KLORPRİFOS ve DELTAMETHRİN'in KAN ve BEYİN LİPİD PEROKSİDASYON VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ

Eren KAYA

Yüksek Lisans Tezi
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA 2005

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLORPRİFOS ve DELTAMETHRİN'in KAN ve BEYİN LİPİD PEROKSİDASYON VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ

EREN KAYA

Danışman: Yrd.Doç.Dr.M.Nalan TÜZMEN
Yrd.Doç.Dr.Hilal YÜCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ISPARTA, 2005

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **İ**
ÖZET ..... **İİ**
ABSTRACT ..... **İİİ**
ÖNSÖZ ..... **İV**
SİMGELER DİZİNİ ..... **V**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **Vİ**
1 GİRİŞ **1**
1.1 SERBEST RADİKALLER 2
1.2 METABOLİZMADAKİ SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI 13
1.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ 15
1.4 PESTİSİTLER VE OKSİDATİF STRES 20
1.4.1 Klorprifos *25*
1.4.2 Deltamethrin *26*
2 KAYNAK ÖZETLERİ **28**
3 MATERYAL VE METOD **33**
3.1 MATERYAL 33
3.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması: *33*
3.1.2 Kan numunelerinin hazırlanması: *34*
3.1.3 Doku numunelerinin hazırlanması: *34*
3.1.4 Kullanılan malzeme ve cihazlar: *34*
3.1.5 Kullanılan kimyasal maddeler: *35*
3.1.6 Kullanılan çözeltiler *37*
3.2 METOD 39
3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD) tayini *39*
3.2.2 Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tayini *42*
3.2.3 Katalaz (CAT) tayini *43*
3.2.4 Lipid peroksidasyon tayini *44*
3.2.5 GSH tayini *45*
4 ARAŞTIRMA BULGULARI **48**
5 TARTIŞMA VE SONUÇ **57**
6 KAYNAKLAR **60**
ÖZGEÇMİŞ **69**

ÖZET

Pestisidler, ürün kalitesi ve verimliliği artırmak, tarımdaki zararlı populasyonu kontrol altına almak amacıyla kullanılan toksik maddelerdir. Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisidler, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{-\cdot}$) ve hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilirler, enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olabilirler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonunu başlatabilirler. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılamazlarsa oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir.

Bu çalışmada; oral olarak farklı dozlarda klorprifos ve deltamethrin verilen yetişkin ratların, kan ve beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkileri incelenmiştir. Kan örneklerinde, SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitileri ile MDA düzeyleri, düşük doz klorprifos (Grup II), yüksek doz klorprifos (Grup III), düşük doz deltametrin (Grup IV), yüksek doz deltametrin (Grup V) ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltametrin karışımı (Grup VI) uygulanan gruplarda kontrol grubuna (Grup I) kıyasla düşüş göstermiştir. Beyin dokusunda ise kontrol grubuna kıyasla, düşük doz deltametrin (Grup IV) uygulanan grupta MDA düzeyi anlamlı ölçüde artarken CAT aktivitesi düşmüş; düşük doz klorprifos + düşük doz deltametrin karışımı (Grup VI) uygulanan grupta ise MDA seviyesi düşmüş CAT aktivitesi artış göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Serbest radikal, antioksidan enzim, lipid peroksidasyonu, klorprifos, deltametrin

ABSTRACT

In agriculture, pesticides are commonly used for achieving better quality pruducts, increased production rate and controling pest population. However, they are also toxic substances. These pesticides lead to generation of reactive oxygen species such as hydrogene peroxide(H_2O_2), superoxide($O_2^{-\bullet}$), and hydroxyl ($^{\bullet}OH$), which have harmful effect on human health. The reactive oxygen species may react with biological macromolecules, cause enzyme inactivation, DNA damage and initiate lipid peroxidation in tissue by accumulating in polyunsaturated fatty acid (PUFA). If these oxidants can not be removed by antioxidant defense systems they cause oxidative stress. As a result of oxidative stress, pathological formations like DNA damage and cancer are observed.

In this study, the effects of the rats that were exposed to chlorpyrifos and deltamethrin in various doses orally to the brain and blood lipid peroxidation and antioxidation enzyme activities were investigated. In blood samples, antioxidation enzyme activities like SOD, CAT and GSH-Px and MDA levels showed a relative decrease in groups that were exposed to low dose chlorpyrifos (group II), high dose chlorpyrifos (group III), low dose deltamethrin (group IV), dose deltamethrin (group V), mixture low dose chlorpyrifos + low dose deltamethrin (group VI) compared to the control group (group I). When compared to the control group (group I) in brain tissue, with the increasing MDA level in group which was exposed to low dose deltamethrin (group IV), CAT activity decreased; and in group that was exposed to mixture low dose chlorpyrifos + low dose deltamethrin (group VI) MDA level decreased and CAT activity showed an increase.

Key words: Free radical, antioxidant enzyme, lipid peroxidation, chlorpyrifos, deltamethrin

ÖNSÖZ

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Çalışmam süresince bana büyük emeği geçen, desteğini her zaman yakından hissettiğim, karşılaştığım bütün zorlukları aşmamda bana yardımcı olan danışmanlarım Yard.Doç.Dr. M. Nalan TÜZMEN ve Yrd.Doç.Dr. Hilal YÜCEL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel kısmında laboratuar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Namık DELİBAŞ ve Yrd.Doç.Dr Recep Sütcüoğlu'na; Fen Ed. Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine; Fen Ed. Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd.Dç.Dr. Kenan Çınar'a ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında imkanlarından faydalandığım Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Şu anda bu tezin okunabiliyor olmasında büyük emekleri geçen beni her zaman ve sınırsız destekleyen aileme bu sonsuz ilgi, sevgi ve desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

SİMGELER DİZİNİ

CAT : Katalaz
CP : Klorprifos
DM : Deltamethrin
GSH-Px : Glutatyon peroksidaz
GR : Glutatyon redüktaz
GSH-S-T : Glutatyon-S-transferaz
SOD : Süperoksit dismutaz
XOD : Ksantin oksidaz
CAPS : 3-[Siklohekzilamino]-1-propensülfonik asit
INT : 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür
β-NADPH : β-Nikotinamid adenindinükleotid fosfat
MDA : Malondialdehit
GSH : Glutatyon
GSSG : Glutatyon disülfid (GSH'ın yükseltgenmiş formu)
DTNB : Ellman reaktifi
ROS : Reaktif oksijen türleri
CNS : Merkezi sinir sistemi
PUFA : Polidoymamış yağ asidi
NAT : N-asetiltransferaz
LTP : Long-term potansiasyonu
SAM : S-Adenozilmetiyonin
SAH : S-Adenozilhomosistein
DHA : Dehidroaskorbik asit
AA : Araşidonik asit
NMDA : N-Metil-D-aspartat
ALS : Amiyotrofik lateral skleroz
NOS : Nitrikoksit sentaz
OFR : Oksijen serbest radikali

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Lipid peroksidasyonu 11
Şekil 1.2 Toksik Azot Oksitleri 12
Şekil 1.3 Memeli hücrelerinde oksijen, azot radikalleri ile diğer reaktif türlerin üretimi 13
Şekil 1.4 Glutatyon Redüktaz reaksiyonları 19
Şekil 1.5 Memeli hücrelerinden oksijen, azot serbest radikalleri ile diğer reaktif türlerin uzaklaştırılması 20
Şekil 1.6 Pestisidlerin kontaminasyon yolları 23
Şekil 3.1 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin konsantrasyona bağımlı değişimi 41
Şekil 3.2 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin log C'ye bağımlı değişimi 41
Şekil 3.3 Glutatyon kalibrasyon grafiği 46

1 GİRİŞ

Pestisitler, bitki ve hayvanlardaki herhangi bir zararlının kontrolünde ya da önlenmesinde kullanılması tasarlanan bir madde ya da maddelerin karışımıdır. Binden fazla aktif maddenin karışımı ile elde edilen 35.000 civarında pestisit preparatı vardır (Karadağ, 2000).

Havadan çok düşük seviyelerde uygulanan pestisitler buradan sulara ve topraklara oradan da bitki ve hayvanlara geçerek besin zincirine ulaşabilmektedir. Sudaki büyük canlıların daha küçükleri yemesi ve kalıntı içeren maddeleri hayvanların yemesiyle bunlarda oluşan birikim, besin zincirinin son halkasında bulunan insanda kalıntı düzeyi çok daha yüksek ve yoğunlaşmış olarak ortaya çıkar. Doğada görülen bu kalıntının gıda zincirinde ve canlılarda giderek artması olayına biyokonsantrasyon denir (Arınç, 1970; Öztürk, 1978; Ceron, 1995;Berksan, 1996).

Gıdalardaki pestisit kalıntılarının uzun süre alınmasıyla uzun vadede akciğer hastalıkları, kanser, beyinde ve periferal sinir sisteminde harabiyet, karaciğer, kalp, endokrin, üreme sistemi ve böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bunların yanı sıra teratojenik, mutajenik, hematolojik, metabolik ve alerjik etkileri olan pestisitler de vardır. Pestisitlerin insanlarda yaptıkları bu etkilerin yanı sıra hayvanlar üzerinde de olumsuz etkileri mevcuttur. Pestisitlerin kümes hayvanları ve kuşlarda yumurta kabuklarının incelmesine neden olduğu ayrıca doğada kuşların üreme ve çoğalmalarını engellediği bilinmektedir. Pestisitlerin bu olumsuz etkileri kimyasal yapı, uygulama ve kullanma sıklığı gibi faktörlere bağlıdır (Frag vd, 2000; Gold vd, 2001).

Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisitler, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{-\bullet}$) ve hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilirler, enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olabilirler. Pestisidler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna neden olurlar. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılamazlarsa

oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir. Bazı çalışmalarda, pestisidlere maruz kalan işçilerde, akciğer kanseri, mesane kanseri ve lösemi riskinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra organofosfatlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını da içeren birçok nöropatolojik oluşumlara da yol açmaktadırlar. Çünkü bu kimyasalların hedefi, korteks ve hipokampüsteki sinirsel uyarılabilirliğin ana düzenleyicisi olan GABAerjik ve kolinerjik sistemlerdir(Castillo vd., 2002). Organofosfatların toksisitesi, asetilkolinesterazın inhibisyonundan dolayı asetilkolinin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Asetilkolinin fazlalığı, kolinerjik reseptörler ile asetilkolinin etkileşimine bağlı olarak başlayan olayları olumsuz yönde etkiler (Hazarika vd., 2003).

İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalar, akut, subakut, subkronik ve kronik insektisit uygulamalarının sonucu ortaya çıkan hepatotoksisite, nörotoksisite, genotoksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi etkenlerin patogenezinde organofosfat insektisitlerinin yol açtığı artmış reaktif oksijen türleri (ROS)'nin neden olduğu oksidadif doku hasarının rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda, karaciğer, beyin ve tiroit gibi çeşitli doku örneklerinde, serum ve eritrositlerde lipid peroksidasyonu (LPO)'nun bir göstergesi olan tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) seviyelerinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerindeki değişiklerin gösterilmesiyle OPIs'in toksisitesinde oksidatif hasarın rol oynayabileceği belirtilmiştir (Dwivedi vd, 1998; Banerjee, 1999; Kale vd, 1999; Öncü vd, 2002; Altuntas vd, 2003).

1.1 Serbest Radikaller

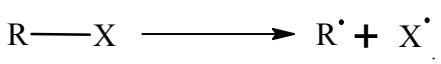
Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu

moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" denir (Halliwell ve Chirico, 1993). Serbest radikal, en dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektron içeren herhangi bir atom, atom grubu ya da moleküldür (örneğin nitröz oksid [NO] ya da azot dioksid [NO_2]). Biradikal, dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içerir (örneğin moleküler oksijen [O_2]). Radikal iyon ise pozitif (örneğin [H_3N^+]) ya da negatif (örneğin [$O_2^{-\bullet}$]) bir yük taşıyan serbest radikaldir (Pryor, 1982). Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş tek elektron içeren bu bileşikler kendi orbitallerini tamamlamak için komşu moleküllerden elektron koparark zincir reaksiyonlarını başlatırlar (Rabideau, 2001). Oksijen radikali serbest elektronunu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığında diğer molekülü kararsız hale getirir. Bu nedenle, serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler (Cheeseman ve Slater, 1993, Halliwell ve Chirico, 1993).

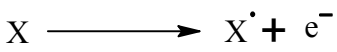
Serbest radikal türlerinin, oksijen-merkezli, karbon–merkezli ($R^\bullet$, $RCOO^\bullet$) ya da azot-merkezli ($NO^\bullet$, $ONOO^-$) olmak üzere birçok türü vardır (Kalyanaraman, 1982; Whiteman vd., 1996). Serbest radikallerin birçoğu, kimyasalların bir yada daha fazla reaktif ara ürüne metabolize olmalarıyla meydana gelirler (Rabideau, 2001). Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak da adlandırılan serbest radikaller, süperoksit anyonu ($O_2^{-\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve singlet oksijen ($^1O_2$) gibi türleri içerirler.

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (Cheeseman ve Slater, 1993):

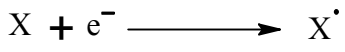
1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla



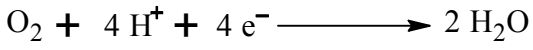
2- Bir molekülden bir elektronun ayrılmasıyla



3- Bir moleküle bir elektronun katılmasıyla



Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar. İnsan hücrelerine giren oksijenin %90'nından fazlası, mitokondrial sitokrom oksidaz tarafından enerji üretimi için kullanılır; iki su molekülünün oluşumu ile sonuçlanan bu işlemler süresinde, her bir oksijen molekülü 4 e^- ilavesiyle indirgenir.



Ancak, hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştüğü bilinmektedir (Floyd 1999).

Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan doğrudan moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan oksijen radikalleridir. Biyolojik sistemlerde moleküler oksijen genellikle elektron alarak aşağıdaki ara ürünleri oluşturur:

$O_2 \xrightarrow{e^-}$ süperoksit anyon radikali ($\bar{O}_2$)

$\xrightarrow{e^-}$ hidrojenperoksit(H_2O_2)

$\xrightarrow{e^-}$ hidroksil radikali$^{\bullet}$(OH)

$\xrightarrow{e^-}$ su (H_2O)

Yukarıdaki eşitliklerden de görüldüğü gibi, oksijenin suya indirgenmesi esnasında birçok serbest radikal ürünü ve oldukça reaktif türler oluşur. Birinci elektronun transferi ile süperoksit anyon radikali ($O_2^{-\bullet}$) oluşur. İkinci elektronun alınmasıyla, peroksit radikalinin protonlanmış şekli olan hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Üçüncü elektronun alınması, oldukça toksik ve reaktif olan hidroksil radikalinin ($^{\bullet}OH$) oluşumu ile sonuçlanır. Dördüncü elektronun alınması ise, bir su molekülünün (H_2O) oluşumuna yol açar.

Elektron transport zincirinden kaynaklanan bu elektron kaçağının yanında peroksizomlarda lokalize olan flavin oksidaz gibi bir dizi enzim de süperoksit anyonu ya da hidrojen peroksit oluşturabilir. Hayvan hücrelerinde süperoksidin bir diğer kaynağı da askorbik asit, tioller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi moleküllerin otooksidasyonudur.

Süperoksit anyon radikali, aerobik biyolojik sistemlerdeki enzimatik ve enzimatik olmayan oksidasyonlar süresince oluşturulur (Donnely, 1989). Süperoksit anyon radikali birçok yolla O_2'den üretilir:

1)NADPH oksidaz ile NADPH'ın oksidasyonu

2)Ksantin oksidaz ile hipoksantin yada ksantinin oksidasyonu

3)Mitakondrial elektron taşıma sistemi yolu ile indirgenme ürünlerinin (örneğin, nikotinamid adenin dinükleotid [indirgenen; NADH], NADPH, ve $FADH_2$ [indirgenen FAD]) oksidasyonu

4)Geçiş metalerinin eser miktarlarının varlığında monoaminlerin (dopamin,epinefrin, ve norepinefrin), flavinlerin ve hemoglobinin otooksidasyonu

5)Sitokrom P-450 ile O_2'nin bir elektron kaybetmesi

6)Arginin ya da tetrahidrobiopterin eksikliğinde nNOS ya da eNOS ile O_2' nin bir elektron kaybetmesi

Diğer radikallerle kıyaslandığında süperoksit anyon radikalinin reaktivitesi çok düşüktür. Ancak bu radikal, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hidroperoksil radikali gibi oluşumuna neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Aynı zamanda $O_2^{-\bullet}$'nin, hem yükseltgen hem de indirgen özelliği vardır. Süperoksit anyonlarından birisi yükseltgen, diğeri indirgen olarak davranarak spontan dismutasyona uğrayabilir. Bu durumda, bir $O_2^{-\bullet}$ bir diğeriyle reaksiyona girerek H_2O_2 ve moleküler oksijen oluşturur. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen bu dismutasyon reaksiyonu, negatif yüklü radikaller arasındaki elektrostatik itmelerle oluşur (Donnely, 1989; Rabideau, 2001):

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon difüzyon sınırlıdır ve bilinen en hızlı enzimatik reaksiyondur ($k = 3 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) (Donnely, 1989). Süperoksit dismutaz enzimi bir metaloproteindir ve katalitik aktivitesi için Fe, Mn veya Cu'a gereksinim duyar.

Normal solunum metabolizması sırasında sürekli olarak oluşan süperoksit anyon radikallerinin girebileceği tepkimeler şunlardır (Chance vd., 1979):

1- Daha önce de belirtildiği gibi, süperoksit anyon radikalleri SOD ile dismutasyona uğrayarak hidrojen peroksit oluşumuna yol açabilirler.

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

2- $O_2^{\bullet -}$, ortamdan bir proton alarak hidroperoksit radikali oluşturabilir.

$$O_2^{\bullet -} + H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O^{\bullet}\ (\text{Hidroperoksit radikali})$$

$$H_2O^{\bullet} + H_2O^{\bullet} \longrightarrow H_2O + 3/2\,O_2$$

$$2\,H_2O^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow H_2O_2 + 2\,O_2$$

3- Süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ile tepkimeye girip hidroksil radikali oluşturabilir.

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \longrightarrow {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH + O_2$$

4- Süperoksit anyon radikalleri, diaçil peroksitler ile verdiği tepkimelerle singlet oksijen oluşumuna da neden olabilir.

$$2\,O_2^{\bullet -} + RCOOCR \longrightarrow {}^1O_2 + 2RCOO^-$$

Hidrojen peroksit, süperoksit anyonlarının dismutasyonu sırasında, ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonunda, mitokondriyal elektron transportunda ve nötrofillerde üretilir (Chance vd., 1979; Halliwell ve Chirico, 1993). H_2O_2, küçük ve yüksüzdür; kolaylıkla hücre membranından difüze olur ve bu nedenle üretildiğinden uzak bölgelere de yayılabilir. Hidrojen peroksit, gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden önemli bir oksidandır. Geçiş metallerinin varlığında Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikaline ($^{\bullet}OH$) indirgenir (Reiter, 1998).

$$Me^{n} + H_2O_2 \longrightarrow Me^{(n+1)} + {}^{\bullet}OH + OH^{-} \quad \text{(Fenton Reaksiyonu)}$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{H^{+}} O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^{-} \quad \text{(Haber-Weiss Reaksiyonu)}$$

Hidrojen peroksit oluşum yolları aşağıda gösterilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993; Reiter, 1998):

1. Oksijenin iki elektron ile indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.

$$O_2 + 2\,e^{-} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2$$

2. İki süperoksit anyon radikalinin tepkimeye girmesiyle H_2O_2 ve O_2 oluşur.

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Hücrelerin çoğunda H_2O_2, iki önemli antioksidan enzimin fonksiyonuyla zararsız ürünlere dönüştürülebilir. Bunlar, katalaz (CAT) ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). GSH-Px, katalazın merkezi sinir sisteminin birçok bölgesindeki düşük aktivitesinden dolayı beyin için daha önemlidir (Jain vd., 1991). GSH-Px, indirgenmiş glutatyonun (GSH) disülfidine (GSSG) dönüşümü süresince hidrojen peroksit ve hidroperoksitleri sübstrat olarak kullanır (Guemouri vd., 1991).

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2\,H_2O$$

Oksijen radikalleri içerisinde en toksik ve en reaktif olanı hidroksil radikalidir (${}^{\bullet}OH$). Yukarıdaki eşitliklerden de görüleceği üzere, hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde Haber-Weiss reaksiyonuna göre ya da bir metal kompleksi varlığında gerçekleşen

Fenton reaksiyonuna göre H_2O_2'in süperoksit anyonu ile indirgenmesiyle oluşturulur (McCord ve Day, 1978; Cheesemann ve Slater, 1993). Hidroksil radikali oluşur oluşmaz üretildiği yerin birkaç A° uzaklığındaki herhangi bir moleküle reaksiyona girer. Yüksek reaktifliğinden dolayı, 37°C'da beklenen yarılanma ömrü $1x10^{-9}$ saniye'dir. $^{\bullet}OH$, DNA'ya, membran lipidlerine ve karbonhidratlara zarar verir. DNA hasarının gerçekleştiği en az iki yol vardır. H_2O_2, DNA yakınındaki moleküllere bağlı olan Fe^{2+} veya Cu^{+} ile reaksiyona girdiği için bozulmuş DNA oluşabilir; bu nedenle toksik $^{\bullet}OH$ radikali oluştuğunda, onun ilk hedefi komşu nükleik asitlerdir (Arouma ve Halliwell, 1987). Hücre içi serbest Ca^{2+} artışı, çekirdekteki nükleaz enzimlerini aktive eder, bu $^{\bullet}OH$ oluşumu ve DNA hasarıyla sonuçlanır (Reiter, 1998). Bu yarı-indirgenmiş oksijen türü, lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere membran lipidleriyle etkileşir. Bu etkileşim, $^{\bullet}OH$'nin PUFA'dan allelik bir H^{+}'yı uzaklaştırmasıyla gerçekleşir ve bir radikalik zincir reaksiyonuyla sonuçlanır (Reiter, 1998).

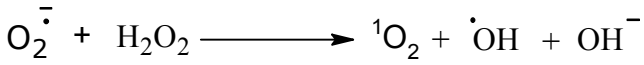
Singlet oksijen, O_2'e enerji transfer edildiği fotooksidatif şartlar altında üretilen diğer bir reaktif oksijen türüdür. Enerji absorbsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış en dış elektronları spinlerini değiştirebilir. Singlet oksijen ($^1O_2$), lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere PUFA'dan bir H^{+}'yı koparabilir. Bu yüzden, biyolojik sistemlerde $^1O_2$, membran lipidlerinin peroksidasyonunda önemli bir role sahiptir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Ayrıca bu reaktif oksijen türünün DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu da gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Halliwell ve Chirico, 1993).

In vivo olarak singlet oksijen üretimine neden olan tepkimeler aşağıda verilmektedir (Pryor, 1982):

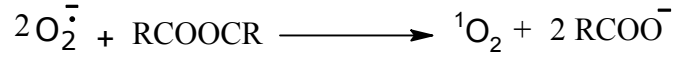
1- Süperoksit anyon radikalinin kendiliğinden dismutasyonu ile singlet oksijen oluşabilir.

$$H_2O + 5/2\ O_2^{\bullet -} \xrightarrow{2\ H^+} {}^1O_2 + 2\ H_2O_2$$

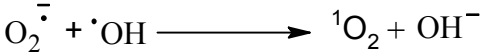
2- Haber-Weiss tepkimesi sonucunda singlet oksijen oluşabilir.



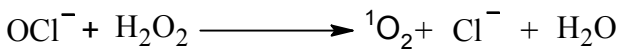
3- Süperoksit anyon radikallerinin diaçil peroksitlerle verdiği tepkime ile singlet oksijen oluşur.



4- Süperoksit anyon ve hidroksil radikalinin etkileşmesi sonucunda singlet oksijen oluşur.



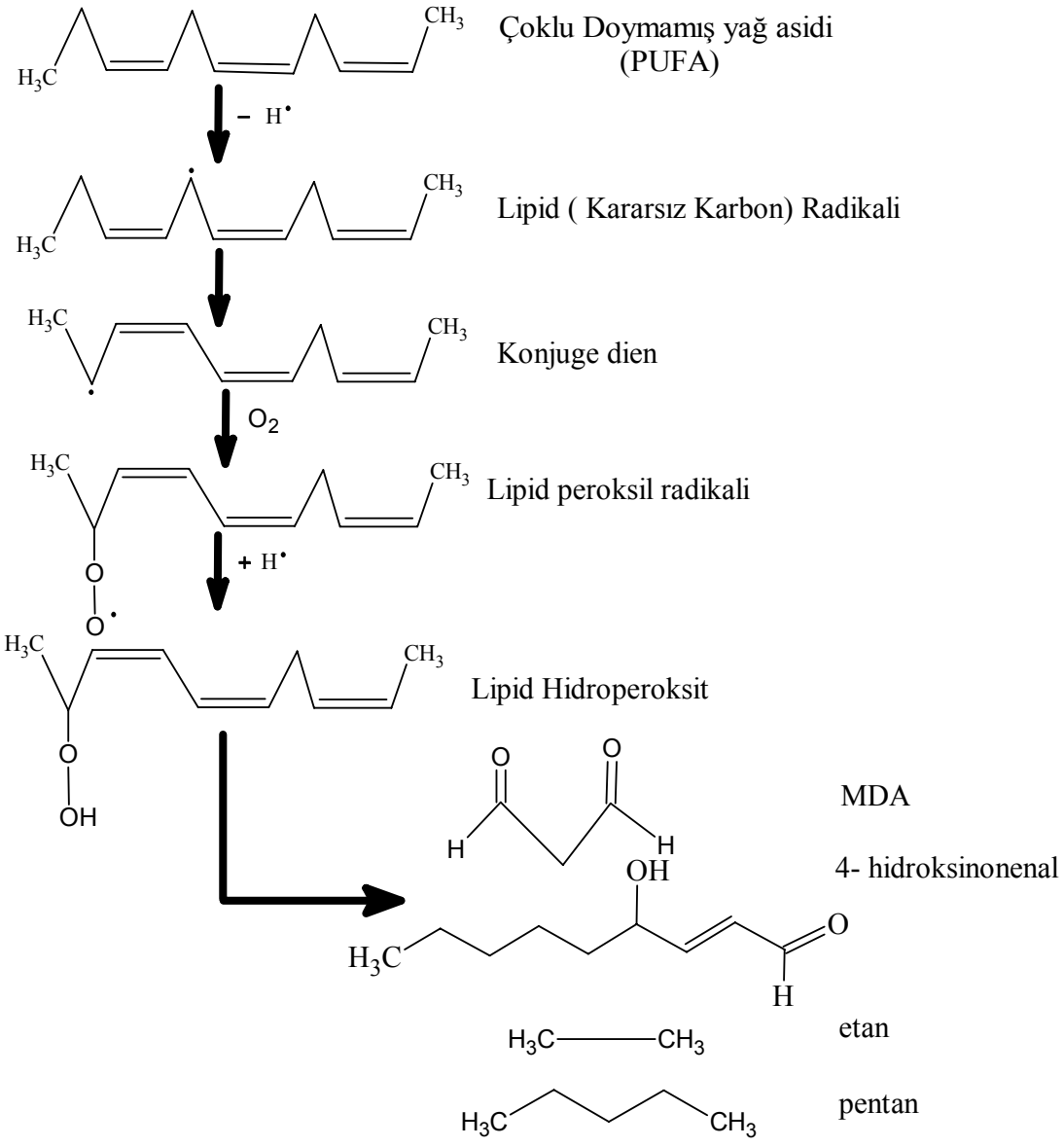
5- Fagositoz sırasında lökositlerden salınan miyeloperoksidazın katalizlediği reaksiyonda hipoklorit (OCl^-) oluşur. Hidrojen peroksit ve hipoklorit arasındaki reaksiyonda da singlet oksijen oluşur (Aruoma ve Halliwell, 1987).



Singlet oksijen, serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikalik tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Serbest radikaller ve diğer reaktif türler, (örneğin; $^{\bullet}OH$, $HOO^{\bullet}$,$ONOO^-$) doymamış yağ açil zincirinden (örneğin; ω-6 çoklu doymamış yağ asidi [PUFA]) bir hidrojen atomu açığa çıkarırsa, karbon merkezli lipid radikali ($L^{\bullet}$) oluşur. Bunu takiben $L^{\bullet}$'radikaline oksijen ilavesi ile lipid peroksil radikali ($LOO^{\bullet}$) oluşur. Lipid hidroperoksit (LOOH), kolaylıkla lipid alkoksi radikali ($LO^{\bullet}$) oluşturacak şekilde

bozunabilir. ROS-başlatıcılı lipid peroksidasyonu, lipid, lipid peroksit, lipid alkoksi radikallerinin oluşumu ile sonuçlanır.

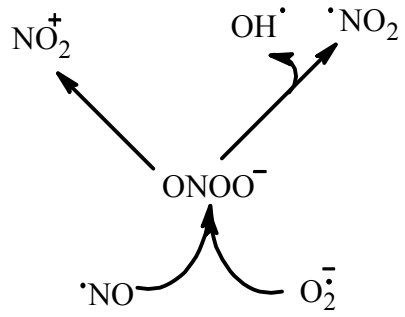


Şekil 1.1 Lipid peroksidasyonu

Bakteriler, asit yağmurları, jetler, egsoz gazları ve sigara dumanı reaktif azot oksitleri üretir. Bu reaktif azot oksitler aynı zamanda karsinojenik etkiye de sahiptirler. NO, stabil bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, serebral kan akışı ve nöroendokrin sekresyonu gibi birçok fonksiyonda rol

oynar (Pryor, 1982; Simonian ve Coyle, 1996). Ancak, hücre içi konsantrasyonu aşırı arttığında, nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. NO, biyolojik sistemlerde, O_2, $O_2^{-\bullet}$ ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktiviteleri veya protein fonksiyonlarında zayıflamaya neden olur.

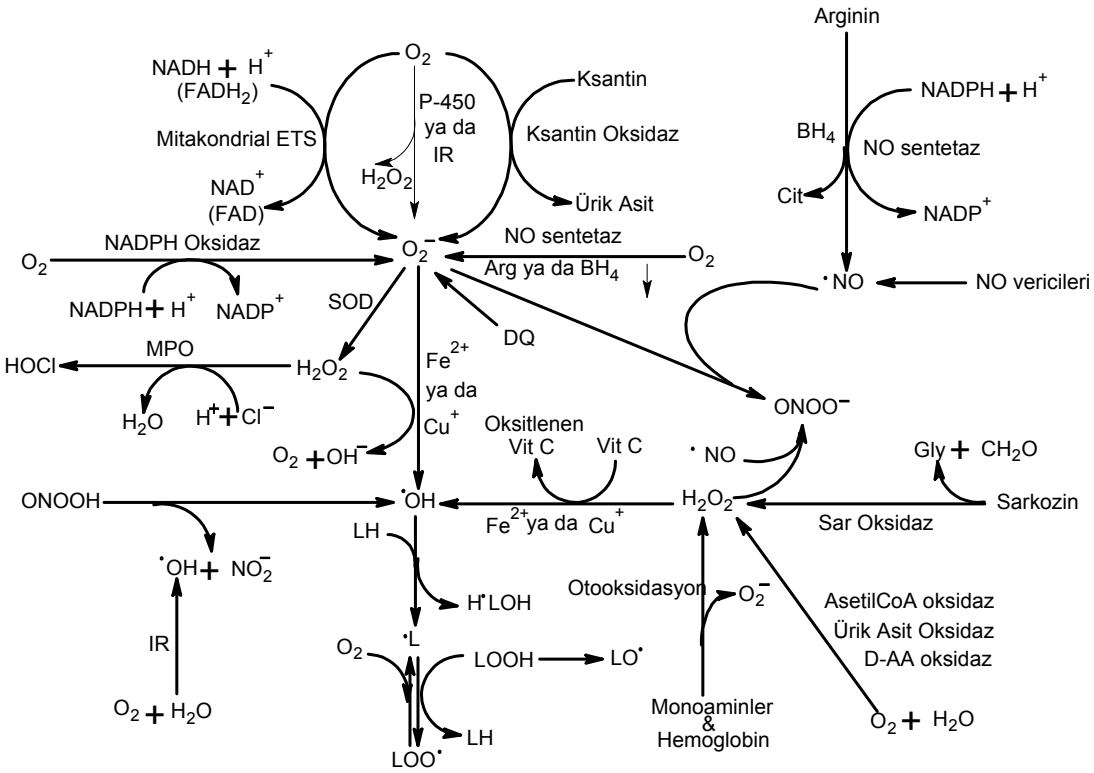
Nitrik oksidin yarı ömrü birkaç saniyedir. NO, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek biyolojik inaktif nitrite döner ve bundan dolayı, NO süperoksit anyon radikalinin hücrelere olan toksik etkileri için kimyasal bariyer rolü oynar. Ancak, NO ile süperoksit anyon radikalinin birleşmesi peroksinitrit anyonunun ($ONOO^-$) oluşumuna yol açabilir.



Şekil 1.2 Toksik Azot Oksitleri

$ONOO^-$, basit bir moleküldür, ancak reaktivitesi, $^{\bullet}OH$ ve $NO_2^{\bullet}$ ile hemen hemen eşdeğerdir. $ONOO^-$ anyonunun zararlı etkisi, amino asit kalıntılarının aromatik halkalarını direkt olarak nitrolaması ve hidroksillemesinden, lipid, protein ve DNA'nın yanı sıra çinko-tiyolat kalıntıları ve sülfidrillerle reaksiyona girmesinden kaynaklanır(Beckman ve Ames, 1997). Bu aktivitesi $ONOO^-$ anyonunu, nöronal fizyoloji üzerinde yıkıcı etkisi olan bir molekül haline getirir (Reiter vd., 1996a; Reiter, 1998) .

Vücutta oksijen ve azot serbest radikallerinin oluşumuna yol açan başlıca reaksiyonlar Şekil 1.3' de verilmiştir:



Şekil 1.3 Memeli hücrelerinde oksijen, azot radikalleri ile diğer reaktif türlerin üretimi

1.2 Metabolizmadaki Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller, iyonizan radyasyon, stres yapıcı durumlar, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda vücuttaki biyolojik fonksiyonların yan ürünü olarak oluşurlar.

- **Biyolojik Kaynakları**

- Aktive olmuş fagositler
- Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine

- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisidler, sigara dumanı, çözgenler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar, radyasyon
- Stres: Streste artan katekolaminin oksidasyonu

- **İntrasellüler Kaynakları**

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, antibiyotikler
- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- Mitokondrial elektron transportu
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri: sitokrom- P-450, sitokrom-b-5
- Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon
- Uzun süreli metabolik hastalıklar

İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında, serbest radikaller genellikle hücrelerde elektron transfer reaksiyonlarıyla meydana gelirler. Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar (Cheeseman ve Slater 1993).

Birçok enzimin katalitik döngüleri sırasında da serbest radikal açığa çıkar. In vivo olarak oluşturulan iskemi, ksantin oksidaz enziminin dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine neden olur.

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı pestisitler gibi yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal

üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler (Cross vd., 1987; Oruç ve Üner, 2004).

1.3 Antioksidan Savunma Sistemleri

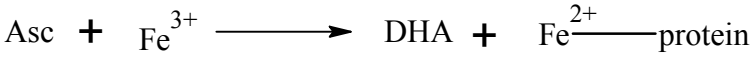
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' ya da kısaca 'antioksidanlar' olarak bilinirler. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler. Antioksidan savunma sistemleri, birincil ve ikincil savunma sistemleri olmak üzere iki kategoride sınıflandırılırlar.

Birincil savunma sistemleri iki grubu içerir:

1. Antioksidan bileşikler
2. Antioksidan savunma enzimleri

Antioksidan bileşikler, glutatyon, β-karoten, ürik asit, C ve E vitaminlerini içerir. E vitamini, bilinen yüksek lipofilik özelliğinden dolayı önemli bir hücre içi antioksidandır. Yağda çözünmüş olarak bulunur, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif diffüzyon ile emilir. Lipid membranının yakınında ya da içinde bulunan $O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}OH$ ve $LOO^{\bullet}$ radikallerini daha az reaktif hale dönüştürerek antioksidan etkisini gösterir. Glutatyon peroksidaz ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini de peroksitlerin sentezini engeller (Cheeseman ve Slater, 1993). C vitamini hidrofilik olması ve vücutta geniş dağılım göstermesi nedeniyle etkili bir hücre dışı antioksidandır. $^{\bullet}OH$ ve $O_2^{-\bullet}$ radikallerini sönümler, nötrofil antioksidanları nötralize eder ve tokoferoksil radikalinin α-tokoferole indirgenmesini sağlar. C vitamini, antioksidan özelliğinin yanı sıra oksidan özellik de göstermektedir. Askorbat, proteine bağlı Fe^{3+} indirgeyerek

Fe^{2+} ' ye dönüştürür. Böylece Fenton reaksiyonunu tetikleyerek $O_2^{-\bullet}$ oluşumuna katkıda bulunur.



A vitamini ve β-karoten lipofiliktirler, $O_2^{-\bullet}$ radikalini sönümler ya da peroksil radikali ile reaksiyona girerler. Ürik asit, hidrofiliktir ve $O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}OH$ ve peroksil radikallerini sönümler. Geçiş metalleri ile bağ yaparak C vitaminin oksitlenmesini engeller. Glutatyon hem nükleofilik hem de indirgen özellik göstermesi nedeniyle, elektrofilik ve oksitleyici moleküllerle reaksiyona girerek nükleik asit ve proteinleri radikal hasarına karşı korur (Bump ve Brown 1990, Cereser vd., 2001). Proteinlerdeki –SH gruplarını indirgenmiş formda tutarak fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin yükseltgenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede önemli rolü vardır (Akkuş, 1995).

Antioksidan sönümleme enzimleri;

- süperoksit dismutaz (SOD),
- katalaz (CAT),
- glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
- glutatyon redüktaz (GR) dır.

Katalitik aktivitesi için Fe, Cu veya Mn gibi metallere gereksinim duyan ve metaloprotein sınıfında yer alan süperoksit dismutaz (SOD, E.C. 1.15.1.1), süperoksit anyon radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Mc Cord ve Fridovich, 1969; Beauchamp ve Fridovich, 1971; 1997; Heikkila ve Cabbat, 1976; Shimuzu vd., 1984; Paoletti vd., 1986; Moscone, 1988; Sanchez- Moreno vd., 1988; Reddy ve Venkaiah, 1988).

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

İnsanda SOD (SOD; E.C. 1.15.1.1)'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitazolde bulunan, Cu ve Zn içeren dimerik izomer (Cu, Zn-SOD) ve mitokondride bulunan, Mn içeren tetramerik (Mn-SOD) izomerdir. Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit anyon radikalinin zararlı etkisine karşı korur. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan hücrelerde fazladır ve dokudaki O_2 basıncı arttıkça artar. Metabolizmada normal şartlar altında çok fazla süperoksit anyon radikali üretilir, ancak, SOD hücre içi radikal seviyesinin oldukça düşük olmasını sağlayacak şekilde aktivite gösterir (Wheeler vd., 1990). Çeşitli dokular arasındaki SOD aktivitesi farklıdır, fakat en yüksek aktivite karaciğer, adrenal galand, hipofiz bezi ya da safra kesesi, böbrek ve dalaktadır (Rabideau, 2001). SOD, USA ve bazı Avrupa ülkelerinde anti-enflamatuar ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, iskemi tedavisinde de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (McGoff vd., 1988; Rabideau, 2001). SOD, meme ve barsak kanseri ile katarakt oluşumunu önlemede koruyucu bir mekanizmaya sahiptir (Reiter, 1998).

Katalaz (CAT; E.C. 1. 1. 1. 6), hidrojen peroksidin oksijen ve suya dönüşümünü katalizler (Shimuzu vd., 1984). Katalazın bu reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, kompleks I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması ile oluşur. Kompleks I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır (Chance vd., 1979; Gebicka vd., 1989; Akertek 1994; Mc Cord, 2000).

$$CAT + H_2O_2 \longrightarrow CAT\text{———}H_2O_2 \quad \text{(Kompleks I)}$$

$$CAT\text{———}H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow CAT + 2\,H_2O + O_2 \quad \text{(Katalaz aktivitesi)}$$

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

Eğer, metanol, etanol gibi bir hidrojen verici kompleks I ile reaksiyona girerse, oluşan ürün su ve bir aldehittir.

$$CAT\text{—}\ H_2O_2 + CH_3OH \longrightarrow CAT + 2\ H_2O + HCOH$$ (peroksidatik aktivite)

Katalaz, % 1,1 hematin, % 0,09 demir içeriğine sahip dört hematin grubu bulundurur (Aebi 1974). Enzim, labil tersiyer strüktüre sahiptir ve enzimin prostetik grubu olan protohematin IX proteine zayıf bir şekilde bağlıdır. Enzimin yapısındaki demir üç değerlidir. Katalaz, H_2O_2'nin yüksek konsantrasyonlarında (H_2O_2 için K_m= 1 mM) daha etkilidir. Daha düşük H_2O_2 konsantrasyonunun söz konusu olduğu durumlarda, bu aktif türün sönümlenmesinde glutatyon peroksidaz (GSH-Px ; H_2O_2 için K_m; μM düzeyinde) daha etkilidir.

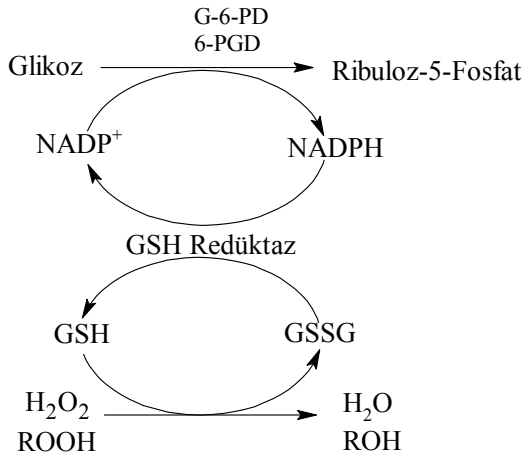
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px; E.C. 1.11.1.9), hem hidrojen peroksidi detoksifiye eder hem de lipid hidroperoksitlerin toksik olmayan alkollere indirgenmesini katalizler (Wheeler vd., 1990; Guemouri vd., 1991).

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} ROH + GSSG + H_2O$$

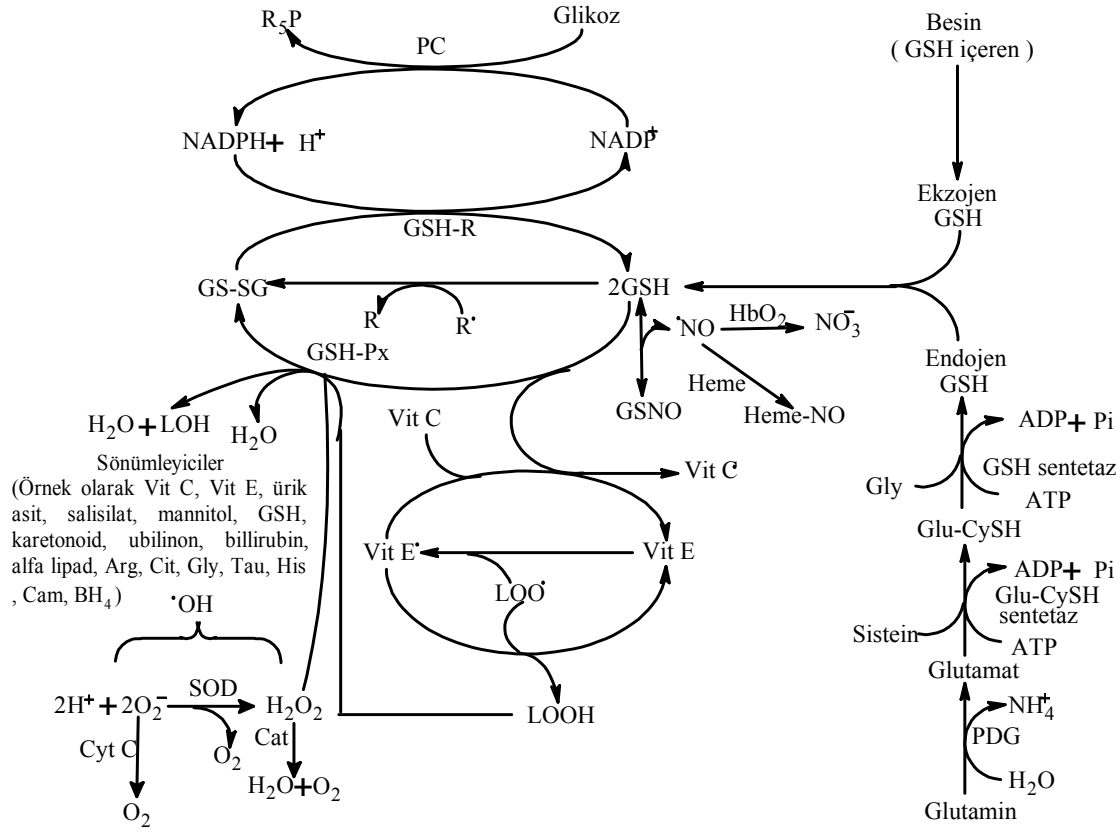
$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2\ H_2O$$

Glutatyon peroksidazlar membran bağımlı ve çözünen tür olmak üzere iki gruptur. Membran bağımlı olanlar lipid hidroperoksitlerini indirgerler. Selenyum bağımlı olan çözünenler ise, H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin glutatyon tarafından indirgenmesini katalize ederler.

Glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2), elektron kaynağı olarak NADH'ı kullanarak düşük molekül ağırlıklı disülfitlerin (GSSG) indirgenmesini katalizler (Rabideau, 2001).



Şekil 1.4 Glutatyon Redüktaz reaksiyonları



Şekil 1.5 Memeli hücrelerinden oksijen, azot serbest radikalleri ile diğer reaktif türlerin uzaklaştırılması

İkincil savunma sistemleri, lipolitik ve proteolitik enzimleri içerir. Her iki grup enzim de, hasar görmüş, değişmiş ya da bozunmuş yağ ya da proteinlerin temizlenmesiyle savunmada ikincil bir hat gibi görev alırlar. Bu proses reaktif hücresel bileşenleri uzaklaştırır, aksi taktirde ortamda daha fazla oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilmektedir (Rabideau, 2001).

1.4 Pestisitler ve Oksidatif Stres

1960'lı yıllardan bu yana Dünya nüfusu iki katına çıkarken tarımsal alanların miktarı sabit kalmış bu da aynı miktar alandan daha fazla ürün elde edilmesi gerekliliğini doğurmuş buna bağlı olarak da tarımsal ürünlerde verimin artırılması, kayıpların

azaltılması yönünde tarım zararlıları ile mücadele zorunlu hale gelmiştir. İnsanlık tarım zararlıları ile savaşarak besin üretimini arttırma yolları aramış ve bu konuda pestisit adı verilen çeşitli kimyasal maddeler kullanmaya başlamıştır. Pestisitlerin yaygın kullanımı sonucu tarım ürünlerindeki kayıplar azaltılmış, bu yolla üretim büyük oranda artırılmıştır. Pestisitlerin kullanılmaması durumunda salgın hastalıklar oluşabilir ve gıda üretiminde büyük kayıplar ortaya çıkabilirdi (Arınç, 1976; Berksan, 1976; Gupta, 1979; Delen vd, 1995; Öztürk, 1997).

Pestisitler, bitki ve hayvanlardaki herhangi bir zararlının kontrolünde ya da önlenmesinde kullanılması tasarlanan bir madde ya da maddelerin karışımıdır. Binden fazla aktif maddenin karışımı ile elde edilen 35.000 civarında pestisit preparatı vardır (61). Pestisitler etki ettikleri zararlılara göre şu şekilde sınıflandırılırlar (Malley, 1997; Gerbracht, 1998; Karadağ, 2000);

İnsektisit :Böcek öldürücü

Fungusit :Mantar yok edici

Herbisit :Yabancı ot öldürücü

Mollusit :Yumuşakça öldürücü

Bakterisit :Bakteri öldürücü

Nematisit :Nematod öldürücü

Rodentisit :Fare ve rat öldürücü

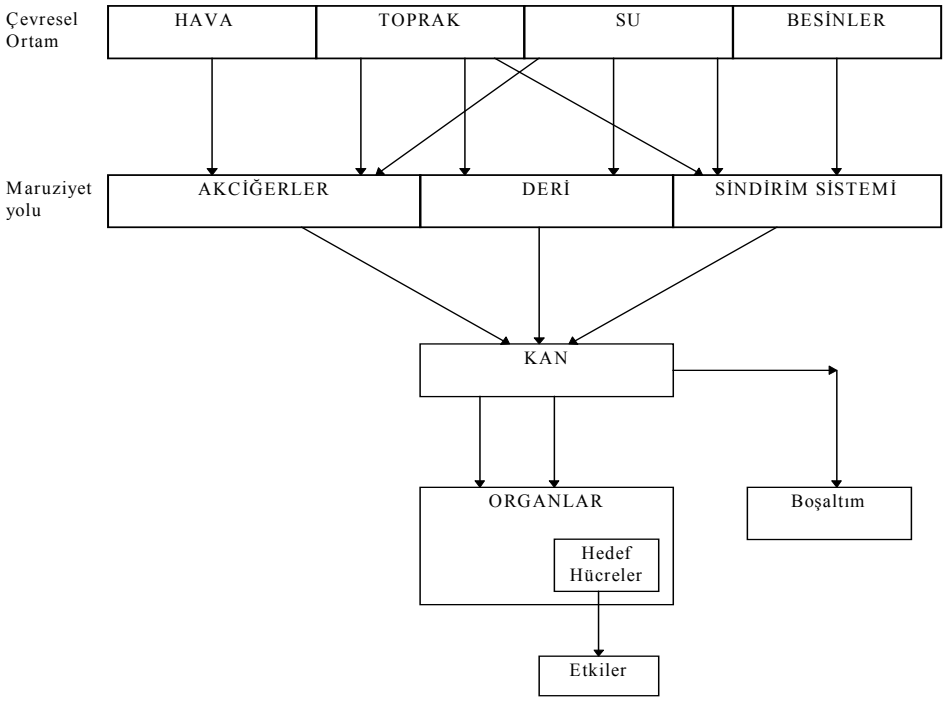
Kullanılan pestisitlerin %47'si herbisit, %29'u insektisit, %19'u fungusit ve %5'i ise diğerleridir. Pestisitler amaçlanan hedefleri dışında çevreye yayılarak, çevre kirliliğine ve doğal hayatın bozulmasına, içilen suda, yenilen meyve ve sebzelerde kalıntılar oluşturarak, insan sağlığına toksik yönde zararlı etkiler göstermektedir. Dünyada her yıl kayıt altına alınabilen 3 milyon akut pestisit zehirlenmesi ve 220.000 ölüm olmakta ve bu ölümlerin %99'u az gelişmiş veya gelişmekte olan

ülkelerde görülmektedir (Arınç, 1976; Berksan, 1976; Gupta, 1979; Delen vd, 1995; Öztürk, 1997).

Havadan çok düşük seviyelerde uygulanan pestisitler buradan sulara ve topraklara oradan da bitki ve hayvanlara geçerek besin zincirine ulaşabilmektedir. Sudaki büyük canlıların daha küçükleri yemesi ve kalıntı içeren maddeleri hayvanların yemesiyle bunlarda oluşan birikim, besin zincirinin son halkasında bulunan insanda kalıntı düzeyi çok daha yüksek ve yoğunlaşmış olarak ortaya çıkar. Doğada görülen bu kalıntının gıda zincirinde ve canlılarda giderek artması olayına biyokonsantrasyon denir (Arınç, 1976; Öztürk, 1978; Ceron, 1995; Berksan, 1996).

Pestisitlerin insanlara zaralı etkileri iki şekilde olmaktadır. Birinci olarak, doğrudan pestisitlerin vücuda alınması ile oluşur. Bu şekilde zehirlenmelere akut zehirlenmeler denir. İkinci olarak, pestisit üretimde ve uygulama alanında çalışma ile veya çevreden gıdalardaki kalıntıların az oranlarda defalarca alımı ile ortaya çıkan kronik zehirlenmelerdir. Pestisitler vücuda alındığında enzimlerin etkisiyle metabolize edilerek dışarıya atılırlar. Ancak belirli bir kısmı da birikerek kronik zehirlenme oluşturur (Rafi vd, 1991; Blanco-Coronado vd, 1992; Karadağ, 2000).

Aşırı gübre ve tarım ilacı kullanımı nedeniyle tarım da majör kirletici sektörler arasına katılmıştır. Bu yolla sadece yüzey ve yeraltı suları kirlenmekle kalmamakta, aynı zamanda besinler de kirlilik taşıyıcısı olmaktadır. Kontaminasyon yolları Şekil-1.6'da gösterilmiştir:



Şekil 1.6 Pestisidlerin kontaminasyon yolları

Gıdalardaki pestisit kalıntılarının uzun süre alınmasıyla uzun vadede akciğer hastalıkları, kanser, beyinde ve periferal sinir sisteminde harabiyet, karaciğer, kalp, endokrin, üreme sistemi ve böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bunların yanı sıra teratojenik, mutajenik, hematolojik, metabolik ve alerjik etkileri olan pestisitler de vardır. Pestisitlerin insanlarda yaptıkları bu etkilerin yanı sıra hayvanlar üzerinde de olumsuz etkileri mevcuttur. Pestisitlerin kümes hayvanları ve kuşlarda yumurta kabuklarının incelmesine neden olduğu ayrıca doğada kuşların üreme ve çoğalmalarını engellediği bilinmektedir. Pestisitlerin bu olumsuz etkileri kimyasal yapı, uygulama ve kullanma sıklığı gibi faktörlere bağlıdır (Farag vd, 2000; Gold vd, 2001).

İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalar, akut, subakut, subkronik ve kronik organofosfat uygulamalarının sonucu ortaya çıkan hepatotoksisite, nörotoksisite, genotoksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi etkenlerin patogenezinde organofosfat insektisitlerinin yol açtığı artmış reaktif oksijen türleri (ROS)'nin neden olduğu oksidadif doku hasarının rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda,

karaciğer, beyin ve tiroit gibi çeşitli doku örneklerinde, serum ve eritrositlerde lipid peroksidasyonu (LPO)'nun bir göstergesi olan tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) seviyelerinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerindeki değişiklerin gösterilmesiyle OPIs'in toksisitesinde oksidatif hasarın rol oynayabileceği belirtilmiştir (Datta vd, 1992; Dwivedi vd, 1998; Banerjee vd, 1999; Kale vd, 1999; Öncü vd, 2002; Altuntas vd, 2003).

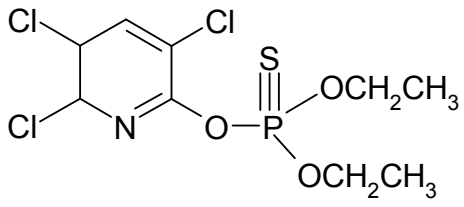
Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisidler, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{-\bullet}$) ve hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilirler, enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olabilirler. Pestisidler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna neden olurlar. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılamazlarsa oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir. Bazı çalışmalarda, pestisidlere maruz kalan işçilerde, akciğer kanseri, mesane kanseri ve lösemi riskinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra organofosfatlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını da içeren birçok nöropatolojik oluşumlara da yol açmaktadırlar. Çünkü bu kimyasalların hedefi, korteks ve hipokampüsteki sinirsel uyarılabilirliğin ana düzenleyicisi olan GABAerjik ve kolinerjik sistemlerdir(Castillo vd., 2002). Organofosfatların toksisitesi, asetilkolinesterazın inhibisyonundan dolayı asetilkolinin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Asetilkolinin fazlalığı, kolinerjik reseptörler ile asetilkolinin etkileşimine bağlı olarak başlayan olayları olumsuz yönde etkiler (Hazarika vd., 2003).

Nörotoksisite birçok pestisitin ortak karakteristiğidir. Organofosfatlar, asetilkolin esterazın aktivitesini inhibe ederek sinir sinapslarında asetilkolin birikmesine neden olur. Bu, merkezi ve periferal sinir sisteminde nöral geçişin bozulmasına neden olur. Düşük dozda organofosforlu pestisitlere maruz kalmanın çeşitli biyokimyasal değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bunların bazılarının olumsuz biyolojik

etkilere neden olabileceği insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Organofosfatların biyolojik etkilerini, beyin ve diğer dokuların hücresel bileşenlerine özellikle elektrofilik saldırı yaparak gösterdiği öne sürülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, in vivo sistemlerde olduğu kadar in vitro sistemlerde de bir çok pestisidin reaktif oksijen türü üretme, DNA hasarı oluşturma ve sitotoksisite potansiyeli olduğunu göstermiştir. Pestisidler, membran bağlı enzimlerin ve reseptörlerin değişmesine, membran potansiyelini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar (Gupta vd., 1998; Fang vd., 2002; Seth vd., 2000). Bu tür olaylar özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek, nöral hücreleri yenilenemeyen beyinde dramatik sonuçlara neden olabilir (Gupta vd., 1998).

1.4.1 Klorprifos

Kimyasal ismi: 0-0-diethyl 0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate
Kimyasal yapısı:



Şekil 1.7 Klorprifos

Molekül ağırlığı: 350.59
Erime noktası: 45.5-46.5°C
Buhar basıncı: $1.87*10^{-5}$ mmHg (25°C)
Ampirik formül: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

CP geniş spektrumlu insektisidal aktiviteye sahiptir. Çim, süs bitkileri ve depolanmış ürünler üzerindeki böcekleri kontrol etmek için kullanılır; hedef türler, ateş karıncaları, sivrisinekler, evsel böcekler, ağaç kurtları ve yaprak bitleridir. CP nin, bir insektisid olarak önemi, yüksek biyolojik aktivitesi ve kısa yarı ömründen

kaynaklanmaktadır. CP, Dow AgroSciences tarafından üretilmektedir ve Dursban™, Lorsban™ ve Equity™ gibi birkaç ticari isimle anılmaktadır.

Diğer organik fosfatlarla olduğu gibi, etkinin temel prensibi asetil kolinesterozun fosforilasyon ve takip eden inaktivasyonudur (Wier, RJ., 1993).

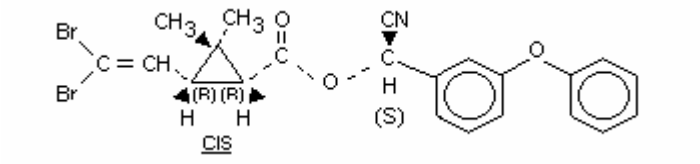
CP, oral yolla verildiğinde ratlar tarafından kolaylıkla emilir. Tüm ana bileşik ve biotransformasyon ürünleri, idrarda belirir. CP nin ve radyo etiketli biotransformasyon ürünlerinin yarı ömrü erkek ratlarda 8 saat ile dişi ratlarda 12 saat arasında değişir (DOW AgroSciences LLC den yayınlanmamış veri). Erkeklerde 3 doz ve dişilerde de 6 dozdan sonra, 25 mg/kg dozun 0.2% si ceset ya da dokuda kalmaktadır. Radyo etikletli CP nin doku artıklarının yarı ömrü 62 saattir (Smith, GN vd 1967).

CP nin cildsel emilimi zayıftır. 5 mg/kg lık bir dozdan sonra, % 3 den daha azı idrarda 3,5,6-trichloro-2-pyridinol olarak belirmiştir. Cildsel dozdan 24 saat sonra metabolitin doruk kan konsantrasyonu, ana bileşikle birlikte 0.063 µg/mL dir. Böylece, oral dozun 10 katı kadar olan bir CP cildsel dozu, yaklaşık olarak 15 kat düşük doruk kan metabolit seviyeleri açığa çıkarmaktadır (Nolan, RJ vd 1984).

1.4.2 Deltamethrin

Kimyasal ismi: (s)-alfa-siyano-3-fenoksibenzilcis-(1R,2R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilsiklopropankarboksilat

Kimyasal yapısı:



Şekil 1.8 Deltamethrin

Molekül ağırlığı: 505.2
Erime noktası: 98-101°C
Buhar basıncı: $1.5*10^{-8}$ mmHg (25°C)
Ampirik formül: $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$

Deltamethrin, sineklerde öldürücü etkisi yüksek olan bir α-siyano piretroitdir. Piretroitler, yapısal olarak piretrumdan şekillenen farmakolojik olarak etkin, pestlere karşı ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan sentetik bileşiklerdir (Stelzer, KJ., 1984, Szepvöllgyi, J. vd 1988). Deltamethrin, sinekler, diğer antropotlar ve balıklar için son derece zehirlidir. Memelilerde ise metabolizması ve atılımı hızlı olduğu için zehirliliği oldukça düşüktür. Decis ve K-othrin ticari isimleriyle tanınır.

Zehirli etkilerini gerek sineklerde, gerekse memelilerde öncelikle sinir sistemi üzerinde gösterir. Piretroit insektisitlerin, alerjik ve immünolojik etkileri de vardır(Kowalczyk-Bronisz, SN vd 1990, Srivastas, AK. vd 1997). Piretroit zehirlenmeleri, hiper hassasiyet, aşırı salivasyon, koreoatetoz, titreme ve felç ile açığa çıkar fakat duyumsal sinirlerde hiçbir tekrarlayan sinir atışları görülmez. Zehirlenme belirtilerindeki bazı farklılıkların dışında, tüm piretroid tipleri için temel hedef sodyum kanalıdır. Tüm aktif piretroidler uyarılabilir doku içindeki sodyum kanallarıyla etkileşir ve zar depolarizayonu ile sodyum akımını uzatır (Vijverberg ve Bercken, 1990).

2 KAYNAK ÖZETLERİ

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve hücrelerin serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı koyabilme yetileri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder (Simonian ve Coyle, 1996).

Reaktif oksijen bileşiklerinin herhangi bir nedenle aşırı oluşumu veya antioksidan savunma sistemi ve onarım sistemlerindeki yetersizlikler sonucu oksidatif stres gelişir (Kökoğlu, 1998).

Oksidatif stres, serbest radikaller üretildiğinde artar, serbest radikallerin temizlenmesiyle veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Oksidatif stresin kronikleşmesi, hücrelerde prooksidan-antioksidan dengenin bozulmasına ve oksidatif hasarın başlamasına neden olur. Bu dengesizlik, hücresel disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilen oksidatif modifiye moleküllerin yapılanmasıyla sonuçlanır. Oksidatif etki genelde proteinlerin modifikasyonu, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, lipid peroksidasyonunun ve DNA'daki hasarın artması şeklinde gözlenmektedir (Reiter, 1998).

Bagchi ve ark. (1999), organofosfatların in vivo ve in vitro olarak; SOD aktivitesi inhibisyonu, GSH-Px aktivitesinde azalma ve MDA üretiminde artışa yol açarak hepatositlerde oksidatif hasar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Lodovici ve ark. (1997), klorprifos ve deltamethrin'ini de içeren 15 pestisit karışımını ratlara uygulayarak oksidatif hasarın indeksi plarak karaciğer DNA'sında 8-OH-2DG düzeylerini ölçmüşlerdir. 0.75 ve 1 mg/kg dozlarında 8-OH-2DG'in DNA'daki düzeylerinin kontrollerle karşılaştırıldığı zaman önemli derecede arttığını, bununla beraber daha yüksek dozlardaki (2.5, 5, 10 mg/kg) düzeylerin ise kontrol değerlerine döndüğünü rapor etmişlerdir. İlaveten, karaciğerde benzo (a) piren

hidroksilaz, N-demetilaz, GSH-Px, GR, GST ve tiol trensferaz aktivitelerinde doza bağımlı olarak azalma olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta, pestisit karışımlarının düşük dozlarının oksidatif DNA hasarı oluşturduğunu, bununla beraber daha yüksek dozlarının oksidatif hasarın ileri ekspresyonunu inhibe ederek hücresel metabolizma depresyonu oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir.

Gordon (2000), belirli dozlarda (0.5, 10 ve 25 mg/kg) klorprifos verdiği erkek ratların motor aktivitesini, damar sıcaklığını (T_c), nabzı (HR), kan basıncını (sistolik, diyastolik), sistolik (S) ve diyastolik (D) değerlerini ölçmüş ve şu sonuçlara ulaşmıştır: BP, kontrollerin ötesinde 15-20 mmHg yükselmiş ve artışlar gece boyunca ve ertesi gün sürmüştür. HR, 25 mg/kg klorprifos verilen ratlarda küçük bir artma gözlenirken 10 mg/kg verilenlerde değişmemiştir. T_c, 25 mg/kg klorprifos verilmesiyle düşmüş ve ertesi gün kontrollerin üzerinde artmıştır. Motor aktivitesi, 25 mg/kg verildiğinde azalırken 10 mg/kg verildiğinde değişmemiştir. Kan basıncı, 10 ve 25 mg/kg klorprifos verildikten sonra 40 saatte 2-4 mmHg yükselmiştir.

Breslin ve ark. (1994), ratlarda toksik doz seviyelerinde oral olarak klorprifos verilmesinin embriyotoksik, embriyoletal veya teratojenik olmadığını bildirmişlerdir.

Roy ve ark. (1998), rat embriyolarında, klorprifos'un nöral tüp gelişim evrelerindeki etkilerini çalışmışlardır. Embriyonik 9.5'ncu günde embriyolara 0,5, 5 veya 50 μg/ml klorprifos uygulayarak 48 saat sonra embriyoları dismorfogenesiz açısından incelemişlerdir. Ön beyin ve arka beyin bölgelerinde hücrelerde mitotik tabakanın disoryantasyonu ve dağılması ile mitotik figürlerde azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Thrasher ve ark. (1993), klorprifos'a maruz kalan insanlarda, yüksek oranlarda atopi, antibiyotik hassasiyeti, artmış CD26 hücreleri ve otoimmünite saptamışlardır. İlaveten, düz kas, parietal hücre, fırçamsı kenar, treid bezi ve miyeline karşı otoantikorların oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Blakley ve ark. (1999), ratlarda yaptıkları bir çalışmada, klorprifosun lenfosit üretimi ve CD5+ ve CD8+'in rölatif ekspresyon yüzdesini artırdığını ve makrofaj fagositozu üzerinde ise bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir.

Gordon ve ark. (1997), klorprifos'un hipotermik ve hipertermik etkilerine erkek ratların daha büyük direnç gösterdiğini ve bunun testiküler fonksiyonlarla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

Bilgili ve ark. (2002), belirli süre (28 gün) ve dozlarda (10, 20, 40, ve 80 mg/kg/ca/gün) verilen organik fosforlu insektisit klorprifos'un humoral bağışıklık üzerine etkisini araştırmışlar ve humoral bağışıklık sisteminde anlamlı bir baskılanma ($p<0,05$)tespit etmişlerdir.

Gordon ve ark. (1998), klorprifos'un nöroimmun mekanizmayı etkilediğini öne sürmüştür. Araştırıcılar, klorprifos verilen ratlara daha sonra E. Coli vermişler ve vücut ısısının kontrol grubuna göre düşük kaldığını bulmuşlardır. Vücut ısısı artışının siklo oksijenaz ve prostaglandin E2 (MMS'de) üretimi ile ilişkili olduğu (7,8) bilindiğine göre çalışmada kullanılan klorprifosun kesin olmamakla birlikte, bu yolak üzerinden etkilenebileceği ve artan dozlarda bağışıklık sistemini baskılayabileceği görülmüştür).

Richardson ve Slotkin (1999), klorpirifos'un humoral bağışıklık üzerinde, ancak çok yüksek dozlarda (40 mg/kg/ca/gün) etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Araştırıcılar, bileşiğin humoral bağışıklık sistemine yönelik etkisini, kolinestaraz etkinliğini engellemesiyle açıklamıştır.

Zabrodskii (1993), klorpirifos'un, humoral bağışıklık sistemine yönelik etkisini, termoregülatör sisteminin baskılanması ve dolayısıyla da vücut ısısının düşmesi ile açıklamıştır.

Serrano ve ark. (1997) tarafından klorprifos, klorfenvinfos ve MD ile yapılan bir çalışmada bu bileşiklerin deniz organizmaları ve insanlar için potansiyel bir risk oldukları ve canlıların dokularında birikecekleri bildirilmiştir.

Bagchi ve ark. (1995), ratlara 0. ve 21. saatlerde oral olarak klorprifos uygulamasını izleyerek, 24. saatte hepatik DNA-tek kolu kırıklarında 3 kat ve beyin nüklear DNA-tek kolu kırıklarında ise 1,4 kat artış olduğunu bildirmişlerdir.

Mortensen ve ark. (1998), deltamethrine maruz kalan ratlarda altı ayrı yaş grubunun beyinlerinde total kolinesteraz aktivitesi inhibisyonunun %90'ının AchE ve %10'unun bütirilkolinesteraz'a ait olduğunu ve beyin AchE aktivitesinin yaşla bağıntılı olarak arttığını saptamışlardır.

Deltamethrin'e maruz kalan (10 ve 30 gün) ratlarda humoral ve hücresel bağışıklık sistemi üzerine ihmal edilebilir bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Kowalczyk ve Bubac, 1990).

Ratajczak ve Krechniak (1991) günlük olarak ağızdan 84 gün boyunca 6mg/kg ve 14 gün boyunca 15 mg/kg deltamethrin vermişler humoral ve hücresel immun sisteminin anlamlı bir şekilde baskılandığını bulmuşlar.

Zira Crofton ve Reider (1987) 6 mg/kg dozda deltamethrinin ratlarda motor etkinliği düşürdüğü saptamışlardır.

Ratajczak ve Krechniak (1991), ratlara 84 gün boyunca verilen deltamethrinin maruziyet süresine bağlı olarak canlı ağırlık ve dalak ağırlıklarında deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli bir fark görmemişlerdir.

Queiroz (1993), ratlara 1,3,5 mg/kg derialtı yolla deltamethrin vermiş denemenin 1., 3., ve 5. günlerinde deneme gruplarında timus ağırlığında azalmanın olduğunu bildirmiştir.

Bilgili ve ark.(2002), ratlara 7,5 ve 30mg/kg ca/gün dozlarında deltamethrini yem ile 30 gün süre ile vermiş, sonuçta; subakut süre ile verilen deltamethrinin bağışıklık sistemini baskıladığı, fakat lökosit dışında kan parametrelerini etkilemediğini saptamışlardır.

Asetilkolinesteraz, çevresel ve merkezi kolinetjik sistemde ana bir nörovericidir. Piretroid-bağımlı nörovericisinin beyindeki presinaptik sinir terminallerinden yayılımı ilk olarak deltamethrin verilen farelerde belgelenmiştir. Delta methrin uygulaması, beyincik içerisindeki asetilkolin seviyesindeki önemli düşüş ile sonuçlanmıştır(Prado vd, 2002).

3 MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması:

Bu çalışmada, Wistar-Albino türü ratlar kullanılarak kontrol ve 5 farklı deney grubu olmak üzere altı grup oluşturuldu (Çizelge 3.1). Çalışmada 3 aylık erkek ratlar kullanıldı. Kontrol grubundaki ratlar, pellet yem ve normal Isparta şehir şebekesinden alınan su ile, deney grubundaki ratlar ise, pellet yem ve belirli dozlarda klorprifos ve deltamethrin içeren şehir şebekesi suyu ile 12 hafta süreye beslendi. Bu süre sonunda ratlar, eter anestezisi altında dekapite edilip, laporotomi ile renal venden EDTA'lı tüplere kan örnekleri ve beyin dokuları alındı.

Çizelge 3.1 Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Gruplar	Hayvan sayısı	Maruz bırakılan pestisit
Kontrol grubu	8	Şebeke suyu
Grup 1	8	Düşük doz CP (1,0 mg/kg/gün)
Grup 2	8	Yüksek doz CP (15,0 mg/kg/gün)
Grup 3	8	Düşük doz DM (5,0 mg/kg/gün)
Grup 4	8	Yüksek doz DM (35,0 mg/kg/gün)
Grup 5	8	Düşük doz CM+ düşük doz DM (1,0 CP+5,0 DM mg/kg/gün)

3.1.2 Kan numunelerinin hazırlanması:

Ratlardan EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, ilk olarak 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilip, üstteki plazma kısmı iki ayrı ependorf tüpüne bölünerek -80^{o}C'da muhafaza edildi. Alttaki eritrosit kısmı, 3 kez soğuk izotonik salinle (%0,9'luk NaCl) yıkandı. Her bir yıkama, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlemenin ardından üst fazın atılmasıyla tamamlandı. Yıkama işleminden sonra 2 mL soğuk bidistile su ilavesiyle hemolizat hazırlandı ve hemolizat, ölçümlere kadar –80^{o}C'da muhafaza edildi.

3.1.3 Doku numunelerinin hazırlanması:

Beyin dokuları, uygun oranlarda 50mM fosfat tamponu (pH=7,4) ile soğuk zincire uygun bir şekilde Ultra Turrax homojenizatör kullanılarak 8000 devir/dakika hızında 10 dk süre ile homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra +4ºC'da 10 dakika süre ile soğutmalı santrijüjde santrifüj edilip süpernatan kısmı ölçümlere kadar -80ºC'da muhafaza edildiler.

3.1.4 Kullanılan malzeme ve cihazlar:

Deneylerde kullanılan cihazlar, Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan cihazlar

Malzeme/Cihaz	**Markası**
Hassas terazi	Scaltec, Precisa
Manyetik karıştırıcı	Nüve
Santrifüj	Nüve, Eppendorf, Hereaus
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf

Vorteks	Nüve
Mikropipet	Eppendorf, Biohit, Gilson
Derin dondurucu	Uğur, Facis, Snijders Scientific
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1201, 1600
Hemogram cihazı	Coulter Max
pH- metre	Mettler Toledo
Homojenizatör	IKA, Ultra Turrax T25

3.1.5 Kullanılan kimyasal maddeler:

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup kullanıldıkları yönteme göre gruplandırılarak aşağıdaki Çizelgelerde gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler

Adı	**Formülü**	**Markası**
Ksantin	$C_5H_4N_4O_2$	Sigma
Ksantin oksidaz	XOD	Sigma
Potasyum dihidrojenfosfat	KH_2PO_4	Merck
Disodyum hidrojenfosfat	Na_2HPO_4	Merck
3-[Siklohekzilamino]-1-propensülfonik asit (CAPS)	$C_9H_{19}NO_3S$	Sigma
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma
2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür (INT)	$C_{19}H_{13}ClIN_5O_2$	Sigma

Çizelge 3.4 GSH-Px tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	**Formülü**	**Markası**
Glutatyon	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Sigma
Glutatyon redüktaz	GR	Sigma
β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β-NADPH)	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$	Sigma
Kümen hidroperoksit	$C_9H_{12}O_2$	Sigma
Potasyum siyanür	KCN	Sigma
Potasyum ferrisiyanür	$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma
Potasyum bikarbonat	$KHCO_3$	Sigma

Çizelge 3.5 CAT tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	**Formülü**	**Markası**
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Sigma
Potasyum dihidrojenfosfat	KH_2PO_4	Merck
Disodyum hidrojenfosfat	Na_2HPO_4	Merck

Çizelge 3.6 Lipid peroksidasyon tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	**Formülü**	**Markası**
Trikloroasetik asit (TCA)	$C_2HCl_3O_2$	Merck
Tiyobarbitürik asit (TBA)	$C_4H_4O_2N_2S$	Sigma

Çizelge 3.7 GSH tayini için kullanılan kimyasal maddeler

Adı	**Formülü**	**Markası**
Metafosforik asit	H_3PO_3	Sigma
Ellman reaktifi (DTNB)	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	Sigma
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8.2H_2O$	Merck
Disodyum hidrojen fosfat	Na_2HPO_4	Merck
Sodyum sitrat	$C_6H_5Na_3O_7$	Sigma
Sodyum klorür	NaCl	Sigma

3.1.6 Kullanılan çözeltiler

H_2O_2 çözeltisi (10,5 mM): % 30'luk H_2O_2 çözeltisinden 107 µL alınır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,00) ile 100 mL'ye tamamlanır.

Ksantin çözeltisi (0,05mM): 3,80 mg ksantin tartılır ve hacmi 40 mM CAPS tamponu (0,94 mM EDTA içeren; pH= 10,2) ile 500 mL'ye tamamlanır. Çözelti, 0,025 mM 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT) içermektedir ve +2- +8 ^oC'da muhafaza edildiğinde 10 gün süreyle kararlıdır.

Ksantin oksidaz çözeltisi (80U/L): 32 µL ksantin oksidaz standardından alınır, 10 mL bidistile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

CAPS tamponu (40 mM): 2,21 g CAPS tartılıp bir miktar bidistile suda çözülerek son hacmi 250 mL'ye tamamlanır ve pH 10,2'ye ayarlanır. Çözelti 0,94 mM EDTA içermektedir.

Kümen hidroperoksit çözeltisi (0,18 mM): Kümen hidroperoksit standardından 10 μL alınır, 10 mL bidistile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

Glutatyon çözeltisi (4mM): 0,307 g glutatyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH=7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 250 mL'ye tamamlanır.

Glutatyon redüktaz (0,5 U/L): 3,4 μL glutatyon redüktaz standardından alınır, 50 mM fosfat tamponu (4,3 mM EDTA içeren ve pH=7,2 olan) ile 1L'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

β-NADPH çözeltisi (0,28 mM): 0,058 g β-NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH=7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 250 mL'ye tamamlanır.

Drabkin çözeltisi (Double Drabkin): 50 mg potasyum siyanür, 1 *g* sodyum bikarbonat ve 200 mg potasyum ferrisiyanür tartılır, bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 500 mL olacak şekilde bidistile suyla tamamlanır.

Fosfat tamponu (50 mM): 6,81 g KH_2P0_4 ve 7,1 g Na_2HP0_4 tartılıp bir miktar bidistile suda çözülerek son hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

Fosfat tamponu (10 mM): 1,362 g KH_2P0_4 ve 1,42 g Na_2HP0_4 tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

NaCN çözeltisi (50 mM): 0,245 g NaCN tartılır, bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi bidistile suyla 100 mL'ye tamamlanır.

TCA çözeltisi (%30): 30 g TCA tartılıp bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

TBA çözeltisi (% 0,67): 0,67 g TBA tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Metafosforik asit çözeltisi: 1,67 g metafosforik asit, 30 g NaCl ve 0,2 g EDTA tartılır, bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Disodyumhidrojenfosfat çözeltisi (0,3 M): 4,29 g Na_2HPO_4 tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

DTNB çözeltisi: 40 mg DTNB ve 1 g sodyum sitrat tartılır, bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 100 mL olacak şekilde bidistile su ile tamamlanır. Çözelti, $+4^oC$'da muhafaza edildiğinde üç hafta süreyle stabildir.

3.2 Metod

3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD) tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini, kinetik ölçüme dayalı Woolliams ve çalışma arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (Woolliams ve ark.,1983).

Deneyin prensibi: Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sisteminden hareketle süperoksit radikalinin ($O_2^{-\bullet}$) oluşumunu temel almaktadır. Oluşan radikaller, INT [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür] ile kırmızı renkli formazan boyayı oluşturur. SOD aktivitesi, bu reaksiyonunun inhibisyonu ile ölçülür.

$$\text{Ksantin} \xrightarrow{\text{XOD}} \text{Ürik Asit} + O_2^{\cdot-}$$

$$O_2^{\cdot-} + \text{INT} \longrightarrow \text{Formazon boyası (kırmızı)}$$

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

Deneyin yapılışı: Hızlı bir şekilde yıkanan santrifüjlenen eritrositlerden 0,5 mL alınıp soğuk bidistile su ile 2 mL'ye tamamlandı. Lizat, % inhibisyonun %30-60 arasında olması için 0,1 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile seyreltildi. 0,025 mL hemolizata 0,850 mL 0,05mM ksantin çözeltisi (0,025mM INT içeren) ilave edildi. 0,125 mL ksantin oksidaz (80U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37^{o}C'da 30 saniyelik gecikme fazının ardından havaya karşı başlangıç absorbansı (A_1) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A_2) okundu. Aynı işlemler kör denemeyle de tekrarlandı. Hesaplamada aşağıdaki bağıntı kullanıldı.

$$\Delta A / \min = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

İnhibe edilmemiş reaksiyon hızı, %100 kabul edilip tüm standart ve numune hızları aşağıdaki bağıntı ile hesaplandı.

$$\%\,\text{inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A_{std/\min} \times 100)}{\Delta A_{S1/\min}}$$

$$\%\,\text{inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A_{Num/\min} \times 100)}{\Delta A_{S1/\min}}$$

Standartların derişimleri, inhibisyon yüzdelerine karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği oluşturuldu ve bu grafik yardımıyla numunelerin derişimleri, inhibisyon yüzdeleri kullanılarak hesaplandı. Bu verilerden tam kan SOD aktiviteleri, seyrelme faktörleri de kullanılarak U/mL olarak hesaplandı ve takiben aşağıdaki bağıntı ile U/g Hemoglobin olarak ifade edildi.

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir:

$$y = 37,13+50,74x +1,82x^2 -17,25x^3 +13,47x^4$$

$$R^2 = 1$$

Doku SOD aktivitesinin tayini amacıyla, aynı işlemler tekrarlandı. Buradaki seyrelme, homojenizasyondaki seyrelmedir.

3.2.2 Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tayini

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Paglia ve Valentine metoduna dayalı olarak tayin edildi (Paglia ve Valentine, 1969).

Deneyin prensibi: Glutatyon peroksidaz, kümen hidroperoksitin glutatyon (GSH) varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutatyonun yükseltgenmiş formu (GSSG), glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın $NADP^+$'ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir.

$$2\ GSH + ROOH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} ROH + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2\ GSH$$

Deneyin yapılışı: 0,050 mL hemolizata, 1,000 mL seyreltici reaktiften ilave edildi. 5 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 1,000 mL Double Drabkin çözeltisinden ilave edilip karışım vortekslendi. Ayrı bir deney tüpünde 1,000 mL glutatyon (4mM), glutatyon redüktaz (0,5U/L) ve β-NADPH (0,28mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 0,020 mL numune karıştırılıp ölçümden hemen önce 0,040 mL kümen hidroperoksit (0,18mM) ilave edildi. Enzim aktivitesi, 340 nm'deki absorbans değişimi ve seyrelme faktörleri kullanılarak U/L olarak hesaplandı ve aşağıdaki bağıntı ile U/g Hemoglobin şeklinde ifade edildi.

$$\text{GSH - Px U/g Hemoglobin} = \frac{\text{GSH - Px U/ L}}{1000 \times \text{g Hemoglobin / mL}}$$

Doku GSH-Px aktivitesinin tayini amacıyla, aynı işlemler tekrarlandı. Buradaki seyrelme, homojenizasyondaki seyrelmedir. Enzim aktivitesi, 340nm'deki absorbans değişimi ve seyrelme faktörleri kullnılarak U/L olarak hesaplandı ve U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3 Katalaz (CAT) tayini

Katalaz tayini, kinetik ölçüme dayalı Aebi metoduna dayanmaktadır (Aebi, 1974).

Deneyin prensibi: Katalaz, hidrojen peroksidin (H_2O_2), su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler .

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaz}} 2\ H_2O + O_2$$

Çalışmada, katalaz aktivitesi, H_2O_2 konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir.

Deneyin yapılışı: Katalaz aktivitesinin tayini amacıyla daha önce hazırlanan hemolizatlar, 50 mM fosfat tamponu (pH=7,00) ile 1:500 oranında seyreltildiler. 2,00 mL hemolizat üzerine 1,00 mL H_2O_2 çözeltisi (30 mM) ilave edilip homojenleştirildikten sonra 240 nm'deki absorbans değişimleri, 15'şer saniye aralıklarla kaydedildi. Benzer işlemler, 2,00 mL hemolizat ve 1,00 mL fosfat tamponu içeren kör denemeyle de tekrarlandı. H_2O_2'in bozunması, başlangıçta (yaklaşık ilk 30 saniye) birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uymaktadır. Bu nedenle, aktivite hesabı, başlangıç ve 30. saniye absorbansları dikkate alınarak aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$k = (2{,}303 / \Delta t)(\log A_1/A_2)$$

Aktivite birimi, buradan elde edilen değerlerin seyrelme faktörü ile çarpılıp hemoglobin miktarına bölünmesiyle k/g Hemoglobin olarak ifade edildi.

Doku katalaz aktivitesinin tayini amacıyla, daha önce hazırlanan homojenizatlar, 50mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile 1:5 oranında seyreltildi. 2,00 mL homojenizat üzerine 1,00 mL H_2O_2 çözeltisi (30mM) ilave edilip 240nm'deki absorbans değişimleri 15'er saniye aralıklarla kaydedildi. Benzer işlemler, kör denemeyle de tekrarlanıp aktivite hesabı, başlangıç ve 30. saniye absorbansları dikkate alınarak hemolizat için kullanılan formüle göre yapıldı. Aktivite birimi, elde edilen değerlerin seyrelme faktörü ile çarpılıp protein miktarına bölünmesiyle k/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.2.4 Lipid peroksidasyon tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, tiyobarbitürik asit metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyin prensibi, Draper ve Hadley yöntemine dayanmaktadır (Draper ve Hadley, 1990).

Deneyin prensibi: MDA, lipid peroksidasyonun güvenilir bir indikatörüdür. MDA, biyolojik materyallerde farklı kovalent bağlı formlarda ve bir dereceye kadar da serbest halde bulunur. Asit veya bazla sıcakta muamele ile kovalent yapıdan ayrılması sağlanır. Polidoymamış yağ asidi (PUFA) peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tayini, TBA ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanır.

Deneyin yapılışı: 0,5 mL serum üzerine 2,5 mL %10'luk TCA eklenip, tüpler vortekste karıştırıldı. 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip derhal soğutuldu. 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 2'şer mL başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1 mL %0,67'lik TBA eklenip vortekste karıştırıldı. Numuneler tekrar 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip hemen soğutulduktan sonra 532 nm'deki absorbansları kaydedildi. MDA miktarı, oluşan MDA-TBA

kompleksinin en yüksek absorbansa özgü 532 nm'deki absorbans değerlerinden (ε= 1.56 x $10^5 cm^{-1}M^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı.

$$A= \varepsilon \times l \times c \Rightarrow c= A / \varepsilon \times l$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l} = \frac{A \times mol \times 10^9 \times L \times 100mL}{1{,}56 \times 10^5\, cm^{-1} \times L \times cm \times mol \times 1000mL \times mgHb} = A \times \frac{10^3\, mol}{1{,}56 \times mgHb}$$

$$c = \frac{A}{g\ Hb} \times 641 \times \text{seyrelme faktörü} = nmol / mg\ Hb$$

A : Absorbans l : ışık yolu, cm

ε : Molar soğurma katsayısı c : konsantrasyon

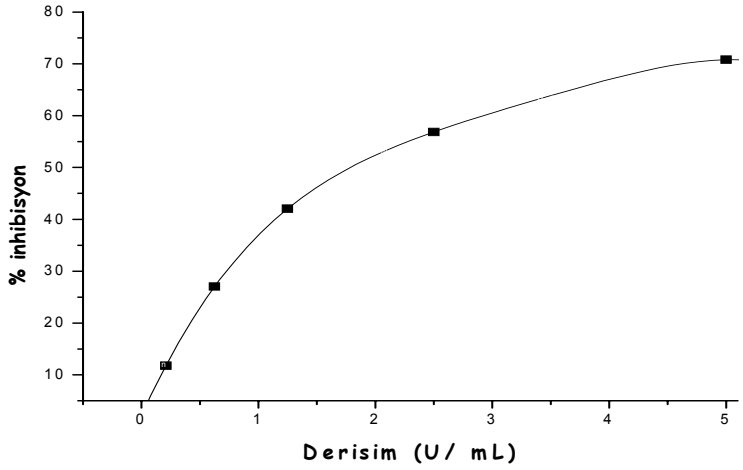
Doku MDA miktarının tayini amacıyla, aynı işlemler tekrarlandı ve derişimleri yukarıdaki formül kullanılarak nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.2.5 GSH tayini

Bir tripeptit olan glutatyonun (GSH, γ-glutamilsisteinilglisin) tayini, Tietze metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tietze, 1969).

Deneyin prensibi: GSH, sayısız ve oldukça önemli fonksiyonlarından dolayı ölçümü üzerinde durulması gereken bir antioksidandır. Glutatyon ve diğer tiyollerin ölçümü, sulu çözeltide kararsız olmalarından dolayı oldukça zordur. Bu nedenle, serbest sülfidril grubu içeren bileşiklerin bir türevlendirici reaktif ile reaksiyona sokularak kararlı hale getirilmeleri gerekir. Çalışmada GSH tayini, bileşiğin Ellman reaktifi (DTNB) ile verdiği renkli ürünün 412 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanmaktadır.

$$\text{SOD U/g Hemoglobin} = \frac{\text{SOD U / mL}}{\text{g Hb / mL}}$$

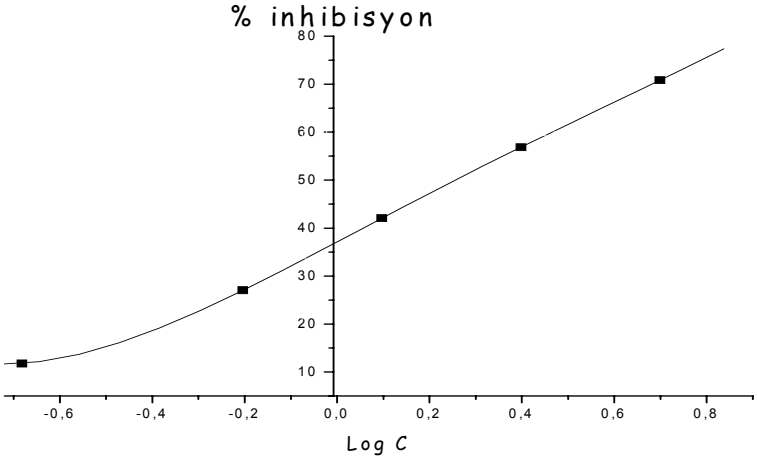


Şekil 3.1 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin konsantrasyona bağımlı değişimi

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir:

$y = 2{,}07958 + 50{,}29755x - 18{,}81371x^2 + 3{,}66696x^3 - 0{,}27326x^4$

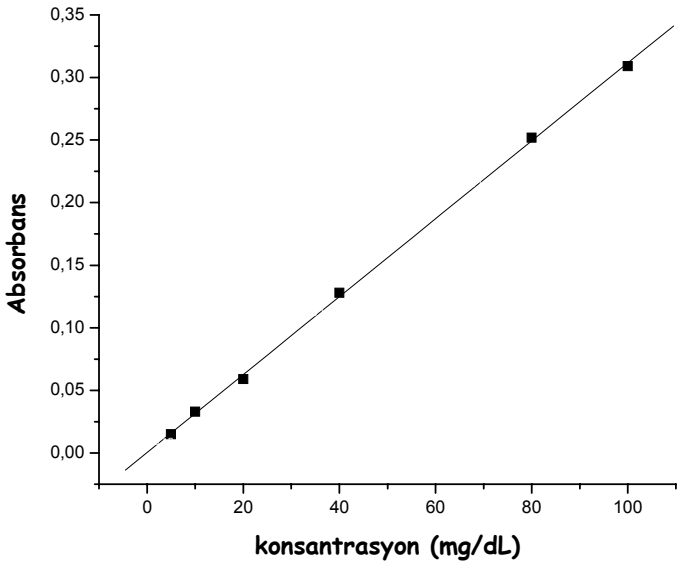
$R^2=1$



Şekil 3.2 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin log C'ye bağımlı değişimi

Deneyin yapılışı: 50 µL eritrosit üzerine 450 µL distile su ve 750 µL metafosforik asit çözeltisinden eklenip, tüpler vortekste karıştırıldı. 5 dakika süreyle buzlu suda bekletilip 3000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 500'er µL başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 2 mL Na_2HPO_4 çözeltisinden eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra üzerine 250 µL DTNB çözeltisinden ilave edildi ve 412 nm'deki absorbansları kaydedildi. GSH miktarı, oluşan ürünün 412 nm'deki molar absorbans değerleri kullanılarak daha önce çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplandı. GSH konsantrasyonun hesabında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{\text{GSH derişimi (kalibrasyon grafiğinden bulunan)}}{\text{Hemotokrit}}$$



Şekil 3.3 Glutatyon kalibrasyon grafiği

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir.

$y = 3{,}43089 \times 10^{-4} + 0{,}00311\ x$

$r = 0{,}99973$

Doku GSH miktarının belirlenmesi amacıyla, benzer işlemler tekrarlandı.

4 ARAŞTIRMA BULGULARI

Kan örneklerinde CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile MDA düzeyleri materyal-metotta belirtilen koşullarda tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortalama ± standart sapma cinsinden Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Eritrosit enzim aktiviteleri ile kan MDA düzeyleri

	SOD (U/gHb)	**GPx (U/gHb)**	**CAT (k/gHb)**	**MDA (nmol/mgHb)**
Grup I	247,0748±26,0180	0,1513±0,0185	44,5607±5,8094	337,4339±35,3948
Grup II	115,1868±8,0475	0,0966±0,0106	12,8207±2,1105	177,7840±28,5632
Grup III	161,8596±19,4138	0,1386±0,0182	14,4107±1,6865	167,9187±20,0967
Grup IV	171,8222±27,5806	0,1377±0,0198	20,0802±3,2534	212,2021±20,5478
Grup V	140,1882±22,0392	0,1320±0,0182	16,4162±1,7087	237,3613±23,7041
Grup VI	115,6448±10,9026	0,0907±0,0153	11,3257±1,8350	151,3667±12,8074

Sonuçlar One-way ANOVA kullanılarak istatistiki olarak değerlendirilmiştir. %95 güven düzeyine göre farklı olan gruplar aşağıdaki çizelgelerde yer almaktadır. * işareti, anlamlı sonuçları göstermektedir.

Çizelge 4.2 Kontrol ve düşük doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup II	P
SOD (U/gHb)	247,0748±26,0180	115,1868±8,0475	0,000*
GPx (U/gHb)	0,1513±0,0185	0,0966±0,0106	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	337,4339±35,3948	177,7840±28,5632	0,000*
CAT (k/gHb)	44,5607±5,8094	12,8207±2,1105	0,000*

Çizelge 4.3 Kontrol ve yüksek doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup III	P
SOD (U/gHb)	247,0748±26,0180	161,8596±19,4138	0,000*
GPx (U/gHb)	0,1513±0,0185	0,1386±0,0182	0,202
MDA (nmol/mgHb)	337,4339±35,3948	167,9187±20,0967	0,000*
CAT (k/gHb)	44,5607±5,8094	14,4107±1,6865	0,000*

Çizelge 4.4 Kontrol ve düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup IV	P
SOD (U/gHb)	247,0748±26,0180	171,8222±27,5806	0,000*
GPx (U/gHb)	0,1513±0,0185	0,1377±0,0198	0,195
MDA (nmol/mgHb)	337,4339±35,3948	212,2021±20,5478	0,000*
CAT (k/gHb)	44,5607±5,8094	20,0802±3,2534	0,000*

Çizelge 4.5 Kontrol ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup V	P
SOD (U/gHb)	247,0748±26,0180	140,1882±22,0392	0,000*
GPx (U/gHb)	0,1513±0,0185	0,1320±0,0182	0,049*
MDA (nmol/mgHb)	337,4339±35,3948	237,3613±23,7041	0,000*
CAT (k/gHb)	44,5607±5,8094	16,4162±1,7087	0,000*

Çizelge 4.6 Kontrol ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup VI	P
SOD (U/gHb)	247,0748±26,0180	115,6448±10,9026	0,000*
GSH-Px (U/gHb)	0,1513±0,0185	0,0907±0,0153	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	337,4339±35,3948	151,3667±12,8074	0,000*
CAT (k/gHb)	44,5607±5,8094	11,3257±1,8350	0,000*

Çizelge 4.7 Düşük doz klorprifos ve yüksek doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup III	p
SOD (U/gHb)	115,1868±8,0475	161,8596±19,4138	0,000*
GSH-Px (U/gHb)	0,0966±0,0106	0,1386±0,0182	0,000*
MDA(nmol/mgHb)	177,7840±28,5632	167,9187±20,0967	0,448
CAT (k/gHb)	12,8207±2,1105	14,4107±1,6865	0,129

Çizelge 4.8 Düşük doz klorprifos ve düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup IV	P
SOD (U/gHb)	115,1868±8,0475	171,8222±27,5806	0,000*
GSH-Px (U/gHb)	0,0966±0,0106	0,1377±0,0198	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	177,7840±28,5632	212,2021±20,5478	0,018*
CAT (k/gHb)	12,8207±2,1105	20,0802±3,2534	0,000*

Çizelge 4.9 Düşük doz klorprifos ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup V	P
SOD (U/gHb)	115,1868±8,0475	140,1882±22,0392	0,012*
GSH-Px (U/gHb)	0,0966±0,0106	0,1320±0,0182	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	177,7840±28,5632	237,3613±23,7041	0,000*
CAT (k/gHb)	12,8207±2,1105	16,4162±1,7087	0,003*

Çizelge 4.10 Düşük doz klorprifos ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup VI	P
SOD (U/gHb)	115,1868±8,0475	115,6448±10,9026	0,929
GSH-Px (U/gHb)	0,0966±0,0106	0,0907±0,0153	0,409
MDA (nmol/mgHb)	177,7840±28,5632	151,3667±12,8074	0,045*
CAT (k/gHb)	12,8207±2,1105	11,3257±1,8350	0,183

Çizelge 4.11 Yüksek doz klorprifos ve düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup IV	P
SOD (U/gHb)	161,8596±19,4138	171,8222±27,5806	0,417
GSH-Px (U/gHb)	0,1386±0,0182	0,1377±0,0198	0,931
MDA (nmol/mgHb)	167,9187±20,0967	212,2021±20,5478	0,001*
CAT (k/gHb)	14,4107±1,6865	20,0802±3,2534	0,001*

Çizelge 4.12 Yüksek doz klorprifos ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup V	P
SOD (U/gHb)	161,8596±19,4138	140,1882±22,0392	0,055
GSH-Px (U/gHb)	0,1386±0,0182	0,1320±0,0182	0,307
MDA (nmol/mgHb)	167,9187±20,0967	237,3613±23,7041	0,000*
CAT (k/gHb)	14,4107±1,6865	16,4162±1,7087	0,064

Çizelge 4.13 Yüksek doz klorprifos ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup VI	P
SOD (U/gHb)	161,8596±19,4138	115,6448±10,9026	0,000*
GSH-Px (U/gHb)	0,1386±0,0182	0,0907±0,0153	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	167,9187±20,0967	151,3667±12,8074	0,010*
CAT (k/gHb)	14,4107±1,6865	11,3257±1,8350	0,004*

Çizelge 4.14 Düşük doz deltamethrin ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup IV	Grup V	P
SOD (U/gHb)	171,8222±27,5806	140,1882±22,0392	0,015*
GSH-Px (U/gHb)	0,1377±0,0198	0,1320±0,0182	0,531
MDA (nmol/mgHb)	212,2021±20,5478	237,3613±23,7041	0,035*
CAT (k/gHb)	20,0802±3,2534	16,4162±1,7087	0,014*

Çizelge 4.15 Düşük doz deltamethrin ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup IV	Grup VI	P
SOD (U/gHb)	171,8222±27,5806	115,6448±10,9026	0,000*
GSH-Px (U/gHb)	0,1377±0,0198	0,0907±0,0153	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	212,2021±20,5478	151,3667±12,8074	0,000*
CAT (k/gHb)	20,0802±3,2534	11,3257±1,8350	0,000*

Çizelge 4.16 Yüksek doz deltamethrin ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup V	Grup VI	P
SOD (U/gHb)	140,1882±22,0392	115,6448±10,9026	0,011*
GSH-Px (U/gHb)	0,1320±0,0182	0,0907±0,0153	0,000*
MDA (nmol/mgHb)	237,3613±23,7041	151,3667±12,8074	0,000*
CAT (k/gHb)	16,4162±1,7087	11,3257±1,8350	0,000*

Çizelge 4.1'den görüleceği üzere, Kan örneklerinde, SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitileri ile MDA düzeyleri, düşük doz klorprifos (Grup II), yüksek doz klorprifos (Grup III), düşük doz deltamethrin (Grup IV), yüksek doz deltamethrin (Grup V) ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin karışımı (Grup VI) uygulanan gruplarda kontrol grubuna (Grup I) kıyasla düşüş göstermiştir.

Beyin dokularında, CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile MDA düzeyleri uygun koşullarda tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortalama ± standart sapma cinsinden Çizelge 4.17'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.17 Beyin dokusu enzim aktiviteleri ile kan MDA düzeyleri

	SOD (U/gHb)	GSH-Px (U/gHb)	MDA (nmol/mgHb)	CAT (k/gHb)
Grup I	0,3385±0,0259	0,1000±0,2469	1,8700±0,2469	0,0365±0,0010
Grup II	0,3362±0,0242	0,0063±0,0003	1,5170±0,1159	0,0397±0,0011
Grup III	0,3581±0,0312	0,0066±0,0004	1,3281±0,1920	0,0283±0,0082
Grup IV	0,3357±0,0386	0,0063±0,0002	2,1636±0,1168	0,0615±0,0018
Grup V	0,3024±0,0311	0,0060±0,0006	1,8300±0,0993	0,0488±0,0111
Grup VI	0,3362±0,0366	0,0060±0,0005	1,6368±0,0741	0,0586±0,0259

Sonuçlar One-way ANOVA kullanılarak istatistiki olarak değerlendirilmiştir. %95 güven düzeyine göre farklı olan gruplar aşağıdaki çizelgelerde yer almaktadır. * işareti, anlamlı sonuçları göstermektedir.

Çizelge 4.18 Kontrol ve düşük doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup II	p
SOD (U/mgpro)	0,3385±0,0259	0,3362±0,0242	0,867
GSH-Px (U/mgpro)	0,1000±0,2469	0,0063±0,0003	0,335
MDA (nmol/gpro)	1,8700±0,2469	1,5170±0,1159	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0365±0,0010	0,0397±0,0011	0,571

Çizelge 4.19 Kontrol ve yüksek doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup III	P
SOD (U/mgpro)	0,3385±0,0259	0,3581±0,0312	0,214
GSH-Px (U/mgpro)	0,1000±0,2469	0,0066±0,0004	0,302
MDA (nmol/gpro)	1,8700±0,2469	1,3281±0,1920	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0365±0,0010	0,0283±0,0082	0,105

Çizelge 4.20 Kontrol ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup IV	P
SOD (U/mgpro)	0,3385±0,0259	0,3357±0,0386	0,871
GSH-Px (U/mgpro)	0,1000±0,2469	0,0063±0,0002	0,300
MDA (nmol/gpro)	1,8700±0,2469	2,1636±0,1168	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0365±0,0010	0,0615±0,0018	0,006*

Çizelge 4.21 Kontrol ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup V	P
SOD (U/mgpro)	0,3385±0,0259	0,3024±0,0311	0,027*
GSH-Px (U/mgpro)	0,1000±0,2469	0,0060±0,0006	0,268
MDA (nmol/gpro)	1,8700±0,2469	1,8300±0,0993	0,418
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0365±0,0010	0,0488±0,0111	0,038*

Çizelge 4.22 Kontrol ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup I	Grup VI	P
SOD (U/mgpro)	0,3385±0,0259	0,3362±0,0366	0,893
GSH-Px (U/mgpro)	0,1000±0,2469	0,0060±0,0005	0,333
MDA (nmol/gpro)	1,8700±0,2469	1,6368±0,0741	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0365±0,0010	0,0586±0,0259	0,057

Çizelge 4.23 Düşük doz klorprifos ve yüksek doz klorprifos grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup III	P
SOD (U/mgpro)	0,3362±0,0242	0,3581±0,0312	0,159
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0003	0,0066±0,0004	0,065
MDA (nmol/gpro)	1,5170±0,1159	1,3281±0,1920	0,042*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0397±0,0011	0,0283±0,0082	0,037*

Çizelge 4.24 Düşük doz klorprifos ve düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup IV	P
SOD (U/mgpro)	0,3362±0,0242	0,3357±0,0386	0,973
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0003	0,0063±0,0002	0,999
MDA (nmol/gpro)	1,5170±0,1159	2,1636±0,1168	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0397±0,0011	0,0615±0,0018	0,015*

Çizelge 4.25 Düşük doz klorprifos ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup V	P
SOD (U/mgpro)	0,3362±0,0242	0,3024±0,0311	0,033*
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0003	0,0060±0,0006	0,205
MDA (nmol/gpro)	1,5170±0,1159	1,8300±0,0993	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0397±0,0011	0,0488±0,0111	0,124

Çizelge 4.26 Düşük doz klorprifos ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup II	Grup VI	P
SOD (U/mgpro)	0,3362±0,0242	0,3362±0,0366	0,998
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0003	0,0060±0,0005	0,210
MDA (nmol/gpro)	1,5170±0,1159	1,6368±0,0741	0,040*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0397±0,0011	0,0586±0,0259	0,100

Çizelge 4.27 Yüksek doz klorprifos ve düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup IV	P
SOD (U/mgpro)	0,3581±0,0312	0,3357±0,0386	0,223
GSH-Px (U/mgpro)	0,0066±0,0004	0,0063±0,0002	0,047*
MDA (nmol/gpro)	1,3281±0,1920	2,1636±0,1168	0,000*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0283±0,0082	0,0615±0,0018	0,000*

Çizelge 4.32 Yüksek doz deltamethrin ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup V	Grup VI	P
SOD (U/mgpro)	0,3024±0,0311	0,3362±0,0366	0,065
GSH-Px (U/mgpro)	0,0060±0,0006	0,0060±0,0005	0,975
MDA (nmol/gpro)	1,8300±0,0993	1,6368±0,0741	0,001*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0488±0,0111	0,0586±0,0259	0,319

Çizelge 4.17.'den görüleceği üzere, Beyin dokusunda ise kontrol grubuna kıyasla, düşük doz deltamethrin (Grup IV) uygulanan grupta MDA düzeyi anlamlı ölçüde artarken CAT aktivitesi düşmüş; düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin karışımı (Grup VI) uygulanan grupta ise MDA seviyesi düşmüş CAT aktivitesi artış göstermiştir.

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Kandaki normal eritrosit fonksiyonu, pestisidleri de içeren birçok toksik faktörün hedefi olan eritrosit membranının bozulmasına bağlı olarak değişir. Pestisidlerin hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve dolayısıyla oksidatif doku hasarına neden olduğu literatürlerde belirtilmektedir (Seth vd., 2000; John vd., 2001; Altuntaş vd., 2003). SOD, CAT ve GSH gibi serbest radikal sönümleyiciler ile γ-glutamil peptidaz, GSH-Px, GR ve GSH-S-transferaz gibi metabolizma düzenleyici enzimler, hücresel sistemi pestisid kaynaklı serbest radikallerin yıkıcı etkilerinden koruyabilirler. Bununla birlikte, antioksidan savunma mekanizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerinin, hem in vitro hem de in vivo olarak insektisidlerden etkilendiği literatürlerde ifade edilmektedir (Gültekin ve ark, 2000b; 2001; Oncu ve ark, 2002). Organofosforlu insektisidlerin SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin inhibisyonuna neden olduğu literatürlerde belirtilmektedir (Naqvi ve Hasan, 1992; Altuntaş vd., 2003, Monna ve ark., 2005). Hemoglobinin ksenobiyotik ya da diğer yükseltgeyici ajanlarla etkileşimi, eritrositlerdeki radikal oluşumunun temel nedenidir.

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla deney gruplarına ait kan örneklerinin SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde gözlenen düşüş, klorprifos ve deltamethrin gibi yükseltgeyici bir ajan ile etkileşim sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artışa bağlı olabilir. Bu etkileşim sonucu oluşan singlet oksijen ve peroksil radikalleri de SOD aktivitesini inhibe etmiş olabilir. Blum ve Fridovich, süperoksit radikallerinin GSH-Px aktivitesini inhibe edebileceğini ifade etmektedirler (Blum ve Fridovich, 1985). Bu nedenle çalışmamızda gözlenen GSH-Px aktivitesindeki düşüşün nedeninin pestisid kaynaklı oluşan ROS artışı olduğu düşünülebilir.

Düşük doz klorprifos uygulanan grup (Grup II) ile karşılaştırıldığında, hem düşük doz deltamethrin (Grup IV) hem de yüksek doz deltamethrin (Grup V) uygulanan gruplarda MDA düzeylerinin anlamlı ölçüde artış gösterdiği dikkati çekmektedir. Bununla birlikte, bu gruplarda SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde

gözlenen artışın da lipid peroksidasyonundaki bu artışı kompanse edecek yönde olduğu düşünülebilir.

Yüksek doz klorprifos uygulanan grup (Grup III) ile hem düşük doz deltamethrin (Grup IV) hem de yüksek doz deltamethrin (Grup V) uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlenmezken Grup IV ve Grup V'te MDA düzeylerinin artması, CAT aktivitelerinin düşmesi bize,deltamethrin uygulamasının klorprifosa kıyasla lipid peroksidasyonunu daha fazla artırdığını, antioksidan enzim olan katalazın da bu artışı dengeleyecek yönde hareket ettiğini düşündürmektedir.

Gerek Grup II ve Grup III, gerekse Grup IV ve Grup V ile karşılaştırıldığında pestisid karışımı uygulanan (Grup VI) grupta antioksidan enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir. Bu durum, karışım halinde pestisidlerin birbirlerinin toksik etkilerini perdelediğini düşündürmektedir.

Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisidler, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{-\bullet}$) ve hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar. Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) veya hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri oksidatif prosesleri değiştirir ve hücre membranlarında oksidatif hasar oluştururlar. Pestisidler, hücresel hasara, DNA ve protein hasarına, membran bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonuna ve sonuçta membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Ayrıca, hidroksil radikalinin ($^{\bullet}OH$), demir katalizli Fenton reaksiyonu sonucu lipid peroksidasyonunu başlattığı önerilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Pestisidler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna neden olurlar. Bu durum, özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek, nöral hücreleri yenilenemeyen beyinde dramatik sonuçlara neden olabilir (Gupta vd., 1998). Bunun yanı sıra organofosfatlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını da içeren birçok nöropatolojik oluşumlara da yol açmaktadırlar. Çünkü bu kimyasalların hedefi, korteks ve hipokampüsteki sinirsel uyarılabilirliğin ana düzenleyicisi olan GABAerjik ve kolinerjik sistemlerdir (Castillo vd., 2002).

Çalışmamızda, kontrol grubuna (Grup I) kıyasla, düşük ve yüksek doz klorprifos uygulanan (Grup II ve Grup III) grupların beyin dokusunda MDA düzeyleri pestisid uygulamasında beklenenin aksine düşüş göstermiştir. MDAdaki bu düşüş, peroksit sönümleyici bir enzim olan GSH-Px aktivitesine bağlı olabilir. Yüksek doz deltamethrin uygulaması anlamlı bir değişime neden olmazken, düşük doz deltamethrin uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla MDA düzeyi ile CAT aktivitesi anlamlı olarak artmış, GSH-Px aktivitesi de anlamlı olmamakla birlikte azalmıştır. Bu durum, deltamethrinin lipid peroksidasyonunu artıracağı, CAT'ın da bu artışı dengeleyecek ve GSH-Px aktivitesindeki düşüşü kompanse edecek yönde hareket edeceği şeklinde açıklanabilir.

Düşük doz klorprifos ve yüksek doz klorprifos uygulanan (Grup II ve Grup III) gruplar ile karşılaştırıldığında, hem düşük doz hem de yüksek doz deltamethrin uygulanan (Grup IV ve Grup V) grupların beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun ve CAT aktivitesinin anlamlı ölçüde arttığı, GSH-Px enzim aktivitesinin ise anlamlı olmamakla birlikte düştüğü dikkati çekmektedir. Bu durum bize, deltamethrinin serbest radikal aracılı hasarda klorprifostan daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

Düşük doz ve yüksek doz klorprifos uygulanan (Grup II ve Grup III) gruplara kıyasla karışım uygulanan grubun (Grup VI) beyin dokusunda MDA düzeyleri ile CAT aktiviteleri artmış; düşük doz ve yüksek doz deltamethrin uygulanan (Grup IV ve Grup V) gruplara kıyasla ise aynı grupta MDA düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Karışımda gözlenen bu durum, deltamethrin aracılı serbest radikal hasarının daha baskın olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, klorprifos ve deltamethrin uygulamasının serbest radikal hasarına yol açtığını, deltamethrinin oksidan/antioksidan dengeyi oksidan yöne kaydırma potansiyelinin klorprifostan daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

6 KAYNAKLAR

Aebi, H., 1974. Catalase, In Methods of Enzymatic Analysis (Bergemeyer, H U., ed) Academic Press, 673-684, New York-London.

Akertek, E., 1994. Characterization of immobilized catalase and their application in the milk sterilization with H_2O_2, Masters Thesis of DEU , İzmir.

Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.

Altuntas, I., Delibas, N., 2002. The Effects of Fenthion on Lipid Peroxidation and Some Liver Enzymes: The Possible Protective Role of Vitamines E and C, Turk Klin J Med Sci, 32, 293-297.

Altuntas, I., Delibas, N., Sutcu, R., 2002. The Effects of Organophosphate Insecticide Methidathion on Lipid Peroxidation and Anti-Oxidant Enzymes in Rat Erythrocytes: Role of Vitamines E and C, Hum Exp Toxicol, 21(12), 681-5.

Altuntas, I., Delibas, N., Doguc, DK., Ozmen, S., Gultekin, F., 2003. Role of Reactive Oxygen Species inOrganophosphate Insecticide Phosalone Toxicity in Erythrocytes in Vitro, Toxicol In Vitro, 17, 153-157.

Altuntas, I., Delibas, N., Demirci, M., Kilinc, I., Tamer, N., 2003. The Effects of Methidathion on Lipid Peroxidation and Some Liver Enzymes: Role of Vitamines E and C, Arch Toxicol, 76, 470-473.

Arınç, E., 1976. Pestisit ve Tıbbi İlaçları Metabolize Eden Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar, Tarım İlaçlarının Kullanılması Semineri, Gaziantep kampusü, Yayın No: 1, Gaziantep, 117-135.

Aroumo, O.I., Halliwell, B., 1987. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, Biochem. J., 248, 973- 976.

Banerjee, BD., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, ST., Chakraborty, AK., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free Radical Scavengers, Toxicol Lett, 107, 33-47.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287.

Beckman, K. B., Ames, B. N., 1997. Oxidative decay of DNA, J. Biological Chemistry, 272(32), 19633- 19636.

Berksan, N., 1996. Tarım İlaçları ve Çevre, Tarım İlaçlarının Kullanılması Semineri, Yayın No: 1-7 ODTÜ Gaziantep Kampusü.

Blanco-Coronado, JL., Repetto, M., Ginestal, RJ., Vicente, JR., Yelamos, F., Lardelli, A., 1992. Acute Intoxication by Endosulfan, J Toxicol, 30, 575-83.

Bump, A. E., Brown, J M., 1990. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo, Pharmac. Ther., 47, 117- 136.

Castillo, C.G., Montante, M., Dufour, L., Martinez, M.L., Jimenez-Capdeville, M.E., 2002. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats, Neurotoxicology and Teratology, 24, 797–804.

Cereser, C., Guichard, J., Drai, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A., 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts, J. Chromatography B, 752, 123- 132.

Ceron, CC., Panizo, CG., Montes, A., 1995. Toxicological Effects in Rabbits Induced by Endosulfan, Lindane and Methylparation Represending Agricaltural by Products Contamination, Bull Environ Contam Toxicol, 54, 258-65.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiological Reviews, 59(3), 527-605.

Cheeseman, K H., Slater, T F., 1993. An introduction to free radical biochemistry, Free Radicals in Medicine, 481- 493.

Crop Protection Industry Brief on Prior Informed Consent (PIC), Anonymous, 1999. American Crop Protection Federation Website.

Cultivating Our Future, Anonymous, 1999. Global Crop Protection Federation Website.

Datta, C., Gupta, J., Sarkar, A., Sengupta, D., 1992 Effects of Organophosphorus Insecticide Phosphomidon on Antioxidant Defence Components of Human Erythrocyte and Plasma, Indian J Exp Biol, 30(1), 65-67.

Delen, N. Toros, S. Tosun, N. Öztürk, S. Yücel, E. Çalı, E., 1995. Tarım İlaçları Kullanımı ve Üretimi, Türkiye Ziraat Mühendisliği 4. Teknik Kongresi, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları, No:26, 1015-1028.

Donnely, J.K., McLellan, K.M., Walker, J.L., Robinson, D.S., 1989. Superoxide dismutases in foods, Food Chemistry, 33, 243- 270.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, Methods in Enzymology, 186, 421-431.

Dwivedi, PD., Das, M., Khanna, SK., 1998. Role of CytochROSe P-450 Ouinalphos Toxicity: Effects on Hepatic and Brain Anti-Oxidant Enzymes in Rats, Food Chem Toxicol, 36(5) 437-444.

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radical, antioxidants, nutrition, Nutrition 18, 872-879.

Farag, AT., Eweidah, MG., Tayel, SM., El-Sebae, AH., 2000. Developmental Toxicity of Acephate by Gavage in Mice, Reprod Toxicol, 14, 241-245.

Floyd, R A., 1999. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders, Experimental Biology and Medicine, 222, 236- 245.

Gebicka, L., Metodiewa, D., Gebicki, J.L., 1989. Pulse radiolysis of catalase in solution. I. Reactions of $O_2^{-\cdot}$ With catalase and its Compound I, Int. J. Radiat. Biol., 55(1), 45- 50.

Gerbracht, U., Spielmann, H., 1998. The use of Dogs as Second Species in Regulatory Testing of Pesticides, Arch Toxicol, 72, 319-329.

Gold, LS., Manley, NB., Slone, TH., Ward, JM., 2001. Conpendium of Chemical Carcinogens by Target Organ: Results of Chronic Bioassays in Rats, Mice, Hamsters, Dogs and Monkeys, Toxicol Pathol, 29, 639-652.

Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G., 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathine peroxidase and catalase in blood, Clin. Chem., 37 (11), 1932- 1937.

Gupta, P.,K. Gupta. R.,C., 1979. Pharmacology, Toxicology and Degradation of Endosulfan. Toxicology, 13, 115-130.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. Metabolism of transition metals in the human body, Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon, 111-150.

Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, Am. J. Clin. Nutr., 57, 715S-725S.

Hazarika, A., Sankar, A.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study, Toxicolgy, 185, 1-8.

Heikkila, R E., Cabbat, F., 1976. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine, Analytical Biochemistry, 75, 356- 362.

Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A. M., Meister, A., 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain, Proceedings of the National Academy of Sciences, 88, 1913-1917.

Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D., 1999. Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alteration in Antioxidant Status in Rat Erythrocytes: A Possible İnvolvement of Reactive Oxygen Spicies, Toxicol Lett, 105, 197-205.

Kalyanaraman, B., Mason, R.P., Tainer, B., Eling, T.E. 1982. The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoprotein-derived, J. Biol. Chem., 257 (9), 4764-4768.

Karadağ, K., 2000. Kolinesteraz İnhibitörü Pestisitlere Maruz Kalan İşçilerde İş Sağlığı Uygulamaları, Türk Tabipler Birliği Mesleki Sağlık ve Güvenlik Dergisi.

Kowalczyk-Bronisz, SN., Bubac, B., 1990. Immunological Profile of Animals Exposed to Pesticides-Deltamethrin, Arch Immunol Ther Exp, 38(3-4), 229-238.

Malley, M., 1997. Clinical Evaluation of Pesticide Exposure and Poisonings, Lancet, 349, 1161-66.

McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, J. Biological Chemistry, 244 (22), 6049-6055.

McCord, J. M., Day, E D., 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron- EDTA complex, FEBS Letters, 86 (1), 139-142.

Monna, S., Bhattacharyya, D., Mondal, TK., Das, S., 2005. Repeated dose toxicity of deltemethrin in rats, Indian J. Pharmacology, 37(3), 160-164.

Moscone, D., 1988. Determination of superoxide dismutase activity with an electrochemical oxygen probe, Analytica Chimica Acta, 211, 195-204.

Nolan, RJ., Dick, DL., Freshour, NL., Saunders, JH., 1984. Chlorpyrifos Pharmacokinetics in Human Phosphorothiolate, Toxicol Appl Pharmacol, 73, 8-15.

Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Uner , N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responces in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 137, 43-51.

Öncü, M., Gultekin, F., Karaöz, E., Altuntaş, İ., Delibaş, N., 2002. Klorprifos-Etil Tarafından Oluşturulan Oksidatif Hasarın Sıçan Karaciğerine Etkileri, Turk Klin J Med Sci, 22, 50-55.

Öztürk, S., Özgen, N., 1978. Bitki Koruma İlaçları, Eser Matbaası Yayını.

Öztürk, S., 1997. Tarım İlaçları, Ak Basımevi, İstanbul.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts, Analytical Biochemistry, 154, 536-541.

Pryor, W.A., 1982. Free radical biology: Xenobiotics, cancer and aging, Annals New York Academy of Sciences, 1-22.

Rabideau, C.L., Pesticide Mixtures Induce Immunotoxicity:Potentiation of Apoptosis and Oxidative Stres, Blacksburg, 185, Virginia.

Rafi, GM., Srinivas, T., Reddy, SJ., Reddy, DC., Ramamurthy, R., 1991. Acute and Chronic Toxicity of Endosulfan to Crap: Effect of Lipid Metabolism, Bull Environ Contam Toxicol, 47, 918-24.

Reddy, S.V.K., Venkaiah, B., 1988. Chemical modification studies on isoenzymes of superoxide dismutase from bajra seedlings, Phytochemistry, 27 (7), 1959-1960.

Reiter, R.J., Pablos, M., Agapito, T.T., Guerrero, J M., 1996. Melatonin in the context of the free radical theory of aging, Ann. N. Y. Acad. Sci., 786, 362-378.

Reiter, R.J., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin, Progress in Neurobiology, 56, 359-384.

Sanchez-Moreno, M., Garcia-Ruiz, M A., Sanchez- Navas, A., Monteloiva, M., 1989. Physico-chemical characteristics of superoxide dismutase in Ascaris Suum, Comp. Biochem. Physiol., 92B(4), 737-740.

Seth, V., Banerjee, B.D., Bhattacharya, A., Chakravorty, A.K., 2000. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of human poisoning with Propoxur, Clinical Biochemistry, 33 (8), 683-685.

Shimizu, N., Kobayashi, K., Hayashi, K., 1984. The reaction of superoxide radical with catalase , J. Biological Chemistry, 259 (7), 4414-4418.

Simonian, N. A., Coyle, J. T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative disease, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 83-106.

Smith, GN., Watson, BS., Fischer, FS., 1967 Investigations on Dursban Insekticide Metabolism of (36Cl) 0,0-diethyl 0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate in Rates, J Argıc Food Chem 15, pp, 132-138.

Srivastas, AK., Srivastava, SK., Srivastav, SK., 1997. Impact of Deltamethrin on Serum Calcium and Inorganic Phosphate of Freshwater Catfish, Heteropneustes Fossils, Bull. Environ. Contam Toxicol, 59, 840-846.

Stelzer, KJ., Gordon, MA., 1984. Effects of Phyrethroids on Lymphocyte Mitogenic Responsiveness, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 46(1), 137-150.

Sustainable Agricultire through Integrated Crop Management (ICM), Anonymous, 1999. European Crop Protection Federation Website.

Szepvöllgyi, J., Nagy, K., Bedo, A., Regöly-Merei, A., Szerletics, M., Soos, K., Athal, M., 1988. Examination of The Interaction of Decis and Dithane in Rat, TXCYA 53, 107-111.

The World Pesticide Market, Anonymous, 1999. Global Crop Protection Federation Website.

Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, Analytical Biochemistry, 27, 502-522.

Wheeler, C.R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Korte, D. W., 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity, Analytical Biochemistry, 184, 193-199.

Whiteman, M., Tritschler, H., Halliwell, B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and α_1-antiproteinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid , FEBS Letters, 379, 74-76.

Wier, RJ., 1993. Organic Phosphates, Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 4th ed, New York, Iia, 711-53.

Woolliams, J A., Wiener, G., Anderson, P H., McMurray, C H., 1983. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep, Research in Veterinary Sciences, 34, 253-256.

Çizelge 4.28 Yüksek doz klorprifos ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup V	P
SOD (U/mgpro)	0,3581±0,0312	0,3024±0,0311	0,002*
GSH-Px (U/mgpro)	0,0066±0,0004	0,0060±0,0006	0,014*
MDA (nmol/gpro)	1,3281±0,1920	1,8300±0,0993	0,000*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0283±0,0082	0,0488±0,0111	0,001*

Çizelge 4.29 Yüksek doz klorprifos ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup III	Grup VI	P
SOD (U/mgpro)	0,3581±0,0312	0,3362±0,0366	0,234
GSH-Px (U/mgpro)	0,0066±0,0004	0,0060±0,0005	0,018*
MDA (nmol/gpro)	1,3281±0,1920	1,6368±0,0741	0,002*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0283±0,0082	0,0586±0,0259	0,008*

Çizelge 4.30 Düşük doz deltamethrin ve yüksek doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup IV	Grup V	P
SOD (U/mgpro)	0,3357±0,0386	0,3024±0,0311	0,067
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0002	0,0060±0,0006	0,173
MDA (nmol/gpro)	2,1636±0,1168	1,8300±0,0993	0,000*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0615±0,0018	0,0488±0,0111	0,094

Çizelge 4.31 Düşük doz deltamethrin ve düşük doz klorprifos + düşük doz deltamethrin grupları arasındaki farklılık düzeyleri

Parametre	Grup IV	Grup VI	P
SOD (U/mgpro)	0,3357±0,0386	0,3362±0,0366	0,979
GSH-Px (U/mgpro)	0,0063±0,0002	0,0060±0,0005	0,176
MDA (nmol/gpro)	2,1636±0,1168	1,6368±0,0741	0,000*
CAT*10^{-4} (k/mgpro)	0,0615±0,0018	0,0586±0,0259	0,805

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eren KAYA

Doğum Yeri : ORDU

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1994 – 1998 İnegöl Lisesi-İnegöl

Lisans 1998 – 2002 Süleyman Demirel Üniversitesi-Kimya Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi:

2004 – İpliksan A.Ş.- ISPARTA-Kimyager