ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Mehmet YILMAZ

BAZI PESTİSİTLERİN SIÇAN DOKULARINDAKİ ASETİLKOLİNESTERAZ VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ İLE MALONDİALDEHİT DÜZEYİNE ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÖZ

DOKTORA TEZİ

BAZI PESTİSİTLERİN SIÇAN DOKULARINDAKİ ASETİLKOLİNESTERAZ VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ İLE MALONDİALDEHİT DÜZEYİNE ETKİLERİ

Mehmet YILMAZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
İkinci Danışman : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Yıl : 2010, Sayfa: 69
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
Doç.Dr. Süphan KARAYTUĞ

Bu çalışmada Cyfluthrin ve Etoxazole'nin letal olmayan derişimlerinin sıçan karaciğer ve böbreklerinde katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) düzeyine subkronik etkisi araştırılmıştır. Cyfluthrin'in 1.2, 12 ve 120 mg/kg v.a./gün'lük, Etoxazole'nin 2.2, 11 ve 22 mg/kg v.a./gün'lük dozları sıçanlara intraperitonal yolla 21 gün süreyle verilmiştir.

Cyfluthrin etkisinde: karaciğer ve böbrekte kontrol ve Dimetilsülfoksit (DMSO)'e göre en düşük dozda CAT aktivitesi değişmezken, diğer iki dozda azalmıştır. GPx aktivitesi, Karaciğerde SF (Serum fizyolojik) ve DMSO'ya göre önemli derecede azalmıştır. Böbrekte, GPx aktivitesinde SF'ye göre en düşük dozda değişim görülmezken diğer dozlarda önemli azalma, DMSO'ya göre tüm muameleli gruplarda azalma görülmüştür. karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm derişimlerde, böbreklerde ise sadece en yüksek iki dozda MDA düzeyi artmıştır. AChE enzim aktivitesinde, karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm dozlarda, böbrekte en yüksek dozda azalma görülmüş, diğer dozlarda değişim görülmemiştir. Etoxazole etkisinde karaciğer ve böbreklerde CAT, GPx ve AChE aktivitesi SF'ye göre tüm dozlarda azalırken MDA düzeyinde artma görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, Malondialdehit, Sıçan, Cyfluthrin, Etoxazole

ABSTRACT

PhD THESIS

THE EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON ACETYLCHOLINESTERASE, ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND THE MALONDIALDEHYDE LEVEL IN TISSUES OF RATS

Mehmet YILMAZ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATUAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor	: Prof. Dr. Mustafa CANLI
Cosupervisor	: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Year	: 2010, Page 69
Jury	: Prof. Dr. Mustafa CANLI
	Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
	Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
	Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
	Assoc.Prof.Dr. Süphan KARAYTUĞ

In this study, effects of sublethal concentrations of cyfluthrin and etoxazole on the activities of catalase (CAT), glutation peroksidase (GPx), acetlycolinesterase (AChE) and malondialdehite (MDA) levels in the liver and kidney of the rats were investigated. Cyfluthrin and Etoxazole were administered intraperitonally over a 21 day period in a dose of 1.2, 12 and 120 mg/kg b.w./day and 2.2, 11 and 22 mg/kg b.w./day respectively.

Cyfluthrin decreased CAT activity at the higher two doses in the liver and kidney, whreas it did not affect CAT activity at the lowest dose. GPx activity decreased in the liver comparing SP (serum physiologic) and DMSO controls in all groups, though there was no change in the kidney of rat which was compared to SP control at the lowest exposure dose and at all doses when compared with DMSO. Cyfluthrin increased MDA level in liver at all doses when compared with both SP and DMSO, however, it increased the MDA level in kidney at two highest doses. AChE activity in the liver of all groups exposed to cyfluthrin decreased comparing to both SP and DMSO control group whereas in the kidney there was only significant decrease at the highest dose when compared to both control. The kidney and liver CAT, GPx and AChE activities of rats treated with etoxazole were decreased at all doses when compared with SP however, the MDA level was increased.

Key Words: Catalase, Malondialdehyde, Rat, Cyfluthrin, Etoxazole

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI ve Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez deneylerimi yürütebilmem için laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan. Sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ, Sayın Prof. Dr. Sadık DİNÇER, Sayın Prof. Dr.İskender EMRE ve Sayın Arş.Gör. Ayşenur KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım için maddi kaynak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……..... I
ABSTRACT……..... II
TEŞEKKÜR……..... III
İÇİNDEKİLER……..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ……..... VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……..... VII
SİMGELER VE KISALTMALAR……..... VIII
1.GİRİŞ……..... 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……. 17
2.1.Test Maddeleri Dışındaki Diğer Pestisidler ile Yapılan Çalışmalar……. 17
2.2.Test Maddeleri Cyfluthrin ve Etoxazole ile Yapılan Çalışmalar…….. 20
3. MATERYAL VE METOD…….. 23
3.1. Materyal…….. 23
3.2. Test Maddeleri…….. 23
3.2.1 Cyfluthrin …… 23
3.2.2. Etoxazole …… 24
3.3. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler…… 25
3.3.1. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler…… 25
3.3.2. Bu Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler …… 26
3.4. Metod …… 27
3.4.1. Test Maddelerinin Deney Hayvanlarına Verilmesi…… 27
3.4.2. Analiz Yöntemleri …….. 28
3.4.2.1. GPx Aktivite Ölçüm Yöntemi..... 28
3.4.2.2. CAT Aktivite Ölçüm Yöntemi……..... 29
3.4.2.3. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi…… 31
3.4.2.4. Asetilkolinesteraz Aktivite Ölçüm Yöntemi…… 32
3.4.2.5. Malondialdehit Miktarı Ölçüm Yöntemi..…… 34
3.2.2. Verilerin İstatistik Değerlendirilmesi ……..……35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……..…… 37

4.1.Bulgular……..……..….37
4.1.1.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi, AChE Spesifik Aktivitesi ve MDA Düzeyine Yanıtı…..…….….37
4.1.1.1.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi…….…. 37
4.1.1.2.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi……..……....40
4.1.1.3.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Asetilkolin Esteraz Spesifik Aktivitesine Etkisi….…….….42
4.1.2.Etoxazole'nin Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi, AChE Spesifik Aktivitesi ve MDA Düzeyine Yanıtı ..…….… 43
4.1.2.1.Etoxazole'nin Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi…….. 43
4.1.2.2.Etoxazole'nin Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi……..46
4.1.2.3.Etoxazole'nin Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Asetilkolin Esteraz Spesifik Aktivitesine Etkisi…..……. 48
4.2.Tartışma……..…….…. 49
5.SONUÇ VE ÖNERİLER…… 57
KAYNAKLAR…….….. 59
ÖZGEÇMİŞ…….……... 69

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. GPx Yöntemi 29
Çizelge 3.2. CAT Yöntemi 30
Çizelge 3.3. Protein Yöntemi..... 32
Çizelge 3.4. AChE Yöntemi 33
Çizelge 3.5. MDA Standart Eğrisinin Hazırlanması..... 34
Çizelge 3.6. MDA Yöntemi 35
Çizelge 4.1. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde CAT Spesifik Aktivitesine Etkileri (U/mg Protein) 38
Çizelge 4.2. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde GPx Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) 39
Çizelge 4.3. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi (U/mg Protein)..... 41
Çizelge 4.4. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde AChE Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) 42
Çizelge 4.5. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde CAT Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) 44
Çizelge 4.6. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde GPx Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein)..... 45
Çizelge 4.7. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi (U/mg Protein) 47
Çizelge 4.8. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde AChE Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein)..... 48

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde CAT Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein)……..…… 38
Şekil 4.2. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde GPx Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) …… 40
Şekil 4.3. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi (U/mg Protein) ……..…… 41
Şekil 4.4. Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde AChE Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) …… 43
Şekil 4.5. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve böbrekte CAT Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) ……..…….. 44
Şekil 4.6. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde GPx Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) ……..……..…. 46
Şekil 4.7. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi (U/mg Protein) ……..……. 47
Şekil 4.8. Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde AChE Spesifik Aktivitesine Etkisi (U/mg Protein) ……..…….. 49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Rpm : Round (Rotor) Per Minute (devir/dakika)
DMSO : Dimethyl sulfoxide
EDTA : Etilendiamintetraasetikasit
İ.p. : Intraperitonal
LPO : Lipid Peroxidation
WHO : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
NaCl : Sodyum klorür
TIBDAM : Tıbbi Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi
Lauril sülfat : Sodyumdodesil Sülfat (SDS)
NaOH : Sodyum Hidroksit
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
DTNB : 5-5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik asit)
AChE : Asetilkolinesteraz
MDA : Malondialdehit
CAT : Katalaz
Hac : Asetik Asit
TBA : Tiobarbitürik Asit
GSH : Glutatyon
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
$CuSO_4.5H_2O$: Bakır sülfat
K_2HPO_4 : Dipotasyum hidrojen fosfat
Na_2CO_3 : Sodyum karbonat
Tris HCl : Tris hidroklorit
V.a : Vücut Ağırlığı

1.GİRİŞ

Yüzyılın başından bu yana zirai mücadelede pestisitler hastalık taşıyıcılarını kontrol ederek ve istenmeyen böcekleri yok ederek besin üretimini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Anwar, 1997). Pestisitlerin yaygın kullanımı toprak, su, hava ve besinde kirlilikle sonuçlandığı, pestisitle yüklü yüzeylerden temas ile besinlerin kontamine olduğu ve bu yolla, yetişkin ve çocukların diyet yoluyla pestisitlere maruz kalmalarının potansiyel olarak arttığı bildirilmiştir (Pournourmohammedi ve ark., 2004).

1.1.Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, etkili olduğu canlı grubuna göre herbisitler, fungisitler, rodentisitler ve insektisitler (Organofosfatlı pestisitler, Karbamatlı pestisitler, Organoklorinli pestisitler ve Piretroitler) olmak üzere 4 ana sınıfa ayrılmaktadırlar (Huges, 1996).

Chrysanthemum cinerariaefolium çiçeklerinden türetilmiş olan piretrinler yüzyılı aşkın süredir insektisit olarak kullanılmaktadır. Piretroitler piretrinlerin yapısal türevleri olmakla birlikte çevresel stabilitesi ve etki gücü daha fazladır. (Wolansky ve ark., 2005). Ziraat, tıbbi, ev tipi zararlı kontrolü ve veterinerlik gibi alanlarda kullanılmaktadır (Wolansky ve ark., 2005). Ziraatte ürün zararlılarına karşı geniş ölçekte etkili ve memelilere kısıtlı etkisi nedeniyle piretroit pestisit kullanım miktarı hızla artmaktadır (Ross ve ark., 2006). Bununla birlikte karbamatlılar, organoklorinler, organofosfatlar ve piretroid pestisidlere alternatif olabileceği düşüncesi ile yeni nesil pestisit olarak difenil oxazoline grubu insektisitler üretilmiştir. Bu çalışmada test maddesi olarak piretroid kullanılan cyfluthrin piretroit pestisit, etoxazole ise difenil oxazoline insektisit grubuna girmektedir.

Pestisidlerin tavuk ve farelerde hepatik lipid peroksidasyonunu indüklediği, serbest radikal oluşturması ile oksidatif stres meydana getirdiği bildirilmiştir (John ve ark., 2001).

1.2.Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Süperoksit dismutaz (SOD), Süperoksit anyon radikalinin (O_2^-) detoksifikasyonundan sorumlu bir enzimdir. Bu enzimin McCord ve Fridovich tarafından 1969 yılında keşfi ile oksijen metabolizması çalışmaları başlamış ve biyolojik hasarların radikallerin oluşturduğu oksidatif stresten kaynaklandığı anlaşılmıştır. Oksidatif stres canlı organizmada oksijen radikali üretim hızının dekompozisyon veya atılım hızını geçtiğinde ortaya çıkan bir durumdur. Oksidatif stres sürecinde DNA ve protein gibi makromoleküller bozularak hücre zarar görür (Kelly ve ark., 1998).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan ürünlerdir. Bu tanım, eşleşmemiş bir elektron içeren hidrojen atomunu, birçok geçiş metalini ve oksijen molekülünü kapsamaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Aerobik yaşamın vazgeçilmez elemanı oksijen, temel enerji seviyesindeki moleküler oksijenin (O_2) süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikale ($HO^·$) dönüşümü nedeniyle toksik etkilere de sahip olmaktadır (Fridovich, 1998).

Bunlardan O_2^- hem çevresel etkenler hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle kolaylıkla fazla miktarlarda oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla $O_2^{-·}$nin birikmesine bağlıdır ve bir kere bu radikaller biriktikten sonra bir seri zincirleme radikal tepkimeler sonucu diğer radikaller de oluşur (Kelly ve ark., 1998).

1.2.1.Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenin dış orbitallerindeki iki elektron paylaşılmadığında ve ayrı ayrı orbitallerde bulunduklarında, spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali, O_2^-), iki elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (Halliwel ve Gutteridge,

1990). O_2^- bir oksitleyici gibi davranıp bir elektron daha aldığı zaman oluşan O_2^{2-} ortamdan iki proton alarak H_2O_2 oluşturabilir veya O_2^- aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenip indirgeyici gibi davranabilir. Ya da iki O_2^- birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri indirgenir, böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (Nordberg ve Arner, 2001):

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (1,1)$$

O_2^-'nin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Canlılarda O_2^-'nin oluşumuna neden olan olay ve etkileri iki grupta toplamak mümkündür:

1-Çevresel etkiler: Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda O_2^- oluşumuna neden olurlar. Bazı koşullarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere, özellikle bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar her oksijenli ortamda O_2^-'ni oluştururlar. Yüksek enerjili ışınlardan özellikle beta, gama ve X ışınları O_2^-'nin yanısıra, doğrudan diğer radikallerin oluşumunu da sağlarlar. Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat artar.

2-Canlı organizmalar radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorlarsa, organizmalardaki pek çok tepkimelerle O_2^- üretirler. Canlılarda O_2^- üreten başlıca tepkimeler şunlardır:

a) Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, tiollerin, indirgenmiş boyaların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyon tepkimelerinde O_2^- üretilebilir.

b) Çeşitli enzimatik tepkimelerde O_2^- oluşur. Bu enzimlere ksantin oksidaz, dihidroorotat dehidrojenaz ve bir grup flavoprotein dehidrojenazlar örnek verilebilir.

c) Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimleri de katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak O_2^- üretirler. Bunlara mikrozomal hidroksilazlar, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz örnek olarak verilebilir.

d) Canlılarda $O_2^{-\cdot}$nin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküler oksijenin en önemli kullanım yerinin mitokondri iç zarındaki elektron transport sistemi olduğu hatırlanırsa, radikal üretimi beklenen bir sonuçtur. Bilindiği gibi mitokondrideki oksijen tüketiminin çok büyük bir kısmından elektron transport sistemi sorumludur ve sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri iç zarındaki elektron transportu sırasında ubikinondan (koenzim Q) sonra sitokromlar elektronları tek tek taşırlar ve bu elektronları sitokrom a_3'ün bağladığı oksijene verirler. Sitokrom a_3'ün bağladığı bir molekül oksijenin suya indirgenmesi için dört elektron gerekmesi ve diğer taraftan elektronların sitokromlarda tek tek taşındığı gerçeği göz önüne alınırsa, elektron transportunun son tepkimesinin (sitokrom oksidaz tepkimesinin) en önemli O_2^- üretim bölgesi olması beklenir. Oysa bu bölgede O_2^- üretildiği tespit edilememiştir. Buna karşı mitokondri, elektron transport sisteminde O_2^- üreten iki bölgenin bulunduğu belirtilmiştir. Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH dehidrogenazdır ve mitokondri zarında üretilen $O_2^{-\cdot}$nin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır. İkinci bölgede ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun otooksidasyonu elektron transport sisteminde üretilen $O_2^{-\cdot}$nin üçte ikisini oluşturur. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin % 1,5'i O_2^- oluşumu ile sonuçlanır.

e) Ayrıca önemli ölçüde O_2^- fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) ve enzimatik olarak üretilir. O_2^- sulu ortamda önemli ölçüde birikmez, kendiliğinden dismutasyon ile ortamdan temizlenirler.

O_2^- üreten tepkimelerde yapılan bu ilk radikal bir seri tepkimelerle oksijenin diğer radikallerinin oluşumuna neden olur. Ortamda biriken $O_2^{-\cdot}$nin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir,

1-O_2^-, yukarıda verilen tepkimelerle kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.

2-Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturabilir.

3-H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen ($^1O_2$) oluşturabilir:

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + OH^- + OH^\cdot \quad (1.2)$$

4-Veya diaçil peroksitlerle olduğu gibi, diğer tepkimeler ile $^1O_2$ yapımına neden olur (Kılınç, 1985):

$$O_2^- + OH^\cdot \longrightarrow {}^1O_2 + OH^- \quad (1.3)$$

$$2O_2^- + R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}O\text{-}O\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}R \longrightarrow {}^1O_2 + 2\ RCOO^- \quad (1.4)$$

$O_2^{-\cdot}$'nin oluşumlarına sebep olduğu radikaller diğer radikal tepkimeleri başlatırlar ve oluşan radikaller $O_2^{-\cdot}$in kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkiye sahiptirler. Bu nedenle O_2^- oluştukları anda uzaklaştırılamazlarsa, diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır (Kelly ve ark., 1998).

1.2.2.Hidroksil Radikali

1934 yılında Haber ve Weiss, H_2O_2'in O_2^- ile indirgenmesiyle OH radikalinin oluşabileceğini göstermişlerdir.

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH + O_2 \quad (1.5)$$

Araştırmacılar O_2'nin H_2O_2 ile etkileşiminin hız sabitinin, O_2'nin kendiliğinden dismutasyonu ile yarışamayacağını düşündüklerinden canlılarda fizyolojik olarak önemli miktarda $OH^\cdot$, üretilemeyeceğine inanıyorlardı. Redoks katalizör olarak işlev gören bir geçiş metali, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda $OH^\cdot$ üretildiği bilinmektedir (Ahmad, 1995). $O_2^{-\cdot}$'nin bir kısmı kendiliğinden dismutasyon ile H_2O_2 oluşturmakta ve biriken H_2O_2, O_2^- ile etkileşerek $OH^\cdot$yapmaktadır. İn vivo da $OH^\cdot$yapımına neden olabilen önemli tepkimelerden birisi Fenton tepkimesidir:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH + OH^- \quad (1.6)$$

In vivoda $OH^{\cdot}$üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. İn vivoda $O_2^{\cdot-}$'nin H_2O_2 ile $OH^{\cdot}$üretmesi, şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.

$$Fe\ (şelat)^{3+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe\ (şelat)^{3+} + O_2 \qquad (1.7)$$

$$Fe\ (şelat)^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe\ (şelat)^{3+} + OH + OH^- \qquad (1.8)$$

Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve toksik etkili olanı OH'dir. $OH^{\cdot}$üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girip radikal tepkimelerini başlatabilir. $OH^{\cdot}$'nin yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkilerinin yanısıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyon için de gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak $OH^{\cdot}$üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır. Bazı kimyasal bileşikler, canlıda radikal yapımına neden oldukları için toksik etkilidirler. (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.2.3.Singlet Oksijen

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda dıştaki iki elektron ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilirler. Singlet oksijenin delta formununda ($^1\Delta gO_2$) iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğer orbital boştur. $^1O_2$'in sigma formunda ($^1\Sigma^+gO_2$) ise iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve dönüşümleri birbirine zıttır. Sigma formunun enerjisi daha fazladır, daha fazla stabildir ve sulu çözeltilerde yarı ömrü 10^{-11} saniyedir. Delta formunun yarı ömrünün daha uzun olması ($2x10^{-8}$ s) nedeniyle, gözlenen kimyasal reaktivitelerden delta formunun sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Ahmad, 1995). $^1O_2$'in her iki formu da aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler. In vivo'da $^1O_2$ üretimine neden olan başlıca önemli tepkimeler şunlardır.

1-O_2^- üretilen ortamdan kendiliğinden dismutasyon ile

$$HO_2 + O_2^{\cdot-} + H^+ \longrightarrow {}^1O_2 + H_2O_2 \qquad (1.9)$$

2-O_2^- ile OH'in etkileşmesi ile

$$OH + O_2^{\cdot -} \longrightarrow {}^1O_2 + OH^- \quad (1.10)$$

3-Haber-Weiss tepkimesi ile

$$O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Metal}} {}^1O_2 + OH^{\cdot} + OH^- \quad (1.11)$$

Yukarıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi, $^1O_2$ ve OH'nin üretimi tümüyle ortamda O_2^- ve H_2O_2'in birikmesine bağlıdır (Khan ve Kasha, 1994).

1.3.Oksidatif Stresten Korunma Mekanizmaları

1.3.1.Antioksidant Bileşiklerle Korunma

1.3.1.1.Metal İyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan Antioksidantlar

Bu grupta metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen bileşikler bulunmaktadır. Transferin, laktoferrin, ferritin, seruloplazmin, albumin, hemoglobin, haptoglobulin ve metallotioneinler örnek olarak gösterilebilir.

1.3.1.2.Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidantlar

Ürik asit, ubikinon, bilirubin, α-Keto asidler, cinsiyet hormonları, melatonin, lipoik asid, melaninler, histidin içeren dipepitler ve tiyol içerenler (glutatyon,N-asetilsistein) bu tip moleküllerdir.

1.3.1.3.Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidantlar

E vitamini ve anologları lipid peroksidasyon zincirini kırmaktadır. O_2^- ve $OH^{\cdot}$ tutucusu olan C vitamini, E vitaminini rejenere etmektedir. Hücre büyümesi,

farklılaşması ve görme için esansiyel bir vitamin olan A vitamini peroksiller üzerinde doğrudan etkili olmaktadır.

1.3.1.4.Karotenoidler ve Fenolik Yapılar.

Karotenoidler, A vitamininin öncü maddesidirler. Bunlardan, epikateşin (yeşil ve siyah çay), kateşin (kırmızı şarap), kamferol (brokoli, greyfurt ve siyah çay), kuarsetin (soğan, brokoli, çilek) antosiyaninler (renkli meyveler, kırmızı şarap, çilek, vişne), kafeik asit (zeytin ve kahve) gibi bazı bitkisel fenolik maddeler çeşitli bitkilerde ve bitkisel ürünlerde bulunmaktadır. Fenollerin LDL oksidasyonunu önlediği de gösterilmiştir (Onat ve ark., 2002).

1.3.2. Antioksidant Enzimlerle Korunma

Organizmalarda pek çok tepkimelerle üretilebilen ve diğer radikallerin oluşumunu başlatan O_2^- olduğuna göre, aerobik canlılarda oksijenin toksik etkilerine karşı korunma mekanizmasının $O_2^{-\cdot}$nin birikmesini önlemek şeklinde olması beklenmelidir. Gerçekten de, canlılarda oksijen toksisitesine karşı savunma bu basamaktadır ve enzimatik bir mekanizmadır. Bu korunma süperoksit dismutaz tarafından başarılmakta olup, enzimin görevi $O_2^{-\cdot}$nin dismutasyonunu katalizlemektir (Fridovich, 1995).

1.3.2.1.Süperoksit Dismutaz ve Enzimatik Dismutasyonun Önemi

SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve $O_2^{-\cdot}$nin H_2O_2'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (Fridovich, 1995).

$$O_2^- + O_2^- + 2H \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (1.12)$$

O_2^- kendiliğinden de dismutasyona uğrayabilir. Kendiliğinden dismutasyonun hız sabiti $2x10^5$ $M^{-1}sn^{-1}$'dir. Buna göre O_2^- sulu ortamda fazla birikmezler ve bu

nedenle SOD ile katalizlenen dismutasyon önemsiz gibi görülebilir. Oysa iki faktör enzimatik katalizin önemini belirgin şekilde ortaya koyar:

1-SOD ile enzimatik dismutasyonun hız sabiti pH 7.4'de $2x10^9 M^{-1}sn^{-1}$'dir. Bu da kendiliğinden dismutasyondan 10^4 kez daha hızlı bir dismutasyon sağlar.

2-Kendiliğinden dismutasyon pH 5.0'da en fazla iken, pH 9.0'da en azdır. Oysa SOD'nin katalizlediği reaksiyon pH 7.8'de ve O_2^-'nin steady-state konsantrasyonunda yürür. Bu da reaksiyonun fizyolojik şartlarda O_2^-'nin hızlı bir şekilde dismutasyona uğramasını sağlar (Ahmad, 1995).

Bütün canlılardaki SOD enzimleri, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre sınıflandırılırlar (Fridovich, 1995).

1-Bakır ve Çinko İçeren Dismutazlar: Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunur, 32 kDa ağırlığındadır. Tek sülfit bağı ile birbirine bağlı iki ayrı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer atom çinko ile bakır içerir. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko, kobalt, civa veya kadmiyum ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile O_2^- arasında gerçekleşir. Bu enzimin mitokondri matriksi dışında ökaryotik hücrelerin her organelinde bulunan dismutazdır.

2-Mangan İçeren Dismutazlar: Prokaryotik hücrelerde bulunur, ağırlığı 86 kDa'dır, dört alt birimden oluşan enzimin alt birimi başına birer atom mangan içerir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu, Zn-SOD arasında hiçbir ortak özellik yoktur.

3-Demir İçeren Dismutazlar: Demir içeren dismutaz kofaktörü dışında Mn-SOD'ye benzer, ağırlığı 41 kDa'dur. İki alt birimden oluşur. (Ahmad, 1995).

1.3.2.2.Katalaz

H_2O_2, O_2^- radikalinin dismutasyon ürünlerinden birisi olup peroksidazlar ya da katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) tarafından detoksifiye edilir.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (1.13)$$

$$\text{Cat-Fe(3)} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Kompleks I}$$

$$\text{Kompleks I} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Cat-Fe (3)} + 2H_2O + O_2$$

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde CAT (EC 1.11.1.6) bulunur. CAT birbirinin aynısı dört alt üniteden yaklaşık 240 kDa ağırlığında tetramerik bir moleküldür.

Aktif enzim –H_2O_2 ara bileşiği ilk olarak oluşmaktadır ve Kompleks I adını alır. Kompleks I ve H_2O_2 molekülü arasındaki reaksiyon oldukça hızlı yürüyüp denge sabiti 10^7 litre $mol^{-1}s^{-1}$'dir.

CAT genellikle peroksizomlarda bulunur. Balıklarda, amfibilerde ve memelilerde karaciğer, böbrek, kalp ve beyinde yüksekten düşüğe doğru aktivite dağılımı gösterip hiçbir ekstraselüler sıvıda bulunmaz (Ahmad, 1995).

1.3.2.3.Glutatyon Peroksidaz

Sitosolik glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) sitosolde ve mitokondrial matriksde bulunur ve sitotoksik hidroperoksitlerin uzaklaştırılması için çok önemli bir enzimdir. Omurgalı türlerinde enzimin katalitik aktivitesi için bir hidrojen donörü olan glutatyona (GSH) mutlak gereksinimi vardır. Enzim H_2O_2'i iki H_2O molekülüne ve membran peroksitlerini (ROOH/LOOH) H_2O ve herhangi bir etkisi olmayan bir molekül olan alkole (ROH/LOH) indirger.

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2\,H_2O + GSSG \qquad (1.14)$$

$$LOOH + 2GSH \longrightarrow H_2O + LOH + GSSG$$

Enzim aynı inkübasyon koşullarında H_2O_2, etil hidroperoksit, tert-butilhidroperoksit, sümen hidroperoksit, linoleik asit hidroperoksit ve nükleotid veya steroid türevli hidroperoksitleri birbirlerine yakın değerlerde indirgeyebilir.

Membran hidroperoksitlerine etki edebilmesi için sitosolik GPx fosfolipaz A_2 enzimine gereksinim duymaktadır. Fosfolipaz A_2 poliansatüre ROOH/LOOH'ları sitosole bırakır.

GPx 76-105 kDa ağırlığında tetramerik bir proteindir. Her bir molekül dört selenyum atomu içermektedir. Selenyum enzimin katalitik merkezinde ve selenosistein selenolat olarak bulunur. Hidroperoksit reaksiyonlarının katalizlenmesi birkaç basamakta yürür. Önce enzimin katalitik merkezi hidroperoksiti indirger ve

enzim yükseltgenir, ikinci basamakta, okside enzim bir molekül GSH ile bir kompleks meydana getirir, üçüncü basamakta, kompleks başka bir molekül GSH'ı kullanarak enzim başlangıç durumuna dönüşürken iki molekül GSH, okside glutatyonu (GSSG) oluşturarak okside olurlar (Ahmad, 1995).

1.4.Asetilkolinesteraz

Nörotransmitter madde olan asetilkolinin hidrolizini katalizleyen enzime asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) denir. Nörotransmitter madde bir uyarılmış sinir hücresinden diğeri arasındaki sinaps içerisine salınarak sonraki sinir hücresinin reseptör bölgesine bağlanıp sinir impulsunun diğer hücreye geçmesine sebep olur. Bir sonraki impulstan önce asetilkolinin AChE tarafından hidrolize edilmesi gerekir. Asetilkolinin hidrolize edilmesiyle asetat ve kolin meydana gelir. İşte bu enzimin aktivitesini bozan maddeler sinir impuls iletiminin bozulmasına ve bunu takiben belli fonksiyonların aksamasına neden olurlar (Lehninger ve ark., 1993).

1.5.Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikal hasarının sonuçlarından biri de lipid peroksidasyonudur (de Zwart ve ark., 1999). Biyolojik sistemlerde, poliansature yağ asitlerinin oksidasyonu olarak bilinir ve bu olay birbirini izleyen zincirleme reaksiyonlar dizisidir. Üç aşamadan oluşur: Başlangıç (initiation), ilerleme (propagation) ve sonlanma (termination).

Lipit peroksidasyonunun başlangıcı, reaktif bir bileşik tarafından poliansatüre yağ asitinin metilen grubundaki (-CH_2 -) $H^{\cdot}$ atomunun koparılmasıdır. Hidrojen atomu koparılabilen reaktif bileşikler; hidroksil radikali (OH), alkoksil radikali (RO), peroksil radikali (ROO) ve hidroperoksit radikalleridir (HO_2). Hidrojen peroksit veya süperoksit radikalleri bu koparma işlemini gerçekleştiremezler.

Yağ asitinde çift bağın varlığı, bitişiğindeki C-H bağını zayıflattığından buradan $H^{\cdot}$ atomunun koparılması daha kolaydır. Bundan dolayı poliansatüre yağ

asitlerine sahip membran lipitleri peroksidasyonuna özellikle duyarlıdır. Reaktif radikallerin bu saldırısı sonucu, yağ asit zincirinde bir çiftleşmemiş elektron yani lipit radikali oluşur.

Karbon merkezli lipit radikali daha sonra moleküler düzenlemeyle konjuge dien oluşturur. Bunlarda oksijenle hızlıca reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturur.

Peroksil radikali, yalnız başına bitişik yağ asitinden $H^{\cdot}$kopararak karbon merkezli lipit radikali oluşturma kabiliyetindedir. Bu yüzden peroksil radikali oluştuktan sonra zincirleme reaksiyon başlar (chain propagation).

Prensip olarak lipit peroksidasyonu, oksijen veya lipit substratların tüketilmesiyle sonlanır. Zincir sonlanma reaksiyonlarından bazıları şunlardır: Lipit radikali (L), alkoksil radikali (LO) ve peroksil radikalleri (LOO) arasında çapraz reaksiyonlarda mümkündür.

Membranlarda meydana gelen lipit peroksidasyonu membran organizasyonunu bozarak hücrenin yaşamını tehdit eder.

Biyolojik membranlarda meydana gelecek lipit peroksidasyonu; membran akışkanlığının kaybına, membran potansiyelinin düşmesine, iyonlara karşı geçirgenliğinin artışına ve sonunda hücrenin bütünlüğünün bozularak ölümüne yol açar. (Yaprak, 1998).

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Ohkawa ve ark., 1979).

1.6.Antioksidant Enzimlerin Önemi

Ekotoksikolojik çalışmalarda kontamine ortamlarda antioksidant enzim aktivitesi ölçümlerinin markır olarak önemlerini gösteren deliller giderek artmaktadır (Lopes ve ark, 2001).

Biyomarkırlar hem çevre kalitesini hem de organizmanın ortamına uyumunu gösterirler (Cajaraville ve ark, 2000). Bu enzimler hemen tüm omurgalıların dokularında bulunur; ancak genelde en yüksek aktivitelerini ksenobiyotik alınımı ve

reaktif oksijen türlerinin (ROS) enzimatik dönüşümleri için temel organ olan karaciğerde gösterirler. Bu enzimlerden bazıları oksidatif stresin belirgin moleküler biyoindikatörleri olup metal ve diğer ksenobiyotikler gibi kirleticilerin etkisindeki populasyonlarda tepki düzeyini gösterirler.

Kimyasal stres altında antioksidant sistemler indüklenebilir veya inhibe olabilirler. İndüklenme adaptasyon olarak yorumlanır ve organizma güvensiz kirli ortamında kısmen veya tamamen stres ile baş edebilir demektir. Diğer durumda organizma toksik ajana daha duyarlı hale gelir ve toksisite başlar. Bu nedenle antioksidant sistemler sadece kontaminant etkisine değil toksisitede de biyomarkır olurlar (Cossu ve ark., 1997). Bu biyomarkırlar çevre kirleticilerin arazide değerlendirilmesinde güvenli göstergelerdir (Walker, 1995). SOD, GPx, CAT ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimleri içeren antioksidant sistem farklı hücresel kompartmanlarda yer alabilirler, bu sistem omurgalılarda tüm dokularda bulunmakla birlikte ksenobiyotik alınımı ve ROS'nin enzimatik transformasyonunda başlıca organ karaciğerdir (Lemaire ve ark., 1994).

1.7. Böbrek

Böbrekler temelde vücut sıvı ve elektrolit dengesinden sorumlu organlardır. Atılım fonksiyonu (idrar oluşumu), protein metabolizması, atık ürünlerin uzaklaştırılması, hormonal fonksiyon, proteinlerin vücutta tutulumu, sıvı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi ile asit-baz dengesinin sağlanması olmak üzere böbreğin altı temel fonksiyonu bulunmaktadır.

Vücut ağırlığının %0.5 kadarını oluşturan böbreklerden, kalp tarafından sistematik dolaşıma pompalanan kanın %25 kadarı geçtiği için kompleks fonksiyonları gerçekleştirmektedir (İşlekel., 2002). Böbrekler yoğun olarak oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon reaksiyonlarını yürütür (Rodrigo ve ark.,2001).

1.8. Karaciğer

Karaciğer genel dolaşım ile sindirim kanalı arasında çok önemli bir konuma yerleştirilmiştir. Bir dakikada kalpten çıkan kan (kalp debisi) hacminin %20-25'ini portal vena (sindirim kanalından emilen besinler ile diğer maddeleri karaciğere taşıyan damar) ve hepatik arter (genel dolaşımdan gelen kanı karaciğere geri taşıyan damar) yoluyla alır. Barsaktan emilen veya hepatik arter yoluyla karaciğere sunulan toksik maddelerin vücuttaki diğer organlara ulaşmadan önce bu metabolik olarak aktif organdan geçirilmeleri zorunludur. Karaciğerin görece büyük hacmi (total vücut ağırlığının %3'üdür) besin maddelerine uygun şekilde metabolize edilecekleri, potansiyel olarak zararlı maddelerin de detoksifiye edilip idrar veya dışkı ile atılacak hale getirilmeleri için gereken bekleme süresini sağlar. Dolayısı ile karaciğer, diğer işlevleri arasında böbrek ve barsakla birlikte bir dışarı atma (itrah) olup geniş bir detoksifiye edici mekanizmalar dosyası ile donatılmıştır. Bu organ, örneğin, metabolik dönüşüm yollarını başarma ve aynı zamanda potansiyel olarak toksik bileşikleri atmasına izin veren salgılama sistemlerini çalıştırma kapasitesine sahiptir. Karaciğer aynı zamanda, gerekli besin maddeleri için ileri derecede özgül ve seçici taşıma mekanizmaları da içermekte olup bu besin maddeleri sadece organın gereksinim duyduğu enerjiyi sağlamakla yetinmez, aynı zamanda, organizmanın sistemik gereksinimlerine ait fizyolojik olarak önemli maddeleri de sağlar (Atik., 2007).

Bu çalışmada kullanılan test maddelerinden birisi olan cyfluthrin'in fare eritrositlerinde CAT ve SOD aktivitesini azalttığı ve plazmada MDA düzeyini arttırdığı görülmüştür (Eraslan ve ark., 2006). Ayrıca Cyfluthrin'in *Cyrinus carpio* L.'nin beyninde MDA düzeyi artmış ve sodyum kanallarını da bloke etmiştir (Sepici-Dinçel ve ark., 2009). Cyfluthrin'in Ames testinde mutajen olmadığı fakat insan lenfositlerinde kromozom anormalliklerini ve mikronükleus oluşumunu artırdığı, sıçanlarda da genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ila ve ark., 2008).

Test maddelerinden bir diğeri olan etoxazole'un insan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Rencüzoğulları ve ark., 2004). Tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un karaciğerinde etoxazole'un

antioksidant enzimlerden CAT, SOD ve GPx aktivitesinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı, Na, K-ATPaz aktivitesinde önemli olmayan değişim, AChE aktivitesinde ise önemli bir azalma, MDA düzeyinde ise artma oluşturduğu gözlenmiştir. GPT aktivitesinde değişiklik görülmediğinden etoxazole'ün hepatoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Sevgiler ve ark., 2004). Etoxazole'nin *Oreochromis niloticus*'un solungaç, böbrek ve kas dokularında oksidatif strese neden olmadığı, Na, K-ATPaz aktivitesini ise solungaç ve kasta arttırırken böbrekte azalttığı fakat Ca ve Mg-ATPaz aktivitelerinde de önemli bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır (Üner ve ark., 2004).

Görüldüğü gibi şu anda pestisit olarak en çok kullanılan cyfluthrin ve etoxazole'un her ikisinin de deney hayvanlarında enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleriyle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Deney hayvanları özellikle sıçanlar kolay üretilmeleri bir yana, sıcakkanlı olmaları, karaciğer ve böbreğe sahip olmaları açısından insan metabolizmasıyla birçok özdeş yanları bulunmaktadır. Yukarıda da anlatıldığı gibi karaciğer ve böbreklerin kimyasalların metabolizmasında ve dışarı atılmasında görev alan vücudun önemli organları oldukları ve kimyasallara diğer organlardan çok daha fazla maruz kaldıkları bilinmektedir. Bundan dolayı bu çalışmada deney hayvanı olarak sıçanlar ve organ olarak karaciğer ve böbrekler çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı cyfluthrin ve etoxazole pestisitlerinin sıçan (Wistar Albino Sprague Dawley) (*Rattus norvegicus* var. albinos) karaciğer ve böbreklerinde enzim aktiviteleri ve MDA düzeyine etkisini araştırmaktır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Test Maddeleri Dışındaki Diğer Pestisitler ile Yapılan Çalışmalar

Balıkta, diazinon etkisinde 24. saatte CAT aktivitesinin artışı adaptasyon olarak belirtilmiş, 48 ve 96. saatlerde ise CAT aktivitesinde azalma meydana gelmiştir (Keramati ve ark., 2010).

Fungisit Propiconazole'nin gökkuşağı alabalığın'da 7, 20 ve 30 günlük etkisinin araştırıldığı çalışmada, oksidatif stres göstergeleri (LPO ve ROS) ve antioksidant (SOD, CAT ve GPx) parametreler ölçülmüş, yedi günlük çalışmada antioksidant savunma sistemi bu etkiye adaptasyonla cevap vermiş, 20 ve 30 günlük sürelerde oksidatif stresin göstergelerinin yüksek seviyeleri ile antioksidant enzimlerde inhibisyon görülmüş, uzun süreli muamelelerin ise ciddi oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2010).

Dişi sıçanlara imidacloprid'in 5, 10 ve 20 mg/kg/gün'lük dozları oral yoldan 90 gün süreyle verilmiş, serum ve beyinde AChE aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Bhardwaj ve ark., 2010).

İmidacloprid'in sıçanların sinir sistemi ve karaciğerinde akut oksidant ve iltihabi etkisinin araştırıldığı çalışmada plazma ve karaciğerde MDA miktarının kontrole göre arttığı, beyinde ise değişmediği, her iki dokuda da CAT aktivitesinin değişmediği, buna rağmen GPx'in beyin dokusunda üç kat artarken karaciğerde ise azaldığı saptanmıştır (Düzgüner ve Erdoğan, 2009).

İnsan eritrositlerindeki in vitro çalışmada bifenthrin'in indüklediği oksidatif strese karşı seçilen flavonolların koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, bifenthrin'in antioksidant enzim aktivitelerini azalttığı ve LPO'yu arttırdığı gözlemlenmiş, pestisitin flavonol ile birlikte uygulanmasıyla bu etkilerinin olmadığı belirtilmiştir (Sodowko-Woda ve ark., 2009).

İnsektisit cypermethrin'in 1,10 ve 20 mg/kg dozları uygulanmış farelerin testislerinde MDA'nın arttığı, SOD, CAT ve GPx'in azaldığı, sonuçta cypermethrin'in testislerin yapısını hasara uğrattığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2009). C.Sentetik piretroid Lamda-Cyhalothrin (LTC)'in erkek sıçan böbreklerinde

enzim aktiviteleri ve biyokimyasal parametrelerde değişiklikle, oksidatif stresi arttırmaya eğilimi gibi olası etkilerinin ve C vitamininin bunları azaltma kapasitesi üç hafta süreyle araştırılmıştır. Çalışma sonucunda MDA düzeyi artarken C vitaminin bunu azalttığı saptanmış, SOD, CAT, GPx, GR ve GST aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (Fetoui ve ark.,2009).

Sitokrom P-450 monooksijenaz'ın pestisitlerin toksisitesine olan dirençliliğini attırıcı etkisinin gösterge olarak kullanıldığı çalışmada, tebufenpyrad ve chlorfenepyr'in mitler üzerindeki toksik etkisini geraniol ve barbitol'ün 20 kat düşürdüğü saptanmıştır. Yine geraniol, bifenthrin ve pyridaben'in toksik etkilerini düşürmüş, barbitol pyridaben'in etkisini değiştirmemiş bifenthrin'in etkisini ise arttırmıştır (Pottelberge ve ark., 2008).

15 gün süreyle oral yolla 5, 6 ve 18 mg/kg v.a. olacak şekilde piretroit insektisitlerden Deltamethrin verilmiş farelerin karaciğer ve böbreklerinde LPO uyarılmış, GPx, GST ve CAT aktiviteleri baskılanmış, glutatyon düzeyi de azalmıştır. GSH düzeyinin böbrekte karaciğerden daha çok azaldığı saptanmıştır (Rehman ve ark., 2006).

Piretroitleri metabolize eden karboksilesterazların insan, sıçan ve tavşandaki etkileri karşılaştırılmış, bunların piretroit metabolizmasında benzer etkileri gösterdiği belirtilmiştir (Ross ve ark., 2006).

Orgonofosforlu bir pestisit olan dimethoate'ın subkronik kullanımında bazı dozlarda, sıçan beyin ve karaciğerinde oksidatif stresi attırıcı etkisi görülmüştür. Bu çalışmada sitokrom P-450, LPO, CAT, SOD, GPx ve GR aktivitesi artmış, eritrositlerde AChE inhibisyonu görülmüştür. Antioksidant sistemdeki bozukluklar LPO'ya neden olmuştur. G6PD'nin önemli olmayan düzeyde değiştiği de belirtilmiştir (Sharma ve ark., 2005).

Yaygın olarak kullanılan piretroitlerin in vivo çalışmada sıçanların motor fonksiyonları üzerine etkisi araştırılmış, doza bağlı olarak azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Wolansky ve ark., 2005).

Herbicide oxyfluorfen'in 0.3 mg/L dozu ile 7, 14 ve 21 gün muamele edilen *Orechromis niloticus'*da karaciğerin CAT seviyesinin arttığı gözlenirken ve 0.6 mg/L

dozu ile 21 boyunca muamele edilen balıkların karaciğer CAT aktivitesinde ise azalma görülmüştür (Peixoto ve ark., 2005).

Kenelerde in-vitro çalışmalarda bir çok akarisitin rekombinant GST aktivitesini azalttığı bulunmuştur (da Silva Vaz ve ark., 2004).

Sıçan lökositlerinde ve beyin sinaps yerlerinde piperonil butoksit ve piretroitlerin Ca-ATPaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada permethrine'in tek başına ATPaz aktivitesini her iki membranda inhibe ettiği, esbiol ve cyfluthrin'in yalnız olarak membranları etkilemediği, PBO'nun tek başına membranlarda enzimi % 10-15 inhibe ettiği fakat piretroit ile birlikte ise membranlarda % 40 inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (Grosman ve Diel, 2004).

Malathion'un erkek wistar ratlarda oksidatif stresi arttırdığı, eritrosit ve karaciğerde MDA'yı arttırdığı ve AChE'nin aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Akhgrari ve ark., 2003).

Bir insektisit olan propoxur'un 30 gün süreyle sıçanlara günlük 10, 30 ve 90 mg/kg v.a. dozları uygulanmıştır. Yapılan incelemelerde kanda glutatyon düzeyinin düştüğü, serumda malondialdehit düzeyinin ve GSH aktivitesinin arttığı, kırmızı kan hücrelerinde CAT ve SOD, plazmada GR ile tüm kanda GPx'in aktivitelerinin ise yükseldiği saptanmıştır (Seth ve ark, 2001).

İnsanlarda ve deney hayvanlarındaki uygulamalarda, serbest radikallerin hasarının biyomarkırları dört ana grupta toplanmış ve bunlardan birinin lipit peroksidasyonu ürünleri olduğu belirtilmiştir (de Zwart ve ark., 1998).

Bir insektisit olan Hexachlorocyclohexane'nin sıçanlara i.p. olarak verilmesinden sonra ergin ve ergin olmayan sıçanlarda testislerin antioksidant sistemleri ve LPO düzeyi karşılaştırılmış, her iki gruptaki testis homojenatlarında LPO düzeyi artmış ve bu düzey 6 ile 24 saat arası aynı kalmıştır. Fakat GPx ve GR aktiviteleri değişmemiş, SOD aktivitesi gençlerde daha çok azalmış, CAT ise farklı yaş gruplarında aynı düzeyde azalmıştır. Sıçanlarda epididimal sperm sayısına bakılmış, spermatozoaların hasarı ve ölümü önemli ölçüde artmıştır. Bu çalışmaya göre sıçanlarda akut HCH'ın testislerde oksidatif stresi başlatıcı etkisi görüldüğü bildirilmiştir (Samanta ve Chainy,1997).

Organafosfatlı pestisit olan Quinalphos'un 60 gün boyunca sıçanlara ağız yoluyla verilmesini takiben beyin ve karaciğerde sitokrom P-450 ve antioksidant enzimlerine bakılmıştır. Muameleli sıçanlarda beyin ve karaciğer ağırlıkları azalmış, karaciğerde sitokrom P-450'yi indükleyen enzimler olan CAT, GR, SOD ve GSH–peroksidaz enzimlerinin aktivitesi ile beyinde CAT aktivitesi artmış, GSH azalmış, fakat LPO ve glutatyon içeriği önemli ölçüde değişmemiştir (Dwivedi ve ark., 1997).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada intra-peritonal olarak günlük 5 ve 10 mg/kg v.a. olmak üzere delthamethrin'in saf ve ticari şekli uygulanmış, NADPH-sitokrom P-450 redüktaz, aril-hidrokarban hidroksilaz, aminopirin N-dimetilaz, glutamil sistein sentataz, GSH, GPx, CAT, peroksizomal asil-koA oksidaz ve ürat oksidaz üzerine ticari formun daha etkili olduğu bulunmuştur (Villarini ve ark., 1995).

Paraguat etkisinde *C.Carpio*'da eritrositlerde, GPx aktivitesinde azalma meydana gelmiştir (Matkovics ve ark., 1987).

Bir akarisit olan plictran'ın, sıçanlarda hepatik adenilat siklaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Merali ve ark., 1975).

2.2.Test Maddeleri Cyfluthrin ve Etoxazole ile Yapılan Çalışmalar

Cyfluthrin verilmiş farelerin eritrositlerinde CAT ve SOD aktivitesinin azaldığı, plazmalarında ise MDA düzeyinin arttığı saptanmıştır (Eraslan ve ark., 2006). Cyfluthrin'in subletal dozlarının etkisinde *Cyrinus carpio* L.'nin beyninde MDA düzeyi artmış, sodyum kanalları bloke edilmiştir (Sepici-Dinçel ve ark., 2009). Cyfluthrin'in Ames testinde mutajen olmadığı fakat insan lenfositlerinde kromozom anormalliklerini ve mikronükleus oluşumunu artırdığı, sıçanlarda da genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ila ve ark., 2008).

Etoxazole'nin *Oreochromis niloticus*'un solungaç, böbrek ve kas dokularında oksidatif strese neden olmadığı artan SOD aktivitesiyle açıklanmış, Na, K-ATPaz aktivitesi solungaç ve kasta artarken böbrekte azalmıştır. Ca ve Mg-ATPaz aktivitelerinde önemli değişiklik olmamıştır. MDA düzeyi 15 günlük etoxazole etkisinde böbrek ve kasta yükselmiş, solungaçta ise 7. gün azalmış diğer günlerde ise değişmemiştir (Üner ve ark., 2005).

Tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un karaciğerinde etoxazole'nin toksik etkisinin araştırıldığı çalışmada antioksidant enzimlerden CAT, SOD ve GPx aktivitesinde değişiklik gözlenmemiş, Na, K-ATPaz aktivitesinde önemli olmayan değişim, AChE aktivitesinde ise önemli bir azalma, MDA düzeyinde ise artma gözlenmiştir. GPT aktivitesinde değişiklik görülmediğinden etoxazole'ün hepatoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Sevgiler ve ark., 2004).

İnsan lenfositlerinde etoxazole (etx)'un genetoksik etkisi kromozom aberasyon (CA), sister kromatid değişikliği (SCE) ve mikronukleus testi ile araştırılmış, etoxazole'un tüm konsantrasyonlarda CA, SCE ve mikronukleus oluşumunu indüklediği, aynı zamanda mitotik indeksi (MI) de düşürdüğü bildirilmiştir (Rencüzoğulları ve ark., 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan Wistar Albino Sprague Dawley ırkı sıçanlar (*Rattus norvegicus* var. albinos) Ç. Ü. Tıbbi Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM) biriminden temin edilmiştir. TIBDAM biriminden alınan sıçanların laboratuvar koşullarına 2 hafta boyunca adaptasyonları sağlanmıştır. Sıçanlar her kafeste 5'er adet olmak üzere 12 saatlik fotoperiyotta ve 22±1,5°C sıcaklıkta tutulmuştur. Deney süresince hayvanlar standart yem ile beslenmiştir. Denemelerde 248±18 gram ağırlıktaki bireyler kullanılmıştır. Sıçan ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (P>0.05). Nem ise 48-56 aralığında sabitlenmiştir.

3.2. Test Maddeleri

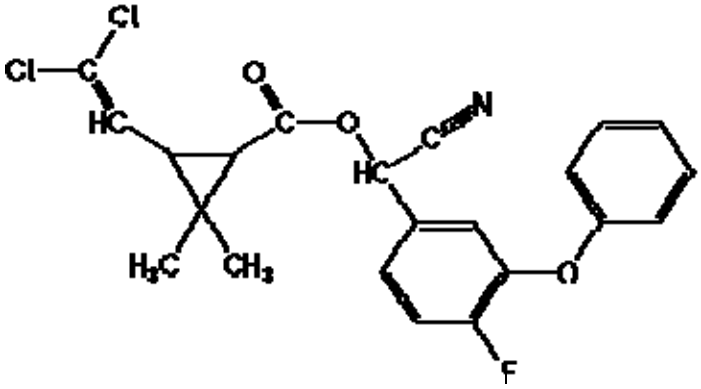
3.2.1. Cyfluthrin

Cyfluthrin sentetik piretroittir (cyano(4-fluoro-3-phenoxyphenyl) methyl-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2dimethylcyclopropanecarboxylate). Memelilere karşı orta düzeyde toksik etkisi vardır. EPA tarafından akut toksisite açısından tip 2 sınıflandırmasına sokulmuştur.

Fiziksel özellikleri:

Görünüm	**:**Soluk sarı
Kimyasal Adı	**:**Cyano(4-fluoro-3-phenoxy-phenyl)methyl3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate.
Moleküler ağırlığı	**:**434,3
Suda çözünürlüğü	**:**0.002 mg/ml 20°C'de
Ergime noktası	:Bilinmiyor
Ticari adları	:Baythroid, Baythroid H, Attatox, Contur, Laser, Responsar, Solfac, Tempo

Açık Formülü:



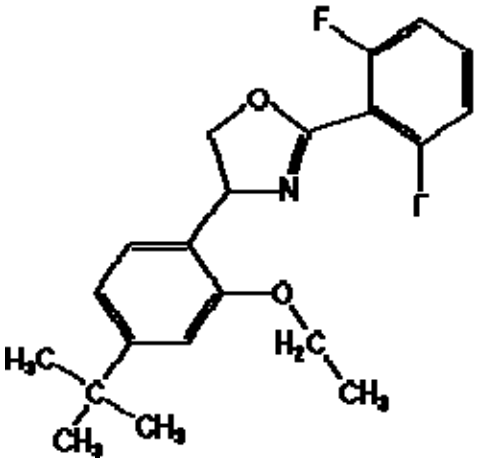
3.2.2.Etoxazole

Etoxazole bir difenil oxazoline akarisittir ve meyve, pamuk ve çilek zararlıları ile mücadele için üretilmiştir. Bu pestisitin karbamatlılar, organoklorinler, organofosfatlar ve piretroid pestisidlere alternatif olduğu düşünülmektedir (Rencüzoğulları ve ark., 2004).

Fiziksel özellikleri:

Kimyasal adı	:2-(2,6-difluorophenyl)-4-[4-(1,1-dimethylethyl)-2-ethoxyphenyl]-4,5-dihydrooxazole
Moleküler Ağırlığı	:359.4
Görünüşü	:Beyaz
Kapalı Formülü	:C21H23 F2 NO2
Ticari adları	:Zoom, Virk ve Baroque
Kaynama Noktası	:101-102°C

Açık Formülü :



3.3. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler

3.3.1. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,1,3,3 tetrametoksipropan		Sigma
2-[2-Tiyobarbitürik asit]	TBA	Merck
Bakır sülfat	$CuSO_4.5H_2O$	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat	$Na_2HPO_4.12H_2O$	Merck
Dipotasyum hidrojen fosfat	K_2HPO_4	Merck
DL-Alanin		Merck
Etilendiamin tetraasetik asit	EDTA	Sigma
Folin-Ciocalteu fenol ayıracı		Sigma
Glutatyon redüktaz	GR	Sigma
Glutatyon	GSH	Sigma
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Merck
Lauril sülfat	SDS	Sigma
n-Butanol		Merck
Piridin		Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	KH_2PO_4	Merck
Sığır serum albumini		Sigma

Sodyum dihidrojen fosfat	$NaH_2PO_4.2H_2O$	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
Sodyum karbonat	Na_2CO_3	Merck
Sodyum klorür	NaCl	Merck
Sodyum potasyum tartarat		Sigma
Sükroz		Sigma
t-Butil hidroperoksit		Sigma
Tris baz		Sigma
5-5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik asit)	DTNB	Sigma
Tris hidroklorit	Tris HCl	Sigma
β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	β-NADPH	Sigma
Asetilkoliniyodür		Sigma
Etopropazin		Sigma

3.3.2. Bu Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. Derin Dondurucu(Örnek Saklamak için)	SANYO
2. PH metre (Tamponların pH'ını ayarlamak için)	WTW
3. Terazi (Sıçan tartmak için)	Scaltec SPB 53
4. Analitik Terazi (Çözelti hazırlamak için)	Sartorius, Gec Avery
5. UV Spektrofotometre (fotometrik ölçümler için)	CECİL
6. UV Spektrofotometre (Aktivite ölçümü için)	VARIAN 50 BIO
7. Homojenizatör (homojenat hazırlamak için)	Ultra Turrax T-25
8. Soğutmalı Santrifüj (Homojenat hazırlamak için)	SIGMA
9. Santrifüj (MDA ölçümü için)	Hettich
10. Benmari (MDA ölçümü için)	Nüve BM 101
11. Otomatik pipetler	Gillman, Eppendorf, Isolab
12. Buz Makinesi	Scotsman AF 10
13. Distile su cihazı	Millipore
14. Manyetik Karıştırıcı (Kimyasal hazırlamak için)	Janke&Kunkel Ikamag

3.4. Metod

3.4.1. Test Maddelerinin Deney Hayvanlarına Verilmesi

Denemeler, kontrol gruplarıyla aynı laboratuvar koşullarında olmak üzere, her kafeste 5'er sıçan olacak şekilde toplam 9 kafeste yürütülmüştür. Deneme sürecinde deney çözeltileri her gün taze hazırlanan stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanmış ve sıçanlara intraperitonal (i.p.) olarak verilmiştir.

Cyfluthrin için kafeslerden biri kontrol (Serum Fizyolojik), biri çözücü kontrol (DMSO) olarak seçilmiş, diğer 3 kafeste bulunan hayvanlar ise Cyfluthrin muamelesi için kullanılmıştır. Test maddesi 21 gün boyunca günlük 1.2, 12 ve 120 mg/kg v.a./gün dozlarında olacak şekilde sıçanlara verilmiştir. Test maddesi DMSO içinde çözülmüştür. Belirlenen konsantrasyonlar hayvanlara 500 µl/kg DMSO içinde verilmiştir. Bundan dolayı DMSO kontrol gruplarına DMSO'dan 500 µl/kg/gün, serum fizyolojik kontrol gruplarına da %0.9 NaCl çözeltisinden 500 µl/kg/gün verilmiştir.

Etoxazole denemelerinde hayvanlar 4 kafese paylaştırılmıştır. Etoxazole suda yayıldığı için, kontrol grubu olarak birinci kafesteki sıçanlara 21 gün boyunca serum fizyolojik verilmiş, diğer 3 kafesteki hayvanlar ise 2.2, 11 ve 22 mg/kg b.w/gün olacak şekilde ve 21 gün süreyle etoxazole ile muamele edilmiştir.

21 günlük süre bitiminde test maddesi ve kontrolleri için kullanılan sıçanların tamamı aynı gün içinde boyunları kırılarak (servical dislocation) öldürülmüştür. Diseksiyon sırasında her sıçandan böbrek ve karaciğer dokuları alınmıştır. Bu dokular % 0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra -85^{o}C'de saklanmıştır.

Analizlere hazırlamak üzere her doku 1/10 w/w olacak şekilde 0.25 M sükroz tamponunda pH 7.4'e ayarlanarak homojenizatörde 5 dakika homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 10000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Süpernatant, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktiviteleri ile MDA miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4.2. Analiz Yöntemleri

3.4.2.1. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm Yöntemi

Prensip

GPx, hidrojen peroksit tarafından redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. Hidrojen peroksit t-butil hidroperoksitin ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'in $NADP^+$'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür (Beutler E., 1975)

$$2\ GSH + R\text{-}O\text{-}O\text{-}H \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O \quad (3.1)$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2\ GSH + NADP^+ \quad (3.2)$$

Ayraçlar

1. 7 mM t-butil hidroperoksit
2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. Tris tamponu (pH 8.0)

Yöntem

Ayraçlar tüplere Çizelge 3.1.'de gösterildiği şekilde konulur:

Çizelge 3.1. GPx Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)
Saf su	660
Tris tamponu	100
GSH	20
GR	100
NADPH	100
Örnek	10
37˚C'de 10 dakika inkübe edilir	
t-butil hidroperoksit	10 eklenir.

Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan tepkime 37˚C'de 1 cm ışık yolu bulunan kuvartz küvetlerde, 340 nm dalga boyunda 0., 2.5., 5. dakikalarda absorbans değerleri ölçülerek izlenir.

Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_ö} \quad (3.3)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

$V_ö$ = Örnek hacmi

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPx aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.4)$$

3.4.2.2. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemi

Prensip

CAT H_2O_2'in yıkımını katalize eder. H_2O_2'in katalaz tarafından yıkım hızı H_2O_2'in 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Beutler E., 1975).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2 \quad (3.5)$$

Ayraçlar

1. 10 mM H_2O_2
2. 1 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. Tris Tamponu (pH 8.0)

Yöntem

Ayraçlar tüplere Çizelge 3.2.'de gösterildiği şekilde konulur:

Çizelge 3.2. Katalaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	50	50
H_2O_2	-	900
H_2O	930	30
37˚C'de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek	20	20 eklenir.

Kör ve örneğin absorbansı 230 nm dalga boyunda 0., 2.5. ve 5. dakikada ölçülür.

Hesaplama

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD \times V_t}{0.071 \times V_{ö}} \quad (3.6)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam hacim

$V_{ö}$ = Örnek hacmi

0.071 = H_2O_2'in 230 nm'deki mM ekstinksiyon katsayısı

$$\text{Katalaz Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.7)$$

3.4.2.3. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi

Prensip

Proteinlerin birçoğu tirozin, triptofan veya her iki aminoasiti de içerirler. Bu aminoasitler serbest veya katlanmamış bir polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungustik molibdik asit ayıracını (Folin-Ciocalteu) indirgerler. Bu yöntemde proteinler ilk olarak bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak için alkali çözeltide Cu^{+2} ile reaksiyona girerler. Ortama Folin-Ciocalteu ayıracı eklendiğinde, indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan kalıntıları birleşirler. Renkli çözeltinin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür (Lowry ve ark. 1961),

Ayraçlar

1. Alkali Na_2CO_3 çözeltisi

2. Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi:

%1 $CuSO_4.5H_2O$

%2 Na-K tartarat

Kullanılacağı zaman bu çözeltiler eşit hacimde (1:1) karıştırılarak hazırlanır.

3. Alkali çözelti (Günlük olarak hazırlanır.): 50 mL alkali Na_2CO_3 çözeltisi 1 ml 2 numaralı çözelti ile karıştırılarak hazırlanır.

4. Folin-Ciocalteu ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu ve 1.5 mL saf su oranı korunacak şekilde hazırlanır.

Yöntem

Ayraçlar tüplere Çizelge 3.3.'de gösterildiği şekilde konulur:

Çizelge 3.3. Protein yöntemi

Çözeltiler (mL)	Kör	Standart	Örnek
Standart	-	0.3	-
Saf su	0.3	-	-
Alkali çözelti	3	3	3
Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.			
Folin-Ciocalteu ayıracı	0.3	0.3	0.3 eklenir.

Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir ve 750 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

Hesaplama

Örneklerin içerdiği protein miktarı sığır serum albumini kullanılarak çizilen standart eğriden değerlendirilir.

3.4.2.4. Asetilkolinesteraz Aktivite Ölçüm Yöntemi

Kolinesterazlar, asetiltiyokolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin oranı ile DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2- nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm'de ölçülür (Elman ve ark., 1961).

Ayraçlar

1. 0,1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH:8,0)

15,4538 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$

0,9322 g KH_2PO_4

Saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

2. 0,1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH:7,0)

1,3871 g $Na_2HPO_4.12H_2O$

0,8338 g KH_2PO_4

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3. 0,01 M DTNB

0,3963g DTNB 100 mL pH:7,0 fosfat tamponunda manyetik karıştırıcıda karıştırılarak eritilir ve koyu renkli bir şişede +4°C'de saklanır.

4. 8,52 x 10^{-3} M Etopropazin (BChE inhibitörü) (günlük hazırlanır)

0,003g Etopropazin

10 mL saf suda eritilir.

+4°C'de 3-4 gün dayanıklıdır.

5. 0,015 M Asetilkoliniyodür (günlük hazırlanır) (5 örnek için)

0,0043g Asetilkoliniyodür

1 mL saf suda eritilir.

Yöntem

Ayraçlar küvete çizelge 3.4'te açıklandığı gibi konur.

Çizelge 3.4 Asetilkolinesteraz Yöntemi

Ayraçlar	Kör (μL)	Örenk (μL)
0,1 M pH:8,0 Fosfat Tamp.	2,70 mL	2,55 mL
Örnek	200	200
0,01 M DTNB	100	100
Etopropazin	-	50
30°C'de 5 dakika inkübe edilir		
Asetilkoliniyodür	-	100

Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda 0. ve 5. dakikadaki absorbansları ölçülür. Örnek ve kör küvetleri aynı anda spektrofotometreye yerleştirilir.

$$\text{AChE aktivitesi (U/mL)} = \frac{OD_5 - OD_0}{t(5)} \text{ x } \frac{Vt(3mL)}{Vornek(0{,}2mL)} /13{,}6 \qquad (3.8)$$

OD=Belirtildiği zamana göre absorbans değeri

3.4.2.5. Malondialdehit Miktarı Ölçüm Yöntemi

Prensip

MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA, aerobik şartlarda, pH 3.4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95˚C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark., 1979).

Ayraçlar

1. %8.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20 Asetik asit (HAc) (pH 3.5)
3. %0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3.5)
4. n-Butanol-piridin (nBu-Pri) çözeltisi (15/1)
5. Stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk: 0.99 g/mL)

Standart Eğri Çizimi

Günlük Standart

Stok standarttan 6.6 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanır (400 nmol/mL'lik günlük standart olur.). 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanır. Bu standartlar çizelge 3.5'te gösterildiği gibi tüplere konulur.

Çizelge 3.5. MDA standart eğrisinin hazırlanması

Çözeltiler (mL)	Kör	10*	20*	30*	40*	60*	80*	100*
Standart	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
HAc	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf Su	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95˚C'de benmaride 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.								
Saf Su	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Kuvvetle vortekslenir ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbansı okunur.

* = nmol/mL

Yöntem

Ayraçlar tüplere Çizelge 3.6'da gösterildiği şekilde konulur:

Çizelge 3.6. MDA Yöntemi

Çözeltiler (mL)	Kör	Standart	Örnek
Standart (10 nmol/mL)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
HAc	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf Su	0.8	0.7	0.7
95˚C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.			
Saf Su	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri	5.0	5.0	5.0

Kuvvetle vortekslenir ve 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbansı okunur. Sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

3.3. Verilerin İstatistiki Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler SPSS programında Student Newman Keul's Test (SNK) uygulanarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve çözücü kontrol ile pestisit muameleli gruplar karşılaştırılmıştır.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Bulgular

Cyfluthrin ve Etoxazole'un farklı derişimlerinin etkisinde 21 gün süreyle bırakılan Wistar Albino Sprague Dawley cinsi sıçanların karaciğer ve böbreklerinde antioksidan enzim aktiviteleri, AChE spesifik aktivitesi ve MDA düzeyine etkilerini belirlemek üzere elde edilen verilerin istatistik değerlendirmeleri yapılarak bulgular çizelge ve şekiller halinde sunulmuştur. Bu sürede ölüm görülmemiştir. Her bir pestisitin anılan paremetreler üzerine etkileri sırayla incelenmiştir.

4.1.1.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi, AChE Spesifik Aktivitesi ve MDA Düzeyine Etkisi

4.1.1.1.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

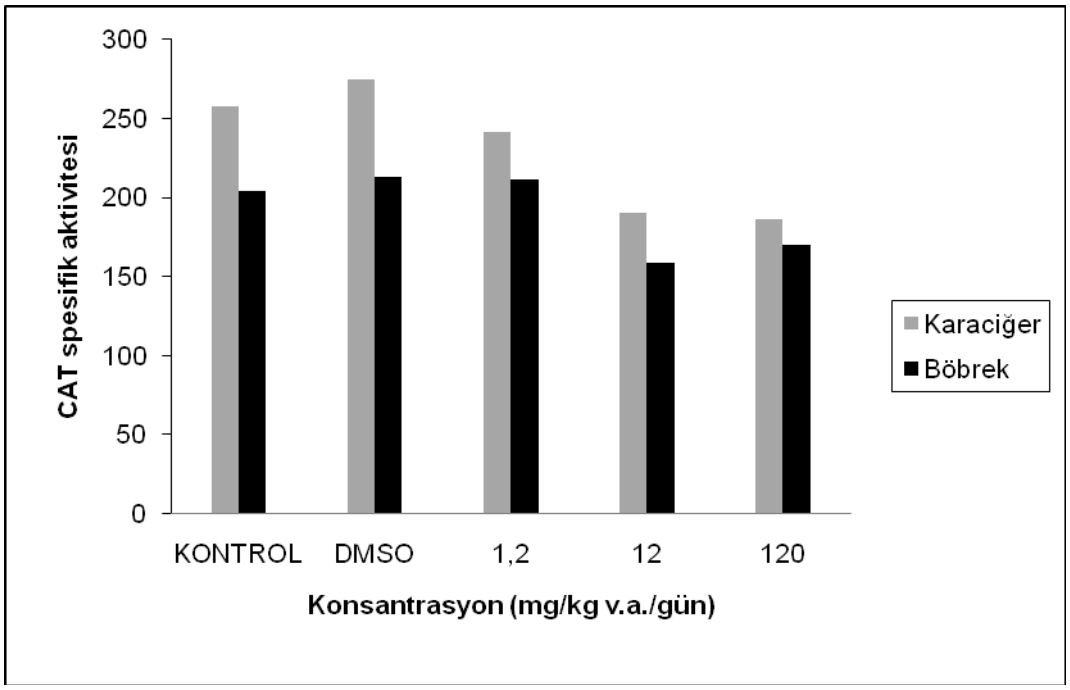
Cyfluthrin ile muamele edilen sıçanların karaciğer CAT spesifik aktivitesinin en düşük dozda serum fizyolojik ve DMSO kontrole göre önemli olarak değişmediği fakat, yüksek dozlarda CAT spesifik aktivitesinin serum fizyolojik ve DMSO'dakine göre önemli derecede azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil.4.1). Böbrekten elde edilen sonuçlarda karaciğerdeki sonuçlara benzemektedir (Çizelge 4.1 ve Şekil.4.1).

Çizelge 4.1.Cyfluthrin'in *sıçan* karaciğer ve böbreklerinde CAT spesifik aktivitesine etkileri (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN $X \pm S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	258,92 ± 16,37 a	204,47 ± 06,08 a
DMSO	274,29 ± 11,63 a	212,73 ± 12,70 a
1,2	241,46 ± 14,26 a	211,29 ± 08,78 a
12	190,13 ± 10,92 b	158,35 ± 13,59 b
120	186,03 ± 03,78 b	169,76 ± 10,18 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* $X \pm S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde CAT spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

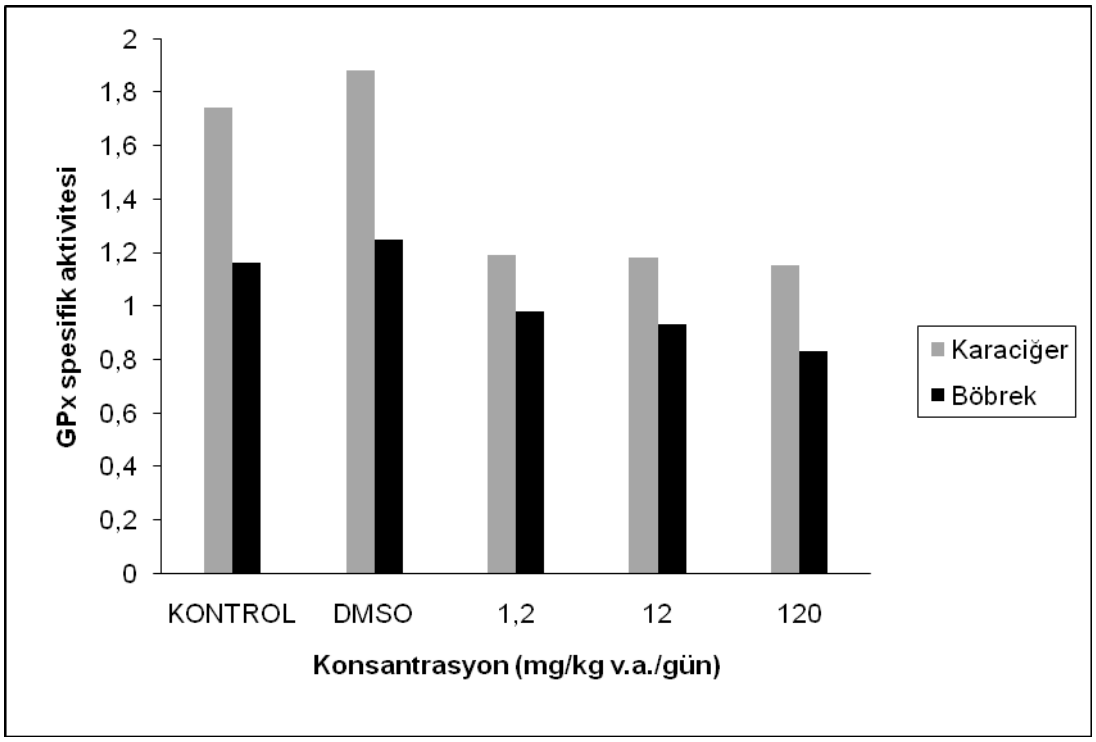
Cyfluthrin'in sıçanların hem karaciğerlerinde hem de böbreklerinde GPx spesifik aktivitesi üzerindeki etkisi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de görülmektedir. Cyfluthrin karaciğer GPx spesifik aktivitesini, serum fizyolojik kontrole ve DMSO muameleli gruba göre tüm konsantrasyonlarda önemli olarak azaltmıştır. Böbrekte ise GPx spesifik aktivitesi DMSO ile serum fizyolojik kontroller arasında herhangi bir fark görülmemiş fakat muameleli grubun tüm konsantrasyonlarında DMSO'dakine göre azalmıştır. Serum fizyolojik kontrole göre ise en düşük konsantrasyonda değişim göstermemiş, diğer konsantrasyonlarda azalma görülmüştür (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2.Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde GPx spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN X±$S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	1,74 ± 0,12 a	1,16 ± 0,03 ab
DMSO	1,88 ± 0,07 a	1,25 ± 0,09 a
1.2	1,19 ± 0,03 b	0,98 ± 0,08 bc
12	1,18 ± 0,08 b	0,93 ± 0,05 c
120	1,15 ± 0,04 b	0,83 ± 0,04 c

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* X±$S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.2.Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde GPx spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

4.1.1.2.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi

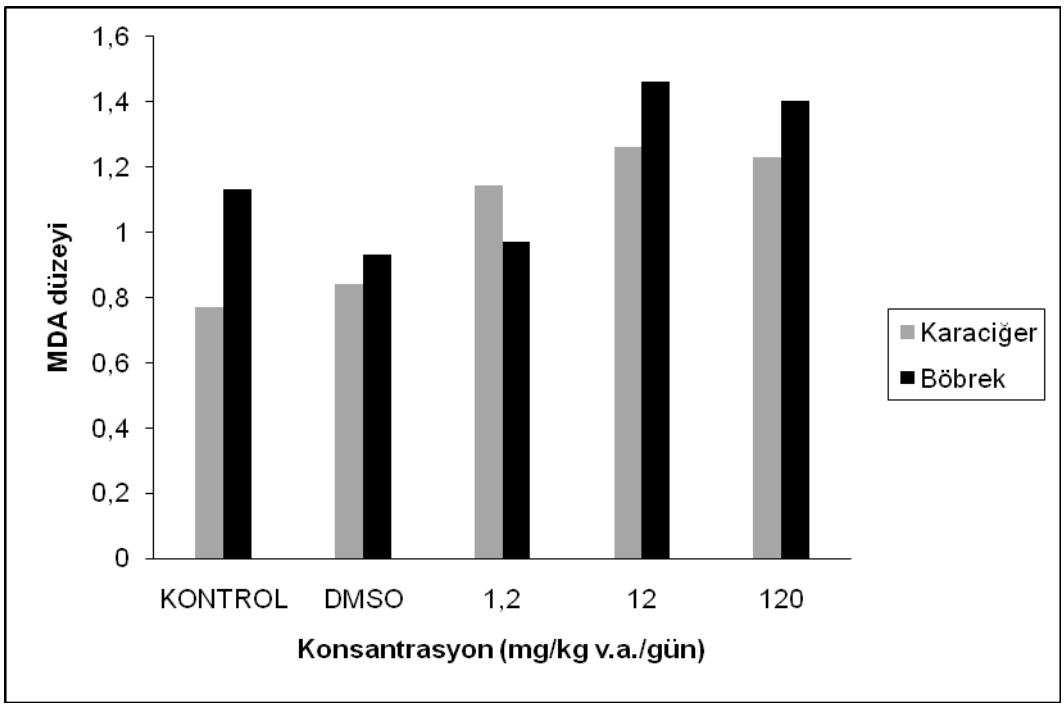
Cyflutrin ile muamele edilen sıçanların karaciğer MDA düzeyleri tüm konsantrasyonlarda serum fizyolojik kontrole ve DMSO kontrol grubuna göre artarken, böbrekte ise en düşük konsantrasyonda serum fizyolojik kontrole ve DMSO grubuna göre MDA düzeyinde herhangi bir farkın olmadığı saptanmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise böbrek MDA düzeyinin her iki kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmış olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.3.Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde MDA düzeyine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN $X \pm S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol	0,77 ± 0,08 a	1,13 ± 0,05 a
DMSO	0,84 ± 0,09 a	0,93 ± 0,04 a
1.2	1,14 ± 0,06 b	0,97 ± 0,05 a
12	1,26 ± 0,04 b	1,46 ± 0,12 b
120	1,23 ± 0,05 b	1,40 ± 0,07 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* $X \pm S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil.4.3. Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde MDA düzeyine etkisi (U/mg protein)

4.1.1.3.Cyfluthrin'in Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Asetilkolinesteraz (AChE) Spesifik Aktivitesine Etkisi

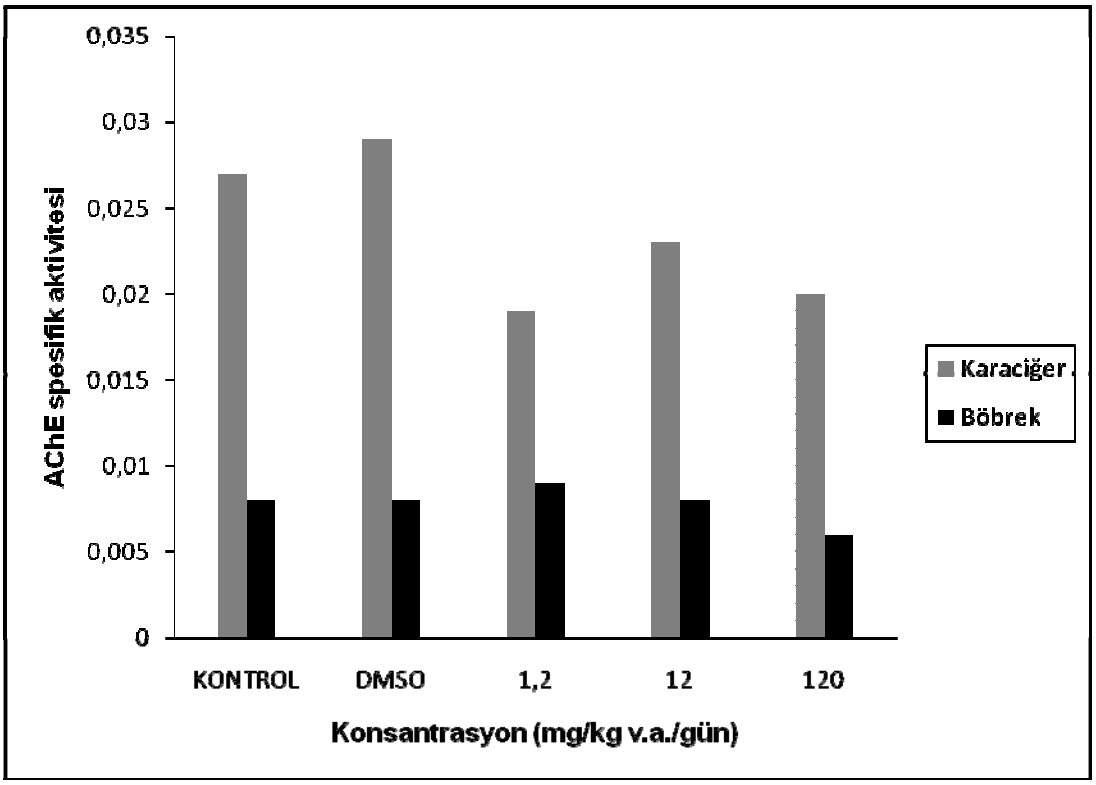
Cyfluthrin ile muamele edilen sıçanların karaciğer AChE spesifik aktivitesi tüm dozlarda hem serum fizyolojik kontrole hem de DMSO kontrole göre önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır. Böbrekte ise AChE spesifik aktivitesi serum fizyolojik kontrole ve DMSO kontrole göre ilk iki konsantrasyonda değişim görülmezken, en yüksek konsantrasyonda bu iki kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.4.Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde AChE spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN	
	$X \pm S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol	0,027 ± 0,001 a	0,008 ± 0,000 a
DMSO	0,029 ± 0,006 a	0,008 ± 0,000 a
1.2	0,019 ± 0,003 b	0,009 ± 0,001 a
12	0,023 ± 0,003 b	0,008 ± 0,001 a
120	0,020 ± 0,002 b	0,006 ± 0,000 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* $X \pm S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.4.Cyfluthrin'in sıçan karaciğer ve böbreklerinde AChE spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

4.1.2.Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi, AChE Spesifik Aktivitesi ve MDA Düzeyine Yanıtı

4.1.2.1.Etoxazole'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

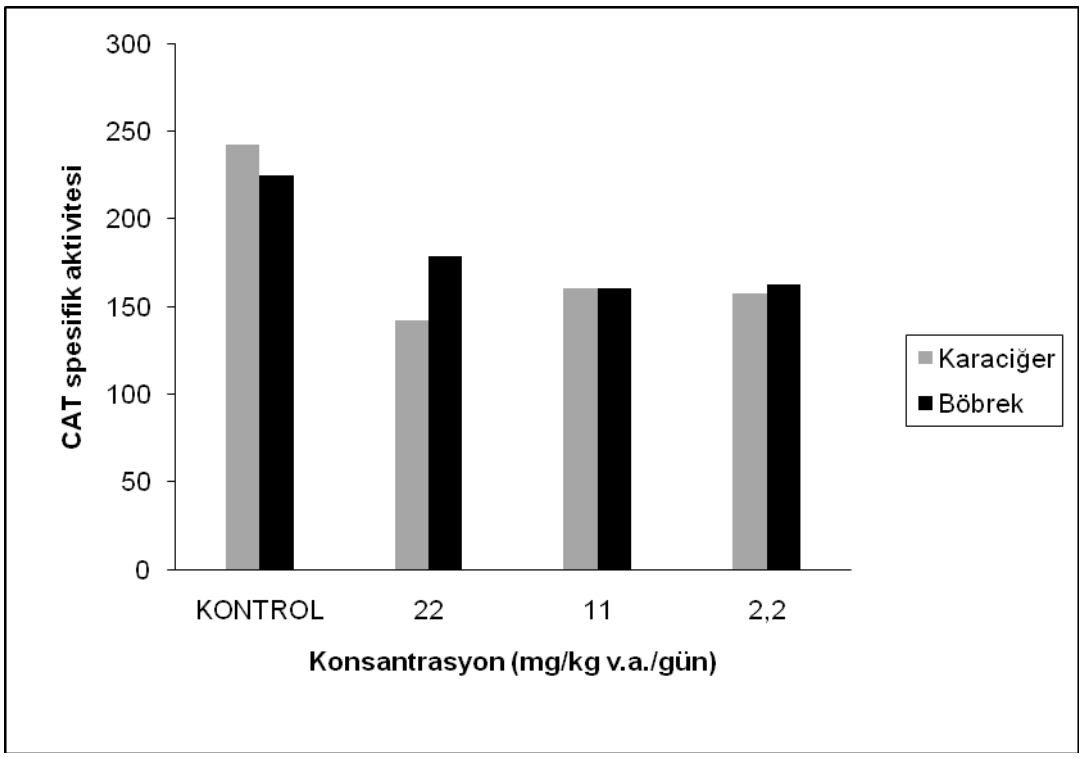
Etoxazole ile muamele edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde CAT spesifik aktivitesi tüm konsantrasyonlarda serum fizyolojik kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.5.Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde CAT spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN X±$S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	242,72 ± 9,85 a	225,12 ± 10,83 a
2.2	142,03 ± 7,03 b	178,36 ± 8,26 b
11	160,14 ± 8,70 b	160,08 ± 8,47 b
22	157,62 ± 7,98 b	162,47 ± 6,56 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* X±$S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbrekte CAT spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

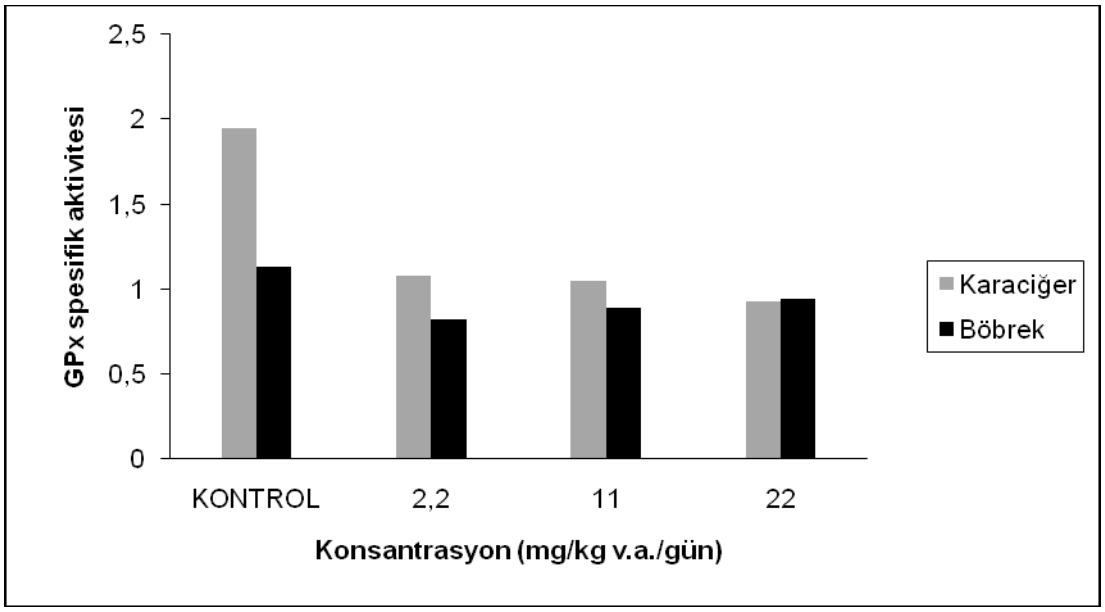
Etoxazole sıçan karaciğer ve böbreklerinde GPx spesifik aktivitesini serum fizyolojik kontrol ile mukayese edildiğinde tüm konsantrasyonlarda istatistiki olarak önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 5.6).

Çizelge 4.6.Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde GPx spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN $X \pm S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	1,95 ± 0,07 a	1,13 ± 0,06 a
2.2	1,08 ± 0,06 b	0,82 ± 0,03 b
11	1,05 ± 0,06 b	0,89 ± 0,04 b
22	0,93 ± 0,05 b	0,94 ± 0,05 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* $X \pm S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde GPx spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

4.1.2.2.Etoxazol'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde MDA Düzeyine Etkisi

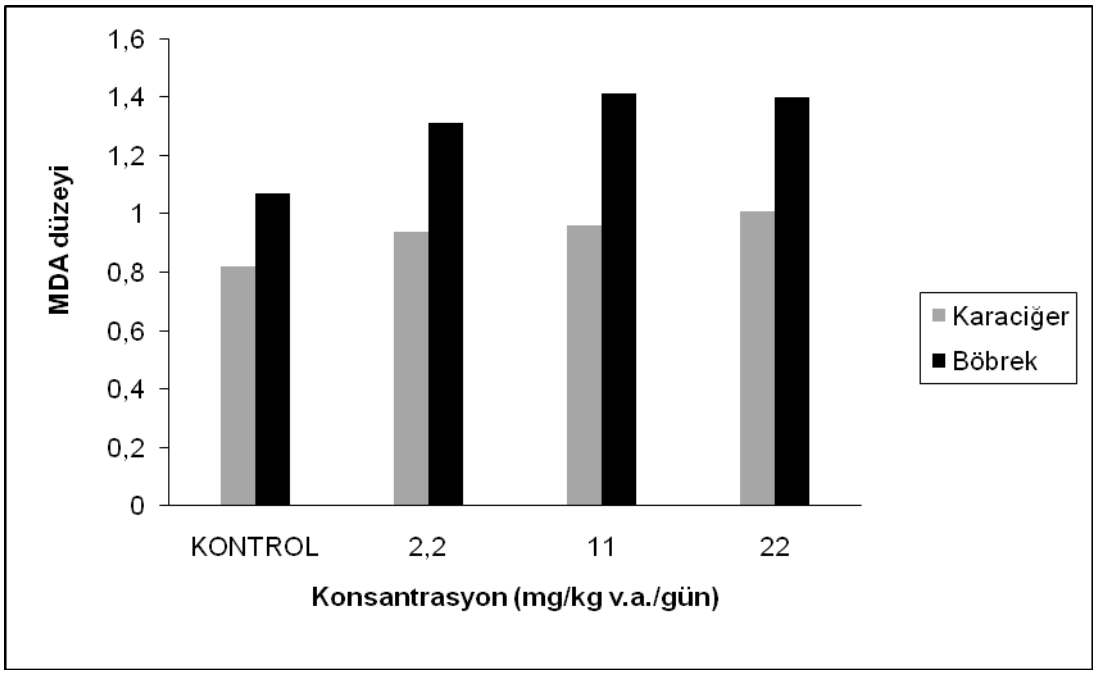
Etoxazole ile muamele edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde yapılan MDA düzeyinin saptanmasına yönelik çalışmalarda MDA düzeyinin hem karaciğerde hem de böbreklerde ve tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.7.Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde MDA düzeyine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN X±$S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	0,82 ± 0,03 a	1,07 ± 0,06 a
2.2	0,94 ± 0,02 b	1,31 ± 0,03 b
11	0,96 ± 0,06 b	1,41 ± 0,05 b
22	1,01 ± 0,02 b	1,40 ± 0,09 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* X±$S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil.4.7. Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde MDA düzeyine etkisi (U/mg protein)

4.1.2.3.Etoxazol'un Sıçan Karaciğer ve Böbreklerinde Asetilkolinesteraz (AChE) Spesifik Aktivitesine Etkisi

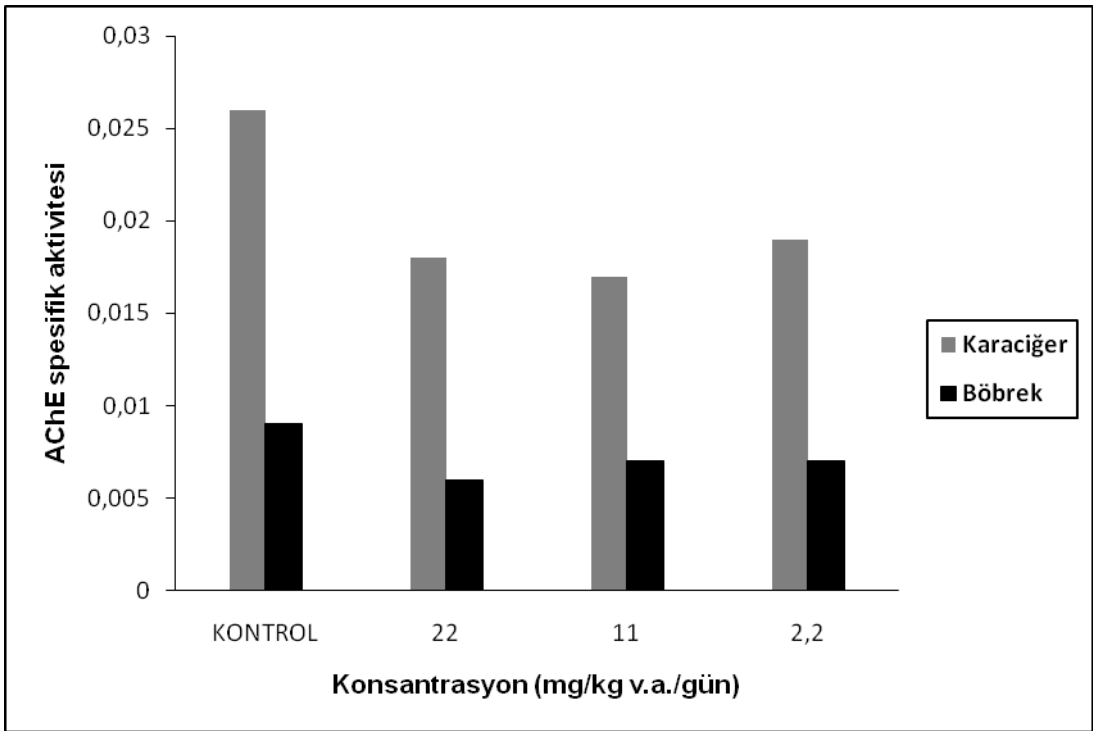
Etoxazole ile değişik dozlarda muamele edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde AChE spesifik aktivitesinin serum fizyolojik kontrol ile mukayese edildiğinde tüm konsantrasyonlarda istatistiksel bakımından önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8.).

Çizelge 4.8.Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde AChE spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

Konsantrasyon (mg/kg v.a./gün)	21.GÜN	
	X±$S_{\bar{x}}$*	
	Karaciğer	Böbrek
Kontrol (serum fizyolojik)	0,026 ± 0,008 a	0,009 ± 0,000 a
2.2	0,018 ± 0,002 b	0,006 ± 0,001 b
11	0,017 ± 0,004 b	0,007 ± 0,000 b
22	0,019 ± 0,004 b	0,007 ± 0,000 b

a, b ve c harfleri veriler arasındaki farkın önemliliğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

* X±$S_{\bar{x}}$=Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.8.Etoxazole'un sıçan karaciğer ve böbreklerinde AChE spesifik aktivitesine etkisi (U/mg protein)

4.2.Tartışma

Bu çalışmada Cyfluthrin ve Etoxazole pestisitlerinin letal olmayan derişimlerinin sıçan karaciğer ve böbreklerinde katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktiviteleri ve MDA düzeyine subkronik etkisi araştırılmıştır. Cyfluthrin, karaciğer ve böbreklerde en düşük dozda CAT aktivitesini etkilemezken, diğer iki dozda CAT aktivitesini azaltmıştır. Etoxazole ise karaciğer ve böbreklerde CAT aktivitesini tüm dozlarda azaltmıştır. GPx aktivitesi, Etoxazole ile muamele edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde serum fizyolojik (SF) kontrole göre tüm dozlarda azalmıştır. Cyfluthrin ile muamele edilen sıçanların karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm gruplarda GPx aktivitesi azalmış, sıçan böbreklerinde SF ile en düşük derişim arasında değişim olmazken, SF'ye göre diğer derişimlerde ve DMSO'ya göre tüm dozlarda GPx aktivitesi azalmıştır. AChE enzim aktivitesi; etoxazole ile muamele edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde SF'ye göre önemli düzeyde azalmıştır. Cyfluthrin ile muamele edilen sıçanların

karaciğerinde SF ve DMSO'ya göre tüm gruplarda AChE enzim aktivitesi azalmış, böbreklerde ise SF ve DMSO kontrol ile mukayesede sadece en yüksek dozda azalma saptanmıştır. Etoxazole, sıçan karaciğer ve böbreklerinde kontrollere göre MDA düzeyini artırırken, cyfluthrin, karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm derişimlerde, böbreklerde ise sadece en yüksek iki dozda MDA düzeyini istatistiki olarak önemli ölçüde artırmıştır. Bu çalışmada, cyfluthrin ve etoxazole'ün memeli dokularında antioksidan savunma sisteminde meydana getirdiği bazı hasarlar tespit edilmiştir.

Pestisitler ve metaller gibi çoğu çevre kirleticileri reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu uyarabilirler (Glusczak ve ark.,2007; Keramati ve ark., 2010). Pestisitlerin farklı türleri H_2O_2, superoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi ROS türlerinin üretimini arttırdıkları saptanmıştır (Banerjee ve ark., 1999). ROS'un düşük miktarları mikroorganizmalara karşı savunmada yararlı olsa da fazla olduğunda yaşlanma, iskemi, bağışıklık ve hormonal fonksiyonların sorununda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Mate's ve ark., 1999). ROS oluşumunun oksidatif strese yol açtığı, bu oksidatif stresin serbest radikal üretimi ile antioksidan aktivite arasındaki dengesizlikte meydana geldiği ve bu durumun hücresel hasarlara yol açtığı bildirilmiştir (Yu ve ark., 2008). Aynı araştırıcılar ROS'un hücrede artışının lipid peroksidasyonunu (LPO) yükselttiğini saptamışlardır.

Yapılan araştırmalarda potansiyel hasara yol açan üç faktörün var olduğu bildirilmiştir: 1) ROS'un artışı, 2) antioksidan savunmanın bozulması ve 3) oksidatif hasarın tamirinde yetersizlik (Dorvel and Hontela., 2003; Keramati ve ark., 2010). Birçok organizmada antioksidan sistem temel olarak SOD, GPx, CAT enzim sistemlerini içerir (Kehrer, 1993; Kerameti ve ark., 2010). SOD, CAT, GPx ve GR gibi ROS yok edici enzimlerin pestisitlerden kaynaklanan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücresel sistemi koruyabildikleri saptanmıştır (Banerjee ve ark., 1999; Yarsan ve ark., 1999; Banerjee ve ark., 2001).

Cossuue ve ark. (1997) kimyasal stres altında antioksidan sistemlerin indüklemesinin adaptasyon olarak değerlendirilebileceğini, adaptasyonun olmaması durumunda organizmanın toksik maddeye duyarlı olacağını ve toksisitenin başlayacağını bildirmişlerdir.

Doymamış yağ asitleri ile serbest radikaller arası reaksiyondan açığa çıkan ve hücresel membranlarda lipid peroksidasyonu (LPO) ana ürünü olan hücresel MDA içeriği LPO'un derecesinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. (Seth ve ark., 2001; Papadimitriou ve ark., 2002; Yu ve ark., 2008).

Tatlı su bivalflerinden (midye) *Unio tumidus*'un kirli ve temiz bölgelerden toplanan örneklerinden elde edilen solungaç ve sindirim organlarının SOD, GPx ve GR düzeylerinde kirli bölgelerde temiz yerden toplanan örneklere göre enzim aktivitelerinde yüksek oranda inhibisyon gözlenmiştir (Cossu ve ark.,1997). İmidacloprid'in memeli sinir sistemi ve karaciğerinde akut oksidant ve iltihabi etkisinin araştırıldığı çalışmada plazma ve karaciğerde MDA miktarı kontrole göre artmış, beyinde değişmemiş, her iki dokuda CAT aktivitesi değişmemiş, GPx beyinde üç kat artarken karaciğerde azalmıştır (Düzgüner ve Erdoğan., 2010). İnsektisit cypermethrin'in 1,10 ve 20 mg/kg dozları uygulanan farelerin testislerinde MDA'nın arttığı, SOD, CAT ve GPx aktivitesinin azaldığı, sonuçta cypermethrin'in testislerin yapısını hasara uğratarak enzim aktivitelerinde oksidatif stres kaynaklı azalmalara yol açtığı bildirilmiştir (Wang ve ark.,2009). Paraguat etkisinde *C.carpio* (sazan) eritrositlerinde, GPx aktivitesinde azalma meydana geldiği ve bu azalmanın O_2^- nin artışına bağlandığı bildirilmiştir (Matkovics ve ark., 1987). Propoxur'un renal hücrelerde ve hepatositlerde bozulmaya sebep olduğu, ROS'un renal hastalıkların patofizyolojik süreçlerinde yaygın rol oynadığı rapor edilmiştir (Seth ve ark., 2001).

Bu çalışmada karaciğer ve böbreklerde benzer sonuçlar görülmüş, 21 gün boyunca cyfluthrin verilen sıçanların karaciğerlerinde kontrol (SF) ve DMSO verilmiş gruba göre tüm derişimlerde GPx aktivitesinde önemli azalma görülmüş, böbreklerde ise SF kontrol ile en düşük derişim arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark olmazken, SF kontrol ile diğer derişimler arası ve DMSO verilmiş grup ile cyfluthrin verilmiş tüm gruplar arasında GPx aktivitesinde istatistiki olarak önemli azalma görülmüştür. Etoxazole etkisine bırakılan sıçanların karaciğer ve böbreklerinde de GPx aktivitesi SF kontrole göre tüm pestisit dozlarında istatistiki olarak önemli ölçüde azalmıştır.

Diazinon'un balıklarda 24. saatte CAT aktivitesini artırması adaptasyon olarak belirtilmiş, 48 ve 96. saatlaerde ise CAT aktivitesinde azalmaya neden

olmuştur (Keramati ve ark., 2010). *Orechromis niloticus* (Tatlı su çuprası) herbisid'in 0.3 mg/L ve 0.6 mg/L konsantrasyonlarındaki oxyfluorfen herbisidi ile 7, 14 ve 21 gün boyunca muamele edilmiş, 0.3 mg/L ile konsantrasyonunda tüm sürelerde karaciğerde CAT aktivitesinde artma gözlenmiş, yüksek dozda ise sadece 21 günlük muamele süresinde CAT aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. (Peixoto ve ark., 2006). Fungisit propiconazole'nin rainbow trout'ta (Gökkuşağı alabalığı) 7, 20 ve 30 günlük etkisinin araştırıldığı çalışmada, oksidatif stres göstergeleri (LPO ve ROS) ve antioksidan (SOD, CAT ve GPx) parametreler ölçülmüş, yedi günlük çalışmada antioksidan savunma sistemi bu etkiye adaptasyonla cevap vermiş, 20 ve 30 günlük sürelerde oksidatif stresin göstergelerinin yüksek seviyeleri ile antioksidan enzimlerde inhibisyon görülmüş, uzun süreli etkide ise ciddi oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2010).

Bu çalışmada etoxazole etkisinde karaciğer ve böbreklerde 21 günlük muamelede de CAT aktivitesi SF kontrole göre tüm konsantrasyonlarda gruplarında istatistiki olarak önemli ölçüde azalmıştır. Cyfluthrin etkisinde karaciğer ve böbreklerde SF kontrol, DMSO ve en düşük derişimin CAT aktiviteleri arasında önemli bir değişim olmazken, bu gruplara göre diğer derişim gruplarının CAT aktivitelerinde önemli ölçüde azalma saptanmıştır. Düşük derişimde CAT aktivitesinin değişmemesi adaptasyon ile açıklanabilirken yüksek derişimlerdeki CAT aktivitesinin azalması pestisitin toksik etkisi olarak açıklanabilir.

Organofosfatlarda olduğu gibi diğer pestisitlerin de AChE enzimini inhibe edebildikleri saptanmıştır (Glusczak ve ark., 2007). AChE pestisitlerin toksik indikatörleri olarak sık sık kullanılır. Sempatik sinapslarda, nöromuskuler kavşaklarda ve merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olan asetilkolin'in miktarını düzenleyen bu enzimin inhibisyonu hayvanları ve insanları ileri derecede etkilediği bildirilmiştir (Sancho ve ark., 2000). Asetilkolinesteraz kolinerjik sinapslarda asetilkolini hidrolize edip görevini sonlandırarak impuls geçişini kontrol eden bir enzimdir (Kamal ve Al-Jafari, 1998). Enzim inhibisyonu sonucu asetilkolin birikmesi aşırı presinaptik uyarıma neden olur, olayın devamı paraliz ve ölümle sonuçlanır (Nemcsok ve ark., 1999). Malathion'un erkek wistar sıçanlarda oksidatif stresi arttırdığı, eritrosit ve karaciğerde MDA'yı arttırdığı ve AChE'nin aktivitesini inhibe

ettiği bildirilmiş, sıçan karaciğerinde AChE ölçümünün iyi bir biyomarkır olarak kullanışlı olduğu gösterilmiştir (Akhgrari ve ark., 2003). Bu çalışmadan ve diğer başka çalışmadan (Kale ve ark., 1999) insektisit piretroitlerin toksisitesinde de ROS'un önemli rolü olduğu anlaşılmaktadır.

Fenthion'un, parathion ve malathion'da olduğu gibi, oxon formunun kolinesteraz inhibitörü olarak davrandığı bildirilmilştir (Kitamura ve ark., 2000). Milatoviç ver ark. (2006) organofosfatlı ve karbamatlı pestisitlerin insanda ve memeli sistemlerdeki toksisitesini nöromuskuler kavşaklar ve sinapslarda AChE'yi inhibe ederek gösterdiğini rapor etmişlerdir. Dişi sıçanlara imidacloprid'in 5, 10 ve 20 mg/kg/gün'lük dozları oral yoldan 90 gün süreyle verilmiş, serum ve beyinde AChE aktivitesi azaldığı saptanmıştır (Bhardwaj ve ark., 2010). Voltaja bağlı sodyum kanallarının açık durumunun uzatılması piretroitlerin yaygın etki mekanizması olarak kabul görmektedir (Vijverberg ve Van Den Bercken., 1990; Narahashi, 2000; Soderlund ve ark., 2002).

Bu çalışmada hem cyfluthrin'in hem de etoxazole'un etkisinde karaciğer ve böbreklerde AChE aktivitesini istatistiki olarak önemli ölçüde azaltıkları saptanmıştır. Bu yönden de diğer araştırıcıların sonuçları ile bu çalışmadan elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyuşmaktadır.

Tetyana ve ark., (2005)'nın bildirdiklerine göre 3-amoni 1,2,4 triazole kirleticisiyle muamele edilmiş goldfish (Japon balığı) ile yapılan çalışmada CAT aktivitesi azalmış, LPO ve oksidatif stres artmıştır. Bir başka çalışmada da cyfluthrin verilmiş farelerin eritrositlerinde CAT ve SOD aktivitesinin azaltıldığı, plazmalarında ise MDA düzeyinin artırıldığı saptanmıştır (Eraslan ve ark., 2006). İnsan eritrositlerindeki in vitro çalışmada bifenthrin'in indüklediği oksidatif strese karşı seçilen flavonolların koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, bifenthrinin antioksidan enzim aktivitelerini azalttığı LPO'yu arttırdığı gözlemlenmiştir (Sodowska-Woda ve ark., 2010). Sıçanlara insektisitlerden hexachlorocyclohexane'nin intraperitonal yoldan verilmesiyle testislerde oksidatif stresi başlatıcı etkisi görülmüştür. Aynı çalışmada CAT düzeyi azalmış buna karşın LPO düzeyi artmıştır (Samantha ve Chainy, 1997). Malathion, anilofos ve bunların kombinasyonları erkek sıçanların karaciğer, beyin ve eritrositlerinde LPO'yu

arttırmıştır (Hazarika., 2003). Organofosforlu insektisit dimethoate'nın maruziyetinde kalan sıçanların beyin ve karaciğerinde oksidatif stres artmış, eritrositlerde LPO'ya sebeb olmuştur (Sharma ve ark., 2005).

Piretroit insektisitlerden deltamethrin farelere oral yolla 15 gün süreyle verilmiş, çalışma sonunda karaciğer ve böbreklerde LPO indüklenmiş, GPx ve CAT enzim aktiviteleri baskılanmıştır (Rehman ve ark., 2006). Sentetik piretroid lamda-cyhalothrin (LTC)'in erkek sıçan böbreklerinde enzim aktiviteleri ve biyokimyasal parametrelerde değişiklikle, oksidatif stresi arttırmaya eğilimi gibi olası etkilerinin ve C vitamininin bunları azaltma kapasitesi üç hafta süreyle araştırılmış; MDA düzeyi artarken C vitamini bunu azaltmış, SOD, CAT, GPx, GR ve GST aktiviteleri azalmış, C vitamini ile LTC'nin beraber etkisinde ise antioksidan durum daha düzgün hale gelmiştir (Fetoui ve ark., 2009). İnsektisit propoxur'un 30 gün süreyle farklı dozlarına maruz kalan sıçanlarda serum MDA düzeyi artmıştır (Seth, 2001).

Bu çalışmada etoxazole ve cyfluthrin ile muamele edilmiş sıçanların karaciğer ve böbreklerinde MDA düzeyinin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlara benzer sonuçları Akhgrari ve ark. (2003) elde etmişlerdir. Bu araştırıcılar malathion'un erkek wistar ratlarda oksidatif stresi ve eritrosit ile karaciğerde de MDA düzeyini arttırdığını saptamışlardır.

İnsanlardaki ve deney hayvanlarındaki uygulamalarda, serbest radikallerin hasarının biyomarkırlarının birkaç ana grupta toplandığı ve bunlardan birisinin de lipid peroksidasyonu ürünleri olduğu bildirilmiştir (de Zwart ve ark., 1998). Pestisitler oksidatif stresi arttırarak serbest radikal üretimine ve LPO'ya yol açmaktadırlar. Enzimatik sistem organik peroksitleri ve metabolitleri azaltan ve uzaklaştıran bir sistemdir. Antioksidan savunma sisteminin kimyasallarla temas durumunda etkilenebileceği bilinmektedir (Kehrer, 1993).

Yukarıdaki çalışmalar göz önüne alındığında, yaptığımız çalışmalarda pestisitlerin etkisinde ROS'un yükseldiğini ve bunun oksidatif strese yol açarak antioksidan enzimleri azalttığını bunun da LPO oluşumunu artırarak membran yapısını bozduğunu artan MDA miktarıyla açıklayabiliriz.

Karaciğerin detoksifasyonda ana organ olduğu (Glusczak ve ark.,2007) ve antioksidanların oksidatif mücadelede böbreğin hassasiyetini azalttıkları

bilinmektedir (Seth ve ark., 2001). Bu çalışmada da pestisitlerin karaciğerde ve böbreklerde enzim aktivitelerini azalttıkları ve MDA düzeyini yükselttiği saptanmıştır. Bu pestisitlerin karaciğerde metabolize oldukları ve böbrekler yoluyla dışarı atıldıkları düşünüldüğünde, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar çalışmamızda test maddesi olarak kullandığımız cyfluthrin ve etoxazole'nin karaciğer ve böbreklerde antioksidan savunma sisteminde bazı hasarlar oluşturabileceklerini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, zirai mücadelelerde, evde ortaya çıkan haşereler ile yapılan mücadelelerde ve veterinerlik alanında kullanılan cyfluthrin ve etoxazole'nin düşük derişimlerinin sıçan karaciğer ve böbreklerinde antioksidan savunma enzimlerinden olan GPx ve CAT spesifik aktiviteleri ile AChE spesifik aktivitesi ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi üzerine etkileri incelenmiştir.

Cyfluthrin etkisinde: karaciğer ve böbrekte kontrol ve Dimetilsülfoksit (DMSO)'e göre en düşük dozda CAT aktivitesi değişmezken, diğer iki dozda azalmıştır. GPx aktivitesi, Karaciğerde SF (Serum fizyolojik) ve DMSO'ya göre önemli derecede azalmıştır. Böbrekte, GPx aktivitesinde SF'ye göre en düşük dozda değişim görülmezken diğer dozlarda önemli azalma, DMSO'ya göre tüm muameleli gruplarda azalma görülmüştür. karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm derişimlerde, böbreklerde ise sadece en yüksek iki dozda MDA düzeyi artmıştır. AChE enzim aktivitesinde, karaciğerde SF ve DMSO'ya göre tüm dozlarda, böbrekte en yüksek dozda azalma görülmüş, diğer dozlarda değişim görülmemiştir. Etoxazole etkisinde karaciğer ve böbreklerde CAT, GPx ve AChE aktivitesi SF'ye göre tüm dozlarda azalırken MDA düzeyinde artma görülmüştür.

Bu çalışmada, cyfluthrin ve etoxazole'nin memeli dokularının antioksidan savunma sisteminde meydana getirdiği bazı değişiklikler ve bunun yol açtığı hücresel düzeyde hasarlar tespit edilmiştir. Antioksidan enzimler, AChE ve MDA'nın bu pestisitlere sıçan dokularındaki duyarlılıkları ile önemli biyomarkırlar olarak kullanılabilecekleri gösterilmiş, sonuçlar deney hayvanı itibariyle insanlarda bu pestisitlerin oksidatif stres ve nörotoksik etki yapma potansiyeline karşı tepkilerinin bir göstergesi olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmanın ve daha önce yapılan çalışmaların sonuçları dikkate alındığında pestisitlerin insanların ve hayvanların antioksidan savunma sisteminde bazı değişiklikler ve bunun yol açtığı hücresel düzeyde hasarlar meydana getirebilecekleri, ayrıca canlılarda nörotoksik etkiler de oluşturabilecekleri görülmektedir. Bundan dolayı insanların pestisitlerden uzak durmaları veya zararlılara karşı pestisit uygulanacaksa özellikle çiftçilerin pestisit uygulamaları

sırasında koruyucu elbiseleri giymelerinin hem kendi sağlıkları için hem de gelecek nesillerin sağlıkları için gerekli olduğu görüşündeyim.

KAYNAKLAR

AHMAD, S., 1995. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall, New York, 447 s.

AKHGARI, M., ABDOLLAHI, M., KEBRYAEEZADEH, A., HOSSEINI, R., SABZEVARI, O., 2003. Biochemical Evidence for Free Radical-İnduced Lipid Peroxidation as A Mechanism for Subchronic Toxicity of Malathion in Blood and Liver of Rats. Hum Exp Toxicol, 4:205-11

ANWAR, W., 1997. Biomarkers of Human Exposure to Pesticides. Environ Health Perspect, 40(11): 1571-5

ATİK, U., 2007. Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası: Klinik Yaklaşım. (Erden-İnal, M., Atik, U.,Aksoy, N., Haşimi, A.,) Karaciğer Metabolizması, 2.Baskı, Öncü Basımevi, İstanbul, 842 s.

BANERJEE, B.D., SETH, V., AHMED, R.S., 2001. Pesticide-İnduced Oxidative Stress: Perspectives and Trends. Rev Environ Health, 16(1):1-40

BANERJEE, B.D., SETH, V., BHATTACHARYA, A., PAHSA, S.T., CHAKRABORTY, A.K., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers. Toxicology Letters, 107: 33–47

BEUTLER, E., 1984. Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods Grune and Starton, New York, 160s.

BHARDWAJ, S., SRIVASTAVA, M.K., KAPOOR, U., SRIVASTAVA, L.P., 2010. A 90 Days Oral Toxicity of Imidacloprid in Female Rats: Morphological, Biochemical and Histopathological Evaluations Food and Chemical Toxicology Article in Press, Corrected Prof

BOECK, T.A., SCHOPHER, L.M., LOCKRIDGE, O., 2001. DNA Sequence of Butyrylcholinesterase from The Rat: Expression of The Protein And Characterization of The Properties of Rat Butyrylcholinesterase. Biochemical Pharmacology, 63:2101-2110

CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C. AND VIARENGO, A., 2000. The Use of Biomarkers to

Assess The Impact of Pollution in Coastal Environments of The Iberian Peninsula: A Practical Approach. The Science of The Total Environment, 247: 295-311.

COSSU, C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C., BABUT, M., EXINGER, A., VASSEUR, P., 1997. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, Unio Tumidus, As Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 38: 122-131.

da SILVA VAZ, I.JR., LERMEN, T.T., MICHELON, A., FERREIRA, C.A.S., de FREITAS, D.R.J., TERMIGNONI, C., MASUDA, A., 2004. Effect of Acaricides on The Activity of A Boophilus Microplus Glutathione S-Transferase. Veterinary Parasitology 30: 237-245

de ZWART, L. L., MEERMAN, J., COMMANDEUR, H.N., VERMEULEN, N. P.E., 1998. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. Free Radical Biology & Medicine, 26(1-2) 202-206

DORVAL, J., HONTELA, A., 2003. Role of Glutathione Redox Cycle and Catalase in Defense Against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells Of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). Toxicology And Applied Pharmacology, 192 : 191–200

DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUİN, M-C., BABUTB, M., VASEURAL, P., 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in The Gills and The Digestive Gland of The Freshwater Bivalve Unio Tumidus. Aquatic Toxicology, 39 : 93-110

DÜZGÜNER, V., ERDOGAN, S., 2010. Acute Oxidant and Inflammatory Effects of Imidacloprid on The Mammalian Central Nervous System and Liver in Rats. Pesticide Biochemistry and Physiology, 97 : 13–18

DWIVEDI, P.D., DAS, M., KHANNA, S.K., 1998. Role Of Cytochrome P-450 in Quinalphos Toxicity: Effect on Hepatic and Brain Antioxidant Enzymes in Rats. Food and Chemical Toxicology, 36: 437-444.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.

ERASLAN, G.A, SAYGI, Ş.B., ESSİZ, D.C., AKSOY,A.D., GUL, H.E., MACİT, E., 2007. Evaluation of Aspect of Some Oxidative Stress Parameters Using Vitamin E, Proanthocyanidin and N-Acetylcysteine Against Exposure to Cyxuthrin in Mice. Pesticide Biochemistry and Physiology 88 : 43–49

FETOUI, H., MAKNI, M., GAROUI, E.M,. ZEGHAL, N., 2009 . Toxic Effects of Lambda-Cyhalothrin, A Synthetic Pyrethroid Pesticide, on The Rat Kidney: Involvement of Oxidative Stress and Protective Role of Ascorbic Acid. Experimental and Toxicologic Pathology , In Press

FRIDOVICH, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. Annual Review of Biochemistry, 64, 97-112.

_____., 1998. Oxygen Toxicity: A Radical Explanation. The Journal of Experimental Biology, 201: 1203-1209.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.D.S., MORAES, B.S., SIMÕES, R.R., SCHETINGER, M.R.C., VÂNIA, V.M., LORO, L., 2007. Acute Effects of Glyphosate Herbicide on Metabolic and Enzymatic Parameters of Silver Catfish (Rhamdia Quelen). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146: 519–524

GROSMAN, N., DIEL, F., 2005. Influence of Pyrethroids and Piperonyl Butoxide on The Ca2+-Atpase Activity of Rat Brain Synaptosomes and Leukocyte Membranes International Immunopharmacology 5 : 263–270

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C., 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. Methods in Enzymology. Packer, L., Glazer, A.N., Eds., 186: 17-75.

HAZARIKA, A., SARKAR, S. N., HAJARE, S., KATARIA, M., MALIK, J. K., 2003. Influence of Malathion Pretreatment on The Toxicity of Anilofos in Male Rats: A Biochemical Interaction Study, Toxicology, 185:1-8

http: // extoxnet.orst.edu/pips

HUGES, W.W., 1996. Essentials of Environmental Toxicology: The Effects of Environmentally Hazardous Substances on Human Health. Taylor & Francis, 176s

ILA, H.B., TOPAKTAS, M., RENCUZOGULLARİ, E., KAYRALDIZ, A., DONBAK. L., DAGLIOGLU, Y.K., 2008. Genotoxic Potential of Cyfluthrin. Mutat Res. 656(1-2) : 49-54.

İŞLEKEL, H., 2002. Böbrek Fonksiyonları ve Bozuklukları (Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, s.38

JOHN, S., KALE, M., RATHORE, N., BHATNAGAR, D., 2001. Protective Effect of Vitamin E in Dimethoate and Malathion Induced Oxidative Stress in Rat Erythrocytes. The Journal of Nutritional Biochemistry. 12: 500-504.

KALE, M., RATHORE, N., JOHN, S., BHATNAGAR, D., 1999. Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alterations in Antioxidant Status in Rat Erythrocytes: A Possible Involvement Of Reactive Oxygen Species. Toxicology Letters, 105: 197–205

KAMAL, K.M., AL-JAFARI, A.A., Acetylcholinesterase Inhibition By Diazinon: A Dual Substrate Model for Kinetic Study. Journal of Physiology-Paris, 26: 105–119.

KEHRER, J.P., 1993. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. Critical Reviews in Toxicology, 23(I):21-48

KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T.C., ABRAMO, K.H. AND LEVIN, E.D., 1998. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. Environmental Health Perspectives, 106 (7): 375-384.

KERAMATI, V., JAMILI, S., RAMIN, M., 2010. Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of Rutilus rutilus. Journal of Fisheries and Aquatic Science

KHAN, A., KASHA, M., 1994. Singlet Molecular Oxygen in The Haber-Weiss Reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 12365-12367.

KILINÇ, K., 1985. Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, Fonksiyonları Ve Toksik Etkileri. Biyokimya Dergisi, 10 (2): 59-89.

KITAMURA, S., KATODA, T., YOSHIDA, M., JINNO, N.,OHTA, S., 2000. Whole-Body Metabolism of The Organophosphorus Pesticide, Fenthion, in Goldfish, Carassius Auratus. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 126: 259-266.

LEHNINGER, A., NELSON. D.,COX, M.M., 1993. Priciples of biochemistry. Second Edition, Worth Publishers, Inc., 1013s

LEMAIRE, P., MATTHEWS, A., FORLIN, L., LIVINGSTONE, DR., 1994. Stimulation of Oxyradical Production of Hepatic Microsomes of Flounder (Platichthys Flesus) and Perc (Perca Fluviatilis) by Model and Pollutant Xenobiotics. Arch.Environ..Contam.Toxicol., 26: 191-200

LI, B., STRIBLEY, J.A., TICU, A., XIE, W., SCHOPFER, L.M., HAMMOND, P., BRIMIJOIN, S., HINRICHS, S.H., LOCKRIDGE, O., 2000. Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in The Acetylcholinesterase Knockout Mouse. j. Neurochem 75: 1320–1331.

LOPES, P.A., PINHERIO, T., SANTOS, M.C., MATHIAS, M.DA L., COLLARES-PEREIRA, M. J. VIEGAS-CRESPO, A.M., 2001. Response of Antioxidant Enzymes in Freshwater Fish Populations (Leuciscus Alburnoides Complex) to Inorganic Pollutants Exposure. The Science of The Total Environment, 280: 153-163.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. The Journal of Biochemistry, 193: 265-277.

MATE´S, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., de CASTRO, I.N, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. Clinical Biochemistry, 32 : 595–603

MATKOVICS, B., WITAS, H., GABRIELAK, T., SZABÓ, L., 1987. Paraquat as An Agent Affecting Antioxidant Enzymes of Common Carp Erythrocytes

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 87: 1217-219

MERALI, Z., KACEW, S., KOCH, R.B., SINGHAL, R. L., 1975. Inhibition of Rat Liver Adenylate Cyclase by Tricyclohexylhydroxytin (PLİCTRan). General Pharmacology : The Vascular System, 6 : 299-301

MİLATOVIC, D., GUPTA, R.C., MİCHAEL, A., 2006. Anticholinesterase Toxicity and Oxidative Stres 6 : 295-310

MORAES, B.S., LORO, V.L., GLUSCZAK, L., PRETTO, A., MENEZES, C., MARCHEZAN, E., MACHADO, S.O., 2007. Effects of Four Rice Herbicides on Some Metabolic and Toxicology Parameters of Teleost Fish (Leporinus Obtusidens). Chemosphere, 68: 1597–1601

NARAHASHI, T., 2000. Neuroreceptors and Ion Channels as The Basis for Drug Action: Past, Present, and Future. J Pharmacol Exp Ther, 294: 1-26.

NEMCSOK, J., BÁLINT, T., FAZAKAS, J., KATAI, F., KISS, I., HIEU, L., KUFCSAK, O., LÁNG, G., POLYHOS, C., SZABO, I., SZEGLETES, T., 1999. The Contribution of A Pyrethroid İnsecticide to The Massive Eel (Anguilla anguilla) Devastation, in Lake Balaton, in 1995. Acta Biol Hung, 50(1-3):161-73

NORDBERG, J., ARNER, E.S.J., 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology and Medicine, 31 (11): 1287-1312.

OHKAVA, H., OHISINI, N., TAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Chemistry, 95: 351-358.

PAPADIMITRIOU, E., LOUMBOURDIS, N. S., 2002. Exposure of The Frog Rana Ridibunda to Copper: Impact on Two Biomarkers, Lipid Peroxidation, and Glutathione. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 69:885–891

PEIXOTO, F.., ALVES-FERNANDES, D., SANTOS, D., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., 2006. Toxicological Effects of Oxyfluorfen on Oxidative Stress Enzymes in Tilapia Oreochromis Niloticus. Pesticide Biochemistry and Physiology, 85: 91-96

POTTELBERGE, S.V., LEEUWEN, T.V., AMERMAET, K.V., TIRRY, L., 2008. Induction of Cytochrome P450 Monooxygenase Activity in The Two-Spotted Spider Mite Tetranychus Urticae and Its Influence on Acaricide Toxicity. Pesticide Biochemistry And Physiology 91:128-133

POURNOURMOHAMMADI, S., FARZAMI, B., O, S.N., AZIZI, E., ABDOLLAHI, M., 2005. Efffect of Malathion Subchronic Exposure on Rat Skeletal Muscle Glucose Metabolism. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19 : 191-196

REHMAN, H., ALİ, M., ATIF, F., KAUR, M., BHATİA, K., RAİSUDDİN, S., 2006. The Modulatory Effect of Deltamethrin on Antioxidants in Mice . Clinica Chimica Acta, 369:61-65

RENCÜZOĞULLARI, E., ILA ,H.B., KAYRALDIZ, A., ARSLAN, M., DİLER, S.B., TOPAKTAŞ, M. 2004. The Genotoxic Effect of The New Acaricide Etoxazole. Genetika, 40(11):1571-5.

RODRIGO, L., HERNANDEZ, A.F., LOPEZ-CABALLERO, J.J., GIL, F., PLA, A., 2001. Immunohistochemical Evidence for The Expression and Induction of Paraoxonase in Rat Liver, Kidney. Lung and Brain Tissue. Implications for Its Physiological Role. Chemico-Biological Interactions 137(2) :123-137

ROSS, M.K., BORAZJANI, A., EDWARDS, C.C., POTTER, P.M., 2006. Hydrolytic Metabolism of Pyrethroids by Human and Other Mammalian Carboxylesterases Biochemical Pharmacology, 71 (5) : 657-669

SAMANTA, L., CHAINY, G.B.N., 1997. Comparison of Hecachlorocyclohexane-Induced Oxidative Stres in The Testis of Immature and Adult Rats. Comp Biochem. Phsiol. 118c :319-327.

SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., SANCHEZ, M., FERRANDO, M.D., ANDREU-MOLINER, E., 2000. Alterations on Ache Activity of The Fish Anguilla Anguilla as Response to Herbicide-Contaminated Water. Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B, 46: 57-63

SEPİCİ-DİNCEL, A., BENLİ, A.C., SELVİ, M., SARIKAYA, R., SAHİN, D., OZKUL , A., ERKOC, F., 2009. Sublethal Cyfluthrin Toxicity to Carp

(Cyprinus Carpio L.) Fingerlings: Biochemical, Hematological, Histopathological Alterations. Ecotoxicology and Environmental Safety 72 : 1433–1439

SETH, V., BANERJEE, B.D., CHAKRAVORTY, A.K., 2001. Lipid Peroxidation, Free Radical Scavenging Enzymes, and Glutathione Redox System in Blood of Rats Exposed to Propoxur, Pesticide Biochemistry and Physiology 71: 133–139.

SEVGİLER, Y.,. ORUÇ, E.O. ÜNER, N., 2004. Evaluation of Etoxazole Toxicity in The Liver of Oreochromis niloticus. Pest. Biochem. Physio, 78 : 1–8.

SHARMA, Y., BASHIR, S., IRSHAD, M., NAG, T.C., DOGRA, T.D., 2005. Dimehoate- Induced Effects on Antioxidant Status of Liver and Brain of Rats Following Subchronic Exposure. Toxicology, 215: 173-181.

SODERLUND, D.M., CLARK, J.M., SHEETS, L.M., MULLIN, L.M., PICCİRILLO, V.J., SARGENT, D., STEVENS, J.M., WEINER, M.L., 2002. Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: Implications for Cumulative Risk Assessment. Toxicology, 171: 3–59

SODOWSKA-WODA I.A., POPOWICZ, D.A., KAROWICZ-BILINSKABİ, A., 2010. Fenthrin-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes in Vitro and Protective Effect of Selected Flavonols. Toxicology in Vitro ,24 : 460–464

TETYANA V. B., VASYLKIV, O.Y., STOREY, K.B., LUSHCHAK, V.L., 2005. Catalase Inhibition by Amino Triazole Induces Oxidative Stres in Goldfish Brain. Brain Research, 1052 :180 – 186

ÜNER, N., ORUÇ, E., SEVGİLER, Y., 2005. Oxidative Stress-Related and Atpase Effects of Etoxazole in Different Tissues of Oreochromis niloticus Environmental Toxicology An Pharmacology 20: 99-106

VIJVERBERG, H. P., BERCKEN, V.D.J., 1990. Neurotoxicological Effects and The Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. Crit Rev Toxiol, 21: 105-26.

VILLARINI, M., MORETTI, M., SCASSELLATI-SFORZOLINI, G., MONARCA, S., PASQUINI, R., CREA, MG., LEONARDIS, C., 1995. Studies on Hepatic Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats Treated with Insecticide Deltamethrin. J Environ. Pathol. Toxicol Oncol, 14(1):45-52.

WALKER, C.H., 1995. Biochemical Biomarkers in Ecotoxicology-Some Recent Developments. The Science of The Total Environment, 171: 189-195.

WANG, X.Z., LIU, S.S., SUN, Y. WU, J.Y., ZHOU, Y.L.. ZHANG, J.H., 2009. Beta- Cypermethrin Impairs Reproductive Function in Male Mice by Inducing Oxidative Stres Theriogenology 72 : 599–611

WOLANSKY, M. J. GENNINGS, C., CROFTON K. M., 2005. Relative Potencies for Acute Effects Of Pyrethroids on Motor Function in Rats. Toxsci Advance Access, 12

YAPRAK, M. 1998. Akut Miyokart Enfarktüsünde Biyokimyasal Parametreler ve Antioksidan Sistemle İlişkisi . Uzmanlık Tezi Çukurova Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilimdalı

YARSAN, E., TANYUKSEL, M., CELİK, S., AYDİN, A., 1999. Effects of Aldicarb and Malathion on Lipid Peroxidation. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63:575-581

YU,M., LI, S-M., LI, X-Y., ZHANG, B-J. , WANG, J-J ., 2008. Acute Effects of 1-Octyl-3-Methylimidazolium Bromide Ionic Liquid on The Antioxidant Enzyme System of Mouse Liver._Ecotoxicology and Environmental Safety, 71:903-908

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden "Biyolog" ünvanı ile mezun oldu. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlayıp 2002 yılında tamamladı. 2002 yılında aynı Anabilim Dalında doktora öğrenimime başladı Aynı Anabilim Dalında 2000-2009 tarihleri arasında araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2009 yılından beri Adıyaman Üniversitesinde Uzman olarak görev yapmakta olup evli ve bir çocuk babasıdır.