

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

**DİBUTİL FTALATIN İNSAN AKCİĞER HÜCRE HATTINA
TOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
ASKORBİK ASİT VE N-ASETİLSİSTEİNİN OLASI KORUYUCU
ETKİLERİ**

Ecz. Gamze KARAMAN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2020**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek akademik bilgileriyle yol gösteren gerekse manevi olarak desteği, ilgisi ve sabrı ile çalışmamda destek olan, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Ü. Pınar Erkekoğlu'na,

Deneylerim süresince bana her zaman destek olan Dr. Ecz. Aylin Balcı ve Uzm. Ecz. Erhan Tan'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yetiştiren, emeklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Eğitim hayatım süresince her zaman yanımda olan ve beni daimi destekleyen başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Yüksek lisans döneminde bana ilham olan minik kızım Nazenin'e ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Karaman, G. Dibutil Ftalatın İnsan Akciğer Hücre Hattına Olası Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi ve Askorbik Asit ve N-Asetilsisteinin Olası Koruyucu Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020 Endokrin bozucular, hormonları taklit ederek veya engelleyerek vücudun normal işleyişini bozan ve genellikle de insanlar tarafından üretilen kimyasal maddelerdir. Üzerinde en çok çalışılan ftalat türevi di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)'tır. DEHP'nin özellikle testiküler ve hepatik oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir. DEHP'den sonra en yaygın kullanılan ftalat türevi olan dibutilftalat (DBP) ise, başta kozmetikler (özellikle ojeler) olmak üzere, endüstride birçok alanda yaygın kullanılmaktadır. DBP'ye inhalasyonla da özellikle manikürcülerin, yoğun parfüm ve deodorant kullanan bireylerin ve bu ftalatı üreten işyerlerinde çalışanların maruz kaldığı bilinmektedir. Literatürde DBP'nin testiküler ve hepatik toksisitesine dair veriler olmakla birlikte, akciğer toksisitesi üzerinde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, DBP'nin akciğer toksisite mekanizmaları bilinmemektedir. Bu tez kapsamında, DBP'nin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre kültürleri (A549 hücreleri) üzerinde olası sitotoksik ve oksidatif stres oluşturucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, A549 hücrelerinde DBP'nin inhibitör konsantrasyon 30 (IC₃₀; hücrelerin %30'unu öldüren konsantrasyon) ve inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀; hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) dozları belirlenmiş, IC₃₀ dozunun neden olduğu intraselüler reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırıcı etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, DBP'nin yol açtığı olası lipit peroksidasyon ve protein oksidasyonu incelenmiş, organizmadaki en önemli tiyol olan glutatyon (GSH) ve total antioksidan kapasitede (TAOC) düzeylerinde yol açabileceği olası değişiklikler belirlenmiştir. Tez çalışmasında DBP'nin olası toksik etkilerine karşı askorbik asit (Asc) ve N-asetil sisteinin (NAC) olası koruyucu etkileri incelenmiştir. Hem NAC, hem de Asc'nin DBP uygulamasıyla beraber ROS düzeylerini düşürdüğü, protein oksidasyonunu azalttığı, total GSH düzeylerini kontrol düzeylerine yükselttiği ve azalan oksidatif strese bağlı olarak her iki antioksidanın da TAOC düzeylerini düşürdüğü belirlenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bilgiler doğrultusunda, DBP'nin toksik etki mekanizmasının altında yatan nedenlerden birinin oksidatif stres olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, Asc ve NAC'ın DBP'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dibutilftalat (DBP), insan akciğer hücreleri (A549 hücreleri), askorbik asit, N-asetilsistein, oksidatif stres, sitotoksisite, reaktif oksijen türleri (ROS).

Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir.

Proje no: TYL-2018-16986

ABSTRACT

Karaman G, Evaluation of Possible Toxic Effects of Dibutyl Phthalate on Human Lung Cell Line and Possible Protective Effects of Ascorbic Acid and N-Acetylcysteine, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Toxicology Program, Master Thesis, Ankara, 2020. Endocrine disruptors are chemical substances which are generally produced by humans that disrupt the normal functioning of the body by imitating or blocking hormones. The mostly studied phthalate derivative is di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). It is known that DEHP can lead particularly to testicular and hepatic oxidative stress. Dibutylphthalate (DBP), which is the most widely used phthalate derivative after DEHP, is widely used in many fields, particularly in cosmetics (especially nail polishes). Manicurists, individuals who use perfumes and deodorants intensely and people working in phthalate producing plants are known to be exposed to DBP particularly by inhalation. Although there is data on testicular and hepatic toxicity of DBP in the literature, there are very few studies on its lung toxicity. In addition, lung toxicity mechanisms of DBP are not known. In this thesis, we aimed to evaluate the possible cytotoxic and oxidative stress-generating effects of DBP in human non-small cell lung cancer cell cultures (A549 cells). In this context, inhibitor concentration 30 (IC₃₀; concentration that kills 30% of cells) and inhibitor concentration 50 (IC₅₀; concentration that kills 50% of cells) doses were determined in A549 cells and the effect of intracellular reactive oxygen species (ROS) generating effect by IC₃₀ dose was evaluated. In addition, possible lipid peroxidation and protein oxidation caused by DBP were investigated, possible alterations in glutathione (GSH), which is the most important thiol in the organism, and total antioxidant capacity (TAOC) levels were identified. In the thesis, the protective effects of ascorbic acid (Asc) and N-acetylcysteine (NAC) against the possible toxic effects of DBP were determined. Both NAC and Asc along with DBP application reduced ROS levels, decreased protein oxidation, increased total GSH levels to control levels and both antioxidants reduced TAOC levels due to decreased oxidative stress. According to the data obtained at the end of the thesis, one of the underlying toxicity mechanisms of DBP is oxidative stress. In addition, Asc acid and NAC were determined to be protective against oxidative stress caused by DBP.

Keywords: dibutylphthalate (DBP), human lung cancer cells (A549 cells), ascorbic acid, N-acetylcysteine, oxidative stress, cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS).

This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit.
Project no: TYL-2018-16986

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Endokrin Bozucular	2
2.2. Ftalatlar	3
2.2.1. Ftalatların Kullanım Alanları	3
2.2.2. Ftalatlara Maruziyet Yolları	4
2.2.3. Ftalatların Biyotransformasyonları	6
2.2.4. Ftalatların Genel Toksik Etkileri	7
2.2.5. Ftalatlarla İlgili Düzenlemeler	8
2.3. Dibutil Ftalat	9
2.3.1. Dibutil Ftalatın Biyotransformasyonu	10
2.3.2. Dibutil Ftalatın Kullanım Alanları ve Maruziyet Yolları	10
2.3.3. Dibutil Ftalat ile İlgili Yasal Düzenlemeler	13
2.3.4. Dibutil Ftalatın Toksik Etkileri	15
2.4. Akciğer Yapısı	19
2.5. A549 Hücre Hattı	21
2.6. Askorbik Asit	21
2.7. N-Asetilsistein	22
2.8. Oksidatif Stres	23
2.8.1. Oksidatif Stres Biyogöstergeleri	25
2.8.2. Antioksidan Enzimler	26

3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	33
3.4. Deneilerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.4.1. DBP Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.4.2. N-Asetil Sistein Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.4.3. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.4.4. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	34
3.4.5. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler	34
3.4.6. A549 Hücrelerinin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler	35
3.4.7. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkoninik asit (BCA) Deneyi] Kullanılan Çözeltiler	35
3.4.8. Total Glutasyon (GSH) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	36
3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler	37
3.4.10. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.11. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	39
3.5. Hücreler ve Deney Grupları	41
3.5.1. Deney Grupları	41
3.5.2. Donmuş Hücrelerin Çözülme Aşamaları	41
3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması	42
3.5.4. Hücrelerin Besiyerinin Değişimi	43
3.5.5. Hücrelerin Dondurulması İşlemi	43
3.5.6. Hücre Sayım İşlemi Basamakları	44
3.6. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	45
3.6.1. A549 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	45
3.6.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi	46
3.6.3. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	47
3.6.4. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	48
3.6.5. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü	50
3.6.6. Total Antioksidan Kapasite Ölçümünün Belirlenmesi	51
3.6.7. Protein Miktarının Belirlenmesi	52

4. BULGULAR	54
4.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksisitenin Belirlenmesi	54
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	55
4.3. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri	56
4.4. Glutasyon Düzeyleri	58
4.5. Protein Oksidasyonu Düzeyleri	60
4.6. Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	61
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	72
8. EKLER	
EK 1. Dijital Makbuz	
EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

A549	İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücreleri
ABTS	2,2-Azino-Bis-3-Etilbenzotiyazolin-6-Sülfonik asit
Asc	Askorbik Asit
ATCC	American Type Cell Collection
BBP	Benzil Butil Ftalat
BCA	Bişinkoninik Asit
BER	Baz Eksizyon Onarımı
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır Serum Albümini
BSMC	Bronşiyal Düz Kas Hücreleri
CAT	Katalaz
CYP450	Sitokrom 450
DBP	Dibutil Ftalat
DEHP	Di(2-etilhekzil) Ftalat
DEP	Dietil Ftalat
DIDP	Di-İzodesil Ftalat
DINP	Di-İzononil Ftalat
DİBP	Di-İzobutil Ftalat
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DnOP	Di-n-Oktil Ftalat
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
DPHP	Di(2-propilheptil) Ftalat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'- Ditiyo- Bis-(2- Nitrobenzoik) Asit
EC-SOD	Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz
ED	Endokrin Bozucular
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı

EPA	Amerika Çevre Koruma Ajansı
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz Kromatografisi
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Total Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC30	Hücrelerin %30'unu Öldüren Doz
IC50	Hücrelerin %50'sini Öldüren Doz
IFNγ	İnterferon Gama
IL-10	İnterlökin 10
IL-8	İnterlökin 8
İBH	İnflamatuvar Barsak Hastalıkları
KM	Kunming Fare
LOAEL	Ters Etki Gözlenen En Düşük Düzey
LOOH	Lipid Hidroperoksit
MAG	Mangiferin
MBP	Mono Butil Ftalat
MCPP	3-karboksi- Monopropil Ftalat
MDA	Malondialdehit
MEHP	Mono(2-etilhekzil) Ftalat
MES	2-(N-morfolin) Etansülfonik Asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NAC	N-Asetilsistein
NOAEL	Ters Etki Gözlenmeyen Düzey
Nrf2/ARE	Eritrosit İlişkili 2 Faktör/Antioksidan Duyarlı Eleman
PERK	Endoplazmik Retikulum Kinaz Proteini
PPAR1	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör 1
PVC	Polivinil Klorür
RAW 264.7	Fare Makrofaj Hücre Hattı

RDA	Tavsiye Edilen Günlük Alınması Gereken Besin Miktarı
RfD	Referans Doz
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSS	Reaktif Kükürt Türleri
SCHER	Avrupa Komisyonu Sağlık ve evre Riskleri Bilimsel Komitesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSB	Tek Sarmal Kırıkları
SULT	Sulfon Transferaz
TAOC	Total Antioksidan Kapasite
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Bileşikleri
TCA	Trikloroasetik Asit
TLV-TWA	alışanların Sağlığını Bozmayacak En Yüksek Konsantrasyon
TNFα	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Trolox	6-Hidroksi-2,5,7,8-Tetrametilkroman-2-Karboksilik Asit
UGT	Uridin Glukronil Transferaz

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ftalatların genel yapısı	3
2.3. Dibutil ftalatın yapısı	9
2.4. Monobutil ftalatın yapısı	10
2.5. Akciğerin yapısı	20
2.6. Askorbik asitin yapısı	21
2.7. N-asetilsisteinin yapısı	23
2.8. Lipit peroksidasyonu	27
2.9. Glutatyonun yapısı	28
2.10. Okside glutatyonunun yapısı	29
2.11. N-asetilsistein ve glutatyon ilişkisi	29
2.12. Glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz reaksiyonu	30
3.1. MDA-TBA kompleksi	48
4.1. DBP'nin 0,25-15 mM konsantrasyon aralığında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi	55
4.2. Çalışma gruplarında hücre içi ROS oluşumu.	56
4.3. Malondialdehit standartları-absorbans eğrisi	57
4.4. Çalışma gruplarında malondialdehit (MDA) düzeyleri	58
4.5. Glutatyon düzeyleri.	59
4.6. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri	60
4.7. Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.	61
4.8. Trolox standartları eğrisi.	61
4.9. Çalışma gruplarında total antioksidan kapasite düzeyleri	62

TABLolar

Tablo		Sayfa
4.1.	DBP uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı	54
4.2.	A549 hücrelerinde DBP'nin IC ₃₀ ve IC ₅₀ değerleri	55
4.3.	Çalışma gruplarında hücre içi ROS üretimi	56
4.4.	Çalışma gruplarında malondialdehit aktivitesi.	57
4.5.	Total GSH düzeyleri.	59
4.6.	Çalışma gruplarında protein karbonil aktivitesi.	60
4.7.	Çalışma gruplarında total antioksidan kapasite düzeyleri	62

1. GİRİŞ

Ftalat türevlerinin oksidatif stres oluşturuucu ve genotoksik etkileri son yıllarda birçok araştırmanın konusu olmuştur. Ftalat esterlerine oral, inhalasyon, dermal ve parenteral yollarla temas söz konusu olabilir. Üzerinde en çok bilimsel araştırma yapılan ftalat türevi di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)'tir. DEHP'in özellikle testiküler ve hepatik oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir. DEHP'den sonra en yaygın kullanılan ftalat türevi olan DBP ise, başta kozmetikler (özellikle ojeler) olmak üzere, endüstride birçok alanda yaygın kullanılmaktadır. Yoğun parfüm ve deodorant kullanan bireylerin, ftalat üreten işyerlerinde çalışan işçilerin ve kozmetiklere yoğun maruz kalan meslek gruplarının (örneğin, manikürcüler) DBP'ye özellikle inhalasyonla yüksek miktarlarda maruz kaldıkları bilinmektedir. DBP'nin testiküler ve karaciğer toksisitesine neden olduğuna ilişkin bilimsel literatürde veriler olmakla birlikte, akciğer toksisitesi üzerinde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır ve pulmoner toksisite mekanizmaları bilinmemektedir. Ayrıca, günlük hayatta gıdalar yoluyla tükettiğimiz askorbik asit (Asc) ve vücuttaki sistein metabolizmasına katılan, yüksek mukolitik etkinliğe sahip N-asetil sistein (NAC) gibi güçlü antioksidanların DBP'nin oluşturabileceği akciğer toksisitesi üzerindeki modifiye edici/koruyucu etkileri değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamında, yaygın kullanılan ftalat türevlerinden olan DBP'nin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre kültürleri (A549 hücreleri) üzerinde olası sitotoksik ve oksidatif stres oluşturuucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, DBP'nin olası toksik etkilerine karşı Asc ve NAC'ın koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular (ED'ler), hormonları taklit ederek veya engelleyerek vücudun normal işleyişini bozan sentetik veya doğal kimyasal maddelerdir. Doğal endokrin bozucuların yarı ömürleri daha kısadır ve hızlı metabolize edildikleri için toksik etkilerini ancak çok yüksek dozlarda alındıklarında gösterebilirler. Sentetik ED'lerin ise yarı ömürleri daha uzundur, yağda çözünürlükleri genelde daha fazladır ve özellikle yağ dokusunda akümülyasyonları sonucu etkileri daha uzun süre görülür. Ayrıca, sentetik ED'lerin bazılarının oksidatif metabolitlerinin ana bileşiklerden daha toksik oldukları ve daha ciddi istenmeyen etkiler oluşturabilecekleri bilinmektedir (1).

Yaşamın farklı dönemlerinde, pek çok kaynaktan maruz kalınabilen ED'lerin endokrin dengeyi bozarak, organizmada pek çok sistem üzerinde istenmeyen etkilere neden oldukları ileri sürülmektedir (2). Bu maddelerin büyüme, stres yanıtı, cinsiyet gelişimi, üreme yeteneği, insülin yapımı ve kullanımı ve metabolik hız gibi birçok temel süreci etkiledikleri ve hormonal bozukluklara yol açtıkları düşünülmektedir (3-6).

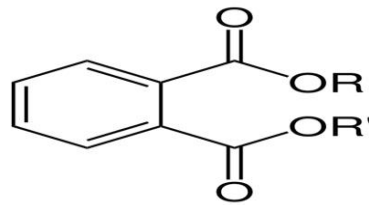
Endokrin bozucu kimyasal maddelerin özellikle cinsiyet hormonlarının üzerine etkileri sonucu, başta prenatal maruziyet ile olmak üzere yaşamın erken dönemlerinde önemli hasarlara yol açabildikleri ve bu hasarların yaşamın ilerleyen yıllarında kalıcı olabileceği belirtilmektedir (7). Ftalatlar gibi anti-androjenik etkili olan ED'lerin yaşamın erken dönemlerinde maruziyet ile özellikle erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilediği; anogenital açıklıkta azalma, hipospadias, kriptorşidizm, sperm sayısında ve motilitesinde azalma, sperm morfolojisinde bozulma ve erken yaşta testis kanserlerine yol açabileceği bildirilmiştir; tüm bu belirtiler "testiküler disjenez sendromu" olarak adlandırılmıştır (8). Bisfenol A (BPA) gibi östrojenik ED'leri ise sperm kalitesinde bozulma, obezite ve farklı kanserlerle (meme ve prostat gibi) ilişkilendirilen çalışmalar mevcuttur (8,9).

Endokrin bozucuların pulmoner sistem üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların daha sınırlı olduğu görülmektedir. Ancak, özellikle işyerlerinde ftalatlar gibi ED'lere inhalasyon yoluyla maruziyet ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir ve yaşam kalitesini düşürebilir. İnhalasyonla ED'lere maruziyeti alerjiler, astım ve

immün sistem ile ilgili sorunlarla ilişkilendiren çalışmalar literatürde mevcuttur (10-12). Ancak, inhalasyona ED maruziyeti sonucu oluşan veya akciğer hücrelerinin maruziyeti sonucu oksidatif stresi değerlendirilen çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (13, 14).

2.2. Ftalatlar

Ftalatlar, 1,2-benzendikarboksilik asitin dialkil veya alkil/aril esterleri olup, 1930'lardan bu yana katkı maddesi olarak oldukça yaygın kullanılan endüstriyel ürünlerdir. Ftalatlar ftalik anhidrit ile uygun bir alkolün (genelde 6-13 karbonlu) reaksiyonu ile elde edilen renksiz ve oda ısısında sıvı olan maddelerdir (15, 16). Şekil 2.1.'de ftalatların genel yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Ftalatların genel yapısı

2.2.1. Ftalatların Kullanım Alanları

Ftalatlar, plastik malzemelerin esneklik ve yumuşaklığını arttırmak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Çok çeşitli alanlarda kullanılıp yüksek miktarlarda üretilip tüketilir. Kullanımlarının yaygın olması ve plastik materyalden kolayca uzaklaşabilmeleri nedeniyle ftalatlara oral, inhalasyon ve dermal ciddi maruziyet söz konusudur. En önemli ve tehlikeli maruziyet kaynakları ise medikal malzemelerdir. Tıbbi cihazlarda, intravenöz torbalarda, tüplerde, kateterlerde, kan torbalarında, enteral beslenme torbalarında, nazogastrik tüplerde, periton diyaliz torbalarında, kardiyopulmoner bypass ameliyatlarında kullanılan torba ve tüpler maruziyet kaynaklarındandır (17). Bu maruziyet kritik bir gelişim dönemine denk gelirse veya yoğun bir temas söz konusu olursa, kalıcı ve ciddi hasarlar ortaya çıkabilir (18-20). Ftalatlar, alkil yan zincirlerinin uzunluklarına göre iki gruba ayrılırlar (21, 22):

1. Kısa zincirli ftalatlar: Di-n-butil ftalat (DnBP), benzil butil ftalat (BBP) gibi yan zincir uzunluğu 2-4 C arası olan ftalatlar genellikle kozmetiklerde ve kişisel bakım ürünlerinde renk ve kokuyu sabitlemek için kullanılırlar. Ayrıca çözücü ve ilaç katkı maddesi olarak ve insektisit formülasyonlarında kullanılmaktadırlar (21, 22).
2. Uzun zincirli ftalatlar: DEHP, di-izononil ftalat (DINP), di-izodesil ftalat (DIDP) ve di (2-propilheptil) ftalat (DPHP) gibi yan zincir uzunluğu 6 C ve üzeri olan ftalatlar esas olarak polivinil klorür (PVC) polimer üretiminde kullanılırlar. PVC polimerlerinin birbirinin üzerinden kaymasını sağlayarak plastik materyalin yumuşatılmasını sağlarlar ve şekil verilmesini kolaylaştırırlar. Bunun dışında sıvı deterjanlarda, endüstriyel yağlarda, kağıt ve mukavva imalatında ve pestisitlerde de kullanımları bulunmaktadır (21,22).

Dünya genelinde ftalik asit esterlerinin üretimi 2007 yılından 2017 yılına kadar olan 10 yıllık süreçte 2,7 milyon tondan, 6 milyon tona yükselmiştir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da tüketici ürünlerinde kullanımları kısıtlanmıştır; ancak, Brezilya, Hindistan ve Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde tüketimlerinin arttığı bildirilmiştir (23).

2.2.2. Ftalatlara Maruziyet Yolları

Ftalatlara en yüksek maruziyet parenteral yolla gerçekleşmektedir. Tıbbi malzemeler (medikal borular, intraketler, enjektörler, vb.) yüksek miktarda ftalat içermektedir. Dolayısıyla, serum torbaları, kan transfüzyon torbaları ve diyaliz torbalarından da yüksek miktarda maruziyet söz konusu olabilir (24, 25).

Ftalat türevlerine özellikle plastik kaplarda bulunan içecekler ve yiyeceklerle oral maruziyet de gerçekleşebilir. Plastik kaplarda bulunan gıda ürünlerini mikrodalgada ısıtmak gibi uygulamalar ftalat içeriğini ciddi oranda arttırabilir. Yüksek miktarda asit içeren turşu gibi yiyeceklerin plastik kaplara konması ve bu kapların tekrar tekrar kullanımı da bu yiyeceklerin ftalat içeriklerinde artışa neden olur (5, 26).

Giysiler çevrede bulunan kimyasalları kolayca adsorbe edip insanlar için deri yolu ile maruziyet kaynağı haline gelmektedir. Uzun süre temas ve temas yüzey alanı büyüklüğü maruziyet oranını arttırmaktadır. Bebek giysilerinde daha sık tercih edilen pamuklu giysilerin diğer kumaşlara göre ftalatları daha kolay adsorbe ettiği kanıtlanmıştır. Gelişimsel olarak bebekler ftalatlardan yetişkinlere göre kolayca

etkilenir. Çin’de yapılan bir çalışmada üretimden ilk giyime kadar olan süreç içerisinde, 24 pamuklu giysi örneği toplanmıştır. Ortamda yüksek oranda bulunan ftalatların pamuklu giysilere yaygın olarak adsorbe edildiği ve yıkama yöntemleriyle ftalatların tamamen giderilmediği gösterilmiştir. Diğer taraftan, baskılı giysilerde de yüksek oranda ftalat bulunur. Yağmurluk, plastik çizme ve plastik tabanlı spor ayakkabılarının üretiminde de ftalatlar kullanılmaktadır (27).

Ftalatlara ağırlıklarına göre en yüksek derecede bebek ve küçük çocukların maruz kaldığı bilinmektedir. Ftalat içeren oyuncak, diş kaşiyıcısı ve diğer bazı ürünlerin kullanımı ile yenidoğan, bebek ve çocukların yüksek oranda oral yolla ftalatlara maruziyeti söz konusudur. Bebek bakım ve pişik kremleri, şampuanlar ve bebek bakım ürünleri de ftalat içerebilir. Diğer taraftan, özellikle yoğun bakımda yatan bebek ve çocukların tıbbi malzemelerle ftalatlara çok yüksek oranlarda maruziyetlerinin olduğu bilinmektedir ve bu durumun yaşamın ilerleyen yıllarında çok ciddi sonuçlar oluşturabileceği ifade edilmektedir (5, 26). Daha büyük çocukların ise sırt ve beslenme çantalarından ve kullandıkları kırtasiye ürünlerinden ftalatlara maruz kaldığı bilinmektedir (28).

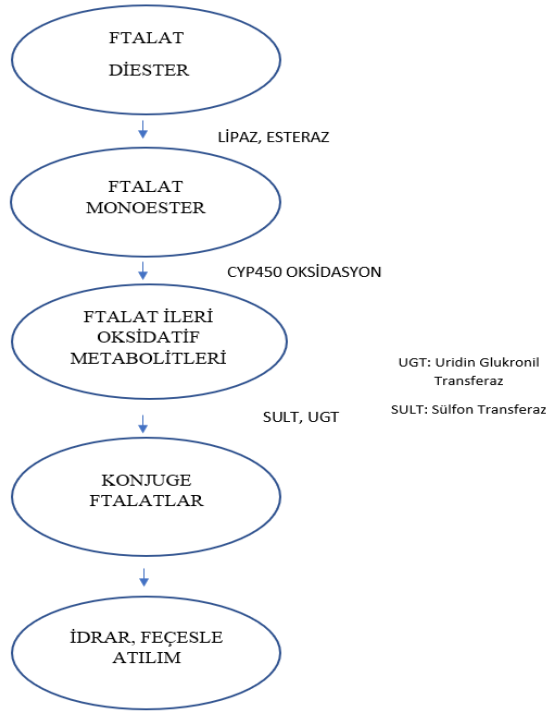
Ftalat türevlerine maruziyet, PVC pencere, halı ve yer kaplamalarıyla da gerçekleşebilir. Özellikle bebek ve küçük çocuklarının yerde oturmaları ve boylarının kısa olması nedeniyle ev tozlarıyla da farklı ftalat türevlerine maruz kaldıkları bilinmektedir. Ev gibi kapalı alanlarda havadaki ftalat konsantrasyonlarının dış ortama göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Büyük şehirlerdeki hava ftalat konsantrasyonları ise, küçük yerleşim yerlerine ve kırsal alanlara göre daha yüksektir (29-31). Diğer taraftan, ftalik asit esterlerinin düşük uçuculuklarından dolayı atmosfere yayılımları fazla değildir. Atıkların yanması, endüstriyel emisyon ve otomobil egzozları atmosfere yayılımlarını hızlandırabilir (23).

1999 yılında Avrupa Birliği tarafından çocuk ürünlerinde DiNP, DEHP, DBP, BBP ve DnOP (di-n-oktil ftalat) kullanımını yasaklamış, 2009 yılında ise genel kullanımlarına kısıtlamalar getirmiştir. ABD ve Avrupa’da kısıtlanmış olsa da, gelişmekte olan ülkelerde ftalat maruziyetinin her geçen yıl arttığı belirtilmektedir (28).

2.2.3. Ftalatların Biyotransformasyonları

Ftalaların biyotransformasyonları oldukça hızlı gerçekleşir; yarılanma ömürleri orta sürelidir (6–12 saat). Genelde vücutta akümüle olmasalar da, maruz kalan bireyin özelliklerine göre (obezite, vücut yağ oranının yüksekliği, yaş) yağ dokusunda birikebilirler (15, 32).

İlk olarak ftalat diesterleri lipaz ve esterazlarla monoesterlere parçalanırlar. Bazı durumlarda monoesterlerin diestelerden daha toksik olduğu görülür. Örneğin, DEHP lipaz ve esterazlarla pimer metaboliti mono (2-etilhekzil) ftalat (MEHP)'ye dönüşür ve MEHP'in ana bileşik olan DEHP'den çok daha toksik olduğu sitotoksosite deneyleri ile *in vitro* olarak gösterilmiştir (33). Ftalatların yan zincir oksidasyonları sitokrom P450 enzimleri (CYP450) ile gerçekleşir ve ileri oksidatif metabolitler oluşur. Bu metabolitlerin bazı durumlarda primer metabolitlere göre toksisiteyi daha yüksek olabilir, biyolojik etkileri ve aktiviteleri daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ftalatların ve metabolitlerinin Faz II biyotransformasyonları, uridin glukronil transferaz (UGT) ve sülfon transferaz (SULT) enzimleri aracılığıyla gerçekleşir ve glukuronat ya da sülfat konjugatları oluşur (Şekil 2.2.). Glukuronidasyon metabolitlerin üriner atılımını kolaylaştırmanın yanında, biyolojik aktif olan türün serbest metabolit halindeki biyolojik aktivite potansiyelini azaltır. Ana ftalat ve metabolitleri asıl olarak idrarla ve daha az miktarlarda feçesle atılır. Genel olarak, uzun zincirli ftalatların oksidatif biyotransformasyonları kısa zincirli olanlara göre daha hızlı gerçekleşir ve yarı ömürleri, kısa zincirli ftalatlara göre yaklaşık %60 daha azdır. Ftalatlar genelde 24 saat içinde elimine edilirler (15, 32).



Şekil 2.2. Ftalatların Biyotransformasyonu

2.2.4. Ftalatların Genel Toksik Etkileri

Kemiricilerde ftalatların karaciğerde peroksizom proliferasyonu yaptıkları ve bu nedenle hepatokarsinojeneze neden oldukları uzun yıllardır bilinmektedir. Bu nedenle, ftalatlar uzun zamandır “epigenetik karsinojenler” olarak tanımlanmışlardır. Ancak, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin de olduğu, oksidatif stresi takiben DNA hasarına yol açabildikleri ve hücre siklus proteinlerinin ekspresyonlarını da etkileyebildikleri belirlenmiştir. Ancak, kemiricilerdeki hepatokarsinojenik etkilerinin insanda görülmediği, sıçan ve farelerde hepatokarsinojenez sürecinde ortaya çıkan bir dizi değişikliklerin insanlarda görülmediği ifade edilmiştir (34).

Ftalatların en önemli toksik etkileri erkek üreme sistemi üzerinedir ve oluşturdukları toksisite bazı durumlarda geri dönüşsüzdür. Özellikle prenatal hayat gibi yaşamın erken dönemlerinde maruziyet ile bir feminizasyon göstergesi olan anogenital açıklıkta azalma, serum cinsiyet hormonlarının düzeylerinde değişiklikler ve doğumdan sonra hipospadias ve kriptorşidizimin son yıllarda çok yaygın şekilde görülmesi ftalat maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir. Yaşamın ilerleyen yıllarında ise, sperm parametrelerinde (sayı, motilite ve morfoloji) görülen bozulmaların da ftalat

maruziyeti ile ilgili olabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, son yıllarda 35-40 yaş arası görülen, testis kanserlerinin yüksek ftalat maruziyeti nedeniyle ortaya çıkabileceği bildirilmektedir. Tüm bu belirtiler “testiküler disjenez sendromu” olarak adlandırılmıştır (35). Ftalatların kadınlarda östrojenik siklusu bozduğu, menstürasyonda anomalilere neden olduğu ve endometriosis ile ilişkili olabileceği de bildirilmektedir (36).

Ftalatların günümüzde birçok hastalığın patogeneğinde yer aldığından da şüphelenilmektedir. Yapılan çalışmalar, jinekomastili erkek çocuklarda plazma DEHP ve MEHP düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (37). Ayrıca, ftalat maruziyeti kız çocuklarında prematür telarj ve puberte prekoks ile de ilişkilendirilmiştir (38). Diğer taraftan, özellikle ev tozlarından ve çevreden ftalat maruziyetini alerji, astım ve immünolojik kökenli hastalıklarla ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur (39,40). Ev ortamında bulunan PVC yüzeylerden salınan ftalat esterlerinin çocukluk çağı astımına yol açabileceği 2008 yılından beri artan çalışmalarla gösterilmiştir. Li ve ark. (2017) tarafından yapılan meta-analiz sonucunda özellikle benzil bütül ftalat (BBP)'nin çocukluk çağı astımı ile yakından ilişkili olabileceği bulunmuştur. Özellikle BBP'ye prenatal ve erken postnatal maruziyet çocukluk çağı astım riski ile pozitif ve kuvvetli korelasyon göstermiştir. Ftalatlarda bulunan karbonil gruplarının biyolojik makromoleküllerle çapraz bağlanabilmesi immün adjuvan özellik göstermelerine neden olmaktadır. BBP'nin ek olarak benzil grubu içermesi astım oluşturma potansiyelini yükseltmiştir. Larsen ve ark. (2002) tarafından alkil yan zincirlerinde 8 veya 9 karbon atomu taşıyan ftalatların daha kısa ya da daha uzun alkil yan zincirlerine sahip ftalatlardan daha güçlü adjuvan etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. DEHP' in hem insan akciğer epitel hücrelerinde hem de hayvan modellerinde adjuvan etkisinin olabileceği gösterilmiştir (40).

2.2.5. Ftalatlarla İlgili Düzenlemeler

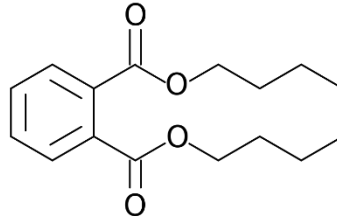
Literatürde yer alan pek çok çalışmanın sonuçları dikkate alındığında DEHP'in çocuklar tarafından kullanılan ürünlere bulunması ABD'de 2002 yılında yasaklanmıştır. DEHP, Avrupa Birliği tarafından “üreme sistemine toksik bileşik” olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle taşınması, saklanması ve etiketlenmesi REACH kuralları ile sınırlandırılmıştır (41).

En yaygın kullanılan ftalat türevi olan DEHP'in Avrupa Birliği Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Bilimsel Panel (AFC)'e göre, üreme toksisitesine ilişkin ters etki gözlenmeyen düzeyi (NOAEL) 5 mg/kg/gün'dür. DEHP'in en düşük ters etki gözlenen düzeyi (LOAEL) ise 29 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (42,43). DEHP için günde 7-8, haftada 40-45 saat çalışma süresince uzun süreli ve tekrar edebilen maruziyetlerde çalışanların sağlığını bozmayacak en yüksek konsantrasyon (TLV-TWA) 5 mg/m³ olarak bildirilmiştir (44).

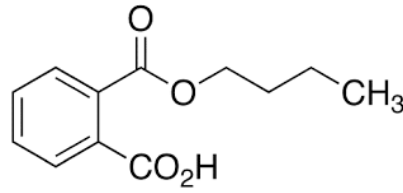
T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı tarafından 2 Nisan 2011'de yayınlanan "Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğ"inde birçok ftalat türevinin (DEHP, DBP, BBP DİNP, DIDP ve DnOP) çocuk bakım gereçleri, kalemler ve defterler (plastik kısımlar), silgi, yapıştırıcı, makas, kalemıraş, cetvel, koli bandı, bant, yapışkan notluk, şerit ve sıvı düzeltici, boya kalemleri ve boya malzemeleri (oyun hamuru ve parmak boyları hariç), beslenme çantası, okul çantası, sırt çantası, resim çantası, kalem kutusu, yiyecek taklidi ürünler, yüzme öğretmeye yardımcı ürünler, jimnastik minderleri, güneşlenme minderleri, deniz yatağı, tekstil ürünlerindeki plastik baskılar ve aksesuarlar, yağmurluklar, spor ayakkabılar ve plastik terliklerde kullanımı kütle bazında %0,1 ile sınırlandırılmıştır (45).

2.3. Dibutil Ftalat

Dibutil ftalat, di-n-butil ftalat olarak da adlandırılan, kokusuz, renksiz ve hafif sarı renkli bir sıvıdır. Kimyasal formülü C₁₆H₂₂O₄'dir ve molekül ağırlığı 278,35 g/mol'dür (Şekil 2.3.). Oda ısısında buhar basıncı 1,0×10⁻⁵ mm'dir. Oktanol/su partiyon katsayısı log K_{ow}=5,60'dır. DBP, n-butanol ile ftalik anhidritin reaksiyonu sonucu elde edilir (46). Ana metaboliti monobutil ftalat (MBP)'dir ve yapısı Şekil 2.4.'te gösterilmiştir (47).



Şekil 2.3. Dibutil ftalatın yapısı



Şekil 2.4. Monobutil ftalatın yapısı

2.3.1. Dibutil Ftalatın Biyotransformasyonu

Sıçanlara uygulanan tek bir oral dozdan sonra DBP'nin %80-90'ının metabolize edildiği ve 48 saat içerisinde idrarla atıldığı bildirilmiştir. İdrarda primer metaboliti olan monobutil ftalat (MBP) %88 oranında bulunmuştur. Sekonder metabolitleri olan mono (3-hidroksibutil) ftalat, mono (4-hidroksibutil) ftalat ve ftalik asit sırasıyla %8, %2 ve %2 oranlarında tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda, sıçan ve kobayların idrarındaki ana metabolitin MBP'nin glukuronid konjugatı olduğu gösterilmiştir. Bu kemiricilerde dozlamadan 30 dk sonra DBP'nin sadece %1 metabolize olmadan atılır (48).

Maddenin mikroorganizmalar tarafından biyodegrede edilmesi DBP ile oluşan çevre kirliliğinin ana nedenidir. DBP, *Enterobacter* türleri tarafından şehir katı atıklarından biyodegrede edilir ve bu atıklarda 1500 ppm kadar DBP'ye rastlanır ve biyodegradasyon yarı ömrü 2-3 saattir. Aynı tür bakteriler dimetil ftalatı %100 oranında, ancak 6 günde degrede edebilir. Diğer taraftan beyaz bir mantar türü olan *Polyporus brumalis*'in de DBP'yi biyodegrede edebildiği gösterilmiştir (49, 50).

İnsanlarda oral DBP dozunun yaklaşık %65-80'i 24 saat içinde idrarda çoğunlukla primer metaboliti olan MBP olarak elimine edilir. MBP ise, 3-OH-mono-n-butil ftalat (3-OH-MBP) ve 4-OH-mono-n-butil ftalat (4-OH-MBP)'ye okside olur. 4-OH-mono-n-butil ftalat (4-OH-MBP)'in mono-3-karboksi-propil ftalat'a (MCP) okside olduğu belirlenmiştir. DBP'nin insanlarda genel popülasyonda tahmini günlük alım miktarının 7-10 mg/kg olduğu ve DBP kaplanmış ilaç kullananlarda bu oranın yaklaşık 233 mg/kg olduğu belirlenmiştir (51, 52).

2.3.2. Dibutil Ftalatın Kullanım Alanları ve Maruziyet Yolları

Dibutil ftalat reçine ve polimerlerde plastizer olarak kullanılan bir ftalat türevidir ve esnek plastik üretiminde tercih edilir (47). Gıda paketlemede kullanımı

mevcuttur. Özellikle atık suları ve korosif materyalleri taşıyan boruların yapısında kullanımı tercih edilir. Plastizer olarak kullanımının yanında, yapıştırıcılar, laklar, parlaticılar, mürekkepler ve kozmetiklerde de yaygın kullanımı bulunmaktadır. Kozmetiklerde parfüm çözücü ve koku fiksatorü, aerosollerde süspand edici ajan, aerosol valflerinde lubrikan ve bulutlanmayı önleyici ajan olarak kullanılır. Özellikle ojeler, yüz kremleri, antiperspiranlar, vücut losyonları, sabunlar, duş elleri ve tıraş ürünleri yüksek oranda DBP içerir. Cilt ürünlerinde emolijan, ojelerde ve takma tırnaklarda plastizer olarak da kullanımı vardır. Ojelere %7 oranında katılır. Bu nedenle özellikle manikürcülerin bu ftalat türevine özellikle de solunum yoluyla maruziyeti çok yüksektir. Ayrıca, parfümlerden, antiperspiran ve deodoranlardan da genel popülasyonun yoğun bir maruziyeti söz konusudur. Diğer taraftan duş perdelerinde, arabaların iç plastik aksamalarında, yüzey kaplamalarda (boya, pigment, yer kaplama), kablo tüplerinde, ayakkabılarda, oyuncaklarda (yaklaşık %0,5 oranında), otomotiv endüstrisinde laklarda, tekstil endüstrisinde (vinil giysiler) ve veteriner ilaçlarında kullanımı bulunmaktadır (53). Diğer taraftan, DEHP ve DBP gibi ftalatlar oral uygulanan kontrollü salım sağlayan tabletlerin içeriğine yardımcı madde olarak katılmaktadır (54).

Düşük moleküler ağırlıklı ftalatların arasında kabul edilen DEP ve DBP için, Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2014 yılında azami maruz kalma limitleri belirlemiştir. DEP ve DBP için maruz kalma limitleri sırasıyla 4 ve 0,01 mg/kg/gündür. Ancak, günümüzde özellikle ilaç kaplamasında DBP kullanımından dolayı belirtilen limitlerden daha fazlasına insanların maruz kalması mümkündür. Son yıllarda yapılan bir çalışmada kronik olarak ftalat içeren ilaç kullanan kişilerin genel popülasyona göre idrarlarında ortalama 50 kat yüksek ftalat metabolitlerine rastlanılmıştır. Danimarka'da 2004'ten 2015'e kadar ftalat içeren ilaçların incelendiği çalışmada, özellikle lityum tedavisi alan hastalarda DBP içeren formülasyonlarda yasal seviyeyi aşan DBP varlığına rastlanılmıştır (54). DBP Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar barsak hastalıklarında (İBH) kullanılan mesalamin içeren formülasyonlarda enterik kaplamada yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Spesifik olarak, DBP içeren mesalamin ilaç kullanan erkek bireylerde DBP'nin ana metaboliti olan MBP idrar düzeyi genel popülasyondaki erkek bireylerin ortalama seviyelerinden yaklaşık olarak

1000 kat yüksek bulunmuştur. İBH hastalarında ilacın sürekli kullanımdan dolayı, kronik olarak maruziyet söz konusudur (55).

Gıda ürünlerinde ftalatların varlığı ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle bitkisel yağların ambalajlarından ftalatların migrasyonunun yüksek olabileceği belirtilmiştir; zira ftalatların lipofilitesi çok yüksektir. Gıdayla temas eden plastikler için Avrupa komisyonu tarafından DBP için yasal sınır olarak maksimum 0,3 mg/kg kabul edilmiştir. Kiralan ve ark. (2019) tarafından Türkiye pazarında farklı soğuk sıkım yağlarındaki ftalat düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, çalışmada kullanılan 30 yağın 6'sında DBP miktarı 0,10-51,63 mg/kg olarak saptanmıştır. En yüksek DBP seviyesi 51,63 mg/kg ile çörekotu yağında tespit edilmiştir. Kayısı çekirdeği yağı, kuşburnu yağı ve üzüm çekirdeği yağlarındaki DBP miktarı ise, yasal sınırın üzerinde bulunmuştur (56).

DBP maruziyeti yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Tüm tüketici gruplarında gıda tüketimi toplam maruziyetin %40-90'ı iken, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerini kullanan gençler ve yetişkin kadınlarda dermal ve inhalasyonla maruziyet tüm DBP maruziyetinin %15-50'ini oluşturabilir. Bebek ve küçük çocuklarda ise, iç mekân havası ve toz kaynaklı maruziyet, toplam maruziyetin yaklaşık %20-40'ını kapsar. Ergenlerin ise, toplam DBP maruziyetinin %14-22'ini iç mekân havasından maruziyet oluşturur (57).

In vitro ve hayvan çalışmalarında dermal emilimden sonra da DBP'nin sistemik dolaşıma geçebildiği gösterilmiştir. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda DBP'nin dermal emiliminin olduğu gösterilmiştir. İdrarla günlük dozun %10-12 arasında atıldığı ve DBP'nin %60'ının 1 haftanın sonunda elimine edilebildiği gösterilmiştir. Dermal uygulamadan 1 hafta sonra uygulama bölgesinde uygulama dozunun %33'ünün olduğu gösterilmiştir (58).

Topikal uygulamayla sistemik dolaşım maruziyeti arasındaki korelasyonun değerlendirildiği bir çalışmada 26 sağlıklı erkek gönüllüye topikal olarak DBP, DEP ve BBP uygulanmıştır ve serum örnekleri toplanmıştır. Uygulamadan yaklaşık 4 saat sonra DBP'nin primer metaboliti olan MBP'nin serumda pik yaptığı görülmüştür (59).

Simoneau ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, farklı kimyasalların 70°C'de 2 saatlik sürede plastik bebek biberonlarından içerisindeki süte migrasyon

düzeyleri araştırılmış ve farklı örneklerde DBP'nin 50-150 µg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir (60).

İnsanların balık ve diğer deniz ürünlerini tüketerek de DBP'ye yüksek oranda maruz kalabileceği belirtilmiştir. Balıklardaki DBP düzeyleri 78-200 ppb arasında değişmektedir. Ayrıca, içme suyu da önemli bir maruziyet yoludur. İçme sularında 1,5-5 ppb arasında DBP bulunduğu belirtilmiştir (46).

Havadan da yüksek oranlarda DBP maruziyeti söz konusu olabilir. New York'ta havada 3,3-5,7 ng/cm³ oranında DBP bulunduğu belirtilmiştir. PVC ile kaplı odaların havasında ise 15,000-26,000 ng/m³ oranında bulunabileceği ifade edilmektedir (46). Avrupa'da plastikleştirici ajanların atmosferik düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, DBP oranı Hollanda'da 2-70 ng/m³, Fransa'da 0,08-15 ng/m³, İtalya'da 17,6 ng/m³'e kadar bulunmuştur; İsveç'te ise DBP'nin havada miktarı tespit edilememiştir (61).

DBP Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Çin Devlet Çevre Koruma İdaresi tarafından öncelikli çevresel kirleticilerden biri olarak sınıflanmıştır. Çin genelinde topraktaki DBP konsantrasyonu 57,7 mg/kg'a kadar ulaşmış, New York eyaletinde ise toplam DBP düzeyleri 8,1 mg/kg üzerinde tespit edilmiştir (62).

DBP'nin mesleki maruziyeti ile ilgili olarak az sayıda çalışma bulunmaktadır. ABD'de manikürcüler arasında yapılan bir çalışmada 40 çalışanın vardiya öncesi ve sonrası idrar örneklerinde DBP'nin ve di-isobutil ftalat (DiBP)'nin metabolitleri incelenmiştir. Manikürcülerde en yüksek konsantrasyonda, MBP olarak belirlenmiştir. MBP'yi DiBP'nin primer metaboliti olan monoizobutil ftalat (MiBP) ve MCPPP takip etmiştir. İnhalasyon yoluyla maruziyette çalışma öncesi ve sonrasında maske kullanan manikürcülerde üriner MBP için konsantrasyonu 7,5 ng/ml iken, maske kullanmayanlarda MBP düzeyi 41,4 ng/ml olarak bulunmuştur. Dermal maruziyette ise çalışma öncesi ve sonrasında eldiven kullanan manikürcülerde üriner MBP düzeyi 21,7 ng/ml iken, eldiven kullanmayanlarda MBP konsantrasyonu 44,6 ng/ml olarak bulunmuştur (58).

2.3.3. Dibutil Ftalat ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Dibutil ftalatın Kimyasal Maddelerin Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Paketlenmesi (CLP) regülasyonlarına göre düzenlenip, Grup 1B üreme sistemine

toksik bileşik olarak sınıflandırılmasından sonra, birçok firma maddenin yerine kullanılacak ftalat yapısında olmayan alternatiflerine yönelme kararı almıştır. Bu nedenle, Avrupa Birliği'nde 1998'de yıllık 26,000 ton olan üretimi, 2007'de 8,000 tonun altına düşmüştür. Avrupa Birliği 2007'de 2000 ton DBP ithal etmiştir. Bu şekilde 2007'de Avrupa Birliği'nde kullanımının 10,000 ton olduğu belirtilmiştir (63).

Dibutil ftalatın ojeler dahil kozmetiklerde kullanımı Avrupa Birliği'nde Direktif 76/768/EEC 1976 ile yasaklanmıştır. Ancak, maddenin hala ucuz kozmetiklerde kullanımı devam etmektedir. 1 Nisan 2005'de DBP içeren kozmetik ürünlerinin Avrupa Birliği'ne girmesi 2004/93/EC nolu ve Eylül 2004'te yayınlanan Avrupa Birliği direktifi ile yasaklanmıştır (63). DBP'nin oyuncaklarda kullanımı ise Avrupa Birliği'nde 1999 yılında kısıtlanmıştır.

Özellikle işyerindeki inhalasyon yoluyla maruziyeti önlemek için Entegre Kirlilik Önleme ve Kontrolü (IPPC) Direktifi (96/61/EC) ve İşyeri Maruziyet Direktifi (98/24/EC)'nde maddenin kullanım koşulları ve maruziyetiyle ilgili detaylı kararlar alınmıştır. Avrupa Komisyonu Sağlık ve Çevre Riskleri Bilimsel Komitesi (SCHER) DBP'ye toplam maruziyetin azaltılması gerektiğini bildirmiştir. Avrupa Birliği 2011/65/EU sayılı direktifinde ve takiben yayınlanan 2015/863 nolu revizyon direktifinde DBP'ye maruziyetin 1000 ppm'i geçmemesi gerektiğini ifade etmiştir (64).

Resmi Gazete'de 2 Nisan 2011'de Sanayi ve Ticaret Bakanlığı tarafından yayınlanan "Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğ"de DBP'nin çocuk bakım gereçleri, kalemler ve defterler (plastik kısımlar), silgi, yapıştırıcı, makas, kalemtraş, cetvel, koli bandı, bant, yapışkan notluk, şerit ve sıvı düzeltici, boya kalemleri ve boya malzemeleri (oyun hamuru ve parmak boyları hariç), beslenme çantası, okul çantası, sırt çantası, resim çantası, kalem kutusu, yiyecek taklidi ürünler, yüzme öğretmeye yardımcı ürünler, jimnastik minderleri, güneşlenme yatakları, deniz yatağı, tekstil ürünlerindeki plastik baskılar ve aksesuarlar, yağmurluklar, spor ayakkabılar ve plastik terliklerde kullanımı kütle bazında %0,1 ile sınırlandırılmıştır (45).

2.3.4. Dibutil Ftalatın Toksik Etkileri

Endokrin Bozucu Etki

Literatürde DBP'nin endokrin bozucu etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Kemiricilerde oral alımdan sonra böbrek ve karaciğer ağırlıklarında düşümlere neden olduğu belirlenmiştir (46). Dibutil ftalatın tüm ftalat türevleri gibi üreme sistemine, özellikle de erkek üreme sistemine toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca, gelişimsel toksik etkilerinin olduğu öne sürülmektedir (65-67). Kemiricilerde yapılan çalışmalarda DBP'nin fetal ağırlıkta azalma, canlı yavru sayısında düşme ve doğumsal kusurlara (nöral tüp defektleri gibi) yol açtığı belirlenmiştir (46,68). Barlow ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada gebe sıçanlara 500 mg/kg/gün dozda uygulanan DBP'nin, yavrularda anogenital açıklıkta azalmaya ve testiküler disjenez sendromuna yol açtığı bildirilmiştir (69). Yapılan bir başka çalışmada ise, maddenin kemiricilerde spermatogenezde azalma, testis ağırlığında düşüş gibi diğer etkileri de rapor edilmiştir. Dibutil ftalatın erkek laboratuvar hayvanlarında testesteron sentezini inhibe edip feminizasyona yol açabileceği de ifade edilmiştir (46, 70).

Dibutil ftalatın insanlarda üreme ve gelişimsel etkileri ile ilgili yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır (46). 1948-1960 yılları arasında Malezya'da görev yapan Yeni Zelendalı askerlere operasyona çıkmadan önce *Eutrombicula hirstii* gibi tiftüs patojeni taşıyan trombokülit akarlarına karşı ısırılmalarını önlemek için asker kıyafetlerinin dikiş yerlerine DBP uygulanmıştır. DBP'nin bu askerlerin Yeni Zelanda'da doğmuş çocukları üzerindeki etkisini inceleyen bir retrospektif kohort anket çalışmasında, askerlerin çocuklarında kriptorşidizm, hipospadias, erken ergenlik, over ve uterus bozuklukları ve meme kanseri görülme sıklığında önemli sayıda artış kaydedilmiştir (70).

Ftalatların kadınlarda üreme sistemi toksisitesine ve erken ergenliğe yol açtığı bilinmektedir. Çin'de yapılan bir çalışmada hijyenik pedlerin %98'inde ve 120 kadın hijyen ürününde 8 ftalat tespit edilmiştir. Dietil ftalat (DEP), DBP ve DEHP bu ürünlerdeki toplam ftalat konsantrasyonunun %60'dan fazlasını oluşturmaktadır. Üst ve alt tabakalarında kullanılan plastik malzemeler ve imalat işlemleri sırasında kullanılan sıcakta eriyen yapıştırıcılar potansiyel ftalat kaynaklarını oluşturmaktadır.

Çalışmanın sonunda yapılan bir hesaplama ile, günlük toplam ftalat maruziyeti doz aralığı 0.001-0.731 µg/kg/gün olarak bildirilmiş ve hijyenik ped kaynaklı maruziyetin iç mekan havası maruziyetine göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak, kadınların toplam diyetle ftalat maruziyeti değerlendirildiğinde, hijyenik pedle maruziyetin diyetle maruziyete göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (71).

Hipertansiyon

DEHP gibi yüksek molekül ağırlıklı ftalatlarla insanlarda hipertansiyon oluşumu ilişkisi gösterilmiş; ancak DBP gibi düşük molekül ağırlıklı ftalatların kan basıncı yükselmesi üzerinde neredeyse hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 6 hafta boyunca 0,1, 1 ve 10 mg/kg DEHP ve DBP'ye maruziyet sonucu kuyruk kan basıncı ölçümünde 1-10 mg/kg dozunda DEHP'nin, kan basıncında ciddi bir artışa neden olduğu gözlenirken, DBP'ye maruziyet kan basıncında yükseklik meydana getirmemiştir (72).

Nörolojik Etkiler

Dibutil ftalatın nöral öncü hücreler üzerindeki nörotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 500 µM dozda maruziyet C17.2 hücrelerinde ROS düzeylerinde yükselmeye ve mitokondriyal hasara neden olmuştur. Ayrıca 2 hafta boyunca genç farelere intraperitoneal olarak 10-50 mg/kg dozda DBP uygulanmış ve hipokampal bölgede nörogenез araştırılmıştır. DBP (50 mg/kg) uygulanan grupta hipokampüste yeni üretilen nöronların sayıca az olduğu belirlenmiştir ve Morris su labirent testinde öğrenme ve hafıza işlev bozuklukları görülmüştür (73). Gebe farelere 7-9. günler arasında gastrik entübasyon ile 50- 300 mg /kg doz DBP uygulaması yapılmış, 300 mg/kg dozda embriyoda nöral tüp gelişimini anormal olarak etkilemiş; ekzensefali, kuyuksuz fetuslar ve göz anormallikleri gözlenmiştir (74).

İmmün Sistem Üzerine Etkiler

Ftalatların sitokin, immünoglobulin ve hücre mediyatörlerinin sentezini ayrıca immün hücrelerinin aktivasyonunu ve hayatta kalmasını etkilediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda ftalatların immünosupresyon yaptığına dair kanıtlar

elde edilmiştir. Örneğin DBP; fare makrofaj hücre hattı (RAW 264.7)'de tümör nekroz faktörü α (TNF α) sekresyonunu ve lipopolisakkarit ile uyarılmış periferik mononükleer kan hücrelerinin üretimini azaltmıştır (57). DBP'nin enflamatuvar uyarılara karşı *in vitro* olarak hücre sel ve humoral bağışıklık tepkisini nasıl değiştirebileceğinin değerlendirildiği çalışmada, DBP varlığı ve yokluğunda lipopolisakkarit (LPS), resiquimod (R848)-forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile uyarılmış granülositler ve monositlere ait yüzey biyogöstergelerinin (CD16, CD24, CD69, CD14) ekspresyonu akış sitometri analizi ile incelenmiştir. TNF α , interferon gamma (IFN γ), interlökin 8 (IL-8) ve interlökin 10 (IL-10) sitokinlerin salınımı ölçülmüştür. DBP varlığında nötrofil ve eozinofil üzerinde bulunan CD24'ün inflamatuvar uyarı kaynaklı ekspresyonunu ve aktive edilmiş eozinofil üzerindeki CD69 biyogöstergeleri azaltırken; nötrofil üzerindeki CD16'yı arttırmıştır. DBP; enflamatuvar uyarılara karşı proinflamatuvar TNF α , ve IFN γ salınımını azaltmıştır. Çalışmanın sonunda, DBP varlığında inflamatuvar uyarılara karşı verilen immünolojik yanıtların baskılanabileceği belirlenmiştir (57).

İlaç Metabolize Edici Sistemler Üzerine Etkiler

Dibutil ftalat, karaciğerde sitokrom P450 (CYP450) proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan ve östrojen metabolizmasında da rol oynayan CYP2C9 ve CYP2C19 aracılı metabolizma üzerine etkileri nedeniyle endokrin homeostazını etkileyebilmektedir. DBP'nin bu enzimleri inhibe edebildiği ve bu enzimlerle metabolize edilen ilaçların vücutta birikimine yol açabileceği belirlenmiştir. Chen ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada DBP; CYP2C9 ve CYP2C19 aktivitesini inhibe ederken, primer metaboliti olan MBP'nin böyle bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (75). DBP, DMP (dimetil ftalat) ve DEHP 'nin 3.8 mM/kg dozda Sprague Dawley sıçanlarına uygulandığı bir çalışmada DBP, CYP450 enzimlerinin karaciğerdeki konsantrasyonunu artırırken, akciğerdeki konsantrasyonlarını %40 oranında azaltmıştır. DBP, akciğerdeki NADPH sitokrom c redüktaz aktivitesini ve sitokrom b5 düzeylerini de yaklaşık %30 oranında azaltmıştır. DMP ve DEHP ile maruziyetten sonra ise minör etkiler gözlenmiştir (76).

Erkek Sprague Dawley sıçanları 5 gün boyunca inhalasyon yoluyla 0,5, 2,5 ve 7 ppm konsantrasyonlarda DBP'ye maruz bırakılmış ve konsantrasyonlar insan

maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir. DBP bu dozlarda karaciğer mikrozomal enzimlerde kantitatif değişkenlik meydana getirmezken, akciğerde doz bağımlı olarak total CYP450'nin konsantrasyonunu %63 azaltmıştır (77).

Dermal Etkiler

Akut eritem, kaşıntı ve vezikülasyon ile ortaya çıkan kontakt dermatitte vakaların %20'si alerjik kontakt dermatit olup, kalan %80'i ise iritan kontakt dermatittir. 1987'de yapılan bir araştırmada kontakt dermatitli hastaların %4,2'sinin kozmetik ürünlere alerjik reaksiyon gösterdiği ve bu vakaların yaklaşık %8'inin tırnak bakım ürünlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Mesleki maruziyetten dolayı tırnak bakımı işçilerinde subakut ve kronik maruziyet daha az kullanılan elin başparmak, 2. ve 3. parmaklarında müşterinin tırnaklarının sabitlendiği yastıkçıklardan geçiş dolayısıyla parmakların kenarlarında alerjenik bileşiklerin derinin çeşitli bölgelerinde birikmesine ve soluma yoluyla astım semptomlarına yol açabileceği bilinmektedir. Düzenli olarak manikür yaptıranlarda likit oje kullanımı alerjik kontakt dermatite neden olmaktadır. Ojenin esnekliğini arttıran bir plastikleştirici olan DBP, alerjik kontakt dermatite ilişkilendirilen bir alerjendir. Bu nedenle, son yıllarda birçok marka formaldehit ve DBP gibi kimyasal maddeleri içermeyen oje üretimine başlamıştır (78).

Böbrek, Karaciğer ve Kemik İliği Üzerine Etkiler

Dibutil ftalata maternal maruziyet ile yavrularda böbrek gelişimi etkisinin incelendiği araştırmada, 850 mg/kg dozda oral perfüzyonla uygulanan DBP'nin sıçan yavrularında böbrek displazisine ve fibroza neden olduğu gösterilmiştir (79).

Dibutil ftalat maruziyetinin kemik iliği ve karaciğer üzerinde etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, erkek fareler 8 hafta boyunca, haftada 3 gün 500 mg/kg ve 2000 mg/kg DBP'ye maruz bırakılmıştır. 8 hafta 2000 mg/kg maruz kalan farelerin karaciğer ve vücut ağırlıklarında belirgin azalmalar meydana gelmiştir. DBP'ye 2000 mg/kg dozda maruz kalan farelerin karaciğer hücrelerinde ve kemik iliği hücrelerinde Comet yöntemiyle genotoksisite de değerlendirilmiş; ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde DNA hasarı gözlenmemiştir. Bu nedenle, DBP'nin somatik hücreler için zayıf mutajen olduğu sonucuna varılmıştır (80). Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer

çalışmada, gebeliğin 13. gününden laktasyonun 21. gününe kadar 5, 50, 500 mg/kg/gün dozlarında DBP uygulanan dişilerin yavrularda DBP'nin doz bağımlı bir şekilde kilo ve açlık glikoz düzeylerinde artışa ve karaciğerde peroksizom proliferatör aktive reseptör 1 (PPAR1) gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (81).

İnhalasyonla Maruziyet Sonucu Etkiler

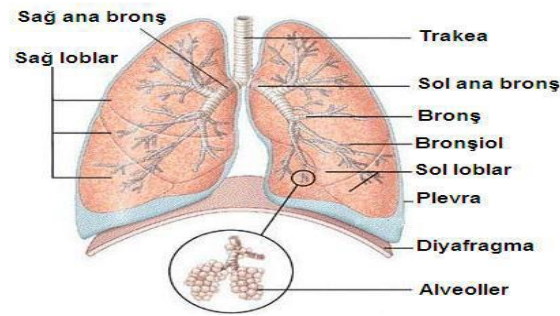
Maddenin oral veya inhalasyon yolları ile ilgili kronik toksik etkileri hakkında literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. İnhalasyonla kronik maruziyet sonucu vücut ağırlık artışında azalma ve akciğer ve beyin ağırlığında artışlar belirlenmiştir. Sub-kronik maruziyetle (13 hafta, 0,1 mg/kg vücut ağırlığı) kemiricilerde vücut ağırlığında azalma, minimal anemi ve karaciğer üzerinde istenmeyen etkilere yol açabileceği ifade edilmiştir. Sıçanlarda yapılan mortalite çalışmalarında referans dozu (RfD) 0,1 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (82). DBP için sıçanlarda antiandrojenik etki, gamet gelişimi ve meme dokusunun gelişimi açısından oral LOAEL dozu 2 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Avrupa Birliği DBP için yayınladığı risk değerlendirme raporunda ise sıçanlarda embriyotoksisite açısından oral LOAEL değerini 52 mg/kg/gün olarak belirtmiştir (63). Amerika Çevre Koruma Ajansı DBP'yi Grup D karsinojen (insan karsinogenisitesi açısından sınıflandırılmayanlar) olarak sınıflandırmıştır (82). Mesleki maruziyet dikkate alındığında; DBP'ye günde 7-8, haftada 40-45 saat çalışma süresince uzun süreli ve tekrar edebilen maruziyetlerde, çalışanların sağlığını bozmayacak en yüksek konsantrasyon değeri (TLV-TWA) 5 mg/m³ olarak saptanmıştır (83).

2.4. Akciğer Yapısı

Göğüs boşluğunda yer alan çift katlı seröz plevra zarı ile çevrili olan akciğer, bronşlardan alveollere kadar olan solunum sisteminin tüm yapılarını içerisinde bulundurmaktadır. Sağ akciğerde 3 lob sol akciğerde ise 2 lob bulunmaktadır ve sol akciğer yapısal olarak sağ akciğere göre daha küçüktür (Şekil 2.5.). Her bir lob pulmoner alveolleri içeren çok sayıda küçük lobüllere ayrılmıştır. Bronşlar dallanarak akciğer dokusu içine dağılır ve bronşoller aracılığıyla havayı alveollere getirir.

Pulmoner alveoller, akciğerlerin ana görevi olan hava değişiminin yapıldığı işlevsel birimlerdir (84).

İnhalasyon sırasında hava trakeadan bronşlara sonrasında bronşiolleere geçerek alveollere ulaşır. Kılcal damarlarla çevrili olan alveollerden oksijen kana geçer ve dokulara taşınır ve dokularda oluşan karbondioksit akciğerlere geri taşınır ve ekshalasyonla trakeadan dışarı atılır (85).



Şekil 2.5. Akciğerin yapısı

Akciğer kanseri erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir. Ancak, son yıllarda akciğer kanseri insidansı kadınlarda artış göstermektedir. 1940 yılında 100.000 kadından 7'sinde akciğer kanseri görülürken günümüzde her 100.000 kadından 42'sinde hastalığın görüldüğü ifade edilmektedir ve bunun nedeni kadınlarda artan sigara kullanımına bağlanmaktadır (86).

Akciğer kanserleri küçük hücreli olan ve olmayan olarak 2 türe ayrılır. Hastalığın agresif olarak ilerlemesi ve tedavi seçenekleri teşhis edilen tümörün tipine bağlıdır. Birçok akciğer kanseri türünün prognozu hızlı olduğu için erken teşhis ve hızlı tedavi kritik bir noktadır (86).

Akciğer kanseri yılda 1,8 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir ve hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarda 5 yıl içerisinde sağ kalım oranı sırasıyla %6 ve %14-17'dir. Enflamasyon, akciğer kanseri ve diğer akciğer hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışmada çevresel kirleticilerin kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut akciğer hasarı,

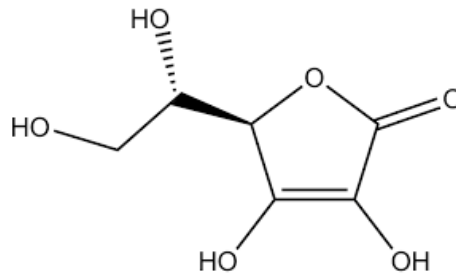
sarkoidoz, astım ve interstisyel pulmoner fibroz dahil pulmoner inflamatuvar hastalıklara neden olabileceği bildirilmiştir. Çevresel faktörlerin neden olduğu enflamasyon, malign hücre oluşumuna veya tümör büyümesine neden olabilmektedir (87).

2.5. A549 Hücre Hattı

A549 hücre hattı, ilk olarak 1972 yılında D. J. Giard tarafından 58 yaşında, beyaz bir erkeğin akciğer karsinoma dokusundan eksplant kültür yoluyla izole edilmiş ve epitelyal adenokarsinoma hücre hattı olarak tanımlanmıştır. Küçük hücreli olmayan insan akciğer hücre hattıdır. A549 hücreleri, lesitini; Tip 2 pnömosit gibi sitidin difosfokolin yolağıyla, yüksek oranda doymamış yağ asitlerini kullanarak sentezleyebilmektedir. Bu hücreler, alveolar tip 2 hücrelerine özgü metabolik ve makromoleküler süreçler için uygun bir model olarak kullanılmaktadır. Hücrelerinin kültürünün kolay olması ve kısa sürede çok sayıda karşılaştırmalı deney yapılmasına izin verilmesinden dolayı *in vitro* çalışmalarda tercih nedeni olmaktadır (88).

2.6. Askorbik Asit

Askorbik asit (askorbat, vitamin C) ilk olarak 1912'de keşfedilmiş, 1928'de izole edilmiş ve 1933'de kimyasal olarak sentez edilmiştir. Asc bilinen en güçlü antioksidanlardır. Birçok gıdada doğal olarak bulunur; gıda desteği olarak da satılmaktadır. DSÖ'nün Esansiyel İlaçlar Listesi'nde yer almaktadır. En çok dolmalık biber, yeşilbiber, maydanoz, narenciye, kivi, brokoli, brüksel lahanası ve çilekte bulunur. Gıdaların uzun süre saklanması veya pişirme ile Asc içerikleri azalır (89-91). Asc'nin yapısı Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Askorbik asitin yapısı

Askorbik asit NADPH oksidaz yolağı üzerindeki süpresif etkisi sayesinde yeni serbest radikallerin oluşumunu önleyen ve doğrudan serbest radikaller üzerinde antioksidan etkinliğe sahip bir elektron vericisidir. Antioksidan etkisi azalmış endotel geçirgenlik, patolojik durumlarda zayıflatılmış hücrel apoptoz ile açıklanabilir. Makrofaj fonksiyonunun düzenlenmesi, enflamatuvar mediyatörlerin azaltılması ve yüksek konsantrasyonlarda doğrudan bakteriyostatik etkisiyle birlikte bağışıklık sistemi üzerinde etkilere sahiptir (92).

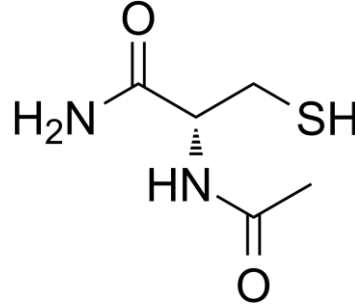
Skorbüt Asc eksikliği nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır ve tedavisinde Asc kullanılır. Asc, dokuların onarımı ve belirli nörotransmitterlerin enzimatik üretimi için gereklidir. Rebound skorbüt ise, yüksek doz Asc alımı ile ortaya çıkar. Diğer taraftan, immün işlevlerin normal şekilde gerçekleşmesinde görevleri vardır (93-95). Her ne kadar soğuk algınlığında yaralı olduğu düşünülse de, bunu destekleyen bilimsel veri yoktur. Ancak, soğuk algınlığının süresinin azalmasına karşı yararlı olabileceğine dair bilimsel yayınlar bulunmaktadır. Diğer taraftan, kanser riskini azaltması, kardiyovasküler hastalıklar ve demasta yararlı olup olmadığı kesin olarak gösterilmemiştir (91, 96-98). Genel olarak iyi tolere edilen bir antioksidandır. Yüksek dozlarda kullanımı gastrointestinal sistemde rahatsızlık hissine yol açar. Ayrıca, baş ağrısı, uyuma güçlüğü ve deride kızarıklıklara neden olabilir. Gebelikte günlük alınması gereken dozda kullanımı genel olarak güvenli kabul edilmektedir (94, 96, 99).

Askorbik asit yüksek dozlarda prooksidan etki gösterebilir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada antioksidan olarak kullanılmaktadır (100). Literatürde askorbik asitin ftalatların toksik etkilerine karşı koruyucu olarak kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (101,102).

2.7. N-Asetilsistein

N-asetil sistein (asetilsistein, NAC) vücuttaki en önemli tiyol olan glutatyonun yapısında bulunan önemli bir amino asit türevidir (103-105). İlk olarak 1960'da patent almıştır ve tıbbi kullanıma 1968'de girmiştir (106,107). NAC, parasetamol zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kistik fibrosis hastalarında, kronik obstrüktif akciğer hastalığında ve öksürükte mukus çözücü olarak kullanımı mevcuttur. İntravenöz (iv), oral veya misti koklanarak kullanılabilir. Gıda desteğı

olarak da kullanımı mevcuttur (108-110). DSÖ'nün Esansiyel İlaçlar Listesi'nde yer almaktadır (89). NAC'ın yapısı Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. N-asetilsisteinin yapısı

N-asetilsisteinin kinik çalışmalarda; alkole bağlı olmayan steatohepatitte, diyabete bağlı meydana gelen hipertansiyonda, kronik bronşitte, tekrarlanan gebelik kayıplarında, erkek infertilitesinde, polikistik over sendromunda, diyabetik retinopatide, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve katarakta faydaları gösterilmiştir. NAC ayrıca parkinson, şizofreni, bipolar bozukluk, otizm ve davranış bozukluğu gibi nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (111).

Yüksek oral doz kullanımıyla bulantı ve kusmaya yol açabilir. Ayrıca, deride acıma hissi ve kızarıklar oluşturabilir. Nadiren, non-immün anaflaksiye yol açabilir. Gebelikte kullanımının güvenli olduğu belirtilmiştir (108).

2.8. Oksidatif Stres

Serbest radikaller son orbitalinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yapılardır. Kısa ömürlerine rağmen, hücredeki lipid, karbohidrat, protein veya DNA/RNA gibi makromoleküllerle reaksiyona girebilirler; yüksek miktarlarda oluşumları organel, membran veya tüm hücrede hasar oluşturabilir ve hücre ölümüne kadar giden bir süreci tetikleyebilir. Normal metabolizma, hücre sinyalleşmesi, mikrozomal sitokrom P450 (CYP450) metabolizması, eozinofil, makrofaj, nötrofil hücrelerinin ve inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu, araşidonik asitin lipooksijenaz ve siklooksijenazlarla oksidasyonu, mitokondriyel aktivite ve enerji üretim

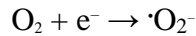
süreçlerinde ortaya çıkabilecekleri gibi, organizmanın biyolojik (bakteriler, virüsler, mantarlar), fiziksel (UV ışınım, X- ve γ -ışınım) veya kimyasal bir ajana (kemoterapötikler gibi ilaçlar, çevresel kirleticiler) maruziyeti ile de artış gösterebilirler. Bazı patolojik durumlarda ise organizmadaki miktarlarının arttığı bilinmektedir (112, 113).

Serbest radikaller genelde 3 grupta incelenir:

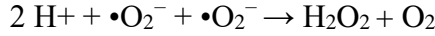
- ROS
- Reaktif azot türleri (RNS)
- Reaktif kükürt türleri (RSS)

Reaktif oksijen türleri yapısında oksijen bulunduran bileşiklerdir. En iyi bilinen ROS'lar ve oluşum reaksiyonları şu şekilde gerçekleşir (111):

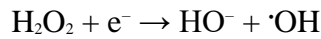
1. Süperoksit



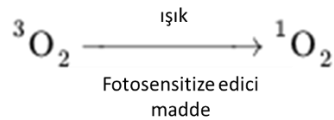
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)



3. Hidroksil radikali



4. Singlet oksijen



Hücrede homeostaz halinde tüm oksidan ve antioksidanların bir denge içinde olması gerekmektedir. Eğer bu denge oksidanlar lehine bozulursa, “oksidatif stres” ortaya çıkar. Oksidatif stres esnasında, ROS artışına bağlı olarak hücrenin yapıtaşları olan lipit, protein ve/veya karbohidratların yapısı bozulur. Lipitlerde peroksidasyon sonucu hasarlar oluşur. Protein ve karbohidratlar ise oksidasyona uğrar. Diğer taraftan, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerde oksidatif hasarlar gelişebilir; bazlar okside olur; baz

hasarları baz eksizyon onarımı (BER) ile yeterli bir şekilde onarılmazsa tek sarmal kırıkları (SSB) görülebilir. SSB sonucunda, kalıp kayması gibi durumlar ortaya çıkabilir. Bu genotoksik etkiler zaman içinde mutasyonların oluşması ile sonuçlanabilir. Oluşan bu hasarlar onarılmadığında, hücre ölümü meydana gelir. Hasar derecesine bağlı olarak hücre ya apoptoza ya da nekroza gider (114).

2.8.1. Oksidatif Stres Biyogöstergeleri

Oksidatif stresin kalitatif ve kantitatif olarak tespiti için birçok biyogöstergeden yararlanılmaktadır. Ölçülecek parametrelerin doğru seçimi ve tanımlanması gerekmektedir. Ayrıca, elde edilmesi beklenen son noktalara göre de belirleme yapmak gereklidir.

Oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan başlıca biyogöstergeler şöyle sınıflanabilir (115):

1. Doğrudan hücre içi ROS ölçümü
2. Antioksidan enzim aktivitelerinin veya bu enzimlerin protein ekspresyonlarının belirlenmesi [CAT, GPx, SOD, glutatyon redüktaz (GR), tiyoredoksin redüktaz (TrxR)]
3. Total GSH ve/veya NAC düzeylerinin belirlenmesi ve GSH/GSSG oranının (redoks oranı) belirlenmesi
4. Lipit oksidasyon ürünlerinin düzeylerinin belirlenmesi [malondialdehit (MDA) veya tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS), konjugedienler, okside yağlar, vb.]
5. Protein oksidasyon ürünlerinin düzeylerinin belirlenmesi (karbonil grupları)
6. Total antioksidan kapasite (TAOC) düzeylerinin belirlenmesi
7. DNA oksidasyonunun değerlendirilmesi: Bunun için genelde okside bazların belirlenmesi gerekir [8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)]
8. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların düzeylerinin belirlenmesi (flavonoidler, karotenoidler, A, C ve E vitaminleri)
9. Antioksidan protein düzeylerinin belirlenmesi (tiyoredoksin)

2.8.2. Antioksidan Enzimler

Glutasyon peroksidazlar, aktif bölgelerinde selenyum içerip içermemesine göre iki gruba ayrılırlar:

1. Selenyum bağımlı GPx'ler: GPx1, GPx3, GPx4 gibi GPX'lerin antioksidan savunma sistemi için önemleri büyüktür. GPX'ler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda GSH, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek GSSG ve su oluşturur. Böylece eritrositlerden ve dokulardan (GPx1), plazmadan (GPx3) veya spermilerden (GPx4) hidrojen peroksidin uzaklaşmasını sağlar. Reaksiyonların sonucunda hidrojen peroksidin hidroksil radikaline dönüşmesi önlenir. Bu da lipit peroksidasyonun ve lipit peroksidasyonu takip edecek olan protein oksidasyonunun gelişimini önler (116).

2.Selenyum bağımsız GPx'ler: GPx5 gibi.

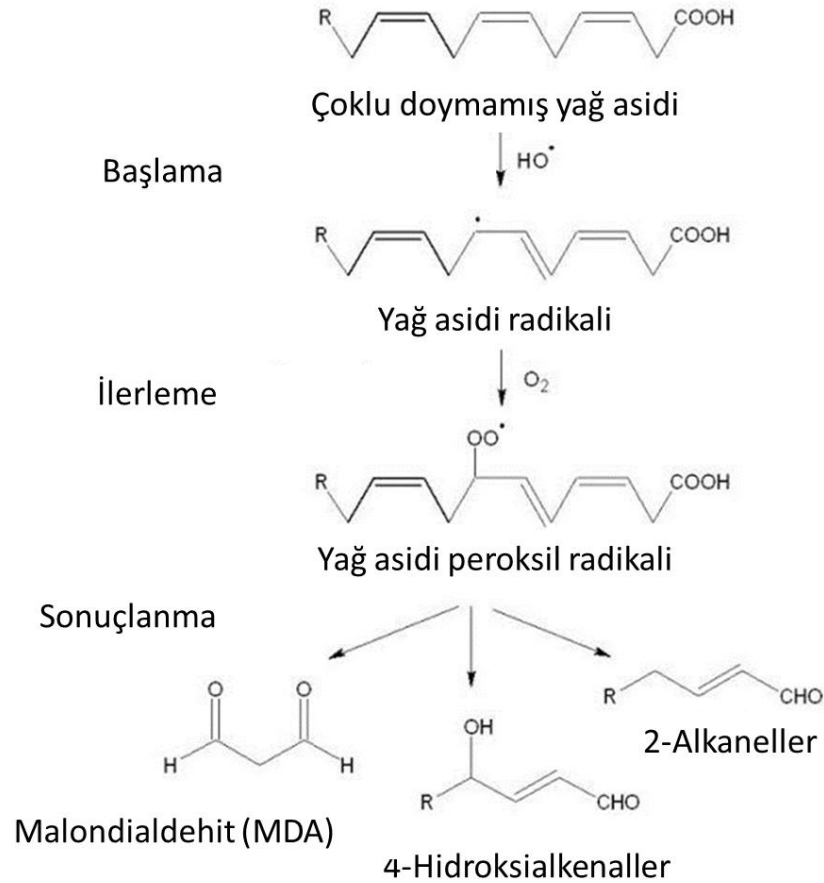
Süperoksit dismutaz enzimleriniin insanlarda ve üst filogenetik sınıflamadaki canlılarda 3 tipi bulunmaktadır: sitozolik süperoksit dismutaz (SOD1, CuZn-SOD), mitokondrial süperoksit dismutaz (SOD2, Mn-SOD) ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (SOD3, EC-SOD). Bu enzimlerin temel görevi süperoksit serbest radikalinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizlenmesidir (117).

Katalaz, en önemli antioksidan enzimlerdendir. Hücre içi CAT'in %20'si sitozolde; %80'i ise peroksidomlarda yer alır. Temel görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya yıkımını katalizlemektir. Hücre içinde %20 sitozolde ve %80 peroksidomlarda bulunmaktadır. Diğer taraftan, CAT metanol, etanol, formaldehit ve formik asit gibi hidrojen donörleriyle reaksiyona girer ve peroksidaz aktivitesi gösterir (118).

Lipit Peroksidasyonu

Hücre içindeki lipitlerin oksidanların oluşturduğu hasara karşı oldukça hassas oldukları bilinmektedir. Hücre içinde ROS'un karbon-karbon bağı içeren membran lipitlerinden elektronlar kopartması ile lipit peroksidasyonu ortaya çıkar. Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan (CH₂) bir hidrojen (H) atomunun uzaklaştırılması ile başlar ve karbon üzerinde eşlenmemiş bir elektron oluşmasıyla biter. Böylece karbon radikali (\cdot CH) oluşur ve moleküllerin rearanje edilmesiyle konjuge dien yapısı oluşur. Konjuge dien ile sabitlenen \cdot CH takiben oksijen ile tepkimeye girer ve lipit peroksil radikali (LOO \cdot) oluşur. Oluşan tüm bu radikaller seri bir tepkime ile (daha fazla hidrojen atomlarının ayrılmasıyla) diğer lipitlerle de

tepkimeye girer ve sonuçta lipit hidroperoksit (LOOH) yapıları oluşarak, tepkimeler zincirleme bir şekilde ilerler (119-122). Lipit peroksidasyonu Şekil 2.8.'de şematize edilmiştir. Lipit peroksidasyonu ile malondialdehit (MDA), 4-hidroksialkeneller (4-hidroksi-2-nonenal), akrolein ve lipit peroksitler (LOOH) oluşabilir. Bu yapılar, lipit peroksidasyonun biyogöstergeleri olarak ölçülebilir (112, 123).



Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonu

Sonuçta hücre membranının bütünlüğü, işlevleri, potansiyeli ve akışkanlığı bozulur. Oksidatif hasar sonucunda meydana gelen membran bütünlüğündeki bozulma membrandan sızdırmalara neden olur. Hücre membranında oluşan rüptürler lizozomal enzimlerin aktivasyonuna ve hücre ölümüne dek gidebilecek bir tabloya yol açar (110). Günümüzde en çok ölçülen oksidatif stres belirteçlerinden biri olan MDA birçok çalışmada lipit peroksidasyonun temel biyogöstergesi olarak kullanılmaktadır. Lipit

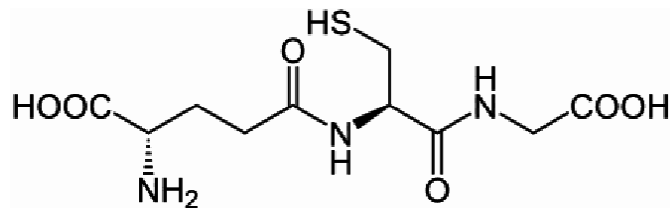
peroksidasyonu hücre içindeki DNA gibi temel makromoleküllerinin yapısının bozulmasına yol açabilir (124,125).

Protein Oksidasyonu

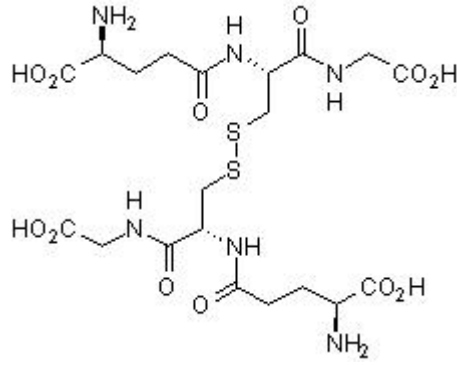
Hücre içinde ROS üretimine yol açabilen tüm ajanlar ve reaksiyonlar protein oksidasyonuna da neden olabilirler. Protein oksidasyonu, peptit zincirinde fragmantasyon, hücrede elektriksel yüklerde değişim, amino asitlerde bölgesel modifikasyonlar, enzim aktivitesinde değişiklikler, membran hasarları gibi farklı mekanizmalarla meydana gelebilir (126). ROS hücredeki proteinler üzerinde oksidatif değişikliklere yol açarak hücre hasara neden olmaktadır. ROS'un neden olduğu değişikliklerden en önemlisi karbonil gruplarının oluşumudur ve bu grupların miktarının belirlenmesi protein oksidasyon düzeyleri hakkında bilgi verebilmektedir (127).

Glutatyon

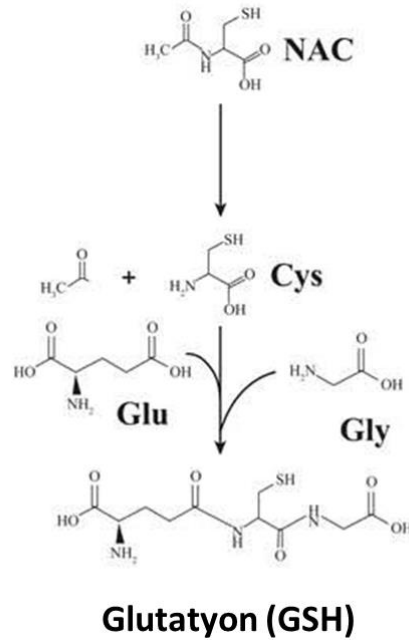
Glutatyon, “ γ glutamilsisteinilglisin” yapısında atipik bir tripeptittir. Vücüttaki en önemli tiyol bileşiği olan GSH, çok önemli bir antioksidandır. GSH'nin yapısı Şekil 2.9.'da gösterilmiştir. GSSG'nin yapısı ise Şekil 2.10.'da gösterilmiştir. Glutatyonun GPx'lerle ve TrxR ile olan reaksiyonları Şekil 2.12.'de verilmiştir. Sistein ve N-asetilsistein takviyesi ile vücüttaki GSH düzeyleri artırılabilir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.9. Glutatyonun yapısı



Şekil 2.10. Okside glutatyonunun yapısı

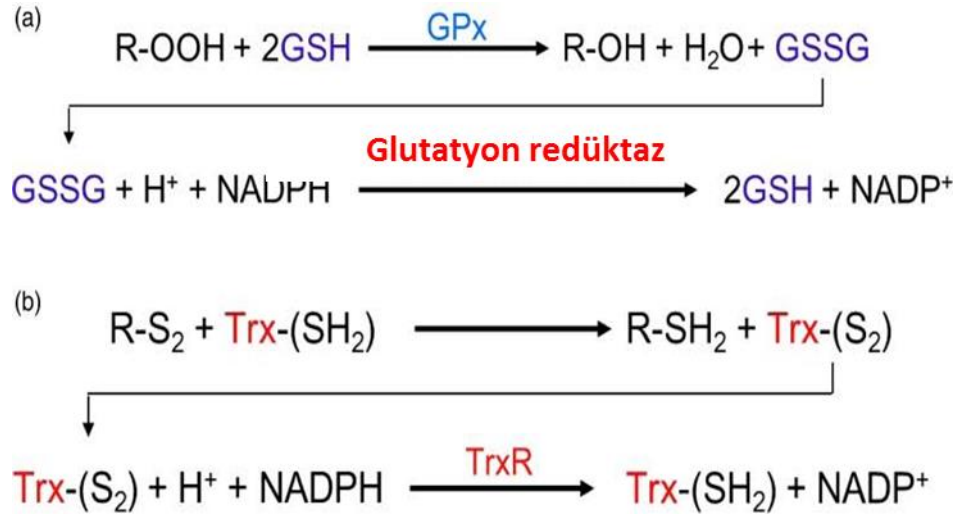


Şekil 2.11. N-asetilsistein ve glutatyon ilişkisi

Cys: sistein; Gly: glisin; Glu: glutamin; NAC: N-asetilsistein

GSH, vücuttaki detoksifikasyon prosesleri için gereklidir ve hücreler içi redoks dengesinin korunmasını sağlar. GPx'lerle GSSG'ye dönüşürken, hidrojen peroksidin uzaklaştırılması gerçekleşir. GSSG oluşurken, 2 molekül GSH'nın konjugasyonu gerçekleşir (128). GSSG daha sonra GR ile tekrar redüklenir ve GSH tekrar kullanılmak üzere tiyol havuzuna aktarılır. Glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri ile GSH ile konjugasyon sağlanarak elektrofilik bileşiklerin zararlı etkileri önlenir (126). Ayrıca, GSH sayesinde proteinlerin sülfidril gruplarının redükte fomda kalması

sağlanır; Asc ve E vitamininin aktif formlarına dönüşmesinde de görevi vardır. GSH, hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalmasında da görevlidir. Ana sentez ve depo organı karaciğerdir ve karaciğerde mM miktarlarda bulunur. Diğer dokularda ise genelde nM düzeylerde bulunmaktadır (129,130).



Şekil 2.12. Glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz reaksiyonu

GR: glutatyon redüktaz; GPx: glutatyon peroksidaz; Trx: tiyoredoksin; TrxR: tiyoredoksin redüktaz

Total Antioksidan Kapasite

Bilindiği üzere, hücrelerin kendilerini dış etmenlerden korumaları için geliştirdiği birçok antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bunlar arasında antioksidan enzimler ve GSH gibi antioksidan tiyoller, vitaminler (Asc, E vitamini, A vitaminleri), melatonin ve tiyoredoksin gibi proteinler yer alır. Organizmada bulunan tüm antioksidanların toplam etkisi “total antioksidan kapasite (TAOC)” olarak adlandırılır. Vücuttaki oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin belirlenmesinde TAOC ölçümü önemli bir biyogösterge olarak son yıllarda kullanılmaktadır. TAOC ölçümü, hem *in vitro*, hem de *in vivo* araştırmalarda gerçekleştirilebilir. TAOC ölçümleri genelde sentetik bir E vitamini türevi olan Trolox’a karşı yapılır (131,132).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Dibutil ftalat	Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu, Düşük glikozlu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM Low Glucose)	Biowest
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (DPBS)	Biowest
Etanol	JT Baker
Florometrik Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşikleri (ROS) kiti	Sigma Aldrich
Fötal Sığır Serumumu (FBS)	Biowest
Glutasyon kiti	Cayman Chemical
Penisilin- Streptomisin karışımı (Hücre kültürü için)	Biowest
Protein Karbonil Kiti	Cayman Chemical
Protein Miktar Tayini Kiti	Boster
Tripsin EDTA çözeltisi	Sigma
Lipit peroksidasyonu (TBARS) Kiti	Cayman Chemical
Total Antioksidan Kapasite (TAOC) Ölçümü Kiti	Cayman Chemical

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyu içeren plak	Grenier Bio-One, Nest
Biyolojik güvenlik kabini	Holten Lamin Air Model 1,2
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES mp Minipure, mes08/Termo Scientific
Enjektör filtresi (0,22 Mikron por açıklığı)	Merck
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Hücre kültür flaskları (25, 75 cm ²)	Corning, Isolab
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Işık mikroskobu	Leica
Kriyo tüp	Grenier Bio-One
Laboratuvar Tipi Kırık Buz Yapma Cihazı	Scotsman AF100
Lamel	Isolab
Neubauer Lamı	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik Pipet (1-10 µl, 10- 100 µl, 20- 200 µl, 100- 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Isolab
Otomatik Pipet uçları (1,10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, True-Line
Santrifüj Cihazı	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Steril Santrifüj Tüpleri	Grenier Bio-One
Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	Grenier Bio-One
Su banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L

3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada insan akciğer kanseri epitel hücre hattı (A549ATCC® CCL-185™) kullanılmıştır. A549 hücreleri American Type Cell Collection (ATCC)'den satın alınmıştır. Hücreler 58 yaşında beyaz ırktan, erkek bir akciğer kanseri hastasından elde edilmiş olan epitel benzeri morfolojiye sahip, adherent yapıdadır.

Hücreler DMEM besiyeri içerisinde %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek flasklarda çoğaltılmıştır. Besiyeri +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Besiyeri hücrelerin çoğalmasına bakılarak haftada 2-3 kere değiştirilmiştir.

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. DBP Çözeltisinin Hazırlanması

Molekül ağırlığı 278,3 g, yoğunluğu 1,05 g/cm³ olan DBP'den 10 µl alınmış %0,1 etanol içeren 10 ml besiyerinde çözülmüş ve 100 mM konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Besi yeri ile ara stok çözeltisi seyreltilerek hücrelere uygulanan DBP çözeltisi hazırlanmıştır. Son olarak elde edilen 0,25-15 mM aralığındaki DBP çözeltileri hücrelere uygulanmıştır.

3.4.2. N-Asetilsistein Çözeltisinin Hazırlanması

Moleküler ağırlığı 163,19 g olan N-asetil sisteinden hassas terazide 16,3 mg tartılmış ve %0,1 etanol içeren 10 ml besiyerinde çözülerek 500 mM konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 300 µl alınmış ve üzerine 29,700 µl besiyeri eklenerek 1/100 seyreltme yapılmıştır. 5 mM nihai konsantrasyonda NAC çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4.3. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Moleküler ağırlığı 176,12 g olan askorbik asitten hassas terazide 17,61 mg tartılmış ve %0,1 etanol içeren 10 ml besiyerinde çözülmüş ve 10 mM konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 60 µl alınmış ve üzerine 59,940 µl besiyeri eklenerek 1/1000 oranında seyreltme yapılarak 10 µM nihai konsantrasyonda askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4.4. MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit

Yoğunluğu 1,1 g/ml olan dimetil sülfoksit (C₂H₆OS) oda sıcaklığında saklanabilen, kullanıma hazır uçucu bir sıvıdır. Bu dimetil sülfoksit çözeltisi doğrudan ve gerektiği miktarda kullanılmıştır.

3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Çözeltisi

0,5 mg/ml konsantrasyonda 3-(4,5-dimetiltiyazol-2- il) – 2,5 – difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi hazırlamak için 15 mg MTT hassas terazide tartıldıktan sonra, öncelikle 3 ml DPBS’de çözdürülmüş ve toplam hacim olarak 30 ml besiyerinde çözülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan MTT çözeltisi 24 saat dayanıklıdır ve ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.4.5. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi

Kit 1 ml ROS tayin reaktifi içermektedir. Kullanımından sonra tekrarlanan deneyler için -20°C’de ışıktan ve nemden uzak saklanmıştır. Kullanım için açıldıktan sonra 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit

Kitte 0,1 ml saf DMSO bulunmaktadır. Kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu

Kit içerisinde 20 ml deney tamponu bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir ve -20°C’de 1 ay saklanabilir.

Master Reaksiyon Karışımı

20 µl ROS tayin reaktifi ve 10 ml deney tamponu içeren karışım çözeltisidir. Taze hazırlanmıştır. Bu karışım 2 saat içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.6. A549 Hücrelerinin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler

Lizis Tampon Çözeltisi

CellLytic™ MT Memeli dokusu lizis/ekstraksiyon reaktifi kullanılmıştır. Proteinler ile minimal girişime neden olan düşük konsantrasyonlarda deterjan, bisin ve 150 mM NaCl içerir. +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Proteaz inhibitörü

Aprotinin, bestatin, E-64, löpeptin, pepstatin A içerir. Bu proteaz inhibitörleri serin, sistein, aspartik proteaz ve aminopeptidazları inhibe eder. -20°C’de derin dondurucuda saklanır.

Proteaz İnhibitör Kokteyli

100 ml lizis tamponu çözeltisi içerisine 1 ml proteaz inhibitörü eklenerek hazırlanmıştır.

3.4.7. Protein Tayin Deneyinde [Bişinkonik asit Deneyi] Kullanılan Çözeltiler

Bişinkonik asit (BCA) Reaktif A

0,1 M sodyum hidroksit içerisinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bişinkonik asit ve sodyum tartarat bulunan 100 ml hacimde kullanıma hazır çözeltidir.

Bişinkonik asit (BCA) Reaktif B

%4 kuprik sülfat içeren 5 ml hacimde kullanıma hazır çözeltidir.

Sığır Serum Albümin (BSA) Standardı

%0,9 tuz ve %0,05 sodyum azid içinde 2 mg/ml sığır serum albümini içeren 20 ml hacmindeki çözeltilerdir.

Albümin (BSA) Standart Çözeltileri

Stok çözelti (A) olarak 2 mg/ml konsantrasyondaki 200 µl BSA standardından 90 µl alınarak üzerine 30 µl distile su eklenerek B standardı; A'dan (stok çözelti) 60 µl alınarak üzerine 60 µl distile su eklenerek C standardı; B standardından 60 µl alınarak üzerine 60 µl distile su eklenerek D standardı; C standartından 60 µl alınarak üzerine 60 µl distile su eklenerek E standardı; E standartından 60 µl alınarak üzerine 60 µl distile su eklenerek F standardı; F standartından 60 µl alınarak üzerine 60 µl distile su eklenerek G standardı; G standartından 25 µl alınarak üzerine 100 µl distile su eklenerek H standardı hazırlanmıştır.

Bişinkoninik asit (BCA) Karışımı

BCA reaktif A'dan 50 ml; BCA reaktif B'den 1 ml ihtiva eden kullanılacağı zaman taze hazırlanması gereken çözeltilerdir.

3.4.8. Total Glutasyon (GSH) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

GSH MES Tamponu

Tamponun pH'sı 6'dır. 0,4 M 2-(N-morfolin) etansülfonik asit (MES), 0,1 M fosfat ve 2 mM EDTA içermektedir. Kullanımdan önce 60 ml tampon, 60 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir.

Okside Glutasyon (GSSG) Standart ve Stok Çözeltileri

Her bir vialin içerisinde 2 ml okside glutasyon (25 µM) bulunmaktadır ve kullanıma hazır haldedir. 0-4 °C'de saklandığında 1 yıl stabilitesini korumaktadır. 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 µl GSSG standart çözeltilerinin üzerine sırasıyla 500, 495, 490, 480, 460, 420, 380, 340 µl MES tampon çözeltisi eklenerek 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 ve 8 µM konsantrasyonlarındaki GSSG standart çözeltileri hazırlanmıştır.

GSH Kofaktör Karışımı

Kitteki herbir vial liyofilize toz halinde NADP+ ve glukoz-6-fosfat içermektedir. Kullanılmadan önce içerik 0,5 ml deiyonize su eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0-4 °C’de 2 hafta dayanıklıdır.

Enzim Karışımı

Kitteki her bir vialde 0,2 ml tampon içerisinde glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz bulunmaktadır. Hazırlanan MES tamponundan 2 ml eklenerek seyreltilmiştir. Seyreltilmiş enzim karışımı 0-4 °C’de 2 hafta dayanıklılığını korur.

Ellman Reaktif Çözeltisi

Kit içerisinde liyofilize toz halde 5,5’- ditiyo- bis-(2- nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktif) bulunmaktadır. Kullanımdan hemen önce 0,5 ml deiyonize su eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan reaktif çözeltisi 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

3.4.9. Lipit Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tiyobarbitürik Asit

Kitte vial içinde 2 g kullanıma hazır halde tiyobarbitürik asit (TBA) bulunmaktadır.

TBA Asetik Asit

Kit içindeki bir vialde konsantre halde 20 ml asetik asit bulunmaktadır. 40 ml asetik asit 160 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Seyreltik asetik asit renk reaktifi hazırlanması için kullanıma hazırdır. Seyreltilmiş hali oda sıcaklığında 3 ay stabilitesini korur.

TBA Sodyum Hidroksit

Kit içerisinde bulunan 20 ml sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin 180 ml deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanan çözeltisi, renk reaktifi hazırlamak için kullanılmıştır. Seyreltilmiş hali oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri

Kitte kullanıma hazır halde 500 µM MDA stok çözeltisi bulunmaktadır. 250 µl MDA çözeltisi 750 µl deiyonize su ile seyreltilmiş ve 125 µM ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltisine deiyonize su eklemeleri yapılarak 0, 0,625, 1,25, 2,5 5, 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarında MDA standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi

Kitte kullanıma hazır olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi bulunmaktadır.

Renk Reaktifi

530 mg TBA üzerine, önceden hazırlanan 50 ml seyreltik TBA asetik asit ve 50 ml sodyum hidroksit eklenmiş ve çözülmesi sağlanarak renk reaktifi hazırlanmıştır. Reaktif 24 saat stabilitesini korur.

3.4.10. Protein Karbonil Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik Asit

Kitteki vialde 12 M hidroklorik asit (HCl) bulunmaktadır. Vialdeki HCl'nin 40 ml deiyonize su içerisine eklenmesiyle 2,5 M HCl elde edilmiştir. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)

Kitte bir vial içerisinde toz halde 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) bulunmaktadır. Bu vial 2,5 M 10 ml HCl eklenerek çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti 4°C’de 1 hafta stabilitesini korumaktadır.

Trikloroasetik (TCA) Çözeltisi

Kitte bulunan bir vial 1 g/ml TCA çözeltisi içermektedir. % 20 TCA çözeltisi hazırlamak için 12 ml TCA çözeltisi ile 48 ml deiyonize su karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 20 ml alınıp 40 ml deiyonize su eklenmesiyle %10 TCA çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözeltiler oda sıcaklığında 1 ay dayanıklıdır.

Guanidin Hidroklorür

Kullanıma hazır olarak kitte bulunmaktadır.

Etanol

Kullanıma hazır olarak kitte vial içerisinde 30 ml olarak bulunmaktadır.

Etil Asetat

Kitte bir vial içinde 30 ml etil asetat bulunmaktadır. 30 ml etanol ile 1:1 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

3.4.11. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Antioksidan Deney Tamponu

Konsantre 3 ml tampon 27 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen tamponun pH’sı 7,4’dür. 5mM potasyum fosfat ve %0,9 sodyum klorür içermektedir. 4°C’de saklandığında stabilitesini 6 ay korumaktadır.

Kromojen

Kitte bulunan bir vialde liyofilize toz halinde 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) içermektedir. Toz üzerine 6 ml deiyonize su eklenerek kromojen dilüe edilmiştir. 4°C’de saklandığında 24 saat stabildir.

Metmyoglobin

Kitte bulunan bir vial metmyoglobinin liyofilize tozunu içermektedir. Toz 600 µl deney tamponu eklenerek kullanıma hazırlanmıştır. -20 °C’de 1 ay stabildir.

Trolox Stok ve Standart Çözeltileri

Kitte bulunan vial Trolox’un (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) liyofilize tozunu içermektedir. Toz 1 ml deiyonize su eklenerek kullanıma hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 4 °C’de 24 saat dayanıklıdır.

Deney tamponundan 1000 µl alınarak A standardı; tampondan 970 µl alınarak üzerine 30 µl Trolox eklenerek B standardı; tampondan 940 µl alınarak üzerine 60 µl Trolox eklenerek C standardı; tampondan 910 µl alınarak üzerine 90 µl Trolox eklenerek D standardı; tampondan 880 µl alınarak üzerine 120 µl Trolox eklenerek E standardı; tampondan 850 µl alınarak üzerine 150 µl Trolox eklenerek F standardı; tampondan 780 µl alınarak üzerine 220 µl Trolox eklenerek G standardı oluşturulmuştur.

Hidrojen Peroksit

Kitten çıkan vial 8,82 M hidrojen peroksit içermektedir. 10 µl hidrojen peroksit 990 µl deiyonize su ile seyreltilmiştir. Bu çözeltiden 20 µl alınarak üzerine 3,98 ml deiyonize su eklenmesiyle nihai konsantrasyonu 441 µM olan hidrojen peroksit çözeltisi elde edilmiştir. Oda sıcaklığında 4 saat stabilitesini korur.

3.5. Hücreler ve Deney Grupları

3.5.1. Deney Grupları

1. Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmayan gruptur. Bu gruba sadece deneyler esnasından çözücü olarak kullanılan %0,1 etanol içeren besiyeri uygulanmıştır.
2. DBP grubu: Sitotoksisite deneylerinin sonucunda belirlenen inhibitör konsantrasyon 30 (IC₃₀, 1,185 mM) DBP'nin 48 saat süreyle uygulandığı gruptur.
3. NAC grubu: Koruyucu doz olarak seçilen 5 mM dozda NAC'ın ön inkübasyon için 24 saat, sonrasında ise 48 saat uygulandığı gruptur.
4. Askorbik asit grubu (Asc): Koruyucu doz olarak seçilen 10 µM dozda askorbik asitin ön inkübasyon için 24 saat, sonrasında ise 48 saat uygulandığı gruptur.
5. DBP+NAC grubu: Bu gruptaki hücelere 24 saat süreyle ön inkübasyon olarak 5 mM NAC uygulanmıştır. Takiben, hücelere 48 saat süreyle sitotoksisite deneyleri sonucu elde edilen IC₃₀ dozunda DBP (1,185 mM) ve NAC (5 mM) uygulanmıştır.
6. DBP+Asc grubu: Bu gruptaki hücelere 24 saat süreyle ön inkübasyon olarak 10 µM askorbik asit uygulanmıştır. Takiben, hücelere 48 saat süreyle sitotoksisite deneyleri sonucu elde edilen IC₃₀ dozunda DBP (1,185 mM) ve Asc (10 µM) karışımı uygulanmıştır.

3.5.2. Donmuş Hücrelerin Çözülme Aşamaları

1. Deneyler sırasında kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etil alkol yardımı ile dezenfekte edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
2. Su banyosu açılmış ve 37 °C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
3. Besiyeri +4°C buzdolabından çıkarılıp, su banyosunda ısıtılmıştır.
4. -80°C'den çıkarılan hücrelerin bulunduğu kriyotüp buzun üzerine alınmıştır.
5. Su banyosunda kriyotüp ısıtılarak hücrelerin çözülmesi sağlanmıştır. Bu aşamada hücrelerin hızlıca çözünme ihtimaline karşı dikkatli olunmalıdır.
6. Kabine alınan kriyotüp içeriği santrifüj tüpüne alınmış, üzerine yavaşça besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak süspansiyon haline gelmesi sağlanmıştır.

7. Hücre karışımı 1200 devirde 5 dk santrifüjlenmiştir.
8. Santrifüj sonrasında supernatan pipetle çekilip atılmıştır.
9. Pellet üzerine taze besiyeri eklenmiştir.
10. Besiyeri ve pellet karışımı pipetaj yöntemi ile süspande edilmiş ve oluşan karışım pipet yardımıyla çekilerek flaska transfer edilmiştir.
11. Flaska alınan hücreler ışık mikroskobunda incelenerek kontrol edilmiştir.
12. Flasklar 37°C ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması

1. Deneyler sırasında kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etil alkol yardımı ile dezenfekte edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
2. Su banyosu açılmış ve 37 °C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
3. Besiyeri, DPBS ve tripsin-EDTA buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Flask içerisindeki hücrelerin durumu ışık mikroskobu altında kontrol edilmiştir.
5. Flaksta yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlama işlemine hazırdır.
6. Hücrelerin üzerinde bulunan besi yeri Pasteur pipeti ile çekilmiştir.
7. Flaska tutunan hücreler 5 ml DPBS kullanılarak 2 defa yıkanmıştır.
8. Yıkamadan sonra hücrelerin flaskın tabanından kalkmasını sağlamak için 4 ml tripsin-EDTA ilave edilmiş ve 3-5 dakika arası inkübatörde bekletilmiştir.
9. Hücrelerin kalktığı ışık mikroskobu altında görüldükten sonra 8 ml besiyeri flaska eklenmiştir.
10. Flaksta bulunan hücre+besiyeri+tripsin-EDTA karışımı santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası üst kısım atılmış pellet üzerine 10 ml besiyeri eklenmiş ve süspande edilmiştir.
12. Tüpte bulunan hücre + besiyeri yeni flasklara eklenmiştir.
13. Flaskların üzerine hücre tipi, tarih, pasaj sayısı, besiyeri bilgileri yazıldıktan sonra 37°C, %5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

3.5.4. Hücrelerin Besiyerinin Değişimi

1. Deneyle sırasında kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etil alkol yardımı ile dezenfekte edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
2. Su banyosu açılmış ve 37 °C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
3. Besiyeri ve DPBS +4°C buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılan hücrelerin mikroskopta canlılığı kontrol edilmiştir.
5. Biyogüvenlik kabininde hücrelerin üzerindeki eski besiyeri steril Pasteur pipeti yardımıyla çekilmiştir.
6. Flasktaki hücreler 5 ml DPBS ile 2 kez yıkanmıştır.
7. Flasklara 10 ml taze besiyeri eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır.

3.5.5. Hücrelerin Dondurulması İşlemi

Hücreler mikroskop altında flaskta yeterli yoğunluğa ulaştıklarında sonraki deneylerde kullanılmak üzere dondurulup -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

1. Deneyle sırasında kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etil alkol yardımı ile dezenfekte edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
2. Su banyosu açılmış ve 37 °C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
3. Besiyeri, D-PBS ve tripsin-EDTA +4°C buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Dondurma işleminden önce 700 µl besiyeri, 200 µl FBS ve 100 µl DMSO içeren dondurma vasatı (%70 besiyeri, %20 FBS, %10 DMSO) hazırlanmıştır.
5. Flasklar inkübatörden alındıktan sonra pipet yardımıyla besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler DPBS ile yıkanarak kalan besiyeri de atılmıştır.
6. Flask, üzerine 4 ml tripsin-EDTA ilavesinden sonra 3-5 dk inkübatöre kaldırılmıştır.
7. Mikroskopta hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiş ve flask üzerine 7-8 ml besiyeri ilave edilmiştir.
8. 1200 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır.

10. Pellet üzerine 1 ml dondurma vasatı eklenmiş ve pipetaj yardımıyla dağıtılmıştır.
11. Hücre süspansiyonu kriyotüp içerisine alınmış, tüp 24 saat -20 bekletildikten sonra -80'e kaldırılmıştır.

3.5.6. Hücre Sayım İşlemi Basamakları

Hücrelerin sayılması tripan mavisi denilen boya ile yapılır. Tripan mavisi canlı hücrelerin içine giremezken membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin içine kolayca difüze olur. Hücrelerin boyaya gerekenden fazla süre maruz bırakılması canlı hücrelerinde boyanmasına neden olacağı için dikkat edilmelidir.

1. Deneyle sırasında kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etil alkol yardımı ile dezenfekte edilerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır.
2. Su banyosu açılmış ve 37 °C'ye kadar ısınması beklenmiştir.
3. Besiyeri, DPBS ve tripsin-EDTA +4°C buzdolabından çıkarılıp su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Flaskta bulunan hücrelerin yoğunluğu ışık mikroskobu altında incelenmiş ve flasktaki besiyeri uzaklaştırılmıştır.
5. Hücreler 2 defa 5ml DPBS ile yıkanmıştır.
6. Yıkamadan sonra flask tabanındaki hücrelerin kalkmasını sağlamak için 4 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve inkübasyon için 3-5 dakika etüve kaldırılmıştır.
7. Işık mikroskobunda hücrelerin kalktığı görülünce 8 ml besiyeri flask üzerine eklenmiştir.
8. Flask içeriği steril santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 devirde 5 dk santrifüjlenmiştir.
9. Santrifüj sonrası üst faz atılmış, pellet üzerine 10 ml besiyeri eklemesi yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlanmıştır.
10. Hücre süspansiyonundan 50 µl ependorf tüpe aktarılmış, üzerine 50 µl tripan mavisi (%0,4) çözeltisi eklenmiş ve süspande edilmiştir.
11. Neubauer hücre sayım lamınının 2 bölmesine lam ile lamel arasından hücre süspansiyonundan 10 µl eklenmiş ve ışık mikroskobu altında hücre sayım işlemi yapılmıştır. Lamda bulunan toplam 8 kare içindeki hücreler sayılmış ve işlem sonunda sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır. Sonrasında ml'deki

hücre sayısı aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplama işlemi yapılmıştır.

$$\frac{\text{toplam hücre sayısı}}{\text{ml}} = \left(\text{sayılan toplam hücre sayısı} \times \frac{\text{dilüsyon faktörü}}{8} \right) \times \frac{10000 \text{ hücre}}{\text{ml}}$$

3.6. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.6.1. A549 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

MTT, *in vitro* olarak hücre canlılığının belirlenmesi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hücrelerin biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı duyarlılığını belirlemek ve sitotoksitesi ve proliferasyonu ölçmek için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Metabolik aktivitedeki küçük değişiklikler hücre canlılığında büyük değişiklikler meydana getirebilir. MTT deneyi; sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür bileşiğinin mitokondriyal dehidrojenazlarla çözünmeyen mor renkli formazana dönüştürülmesi, oluşan formazan kristallerinin DMSO'da çözülmesi ve bu çözeltinin verdiği renk şiddetinin 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (133,134). MTT yöntemiyle biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan konsantrasyon (inhibitör konsantrasyon 50, IC₅₀) belirlenir. Daha sonra elde edilen eğriden IC₃₀ veya diğer inhibitör konsantrasyonlar hesaplanabilir. Deneyler her grupta yer alan 3 örnek için 3 ayrı günde, her günde 2 ayrı tekrar yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin Uygulanışı

1. 6,4 mg MTT tartılmış ve son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde 1 ml DPBS ve 11,8 ml besiyeri içerisinde çözündürülmüştür.
2. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 0,25-15 mM doz aralığında DBP çözeltisi uygulanmıştır.
3. Kontrol grubu olarak hücrelere %0,1 etanol içeren besiyeri uygulanmıştır.

4. 48 saat inkübasyon sonrasında DBP'ye maruz kalan hücrelerin üzerindeki çözeltiler uzaklaştırılmış ve hazırlanan MTT çözeltisinden 100 µl eklenmiştir.
5. Hücreler MTT ile 3 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
6. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 5-10 dakika süre ile çalkalanmıştır.
7. Absorbans 570 nm'de ölçülmüştür.
8. MTT çözeltisinin ışık ile bozulmasını önlemek için deney karanlık ortamda yürütülmüştür.

Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol grubunda bulunan hücrelerin canlılığı (absorbanslarına göre) %100 olarak kabul edilmiş ve diğer gruplardaki hücrelerin canlılığı kontrole göre % canlılık olarak hesaplanmıştır. Takiben DBP uygulanan hücrelerin IC₅₀ ve IC₃₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.6.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Yöntemde canlı hücreler tarafından, floresan olmayan prob olan 5- ve 6-klorometil-2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H₂DCFDA)'ın yeşil renkte floresans oluşturan 2',7'-diklorofloreskein (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi ve oluşan floresansın $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 640 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 675 \text{ nm}$ 'de ölçülmesi esasına dayanır (135).

Yöntemin Uygulanışı

1. ROS tayin reaktifi ile 40 µl DMSO karıştırılmış ve ROS tayin reaktif stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti -20°C' de ışık ve nemden korunarak saklanmıştır.
2. Mikroplağa 90 µl besiyeri içinde olan A549 hücreleri ekilmiştir.
3. Sitotoksisite çalışmaları sonucunda DBP için elde edilen IC₃₀ dozunun 10 katı konsantrasyonda DBP çözeltisi hazırlanmıştır. Koruyuculuk için kullanılan tüm çözeltiler (NAC, Asc) için de 10 katı konsantrasyonlarda çözeltiler

hazırlanmıştır. Her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine DBP, NAC, Asc veya kombine uygulamalar için çözelti karışımlarından 10 µl eklenmiştir. Kontrol grubuna ise sadece 10 µl besiyeri konulmuştur.

4. Plak 37 °C 'de inkübatörde 30 dk bekletilmiştir.
5. ROS tayin reaktif stok çözeltisinden 20 µl alınmış,10 ml deney tamponunda çözülerek “master reaksiyon karışımı” hazırlanmıştır. Çözeltinin 2 saat içinde kullanılması gerekir.
6. Plaktaki kuyucukların her birisine hazırlanan master reaksiyon çözeltisinden 100 µl eklenmiştir.
7. Plak 30 dakika ile 1 saat arasında 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir.
8. Sonrasında kuyucukların floresansı $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 640 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 675 \text{ nm}$ 'de ölçülmüştür.

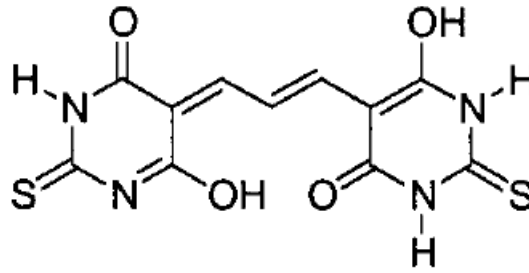
ROS Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol hücreleri tarafından üretilen ROS miktarı %100 kabul edilerek diğer hücrelerin ürettiği ROS miktarı kontrole göre % olarak hesaplanmıştır.

3.6.3. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Malondialdehit (MDA) lipit peroksidasyonu oluşan bir aldehit türevidir ve oksidatif stres sonucu ortaya çıkan lipit peroksidasyonun önemli biyogöstergelerinden kabul edilir. Ölçümü için spektrofotometri, spektrofotometri, gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller elektroforez olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır. Bugüne kadar en yaygın olarak kullanılan yöntem MDA ve tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS)'ın ölçümüdür. Yöntemin esası, asidik ortamda malondialdehitin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi ve oluşan pembe bileşiğin oluşturduğu renk şiddetinin kolorimetrik olarak 530 nm'de ölçülmesidir (136).



Şekil 3.1. MDA-TBA kompleksi

Yöntemin Uygulanışı

1. Hazırlanan MDA standartları ve numune çözeltileri 5 ml cam tüplere 100'er µl olarak eklenmiştir. Tüp üzerine 100 µl SDS çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.
2. Bütün cam tüplere hazırlanmış renk reaktifinden 4 ml ekleme yapılmıştır.
3. Tüpler su banyosuna alınmış ve 100 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında hemen buz üzerine alınmış ve 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
4. Tüpler buzdan alındıktan sonra 3500 devirde 10 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Tüpler santrifüjden sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında şeffaf plak üzerindeki kuyucuklara 150 µl konulmuş, absorbans 530 nm'de ölçülmüştür.

Malondialdehit Düzeylerinin Hesaplanması

Standartların MDA konsantrasyonuna karşı 530 nm'de okunan absorbans değerleri kullanılarak standart konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Grafik, numunenin MDA düzeyinin hesaplanmasında kullanılmış ve sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

3.6.4. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Gltasyon, γglutamilsisteinglisin yapısında atipik bir tripeptittir. GSH, hücre içindeki ana tiyoldür. Birçok bileşiğin detoksifikasyonu için elzemdir ve antioksidan savunma sisteminde hayati bir rol oynamaktadır. Serbest radikallerin uzaklaştırılması

ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksidasyonunun önlenmesi için gereklidir. Glutasyon S-transferaz (GST) ve glutasyon peroksidazlar (GPx'ler) gibi antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar. Bu işlemler sırasında GSH oksitlenmiş forma (GSSG) dönüşür. GSSG, kofaktör olarak NADPH(H⁺) varlığında glutasyon redüktaz (GR) enzimiyle GSH'a dönüştürülür. GSH/GSSG oranı "redoks oranı" olarak da adlandırılır. Bu oran hücre içi oksidatif stresin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır

Kullanılan kit kapsamında reaksiyon GR enzimi tarafından GSSG'nin indirgenmesi, oluşan indirgenmiş GSH'ın, DTNB ile reaksiyona girerek GS-TNB bileşiği oluşturması ve GR enzimi etkisiyle GS-TNB'nin indirgenip GSH'ın tekrar serbest bırakılması ve TNB üretilmesi şeklinde gerçekleşir. Sonuçta meydana gelen sarı renkli TNB bileşiğinin absorbansının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (137,138).

Yöntemin Uygulanışı

1. Plak üzerindeki kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisinden eklenmiştir.
2. Takiben kuyucuklara kontrol, DBP, NAC, Asc, DBP+NAC ve DBP+Asc ile muamele edilmiş A549 hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. 11,25 µl MES tamponu, 0,45 ml kofaktör karışımı, 2,1 ml enzim karışımı, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB karıştırılarak deney kokteyli hazırlanmıştır. Bu kokteyl 10 dakika içinde kullanılmalıdır.
4. Bütün kuyucuklara deney kokteylinden 150 µl eklenmiştir.
5. Sonrasında mikropak ışıktan korunarak 25 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
6. 25 dakika bitiminde absorbans ölçümü 414 nm'de yapılmıştır.

Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması

GSSG standart konsantrasyonlarına karşı absorbansları kullanılarak çizilen eğri yardımıyla örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmış ve sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.

3.6.5. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Proteinlerin reaktif oksijen bileşikleri (ROS) tarafından modifikasyonu sonucu proteinlerin temel olarak aminoasit yan zincirleri etkilenir ve karbonil gruplarının oluşur. Protein oksidasyonu birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. Yaşlanma sürecinde protein oksidasyonunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, metal katalizli oksidasyonların, okside şekerlerin ve lipid peroksidasyonun da protein oksidasyonuna ve özellikle de karbonil gruplarında artışa yol açabileceği bilinmektedir. Protein oksidasyonu lipid peroksidasyondan bağımsız bir şekilde de ortaya çıkabilir ve normal fizyolojik süreçlerde de meydana gelebilmektedir (139,140).

Uygulanan yöntemde, karbonil gruplarının kantitatif analizi DNPH ile bu grupları türevlendirdikten sonra stabil hidrazonların oluşumuna dayanmaktadır. Takiben oluşan stabil hidrazonların absorbansın 370 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür ve sonuçlar nmol/mg protein olarak verilir (139, 140).

Yöntemin Uygulanışı

1. Numune çözeltisinden 200' er µl 2 plastik tüpe aktarılmış ve 1 tüp numune tüpü iken 2. tüp kontrol tüpü olarak isimlendirilmiştir.
2. Numune tüpünün üzerine 800 µl DNPH ve kontrol tüpünün üzerine 2,5 M HCl asitten 800 µl eklenmiştir.
3. 1 saat boyunca tüpler karanlık ortamda oda sıcaklığında her 15 dk'da 1 vortekslenerek inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonrasında her tüpe %20 TCA çözeltisinden 1 ml eklenmiş ve tüpler buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 4 °C'de 15000 devirde 10 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine %1 TCA çözeltisinden 1 ml eklenerek buz üzerinde 5 dakika tutulmuştur.
7. Tüpler tekrar 4°C'de 15000 devirde 10 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine 1:1 oranında 1 ml etilasetat-etanol karışımı eklenmiş ve vortekslenmiştir.

9. Santrifüj sonrası üst faz atılmış, pellet üzerine 500 µl guanidin HCl eklenerek vortekslenmiştir.
10. Takiben 4°C’de 15000 devirde 10 dakika santrifüjden sonra, her bir tüpteki üst fazdan 220 µl alınarak kuyucuklara konulmuştur ve 370 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması

Düzeltilmiş absorbans değerini bulmak için; kontrol gruplarının ortalama absorbans değeri, numunenin ortalama absorbans değerinden çıkarılmıştır. Aşağıdaki formülde düzeltilmiş absorbans değeri de kullanılarak karbonillerin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(\text{Düzeltilmiş Absorbans}) / (*0,011 \mu\text{M}^{-1})] \times (500 \mu\text{l}/200 \mu\text{l})$$

(370 nm’de dinitrofenilhidrazinin ekstinksiyon katsayısı 22.000 M⁻¹ cm⁻¹ (0,022 µM⁻¹ cm⁻¹)’dir.)

3.6.6. Total Antioksidan Kapasite Ölçümünün Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Total antioksidan kapasite ölçümü deneyi numunedeki antioksidanlar tarafından, maksimum 734 nm’de absorbans veren mavi-yeşil renkli ABTS kationunun absorbans şiddetinin azaltılması esasına dayanır. Numunedeki antioksidanların kapasitesi ABTS oksidasyonunu önler. Sonuçta numunelerdeki TAOC düzeyleri suda çözünür bir tokoferol analogu olan Trolox ile karşılaştırılır ve milimolar Trolox eşdeğeri olarak ölçülür. ABTS kationunun oluşması için ABTS ferrilmyoglobin ile reaksiyona girer. Ferrilmyoglobin radikali ise, hidrojen peroksit ve metmyoglobinin reaksiyonu sonrası oluşur (141,142).

Yöntemin Uygulanışı

1. Trolox standart çözeltileri (0, 0,045, 0,090, 0,135, 0,18, 0,225, 0,330 mM), Trolox ve tampon çözeltilerinden kitte belirtilen miktarlarda alınarak hazırlanmıştır.

2. Hazırlanan Trolox standart çözeltilerinden kuyucuklara 10 µl eklenmiş ve üzerine 10 µl metmyoglobin ve 150 µl kromojen ilave edilmiştir.
3. Numune çözeltisinden kuyucuklara 10 µl eklenmiş ve üzerine 10 µl metmyoglobin ve 150 µl kromojen ilave edilmiştir.
4. Plaktaki kuyucukların üzerine 40'ar µl hidrojen peroksit 1 dk içerisinde eklenmiş ve oda sıcaklığında yatay çalkayıcıda 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Sonrasında 750 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Total Antioksidan Kapasite Düzeylerinin Hesaplanması

Standartların Trolox konsantrasyonuna karşı 750 nm'de okunan absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Standart eğrinin lineer regresyonundan elde edilen denklem kullanılarak her bir numunenin ortalama absorbans değerlerinin denklemde kullanılmasıyla numunelerin antioksidan konsantrasyonu hesaplanmıştır. Sonuçlar Trolox eşdeğeri olarak nmol/mg protein olarak verilmiştir.

Antioksidan (mM)

$$: \left[\frac{\text{örneğin ortalama absorbans değeri} - y \text{ eksenini kestiği nokta}}{\text{eğim}} \right] \times \text{dilüsyon}$$

3.6.7. Protein Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Protein miktar tayini deneyi (BCA deneyi), BCA'nın; alkali ortamda Cu^{+2} iyonları ile proteinin reaksiyonu sonucu oluşan Cu^{+1} iyonları ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen yoğun mor renkli kompleksin absorbansının 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenme işlemi; protein içerisinde yer alan sistein, sistin, tirozin, triptofan aminoasitleri ve peptit bağları tarafından gerçekleştirilmektedir. İndirgenme işlemi sonucu oluşan Cu^{+1} miktarı protein miktarı ile orantılıdır (143).

Yöntemin Uygulanışı

1. BCA A ve BCA B çözeltilerinden 50:1 oranında (50 ml BCA A ve 1 ml BCA B) oranında karışım hazırlanmıştır.
2. Sığır serum albümin (BSA) standart çözeltileri PBS eklenmesiyle dilüe edilerek hazırlanmıştır.
3. Kuyucuklara 25 µl örnek veya standart çözeltilerinden eklenmiştir.
4. Sonrasında kuyucuklara 200 µl BCA karışımından ekleme yapılmıştır.
5. Plak 37 °C 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
6. Plak oda sıcaklığına geldikten sonra 10 dk içinde 562 nm'de absorbansı ölçülmüştür.

Protein Miktarının Hesaplanması

BSA standart konsantrasyonu ve absorbans değerleri kullanılmasıyla standart eğri çizilmiş ve bu eğri kullanılarak numune içerisindeki protein konsantrasyonu hesaplanmıştır. Sonuçlar mg protein olarak elde edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Belirlenmesi

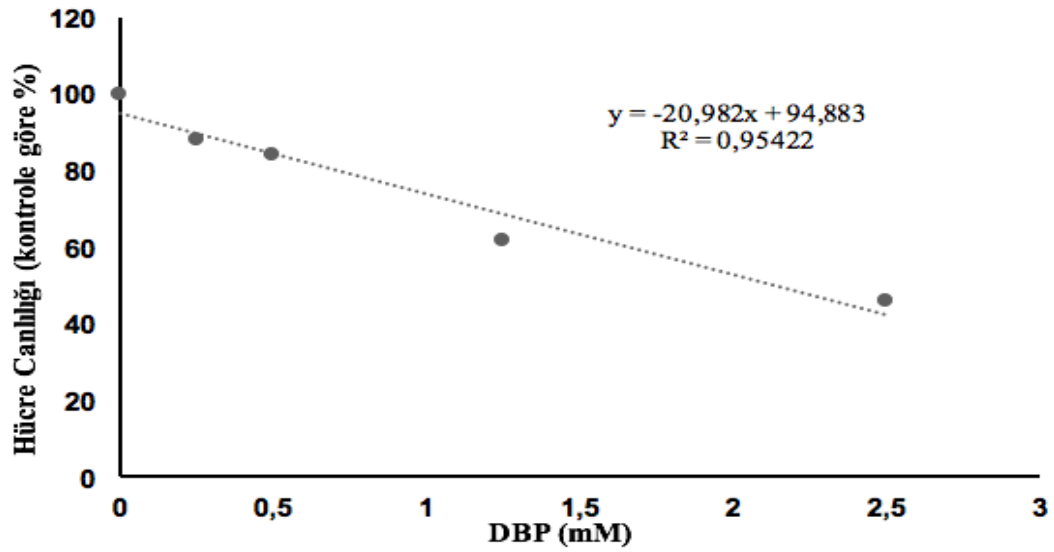
A549 hücrelerine DBP (0,25-15 mM) konsantrasyon aralığında uygulanmış ve hücreler 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı test maddesi kontrol hücrelerine göre % canlılık olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda IC₅₀ ve IC₃₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1., Tablo 4.2., Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. DBP uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı

Uygulanan DBP Dozu (mM)	Hücre Canlılığı (%)
0	100
0,25	87,80
0,5	84,13
1,25	62,50
2,5	45,76
10	44,76
15	38,80

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruptaki hücrelerin canlılıkları kontrole göre % olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değeri olup; üç farklı günde yapılan değerlerden elde edilen ortalama hücre canlılığı verilmiştir.



Şekil 4.1. DBP'nin 0,25-15 mM konsantrasyon aralığında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

Tablo 4.2. A549 hücrelerinde DBP'nin IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri

	DBP için inhibitör konsantrasyon değerleri (mM)
IC ₃₀	1,186
IC ₅₀	2,139

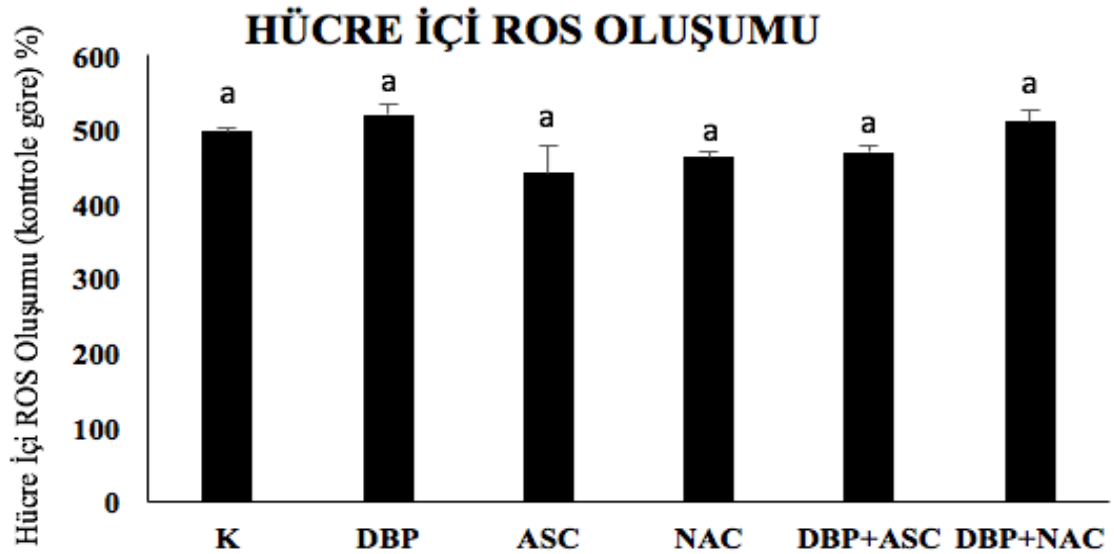
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Çalışma gruplarında belirlenen hücre içi ROS kontrole kıyasla %ROS olarak hesaplanmıştır. İntrasellüler ROS düzeyleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Bütün gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Ancak, DBP uygulanan grupta kontrole kıyasla az da olsa (%4,5) bir artış olduğu görülmüştür. Bu artış koruyucu uygulaması ile engellenmiştir.

Tablo 4.3. Çalışma gruplarında hücre içi ROS üretimi

Çalışma Grupları (n=3)	ROS Üretimi (%)
Kontrol	100±5,45 ^a
DBP	104,53±13,07 ^a
Asc	88,76±35,98 ^a
NAC	93,06±7,48 ^a
DBP+Asc	94,21±8,18 ^a
DBP+NAC	102,53±15,04 ^a

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir.
Gruplar arası istatistiksel fark bulunamamıştır.

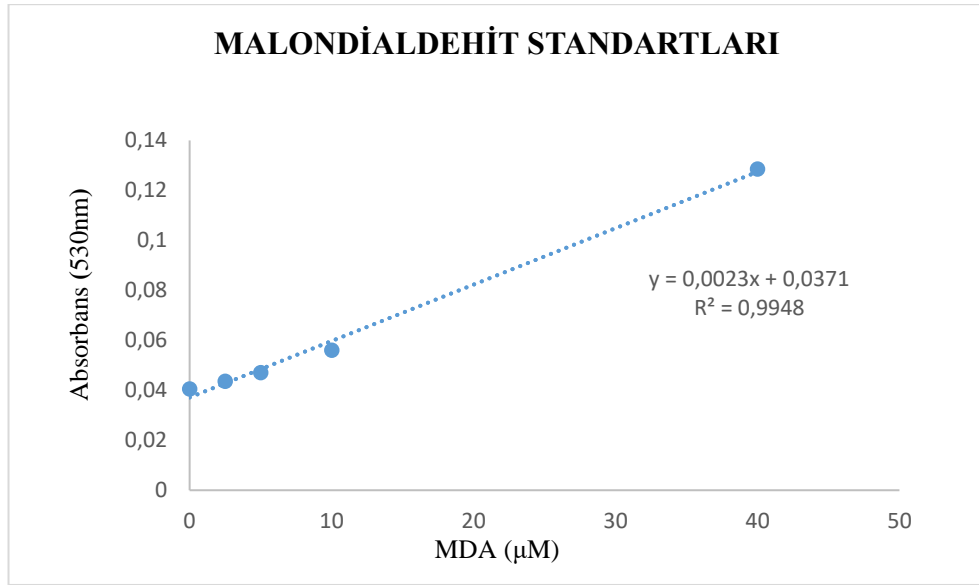
**Şekil 4.2.** Çalışma gruplarında hücre içi ROS oluşumu.

Gruplar arası istatistiksel fark bulunamamıştır.

4.3. Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Malondialdehit standartlarına ait eğri Şekil 4.3.'de verilmiştir. Çalışma gruplarında bulunan MDA düzeyleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. Kontrol grubuna göre DBP grubunda yaklaşık 10,4 kat artış gözlenmiştir. DBP grubu ile diğer

gruplar kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Askorbik asit, NAC, DBP+Askorbik asit, DBP+NAC uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Hücre hatlarına koruyucu madde uygulamasının DBP'nin lipid peroksidasyon üzerine etkisini azalttığı gözlenmiştir.



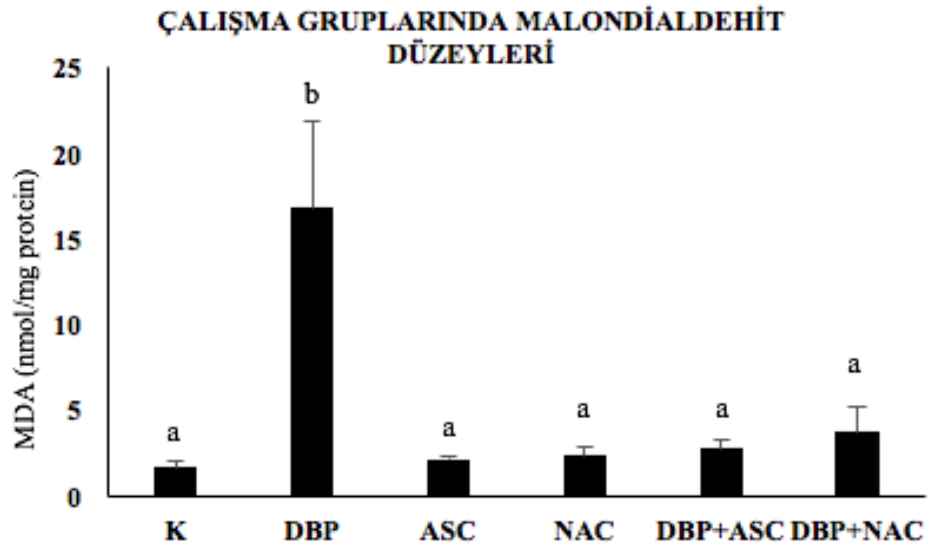
Şekil 4.3. Malondialdehit standartları-absorbans eğrisi

Tablo 4.4. Çalışma gruplarında malondialdehit aktivitesi.

Çalışma Grupları (n=3)	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	1,62±0,34 ^a
DBP	16,81±5,033 ^b
Asc	2,09±0,17 ^a
NAC	2,33±0,58 ^a
DBP+Asc	2,78±0,47 ^a
DBP+NAC	3,70±1,46 ^a

Tüm değerler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir.

^{a, b}Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

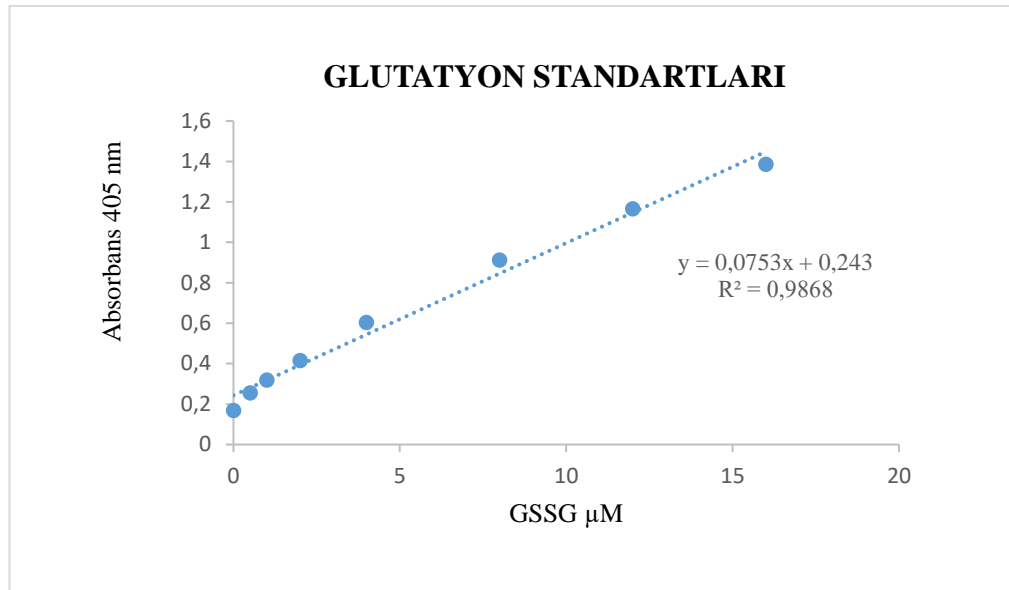


Şekil 4.4. Çalışma gruplarında malondialdehit (MDA) düzeyleri

^{a, b}Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.4. Glutasyon Düzeyleri

Glutasyon standartlarına ait eğri Şekil 4.5.'de, çalışma gruplarında total GSH düzeyleri ise Tablo 4.5. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir. DBP grubuna ait total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla %88 oranında ve anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$). Diğer gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Koruyucu madde uygulamasının DBP'nin glutasyon düzeylerinde neden olduğu azalmayı engellediği görülmüştür.



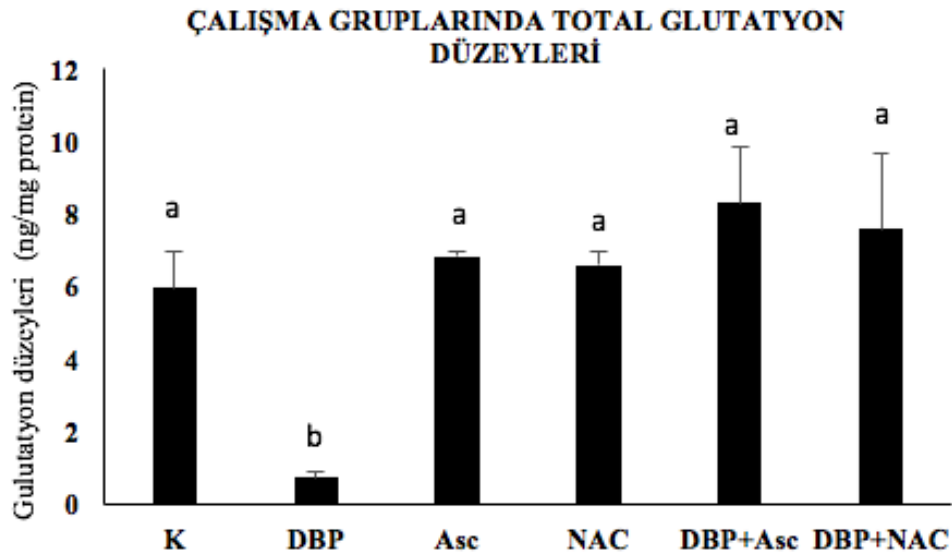
Şekil 4.5. Glutasyon düzeyleri.

Tablo 4.5. Total GSH düzeyleri.

Çalışma Grupları (n=3)	GSH (nmol/mg protein)
Kontrol	5,96±0,99 ^a
DBP	0,71±0,16 ^b
Asc	6,84±0,14 ^a
NAC	6,58±0,37 ^a
DBP+Asc	8,29±1,54 ^a
DBP+NAC	7,58±2,11 ^a

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır (p<0,05).



Şekil 4.6. Çalışma gruplarında total GSH düzeyleri

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

4.5. Protein Oksidasyonu Düzeyleri

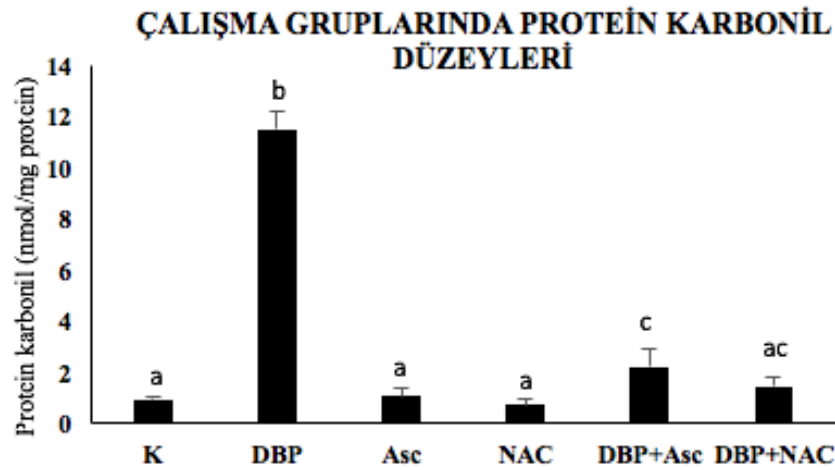
Çalışma gruplarında belirlenen karbonil düzeyleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. DBP grubunda kontrol grubuna kıyasla 12,5 kat artış saptanmıştır ($p<0,05$). DBP+NAC ve DBP+Askorbik asit gruplarının protein karbonil düzeylerinin DBP grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Bu da NAC ve Asc uygulamasının DBP'nin neden olduğu protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.6. Çalışma gruplarında protein karbonil aktivitesi.

Çalışma Grupları (n=3)	Protein karbonil (nmol/mg protein)
Kontrol	0,92±0,11 ^a
DBP	11,50±0,71 ^b
Asc	1,04±0,35 ^a
NAC	0,70±0,25 ^a
DBP+Asc	2,19±0,75 ^c
DBP+NAC	1,45±0,377 ^{ac}

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

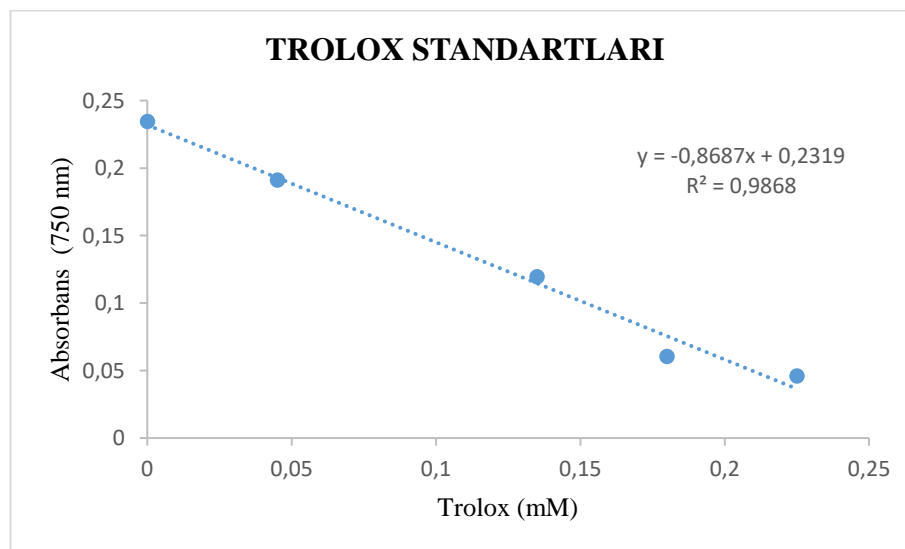


Şekil 4.7. Çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.6. Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Trolox standartlarına ait eğri Şekil 4.8.'de verilmiştir. Çalışma gruplarına ait total antioksidan kapasite düzeyleri Tablo 4.7. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir. DBP grubuna ait total antioksidan kapasite düzeyinde kontrol grubuna oranla yaklaşık 10,5 kat artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubuyla, Askorbik Asit, NAC, DBP+Askorbik Asit grubu kendi aralarında kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).



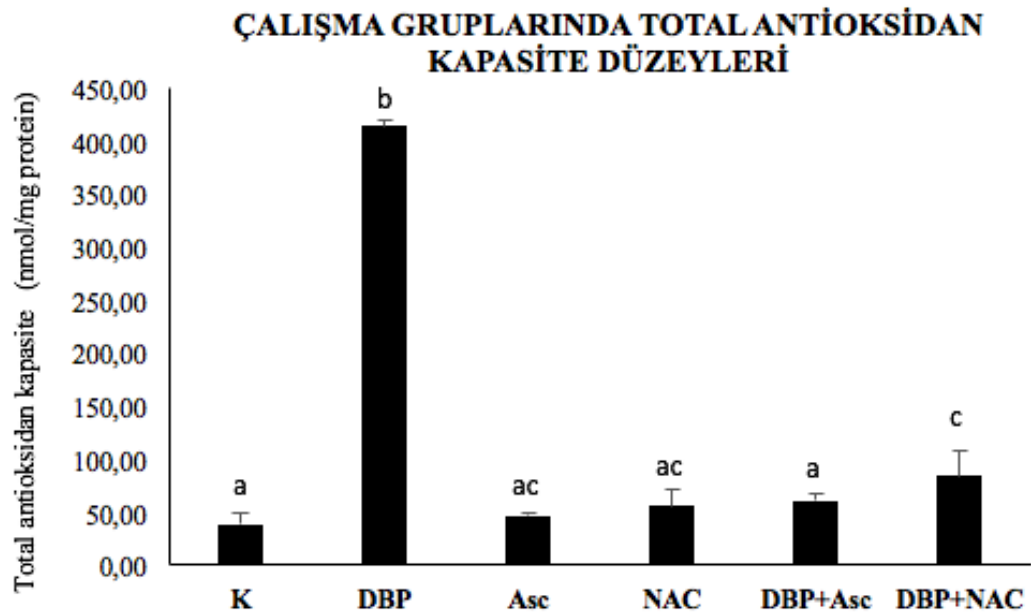
Şekil 4.8. Trolox standartları eğrisi.

Tablo 4.7. Çalışma gruplarında total antioksidan kapasite düzeyleri

Çalışma Grupları (n=3)	Total Antioksidan Kapasite (nmol/mg protein)
Kontrol	39,25±9,89 ^a
DBP	413,95±6,54 ^b
Asc	47,28±1,75 ^{ac}
NAC	55,71±15,75 ^{ac}
DBP+Asc	61,28±6,44 ^a
DBP+NAC	84,14±24,31 ^c

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.9.** Çalışma gruplarında total antioksidan kapasite düzeyleri

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden anlamlı ölçüde farklıdır (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Literatürde diğer ftalatların ve DBP'nin erkek üreme sistemi üzerine toksik etkilerinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte (8, 35), akciğer toksisitesinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma vardır (13,14). Yapılan az sayıda çalışma ftalatların akciğerde immünolojik parametrelerle ilişkisini değerlendirmiştir (40). Ayrıca, ftalatların özellikle astıma yol açıp açmadıklarına veya astımın nedenleri arasında yer alıp almadıklarına dair in vitro ve in vivo çalışmalar da yapılmıştır (39, 40). Ancak, özellikle işyerlerinde inhalasyonla maruziyet sonucu ortaya çıkabilecek olası toksik etkileri değerlendiren çalışmalar çok azdır ve mekanistik bir veri sunamamaktadır (58).

Ftalatlar, alveolar makrofajlarla bakterilerin yok edilmesine müdahale ederek veya proinflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu azaltarak akciğerlerdeki savunma mekanizmaları modüle eder. Bu nedenle maruz kalan duyarlı popülasyonlarda solunum yolu enfeksiyonlarının gelişimi üzerinde bu kimyasal maddelerin önemli etkiye sahip olabileceği ifade edilmiştir (28, 57). Astım, giderek artan prevalansa sahip hava yolunun aşırı duyarlılığı ile karakterize edilen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Birçok epidemiyolojik çalışmada, ftalat maruziyeti ile astım arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Daha önce yapılan deneysel çalışmalar enflamatuvar hücreler üzerinde adjuvan etkileri, immünomodülatör ve immünoşüpresif etkileri üzerine odaklanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, ftalatların hava yolu epitel hücreleri üzerine doğrudan etkiye sahip olabileceğini, kronik astımda hava yolunun yeniden şekillenmesine katkıda bulunabileceğini ve hastalık şiddeti ile doğrusal kuvvetli ilişki gösterebileceğini ortaya konmuştur (40, 144, 145).

İnsan bronşiyal düz kas hücreleri (BSMC) hava yolunun tonusunun modülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Astmatik bir hava yolunda bronşiyal düz kas hücreleri, salgı ve proliferasyonu arttırmakta ve bu durum subepitelyal bölgeye migrasyonlarına neden olmaktadır. BSMC miktarındaki değişkenlik, astımın şiddetiyle doğrudan ilişkilidir. Bronşiyal epitelyumun hava yolu işlevi ve bütünlüğünün korunmasında kritik düzenleyici rol oynadığı ve epiteldeki inflamasyonun artmasının astım gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. BSMC dahil olmak üzere epitel hücreleri, diğer sistemleri veya dokuları düzenlemek için çeşitli immünolojik faktörler ve sitokinler/kemokinler üretebilirler. Ftalik asit esterlerinin

epitel hücreler tarafından IL-8 üretiminde artışa ve bunun sonucunda BSMC proliferasyonuna ve migrasyona neden olduğu ifade edilmiştir. Kuo ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada insan bronşiyal epitel hücre hatları (BEAS-2B ve HBE135-E6E7) kullanılmış, kültür ortamına 5 µM DBP uygulanmış ve 6 saatlik maruziyet sonucunda IL8 üretiminde artışa ve hücrelerde hiperplaziye neden olduğu gösterilmiştir. Etkileri antagonize etmek için maruziyetten sonra zencefilin aktif bileşikleri olan 6-shogaol, 6-gingerol, 8-gingerol ve 10-gingerol 5 µM dozda kültür ortamına eklenmiş ve 6-shogaol bileşiğinin DBP kaynaklı proliferasyon ve migrasyonda en güçlü inhibitör etkinlik sergilediği gösterilmiştir (146).

Sıçanlarda yapılan çalışmalar, DBP'ye inhalasyon ile düşük, oral yolla alımla ise daha fazla toksik etkilerin oluşabileceğini göstermiştir (46). Yapılan az sayıda çalışmada ise, sıçanlara oral DBP uygulamasının akciğerlerde displaziye ve yapısal bozukluklara neden olduğu belirlenmiştir (66,67). Bazı çalışmalarda ise, DBP'nin akciğerlerde CYP450'ler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (75,76).

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, tez çalışmasının verileri üç kısımda tartışılacaktır:

1. Sitotoksikite Bulguları

Ftalatların genelde apoptoz kaynaklı hücre ölümüne yol açabilecekleri belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda ftalat uygulamasının kaspaz yolaklarını tetiklediği ve hücre siklus proteinlerinin ekspresyonlarını arttırarak hücreleri apoptoza götürdüğü sonucu elde edilmiştir. Diğer taraftan, son yıllarda yapılan çalışmalarda ftalatların otofajiye de yol açabileceklerine dair kanıtlar elde edilmiştir (147,148)

Literatürde DBP'nin A549 hücrelerindeki olası toksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan tez çalışmasında, A549 hücrelerine DBP 0,25-15 mM konsantrasyon aralığında uygulanmış ve hücreler 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. DBP uygulanan hücrelerin canlılığı kontrol hücrelerine göre % canlılık olarak belirlenmiştir. IC₅₀ değeri 2,139 mM ve IC₃₀ değeri 1,186 mM olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü üzere DBP A549 hücrelerinde ancak mM konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermektedir. Daha önce DEHP ile yapılan in vitro çalışmalarda, bu ftalat türevinin Leydig ve LNCaP hücrelerinde mM konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Ancak, DEHP'in primer

metaboliti olan MEHP'in ise, ana bileşikten 1000 kat düşük (μM) konsantrasyonlarda sitotoksik olabileceği gözlenmiştir (19, 147, 149). Diğer taraftan, DU145 ve PC3 prostat hücreleriyle yapılan bir çalışmada, DU145 hücrelerinde DBP'nin DIBP'den düşük, BBP'den ise daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği; pC3 hücrelerinde ise DMP ve DEP'den daha düşük toksisite oluşturduğu belirlenmiştir (150).

Farelerden elde edilen peritoneal makrofajlar üzerinde yapılan bir çalışmada, DBP hücre kültürlerine 0, 1, 5, 10, 50 ve 100 μM dozlarda 24 saat boyunca uygulanmıştır. DBP'nin 50 ve 100 μM dozlarda makrofajlarda sitotoksik etki gösterdiği, makrofajların antijen sunma kapasitelerini, immünojenisitelelerini ve sitokin üretimlerini düşürdüğü belirlenmiştir (151).

DBP'nin insan embriyo akciğer (L-132) hücrelerinden türetilen kültüre alınmış epitel benzeri hücrelerdeki etkisinin araştırıldığı çalışmada kültür ortamına 40 $\mu\text{g/ml}$ dozunda DBP eklenmesiyle hücre büyümesinin baskılandığı, hücre çeperlerinde morfolojik değişim ve sitoplazmada birçok lipid damlacıklarının oluştuğu ve hücre sitozolünde kolesterol ve protein seviyesi değişmezken trigliseritin yüksek oranda akümüle olduğu gözlenmiştir (152).

Sıçan embriyonik eklem tomurcuk hücrelerinde yapılan bir çalışmada, iki farklı boyama tekniği kullanılarak DBP'nin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Nötral kırmızı alımı yönteminde DBP'nin IC_{50} değeri 25,54 $\mu\text{g/ml}$ (91,75 μM) bulunurken, alcian mavi boyaması ile IC_{50} değeri 21,21 $\mu\text{g/ml}$ (76,20 μM) bulunmuştur. Çalışmanın sonunda DBP'nin sıçanlarda embriyonik eklem tomurcuk hücrelerinin bölünmesini engelleyerek gelişimsel toksisiteye yol açabileceği ve oluşturduğu sitotoksitenin ise oksidatif stres kaynaklı olabileceği ifade edilmiştir (153).

A549 hücrelerinin metabolik kapasiteleri karaciğer hücreleri kadar yüksek değildir ve DBP'nin MBP'ye dönüşümünü çok etkin sağlayamayacakları düşünülmektedir. Bu nedenle, MBP'nin sitotoksisite araştırılması yapılmamıştır.

2. Hücre içi ROS düzeyleri

Hücre içi ROS düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$; tümü). Ancak, DBP uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı olmayan (%4,5) bir artış olduğu görülmüştür. Bu artış Asc veya NAC

koruyucu uygulaması ile engellenmiştir. Fare spermatozoidlerinden türetilen GC-2 hücrelerinde Zhang ve ark. (2019)'nın yaptığı bir çalışmada, DBP'nin aslında hücre içi ROS düzeylerini arttırabileceği bulunmuştur. Ancak protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum (ER) kinaz (PERK) proteinin özellikle mitokondriyal etkiden kaynaklı hasarı baskılamak için ROS düzeylerini düşürmek için antioksidan bir yolak olan nükleer faktör eritrosit ilişkili faktör 2/antioksidan duyarlı eleman (Nrf2/ARE) yolağını aktive ederek hücre içi ROS düzeylerini düşürdüğü belirtilmiştir (154). Aynı yolak, A549 hücreleri için de geçerli olabilir ve ROS düzeylerindeki istatistiksel olmayan artışın nedeni Nrf2/ARE yolağının aktivasyonu olabilir. Zhang ve ark. (2016)'nın yaptığı bir diğer çalışmada ise, GC-2 hücrelerinde DBP'nin yol açtığı ROS artışının, ER stresinin ve otofajinin melatonin uygulaması ile ortadan kaldırılabilirdiği belirlenmiştir (148).

Albaladejo ve ark. (2017) tarafından insan plasental karsinom (JEG-3) hücre hattında DBP ve diğer plastizer ve endokrin bozucu ajanlarının (BPA, BBP, DEHP, nonifenoller) sitotoksikite ve ROS üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada DBP uygulanmasının en az sitotoksik etkiyi yarattığı ($IC_{50}=466\pm63 \mu M$) ve DBP dahil uygulanan hiçbir ftalatın ROS artışına yol açmadığı belirlenmiştir. Ancak, DBP'nin östrojen biyosentezinde anahtar bir enzim olan ve fetal androjenlerin östrojenlere aromatisasyonunu sağlayan P450 aromataz enzimin aktivitesini azalttığı görülmüştür (155).

Fare nörokortikal nöronlarında yapılan bir çalışmada ise, DBP'nin 3-48 sa uygulama süreleri ve 10-100 nM konsantrasyonlarda ROS'u zaman ve doz bağımlı olarak indüklediği, LDH ve kaspaz 3'ü aktive ettiği belirlenmiştir (156).

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler ile Zhang ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmadan elde edilen sonuçlar paralel bulunmuş, DBP ile görülen hücre içi ROS artışının antioksidanlar tarafından önlenebildiği saptanmıştır. Diğer taraftan, *in vivo* araştırmalarda DBP'nin oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir. Kunming (KM) farelere DBP uygulanarak yapılan bir çalışmada, oral olarak 28 gün 50 mg/kg DBP'nin böbrek ve karaciğerde ROS ve MDA düzeylerini attırdığı belirlenmiştir (157).

3.Oksidatif Stres Parametreleri

Bu tez çalışmasında, A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre DBP grubunda MDA düzeylerinde yaklaşık 10,4 kat artış gözlenmiştir. DBP grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında da DBP grubunun MDA düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Asc, NAC, DBP+Asc ve DBP+NAC uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Hücre hatlarına koruyucu madde uygulamasının DBP'nin lipit peroksidasyon üzerine etkisini DBP grubuna göre azalttığı gözlenmiştir.

A549 hücrelerinde DBP grubuna ait total GSH düzeylerinin kontrol grubuna oranla %88 oranında ve anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Diğer gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuç, koruyucu madde uygulamasının DBP'nin GSH düzeylerinde neden olduğu azalmayı engellediği yönünde yorumlanmıştır.

Protein oksidasyon düzeyleri incelendiğinde, A549 hücrelerinde DBP grubunda kontrol grubuna kıyasla 12,5 kat artış saptanmıştır ($p<0,05$). DBP+NAC ve DBP+Asc gruplarının protein karbonil düzeylerinin DBP grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Bu sonuç ise NAC ve Asc uygulamasının DBP'nin neden olduğu protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

A549 hücre hattında, DBP grubuna ait TAOC düzeyinde kontrol grubuna oranla yaklaşık 10,5 kat bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubuyla, Acs, NAC ve DBP+Asc grubu kendi aralarında kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). DBP+NAC grubunda ise, DBP grubuna göre düşük ancak tüm diğer gruplara göre yüksek TAOC düzeyleri saptanmıştır. DBP ile oluşan muhtemel oksidatif stresin hücre içi farklı mekanizmalar ve yolakları (Nrf/ARE yolağı gibi) uyararak TAOC düzeylerini arttırmış olabileceği düşünülebilir. Ancak, bu konuda mekanistik veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

DBP'nin oksidatif stres oluşturuıcı etkileri üzerinde literatürde sınırlı sayıda in vivo ve in vitro çalışma bulunmaktadır. Elde edilen bulgular DBP'nin oksidatif strese yol açtığı yönündedir. DBP ile birlikte farklı antioksidanların uygulaması, DBP kaynaklı oksidatif stresi azaltmaktadır.

Yan ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada KM farelere oral olarak 5, 50, 125 mg/kg/gün dozunda DBP uygulamasının ardından nörotoksisite ve anksiyete benzeri davranışlar sergilediklerei saptanmıştır. ROS, glutatyon, MDA düzeyleri antioksidan bir madde olan mangiferin (MAG, 50 mg/kg/gün) ve DBP'nin birlikte uygulandığı grupta ölçülmüştür. MAG'ın DBP ile birlikte uygulandığı grupta DBP uygulanan gruba göre anksiyete benzeri davranışlarda düzelmeye neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, DBP maruziyeti ile oksidatif stres kaynaklı nörotoksisite gözlenirken, MAG kullanımıyla toksisite belirtilerinde azalma olduğu rapor edilmiştir (158).

Wang ve ark. (2019) tarafından DBP ve dalak hasarı oluşumu arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, 21 gün boyunca farelere 50 g/kg dozda DBP ve/veya 50 mg/kg/gün dozunda E vitamini ve 2,5 mg/kg/gün kurkumin oral olarak uygulanmıştır. Dalak homojenatında ROS, GSH, TAOC, IL-1B, TNF- α , kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeyleri incelenmiştir. Sonuçlar; 50 mg/kg/gün dozda DBP maruziyetinin dalakta histopatolojik değişikliklere ve oksidatif stresle ilişkili apoptoz ve inflamasyona neden olduğunu göstermiştir. DBP ile birlikte E vitamini veya kurkumin uygulamasının DBP kaynaklı oksidatif stresi antagonize edebileceği ve böylece dalak hasarını azaltabileceği belirtilmiştir (159).

Literatürden elde edilen veriler ışığında, DBP'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak oksidatif strese yol açabildiği görülmektedir. Ancak, DBP'nin pimer toksisite mekanizmasının oksidatif stres olup olmadığının belirlenmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. DBP'nin toksisitesi altında yatan moleküler yolların değerlendirilebilmesi için mekanistik çalışmaların yapılması gereklidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında A549 hücre hattında DBP'nin neden olabileceği sitotoksosite ve oksidatif stres değerlendirilmiştir. Ayrıca, tez kapsamında Asc ve NAC'ın oluşan bu toksik etkilere karşı olası koruyucu etkileri belirlenmiştir. DBP'nin neden olduğu sitotoksosite, DBP uygulaması sonrası hücre içi ROS düzeyleri ve oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür. Asc ve NAC varlığında da değerlendirilmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. A549 hücre hattında DBP için IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,186 mM ve 2,139 mM bulunmuştur.
2. Hücre içi ROS üretimi kontrol grubuna göre DBP uygulanan grupta %4,5 daha fazladır. ROS değerlerine koruyucuların etkisi değerlendirildiğinde, DBP+ Asc uygulanan grupta DBP uygulanan gruba göre %10'luk, DBP+ NAC grubunda ise %2'lik azalma meydana gelmiştir.
3. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri DBP grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (~10,4 kat) artış göstermiştir. DBP ile birlikte Asc ve NAC uygulanan gruplarda DBP uygulanan gruba göre, MDA düzeylerinde sırasıyla %83,5 ve %78 azalma meydana gelmiştir. Dolayısıyla, antioksidan uygulamalarının DBP'nin lipit peroksidasyonunda neden olduğu artışı önlediği belirlenmiştir.
4. Total GSH düzeylerinin DBP uygulanan grupta kontrol grubuna göre %88 oranında anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Total GSH düzeyleri tek başına DBP uygulanan gruba göre, DBP+Asc uygulanan grupta 11,5 kat; DBP+NAC uygulanan grupta ise 11 kat yüksek bulunmuştur (p<0,05, her iki grupta da, DBP grubuna göre). Asc veya NAC uygulamasının DBP'nin yol açtığı total GSH düzeyindeki düşüşü engellemiştir.
5. Protein oksidasyonunun bir göstergesi olan protein karbonil düzeylerinde DBP uygulanan grupta, kontrol grubuna göre 12,5 kat artış meydana gelmiştir (p<0,05). DBP+Asc ve DBP+NAC gruplarındaki protein karbonil düzeyinin DBP grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir. Koruyucu madde uygulamasının DBP'nin neden olduğu protein oksidasyonunu azalttığı anlaşılmıştır.

6. Total antioksidan kapasite düzeylerinin DBP grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (~10,5 kat) arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeni, DBP'nin neden olduğu oksidatif strese karşı hücrelerin TAOC düzeylerini arttırması ve oluşan oksidatif strese kısa süreli bir yanıt vermesi olduğu düşünülmüştür. DBP+Asc uygulanan grupta DBP grubuna göre 6,75 kat; DBP+NAC uygulanan grupta ise 4,9 kat azalma meydana gelmiş ve her iki uygulamayla da DBP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında; çevresel, mesleki ve gündelik yaşamda sıkça maruz kalınan bir EDC olan DBP'nin A549 hücrelerinde hücre canlılığında azalmaya yol açtığı; ancak bunu mM konsantrasyonlarda yapabildiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, DBP hücre içi ROS düzeyinde, lipid peroksidasyonda, total GSH ve protein oksidasyon düzeylerinde artışa yol açmıştır. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde ise, TAOC düzeylerinde görülen artışın artan oksidatif hasara karşı bir yanıt olduğu söylenebilir. Diğer taraftan antioksidan olarak Asc veya NAC uygulamalarının DBP kaynaklı oksidan hasara karşı hücreyi en azından parsiyel olarak koruduğu sonucuna varılmıştır.

Bilindiği üzere, çocukların erişkinlere göre tükettikleri gıda miktarı tüketilen/ağırlık gıda oranı düşünüldüğünde çok fazladır. Ayrıca, özellikle küçük çocukların akciğerleri daha hassastır ve soluk alıp verme oranları, kalp atım hızları ve kalp debileri erişkinlerden daha yüksektir. Çocukların DBP'ye başta gıda olmak üzere birçok kaynaktan maruziyeti söz konusu olabilir. DBP'ye iç ve dış mekan havasından, kırtasiye malzemelerinden, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinden de çocukların maruz kalabileceği düşünüldüğünde, maruziyetlerini azaltmamız gerektiği söylenebilir. Diğer taraftan, DBP'ye iş yeri maruziyeti ile de akciğerlerin etkilenmesi söz konusu olabilir. Özellikle DBP üreten veya son ürünlerinde DBP bulunan kozmetik ve benzeri malzeme üreten işyerlerinde çalışan işçilerin korunması için hem işçilerin, hem de işverenlerin oldukça dikkatli olması gerekmektedir. Bir başka ciddi maruziyet ise manikürcülerdir. Bu kişiler işyeri havasından yüksek miktarda DBP ve benzeri ftalatlara maruz kalabilmektedir. Ayrıca, yoğun kozmetik ve kişisel bakım ürünü kullanan bireylerin de DBP maruziyetleri yüksek olabilir. Bu nedenle,

düzenleyici kuruluşlar da özellikle mesleki maruziyet konusunda alınacak tedbirleri iyi belirlemeli ve daha önce belirledikleri sınır değerleri gözden geçirmelidir.

Tez kapsamında Asc ve NAC'ın DBP toksisitesine karşı koruyucu oldukları belirlenmiştir. Bu durumda özellikle iyi beslenen ve yeteri kadar Asc ve sistein içeren gıdaları alan bireylerin DBP'nin toksik etkilerinden korunabilecekleri söylenebilir. Ayrıca, takviye olarak uygun miktarlarda Asc veya NAC almak da koruyucu olabilir. Ancak, insanlarda inhalasyonla DBP'ye maruz kalınması durumunda nasıl toksik etkiler oluşabileceğine dair literatürde çok az sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalarda antioksidanların etkileri değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, DBP ve diğer ftalatlarla başta işyeri havasından olmak üzere, inhalasyonla maruziyet ile ortaya çıkabilecek toksik etkilerin değerlendirildiği olgu-kontrol ve epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. DBP'nin akciğer toksisitesinin altında yatan olası mekanizmaların ve etkilenen biyolojik yolların ayrıntılı olarak değerlendirilebilmesi için daha çok mekanistik araştırmaya gerek olduğu aşikardır.

7. KAYNAKLAR

1. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrin disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015;40(1):241-258.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM ve ark. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. 2009;30(4):293-342.
3. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environmental Health Perspectives*. 2011;10:1396-1402.
4. Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM ve ark. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*. 2006; 223:144–155.
5. Wittassek H, Koch M, Angerer J, et al. Assessing exposure to phthalates – The human biomonitoring approach. *Matthias Molecular Nutrition and Food Research*. 2011;55(1):7–31.
6. Zonga T, Lai L, Hub J ve ark. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate disrupts placental growth and development in pregnant mice. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;297:25–33.
7. Braun JM, Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *National Review Endocrinology*. 2017;13(3):161-173.
8. Sifakis S, Androutopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017;51:56-70
9. Shafei A, Ramzy MM, Hegazy AI, Husseny AK, El-hadary UG, Taha MM ve ark. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene*. 2018;647:235-243.
10. Bekö G, Callesen M, Weschler CJ, Toftum J, Langer S, Sigsgaard T ve ark. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environmental Research*. 2015;137:432-439.
11. Robinson L, Miller R. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Current Environmental Health Reports*. 2015;2(4):379-387.
12. Jaakkola JJ, Knight TL. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(7):845-53.
13. Jepsen KF, Abildtrup A, Larsen ST. Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. *Toxicology In Vitro*. 2004;18(3):265-9
14. Rafael-Vázquez L, García-Trejo S, Aztatzi-Aguilar OG, Bazán-Perkins B, Quintanilla-Vega B. Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) and monoethylhexyl phthalate (MEHP) promotes the loss of alveolar epithelial phenotype of A549 cells. *Toxicology Letters*. 2018;294:135-144.
15. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*. 2005;62(11):806-818.
16. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005;54(8):2460-2470.
17. Tsai MJ, Kuo PL, Ko YC. The association between phthalate exposure and asthma. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2012;28:28-36.
18. Mezcuca M, Martínez-Uroz MA, Gómez-Ramos MM, Gómez MJ, Navas JM, Fernández-Alba AR. Analysis of synthetic endocrine-disrupting chemicals in food: a review. *Talanta*. 2012;100:90-106.

19. Erkekoğlu P, Rachidi W, De Rosa V, Giray B, Favier A, Hincal F. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;1549(4):559-566.
20. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, Hincal F. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;248(1):52-62.
21. Nakajima T, Hopf NB, Schulte PA. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 2000 [Internet]. [Erişim tarihi 25.12.2019]. Erişim adresi : <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-18.pdf>.
22. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *International Journal of Andrology*. 2008;31(2):131-138.
23. Gao D, Li Z, Wang H, Liang H. An overview of phthalate acid ester pollution in China over the last decade: Environmental occurrence and human exposure. *Science of the Total Environment*. 2018;645:1400-1409.
24. Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, et al. Use of di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono (2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Perspectives*. 2005;113(9):1222.
25. European Commission, Opinion on the safety of medical devices containing DEHP - plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk 2008 [Internet]. [Erişim tarihi 27.12.2019]. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf.
26. Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environment International*. 2011;37(5):893-898.
27. Li HL, Ma WL, Liu LY, Zhang Z, Sverko E, Zhang ZF ve ark. Phthalates in infant cotton clothing: Occurrence and implications for human exposure. *Science of the Total Environment*. 2019;683:109–115.
28. Wang Y, Zhu H, Kannan K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*. 2019;7(2):21-49.
29. Food and Drug Administration, Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices 2003 [Internet]. [Erişim tarihi 20.10.2019]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../UCM080457.pdf>.
30. Rudel RA, Perovich LJ. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*. 2009;43(1):170-181.
31. Carlstedt F, Jönsson B, Bornehag CG. PVC flooring is related to human uptake of phthalates in infants. *Indoor Air*. 2013;23(1):32-39.
32. Bajkin I, Bjelica A, Ičin T, Dobrić V, Kovačev-Zavišić B, Medić-Stojanoska M. Effects of phthalic acid esters on fetal health. *Medicinski Pregled*. 2014;67(5-6):172-175.
33. Erkekoğlu P, Rachidi W, Rosa VD, Giray B, Favier A, Hincal F. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49(4):559-566.
34. Erkekoğlu P, Gümüşel B. Genotoxicity of phthalates. *Journal Toxicology Mechanism and Methods*. 2014;24(9):616-626.
35. Giulivo M, Alda ML, Capri E, Barcelo D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*. 2016;151:251-264.

36. Upson K, Sathyanarayana S, Roos AJ, Thompson ML, Scholes D, Dills R ve ark. Phthalates and risk of endometriosis. *Environmental Research*. 2013;126:91-97.
37. Durmaz E, Ozmert EN, Erkekoğlu P, Giray B, Derman O, Hıncal F ve ark. Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics*. 2010;125(1):122-129.
38. Durmaz E, Erkekoğlu P, Asci A, Akçürin S, Bircan İ, Koçer B. Urinary phthalate metabolite concentrations in girls with premature thelarche. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;59:172-181.
39. Ait BY, Shibata E, Saito I, Araki A, Kanazawa A, Morimoto K ve ark. Exposure to house dust phthalates in relation to asthma and allergies in both children and adults. *Science of the Total Environment*. 2014;485:153-163.
40. Li MC, Chen CH, Guo YL. Phthalate esters and childhood asthma: A systematic review and congener-specific meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2017;229:655-660.
41. The Weight of the Evidence on DEHP: Exposures are a Cause for Concern, Especially During Medical Care [Internet]. 2009 [Erişim Tarihi 04.12.2019]. Erişim adresi: https://noharm.org/sites/default/files/lib/downloads/pvc/Weight_of_Evidence_DEHP.pdf
42. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Ntp cerhr mon*. 2006(18):v, vii-7, II-iii-xiii passim.
43. ATSDR, Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [Internet]. [Erişim tarihi 09.11.2019]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=684&tid=65>.
44. NIOSH, Di(2-ethylhexyl) Phthalate [Internet]. [Erişim tarihi 15.11.2019]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0271.html>.
45. Resmi Gazete, Sanayi ve Ticaret Bakanlığı. Bazı Tüketici Ürünlerinin Tehlikeli Kimyasal Madde İçeriğine Yönelik Piyasa Gözetimi ve Denetimine İlişkin Tebliğ [Internet]. 2011 [Erişim tarihi 16.12.2019], Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-9.htm>.
46. Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Di-n-Butyl Phthalate [Internet]. 2001. [16.10.2019]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf>.
47. Lorz PM, Towae FK, Enke W, Jackh R, Bhargava N, Hillesheim W. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH;2007.
48. Frederiksen H, Shakkebeak NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007;51:899-911.
49. Abdeldaiem MM, Utrilla JR, Perez RO, Mendez-Diaz JD, Sanchez-Polo M. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies – A review. *Journal of Environmental Management*. 2012;109:164-178.
50. Ali MI, microbial degradation of polwinyl chloride plastics [Internet].2011. [Erişim Tarihi 15 12.2019]. Erişim adresi: <http://pr.hec.gov.pk/jspui/bitstream/123456789/6612/1/3362H.pdf>51.
51. Craig ZR, Ziv-Gal A. Pretty Good or Pretty Bad? The Ovary and Chemicals in Personal Care Products. *Toxicological Sciences*. 2018;162(2):349-360.
52. Koch HM, Christensen KL, Harth V, Lorber M, Brüning T. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Archives of Toxicology*. 2012;86(12):1829-1839.
53. Australian Department of Public Health. Dibutyl phthalate. [Internet]. 2017[Erişim Tarihi 04.10.2019]. Erişim adresi: <https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/factsheets/chemical-name/dibutyl-phthalate-dbp>
54. Broe A, Ennis ZN, Pottgard A, Hallas J, Ahern T, Damkier P. Population Exposure to Phthalate-containing Drugs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017;121(3):153-158.
55. Nassan F, Korevaar TM, Coull BA, Skakkebaek NE, Krawetz SA, Estill M ve ark. Dibutyl-Phthalate Exposure from Mesalamine Medications and Serum Thyroid Hormones in Men. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2019;222(1):101-110.

56. Kıralan M, Toptancı İ, Yavuz M, Ramadan MF. Phthalates levels in cold-pressed oils marketed in Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. doi: 10.1007/s11356-019-07162-y.
57. Batlle DM, Pena OM, Huff RD, Randhawa A, Carlsten C, Bolling AK. Dibutyl phthalate modulates phenotype of granulocytes in human blood in response to inflammatory stimuli. *Toxicology Letters*. 2018;296:23-30.
58. Kwapniewski R, Kozaczka S, Silva MJ, Calafat AM, Duty SM. Occupational Exposure to Dibutyl Phthalate Among Manicurists. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2008;50(6):705-711.
59. Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AN, Kongshoj B, Skakkebeak NE, Wulf HC. Systemic Uptake of Diethyl Phthalate, Dibutyl Phthalate, and Butyl Paraben Following Whole-Body Topical Application and Reproductive and Thyroid Hormone Levels in Humans. *Environmental Science and Technology*. 2007;41:5564-5570.
60. Simoneau C, Eede LV, Valzacchi S. Identification and quantification of the migration of chemicals from plastic baby bottles used as substitutes for polycarbonate. *Food Additives and Contaminants*. 2012;29(3):469-480.
61. Guerranti C, Martellini T, Fortunati A, Scodellini R, Cincinelli A. Environmental pollution from plasticizer compounds: Do we know enough about atmospheric levels and their contribution to human exposure in Europe?. *Environmental Science & Health*. 2019;8:1-5.
62. Cheng J, Wan Q, Ge J, Fenf F, Yu X. Major factors dominating the fate of dibutyl phthalate in agricultural soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;183:109569.
63. European Chemicals Agency (ECHA), Review Of New Available Information for dibutyl phthalate (DBP) [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 02.11.2019]. Erişim adresi: https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dbp_echa_review_report_2010_6_en.pdf/64b1253c-9e03-48dd-8546-cb2bee3c3646.
64. European Commission, Commission Delegated Directive amending Annex II to Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council as regards the list of restricted substances [Internet]. 2015 [Erişim tarihi 14.11.2019]. Erişim Adresi: https://eur-lex.europa.eu/eli/dir_del/2015/863/oj#document1.
65. Jiang JT, Sun WL, Jing YF, Liu SB, Ma Z, Hong Y ve ark. Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate induces anorectal malformations in male rat offspring. *Toxicology*. 2011;290(3):322-326.
66. Liu ZH, Li EH, Xu DL, Sun WL, Hong Y, Zhao W ve ark. Genetic research and structural dysplasia assessment of anorectal malformations in neonatal male rats induced by di(n-butyl) phthalate. *Environmental Toxicology*. 2016;31(3):261-268.
67. Zhu YP, Li EH, Sun WL, Xu DL, Liu ZH, Zhao W ve ark. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces combined anorectal and urogenital malformations in male rat offspring. *Reproductive Toxicology*. 2016;61:169-176.
68. Marsman DS, NTP Technical Report on Toxicity Studies of Dibutyl Phthalate Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice [Internet]. 1995. [16.10.2019]. Erişim adresi: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st_rpts/tox030.pdf.
69. Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, Sar M, Gaido KW, Foster P. Quantitative Changes in Gene Expression in Fetal Rat Testes following Exposure to Di(n-butyl) Phthalate. *Toxicological Sciences*. 2003;73(2):431-441.
70. Carran M, Shaw IC. New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increased incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children. *The New Zeland Medical Journal*. 2012;125(1358):52-63.
71. Gao CJ, Wang F, Shen HM, Kannan K, Guo Y. Feminine Hygiene Products-A Neglected Source of Phthalate Exposure in Women. *Environmental science and technology*. 2020;54(2):930-937.

72. Xie X, Deng T, Duan J, Ding S, Yuan J, Chen M. Comparing the effects of diethylhexyl phthalate and dibutyl phthalate exposure on hypertension in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;174:75-82.
73. Lee W, Cho JH, Lee Y, Lee S, Kim DH, Ha S ve ark. Dibutyl phthalate impairs neural progenitor cell proliferation and hippocampal neurogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;129:239-248.
74. Xia H, Chi Y, Su M, Cao Y, Song P, Li X ve ark. Metabolomic evaluation of di-n-butyl phthalate-induced teratogenesis in mice. *Metabolomics*. 2011;7:559-571.
75. Chen B, Hu X, Zhen X, Hu GX. Effects of dibutyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate with their metabolites on CYP2C9*1 and CYP2C19*1 activities in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;160:195-201.
76. Walseth F, Toftgard R, Nilsen OG. Phthalate esters I: Effects on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung, serum enzymatic activities and serum protein levels. *Archives of Toxicology*. 1982;50(1):1-10.
77. Walseth F, Nilsen OG. Phthalate esters. II. Effects of inhaled dibutylphthalate on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung. *Archives toxicology*. 1984;55(2):132-136.
78. Chou BA M, Dhingra MD N, Strugar TL. Contact Sensitization to Allergens in Nail Cosmetics. *Dermatitis*. 2017;28(4):231-240.
79. Zhu YP, Chen L, Wang XJ, Jiang QH, Bei XY, Sun W ve ark. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces renal fibrosis in adult rat offspring. *Oncotarget*. 2017;8(19):31101-31111.
80. Dobrzynska MM, Tyrikel EJ, Hernik A, Derezińska E, Goralczyk K, Ludwicki JK. The effects of di-n-butyl phthalate on the somatic cells of laboratory mice. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2010;61(1):13-19.
81. Venturelli AC, Meyer KB, Fischer SV, Kita DH, Philipsen RA, Morais RN ve ark. Effects of in utero and lactational exposure to phthalates on reproductive development and glycemic homeostasis in rats. *Toxicology*. 2019;421:30-40.
82. U.S. Environmental Protection Agency Chemical Assessment Summary National Center for Environmental Assessment, Dibutyl phthalate; CASRN 84-74-2 [Internet]. 1999. [12.10.2019]. Erişim adresi: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0038_summary.pdf
83. Perez C, Soderholm SC. Some Chemicals Requiring Special Consideration when Deciding Whether to Sample the Particle, Vapor, or Both Phases of an Atmosphere. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 2011. <https://doi.org/10.1080/1047322X.1991.10387978>.
84. Kılıç C. Akciğerlerin Anatomisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*.2011. doi: 10.4328/JCAM.964
85. National Cancer Institute, Anatomy of the Lung, [Internet]. [28.12.2019]. Erişim adresi: <https://training.seer.cancer.gov/lung/anatomy/>
86. National Cancer Institute, Introduction to Lung Cancer [Internet]. [28.12.2019]. Erişim adresi: <https://training.seer.cancer.gov/lung/intro/>
87. Taş İ, Zhou R, Park SY, Yang Y, Gamage C, Son YJ ve ark. Inflammatory and tumorigenic effects of environmental pollutants found in particulate matter on lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2019;59:300-311.
88. Martin A, Sarkar A. Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*. 2017. doi: 10.1080/17435390.2017.1366574
89. WHO, World Health Organization Model List of Essential Medicines. [Internet].2019 [Erişim tarihi 21.11.2019]. Erişim adresi: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf>.

90. Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*. 2016;22(6):463-493.
91. Vitamin C. [Internet].2019. [Erişim tarihi 23.10.2019]. Erişim adresi: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>.
92. Moskowitz A, Andersen LW, Huang D, Berg KM, Grssestreuer AV, Marik PE ve ark. Ascorbic acid, corticosteroids, and thiamine in sepsis: a review of the biologic retinole and the present state of clinical evaluation. *Critical Care*. 2008;22:283.
93. Ascorbic Acid. [Internet].2019. [Erişim tarihi 25.12.2019]. Erişim adresi: <https://www.drugs.com/mtm/ascorbic-acid.html>.
94. The National Academies of Sciences Engineering Medicine, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. [Internet]. 2000. [Erişim tarihi 20.12.2019]. Erişim adresi: <https://www.nap.edu/read/9810/chapter/7>.
95. Oregon State University.Vitamin C [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 04.01.2020]. Erişim adresi: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-C>.
96. Stuart M, Kouimtzi M, Hill SR. WHO Model Formulary. Geneva;WHO:2008.Chapter 27, Vitamins and minerals; s.497.
97. Douglas RM, Hemila H, Chalker E, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000980.pub3>.
98. Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0056803.
99. Ascorbic acid Pregnancy and Breastfeeding Warnings. [Internet]. 2016 [Erişim Tarihi 17.12.2019]. Erişim adresi: <https://www.drugs.com/pregnancy/ascorbic-acid.html>.
100. Chao MW, Erkekoglu P, Tseng CY, Ye W, Trudel LJ, Skipper PL, Tannenbaum SR, Wogan GN. Protective effects of ascorbic acid against the genetic and epigenetic alterations induced by 3,5-dimethylaminophenol in AA8 cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2015;35(5):466-477.
101. Botelho GG, Bufalo AC, Boareto AC, Muller JC, Morais RN, Martino-Andrade AJ ve ark. Vitamin C and resveratrol supplementation to rat dams treated with di(2-ethylhexyl) phthalate: impact on reproductive and oxidative stress end points in male offspring. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 2009;57(4):785-793.
102. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, ve ark. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biochemical Journal*. 2002;365:849-856.
103. Bae H, Jeong CH, Cheng WN, Hong K, Seo HG, Han SG. Oxidative stress-induced inflammatory responses and effects of N-acetylcysteine in bovine mammary alveolar cells. *Journal of Dairy Research*. 2017;84(4):418-425.
104. Maddawy ZK, El-Sayed YS. Comparative analysis of the protective effects of curcumin and N-acetyl cysteine against paracetamol-induced hepatic, renal, and testicular toxicity in Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2017. doi:10.1007/s11356-017-07503.
105. Siddarth M, Chawla D, Raizada A, Wadhwa N, Banerjee BD, Sikka M. Lead-induced DNA damage and cell apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cell: Attenuation via N-acetyl cysteine and tannic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2018. doi: 10.1002/jbt.22038.
106. Fischer J, Ganellin CR. N-Acetyl cysteine. *Analogue-based Drug Discovery*. Weinheim: Wiley;2006.
107. Aaron Leonard Sheffner. Mucoytic-nu-acylated sulfhydryl compositions and process for treating animal mucus", US patent 3091569. ABD; Mead Johnson;1963.

108. Acetylcysteine [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 03.12.2020]. Erişim adresi: <https://www.drugs.com/monograph/acetylcysteine.html>.
109. Pırabbası E, Shahar S, Manaf ZA, Rajab NF, Manap RA. Efficacy of Ascorbic Acid (Vitamin C) and N-Acetylcysteine (NAC) Supplementation on Nutritional and Antioxidant Status of Male Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients. *Journal of Nutritional Science Vitaminology*. 2016;62(1):54-61.
110. Duijvestijn YCM, Brand PLP. Systematic review of N-acetylcysteine in cystic fibrosis. *Acta Paediatrica*. 1999;88:38-41.
111. Salamon S, Kramar B, Marolt TP, Poljsak B, Milisav I. Medical and Dietary Uses of N Acetylcysteine. *Antioxidants*. 2019;8(5):111.
112. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*. 1991;281(2):9-19.
113. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International journal of food science&tecnology*. 2001;36(7):703-25.
114. Valko M, Rhodes C, Maicol J, Izakovic M, Manzur M. Free radicals, metals and antioksidants in oksidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
115. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*. 2000;62(4):234.
116. Herbette S, Roedel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS Journal*. 2007;274(9):2163-2180.
117. Sandström J, Nilsson P, Karlson K, Marklund SL. 10 fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(29):19163-19166.
118. Mates JM, Perez- Gomez C, DeCastro IN. Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
119. Devasagayam TP, Bolor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2003;40(5):300-308.
120. Devasagayam TP, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal Association Physicians India*. 2004;52:794-804.
121. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10): 872-879.
122. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
123. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 1990;186:407-421.
124. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(9):1482-95.
125. Barrea G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. 2012;2012:137289.
126. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioksidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38(7):995-1014.
127. Nordberg J, Arner ES. Reaktive oxygen species, antioxidants, and the mamalian tioredoxin system1. *Free radical biology and medicine*. 2001;31(11):1287-312.

128. Dringen R. Metabolism and functions of Glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(6):649-71.
129. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 1983;52:711-760.
130. Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16(10):1303-1314.
131. Ialongo C. Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva. *Clinical Biochemistry*. 2017;50(6):356-363.
132. Sies H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137(6):1493-1495.
133. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blazquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018;120:159-167.
134. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay, USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 2018. 469-472.
135. Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski M. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Methods Enzymology*. 2014;542:243-262.
136. Jardine D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Investigation of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;50:1720-1724.
137. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 2007;1:3159.
138. Meng D, Zhang P, Zhang L, Wang H, Ho CH, Li S, et al. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*. 2017;37:467-479.
139. Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*. 2009;14(4):159-166.
140. Tamarit J, Hoogh A, Obis E, Alsina D, Cabisco E, Ros J. Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *Journal of Proteomics*. 2012;75:3778-3788.
141. Shahidi F, Zhong Y. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. Canada: 2015. Chapter 12, Methods for the assessment of antioxidant activity in foods; 287-333.
142. Prior R, Cao G. In Vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods. 1999;27(12):1173-1181.
143. Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymology*. 2009;463:73-95.
144. Odebeatu CC, Taylor T, Fleming LE, Osborne N. Phthalates and asthma in children and adults: US NHANES 2007-2012. *Environmental Science Pollution Research International*. 2019;26(27):28256-28269.
145. Kim YM, Kim J, Cheong HK, Jeon BH, Ahn K. Exposure to phthalates aggravates pulmonary function and airway inflammation in asthmatic children. *PLoS One*. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0208553.
146. Kuo PL, Hsu YL, Huang MS, Tsai MJ, Ko YC. Ginger Suppresses Phthalate Ester-Induced Airway Remodeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:3429-3438.
147. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzüğüllü OG, Giray B, Oztürk M, Favier A, Hincal F. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chemical Toxicology*. 2011;49(7):1565-1571.
148. Zhang G, Ling X, Liu K, Wang Z, Zou P, Gao J, Cao J, Ao L. The p-eIF2 α /ATF4 pathway links endoplasmic reticulum stress to autophagy following the production of reactive oxygen species

- in mouse spermatocyte-derived cells exposed to dibutyl phthalate. *Free Radical Research*. 2016;50(7):698-707.
149. De Rosa V, Erkekoğlu P, Forestier A, Favier A, Hincal F, Diamond AM, Douki T, Rachidi W. Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radical Research*. 2012;46(2):105-116.
 150. Kismali G, Yurdakok DB, Kuzukiran O, Arslan P, Filazi A. Phthalate induced toxicity in prostate cancer cell lines and effects of alpha lipoic acid. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2017;118(8):460-466.
 151. Li L, Li HS, Song NN, Chen HM. The immunotoxicity of dibutyl phthalate on the macrophages in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2013;35(2):272-281.
 152. Suzuki Y, Matsumoto M. Accumulation of triacylglycerol in tissue culture cells derived from human embryonic lung (L-132 cells) on administration of di-n-butyl phthalate. *The Japanese Journal of Experimental Medicine*. 1980;50(4):253-261.
 153. Kim SH, Kim SS, Kwon O, Sohn KH, Kwack SJ, Choi YW, Han SY, Lee MK, Park KL. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic limb bud cells; protection by antioxidants. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 2002;65:461-472.
 154. Zhang G, Yang W, Jiang F, Zou P, Zeng Y, Ling X, Zhou Z, Cao J, Ao L. PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells. *Toxicology Letters*. 2019;308:24-33.
 155. Albaladejo EP, Fernandes D, Lacorte S, Porte C. Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells. *Toxicology in Vitro*. 2017;38:41-48.
 156. Wójtowicz AK, Szychowski KA, Wnuk A, Kajta M. Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotoxicity Research*. 2017;31(1):77-89.
 157. Cheng L, Li J, Cheng J, Wu Z. Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice. *Human and Experimental Toxicology*. 2019;38(8):938-950.
 158. Yan B, Guo J, Liu X, Li X, Yang X, Ma P, Wu Y. Oxidative stress mediates dibutyl phthalate induced anxiety-like behavior in Kunming mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;45:45-51.
 159. Wang X, Yan X, Yang Y, Yang W, Zhang Y, Wang J et al. Dibutyl phthalate-mediated oxidative stress induces splenic injury in mice and the attenuating effects of vitamin E and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*. 2020. doi: 10.1016/j.fct.2019.110955.