süreyle Working Strength Stop/Wash Buffer (100 µL stop wash buffer + 3400 µL distile su) ile inkübe edilmiştir. Kesitler daha sonra PBS ile yıkanmış ve TUNEL pozitif reaksiyonunun görünürlüğünü artırmak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyanmıştır. Bu işlem için, 30 µL DAB substratı ve 1470 µL DAB dilüsyon tamponu karıştırılarak, kullanılmadan önce yarım saat karanlık bir ortamda bekletilmiştir. DAB çözeltisi kesitlere eklenip yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Ardından, kesitler distile su ile yıkanmıştır. Son olarak, lamların üzerine metil green boyası damlatılarak 10-15 saniye beklenmiş ve zemin boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Boyama sonrası fazla boyalar akarsuya alınmış, ardından kesitler alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatılmıştır. Değerlendirme sırasında preparatlar TUNEL tekniği kullanılarak boyanmış; apoptotik ve normal hücreler, x400 büyütmede 5 farklı alanda 100 hücre sayılarak kaydedilmiş ve apoptotik indeks (AI) hesaplanmıştır. (AI=TUNEL (+) hücre sayısı/toplam hücre sayısı x 100) (Fleming, 1997).

2.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonunda elde edilen veriler, SPSS 22 istatistik paket programında grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA testi uygulanarak hesaplandı. Post-Hoc olarak Duncan testinden faydalanılarak veriler "ortalama $\pm$ standart sapma" olarak ifade edilmiştir ($X \pm SD$). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi

Ratlardan alınan eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokularında ölçülen MDA değerlerinin (Çizelge 3.1.) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2,4-D grubunda yüksek seviyede olduğu belirlendi ($p<0.005$). 2,4-D ile birlikte 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta ise yüksek seyreden değerlerin azaldığı gözlemlendi ($p<0.005$). Bunun yanı sıra, bulunan sonuçlar kontrol ve klorojenik asit grupları ile kıyaslandığında aralarındaki farkın ovaryum dokusu dışında önemli olmadığı belirlendi ($p<0.005$). Ayrıca 2,4-D uygulanan grupta GSH değerlerinin (Çizelge 3.2.) azaldığı gözlenirken ($p<0.005$), 2,4-D ile birlikte 10 mg/kg klorojenik asit uygulanan grupta ise azalan GSH düzeyini artırdığı belirlendi. Bu değerlerin kontrol ve klorojenik asit grupları ile kıyaslandığında aralarındaki farkın eritrosit ve böbrek dokusunda anlamlı iken, karaciğer, kalp, beyin ve ovaryum dokularında ise anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p<0.005$).

3.2. SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi

Antioksidan enzim seviyeleri için eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokularında ölçülen SOD (Çizelge 3.3) ve CAT (Çizelge 3.4.) değerleri kontrolle karşılaştırıldığında 2,4-D verilen gruplarda en düşük düzeyde olduğu ($p<0.005$), 2,4-D ile birlikte 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta azalan bu SOD ve CAT değerlerinin yükseldiği belirlendi ($p<0.005$). Bunun yanı sıra, klorojenik asit grubunda ise SOD değerleri kontrolle karşılaştırıldığında karaciğer, böbrek, kalp ve ovaryum dokusunda anlamlılık oluşturduğu; ancak eritrosit ve beyin dokularında ise anlamlılık oluşturmadığı tespit edildi ($p<0.005$). Aynı şekilde klorojenik asit grubunun CAT değerleri kontrolle karşılaştırıldığında ise; eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularında anlamlı olduğu; ancak ovaryum dokusunda ise anlamlılık ifade etmediği belirlendi ($p<0.005$).

Çizelge 3.1. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularındaki MDA seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/gdoku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Ovaryum((nmol/g doku)
Kontrol	6,04±0,43 ^c	1,53±0,09 ^c	1,07±0,05 ^c	1,45±0,11 ^c	1,75±0,17 ^c	1,48±0,75 ^b
Kloro	6,15±0,85 ^c	1,57±0,15 ^c	1,16±0,04 ^c	1,51±0,12 ^c	1,88±0,11 ^c	1,35±0,29 ^a
2,4-D	9,29±0,84 ^a	2,58±0,18 ^a	2,62±0,11 ^a	2,81±0,12 ^a	2,55±0,34 ^a	1,89±0,61 ^d
2,4-D+Kloro	8,42±0,77 ^b	1,78±0,21 ^b	1,96±0,08 ^b	2,43±0,24 ^b	2,21±0,32 ^b	1,61±0,71 ^c

Ortalama ± standart sapma; n=7

*a-b,c,d: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çizelge3.2. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularındaki GSH seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/gdoku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Ovaryum(n mol/g doku)
Kontrol	54,77±2,71 ^a	17,56±1,84 ^a	17,81±0,88 ^a	16,74±0,77 ^a	15,76±0,58 ^a	17,74±0,71 ^c
Kloro	49,40±2,43 ^b	17,04±1,51 ^a	16,56±0,41 ^b	16,50±0,81 ^a	15,21±0,86 ^a	17,21±0,85 ^c
2,4-D	38,11±2,86 ^d	13,86±1,37 ^c	13,55±0,68 ^d	13,46±0,54 ^c	12,03±0,52 ^c	12,32±0,68 ^a
2,4-D+Kloro	44,14±2,38 ^c	15,68±1,48 ^b	14,55±0,91 ^c	15,45±0,66 ^b	13,69±0,53 ^b	14,02±0,69 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=7

*a-b,c: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çizelge 1.3. 2,4-D'nin 50 mg/kg Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularındaki SOD seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/μg protein)	Böbrek (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Ovaryum(U/μg/protein)
Kontrol	21,74±1,44 ^a	1,88±0,16 ^a	2,75±0,19 ^a	4,81±0,16 ^a	4,41±0,35 ^a	3,68±0,11 ^c
Kloro	21,53±1,01 ^a	1,75±0,13 ^b	2,28±0,19 ^b	4,63±0,42 ^a	3,95±0,37 ^b	2,71±0,21 ^b
2,4-D	15,06±0,94 ^c	1,24±0,03 ^d	1,27±0,02 ^d	3,32±0,23 ^c	2,62±0,37 ^d	2,40±0,91 ^a
2,4-D+Kloro	19,62±0,52 ^b	1,48±0,08 ^c	1,96±0,03 ^c	3,73±0,26 ^b	3,53±0,12 ^c	2,69±0,13 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=7

*a-b,c,d: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çizelge 3.4. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularındaki CAT seviyeleri üzerine etkisi

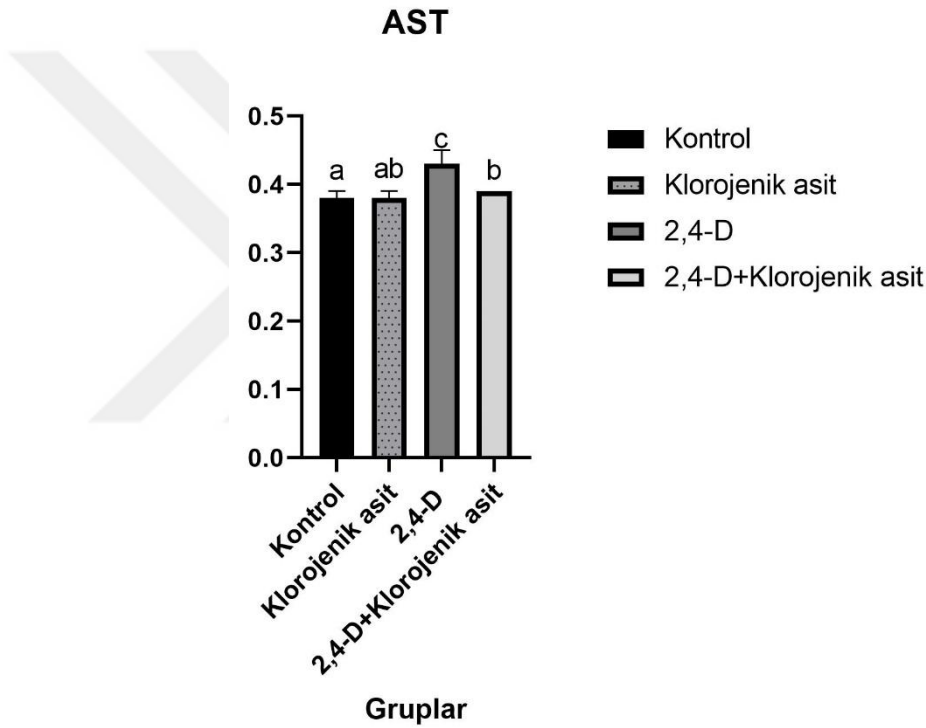
Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/μg protein)	Böbrek (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Ovaryum(U/μg protein)
Kontrol	13,37±0,55 ^a	1,04±0,12 ^a	0,84±0,08 ^a	1,95±0,04 ^a	0,41±0,05 ^a	1,57±0,21 ^c
Kloro	12,56±0,34 ^b	0,88±0,11 ^b	0,76±0,03 ^b	1,73±0,08 ^b	0,36±0,02 ^b	1,44±0,21 ^c
2,4-D	9,59±0,22 ^d	0,59±0,05 ^d	0,44±0,07 ^d	1,14±0,07 ^d	0,17±0,07 ^d	0,92±0,17 ^a
2,4-D+Kloro	11,11±0,36 ^c	0,75±0,03 ^c	0,59±0,05 ^c	1,54±0,04 ^c	0,24±0,04 ^c	1,28±0,31 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=7

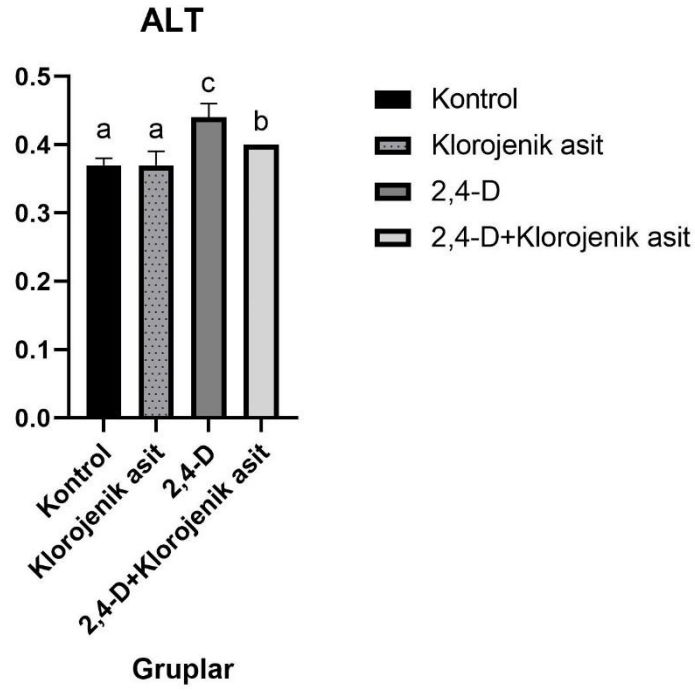
*a-b,c,d: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

3.3. Biyokimyasal Parametre Düzeyleri Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi

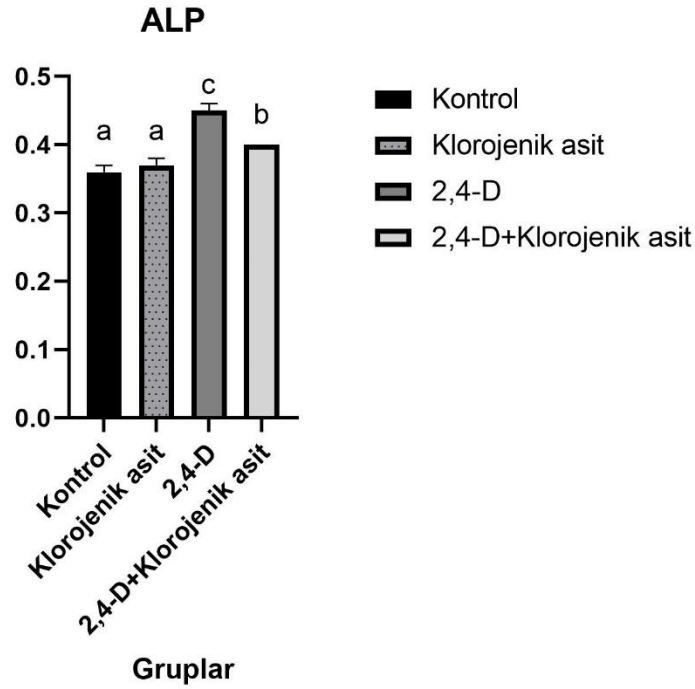
Sıçanların plazmalarından ölçülen AST (Şekil 3.1), ALT (Şekil 3.2), ALP (Şekil 3.3), üre (Şekil 3.4), glukoz (Şekil 3.5) ve total protein (Şekil 3.6) değerlerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 2,4-D grubunda en yüksek seviyede olduğu saptandı. Buna karşın 2,4-D ile birlikte 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta bu yüksek değerlerin azaldığı belirlendi ($p<0.005$).



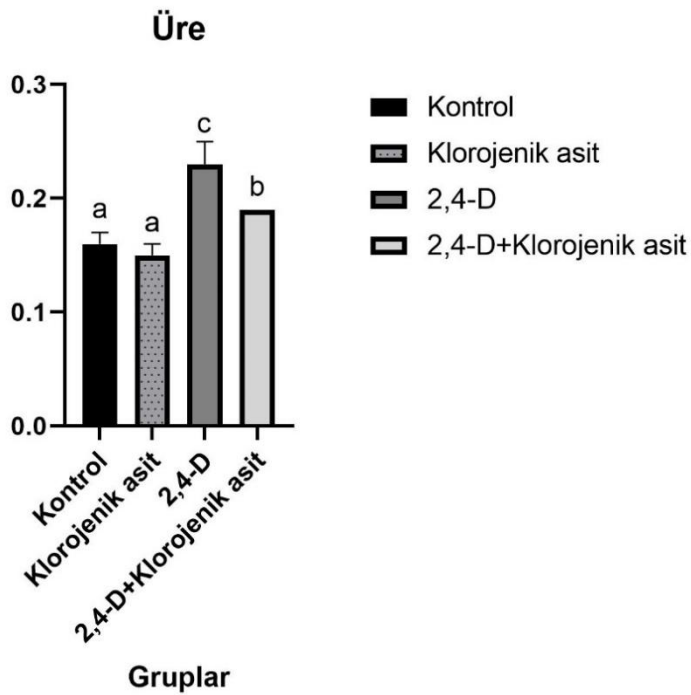
Şekil 2.1. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma AST düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



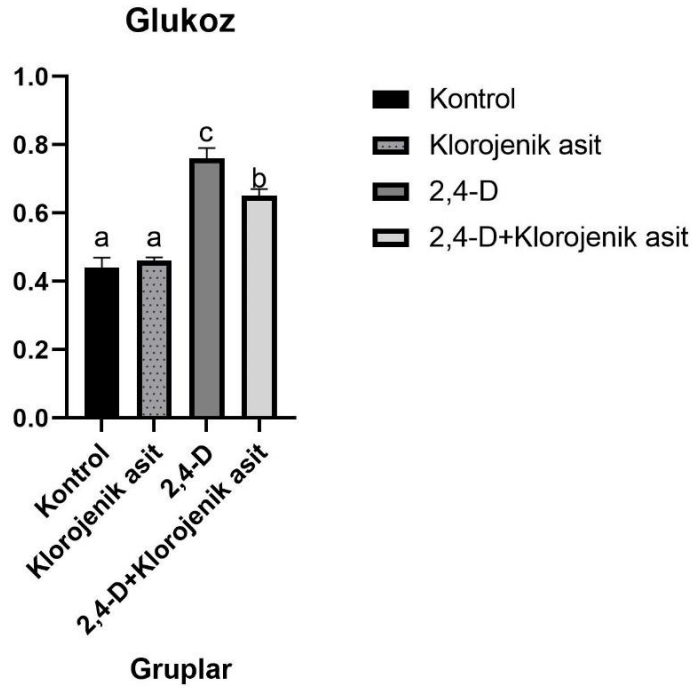
Şekil 3.2 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma ALT düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).



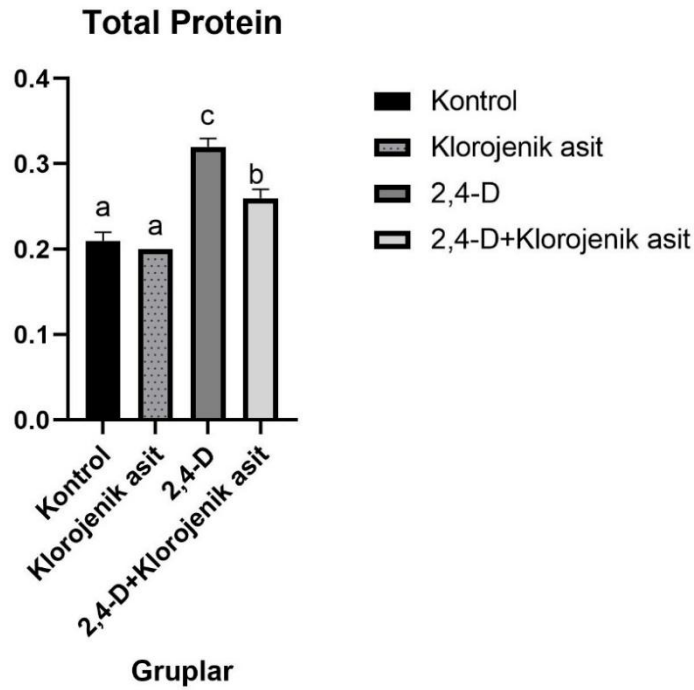
Şekil 3.3. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma ALP düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3.4. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma Üre düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir. ($p<0,05$).



Şekil 3.5. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma glukoz düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3.6. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların plazma total protein düzeyleri üzerine etkisi^{a,b}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir

(p<0,05).

3.4. Hormonal Parametreler Üzerine 2,4-D ve Klorojenik Asitin Etkisi

Hormonal aktiviteyi gösteren parametreler arasında bulunan FSH (folikül stimüle edici hormon), LH (luteinleştirici hormon), PG (progesteron) ve E2 (östrojen) seviyeleri incelenip kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Çizelge 3.5.) 2,4-D grubunda yüksek seviyede olduğu belirlendi (p<0.005). 2,4-D ile birlikte 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta ise yüksek seyreden değerlerin azaldığı gözlemlendi. Bu değerlerin kontrol ve klorojenik asit grupları ile kıyaslandığında aralarındaki farkın progesteron ölçüm sonuçlarında anlamlılık ifade ederken (p<0.005); FSH, LH ve E2 ölçümlerinde anlamlılık ifade etmediği görüldü.

Çizelge 3.5. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozlarına maruz bırakılan ratların FSH, LH, E2 ve PG düzeyleri üzerine etkisi

Gruplar	FSH	LH	PG	E2
Kontrol grubu	168,57±2,43 ^c	63,57±3,77 ^c	14,16±0,75 ^d	19,24±0,53 ^c
Kloro grubu	172,85±6,36 ^c	66,42±2,43 ^c	14,78±0,22 ^c	19,52±0,21 ^c
2,4-D+grubu	209,28±10,92 ^a	85,71±4,51 ^a	20,06±0,16 ^a	24,45±0,53 ^a
2,4-D+Kloro grubu	187,14±7,55 ^b	76,42±2,44 ^b	17,17±0,11 ^b	21,59±0,27 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=7

*a-b,c: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

3.5. Canlı Ağırlık Artışı

Çalışmada 28 günlük deneme süresi boyunca; 7, 14, 21 ve 28. günlerde ratlarda canlı ağırlık farklılıkları belirlenmiştir. Deney boyunca belirlenen ağırlıklar arasındaki fark, uygun istatistiksel hesaplama yöntemleri kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Çizelge 3.6'da sunuldu.

Çizelge 3.6. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların 7, 14, 21 ve 28. günlerde canlı ağırlıkları üzerine etkisi.

Gruplar	Yedinci gün	Ondördüncü gün	Yirmibirinci gün	Yirmisekizinci gün
Kontrol grubu	241,15±25,54	229,87±19,67	218,87±22,72	208,25±21,81
Kloro grubu	241,64±19,42	228,75±20,85	206,00±26,98	206,62±26,98
2,4-D+grubu	239,25±10,02	228,37±14,54	220,75±12,04	204,50±6,90
2,4-D+Kloro grubu	258,12±24,10	226,00±14,94	218,00±15,13	201,62±15,78

Ortalama ± standart sapma; n=7

3.6. Patolojik değişimler

3.6.1. Klinik Bulgular

Çalışmada 2,4-D ile 2,4-D ile klorojenik asit verilen ratlar klinik olarak incelendiğinde; durgunluk, bitkinlik, yem ve su tüketiminde azalma ile iştahsızlık dikkati çekti. Diğer gruplarda ise herhangi bir klinik belirti gözlenmedi.

3.6.2. Makroskopik Bulgular

3.6.2.1. Kontrol Grubu

Bu gruptaki ratların nekropsileri yapıldığında organ ve dokularında herhangi makroskopik bir lezyona rastlanmadı.

3.6.2.2. Klorojenik Asit Grubu

Bu gruptaki ratların nekropsileri yapıldığında organ ve dokularında herhangi makroskopik bir lezyona rastlanmadı.

3.6.2.3. 2,4-D Grubu

Karaciğerde gri-beyaz odaklara rastlandı. Karaciğerin koyu kahverengi bir görünümde olduğu belirlendi. Grubun tüm deneklerinde böbreğin dış yüzeyinde, bazı

olgularda ise kesit yüzeyinde toplu iğne başı kadar gri-beyaz odaklar tespit edildi. Kalpte hiperemi yaygındı. Aynı şekilde gruptaki tüm deneklerin beyinlerinde makroskopik inceleme yapıldığında kan damarlarının hiperemik olduğu görüldü. Ovaryum yüzeyinde hiperemi ile birlikte folikül oluşumlarının şekillendiği belirlendi.

3.6.2.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu

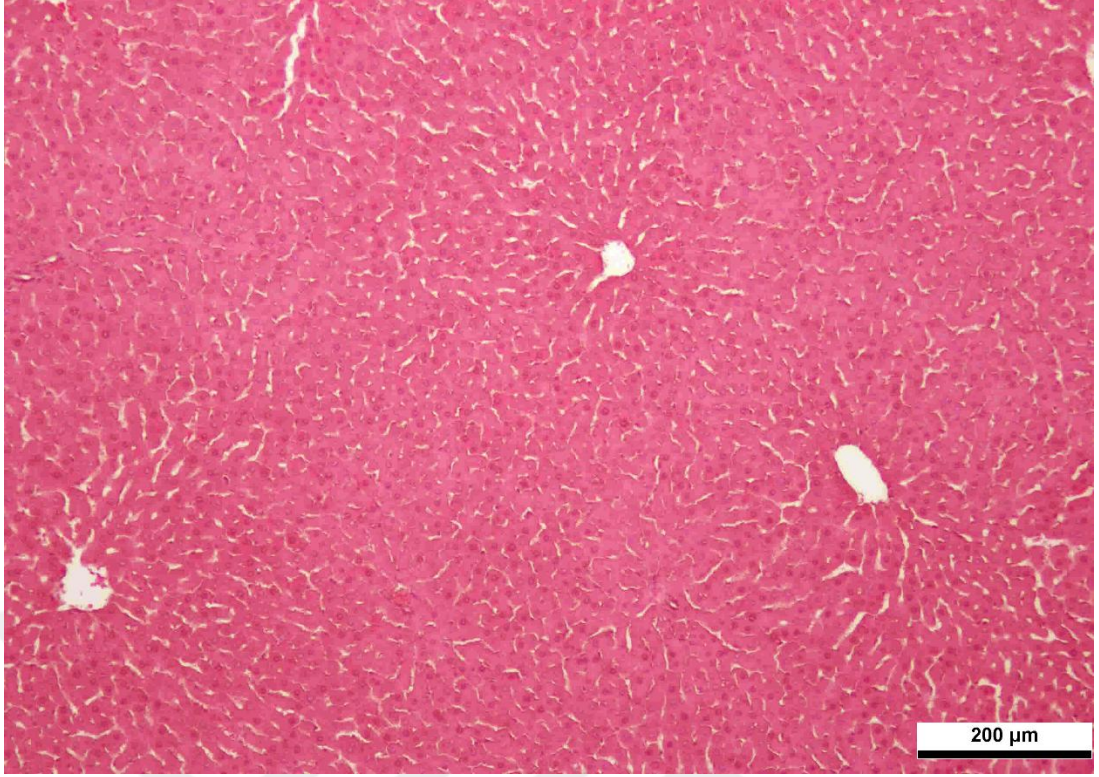
Bu gruptaki ratların nekropsileri yapıldığında; karaciğerlerinin iç yüzeyinde yaygın görünümlü gri-beyaz odaklar tespit edildi. Bu karaciğerlerin yüzeyinden kesitler alındığında bu odakların karaciğer kesitlerinin yüzeyinde de mevcut olduğu belirlendi. Karaciğer bazı durumlarda küçük ve soluk, bazı durumlarda ise kahverengimsi siyah görünümdeydi. Çoğu olguda böbreğin dış ve kesit yüzeylerinde yaklaşık toplu iğne başı büyüklüğünde gri-beyaz odaklar bulunmaktaydı. Böbrek dokusunun bazı örneklerde hafif soluk, bazılarında ise gri-boz bir görünümde olduğu belirlendi. Kalpte hiperemi yaygın bir şekilde görüldü. Tüm olgularda beyin dış yüzeyindeki kan damarlarının da hiperemik olduğu belirlendi. Aynı hiperemik görünüme ovaryumlarda da rastlandı.

3.6.3. Histopatolojik Bulgular

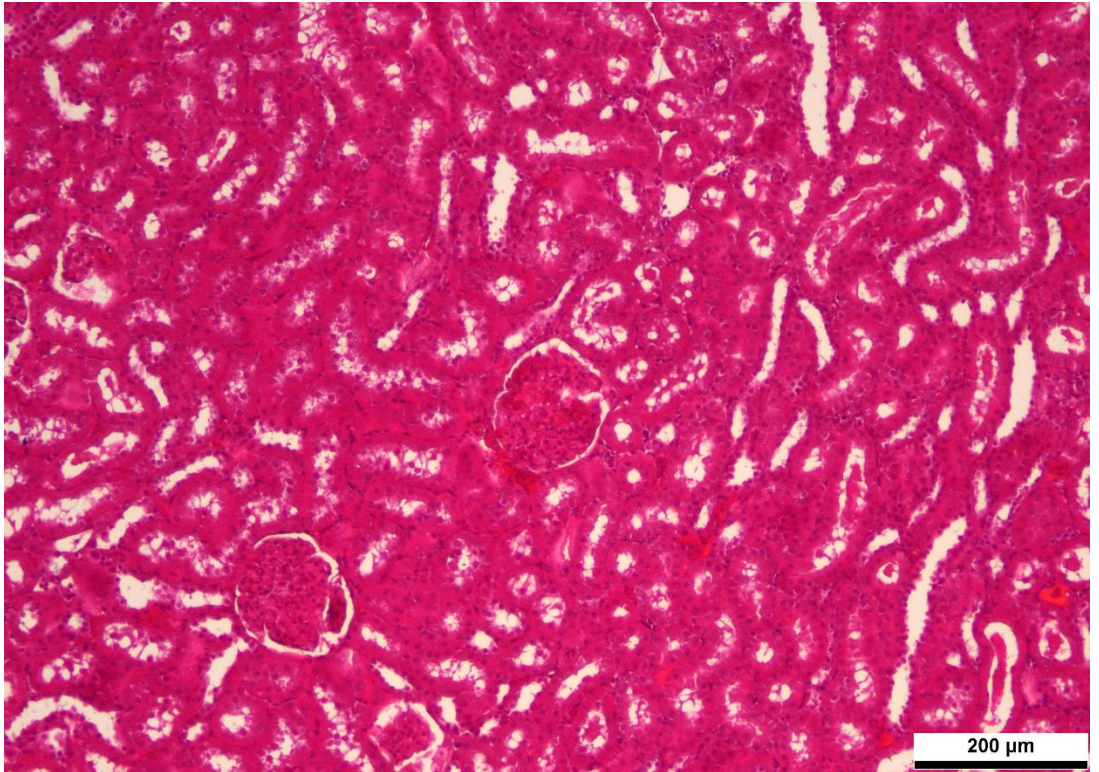
Karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokuları histopatolojileri incelenmiş ve istatistik değerlendirilmesi Çizelge (3.7)'de sunulmuştur.

3.6.3.1. Kontrol Grubu

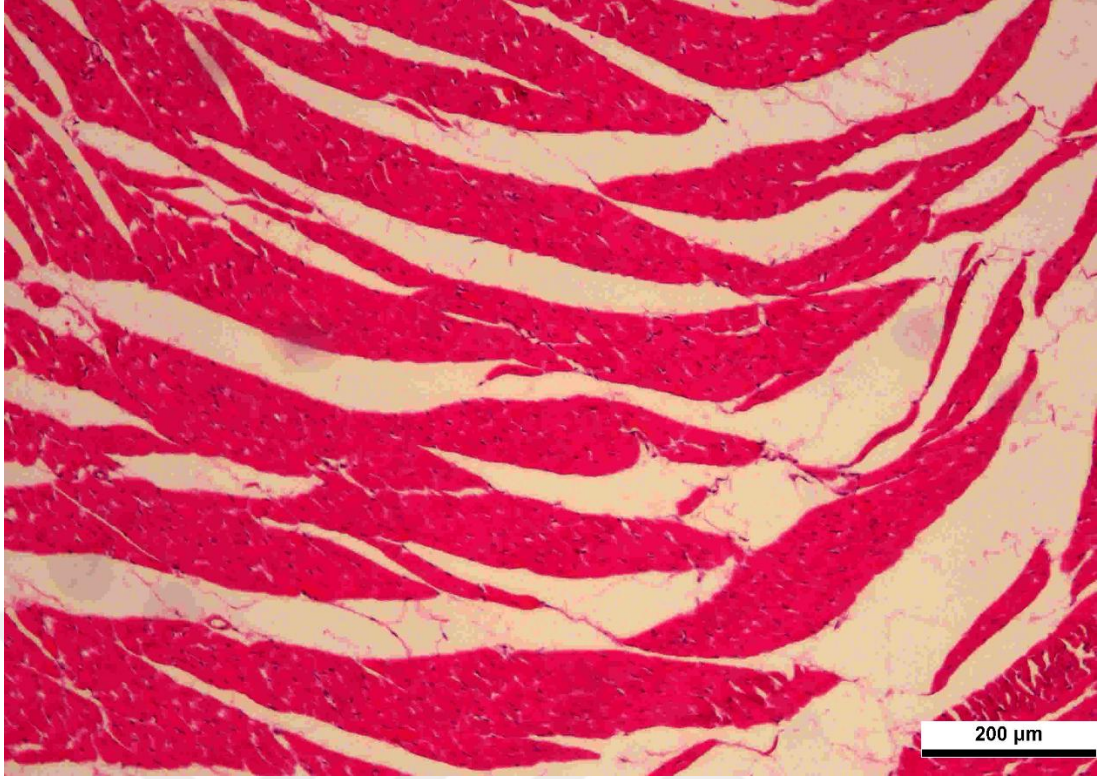
Bu gruptaki ratlarda yapılan incelemelerde karaciğer (Resim 3.1), böbrek (Resim 3.2), kalp (Resim 3.3), beyin (Resim 3.4) ve ovaryum (Resim 3.5) dokularının normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Histopatolojik analizlerde herhangi bir anormallik saptanmadı.



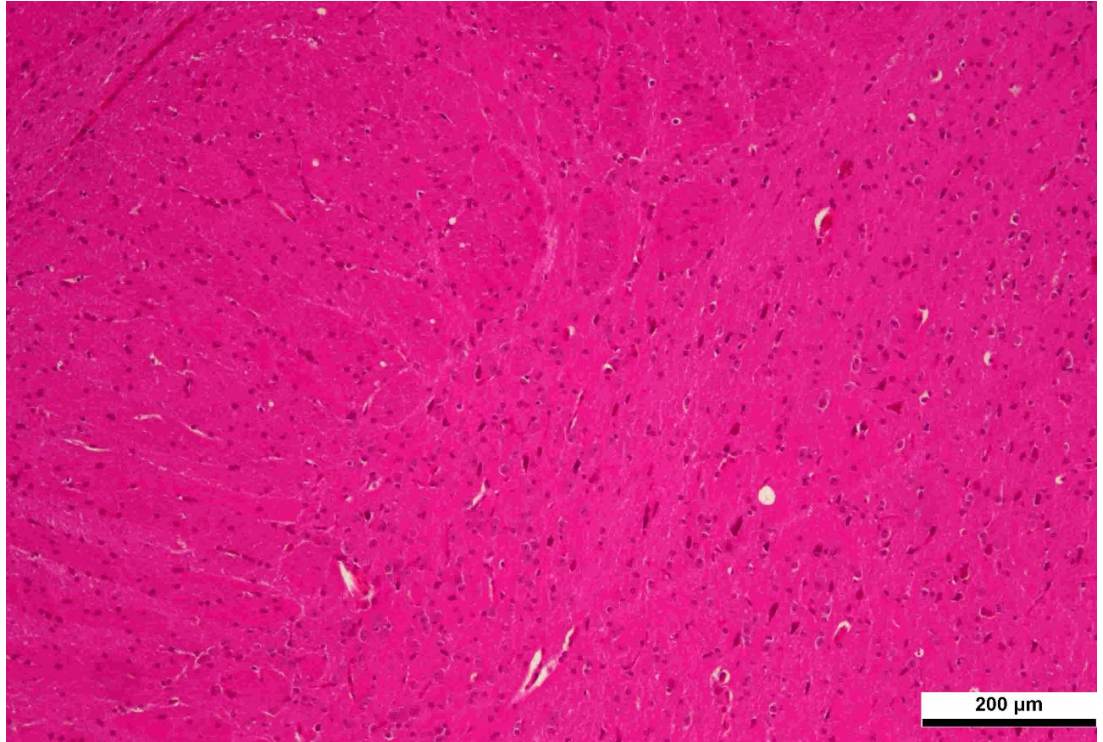
Resim 3.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



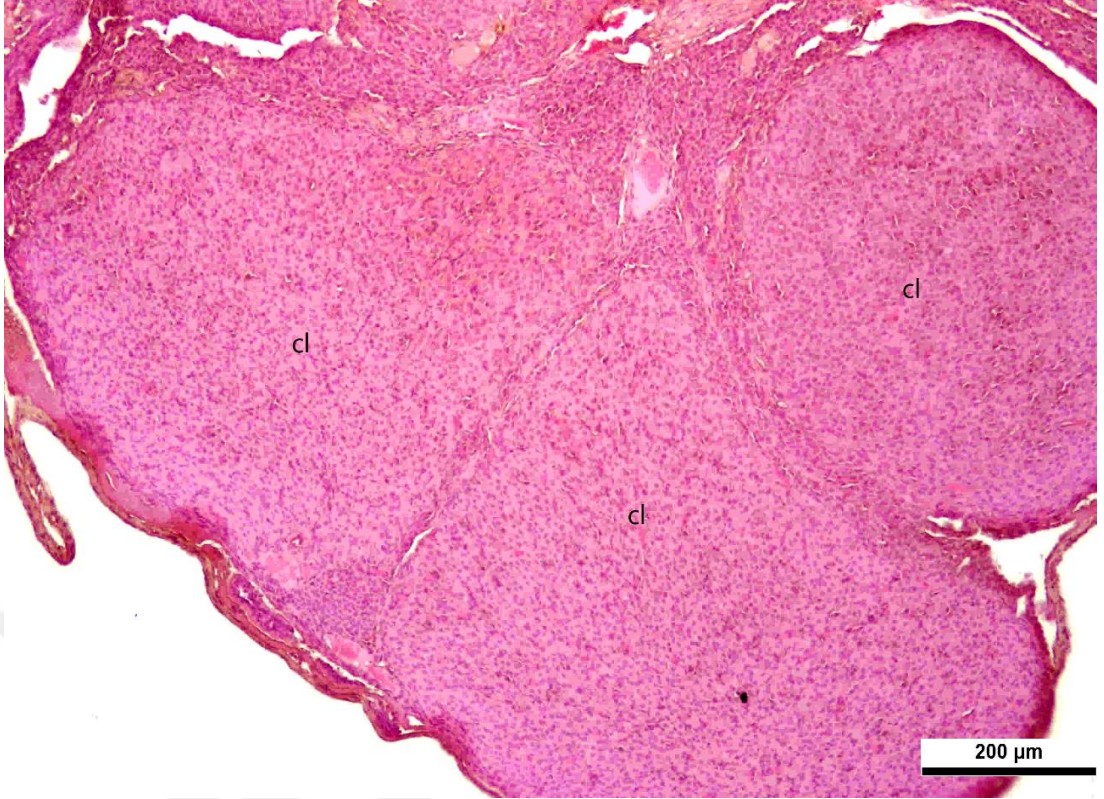
Resim 3.2. Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



Resim 3.3. Kontrol grubuna ait kalp dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



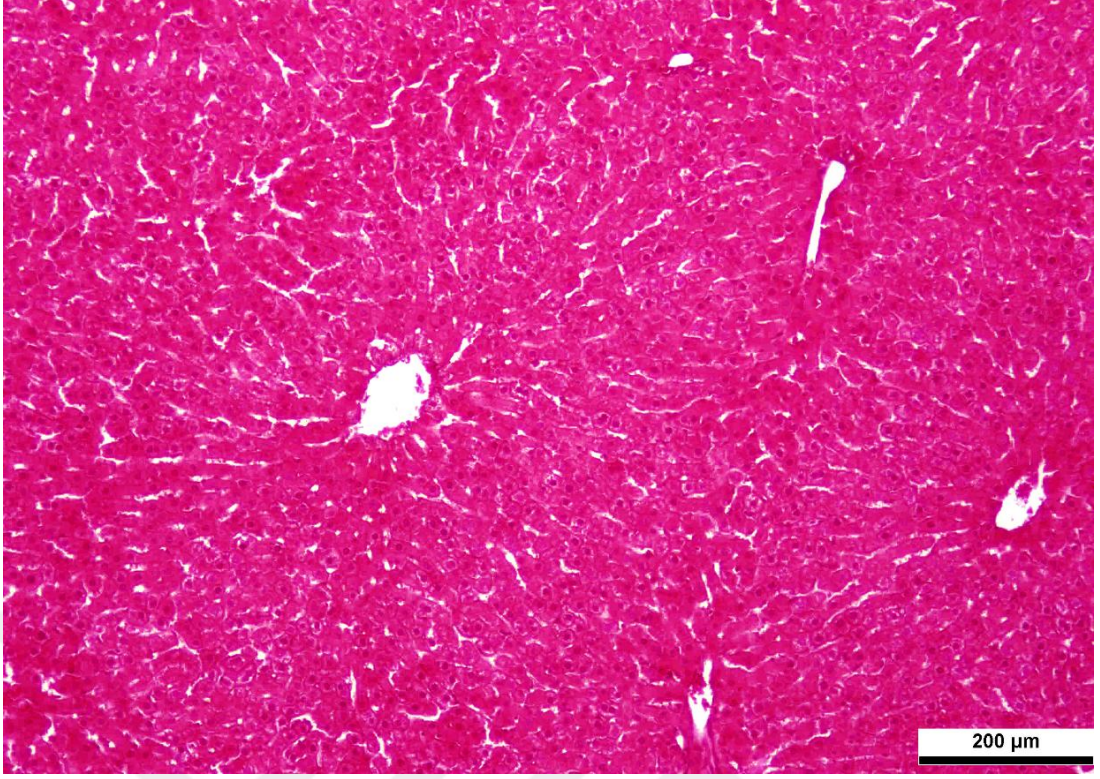
Resim 3.4. Kontrol grubuna ait beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



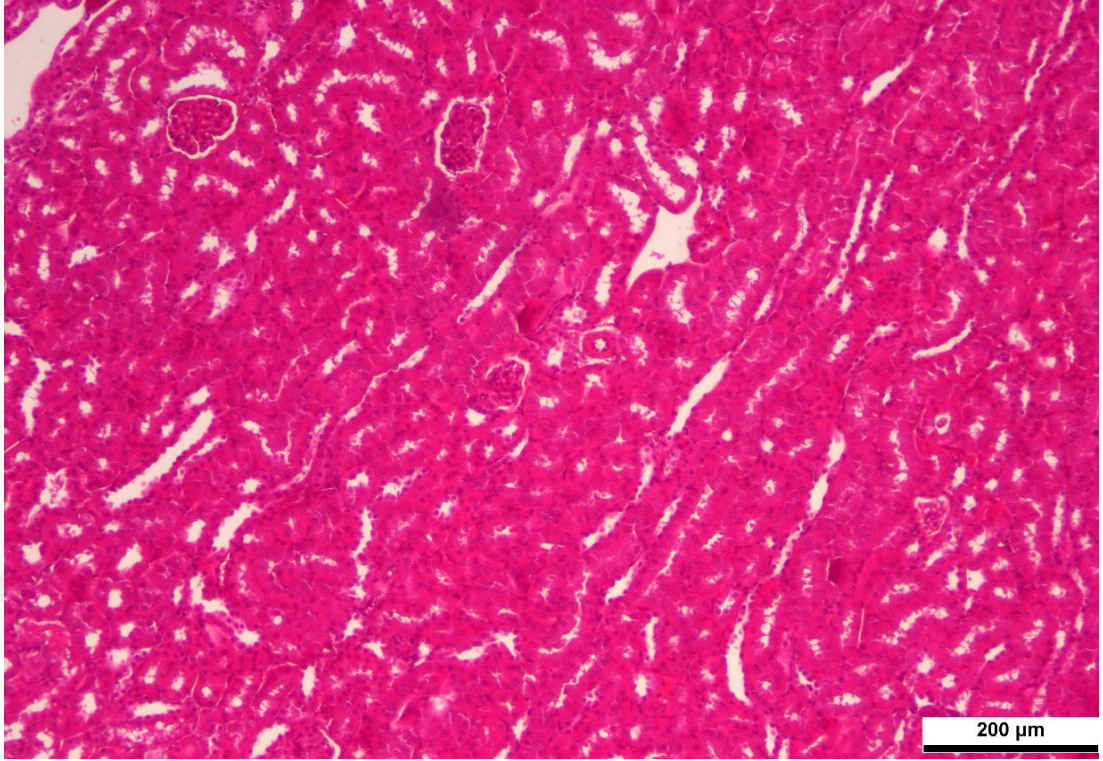
Resim 3.5. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun histopatolojik görüntüsü cl: corpus luteum HE X10

3.6.3.2. Klorojenik Asit Grubu

Bu grupta bulunan ratlarda karaciğer (Resim 3.6), böbrek (Resim 3.7), kalp (Resim 3.8), beyin (Resim 3.9) ve ovaryum (Resim 3.10) dokularının normal histolojik yapıya sahip olduğu görüldü. Histopatolojik olarak herhangi bir anormal bulgu görülmeydi.



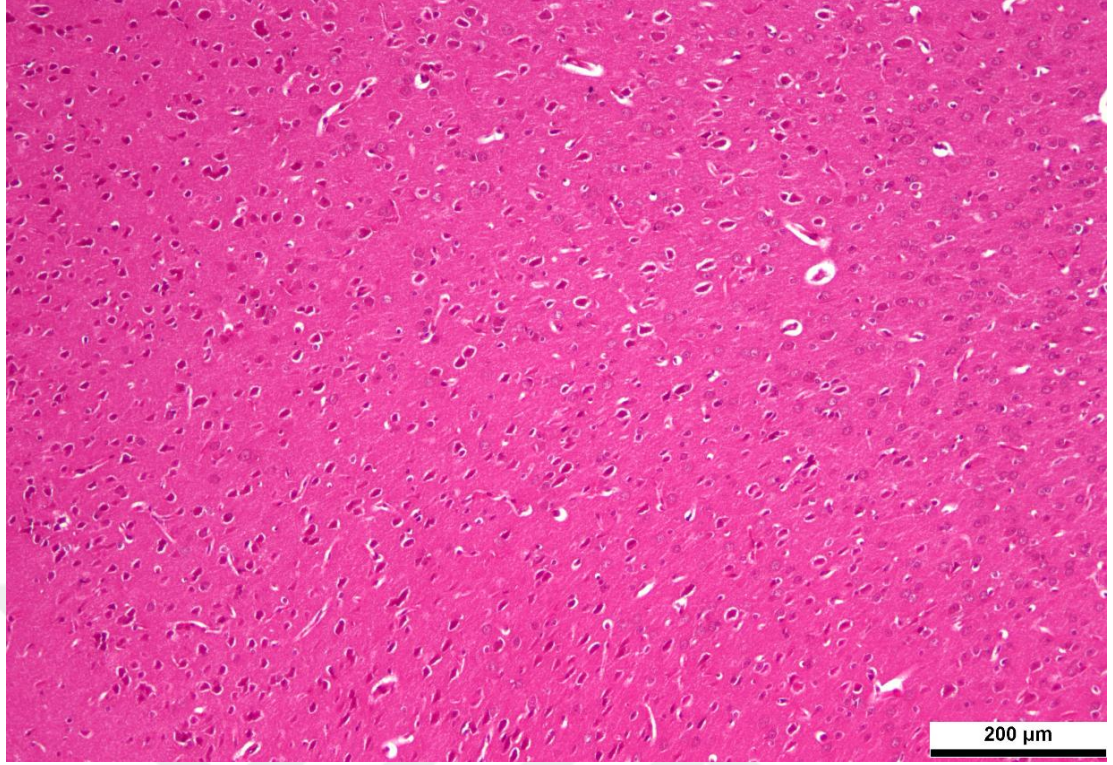
Resim 3.6. Klorojeniik asit grubuna ait karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



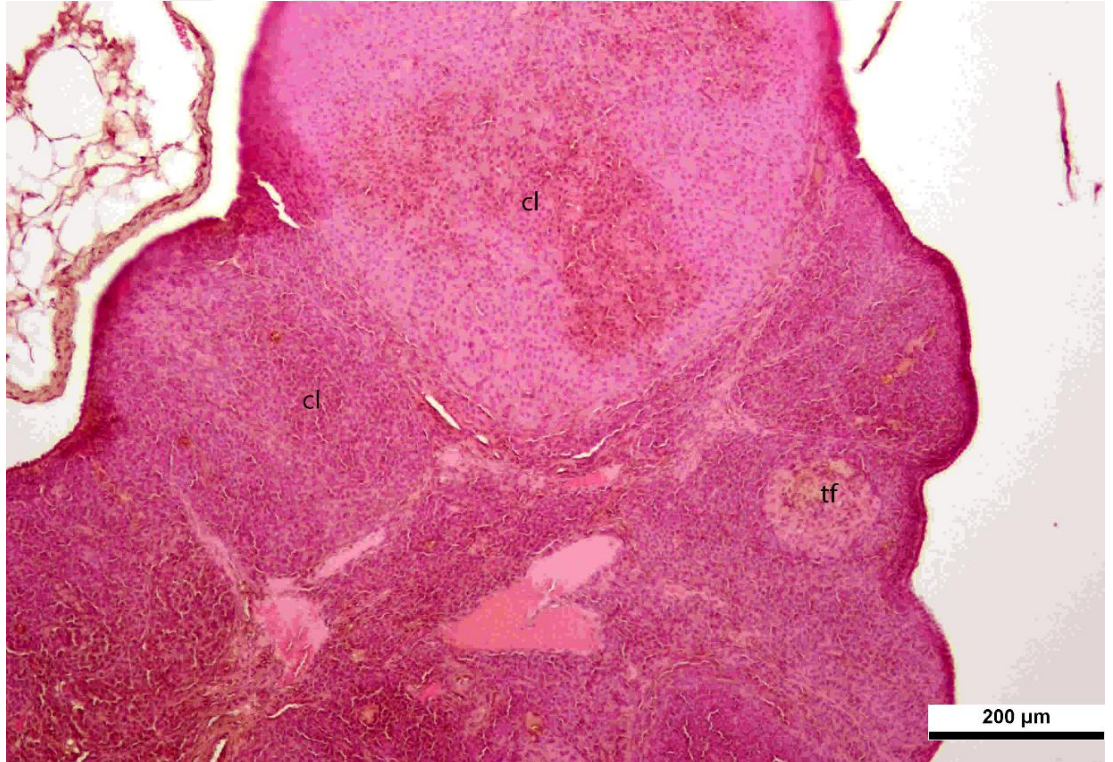
Resim 3.7. Klorojeniik asit grubuna ait böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



Resim 3.8. Klorojeniik asit grubuna ait kalp dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



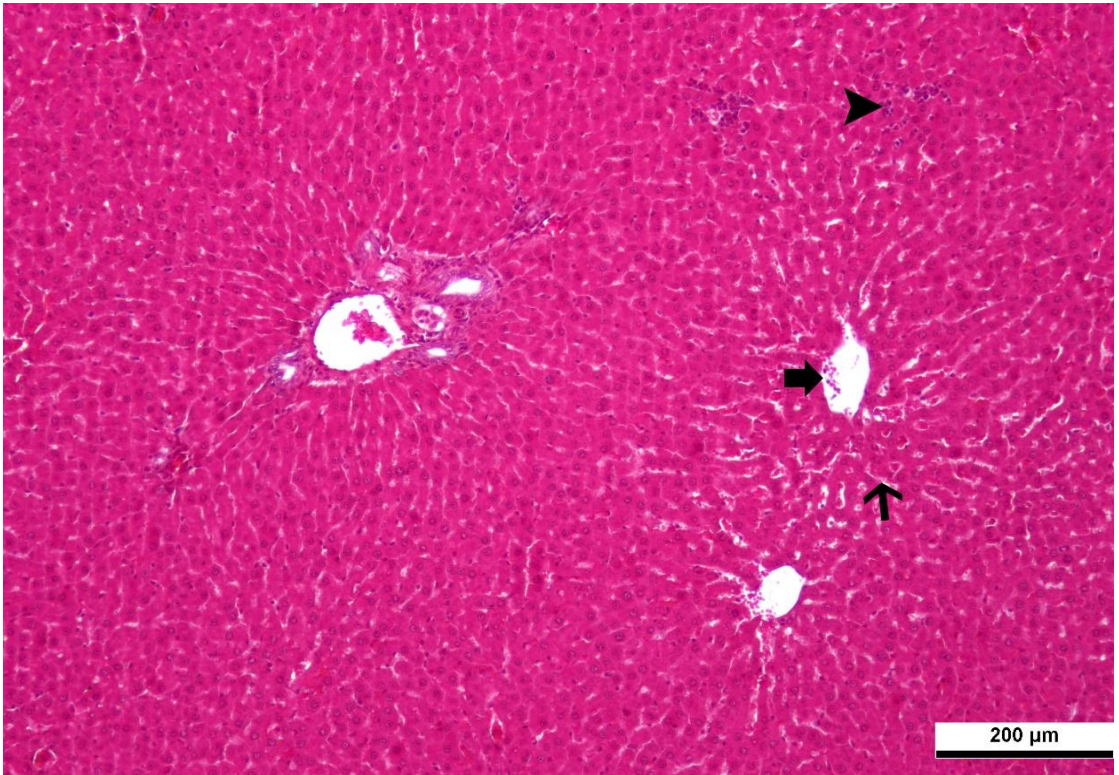
Resim 3.9. Klorojeniik asit grubuna ait beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü HE X10



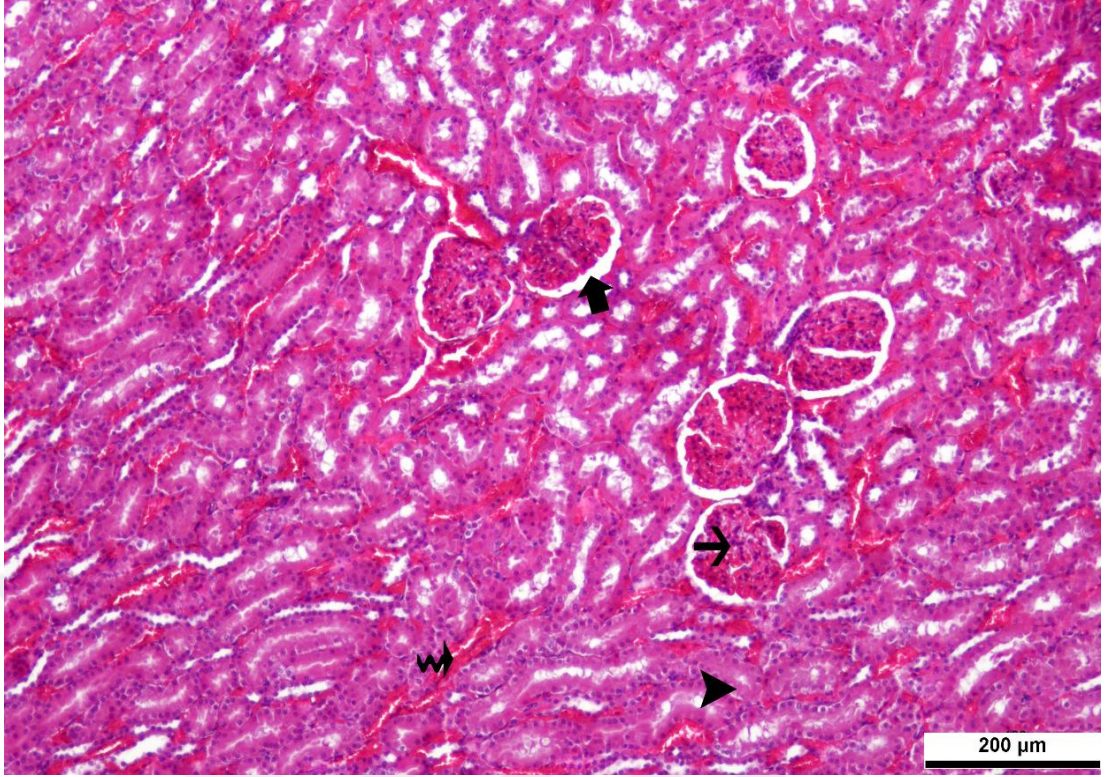
Resim 3.10. Klorojeniik asit grubuna ait ovaryum dokusunun histopatolojik görüntüsü
cl:corpus luteum, tf: tersiyer folikül HE X10

3.6.3.3 2,4-D Grubu

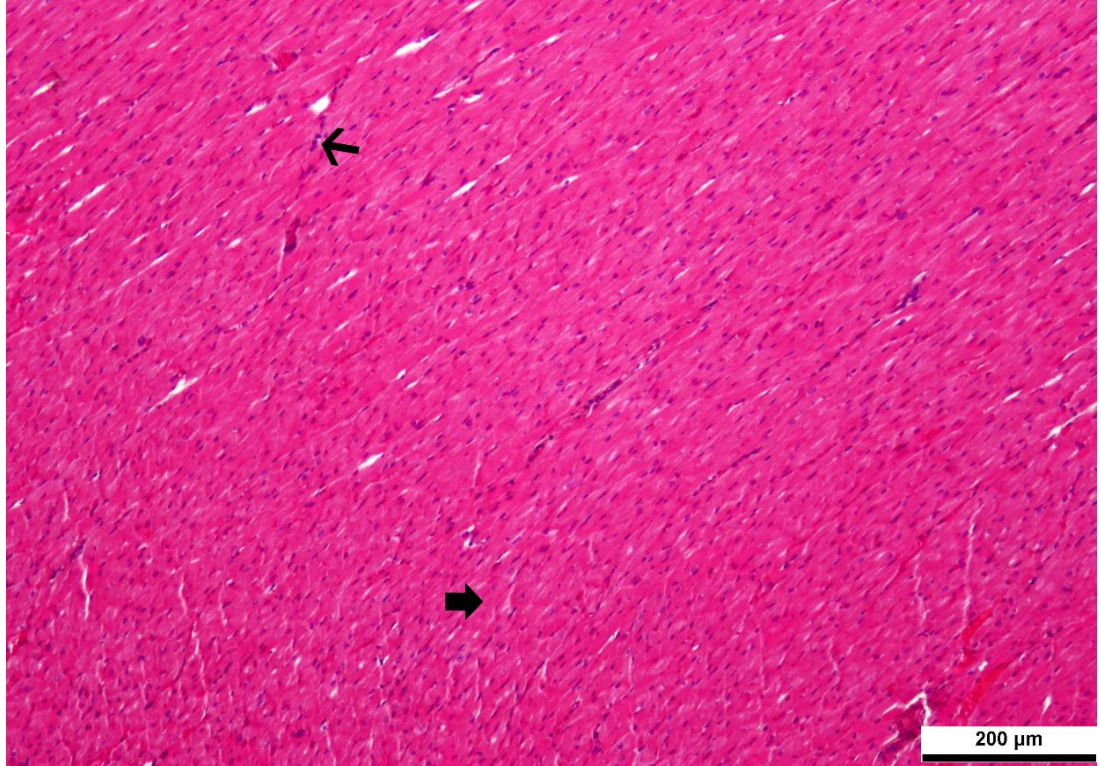
Karaciğerde mikroskopik inceleme yapıldığında sinuzoidlerde hiperemi ile genişleme gözlemlendi. Periportal alanlarda fokal mononükleer hücre infiltrasyonları ile bağ doku oluşumları tespit edildi (Resim 3.11.). Periasiner alanlar başta olmak üzere bazı hepatositlerin stoplazmalarının eozinofilik görünümde olduğu belirlendi. Glomerulus kapillar yumağında hiperemi ile beraber bowman boşluğunda da genişleme tespit edildi. Proksimal tubuluslarda dejeneratif değişiklikler izlendi. Bazı proksimal tubulusların epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon sahaları ile hiperemik alanlara rastlandı. Bazı glomerulus kapillar yumaklarında vakuolizasyon oluşumları belirgindi (Resim 3.12.). Kalpte myokardta hyalin dejenerasyonu alanlarının yanı sıra mononükleer hücre infiltrasyonu alanları da gözlemlendi (Resim 3.13.). Beyindeki kapillar damarların çoğunluğunda hiperemi vardı. Bazı nöronlarda vakuolizasyon ve nöronofaji görüldü (Resim 3.14.). Ovaryumlarda damarlarda şiddetli hiperemi ile stromada mononükleer hücre infiltrasyonu alanları ve fibröz bağ doku formasyonlarına rastlandı (Resim 3.15.).



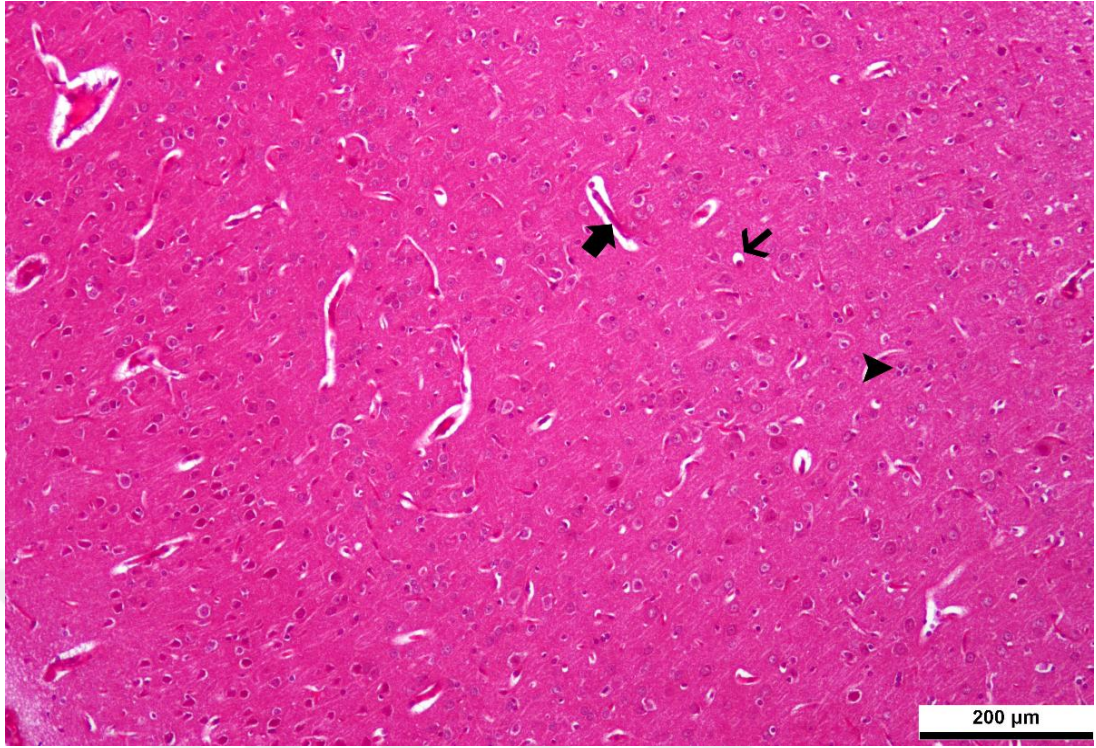
Resim 3.11. 2,4-D grubu **Karaciğerde**, vena sentralislerde hiperemi (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi (ince ok), Periportal bölgede safra kanal hiperplazisi ve intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları (okbaşı). HE. X10.



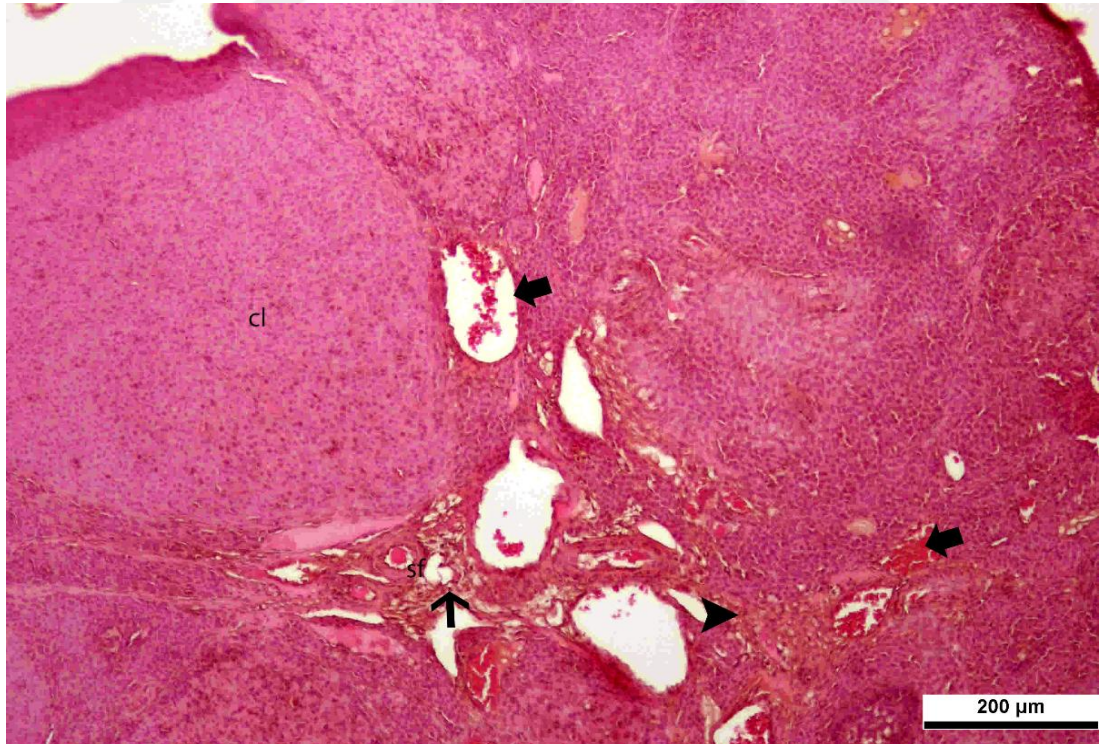
Resim 3.12. 2,4-D grubu **Böbrekte**, Glomerulus bowman boşluğunda genişleme (kalın ok), glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları (ince ok), tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları (okbaşı), intersitisyel alanlarda hiperemi (kırımlı ok) HE. X10



Resim 3.13.1 2,4-D grubu **Kalpte**, Myokartta hyalin dejenerasyonu alanları (kalın ok) ile mononükleer hücre infiltrasyonu alanları (ince ok). HE. X10.



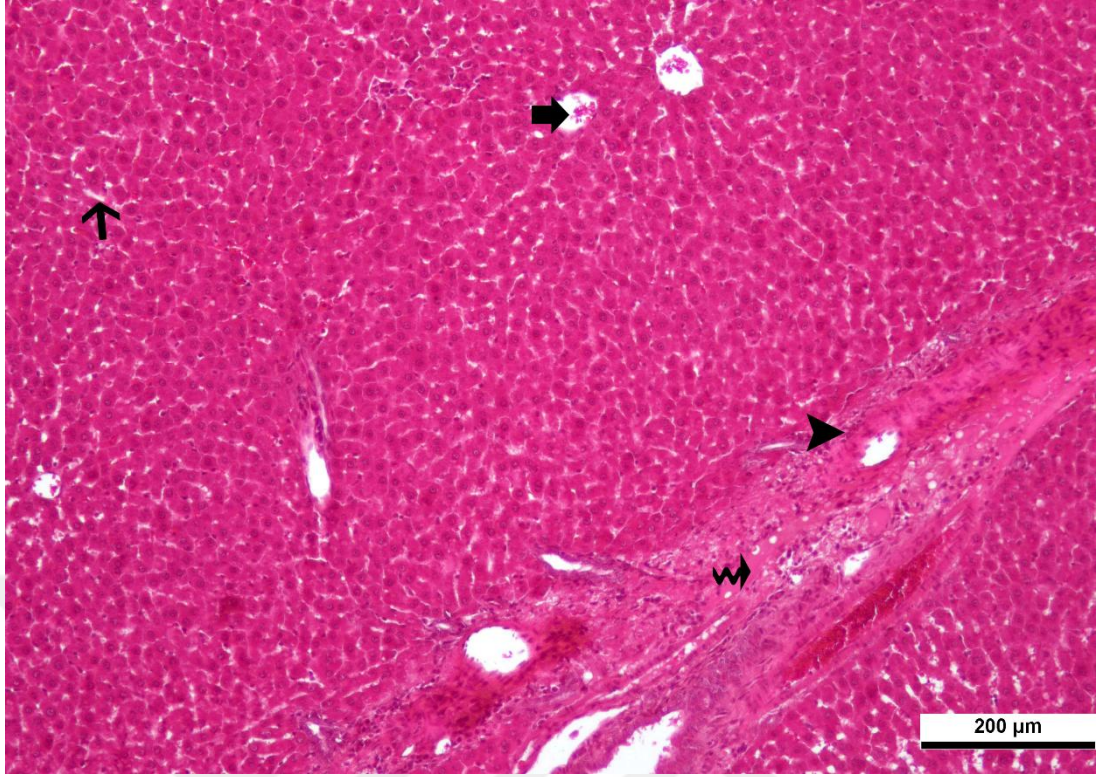
Resim 3.14. 2,4-D grubu **Beyin**, damarlarda hiperemi (kalın ok), nöronlarda vakuolizasyon oluşumu (ince ok), nöronlar çevresinde fokal glia hücre infiltrasyonu alanları (ok başı) HE. X10



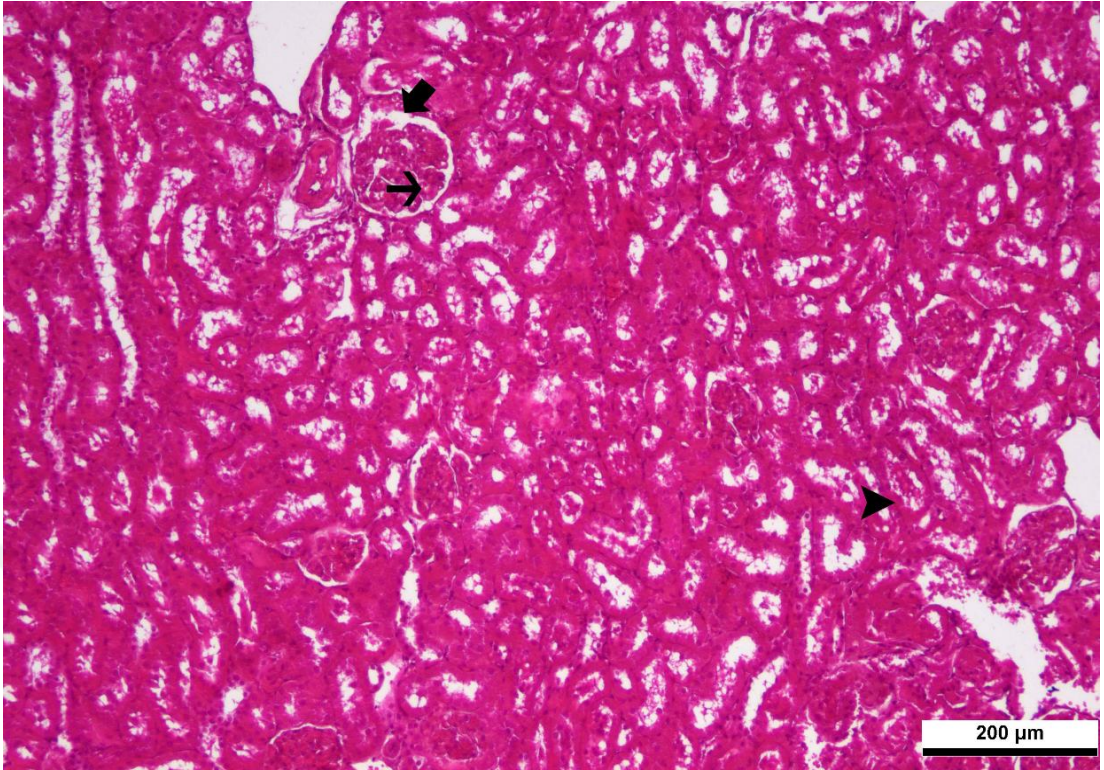
Resim 3.15.2 2,4-D grubu, **Ovaryum**, Damarlarda şiddetli hiperemi (kalın ok) stromada intersitisyel alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu alanları (ince ok), stromada fibröz bağ doku alanları (ok başı), cl: corpus luteum. HE. X10

3.6.3.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu

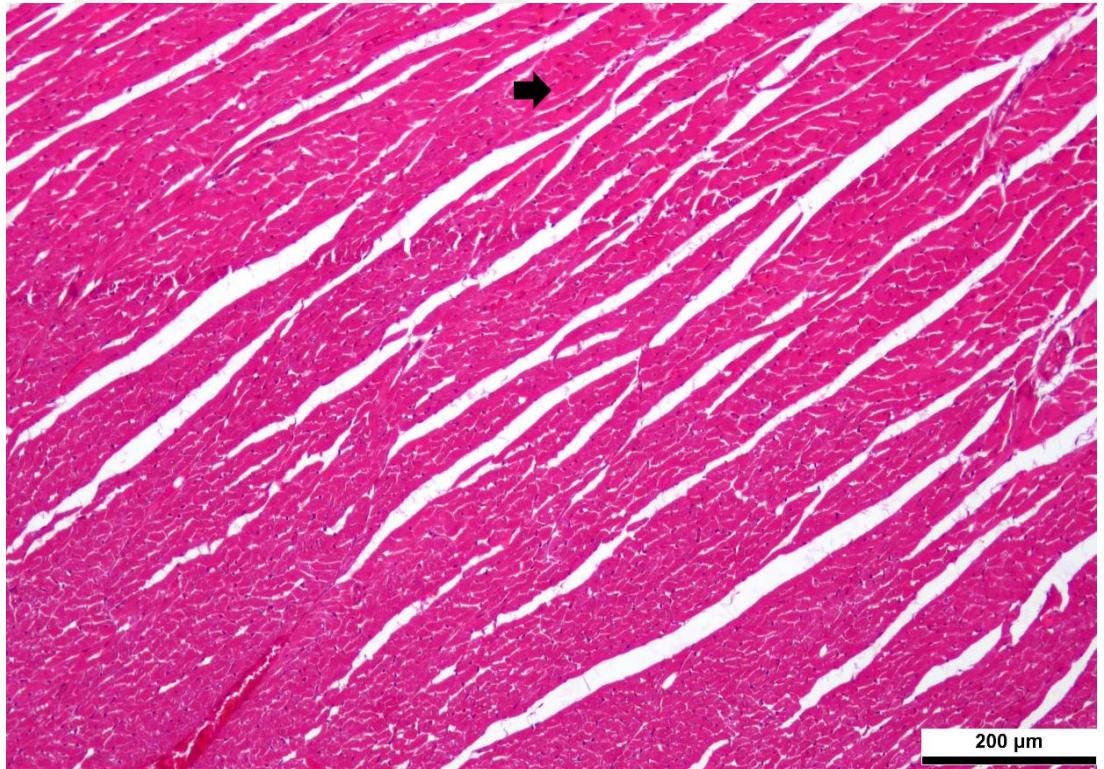
Bu grubun mikroskopik incelemesine bakıldığında karaciğerde şiddetli hiperemi hakimdi (Resim 3.16.). Benzer şekilde sinuzoidlerde de hiperemi ile genişleme olduğu belirlendi. Bazı örneklerde karaciğer parankim yapısının tamamen bozulduğu (disorganizasyon) gözlemlendi. Damar endotel hücrelerinin şişmiş olduğu tespit edildi. Vena centralislerde kan akışının artması (hiperemi) görüldü. Hepatositler arasındaki boşlukların normalden daha geniş olduğu belirlendi. Hepatositlerde, hücre çekirdeğinin etrafında stoplazmanın içinde dağılmış birden fazla vakuol gözlemlendi. Periasiner bölge ve çevresindeki hepatositlerde yaygın dejenerasyon alanları tespit edildi. Bazı hepatositlerin stoplazmalarında eozinofilik bir görünüm dikkati çekti. Özellikle periportal bölgelerdeki hepatositlerde çekirdeklerinde belirgin patolojik değişiklikler gözlemlendi. Perisentral bölgede mononükleer hücre infiltrasyonları ile bağ doku oluşumlarına rastlandı (Resim 3.16.). Böbreğin korteks ve medulla bölgelerinde bulunan damarlar belirgin şekilde hiperemik olduğu gözlemlendi. Glomerüller çoğunlukla hiperemik ve genişlemiş bir şekilde görünürken, bowman boşluğunun da genişlediği fark edildi. Glomerulus kapillar yumaklarında vakuolizasyonlara rastlandı. Proksimal ve distal tubulus epitel hücrelerinde dejenerasyonlara rastlandı. Bazı proksimal tubül epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon bölgeleri daha belirgindi. Ayrıca intersitisyel alanda hiperemiye de rastlandı. (Resim 3.18.). Beyindeki kapillar damarlarda hiperemi belirlendi. Perivasküler alanlarda genişleme görüldü. Nöronlarda dejeneratif değişiklikler ve nöronofajiye rastlandı. Perivasküler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu oluşumları ile yangısal değişimlerin olduğu belirlendi. (Resim 3.19.). Ovaryumlarda damarlarda şiddetli hiperemi ile stromada mononükleer hücre infiltrasyonu alanları ve fibröz bağ doku formasyonlarına rastlandı (Resim 3.20.).



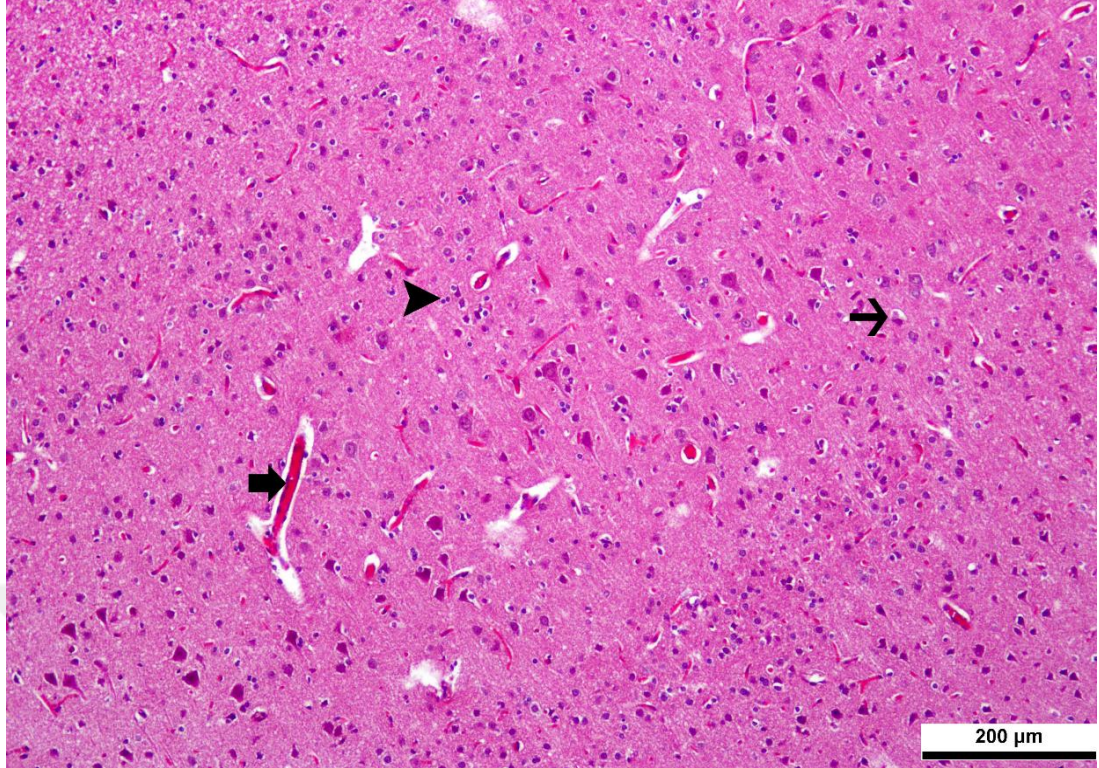
Resim 3.16. 2,4-D+Klorojenik asit grubu **Karaciğerde**, vena sentralislerde hiperemi (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi (ince ok), periportal alanlarda ve intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları (okbaşı), intersitisyel alanlarda bağ doku oluşumu (kıvrımlı ok) HE. X10



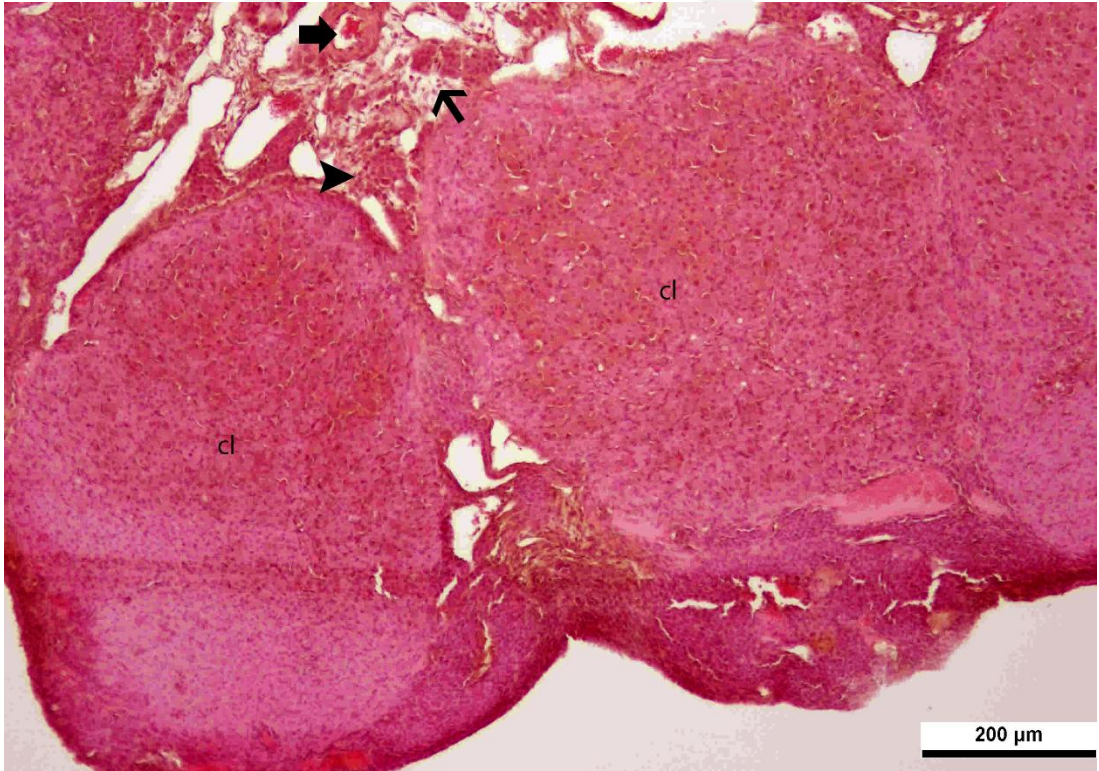
Resim 3.17. 2,4-D+Klorojenik asit grubu, **Böbrek**; Glomerulus bowman boşluğunda genişleme (kalın ok), glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları (ince ok), tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları (ok başı), HE. X10



Resim 3.18. 2,4-D+Klorojenik asit grubu, **Kalp** Myokardta hyalin dejenerasyonu alanları HE. X10



Resim 3.19.3 2,4-D+Klorojenik asit grubu, **Beyin**, Damarlarda şiddetli hiperemi (kalın ok) nöronlarda vakuolizasyon oluşumu (ince ok), nöronlar çevresinde fokal glia hücre infiltrasyonu alanları (ok başı) HE X10



Resim 3.20.4 2,4-D+Klorojenik asit grubu, **Ovaryum**, Damarlarda şiddetli hiperemi (kalın ok) stromada intersitisyel alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu alanları (ince ok), stromada fibröz bağ doku formasyonu (ok başı), cl: corpus luteum HE. X10

Çizelge 3.7. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularının histopatolojisinin istatistiksel değerlendirmesi

Organ	Histopatolojik Bulgular	Kontrol	Kloro ₁₀	2,4-D	2,4D+Kloro ₁₀	"P" DEĞERLERİ
Karaciğer	Karaciğerlerde Vena sentraliste hiperemi	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,57±0,53 ^c	1,28±0,48 ^b	0,000
	Sinuzoidal dilatasyon ve hiperemi	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,01±0,29 ^c	1,12±0,18 ^b	0,000
	Periportal bölgede ve intersistisyel alanda MNH infiltrasyonu alanları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,14±0,69 ^c	1,14±0,37 ^b	0,000
	İntersistisyel alanda bağ doku oluşumu	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,53±0,52 ^c	1,14±0,37 ^b	0,000
Böbrek	Glomerulus bowman boşluğunda genişleme	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,28±0,48 ^c	0,82±0,22 ^b	0,000
	Glomerulus kapillarlarında vakuolizasyon oluşumları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,57±0,53 ^c	1,28±0,32 ^b	0,000
	Tubuluslarda vakuoler dejenerasyon alanları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,04±0,23 ^c	1,12±0,21 ^b	0,000

	İntersitisyel bölgede hiperemi	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,14±0,69 ^c	1,14±0,37 ^b	0,000
Kalp	Myokardta hyalin dejnerasyonu alanları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,56±0,53 ^c	1,14±0,37 ^b	0,000
	Myokardta MNH infiltrasyonu alanları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,02±0,35 ^c	1,27±0,24 ^b	0,000
Beyin	Damarlarda hiperemi	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,14±0,69 ^c	0,82±0,32 ^b	0,000
	Nöronlarda vakuolizasyon oluşumları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,57±0,53 ^c	1,14±0,37 ^b	0,000
	Glia hücre infiltrasyonu alanlarında artış	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,04±0,43 ^c	1,15±0,36 ^b	0,000
Ovaryum	Damarlarda hiperemi	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,52±0,43 ^c	1,25±0,38 ^b	0,000
	Stromada MNH infiltrasyonu alanları	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,11±0,29 ^c	1,15±0,18 ^b	0,000
	Stromada fibröz bağ doku formasyonunda artış	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,14±0,62 ^c	1,16±0,33 ^b	0,000

Ortalama ± standart sapma; n=7

*^{a-b,c} : Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

3.6.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

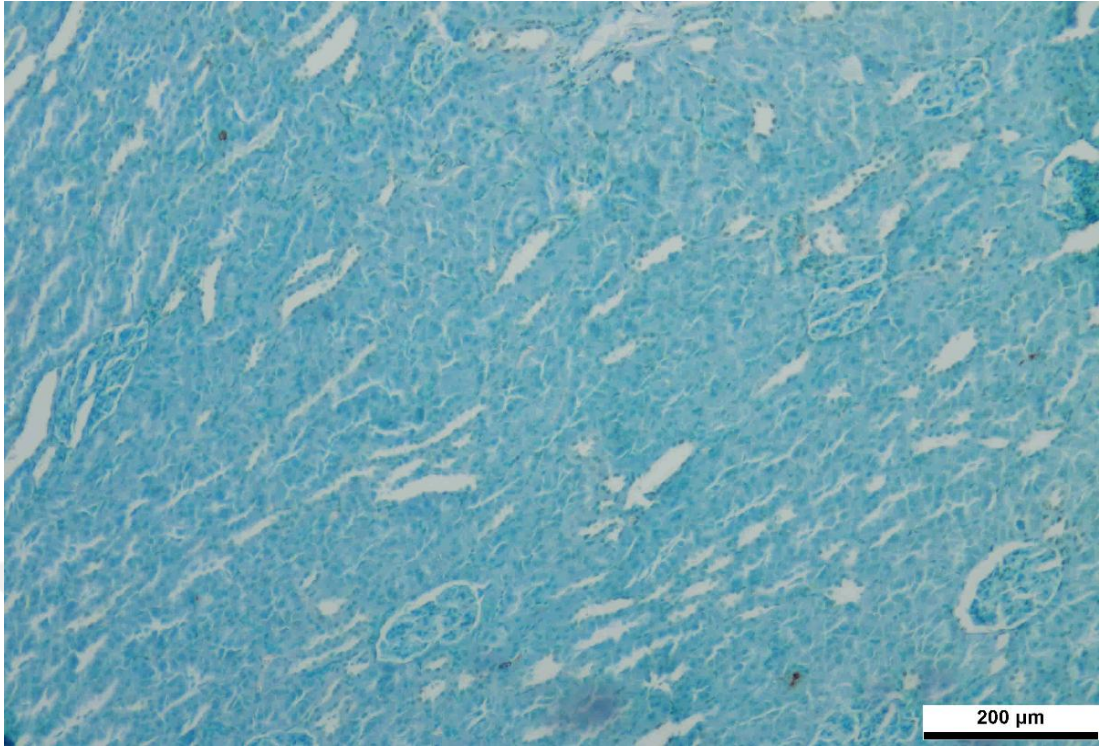
Yapılmış olan çalışmadaki mikroskopik değişimler incelendiğinde karaciğer ve böbrek dokularında TUNEL boyama yöntemi ile apoptozisi belirlemek amacıyla yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistik verileri Çizelge 3.8’de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

3.6.4.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki ratların karaciğer (Resim 3.21.) ve böbrek (Resim 3.22) dokularında yapılan TUNEL boyamasında pozitiflik saptanmadı.



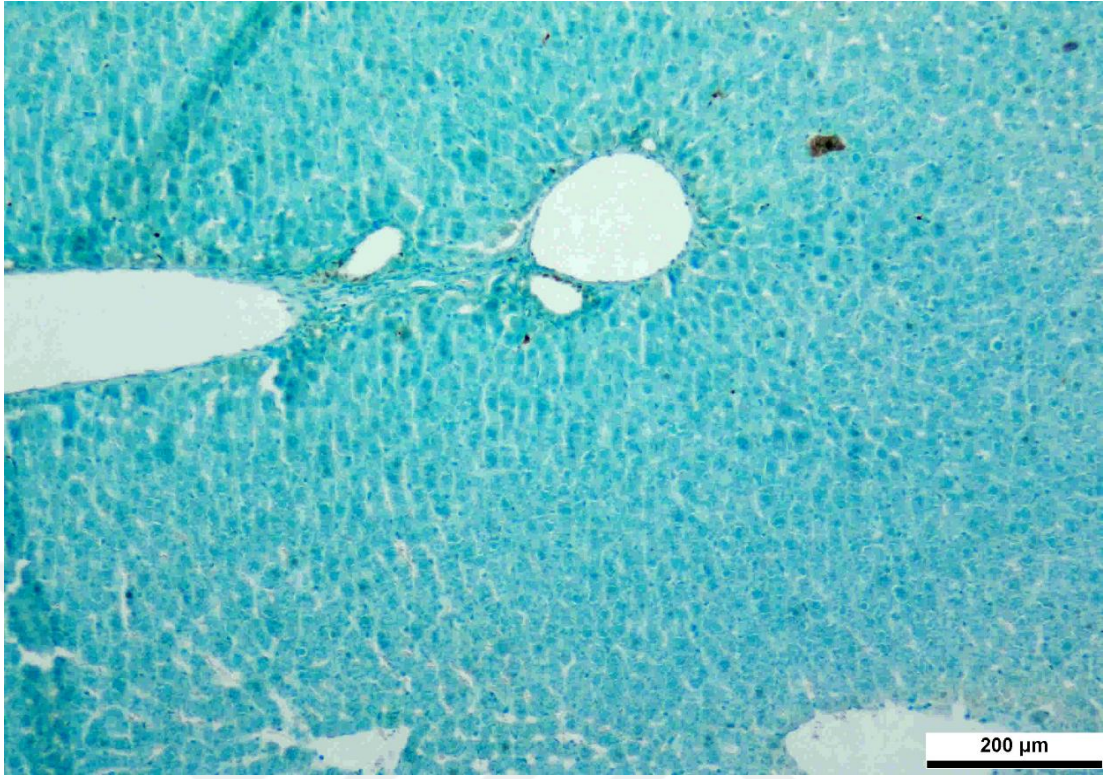
Resim 3.21. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL (-) hücreler. X20



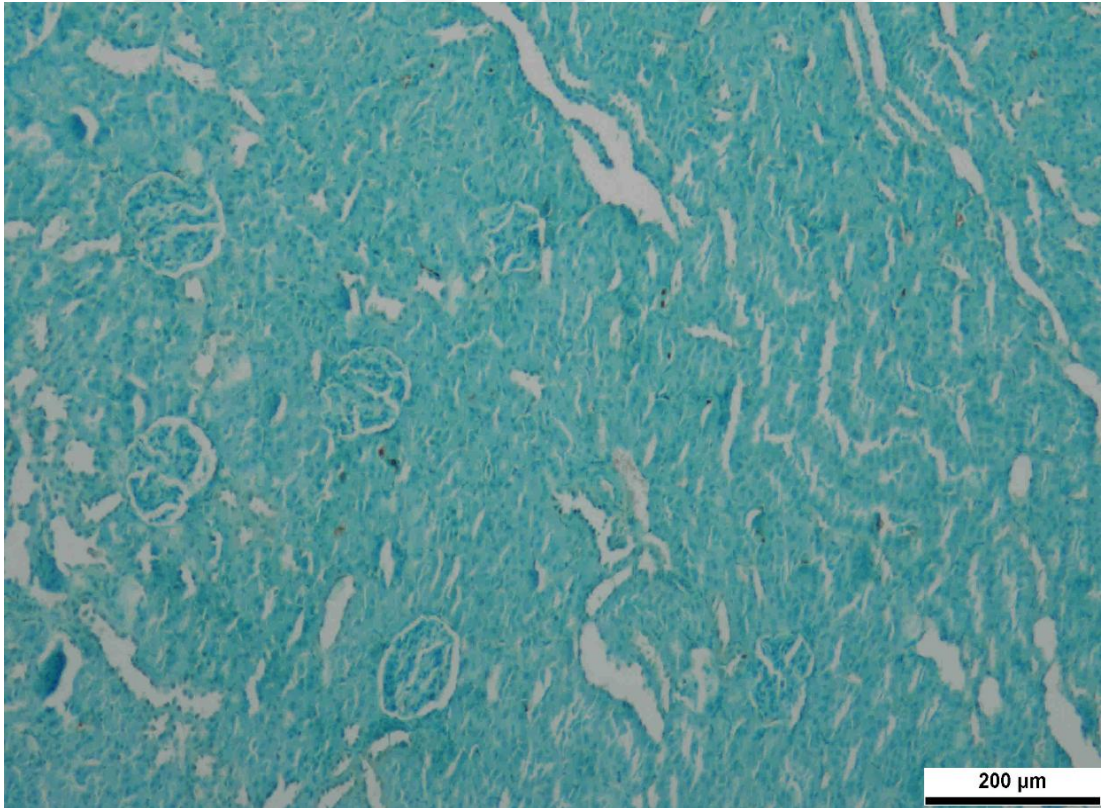
Resim 3.22. Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL (-) hücreler. X10

3.6.4.2. Klorojenik Asit Grubu

Klorojenik asit grubundaki ratların karaciğer (Resim 3.23) ve böbrek (Resim 3.24) dokularında yapılan TUNEL boyamasında pozitif immün reaktivite saptanmadı.



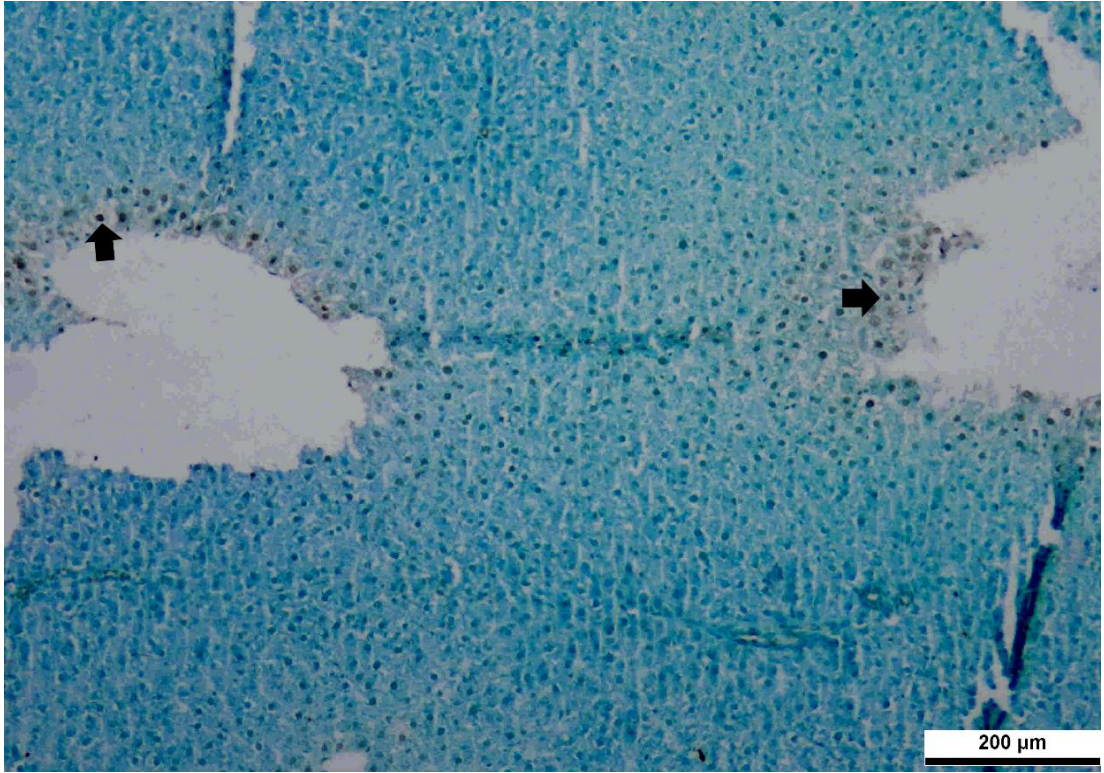
Resim 3.23. Klorojenik asit grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL (-) hücreler. X10



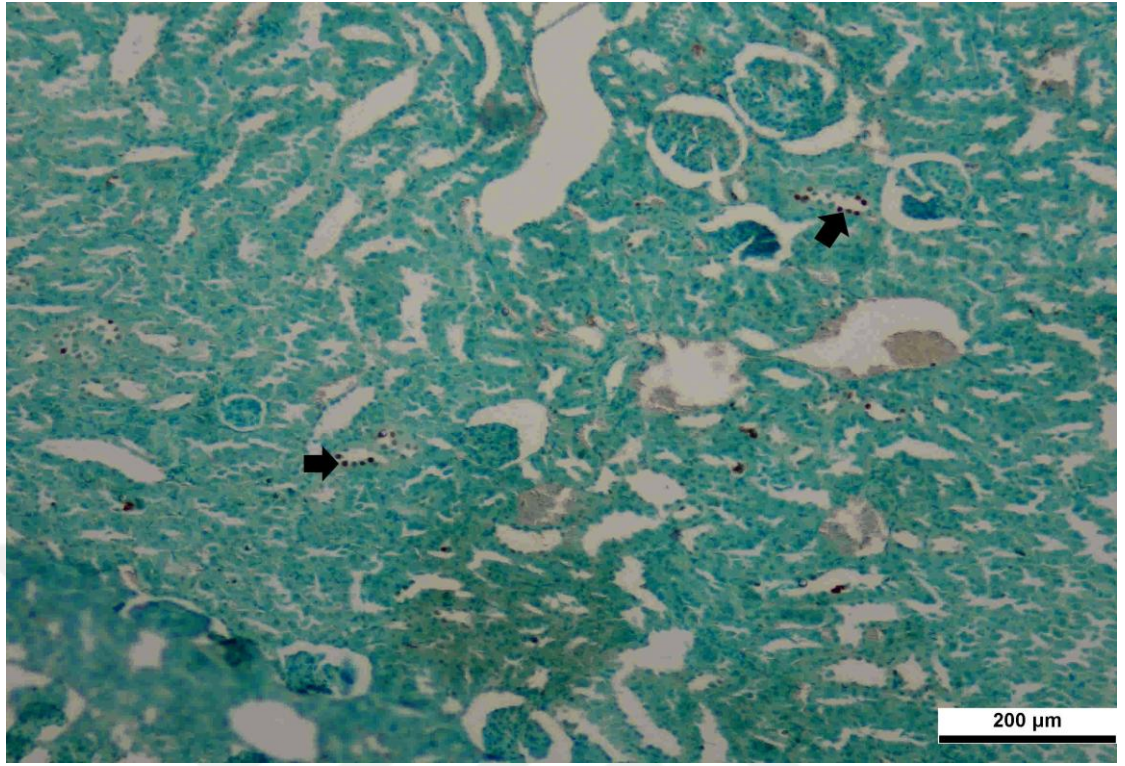
Resim 3.24.5 Klorojenik asit grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL (-) hücreler. X10

3.6.4.3. 2,4-D Grubu

2,4-D grubundaki ratların karaciğer hepatositleri incelendiğinde TUNEL pozitif boyanma saptandı (Resim 3.25). Böbreklerde de proksimal tubulus epitelinde TUNEL pozitif boyanmaların olduğu tespit edildi (Resim 3.26).



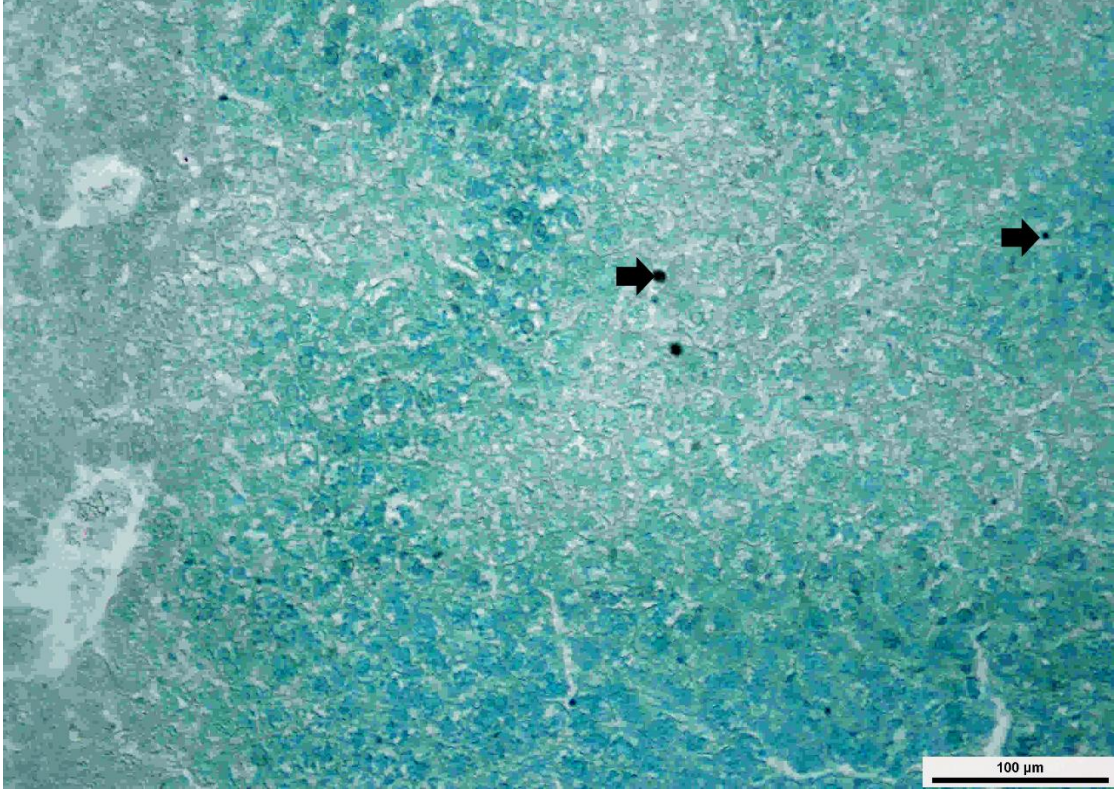
Resim 3.25. 2,4-D grubuna ait karaciğerde hepatosit çekirdeklerinde TUNEL (+) hücreler (kalın ok). X10



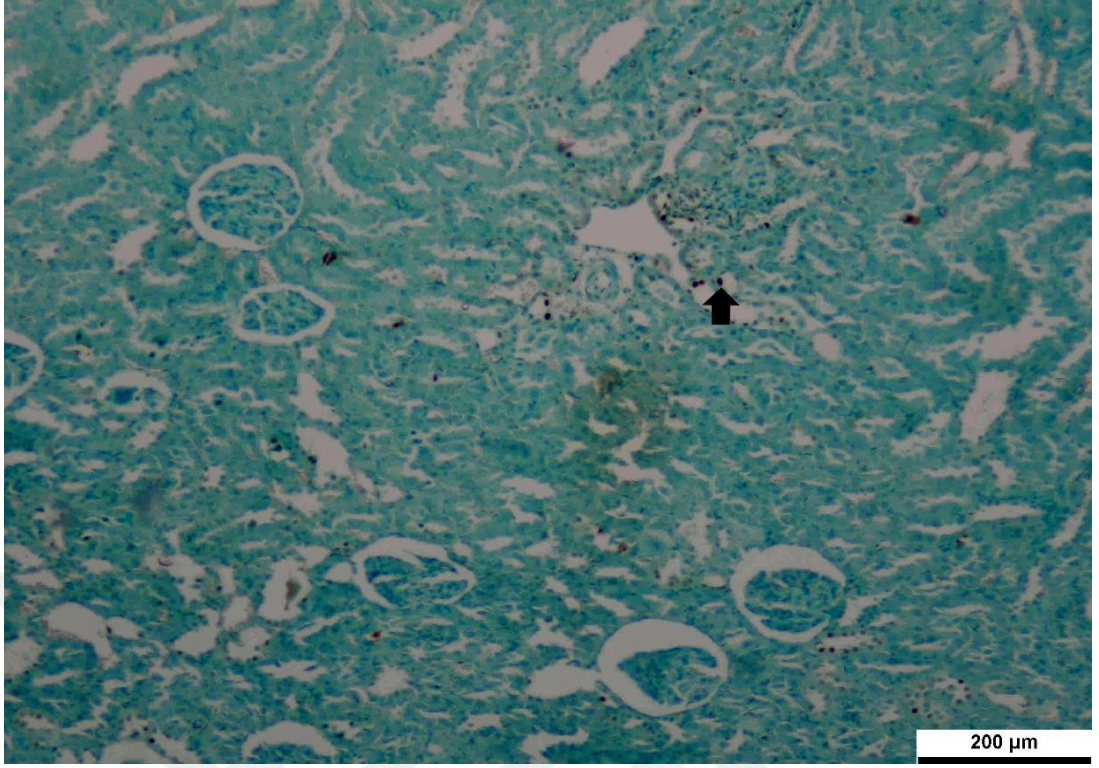
Resim 3.26.6 2,4-D grubuna ait böbrek tubulus epitel hücrelerinde TUNEL (+) hücreler (kalın ok). X10

3.6.4.4. 2,4-D+Klorojenik Asit Grubu

2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen ratların karaciğer hepatositleri incelendiğinde TUNEL pozitif boyanma saptandı (Resim 3.27). Böbreklerde de proksimal tubulus epitelinde TUNEL pozitif boyanmaların olduğu tespit edildi (Resim 3.28).



Resim 3.27. 2,4-D+Klorojenik asit grubuna ait karaciğerde hepatosit çekirdeklerinde TUNEL (+) hücreler (kalın ok). X20



Resim 3.28.7 2,4-D+Klorojenik asit grubuna ait böbrek tubulus epitel hücrelerinde TUNEL (+) hücreler (kalın ok). X10

Çizelge 3.8. 2,4-D'nin 50 mg/kg (2,4-D) ve Klorojenik asidin 10mg/kg (Kloro) dozları uygulanan ratların karaciğer ve böbrek dokularının TUNEL boyama yöntemi istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Kontrol	Kloro	2,4-D	2,4-D+Kloro	"p" DEĞERLERİ
Karaciğer TUNEL	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	24,28±5,34 ^c	13,22±5,34 ^b	0,000
Böbrek TUNEL	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	25,26±4,08 ^c	17,14±3,89 ^b	0,000

Ortalama ± standart sapma; n=7

*^{a-b,c}: Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

4. TARTIŞMA

İyonlaştırıcı radyasyon, ağır metaller, ultraviyole ışınları ve pestisitler gibi kimyasal maddelerin organizmalar üzerinde çeşitli zararlı etkiler yarattığı bilinmektedir (Pizzino vd., 2017; Ercal vd., 2001). Kimyasal ajanlar doku ve organ hasarlarına neden olmaktadır. Ayrıca kanser gibi birçok hastalığın oluşumundan da sorumludur. Bu ajanların canlı organizmalarda reaktif oksijen türlerinin birikimini artırarak oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. (Toyokuni vd., 1995; Reuter vd., 2010; Klaunig, 2018; Hayes vd., 2020).

Teknoloji ile birlikte tarımda gün geçtikçe pestisit kullanımı da artmaktadır. Bu kimyasal kirleticilerin kullanımı arttıkça pestisit kalıntılarıyla kirlenmiş su ve gıdaları tüketen organizmalar nedeniyle olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır. Pestisitlerin hedef organizma üzerinde toksik etkileri ile bu maddelere maruz kalan canlı organizmalarda değişik maruz kalma yolları ile ciddi metabolik bozukluklara bağlı hastalık ve organizma hasarı gibi önüne geçilmez sonuçların açığa çıktığı bilinmektedir. (Shadnia vd., 2005).

Pestisitler günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Halkın çoğu zaman farkında olmadığı, çeşitli kullanım alanlarına sahip ve çevreye büyük tehditler oluşturan maddeler de mevcuttur. Bu maddelerden biri de klorofenoksi grubuna ait olan 2,4-D'dir. İkinci dünya savaşı sırasında geniş yapraklı bitkileri kontrol altına almak için kullanılan bu maddenin zararlı etkilerinin keşfedilmesinden bu yana pek çok araştırmacı konu üzerinde çalışmalar yapmıştır. Ancak bu çalışmalar halkın gözünde istenilen oranda farkındalık oluşturmamıştır 2,4-D Türkiye'de oldukça sık kullanılmaktadır. Sürekli maruz kaldığımız bir maddenin zararlı etkilerini araştırmak ve yaygın kullanımının getirebileceği sonuçları anlamak gerçekten çok önemli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. 2,4-D'nin insanlardaki etkilerini araştırmayı amaçlayan çalışmalar toksikasyonu biyokimyasal, histopatolojik ve genetik olarak incelenmesiyle yapılabilir. Ancak etik nedenlerden dolayı insanlar üzerindeki etkileri doğrudan ortaya koyan çalışmalar yapılamadığından model organizmalar kullanılmıştır. (Özdaş, 2006).

Antioksidan bir bileşik olan klorojenik asit, başta yeşil kahve, elma, kiraz, böğürtlen, domates ve patates olmak üzere birçok sebze ve meyvede bulunan bir polifenoldür.

Klorojenik asitin vücutta kardiyovasküler, sinir ve gastrointestinal sistemler üzerinde koruyucu etkisi vardır. Ayrıca glikoz ve lipid metabolizmasını düzenleyici etkiye de sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bunun yanı sıra antihipertansif, antilipidemik ve antidiyabetik etkilerinin yanı sıra güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri de ön plandadır (Lu vd., 2020). Klorojenik asit, antioksidan ve antiapoptotik etkileri sayesinde böbreklerdeki birçok doku hasarını da önleyebilmektedir (Wang vd., 2022).

Oksidatif stres, oksidasyonu teşvik etmek için oksidatif ve antioksidan etkiler meydana geldiğinde ortaya çıkar. Genellikle reaktif oksijen türlerindeki (ROS) değişiklikler organizmaların birçok fonksiyonunu etkiler (Liguori vd., 2018). Bu yüzden artan oksidanları belirlemenin etkili bir yöntemi antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişiklikleri ölçmekle başlar. Bu nedenle oksidatif stresi belirlemenin etkili bir yöntemi antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişiklikleri belirlemektir (Liguori vd., 2018; Pisoschi vd., 2021). Antioksidan enzim aktivitesinin bir göstergesi süperoksit dismutazdır. SOD, serbest haldeki oksijen radikallerini temizleyen ve bunların metabolizmadaki yoğunluğunu azaltan bir enzimdir ve çoğunlukla da oksidatif stresin belirleyicileri olarak kabul edilir. (Hu vd., 2019; Culotta, 2001; Younus, 2018). Katalaz, neredeyse bütün canlılarda varolan antioksidan savunma sisteminde yer alan bir diğer önemli enzimdir (Nandi vd., 2019; Chen vd., 2004).

Klorfenoksi grubuna ait 2,4-D, karaciğer üzerinde toksik etkiler göstererek AST, ALT ve ALP düzeylerinde artışa yol açabilir; ayrıca böbrek fonksiyonlarını gösteren BUN ve kreatinin seviyelerini de yükseltebilir (Demirel vd., 2023).Yapılan bir çalışmada, (Demirel vd., 2023), dişi sıçanlara içme suyuyla birlikte 600 mg/L 2,4-D verildiğinde plazma ALT, AST, ALP, BUN ve kreatinin ile FSH, LH, PG ve E2 düzeylerinin arttığı vurgulanmıştır. Malathion'un neden olabileceği biyokimyasal ve histopatolojik hasarı araştıran başka bir çalışmada, malathion 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında 14 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen verilere göre karaciğer enzimlerinin (AST, ALT, ALP) serum düzeyleri değerlendirilmiş ve malathion grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmiştir. (Raoofi vd., 2016). Marouani vd. (2017)' de yaptığı diğer bir çalışmada erkek ratlara 100 ve 200 mg/kg dozlarında 2,4-D'yi 30 gün boyunca uygulamış ve kontrol grubuna göre FSH ve LH seviyelerinin yükselmiş olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer şekilde bu çalışmada da, 2,4-D kullanımının AST, ALT, ALP, üre, glikoz ve total protein düzeyleri ile FSH, LH, PG ve E2 seviyelerini artırdığını, klorojenik asitin ise bu toksikasyonda artan seviyeleri normale yakın bir seviyeye getirdiği belirlenmiştir. Bunun nedeni 2,4-D'nin karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında normal metabolik süreçlere etki ederek bu parametrelerde artışa neden olması, klorojenik asidin ise antioksidan etkisiyle karaciğer ve böbrekler üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu söylenebilir (Wang vd., 2022). Literatürde 2,4-D ile yapılan çalışmalarda canlı ağırlık değişimlerine ait çok fazla veri olmamasına rağmen çalışmamızda tüm grupların canlı ağırlık değişimleri belirlenmiş ve gruplar açısından istatistiksel olarak bir fark oluşmadığı belirlenmiştir.

Hücre içi çoklu doymamış yağ asitlerinin $-H_2O_2$ veya $-OH$ radikalleri tarafından oksidasyonu, enzimatik veya kimyasal tepkimeyle bozulmasıyla MDA'yı oluşturan lipid peroksitleri oluşturmaktadır (Cheng vd, 2011). İlgili enzim sistemleri (SOD ve CAT gibi), lipid peroksitlerin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli faydalar sağlamaktadır. Daha önceki birçok çalışmada, 2,4-D'ye maruz kalan insan ve sıçanlarda MDA düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Nakbi vd., 2010). Başka bir çalışmada ise (Jahovic vd., 2003), metotreksat uygulanan sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında GSH düzeylerinin azaldığı, miyeloperoksidaz aktivitesi ve MDA düzeylerinin ise arttığını belirlemiştir. Yapılan diğer çalışmalarla paralel olarak bizim çalışmamızda da kan ve doku MDA'sında artış gözlenmiştir. 2,4-D ile birlikte klorojenik asit verilen grupta MDA düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu durumun klorojenik asidin etkili bir serbest radikal temizleyici olmasından dolayı oluşabileceği sonucuna varılmıştır.

Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH, vücudun antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Sadece GPx'in bir ortak substratı değildir, aynı zamanda serbest radikallerin temizlenmesinde de doğrudan bir rol oynar. Aynı zamanda hücre içindeki redoks tampon sisteminin temel bir bileşeni olarak işlev görür (Johansen vd, 2005). Pestisitler gibi ksenobiyotiklerle etkileşime girerek karmaşık bileşikler oluşturur. Bu etkileşim sayesinde, GSH hücreleri ksenobiyotiklerin toksik etkilerinden korur (Chhabra vd., 1993, Demirel vd., 2023). Oksidatif stres sırasında GSH, yüksek LPO tarafından üretilen peroksitlerin detoksifikasyonunda yer alan enzimler tarafından tüketilir (Cathcart, 1985). Pek çok çalışmada pestisitlere maruz kalan hayvanlarda GSH'nin azalma yönünde seyrettiği

(Ahmad vd., 2013; Karabağ-Coban vd., 2016) ve çeşitli antioksidanların kullanımının GSH düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Alturfan ve arkadaşları (2011) yaptıkları başka bir çalışmada ise sıçanlarda akrilamidin neden olduğu oksidatif stresi azaltmak için resveratrolün farklı dokulardaki etkilerini araştırmışlar ve bu amaçla dört grup oluşturmuşlardır. Bu çalışmada resveratrol 30 mg/kg, akrilamid 40 mg/kg dozlarında ayrı ayrı ve akrilamid ile resveratrol birlikte verildiği gruplar oluşturulmuş ve oksidan antioksidan dengelerin toksik gruplarda bozulduğu; ancak resveratrol verilen grupta ise bu dengenin normale yakın değerlere dönüştüğünü açıklamışlardır. Akrilamid grubunda 10 gün sonra MDA ve MPO aktivitelerinin istatistiksel olarak arttığını, GSH'nin ise anlamlı düzeyde azaldığını, tedavi grubunda ise bu durumun anlamlı olarak tersine döndüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada 2,4-D grubunda GSH düzeyleri kontrole göre azalmıştır. Bu durum, 2,4-D uygulanması sonucu oluşan serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyonlara bağlı olarak GSH düzeylerinin azalabileceği şeklinde yorumlanmaktadır. Klorojenik asidin 2,4-D ile birlikte kullanıldığı grupta ise klorojenik asidin GSH düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Bu, klorojenik asidin 2,4-D kaynaklı lipid peroksidasyonunu hafiflettiğini ve antioksidan etkisinden dolayı antioksidan enzimlerin aktivitesini iyileştirdiğini göstermektedir (Wang vd., 2022).

Normal fizyolojik koşullar altında, SOD ve CAT gibi hücre içi antioksidan enzimler, ROS'u temizleyerek hücrel antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (Bukowska, 2004). SOD, süperoksit radikallerinin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize ederken; CAT, H_2O_2 'yi suya dönüştürür. Dolayısıyla bu antioksidan enzimler ROS'un toksik etkilerini azaltabilir sonucuna ulaşılmaktadır (Mansour ve Mossa, 2009). Farklı pestisitler kullanılarak yapılan araştırmalar, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkilerine ilişkin farklı açıklamalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada (Kanbur vd., 2009), bir organofosfatlı insektisit olan propetanphos'un sıçan eritrositlerinde SOD ve CAT aktivitelerini azalttığını bildirmişlerdir. Başka bir araştırmacının yaptığı çalışmada ise (İnce vd., 2017), malathion kaynaklı oksidatif hasara bağlı olarak farelerin eritrosit ve dokularında SOD ve CAT aktivitelerinin arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde bu in vivo çalışmada da 28 gün boyunca 2,4-D verilen sıçanlarda eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında SOD ve CAT aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. 2,4-D grubundaki eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum

dokularında SOD ve CAT aktivitelerinin düşük seviyeleri artan oksidatif stres nedeniyle bu enzimlerin tükenmesi ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Sıçanların eritrosit, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ovaryum dokularında SOD ve CAT aktiviteleri, klorojenik asit grubunda 2,4-D grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Bu durumun, klorojenik asidin bu enzimlerin aktivitesini sürdürme ve yenileme kapasitesi ile oksidan süpürücü özelliğinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Sıçanlarda 2,4-D'nin doku dağılımının incelendiği bir çalışmada sıçanlara 28 gün boyunca 15, 75 ve 150 mg/kg dozlarında 2,4-D uygulanmış ve böbrek tübüllerinde lezyonlar rapor edilmiştir. Bu hayvanlarda vasküler hiperemi ve glomerülerde değişiklikler meydana geldiği açıklanmıştır (Tayep vd., 2012). Başka bir çalışmada ise 2,4-D içme suyuna 25 ve 50 ppm dozlarında 45 gün süreyle uygulanmış; 50 ve 100 ppm dozlarına maruz kalan sıçanların beyin, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında değişiklikler olduğunu rapor etmişlerdir. Özellikle de karaciğerde portal alanlarda, böbreklerde tubulus epitel hücrelerinde dejenerasyon oluşumlarının şekillendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca beyinde de nöronlarda glia hücre infiltrasyonu ve nöronofaji oluşumlarının şekillendiği belirtilmiştir (Vural vd., 2015). 2,4-D'nin dokularda neden olduğu histopatolojik değişiklikler üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Nakbi vd., (2010)'da 4 hafta boyunca 5 mg/kg dozunda uygulanan 2,4-D'nin sıçanların karaciğer sinüzoidlerinde kupffer hücre aktivasyonunun arttığını bildirmiştir. Aynı zamanda İnce ve ark. (2023)'te 5 mg/kg dozunda 2,4-D'ye 8 hafta maruz kalan erkek farelerde karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, testis ve beyin dokusunda histopatolojik değişikliklerin meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu tez çalışması histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde bu çalışmalara benzer şekilde sonuçlara ulaşılmıştır. Kontrol ve klorojenik asit grubu ile karşılaştırma yapıldığında 2,4-D grubunda karaciğer dokusunda periasiner ve periportal alanlarda sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi ile hepatositlerde dejeneratif değişiklikler, periasiner ve periportal bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonu alanları ile bağ dokusu oluşumunun gözleendiği belirlendi. Böbrek örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde ise; glomerüler kapillarlarında hiperemi ile vakuolizasyon oluşumları tespit edildi. Ayrıca birçok tubulus epitel hücrelerini kapsayan dejenerasyon alanları ile kortikomedüller bölgede hiperemi gözlenmiştir. Beyin dokusu incelendiğinde birçok damarda hiperemi ile nöronlar çevresinde glia

hücre infiltrasyonun arttığı tespit edildi. Aynı zamanda nöronlarda vakuolizasyon oluşumları da görüldü. Kalpte de histopatolojik değişiklikler gözlenmiş ve miyokardda hiyalin dejenerasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonun olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, 2,4-D'ye yanıt olarak koruyucu olarak klorojenik asit verilen grupta, klorojenik asidin antioksidan ve sitoprotektif etkileri yoluyla bu değişiklikleri azalttığı belirlenmiştir (Wang vd., 2022).

Serbest radikallerin üretimi patofizyolojinin bir parçasıdır ve birçok pestisit toksisitesi serbest radikallerin üretimiyle ilişkilidir. 2,4-D'nin aynı zamanda ROS ürettiği de bilinmektedir (Demirel vd., 2023). Serbest radikaller doğrudan veya dolaylı olarak hücre ölümüne neden olabilir. Karaciğer ve böbrek de dahil olmak üzere birçok hücre türünde apoptoz, ROS ve oksidatif stres oluşumunda büyük bir rol oynamaktadır. Yapılan in vivo çalışmalar, birçok toksik ajanın DNA kırıklarına yol açtığı ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir (Mishima vd., 2006; Karakoç vd., 2015). Bu çalışmada da karaciğer ve böbrek dokularında apoptozu göstermek amacıyla TUNEL boyaması yapılmıştır. 2,4-D'ye maruz kalan ratların karaciğer ve böbrek dokularında apoptozun arttığı gözlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatürü destekler niteliktedir. Çalışmamızda 2,4-D grubunda apoptozun kontrol grubu ve klorojenik asit grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Koruyucu madde grubu olan klorojenik asit; 2,4-D grubuna göre TUNEL (+) hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiş ve klorojenik asidin karaciğer ve böbrek dokularında apoptozu önlediği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamız, 2,4-D'nin 50 mg/kg ve klorojenik asidin 10 mg/kg dozlarında, ratlara oral gavaj yöntemiyle 28 gün süreyle uygulanarak, bu maddelerin metabolizma üzerindeki etkilerini, oksidatif stresin oluşumunu ve oksidan-antioksidan dengesindeki değişimleri biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle, çalışmamız literatürdeki mevcut eksiklikleri gidermeye yönelik önemli bir katkı sağlamaktadır. Yapılan çalışmada 2,4-D verilen sıçanlarda bazı biyokimyasal parametre düzeylerinin (AST, ALT, ALP, üre, total protein ve glukoz), lipid peroksidasyonun, DNA kırıklarının ve proinflamatuvar ve apoptotik hücrelerin sayılarının arttığı, GSH ile antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve ovaryum dokusunda hasara ilişkin histopatolojik değişikliklerin olduğu belirlendi. Buna karşın, 10 mg/kg dozda klorojenik asit uygulamasının ise 2,4-D ile görülen olumsuz değişiklikleri azalttığı tespit edildi. Sonuçta klorojenik asidin 2,4-D ile indüklenen oksidatif hasara karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi ile birlikte sitoprotektif etki gösterdiği ortaya çıkarıldı. Bu açıdan bakıldığında, özellikle klorojenik asit takviyesinin insan ve hayvan sağlığı açısından oksidatif hasara neden olan 2,4-D maruziyetine karşı potansiyel koruyucu etkisinin olabileceği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada 2,4-D ve bu gruptaki herbisitlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı klorojenik asidin koruyucu etkisinin belirlenmesi literatüre ilave bilgilerin girmesine olanak sağlamış ve ayrıca bunlardan kaynaklı oluşabilecek olumsuz etkilerin azaltılmasında klorojenik asidin kullanılabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6): 141-147.
- Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B.K., Kumar, V., Chauhan, A.K., Singh, D., Pandey, H.P., Singh, C. (2013). Biochemical and molecular mechanisms of N-acetyl cysteine and silymarin-mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Chem Biol Interact.*, 201: 9–18.
- Alavanja, M.C., Hoppin, J.A., Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health.*, 25: 155-197.
- AL-Megrin, W.A., Metwally, D.M., Habotta, O.A., Amin, H.K., Abdel Moneim, A.E., El-khadragy, M., (2020), Nephroprotective effects of chlorogenic acid against sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis: *Journal of the Science of Food and Agriculture*
- Al-Rasheed, N., Faddah, L., Al-Rasheed, N., Bassiouni, Y.A., Hasan, I.H., Mahmoud, A.M., Mohamad, R.A., Yacoub, H.I., (2016), Protective effects of silymarin, alone or in combination with chlorogenic acid and/or melatonin, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: *Pharmacognosy Magazine*, v. 12, p. S337–S345.
- Altınar, A., Atalay, H., Bilal, T. (2018). Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilim Derg.*, 7(1): 51-55.
- Alturfan, A.A., Tozan-Beceran, A., Sehirli, A.O, Demiralp, E., Sener, G., Omurtag, G.Z. (2011) Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep*, 39, 4, 4589-4596.
- Arnold, E.K. (1989) Pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides, *Veterinary Human Toxicology*, 31(2): 121-5.
- Beutler, E., Duron, O. BM Kelly. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882.
- Braak, N., Neve, R., Jones, A.K., Gibbs, M., Breuker, C. J. (2018). The effects of insecticides on butterflies—A review. *Environmental pollution.*, 242: 507-518.
- Buchel.K.H., “Pflanzenschutz und schädlingbekämpfung”, *Thieme*, Stuttgart, (1977).
- Bukowska, B. (2004) 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role of glutathione. *Cell Biol Int.*, 28(7): 557-63.
- Cathcart, R.F. (1985) Vitamin C: the nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses*, 18: 61-77.
- Chen, X., Liang, H., Van Remmen, H., Vijg, J., Richardson, A. (2004). Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.*, 422(2): 197-210.
- Cheng, J., Wang, F., Yu, D. F., Wu, P. F., and Chen, J. G. (2011). The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial 55 dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *Eur J Pharmacol*, 650(1): 184-194.
- Chhabra, S.K., Hashim, S., Rao, A.R. (1993) Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translocally to malathion. *J Appl Toxicol*, 13: 411–416.
- Culotta, V. C. (2001). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current topics in cellular regulation*, 36: 117-132.
- Dalton, T. P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L., Andrews, G. K. (1996). Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity: occupancy in vivo of metal response

- elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biochem Physiol*, 271(42): 26233-26241.
- Demirel, H. H., Zemheri-Navruz, F., Kucukkurt, İ., Arslan-Acaroz, D., Tureyen, A., Ince, S. (2023). Synergistic toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and arsenic alters biomarkers in rats. *Toxicology Research*, 12(4), 574-583.
- Dkhil, M.A., Abdel Moneim, A.E., Bauomy, A.A., Khalil, M., Al-Shaebi, E.M., ve Al-Quraishy, S., (2020), Chlorogenic acid prevents hepatotoxicity in arsenic-treated mice: role of oxidative stress and apoptosis: *Molecular Biology Reports*, v. 47: p. 1161–1171.
- Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology*. 2014; 324: 98-107.
- Drabkin, D. L., Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biochem Physiol*, 112(1): 51-65.
- Draper, H.H., Hardley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421–431.
- DSouza, U. J. A. (2017). Pesticide Toxicity And Oxidative Stress Review. *Borneo Journal of Medical Sciences (BJMS)*, 3-3.
- Ecevit, O., Mennan, H., Aksoy, H.M., Akça, İ. (1999) Tarımsal mücadele ilaçları ve çevreye olan etkileri. *O.M.Ü. Ziraat Fak. Ders Kitabı*, Samsun, No:32.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, 1(6): 529-539.
- Erne, K. (1966), Distribution and elimination of chlorinated phenoxyacetic acid in animals, *Acta Vet Scand.*, 7: 240-256.
- Extoxnet. (1996) *Extension Toxicology Network*, Pesticide Information Profiles.
- Farah, A., ve de Paula Lima, J., (2019), Consumption of Chlorogenic Acids through Coffee and Health Implications: *Beverages*, v. 5: p. 11.
- Feldman, R.J., Maibach, H.I. (1974) Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man, *Toxicol Appl. Pharmacol*, 28: 126-3.
- Feng, Y., Yu, Y.H., Wang, S.T., Ren, J., Camer, D., Hua, Y.Z., Zhang, Q., Huang, J., Xue, D.L., Zhang, X.F., Huang, X.F., ve Liu, Y., (2016), Chlorogenic acid protects d -galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice: *Pharmaceutical Biology*, v. 54, p. 1027–1034.
- Ferri K.F., Kroemer G. (2001). Mitochondria-the suicide organelles. *BioEssays*, 23: 111- 115.
- Fleming, R.A. (1997), An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 17(5P2): 146S-154S.
- Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* 53(1): 1-2.
- Forman, H. J., Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 20(9): 689- 709.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a trois. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 674: 3-22.
- Ftiesen, E.G., Jones, G.R., Vaughan, D. (1990) Clinical presentation and management of acute 2,4-D oral ingestion, *Drug Saf.*, 5 (2): 155-90.
- Gastman BR. (2001). Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, 23: 409-25.

- Gomez, L., Duran, A., Gazquez, A., Martinez, S., Masot, J., Roncero, V. (2001). Lesions "Induced by 2,4-D and Chloropyrifos in Tench (*Tinca tinca* L.): Implication in toxicity Studies". *Histology and Pathological Anatomy Unit, Facultad de Veterinaria, Uex, C ceres, Spain*.
- Gorzinski, S. J., et al. Acute, Pharmacokinetic, and Subchronic Toxicological Studies of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Toxicological Sciences*, 1987, 9.3: 423-435
- Guerrero A, Arias M. (1998). Apoptosis. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*, Third Edition. Boston, *Acedemic Press*, 159-188.
- Guerrero A, Arias M. (2001). *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*. Third Edition. Boston, *Acedemic Press*, 1171-1184.
- Güngör, B. (2007) 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (2,4-D) immobilize *Pseudomonas putida* ile biyokimyasal yıkımının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 80.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ pol*, 112(1): 1-10.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*.
- Hilton DA, Love S, Barber R. (1997). Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labelled poly-A oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 1997;42: 13-20.
- Hu, X., Hao, C., Cheng, Z. M., Zhong, Y. (2019). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the grapevine superoxide dismutase (SOD) family. *Int J Genom Data Min*, 2019.
- Hwang, S.J., Kim, Y.W., Park, Y., Lee, H.J., Kim, K.W. (2014), Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research Official Journal of The European Histamine Research Society*. 63(1): 81–90.
- Ince, S., Demirel, H. H., Zemheri-Navruz, F., Arslan-Acaroz, D., Kucukkurt, I., Acaroz, U., Demirkapı, E. N. (2023). Synergistic toxicity of ethanol and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid enhances oxidant status, DNA damage, inflammation, and apoptosis in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(4), 10710-10723.
- Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H.H., Varol, N., Ozyurek, H.A., Zemheri, F., Kucukkurt, I., (2017), Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 96: 263–268.
- Ince, S., Demirel, H.H., Zemheri-Navruz, F., Arslan-Acaroz, D., K   kkurt, I., Acaroz, U., Tureyen, A., Demirkapı, E.N. (2022), Synergistic toxicity of ethanol and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid enhances oxidant status, DNA damage, inflammation, and apoptosis in rats. *Environ Sci. Pollut Res*. 30(4): 10710-10723.
- Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, A.O., Yegen, B.C., Sener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*, 34, 4: 282-287.
- Jakubczyk, K., Dec, K., Ka du ska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K. (2020). Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*, 48(284): 124-127.
- Ji, L., Jiang, P., Lu, B., Sheng, Y., Wang, X., Wang, Z. (2013), Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24(11): 1911-1919.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J., Ergul, A., (2005), Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*, 4(1): 5 1-11.

- Kalıpcı, E. (2011). 2, 4-D herbisitleri ve endüstriyel atık sularının ekotoksik etkilerinin azaserin-sıçan modelinde karaciğer ve pankreasta araştırılması
- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S., (2009) Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.*,72:909-915.
- Karabag-Coban, F., Bulduk, I., Liman, R., Ince, S., Cigerci, I., Hazman, O. (2016), Oleuropein alleviates malathion-induced oxidative stress and DNA damage in rats. *Toxicol Environ Chem.*, 98(1): 101-108.
- Karakoc, H. T., Altintas, R., Parlakpınar, H., Polat, A., Samdancı, E., Sagir, M.,Duran, Z. R. (2015). Protective Effects of Molsidomine Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 24(4), 585-593.
- Keller, T., Skopp, G., Wu, M. (1994). Fatal overdose of 2,4- diclorophenoxyacetic acid (2,4-D), *Forensic Sci. Int.*, 65: 13-8.
- Khalil, A.B., (2003) Isolation and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading organisms from soil in Jordan valley, *Biotechnology*, 2 (2): 73-85.
- Kim, K. H., Kabir, E.,Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*, 575: 525-535.
- Klaunig, J. E. (2018). Oxidative stress and cancer. *Curr Pharm Des*, 24(40): 4771-4778.
- Kohli, J.D., Khana, R.N., Gupta, B.N., Dhar, M.M., Tandon, J.S., Sircar, K.P., (1974), Absorption and excretion of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in man, *Xenobiotica*, 4 (2): 97-100.
- Kwan,C.Y., Chu, W., (2004), A study of the reaction mechanisms of the degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid by oxalate-mediated photooxidation, *Water Research*, 38: 4213-4221.
- Li, L., Li, H., Li, Y., Feng, J., Guan, D., Zhang, Y., Li, C. (2021), Ferritinophagy-Mediated ROS Production Contributed to Proliferation Inhibition, Apoptosis, and Ferroptosis Induction in Action of Mechanism of 2-Pyridylhydrazone Dithiocarbamate Acetate. *Oxid Med Cell Longev*,
- Liu, Y. J., Zhou, C. Y., Qiu, C. H., Lu, X. M.,Wang, Y. T. Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 8(4): 1106-1110.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 13: 757.
- Lindquist, N.G., Ulberg, S., (1971), Distribution of the herbicides 2,4,5-T and 2,4-D in pregnant mice, Accumulation in the yolk sac epithelium, *Experientia*, 27: 1439- 1441.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L.,Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z., Ma, X. (2020). Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 19(6): 3130-3158.
- Luo, J., Yang, C., Luo, X., Yang, Y., Li, J., Song, B., Li, L. (2020). Chlorogenic acid attenuates cyclophosphamide-induced rat interstitial cystitis. *Life Sciences*. 254: 117590.
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M.,Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI journal*, 17: 1101.
- Manda, G., Nechifor, M. T.,Neagu, T. M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 3(1): 22-46.
- Mansour, S.A., Mossa, A.H., (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes

- induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic Biochem Physiol*, 93: 34–39.
- Mishima, K., Baba, A., Matsuo, M., Itoh, Y., Oishi, R. (2006). Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(9), 1564-1577.
- Mossa, A. T. H., Mohafrash, S. M., Chandrasekaran, N. (2018). Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. *Biomed Res Int*,
- Mountz, JD., Zhou, T. (2001). Apoptosis and autoimmunity. In: Koopman WJ, (ed). A textbook of rheumatology: Arthritis and allied conditions. *Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins*.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 279(47), 49064-49073.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I., Ellouz, M., Miled, A., Hammami, M., (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid treated rats, *Nutrition Metabolism*, 7 (80), doi:10.1186/1743-7075-7-80.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.*,
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*. 97: 67-74.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 97: 67-74.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z., (2018), Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research: *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 97, p. 67–74.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2): 351-358.
- Öncüer, C. (1991). Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçları, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*, Bornova-İzmir.
- ÖZCAN, S. (2003). Konya atıksuyunda organoklorlu pestisitlerin (ocps) araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 1-59.
- Özdaş, E., Songül, B., Ateş, U., Ergen G., Uyanıkgil, Y., Baka, M. Ve Yavaşoğlu, A., (2006), Bir Herbisit Olan 2,4-D'nin Sıçanlarda Testis Dokusunun Üzerine Etkisi, *Ege Tıp Dergisi*, 45(3) : 169- 174.
- Özoran, Y. (1992). Apoptosis. In: Robbins S, Cotron R, Kumar V, (ed). Basic Pathology. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders company, 14-15.
- Öztürk, F. (2002). Apoptoz. İnönü Üniversitesi *Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2): 143-148.
- ÖZTÜRK, S. (1997). Tarım ilaçları. 2. Baskı, *Ak Basımevi*, İstanbul, 127-132.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., Serban, AI. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem*, 209: 112891.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Polat. H. (1999). “Beta-Cyphemethrin Pestisitinin Balıklara Ani Toksik Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara,

- Prescott, L.F., Park, J., Darrien, I. (1979). Treatment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis, *Bri Journal of Clinical Pharmacology*, 7: 111-116.
- Raoofi, R., Jahromi, H. K., Jahromi, Z. K., Abedi, H. A., Sameni, H., Pourahmad, M. (2016). Antioxidant effects of green-tea on biochemical and histopathological changes of liver in male rats poisoned by malathion insecticide. *Int J Med Res Health Sci*, 5(5): 361-70.
- Rashidi, R., Rezaee, R., Shakeri, A., Hayes, A. W., Karimi, G. (2022). A review of the protective effects of chlorogenic acid against different chemicals. *Journal of Food Biochemistry*. 46(9): e14254.
- Rehman, K., Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *J Cell Biochem.*, 118(11): 3577-3585.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med*, 49(11): 1603-1616.
- Sauerhoff, M.W. (1977) The fate of 2,4-D following oral administration to man, *Toxicol.*, 8: 3-11.
- Schneider P, Tschoop J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacotherapy library*, 2000;74: 281-286.
- Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Abdollahi, M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol*, 24(9): 439-445.
- Shankar, M.V., Anandan, S., Venkatachalam, N., Araindoo, B., Murugesan, V. (2006) Fine route for an efficient removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by zeolite-supported TiO₂, *Chemosphere*, 63: 1014-1021.
- Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9): 852.
- Sinha, A.K., (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem*. 47(2): 389-94. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90132-7.
- Sota-Grabinska, E., Wisniowska, E., Kalka, J. (2003). Toxicity of selected synthetic auxines-2,4-D, MCPA derivatives to broadleaved and cereal plants, *Crop Protection*, 22: 355-360.
- Sun, Y. I., Oberley, L. W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3): 497-500.
- Tanyeli, A., Guzel, D. (2018). Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Klorojenik Asit (Cga) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma. *Sakarya Tıp Dergisi*, 8(2), 410-415.
- Tatlı, Ö. (2006) Ege bölgesine özgü bazı yas meyve, sebze ve kurutulmuş gıda ürünlerinde pestisit kalıntı düzeylerinin tespiti, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-121.
- Tayeb, W., nakbi, A., trabelsi, M., miled, A., hammami, M. (2012). Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: involvement of oxidative stress *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(9): 696–704.
- Tepe, I. (1997). Türkiye’de tarım ve tarım dışı alanlarda sorun olan yabancı otlar ve mücadeleleri, *Yüzüncü Yıl Ün., Yay No:32*, s.16.
- Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters*, 358(1): 1-3.

- Van Hung P. (2016). Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56(1): 25–35.
- Vroumsia, T., Vural, H.A., Gülçubuka, A., Erdoğan, Ö., Özkan, O., Öztürk, G.Y., Haktanır, D. (2015). Subchronic exposure to 2,4-d-induced biochemical and histopathological changes in rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24- No: 3a
- Vural N., “Toksikoloji Kitabı”, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını*, 73, (1996).
- Vural, H. A., Gulcubuk, A., Erdogan, O., Ozkan, O., Ozturk, G. Y., Haktanir, D. (2015). Subchronic Exposure to 2, 4-d-Induced Biochemical and Histopathological Changes in Rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(3 a): 970-976.
- Wang, L., Pan, X., Jiang, L., (2022). The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. *Front Nutr*. 9: 943911.
- Washington State Department of Ecology, (2001). İnternet Erişim Tarihi: 10.02.2019.
- Westing, A.H. (1979). Ecological effects of military defoliation on the forests of South Vietnam, *Bioscience*, 21: 893-898.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M., Carrell, R.W. (1975). The estimation of red cell superoxide activity. *J Lab Clin Med* 55: 337–341.
- World Health Organization., “Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture”, WHO, Geneva, (1990).
- Yalçınkaya, M. (2006). Bir herbisit olan 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)’ın *Poecilia Reticulata* P., 1859’da medulla spinalis üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 1-97.
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci* 12(3): 88.
- Yönten, V. (2006). Bitkisel hormonlardan 2, 4-D amin ve böcek öldürücülerden 2, 2-dikloro vinil fosfat (dichlorvos)’ın orjinal, yüzeyi HNO₃ ve Na₂CO₃ ile değiştirilmiş bentonit üzerine adsorbsiyonlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van, 1-56.
- Yun, N., Kang, J. W., Lee, S. M. (2012). Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 23(10): 1249-1255.

