

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOJEN MELATONİNİN VE PİNEALEKTOMİLİ RATLARDA
EKSOJEN MELATONİNİN ORGANOFOSFAT İNSEKTİSİT FENTHİON
İLE OLUŞTURULAN TOKSİSİTE ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

Fatma KARAKUŞ

TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan MOLLAOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuray ÖZTAŞAN

Tez No:2015- 010
2015-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıp Fizyoloji Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/06/2015



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK
Jüri Başkanı



Prof Dr. Hakan MOLLAOĞLU
Üye



Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman GENÇ
Raporör

Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Fatma KARAKUŞ'un "Endojen Melatonin ve Pinealektomili Ratlarda Eksojen Melatonin Organofosfat İnsektisid Fenthion ile Oluşturulan Toksikite Üzerine Koruyucu Etkisi" başlıklı tezi 17./06/2015 günü saat 10.:00 de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm danışman hocalarım Prof. Dr. Hakan MOLLAOĞLU ve Doç Dr. Nuray ÖZTAŞAN'a,

Öğrencileri olmaktan her zaman onur duyacağım hocalarım Prof. Dr. Kağan ÜÇOK ve Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman GENÇ'e, deney hayvanlarının temin edilmesinde ve uygun deney ortamının sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç Dr. Efkan UZ'a, çalışmamın deney aşamasında büyük emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa IRAZ, Yrd. Doç. Dr. Tennur ATABAY ve Yrd. Doç. Dr. Hatice YALÇINKAYA'ya,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr. Necip Fazıl ÇOBAN ve Esin Damra ÇOBAN'a, Fizyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Tuğba SEMERCİ BOZKURT'a,

Tez çalışmam sırasında, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen değerli anne ve babama, yoğun çalışma dönemlerinde beni anlayışla karşılayan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay.....	ii
Önsöz.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vii
Şekiller.....	viii
Tablolar.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pestisitler.....	1
1.1.1. Organofosfatlar.....	3
1.1.1.1. Organofosfatların Etki Mekanizması.....	4
1.1.1.2. Fenthion.....	6
1.2. Serbest Radikaller.....	7
1.2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	9
1.2.1.1. Süperoksit Radikali.....	9
1.2.1.2. Hidrojen Peroksit.....	10
1.2.1.3. Hidroksil Radikali.....	10
1.2.1.4. Singlet Oksijen.....	10
1.2.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerine Etkileri.....	10
1.2.3. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma; Antioksidanlar.....	12
1.2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
1.2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	17
1.3. Pineal Bez(Epifiz bezi).....	19
1.3.1. Pineal Bezin Anatomisi.....	20
1.3.2. Pineal Bezin Histolojisi.....	23
1.3.3. Pineal Bezin Gelişimi.....	24
1.3.3.1. Prenatal Dönem.....	24
1.3.3.2. Postnatal Dönem.....	25

1.3.4. Pineal Bezin Fizyolojisi.....	25
1.4. Melatonin.....	26
1.4.1. Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması.....	27
1.4.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi.....	30
1.4.3. Melatoninin Fizyolojik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi.....	31
1.4.3.1. Melatoninin Endokrin Sistem Üzerine Etkisi.....	31
1.4.3.2. Melatoninin İmmün Sistem Üzerine Etkisi.....	32
1.4.3.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi.....	33
1.4.3.4. Melatoninin Yaşlanma Üzerine Etkisi.....	35
1.4.3.5. Melatoninin Uyku Üzerine Etkisi.....	36
1.5. Tezin Amacı.....	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar.....	38
2.2. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri.....	39
2.3. Deneysel Uygulamalar.....	40
2.3.1. Pinealektomi.....	40
2.3.2. Dokuların Alınması, Korunması, Homojenizasyonu ve Hazırlanması.....	41
2.3.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler.....	42
2.3.2.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması.....	42
2.4. Biyokimyasal Ölçümler.....	43
2.4.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini.....	43
2.4.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini.....	44
2.4.3. Malondialdehit Miktarının Tayini.....	44
2.4.4. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz Numunelerde Protein Tayini.....	45
2.5. İstatistiksel Analiz.....	45
3. BULGULAR.....	46
3.1. Karaciğer dokusu biyokimyasal analiz sonuçları.....	46
3.1.1. Katalaz (CAT).....	48
3.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	49

3.1.3. Malondialdehit (MDA).....	50
3.2. Böbrek dokusu biyokimyasal analiz sonuçları.....	51
3.2.1. Katalaz (CAT).....	52
3.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	53
3.2.3. Malondialdehit (MDA).....	54
3.3. Beyin dokusu biyokimyasal analiz sonuçları.....	55
3.3.1. Katalaz (CAT).....	56
3.3.2. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	57
3.3.3. Malondialdehit (MDA).....	58
4. TARTIŞMA.....	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
ÖZET.....	67
SUMMARY.....	68
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ach	Asetilkolin
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	Katalaz
Cu-Zn-SOD	Sitoplazmik- SOD
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Ec-SOD	Ekstrasellüler – SOD
EPA	Enviromental Protection Agency
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon- Peroksidaz
GSSG	Yükseltgenmiş Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HİZBİB	Hacettepe İlaç ve Zehir Bilgi Birikimi
HO₂[·]	Perhidroksil Radikali
kDa	Kilo-Dalton
LD₅₀	Letal Doz-50
µg	Mikrogram
MDA	Malondialdehit
Mn-SOD	Mitokondrial-SOD
O₂^{·-}	Süperoksit Radikali
OH	Hidroksil Radikali
OP	Organofosfatlı Pestisitler
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
UZEM	Ulusal Zehir Merkezi

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Fenthion'un kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.2. Oksijen kaynaklı radikal oluşumu.....	11
Şekil 1.3. Antioksidanların hücresel etkileri.....	14
Şekil 1.4. Pineal bezin anatomik görünümü.....	21
Şekil 1.5. Retinadan pineal beze giden sinirsel yolak.....	22
Şekil 1.6. Pineal bez sinirsel innervasyonunu gösteren şematik çizim.....	23
Şekil 1.7. Melatoninin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 1.8. Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi.....	28
Şekil 1.9. Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması.....	29
Şekil 1.10. Melatoninin gece-gündüz salınımı.....	31
Şekil 2.1. Pinealektomi öncesi kemik flebinin açılmış hali.....	41
Şekil 2.2. Pinealektomi işlemiyle alınan pineal bez örneği.....	41
Şekil 2.3. Dokuların hassas terazide yaş ağırlıklarının ölçümü.....	43
Şekil 3.1. Karaciğer dokusu CAT enzim aktiviteleri.....	48
Şekil 3.2. Karaciğer dokusu SOD enzim aktiviteleri.....	49
Şekil 3.3. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.....	50
Şekil 3.4. Böbrek dokusu CAT enzim aktiviteleri.....	52
Şekil 3.5. Böbrek dokusu SOD enzim aktiviteleri.....	53
Şekil 3.6. Böbrek dokusu MDA düzeyleri.....	54
Şekil 3.7. Beyin dokusu CAT enzim aktiviteleri.....	56
Şekil 3.8. Beyin dokusu SOD enzim aktiviteleri.....	57
Şekil 3.9. Beyin dokusu MDA düzeyleri.....	58

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	1
Tablo 2.1. Deneyde kullanılan cihazlar.....	42
Tablo 3.1. Çalışma gruplarının karaciğerdeki CAT, SOD enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri.....	46
Tablo 3.2. Çalışma gruplarının karaciğer CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 3.3. Çalışma gruplarının böbrekteki CAT, SOD ve MDA değerleri	51
Tablo 3.4. Çalışma gruplarının böbrek CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo 3.5. Çalışma gruplarının beyindeki CAT, SOD ve MDA değerleri	55
Tablo 3.6. Çalışma gruplarının beyin CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması	55

1. GİRİŞ

1.1. Pestisitler

Pestisit, insan yaşamını tehdit eden canlıları öldürmek için kullanılan bileşikler veya maddeleri ifade eden genel bir terimdir (McEven ve Stephenson, 1979). Pestisitler başlıca fungusitler, herbisitler, kemirgenlerle mücadele ilaçları (rodentisit), kaçırıcı-uzaklaştırıcı ilaçlar (repellent) ve insektisitler (böcek öldüren ilaçlar) olarak sınıflandırılır (Flomenbaum ve ark., 2006; Goldfrank ve ark., 2006). Alt sınıf olarak pestisitler organofosfatlar, karbamatlar, organoklorlular ve piretroidler şeklinde sınıflandırılırlar (Tablo 1.1). Dünyada ve ülkemizde tarımsal alandaki zararlılarla mücadele etmek için pestisitler sık olarak kullanılmaktadır. Tarım alanlarında kullanılan pestisitler zararlı organizmaları yok ederek ürün artışını sağlayabilmektedir. Fakat aynı zamanda zararsız organizmaları da yok ederek hasara yol açmaktadırlar (McEven ve Stephenson, 1979; Ecobichon, 1991).

Tablo 1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması (Obare, 2010).

Pestisitler	<ul style="list-style-type: none"> • İnsektisitler • Herbisitler • Fungisitler
Pestisit alt grupları	<ul style="list-style-type: none"> • Organoklorlular • Organofosfatlar • Piretroidler • Karbamatlar • Bioratlar • Piretrumlar

Tarım zararlılarının kontrolü için, pestisit uygulaması ile çeşitli tarım faaliyetlerinde önemli ölçüde artış olduğu gözlenmektedir, fakat pestisit kullanımının, dünya çapında ciddi çevresel problemlere sebep olduğu da bilinen bir gerçektir. Pestisitler insanlarda nörolojik bozukluklara sebep olan son derece zehirli maddelerdir. Bu maddeler hedef olmayan organizmaya çeşitli yollarla girerek

organizmada sinir sistemi, endokrin sistem, immün sistem, boşaltım sistemi, karaciğer, kas, kalp, kan ve diğer sistemleri etkileyebilmektedirler (Costa, 2006; Zhang ve ark., 2004).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 1985 yılı verilerine göre tüm dünyada yılda üç milyona yakın pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte ve bunların 220.000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır (WHO, 1986; WHO, 1990). Bir tarım ülkesi olan Türkiye'de pestisitler ile oluşan zehirlenmeler ciddi bir sağlık problemi olarak görülmektedir. 2008 yılı Ulusal Zehir Merkezi'ne (UZEM) bildirilen 77.988 zehirlenme vakasının 6.503'ü (% 8,34) pestisit kaynaklı olduğu bildirilmektedir (UZEM 2008 çalışma raporu özeti, 2009). Tarım ilaçları ile oluşan zehirlenmelerin ikinci sırada yer alması hem bu ilaçların kullanımının yaygınlığını hem de dikkatsiz bir şekilde kullanımlarını göstermektedir. Hacettepe İlaç ve Zehir Bilgi Birimi (HİZBİB)'nde yapılan bir çalışmada, birime yapılan başvurulardan 1993- 2002 yılları arasındaki pestisitlerle meydana gelen zehirlenme vakaları incelenmiştir. Bu verilere göre tüm zehirlenmelerin içinde pestisitlerle meydana gelen zehirlenmeler ilaç zehirlenmelerinden sonra % 10,3'lük oranla ikinci sırada yer almakta, pestisit gruplarının dağılımında organofosfatlar % 25,5 ile ilk sırada bulunmaktadır (Çeliker, 2003). Dünyadaki pestisit kullanımının % 20'sinin gerçekleştiği Amerika Birleşik Devletleri'nde 1988 yılında 64 farklı zehirlenme merkezine yapılan 1.368.748 başvurunun 56.674'ünün (% 4,1) pestisitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (WHO, 1989; Güler ve Çobanoğlu, 1997). Amerikan Zehir Kontrol Merkezleri'nin 2009 yılında yapmış olduğu çalışma raporunda tüm zehirlenme soruları arasında pestisitler % 3,9 ile 10. sırada yer aldığı bildirilmiştir (Bronstein, 2010).

Ölümcül pestisit zehirlenmeleri özellikle fakir ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir sağlık problemidir. Sri Lanka'da 1982 yılında yapılan bir çalışmada, yılda 10.000 kişinin akut pestisit zehirlenmesi şüphesiyle hastanelere başvurduğunu ve bunlardan 1.000 kişinin ölümü ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Aynı yıl akut pestisit zehirlenmesinden dolayı meydana gelen ölümlerin; sıtma, çocuk felci, boğmaca, difteri ve tetanoz hastalıkları ile sonuçlanan ölümlerin iki katı olması, akut pestisit

zehirlenmelerinin halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (Jeyaratnam ve ark., 1982; Jeyaratnam, 1985).

1.1.1. Organofosfatlar

Fosfor içeren asitlerin türevleri ester, tiol ester veya anhidrit olup tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Organofosfatlara örnek olarak malation, paration, diazinon, forat, terbufos, fenthion ve klorprifos gibi insektisitler; soman, sarin ve tabun gibi sinir gazları; göz tedavisinde kullanılan ekotiofat ve izoflurofat ile parazitlere karşı kullanılan triklorfon sayılabilir (Peña-Llopis, 2005; Kwong, 2002).

Organofosfatlı pestisitler (OP) ilk olarak 1800'lerde sentezlenmiş ve 1930'larda kolinerjik etkileri tanımlanarak böcek öldürücü özellikleri keşfedilmiştir. Kısa bir süre sonra da kimyasal savaş ajanı olarak kullanılabilirleri ortaya çıkmıştır. G-serisi silahlar olarak bilinen sarin, soman ve tabun II. Dünya Savaşı yıllarında geliştirilmiş, ancak savaşta kullanılmamıştır. II. Dünya Savaşı'ndan sonra OP yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Costa, 2006).

Organofosfatlar son derece zehirli olmalarına rağmen genellikle çevrede kalıcı değildir; güneş ışığı, hava ve toprakla temas ettiklerinde hidroliz olarak parçalanırlar. Bu özellikleri sayesinde organofosfatlar dikloro difenil trikloroethan (DDT), aldrin ve dieldrin gibi çok zehirli ve kalıcı organoklorlu pestisitler yerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. OP'nin kullanımı 1970'lerde organoklorlu pestisitlerin yasaklanmasından sonra artmıştır. Fakat organofosfatlılar organoklorlulara göre daha hızlı parçalansalar da, akut toksisiteleri daha yüksektir (Costa, 2006).

Günümüzde yüzden fazla farklı sentezlenmiş OP bileşikleri insektisit olarak kullanılmaktadır (Kwong, 2002). Çünkü bu bileşiğin yaygın kullanımı ve kolay

erişilebilir olması, OP ile zehirlenmeleri önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Organofosfat zehirlenmesi, dünyada hemen hemen her ülkede benzer sıklıkta görülmektedir. Zehirlenmeler genellikle kazara evlerde, tarım, endüstri (bu maddelerin üretim ve taşınmasında çalışan kişilerde) ve insekt alanlarında çalışan kişilerde görülmektedir. İntihar amaçlı alımlar daha çok 30-50 yaş arası erkeklerde görülmektedir. Yine mesleki maruziyet insidansının yüksekliğinden dolayı bu zehirlenmelere 15–45 yaş arası erkeklerde daha sık rastlanır. Küçük çocuklarda ise alım genellikle kaza sonucudur ve ciddi zehirlenme insidansı daha yüksektir (EPA Office of Pesticide Program, 2002; Watson ve ark., 2004; Calvert ve ark., 2004).

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne 2004 yılında başvuran pestisit zehirlenmesi vakalarının % 41,7'si organik fosforlu pesisit kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Sataloğlu ve ark., 2007). Organofosfatlı bileşikler ile oluşan zehirlenmeler diğer ülkelerde de yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri'nde pestisit zehirlenmesi vakalarının % 33'ünü organofosfatlar ve karbamatların oluşturduğu görülmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Sri Lanka'da pestisit zehirlenmelerinin % 31'ini organofosfatlı insektisitlerin oluşturduğu (Van der Hoek ve Konradsen, 2005), Japonya'da ise pestisit zehirlenmelerinin (% 36) ile en fazla organofosfatlı insektisitlerin oluşturduğu belirtilmiştir (Nagami ve ark., 2005). İran'da akut pestisit zehirlenmelerinin yarısından fazlasının (% 57) OP kaynaklı olduğu görülmüştür (Abdollahi ve ark., 1997). Pestisit zehirlenme vakaları değerlendirildiğinde; hastane verilerinden elde edilen akut pestisit zehirlenme semptomlarının spesifik olmamasından dolayı ciddi zehirlenme durumlarında hastaneye başvuru yapılması önemlidir (Eyer ve ark., 2007).

1.1.1.1. Organofosfatların Etki Mekanizması

Son yıllarda kullanılan organofosfatlar, sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır. Organofosfatların etki mekanizması fazla asetilkolin (Ach) ve çok sayıda nörolojik semptomlar üreterek merkezi ve periferik sinir sistemi içinde

asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek nörotoksisiteye yol açmasına dayanır (Bouchard ve ark., 2010). Bir nörotransmitter olan Ach'i kolin ve asetik asite parçalayan asetilkolinesteraz, merkezi ve periferik sinir sisteminde iki şekilde bulunur;

1) Kırmızı kan hücresi asetilkolinesterazı: asıl olarak sinir dokusundaki kırmızı kan hücrelerinde bulunur.

2) Plazma kolinesterazı: serum, karaciğer, kalp, pankreas ve beyinde bulunur (Robey ve Meggs, 2004).

Sinir sinyallerinin sinir liflerinden düz kaslara, iskelet kaslarına, salgı bezlerine ve otonom sinir düğümlerine iletilmesinde ve aynı zamanda merkezi sinir sistemi içerisinde iletilmesinin düzgün bir şekilde gerçekleşmesi için asetilkolinesteraz enzimi önemli bir nörotransmitterdir (http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4).

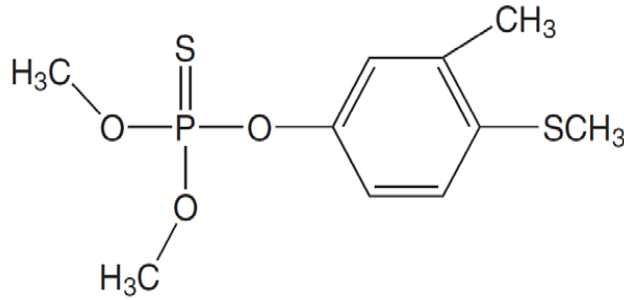
Organofosfatlar, asetilkolinesteraz enzimini, aktif bölgedeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Asetilkolinesteraz enzimi baskılandığında, sinir sisteminde Ach birikmeye başlar ve parasempatik sistemde aktivasyona yol açar. Bunun sonucunda da muskarinik ve nikotinik reseptörler aşırı uyarılır. Bu duruma “ akut kolinerjik sendrom” denir (Kamanyire ve Karalliedde, 2004). Kolinerjik sinir kavşaklarında Ach miktarının artması, düz kasların kasılmasına ve salgı bezlerinin salgı yapmasına sebep olur. İskelet kası kavşaklarında aşırı miktarda birikmiş Ach hücreyi uyarıcı olabileceği gibi, hücreyi paralize de edebilmektedir. Merkezi sinir sisteminde yüksek miktarda bulunan Ach; anksiyete, uykusuzluk, titreme, baş ağrısı, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine sebep olmaktadır. Solunum bozukluğuna eşlik eden artmış akciğer salgıları, organofosfat zehirlenmelerinde görülen ölümlerin en sık karşılaşılan semptomlar olduğu bilinmektedir (http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4).

Organofosfatlı insektisitler için bir diğer önemli etki mekanizması, karaciğerdeki aktivasyonlarıdır. Fosfatlardan (P=O) daha lipofilik yapıda oldukları için yağda

büyük oranda depolanırlar. Yağda büyük oranda depolanmaları nedeniyle ayrışmaları da yavaş olur ve hatta günlerce sürebilir (Kwong, 2002; Costa, 2006).

1.1.1.2 Fenthion

Fenthion (*O,O*-dimethyl *O*-(4-(methylthio)-*m*-tolyl) phosphorothioate) molekül ağırlığı, 278,3 g/mol olan lipofilik özellikte bir bileşiktir. Saf fenthion hafif sarımsak kokulu, sarı-kahverengi bir sıvıdır. Erime noktası $< -25^{\circ}\text{C}$ 'den küçük ve kaynama noktası 0.01 mm/Hg 105°C 'dir. Fenthion su içinde çözünmez fakat metanol, etanol, eter, aseton gibi diğer organik çözücüler (özellikle klorlanmış hidrokarbonlar) içinde çözünür. Fenthion pH 9.0'a kadar alkalidir ve 210°C 'ye kadar stabil ve dayanıklıdır (EPA, 2001). Fenthion'nun kimyasal yapısı Şekil 1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Fenthion'un kimyasal yapısı (Wexler, 2005).

İnsanlarda memelilere nispeten düşük toksisite göstermesi nedeniyle fenthion; ABD Environmental Protection Agency (EPA) Çevre Koruma Ajansı ve DSÖ'ye göre II. sınıf toksik bir insektisit olarak yer almaktadır. Fare ve tavşan gibi deney hayvanlarına fenthion'un intraperitoneal ve dermal uygulama letal doz (LD₅₀) değerleri sırasıyla, 125-330 mg/kg ve 330-800 mg/kg olarak değerlendirilmiştir (Wexler, 2005). Ratlarda ise oral LD₅₀ doz değeri 180-298 mg/kg olarak bildirilmektedir (Extoxnet, 1993).

1960 yılında Schrader tarafından geliştirilen bir organofosfat insektisit olan fenthion, sıtma etkeni olarak bilinen *Anopheline* türü sivrisineklerin kalıntılarının kontrolü için bir sprey olarak kullanılabilmesini bulmuştur. DSÖ'nün desteği altında gerçekleştirilen ilk çalışmalarda farklı canlı türleri üzerinde kalıntı olarak fenthionun iz bıraktığını göstermiştir (Elliott ve Barnes, 1963). Aynı zamanda fenthion Bayer Kimya tarafından 1960 yılında evcil hayvanlardaki dış parazitlere karşı şampuan ve sprey şeklinde üretilerek piyasaya sürülmüştür (www.abcbirds.org). Ticari olarak yaygın kullanılan insektisit isimleri; Baycid, Baytex, Dalf, DMTP, Lebaycid, Korfen 50EM, Queletox, Talodex, Prentox Fenthion 4E, Mercaptophos, S 1752, Entex, Spotton ve Tiguvon'dur.

Bayer firmasının Amerika'da fenthion üretimini durdurması ile birlikte EPA fenthion kullanımının 30 Haziran 2004 tarihinden itibaren yasaklanacağını bildirmiştir (EPA, 2003). Ancak ülkemizde Bayer firmasının 1966 yılında ruhsat alarak başlayan fenthion üretimine farklı ürünlerde fenthion kullanımına devam edilmektedir (Aydınoglu ve ark., 2002). Diğer birçok organofosfatlar gibi, etki mekanizması kolinesteraz önleme yoluylaadır. Nijerya'da yapılan bir araştırmada, sprey uygulanan farklı bölgelerdeki konutlarda bulunan insanların tüm kan kolinesteraz aktivitesi seviyesinde önemli derecede düşüş olduğu gözlenmiştir (Elliott ve Barnes, 1963; Francis ve Barnes, 1963). Bagchi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir araştırmada, fenthionun karaciğer ve beyinde lipid peroksidasyonuna yol açtığı, DNA'nın tek kolunda kırıklara ve laktat dehidrogenazın ekstrasellüler sıvıya sızıntısında artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Bagchi ve ark., 1995).

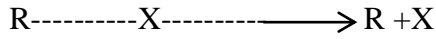
1.2. Serbest Radikaller

Atom yapısındaki elektronlar "orbital" adı verilen uzaysal alanda ve çift yapıda bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektrondur fakat az sayıda bulunan elektronlar ise eksik elektronlu olarak adlandırılır. Eksik elektronlu moleküllerin etrafında herhangi bir elektron ile iletişime girerek, o molekülden ya bir elektron alır ya da o moleküle bir elektron verirler. Dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmamış

(eşleşmemiş) elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Serbest radikaller oldukça kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda serbest radikaller radikal olmayan maddelerle reaksiyona girerek yeni radikaller oluştururlar ve zincir reaksiyonu başlatabilirler (Sen, 2001). Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur. Ancak oluşan serbest radikallerin antioksidan sistemlerle temizlenmesiyle herhangi bir sitotoksosite ortaya çıkmaz. Fakat bu işleyişin tersi söz konusu olduğunda bir dizi patolojik reaksiyonlar ortaya çıkabilir. Organizmada doğal olarak serbest radikal oluşturanların başlıcaları; mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyararla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır (Fridowich, 1978; Karabulut ve Kabakçı, 1995).

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

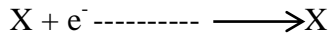
- 1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarının birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla oluşan hemolitik bağ kırılması ile;



- 2- Bir molekülden bir elektronun ayrılması ile;



- 3- Bir moleküle bir elektronun katılması ile;



Serbest radikaller, vücutta metabolizma sırasında meydana gelen son derece etkin kimyasal ürünlerdir. Serbest radikaller hücrelerin protein, (Deoksiribonükleik asit) DNA, karbonhidrat, lipitler, enzimler ve diğer molekül grupları ile etkileşime girerek onların metabolizmalarını etkilerler. Serbest radikaller hücre büyüme gelişimi üzerine direkt olarak etkilidirler (Akkuş, 1995). Membran yapısında yer alan fosfolipitlerdeki poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu ile hücrelere zarar verirler ve ayrıca lizozomları ve mitokondrileri çevreleyen zarın permeabilitesini artırarak parçalarlar (Bejma ve Ji, 1999; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Hücre üzerindeki bu direkt etkiler damar sertliği, kanser, romatizmal hastalıklar ve yaşlanma gibi hastalıkların oluşmasında önemli rol oynarlar (Zaobornyj ve ark., 2005).

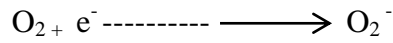
1.2.1 Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen, tüm hücrelere herhangi bir zorlukla karşılaşmadan girebilen ve hücre içerisinde en çok kullanılan moleküler özelliğe sahip olan maddedir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilmektedir. Süperoksit radikali (O_2^-) hem çevresel etkenler hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle kolaylıkla fazla miktarlarda oluşabilen oksijen radikalleridir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu genellikle O_2^- 'nin birikmesine bağlıdır. Bu radikaller birikerek bir seri zincirleme radikal tepkimeler ile birlikte diğer radikaller de oluşur (Kelly ve ark., 1998).

ROS'un en önemlileri süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Temel enerji seviyesindeki moleküler oksijenin (O_2); süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikale (OH^\cdot) dönüşümü sonucu toksik etki oluşturmaktadır (Fridovich,1998).

1.2.1.1. Süperoksit Radikali

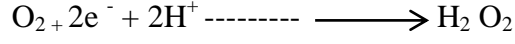
Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile O_2^- anyonu oluşmaktadır.



H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyici olması O_2^- 'nin önemli özellikleri arasındadır. Aynı zamanda O_2^- hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. O_2^- pH değerlerinin düşük olduğu durumlarda bir proton alarak reaktif olan perhidroksil radikaline (HO_2^\cdot) dönüşür.

1.2.1.2. Hidrojen Peroksit

Oksijen molekülünden iki elektron alarak oksijen molekülünün indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit serbest radikali (H_2O_2) oluşur.



Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde ROS grubuna dahil edilir. Çünkü serbest radikal biyokimyasında Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, (O_2^-) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan (OH^\cdot)'ı oluşturur.

1.2.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil Radikali (OH^\cdot) yüksek reaktif bir oksidan olmasından dolayı yarılanma ömrü çok kısadır. OH^\cdot 'ın ROS'lar arasında en güçlüsü olduğu düşünülmektedir. Bu radikalin çok küçük miktarlarda oluştuğu dokularda bile büyük hasara neden olur.

1.2.1.4. Singlet Oksijen

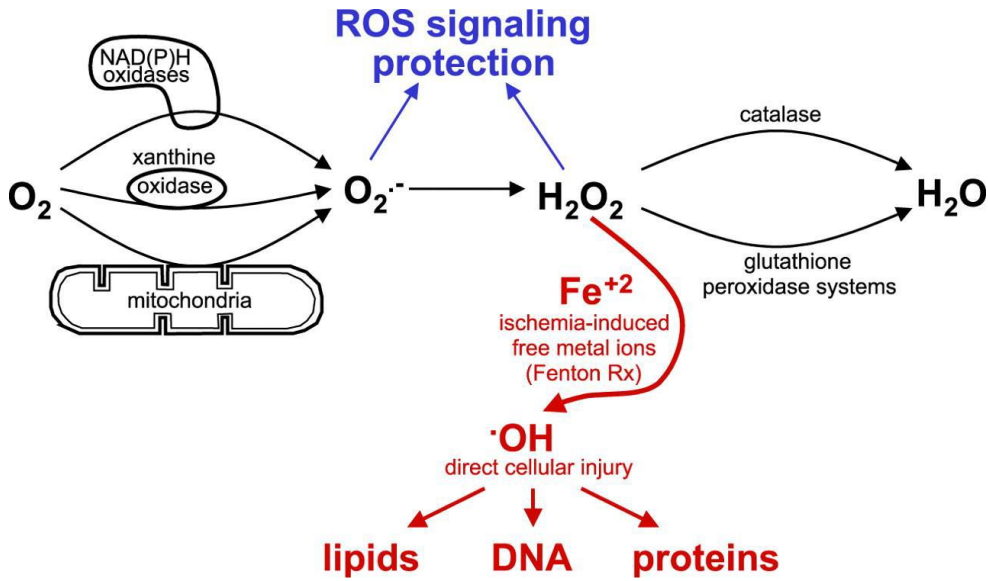
Bu molekül aslında serbest radikal değildir. Ancak doymamış yağ asitleri ile direkt tepkimeye girerek hidroperoksidlerin oluşmasına neden olduğu için serbest oksijen radikalleriyle değerlendirilir.

1.2.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerine Etkileri

Hücrede oksijenin % 90'ı oksidatif fosforilasyonun merkezi olan mitokondrilerde tüketilir. Bunların % 2'si ROS'a dönüşmektedir. ROS; DNA, protein, lipitler ve tüm

yapılardaki moleküllerle etkileşime girer (Şekil 1.2). DNA molekül oksidasyonu ile genetik Messenger DNA hasarı, hücre bölünmesinin durması, kontrolsüz büyüme-malignensi oluşumu, lipit peroksidasyonu ile hücre membran hasarı, ateroskleroz hızlanması gerçekleşmektedir (Cankurtaran, 2005). Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı meydana gelir. Hücrede ROS ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. ROS artışına bağlı iskemi ve iskemi sonrası reperfüzyon hücre hasarını artırır ayrıca alzheimer, multipl skleroz, epilepsi ve spinal kord hasarı gibi nörolojik hastalıklar oluşabilir. Aynı zamanda ROS artışı beyin dokusunda da nekroz, nöron hasarı ve nöron ölümüne kadar tahribat oluşturabilmektedir (Eşmekaya ve ark., 2011).

Radikaller, aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilir ve hücrelerde çeşitli değişikliklere neden olabilirler. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve/veya organ hasarı meydana gelebilir (Koch ve ark., 2004).



Şekil 1.2. Oksijen kaynaklı radikal oluşumu

(<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/61/3/461/F1.large.jpg>).

1.2.3. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma; Antioksidanlar

Reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu sonucunda meydana gelen hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinmektedirler (Akkuş, 1995).

Antioksidanların ilk gözlenen etkileri zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonlarının engellenmesiyle meydana gelmiştir. Antioksidanların günümüzde lipitleri, proteinleri, nükleik asitleri ve diğer hedef makromoleküller üzerinde koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Antioksidan etki mekanizmaları tutucu veya temizleyici (scavenger), baskılayıcı (quencher), onarıcı ve zincir kırıcı olmak üzere dört farklı etkisi bulunmaktadır (Yalçın, 1992; Yalçın, 1998; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Bunlar;

1. Scavenging (temizleme): Oksidanların zayıf bir moleküle çevrilmesi enzimler aracılığıyla yapılır. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2. Quencher (baskılama): Oksidantlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

3. Onarma: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

4. Zincir koparma: Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Taysi, 2002; Polat, 2002; Cherubini, 2005).

Antioksidanlar; endojen ve eksojen kaynaklıdır ve serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde bulunan bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (süperosit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz

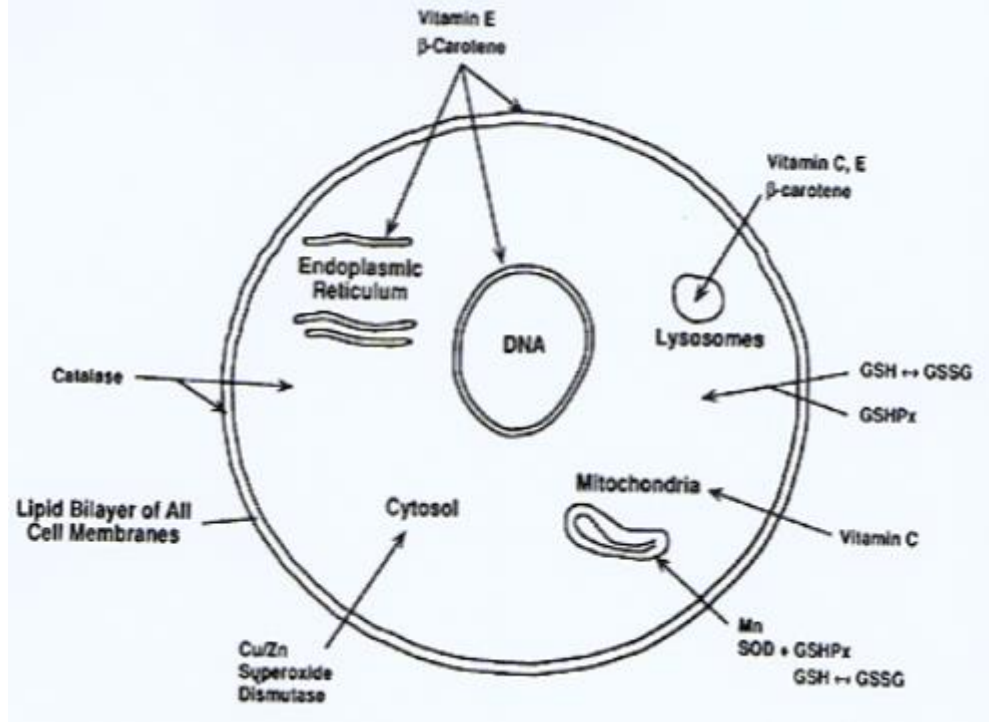
gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, serüloplazmin gibi) ve bitkilerde daha yaygın şekilde bulunan antioksidan fitonutrientlerdir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Ulusoy, 2010).

Antioksidanlar		
Doğal Antioksidanlar		Yapay Antioksidanlar
Enzimatik	Enzimatik Olmayan	
SOD Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Sitokrom oksidaz Glutasyon S-transferaz	Endojen Glutasyon Serüloplazmin Bilirubin Ferritin Laktoferin Ürik Asit Haptoglobinler Melatonin	Eksojen E vitamini β- Karoten Askorbik Asit Flavonoidler
		BHT BHA Troloks SOD mimikleri Çeşitli şelat oluşturan maddeler

Antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir. Doğal antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak sınıflandırılabilirdiği (Akkuş, 1995) gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar şeklinde de sınıflandırmalar mevcuttur. Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alanlar; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ise suda ve yağda çözünen radikal tutucularıdır (Halliwell, 1994; Percival, 1998).

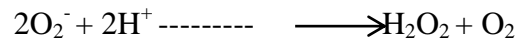
Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler. Antioksidanların hücrel etkileri Şekil 1.3'te gösterilmektedir. Buna göre hem eksojen hem de endojen antioksidan madde ve enzimler hücrenin hasar görmüş bütün kısımlarına müdahale ederek oksidantların etkisini ya azaltarak ya da ortadan kaldırarak etki ederler (Young ve Woodside, 2001).



Şekil1.3. Antioksidanların hücrel etkileri
(http://www.medscape.org/viewarticle/432384_5).

1.2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz: Süperoksit serbest radikallerinin dismutasyonu sonucunda moleküler oksijen ve (H_2O_2)'e katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan antioksidan bir enzimdir. Yapısında metal bulunmasından dolayı bir metalloenzim grubundan sayılır. ROS'lara karşı primer antioksidan enzim Süper oksit dismutazdır (SOD). SOD'un esas fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Bu antioksidan enzimin katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.

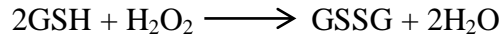


SOD'un insanda iki farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar ilk defa McCord ve Fridovic tarafından 1969 yılında keşfedilen Cu-Zn SOD ve Mn-SOD'tur (McCord, 1969). Canlıda bulunduğu bölgeye göre SOD'un üç farklı izoformu bulunur. Enzim

mitokondride bulunuyorsa mitokondrial SOD (Mn-SOD); Mn-SOD 88 kDa ağırlığında olup homotetramer yapıdadır ve her alt ünitesinde bir Mn iyonu bulunur. Hücrel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır. Eğer enzim sitoplazma içerisinde bulunuyorsa sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD); CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein alt ünitesi içerir. Her alt ünite Cu ve Zn atomları bulunur. Bir diğer izoform; enzim ekstraselüler alanda bulunuyorsa ekstraselüler SOD (ec- SOD) adını alır. EC-SOD ise en çok akciğer, uterus ve tiroid bezlerinde bulunur (Buettner, 1998).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Bu enzim ilk defa 1957 yılında Mills tarafından memeli eritrositlerinde ortaya çıkarılmıştır (Cheeseman ve Slater 1993; Knapen, 1999). Yapısında bir metal olan selenyum bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir.

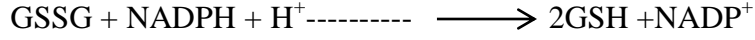
H₂O₂ ve lipit peroksitlerin indirgenmiş (redükte) glutasyonla (GSH) in vitro ortamda reaksiyona girerek, H₂O ve yükseltgenmiş (okside) glutasyon (GSSG) oluşmasını katalizleyen enzimdir (Mills, 1957). Glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) harcanırsa okside glutasyon tekrardan redükte hale dönüşebilir (Halliwell, 1974; Halliwell, 1994). Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde etkili olan bir enzimdir. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, % 25-40'ı ise mitokondride bulunur. Aktivitenin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (Malone, 1991). GSH-Px, E vitamini yetersiz olduğu durumlarda membranı peroksidasyona karşı korur ve eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili

antioksidan enzimidir. GSH-Px'in önemli bir işlevi lipit peroksidlerinin indirgenmesini katalizlemektir (Halliwell, 1994).

Glutasyon Redüktaz: GSH-Px' in H_2O_2 'i indirgemesi sonucunda GSSG tekrar GSH' ye dönüşümünü katalizler. Reaksiyon şu şekildedir;

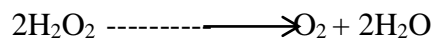


Glutasyon-S-Transferaz: Glutasyon-S-transferaz ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda aktif rolleri bulunmaktadır. Bu enzimler de glutasyon peroksidaz gibi lipit peroksidlerini indirgeyerek antioksidan etki gösterirler. GSH-Px enziminden farklı olarak selenyumdan bağımsız olarak antioksidan aktivite gösterebilirler (Akkuş, 1995).

Katalaz: Katalaz (CAT), ilk olarak Sumner ve Dounce tarafından 1937 yılında sığırcı karaciğerinden kristal formda izole edilmiştir (Deisseroth ve Dounce, 1969; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Leew ve arkadaşları ise 1901 yılında katalaz enziminin tabiatta yaygın olarak bulunduğunu gözlemlemişlerdir (Aebi, 1974). Bu enzimin yaklaşık molekül ağırlığı 240 kDa olup, aktif kısmında dört tane Fe^{+3} bulunduran glikoprotein yapısında bir hemoproteindir (Nordberg ve Arner, 2001; Young ve Woodside, 2001; Memişoğulları, 2005).

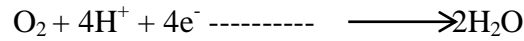
CAT, SOD'a benzer bir reaksiyon ile H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H_2O_2 'nin zararlarına karşı korurlar (Duthie, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

CAT H_2O_2 'yi su ve moleküler oksijene parçalar. CAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



CAT hemen hemen bütün memeli hücrelerinde bulunur ve özellikle H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda etkilidir (Chance ve ark., 1979). Çeşitli dokuların katalaz enzimi birbirinden farklı aktiviteler gösterebilmektedir. Katalaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrek dokularıdır. Bu enzimin aktivitesinin en düşük seviyede görüldüğü dokular ise destek dokularıdır. Bu enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Buna ek olarak endoplazmik retikulumda ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. Okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan H₂O₂'yi direkt olarak suya dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise H₂O₂ substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (glutatyon peroksidaz gibi) devreye girerek H₂O₂'yi ortamdan uzaklaştırırlar (Agar ve ark., 1986).

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir. Mikrozomal ve mitokondrial elektron transport sistemlerinde üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport sisteminde bir O₂ molekülüne 4 elektron aktarılarak 2 molekül su açığa çıkar. Reaksiyon şu şekildedir;



Bu reaksiyon ile yakıt maddelerin oksidasyonu tamamlanır ve fazla miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Mitokondrial sitokrom oksidaz elektronlanmış oksijen moleküllerini kendi aktif bölgesinde sıkıca tutarak bu elektronların ortama sızmasına engel olur. Bu sızıntıya engel olmasından dolayı diğer moleküllerinde oksidasyonunu engeller ve antioksidan etkisini göstermiş olur.

1.2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutatyon: Genetik bilgiye gerek olmadan karaciğerde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenebilen tripeptit yapısında bir moleküldür.

Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, peroksitlerle ve serbest radikallerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabilmektedir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engeller. Ayrıca, proteinlerdeki “-SH” gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların oksidasyona uğramasını engeller.

β-Karoten: Vitamin A'nın ön maddesidir. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktive eder ve böylece antioksidan etki göstermiş olur.

Vitamin E (α-tokoferol): Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. O₂ ve OH⁻ radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirgeyici özelliği vardır. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme olarak devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını sonlandırır. Aynı zamanda vitamin E antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını engellemektedir.

Vitamin C (askorbik asit): Vitamin C organizmada hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici olarak rol oynar. Ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır. OH⁻ ve süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek, bu iki radikali ortamdan temizler.

Seruloplazmin: SOD enziminin benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. +2 değerli demirin +3 değerli demire yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder ve böylece serbest radikal oluşmasını engeller.

Bilirubin: Serbest radikalleri tutma yeteneği vardır. Hidroksil ve süperoksit radikali temizleyicisidir

Transferrin: Dolaşımda serbest haldeki demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir.

Ürik Asit: Plazmada normal konsantrasyonlarda bulunduğunda, OH⁻, peroksit ve O₂ radikallerini ve singlet oksijeni temizleme yeteneği vardır.

Albümin: Geçiş metallerini bağlama özelliği vardır. Lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) bağlayıcısıdır.

Piruvat: H₂O₂ bağlayıcı özelliği vardır.

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit (ClO⁻) ile de reaksiyona girerek etkisini azaltır.

Sistein: ClO⁻ ve serbest radikal temizleyici özelliği bulunmaktadır.

Glukoz: OH⁻ radikalini tutarak onun zararlı etkilerini engeller.

Hemoglobin oksidanları, hemopeksin serbest haldeki hemi, haptoglobin de hemoglobini bağlayarak antioksidan özellik gösterir (Akkuş, 1995).

1.3. Pineal Bez (Epifiz Bezi)

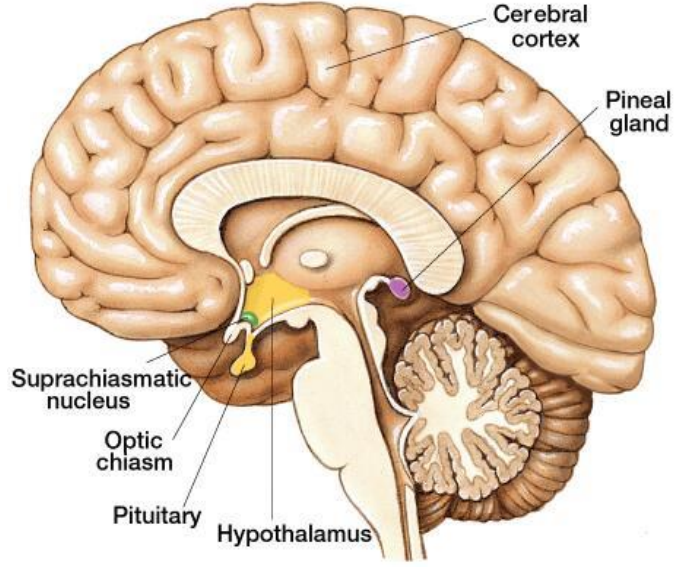
Pineal bezin varlığı eski dönemlerden beri bilinmektedir. Pineal bez ile ilgili gelişmeler üç büyük döneme ayrılabilir. Birinci dönem; Milattan önce (M.Ö) 3. yüzyıl civarında Herophilus tarafından pineal bezin bulunmasıyla başlar. Gallen insan pineal bezini çam ağacının tepesine benzettiği için Latince kökenli “*conarium*” kelimesini kullanmıştır. Bu kelime pineal sinirleri tanımlamak için “*nervi conarii*” olarak kullanılmıştır. Pineal kelimesinin kökeni, Latince’de “çam ağacı kozalağı” anlamına gelen “*pine*” kelimesinden gelmektedir. Vesalius (1514-1564) pineal bezin topografik yapısını dikkatlice incelemiştir. Descartes (1596-1650) ise pineal bezin “ruhun oturduğu yer” olduğunu düşünüyordu. İkinci dönem; Kolliker, memelilerin pineal bezinde sinir liflerinin varlığını gözlemlemiştir (1850). Cajal, fare

pineal bezinde demet yapan sinir liflerini bulmuş ve sempatik orjinli olduğu kanısına varmıştır (1904) (Çam ve Erdoğan, 2003). Üçüncü dönem son 50 yılı kapsayan dönem olarak bilinir. Bu dönemdeki en önemli gelişme Lerner ve arkadaşlarının pineal ekstrelerde bulunan, amfibienlere verildiğinde cilt renginin açılmasına neden olan pineal hormonunu izole etmeleridir (Lerner ve ark., 1997).

1.3.1. Pineal Bezin Anatomisi

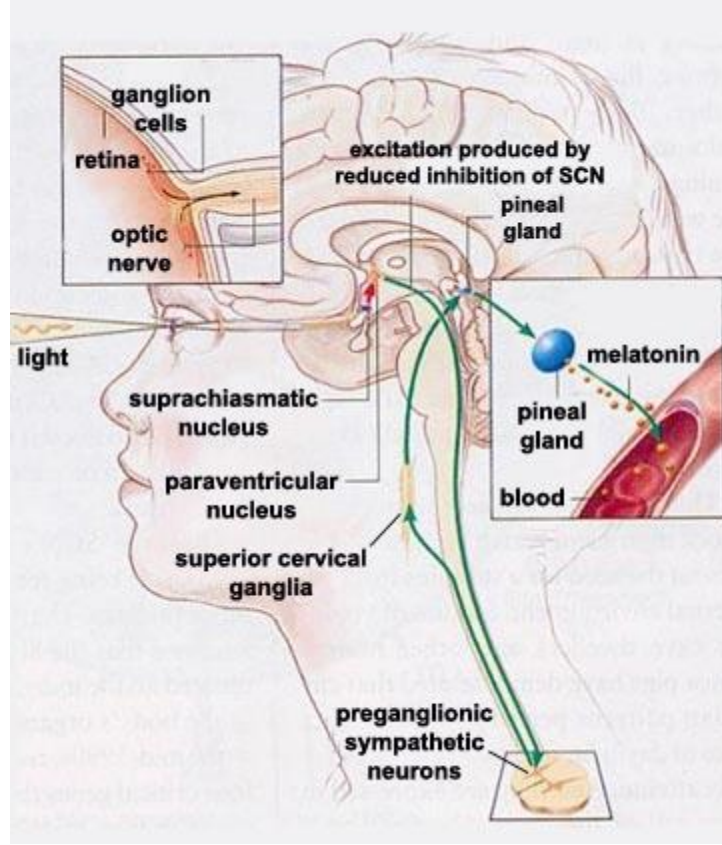
İnsanda, colliculus süperior'lar, pulvinar thalami ve splenium corporis callosi arasında bulunan pineal bez önemli bir nöroendokrin organdır. İnsan pineal bezi konik şekilli olup, 5-8 mm uzunluğunda, 3-5 mm genişliğinde ve 120-150 mg ağırlığındadır. (Şekil 1.4). Pineal bez bir sap aracılığı ile 3. ventrikül tavanı ile birleşir. 3.ventrikül, pineal sap içerisine uzanarak *Recessus pinealis*'i meydana getirir. *Recessus pinealis*'in üzerinde kalan sap kısmı *Commissura habenularis* ile birleşmektedir. Pineal sapın alt duvarı *Commissura posterior*'a tutunur (Arıncı ve Elhan, 2006).

Kan akımı yönünden zengin olan pineal bez, *A.cerebri posterior*'dan ayrılan *A. choroidea posterior*'un ince dalları tarafından beslenir. Aynı zamanda 4 ml/dak./gr'lık değerle böbreklerden sonra ikinci sırada yer alır. Arteriyel dallar pineal bez kapsulasında birçok arteriollere ayrılarak organ içerisine penetre olurlar ve bağ dokusundan oluşmuş septalar ile birlikte parankimaya dağılırlar. (Gray, 1995; Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002; Gray's Anatomy, 2009).



Şekil 1.4. Pineal bezin anatomik görünümü
(<http://medicalterms.info/anatomy/Pineal-Gland>).

Pineal bezin endokrin fonksiyonunun tamamen sinirsel innervasyona bağlı olduğu bilinmektedir. Genel bir ifadeyle, ışık melatonin üretimini baskılar, karanlık ise artırır. Bu nedenle aydınlık ve karanlık faktörü, pineal bezden salgılanan melatoninin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Işık uyarımları, retinadan başlayan sinirsel yolla pineal beze ulaşır. Retinada bulunan fotoreseptör hücreler ışık uyarımlarını elektriksel impulsa çevirirler (Şekil 1.5). Hipotalamusta yer alan nucleus suprachiasmaticus'a ulaşması *Tractus retinohypothalamicus* aracılığı ile sağlanır. Hipotalamus'ta bulunan bu çekirdeğe tractus opticus yoluyla corpus geniculatum laterale'den gelen bir kısım ışık uyarımları da vardır. Ancak, ışık uyarımlarının nucleus suprachiasmaticus'a iletilmesinde en önemli yol tractus retinohypothalamicus'tur (Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).



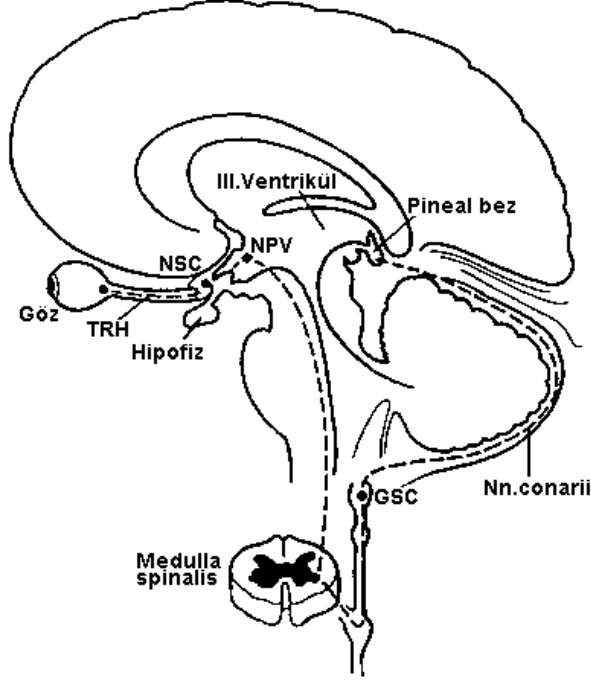
Şekil 1.5. Retinadan pineal beze giden sinirsel yolak

(<http://usdbiology.com/cliff/Courses/Behavioral%20Neuroscience/Biorhythm/BRfigs/BRAFferent%20SCN%20figures.html>).

Tractus retino hypothalamicus'u lifler oluşturur ve chiasma opticum seviyesinde tractus opticus'tan ayrılarak hedef bölgeye ulaşır. Tractus retinohypothalamicus'u oluşturan liflerin büyük bir bölümü chiasma opticum'da çapraz yaparak karşı tarafın nuc. suprachiasmaticus'a gider. Liflerin az bir kısmı ise çapraz yapmadan kendi tarafındaki nuc. suprachiasmaticus'unda son bulur (Reiter, 1991; Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

Suprakiazmatik çekirdeklerde sinaps yapan lifler daha sonra hipotalamus'ta yer alan nuc. paraventricularis'e uzanır (Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Nuc. paraventricularis'ten başlayan lifler ise mesencephalon'daki formatio reticularis'te sonlanır. Buradan da tractus reticulospinalis'i oluşturan lifler aracılığı ile medulla spinalis'in üst torakal segmentlerine giderek, columna intermediolateralis'teki multipolar ganglion hücreleri ile sinaps yaparlar (Gray, 1995). Columna intermediolateralis'te yerleşmiş olan multipolar ganglion

hücrelerinin aksonları ise medulla spinalis'ten ayrılarak preganglionik lif olarak ganglion cervicale superior'a ulaşır (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Sonuç olarak, ganglion cervicale superius'dan çıkan postganglionik sempatik lifler, tentorium cerebelli'den geçerek Şekil 1.6'da gösterildiği üzere nn.conarii yolu ile pineal beze ulaşır (Patrickson ve Smith, 1987; Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).



Şekil 1.6. Pineal bez sinirsel innervasyonunu gösteren şematik çizim. (TRH: Tractus retinohypothalamicus; NSC: Nucleus supra-chiasmaticus; NPV: Nucleus paraventricularis; GSC: Ganglion cervicale superius). (Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

Pineal bez kapsulasından geçerek parankimada dağılan miyelinsiz sinir lifleri daha çok perikapiller alanlarda ve pinealositler arasında sonlanır (Reiter, 1991; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

1.3.2. Pineal Bezin Histolojisi

Pineal bezde pinealositler ve glia-benzeri interstisyel hücreler olmak üzere iki tip hücre yer almaktadır. Pinealositler, kümeler ve kordonlar halinde toplanan ve bir bazal lamina üzerine oturan sekretuar hücreler olup, dış görünüşü pencereci şeklinde

endotel hücrelerine sahip kan damarları ve sinirler içeren bağ dokusu ile çevrelenmişlerdir. Pinealositler, iki veya daha fazla sayıda, uç kısımları bombelenmiş, hücre uzantısına sahiptir. Uzantılardan birisi kapiller yakınında sonlanır. Hücre sitoplazmasında çok sayıda mitokondriyon ve random olarak dağılmış çok sayıda sinaptik şerit bulunur (Kierszenbaum, 2006).

İnterstisyel hücreler, pinealositlerin aralarında yer alırlar. Glia benzeri interstisyel hücreler ve bağ dokusu, fonksiyonel pinealositlere, stromal destek sağlarlar. Pinealositlerin fonksiyonu β -adrenerjik reseptörler ile düzenlenir. Pinealositlerin metabolik aktivitesi, β -adrenerjik antagonistler ile inhibe edilir. Pineal bezin en önemli histolojik özelliği ekstraselüler boşluklarda bulunan ve corpora arenacea (beyin kumu) olarak adlandırılan, kalsifikasyon alanlarının bulunmasıdır. Kalsifikasyon erken dönemde, çocukluk çağında 10 yaşına kadar ve 10 yaşından sonrası ortaya çıkmaktadır. Pinealositler, içinde kalsiyum fosfat kristalleri bulunan ekstraselüler matriks salgılar. Kalsifikasyonun, pineal bez fonksiyonları üzerine bilinen bir etkisi yoktur. Kalsifiye olmuş bir epifiz, beynin orta hattının belirlenmesinde önemli bir radyografik belirteçtir (Kierszenbaum, 2006).

1.3.3. Pineal Bezin Gelişimi

1.3.3.1. Prenatal Dönem:

İnsanda pineal bez, intrauterin hayatın 36. gününde, commissura posterior ve commissura habenulorum arasında, diensefalon'un üst arka bölümündeki nöroektoderm'den, nöroepitelium'un divertikülü şeklinde gelişmeye başlar. Nöroepitelyal hücreler çoğalarak pinealoblastlara, bunlar da parankima hücrelerine dönüşürler. Erken embriyonal dönemde commissuralardan gelen sinir lifleri organa ulaşır. Sempatik sinir lifleri ise yaklaşık 60. günde n.conarii yoluyla organın distal kısmından girer ve innervasyonda başlıca rol oynar (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Kan damarları içeren stroma dokusu ise mezanşimden gelişir ve insan pineal bezi

posterior serebral arterin medial posterior koroidal dalları ile beslenir. Bezin küçük çapına karşılık kanlanması oldukça güçlüdür ve organizmada böbrekten sonra en fazla kanlanan organdır. Pineal bezin venöz drenajı, Galen venine boşalan küçük pineal venler aracılığı ile olur (Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

1.3.3.2. Postnatal Dönem:

Pineal bez parankiminde pinealositler ve glia hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır. Doğumda baskın olan hücreler glia hücreleri iken, postnatal yaşamın 3. ayından itibaren glia hücreleri azalır ve yerini pinealositler alır. Genel olarak insanlarda pineal bezin gelişim sürecinin yedi yaşına kadar olduğu kabul edilmektedir (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Erişkin insanlarda ortalama ağırlığı 100-180 mg olan pineal bez 5-9 mm uzunluğunda, 3-6 mm genişliğinde, 3-5 mm derinliğindedir (Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998).

1.3.4. Pineal Bezin Fizyolojisi

Pineal bez, endokrin bir organ olarak kabul edilir. Pineal bezden serotonin, melatonin ve norepinefrin gibi biyojen aminler salgınır. Pineal bez, hipotalamus'ta yer alan nucleus suprachiasmaticus ile biyolojik bir saat gibi çalışır. Pineal bez karanlıkta salgıladığı melatonin ile vücutta günün veya yılın farklı zamanlarında ki fizyolojik siklusların düzenlenmesinde rol oynar (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Pineal bezden salınan melatonin gece- gündüz ritmine bağlı olarak sentez edilir. Sağlıklı bir ratda 24 saatte ortalama 10 µg melatonin salgılanmaktadır. Melatonin üretimi ve salınımı karanlık ile başlar, aydınlık ile sona erer. Bu nedenle melatonin için felsefi yaklaşım olarak "Karanlığın Kimyasal Anlatımı" veya "Endokrin Sistemin Drakulası" gibi isimler kullanılmaktadır. Aydınlık dönemin uzaması veya aniden ışığa çıkılması durumunda melatonin sekresyonu azalırken, geceleri ise, yüksek bir artış gösterir. Yükselmiş melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi ise, karanlığın süresi ile doğru

orantılıdır. Kış aylarında, uzamış gecelerde, bu süre biraz daha uzundur. Pinealektomi veya sempatik duyarsızlaştırma işlem uygulamaları melatoninin gece yükselmesini önler (Arendt, 1998). Melatoninin siklik salınımı daima hipotalamusta nucleus suprachiasmaticus'un sinirsel aktivasyonu sonucu gerçekleşir. Ancak diyet, uyku süresi ve vücut postürüne göre melatonin sekresyonu bazı değişiklikler gösterebilir (Ljubuncic ve ark., 2000; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

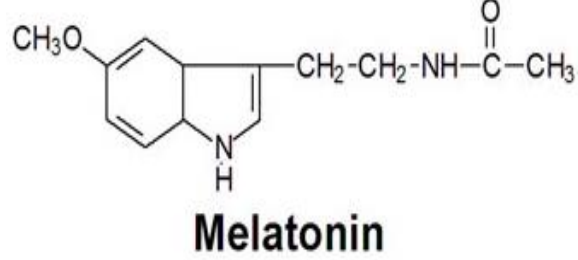
Dolaşım sisteminde ise melatonin pineal bezden sentezlendikten sonra depolanmadan hızla dolaşıma verilir ve beyin omurilik sıvısı (BOS), tükürük, safra gibi vücut sıvılarına geçer. Bu sıvılarda serum düzeylerinden birkaç kat daha yüksek konsantrasyonda bulunur (Tan ve ark., 1999). Dolaşımdaki melatoninin, %50-75'i geri dönüşümlü olarak albümin veya alfa-asit glikoproteine bağlanarak fonksiyon gösterir. Melatoninin yarılanma ömrü 30 ile 60 dakika arasındadır. Dışarıdan verilen melatoninin yarılanma ömrü ise daha kısa olup 12 ile 48 dakika arasında değişir. Eksojen olarak verilen melatonin de endojen melatonin gibi aynı yolları kullanarak metabolize olur (Çam ve Erdoğan, 2003).

Pineal bezin aynı zamanda endokrin bezler üzerinede etkileri bulunmaktadır. Bunlar; adenohipofiz, nörohipofiz, pankreastaki langerhans adacıkları, böbrek üstü bezinin korteks ve medulla kısımları, ovaryum ve testislerdir. Melatonin hormonu bu organlara kan veya (BOS) ile ulaşarak fonksiyonlarını genellikle inhibe edici yönde etkiler (Arıncı ve Elhan, 2006).

1.4. Melatonin

İlk kez 1958 yılında Amerikalı dermatolog Aoran B. Lerner (Lerner ve ark., 1958) çok sayıda sığırın pineal bezinden amfibian olarak adlandırılan etkin maddeyi tanımladı. Bu maddeye amfibian pigmentindeki melanoforları kontrakte ettiği için melatonin adını verdi (Kappers, 1976; Arendt, 1988). Lerner bu maddeyi Yunanca'da siyah anlamına gelen "melas" ve iş anlamına gelen "tosos" kelimelerini birleştirerek "melatonin" olarak da adlandırmıştır (Lerner ve ark., 1960).

Pineal bezden indolaminler ve peptidler olmak üzere iki grup endojen madde salgılanmaktadır. İndolaminlerin en önemlisi 232 molekül ağırlıklı N-asetil-5 metoksitriptamin, diğer bir deyişle melatonindir (Erlich ve ark., 1985). (Şekil 1.7)



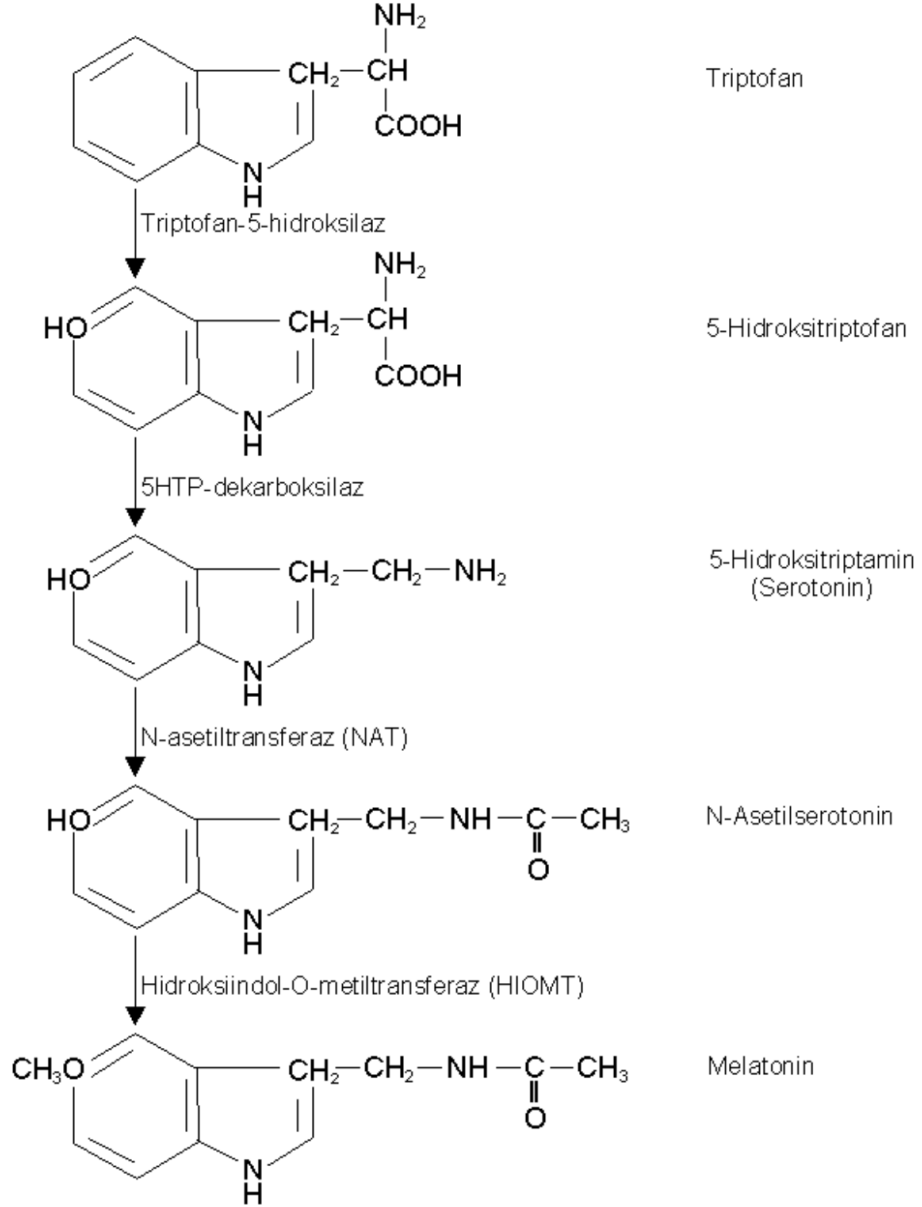
Şekil 1.7. Melatoninin kimyasal yapısı
(<http://www.quit-yer-snoring.com/melatonin-and-serotonin.html>).

1.4.1. Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması

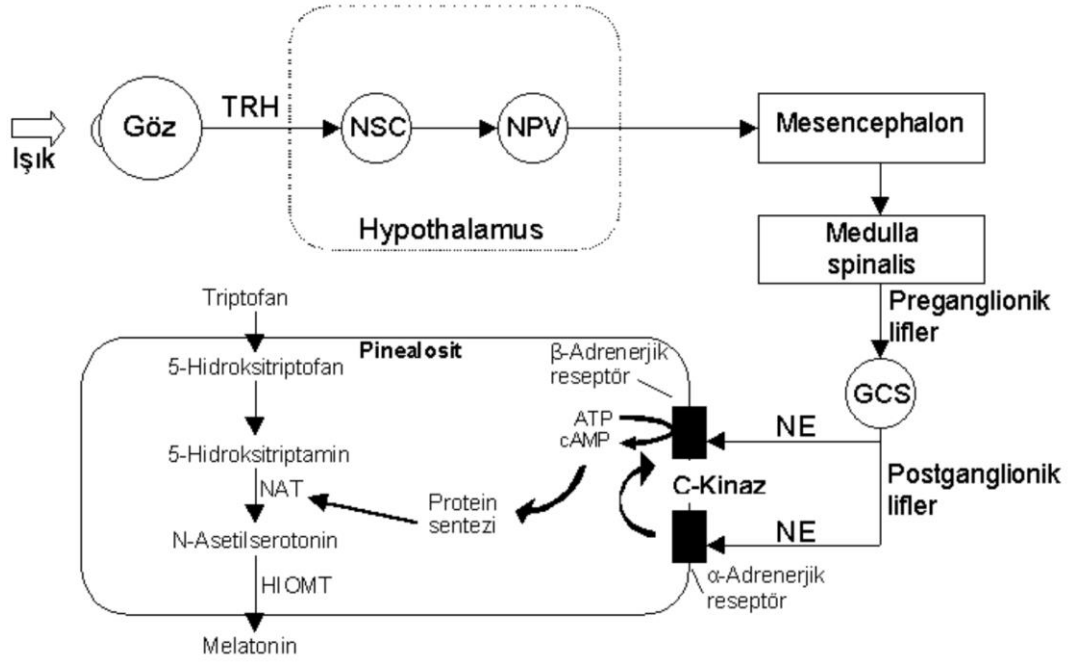
Melatonin hormonu, pineal bez yapısında bulunan ve parankimal hücrelerin çoğunluğunu oluşturan pinealositler tarafından sentezlenir. Bu hücreler tarafından gerçekleştirilen melatonin sentezi için triptofan aminoasidine gereksinim vardır. Kan dolaşımından pinealosit içerisine alınan triptofan, ilk önce triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) çevrilir. Serotonin de son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (Şekil 1.8) (Erlich ve Apuzzo, 1985; Cagnacci, 1996; Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz 2002).

Pineal beze ulaşan sempatik sinir lifleri parankimal hücreler arasında sonlanmakta ve bu sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter norepinefrindir. Sinir sonlanmalarındaki norepinefrin salınımı aydınlıkta azalırken, karanlıkta artış gösterir. Norepinefrin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membran yapısındaki β ve α -adrenerjik reseptörlere bağlanır. Pineal bez fonksiyonunun düzenlenmesinde α -

adrenerjik reseptörlerin β -uyarımı artırıcı bir görevi vardır. Melatoninin % 85'i β -reseptörlerin aktivasyonu ile sentez edilirken, % 15' i ise α -reseptörlerin aktivasyonu ile sentez edilir. Hücre içinde β ve α -adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile c-AMP ve Nasetiltransferaz (NAT) artışı gözlenir (Erlich ve Apuzzo, 1985; Cagnacci, 1996; Keleştimur, 1996; Kuş ve Sarsılmaz 2002). (Şekil 1.9)



Şekil 1.8. Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi (Kuş ve Sarsılmaz 2002).



Şekil 1.9. Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). (TRH: Tractus retinohypothalamicus; NSC: Nucleus suprachiasmaticus; NPV: Nucleus paraventricularis; GCS: Ganglion cervicale superius).

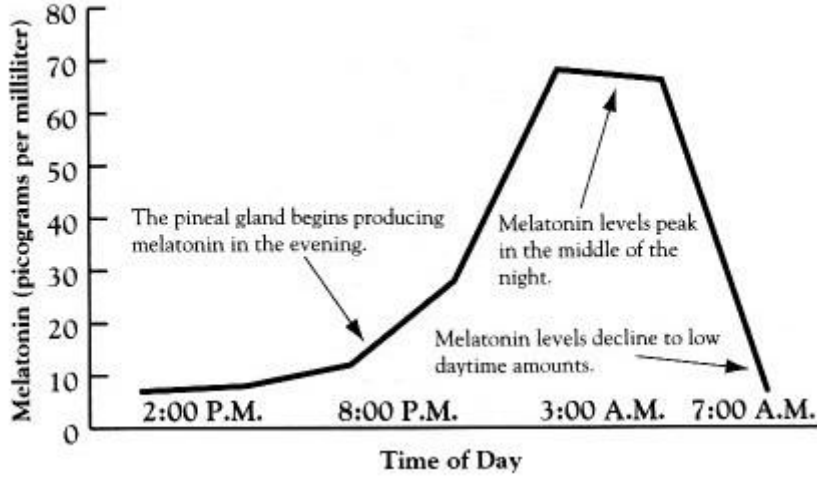
Melatonin hem yağda hem de suda çözünebilir özellikte ve düşük molekül ağırlığına sahip bir hormondur. Bu özelliğinden dolayı pinealositlerde üretildikten sonra pasif diffüzyonla hızlı bir şekilde hücre dışına atılır (Cagnacci, 1996). Lipofilik yapısından dolayı melatonin vücutta tüm doku ve sıvılara kolayca dağılmaktadır. Pineal bezde kan-beyin bariyeri bulunmaz bu sebeple salgılanan melatonin direk olarak sistemik kan dolaşımına geçer. Melatonin organizmanın bütün biyolojik sıvılarına ve dokularına ulaşır. Belirli antikörlerin yardımı ile, melatonin varlığı beyin, retina, lens, koklea, harder bezi, deri, mide bağırsak, karaciğer, böbrek, tiroid, pankreas, timüs, dalak, bağışıklık sistemi hücreleri, karotid cisim, solunum yolu epitelinde, üreme yolu ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birden fazla pinealden farklı dokularda tespit edilmiştir. Bu dokuların çoğunda, melatonin sentezleyen enzimler belirlenmiştir. Melatonin, beyin omurilik sıvısı, tükürük, safra, eklem sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü de dahil olmak üzere esas olarak tüm biyolojik sıvılar içinde bulunmaktadır. Bu sıvıların birçoğunda bulunan melatonin konsantrasyonları kanda kabul edilen miktarlardan yüksektir. Bu durum hücresel düzeyde melatoninin sürekli kullanılabilir olması, hücre homeostazının fizyolojik düzenlenmesi için önemlidir (Acuña-Castroviejo ve ark., 2014). Kandaki yarılanma süresi 10-40 dakika

olan melatonin hormonu başlıca karaciğerde ve böbreklerde metabolize olur. Melatonin hormonunun % 90'ı karaciğerde metabolize olarak mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonine dönüştürülür. Bu bileşen sülfat veya glukoronik aside bağlanarak idrar yoluyla dışarı atılır (Cagnacci, 1996). 6-sulfatoksimeletonin ise idrarda bulunan melatonin hormon metabolitidir (Erlich ve Apuzzo, 1985; Keleştimur, 1996). Bu idrar bileşeni özellikle çocuklarda epifiz bezi işlevlerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Webb, 1995).

1.4.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi

Melatonin sekresyonunun sirkadiyan ritmi hipotalamusta yer alan nuc. suprachiasmaticus tarafından düzenlenir. Bu çekirdek, ışığın şiddetine bağlı olarak pineal bezdeki melatonin sentezini baskılar (Cagnacci, 1996). Işık şiddetine bağlı olarak ortaya çıkan engelleme, karanlıkta oratadan kalkar. İnsan dahil tüm memelilerde melatonin hormonu geceleri daha fazla miktarda salgılanmaktadır. Melatonin sentezinin gerçekleşmesinde rol oynayan pineal NAT ve HIOMT enzim aktivasyonlarının da geceleri çok yüksek olduğu belirtilmiştir (Keleştimur, 1996).

Melatonin seviyesi özellikle gece saat 23.00–05.00 sıralarında en üst düzeye ulaşır ve kandaki konsantrasyonu 3-10 kat artar (Çam, 2003). Akşam 21.00-22.00 saatlerinde artmaya başlar, 02.00-04.00 saatlerinde en üst seviyeye ulaşır. Sabah 05.00-07.00 saatleri arasında azalmaya başlar ve 07.00'den sonra tekrar bazal seviyelere düşer (Şekil 1.10). Melatoninin kan konsantrasyonu gündüz saatlerinde yaklaşık 0-20 pg/dl düzeylerinde değer gösterirken, gece saatlerinde 50-200 pg/dl düzeylerine yükselir. Gece boyunca ortalama 30 mg melatonin sentezlendiği bildirilmiştir (Çam, 2003; Claustrat, 2005; Mollaoğlu, 2005).



Şekil1.10. Melatonin gece-gündüz salınımı
(<https://amandamarielphelps.files.wordpress.com/2015/05/melatoninchart.jpg>).

Kan melatonin düzeyleri yaşa bağlı olarak değişim gösterir. Yeni doğanda kan melatonin konsantrasyonu düşük olup, üçüncü aya kadar artmakta ve bu aydan sonra sirkadiyan melatonin ritmi belirginleşmektedir (Keleştimur, 1996).

1.4.3. Melatoninin Fizyolojik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

1.4.3.1. Melatoninin Endokrin Sistem Üzerine Etkisi

Pineal bez, organizmadaki endokrinolojik aktiviteyi hipofiz, tiroid, adrenal bez ve gonadlar üzerinden düzenleyen bir yönetici konumundadır. Bu nedenle endokrin organlardaki fonksiyon bozukluklarına bağlı olaylarla ilişkilidir (Turgut ve ark., 2002). Melatonin salınımının, gonadal hormonları etkilediği, çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Ozturk ve ark., 2003; Oztekin ve ark., 2006). Eksojen melatonin, türe, yaşa, doza ve uygulama zamanına göre değişkenlik göstermekle beraber, üremeyi etkiler (Turgut ve ark., 2002). Hipotalamustaki Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) üretimini baskılamakta ve ön hipofizdeki Luteinleştirici Hormon (LH) salınımını inhibe etmektedir. Hem hipotalamus düzeyinde hem de ön hipofiz düzeyinde göstermiş olduğu bu etki sonucu gonadal hormonların üretimini de azaltmaktadır. Hayvan çalışmalarında doğrudan hipotalamus düzeyinde GnRH

salgılanması üzerindeki etkisiyle LH salgılanmasını inhibe ettiği belirlenen melatoninin insanda da pubertenin başlamasında benzer bir etki oluşturacağı öngörülmektedir. Buna göre, plazma melatonin düzeyi yaklaşık 500 pmol/l'nin altına düştüğünde GnRH'ın salgılanması artmakta ve pubertenin başlaması mümkün olmaktadır. Melatonin ayrıca endorfin gibi GnRH salgılanmasını azaltan opioid maddelerin sekresyonunu da artırmaktadır (Keleştimur, 1996; Baltacı, 2001).

Ratlarda yapılan çalışmalarda, pinealektominin Leydig hücrelerinde serum testosteron seviyelerini kontrol gruplarına göre önemli ölçüde artış gösterdiği gözlenmiştir. Pinealektomi sonrasında melatonin verilmesinin bunu azalttığı bildirilmiştir (Kuş ve ark., 2002).

1.4.3.2. Melatoninin İmmün Sistem Üzerine Etkisi

Melatonin hormonu hipotalamustaki Tiroid Uyarıcı Hormon (TRH) sentezini ve salgılanmasını uyararak, immunomodülatör, timotropik ve anti-stres aktivitesini oluşturur. Pinealektomi işleminin melatonin sentezini engellemesiyle immun fonksiyonlarda bir azalma görüldüğü, eksojen olarak dışarıdan uygulanan melatonin hormonunun ise immun cevabı tekrardan uyardığı bildirilmiştir. Melatonin, immun sistem üzerinde hücrel bağışıklığı hem direk hem de indirek olarak etkileyen bir hormondur (Baltacı ve ark., 2005). Yapılan birçok laboratuvar çalışmalarında fare ve sıçanlara uygulanan melatoninin immun fonksiyonu arttırdığı deneysel olarak incelenmiştir. Bu sebeple melatonin uygulamasının immun fonksiyonlar için özellikle hücrel immunitenin aktivasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (Rohr ve Herold, 2002).

Melatonin immun cevabı artırır ve immun yetmezlik durumlarında uygulandığında, belirgin bir şekilde immun aktivasyonuna yol açmaktadır. İmmun parametreler üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinen akut stres ve immunsupresif farmakolojik ajanların uygulanmasıyla oluşan immun yetmezlik durumları,

melatonin ile kontrol altına alınabilmektedir (Ölmez ve ark., 2000). Doğal immunité dışardan melatonin verilmesi ile stabil tutulabilir. Doğal Öldürücü (NK) hücre aktivitesinin farelerde pinealektomi işleminin sonrasında azaldığı gözlenmiştir. Melatoninin, kemik iliğinde de bulunması NK hücrelerinin ve monositlerin gelişmesi üzerine module edici etkisine işaret eder. Genç erkek farelere eksojen melatonin verildikten 7-14 gün sonra hem NK hücrelerinde, hem de monosit sayılarında artış gözlenmiştir. Aynı zamanda melatonin makrofaj üretimi ve fonksiyonunu sağlar. Makrofaj olarak bilinen TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin üretimi dışardan melatonin verilmesi ile arttırılabilir veya azaltılabilir. Melatoninin immün fonksiyonları direk olarak etkileyebileceği yer ise T hücreleridir. Melatonin T hücrelerinin apoptosisini azaltır ve T hücrelerinin aracılık ettiği sitokin ekspresyonunu artırır. Melatonin verilmesi TH1 hücreleri üzerinden IFN- γ , IL-2 ve 10 TNF- α salınımını uyarır. İnsan monositlerinde de benzer şekilde bahsedilen sitokinlerin üretimi melatonin tarafından arttırılır (Hotchkiss ve ark., 2002).

1.4.3.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatoninin bir antioksidan olduğu literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve arkadaşları tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla bu hipotez desteklenmiştir. Melatoninin antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adhezyon moleküllerinin ve proinflatuar sitokinlerin sentezlerini azaltmayı da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (Ianăș ve ark., 1991). Melatoninin prooksidatif aktivitesi yoktur bu yüzden, melatonin molekülü kolayca oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz ve redoks döngüsüne, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara girmez. Melatoninin OH radikalini nötralize etme özelliği glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır (Palaoğlu ve ark., 1998). Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatoninin toksik bir etki göstermemesidir (Reiter, 1993).

Melatoninin bu antioksidan özelliği, yaşam döngüsünde oldukça önemli olan DNA'yı oksidatif hasardan korumakta ve tümör oluşumunu inhibe etmektedir. Bu durum, birkaç şekilde açıklanabilir. Birincisi melatoninin güçlü bir serbest radikal tutucu veya süpürücü olmasıdır. İkincisi ise; zehirli ve kimyasal maddeleri uzaklaştıran yolları aktifleştirmesidir (Kerman, 2005).

Melatonin, immun sistem üzerine hücre sel immunitiyi hem direk hem de indirek yollarla etkileyen bir hormondur. Melatonin, lipofilik ve hidrofilik özellikte olması nedeniyle bütün morfofizyolojik bariyerleri geçerek organizmada çok geniş bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir (Reiter, 2003; Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007).

Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intrasellüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikallerin hasarından koruyabilmektedir (Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O_2^- , H_2O_2 ve OH^- gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır (Reiter, 1993; Reiter, 2003; Konturek ve ark., 2007). Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol melatonine benzer şekilde yıkılsa da, O_2^- varlığında, melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Konturek ve ark., 2007). Melatoninin H_2O_2 varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir. AFMK, daha sonra Arilamin Formamidaz (AFA)'ın katalizlediği reaksiyonla N1-asetil-5-metoksikinüramine (AMK) çevrilmektedir. Kinüramin türevi olan AFMK ve AMK gibi metabolitler de, melatoninin antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerine sahiptir (Konturek ve ark., 2007). Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın

oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır. Genomdaki reseptörleri etkileyerek (CAT), (SOD), (GPx), (GRx) ve α -Glutamil Cysteine Sentetaz (GCS) gibi antioksidan enzim sistemlerinin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttıran uyarıcı etkisi vardır. Bu etkileriyle hücreyi oksidatif hasardan korur, inflamasyonu azaltır ve doku ödemi geriletir (Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007).

1.4.3.4. Melatoninin Yaşlanma Üzerine Etkisi

Birçok bilimsel makale insanlarda plazma melatonin konsantrasyonunun yaş ile düştüğünü rapor etmektedir (Touitou 2001; Turgut ve ark., 2002). Kan melatonin konsantrasyonu sekiz yaş civarlarında maksimum düzeylere ulaşır. Puberta döneminde belirgin bir şekilde azalan melatonin düzeyleri, yaş ile birlikte sürekli bir azalış gösterir (Erlich ve Apuzzo, 1985). Yaşlanma ile melatonin sentez ve salınımında azalışa paralel olarak melatoninin sirkadiyan ritmi bozulmaktadır. Touitou (2001) nun bildirdiğine göre yaşlı insanlarda ölçülen plazma melatonin konsantrasyonu normal değerinden yaklaşık % 40-50 daha düşük bulunmaktadır. Deneysel hayvanlarında da hayvan yaşlandıkça sirkadiyan ritmin bozulduğu, gündüz ve geceye ait serum melatonin düzeylerinin hemen hemen eşit düzeye geldiği saptanmıştır (Turgut ve ark., 2002).

Melatonin seviyelerinin yaşlanma ile düşmesinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır, çok sayıda faktörün bu azalmadan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu faktörler:

- Pubertal dönemden itibaren pineal bezde kalsiyum depoları göze çarpar. Yaşlanmayla beraber pineal bezin kalsifikasyonu görülür. Pineal bezin kalsifikasyonu çoğunlukla kalsiyum depolarındaki kalsiyumun çökmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak pineal bezde kalsiyum taşlarının

oluşması bezin kalsifikasyonuna yol açan en önemli etken olarak görülmektedir.

- Diğer bir faktör de, yaşlı kemirgenlerde de açıklandığı gibi, yaşla birlikte pinealosit membranındaki β adrenerjik reseptörlerin sayıları ve/veya norepinefrine karşı tepkileri azalabilir.
- Melatonin sentezinden sorumlu anahtar enzim olan NAT aktivitesi yaşlı sıçanlarda, melatoninin azalmasına paralel olarak sirkadiyan durum ne olursa olsun azalış göstermiştir (Touitou, 2001).

1.4.3.5. Melatoninin Uyku Üzerine Etkisi

Pineal bezden melatonin salgılanma ritmi, normal uyku alışkanlığı saatleri ile doğru orantılıdır. Kanda ki melatonin düzeyi geceleri gündüze oranla 10 kat daha yüksektir. Uyku bozukluğu olan yaşlılarda, serum melatonin konsantrasyonu uyku problemi olmayan aynı yaştakilere oranla daha düşük bulunmuştur (Ölmez ve ark., 2000).

Riemann ve ark. (2002) uykusuzluk problemi olan hastalarda nokturnal melatonin konsantrasyonunun düştüğünü göstermişlerdir. Mac Farlage ve ark. (1991) kronik uykusuzluğun tedavisinde yüksek dozda melatonin (75 mg) kullanımının etkisini araştırmışlar ve melatonin verilen grupta toplam uyku sürelerinin arttığını bulmuşlardır. Düşük dozda melatoninin de aynı zamanda uykusuzluğun tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Gönüllü hastalara 0,3 mg ve 1 mg dozlarında melatonin verilmiş ve her iki doz seviyesinde de melatoninin uykuya dalmak için gereken zamanı azalttığı gösterilmiştir (Birdsall, 1996).

Jet lag, denizaşırı uçak seyahatleri sonrasında vücut ritminin bozulmasına bağlı olarak gelişen uykusuzluk ve grip benzeri semptomlarla kendini gösteren bir rahatsızlıktır. Beraberinde konsantrasyon ve oryantasyon bozukluğu, kan basıncında, kan şekeri düzeyinde düşme, enerji, uyanıklık ve hormon düzeylerinde değişiklikler gözlenebilir (Rohr ve Herold, 2002; Ölmez ve ark.,2002). Melatonin verilmesinin

denizaşırı yolculuk yapanlarda jet lag etkilerini en aza indirgediği bildirilmiştir (Birdsall, 1996).

1.5. Tezin Amacı

Yaygın olarak kullanılmakta olan organofosfat insektisitlerin kullanımı sonucunda sıklıkla toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu toksik etkilerden korunma ve zararlı etkilerin en aza indirilmesi amacıyla çeşitli antioksidan ve koruyucu faktörlerin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Bir organofosfat insektisit olan fenthion, uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, bu insektisit zararlı etkileri ve bu etkilerden korunmayı amaçlayan çalışmalar devam etmektedir. İnsektisitlerin toksik etkilerinin azaltılmasına yönelik uygulanan tedaviler, oluşacak doku ve organ hasarlarını da en aza indirerek, insektisitlerin hem zararlı etkilerinden korunmaya hem de tedavi maliyetinin azaltılmasına olanak sağlayacaktır.

Bu tezin amacı, akut fenthion maruziyetine bağlı oluşan toksisite üzerine güçlü bir antioksidan olan melatoninin koruyucu etkilerini araştırmaktır. Bununla birlikte fenthion ile oluşabilecek toksisitenin melatonin varlığında nasıl önlenebileceğini araştırmak ve endojen ve eksojen kaynaklı melatoninini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı (SDÜ-HÜDAL) tarafından temin edilen Wistar Albino cinsi 4-6 haftalık / 200-250 gr erişkin erkek ratlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (SDU-HADYEK)'ndan 04.12.2014 tarihinde alınan "07" sayılı onay kararı ile başlandı.

Toplam 63 adet rat kullanılan araştırmada gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

Grup 1, (n:8) Kontrol Grubu: Gündüz 12.00'da Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) (% 0,9 NaCl) ile sulandırılmış % 10'luk etanol'den 0,1 ml intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edilen ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup 2, (n:11) Fenthion ve Endojen Melatonin Uygulanan Grup: Endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece saat 00.30'da, kırmızı loş ışık altında oral gavaj yoluyla mısır yağında çözülmüş tek doz 54 mg/kg fenthion uygulanan ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup 3, (n:11) Fenthion, Endojen ve Eksojen Melatonin Uygulanan Grup: İki gün süreyle, gündüz 12.00'da günde tek doz 10 mg/kg i.p melatonin uygulandıktan sonra endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece saat 00.30'da, kırmızı loş ışık altında oral gavaj yoluyla mısır yağında çözülmüş tek doz 54 mg/kg fenthion uygulanan ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup 4, (n:11) Pinealektomi Grubu: Cerrahi olarak pinealektomi işlemi uygulandı. Otuz gün iyileşme sürecinden sonra iki gün süreyle gündüz saat 12.00'de

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) (% 0,9 NaCl) ile sulandırılmış % 10'luk etanol'den 0,1 ml i.p olarak enjekte edilen ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup 5, (n:11) Pinealektomili Fenthion Uygulanan Grup: Cerrahi olarak pinealektomi işlemi uygulandı. Otuz gün iyileşme sürecinden sonra oral gavaj yoluyla mısır yağında çözülmüş tek doz fenthion 54 mg/kg uygulanan ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup 6, (n:11) Pinealektomili Eksojen Melatonin ve Fenthion Uygulanan Grup: Cerrahi olarak pinealektomi işlemi uygulandı. Otuz gün iyileşme sürecinden sonra 2 gün süreyle günde tek doz 10 mg/kg i.p melatonin uygulandı. Melatonin uygulamasından sonra oral gavaj yoluyla mısır yağında çözülmüş tek doz fenthion 54 mg/kg uygulanan ratlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

2.2. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

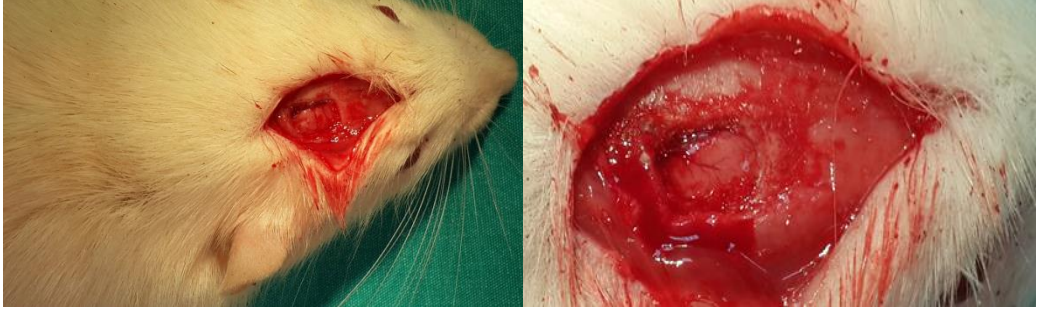
Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları grup halinde barındırılacağı için kafeslerinin taban alanları, birey başına 250 cm² olacak şekilde özel çelik kafeslere yerleştirildi. Kafeslere altlık olarak ağaç talaşı kullanıldı. Yemler özel çelik kaplarda normal rat yemi (pellet halinde) olarak; su, cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi.

Ratlar nokturnal hayvanlar oldukları için gece/gündüz döngüsü bu hayvanların normal fizyolojik davranışlarını etkileyebilir. Bu yüzden ratlar, doğal ışık döngüsünü algılamaları için 12 saat ışık (7.00-19.00) ve 12 saat karanlıkta (19.00-7.00) olmak üzere aydınlık/karanlık döngüsü olan iyi havalandırılmış, % 60 rölatif nem oranına ve 21°C ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırıldı.

2.3. Deneysel Uygulamalar

2.3.1. Pinealektomi

Pinealektomi Kuszack ve Rodin'in (Kuszack ve Rodin, 1997) belirlediği metoda uygun bir şekilde yapıldı. Hayvanlar, 60 mg/kg ketamine hydrochloride (Alfamine %10) ve 5 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer) karışım solusyonu ile anestezi edildi. Genel anestezi altına alınan ratlar sterno abdominal pozisyonda kafatası sabitlenerek, kafatası derisinin üstü tıraşlandı. Daha sonra longitudinal olarak oksipital çıkıntıya ulaşacak şekilde medialde 1,75 cm'lik bir enzision yapıldı. Sagittal ve lambdoid süturların bulunduğu kemiklerin periostları temporal kaslara kadar kazındı. Sonrasında dişçi matkabı ile kafatası kemiği rostrokaudal olarak ortalama 1,25 cm dik açılı bir dikdörtgen ve 0,75 cm mediolateral olacak şekilde kesildi. Parietal ve oksipital kemikleri de içine alan dikdörtgen şeklindeki kemik flebinin çıkarılması işlemine geçildi (Şekil 2.1). Bu işlemde, üç kenarı elektrikli testere ile kesilerek kemik flebi rostral açıdan tutularak, kaldırıldı. Durayı zedelememek ve sinüslerde hemoraji oluşturmamak için kemik flebi posteriora doğru kaldırılırken özen gösterildi. Kemik uzaklaştırıldıktan sonra gazlı bez ile kanama koruma altına alındı. Transvers sinüsün mediorostral kenarından sagittal venin lateral kenarları boyunca dura kesildi. Dura mater kanalın altına sokulan 0,2 mm uzunlukta uca sahip keskin kenarlı bir kanca yardımıyla sinus longitudinalisin her iki tarafından kaldırılarak ince köşeli bir pensetin sinus altına girebilmesine izin verecek genişlikte açıldı. Sinüsün ligatüre edilen kaudal kısmı posterior olarak yer değiştirilerek sagittal ve transversal sinüslerin birleşme yerinin hemen altındaki pineal beze ulaşıldı. Vakit kaybetmeden forseps yardımıyla pineal bez sap kısmından tutularak uzaklaştırıldı (Şekil 2.2). Venöz sinüsler orijinal konumlarına getirildikten sonra kemik flebi tekrar yerine yerleştirildi ve sagittal venin her iki ucu birbirine bağlanarak kafatası derisi 5-0 ipekle dikildi (Yılmaz ve ark., 2011).



Şekil 2.1. Pinealektomi öncesi kemik flebinin açılmış hali.



Şekil 2.2. Pinealektomi işlemiyle alınan pineal bez örneği.

2.3.2. Dokuların Alınması, Korunması, Homojenizasyonu ve Hazırlanması

Sakrifiye edilen deney hayvanlarından alınan dokular (beyin, böbrek ve karaciğer) hızlı bir şekilde 2 ml'lik ependorf tüplerin içerisine konulup ependorfun kapağı kapalı olacak şekilde sıvı azot tankının içerisine daldırılıp çıkartılarak donduruldu. Daha sonra -80°C 'de biyokimyasal çalışma yapılana kadar muhafaza edildi. Çalışmamızda kullanılan cihazlar Tablo 2.1' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Deneyde kullanılan cihazlar.

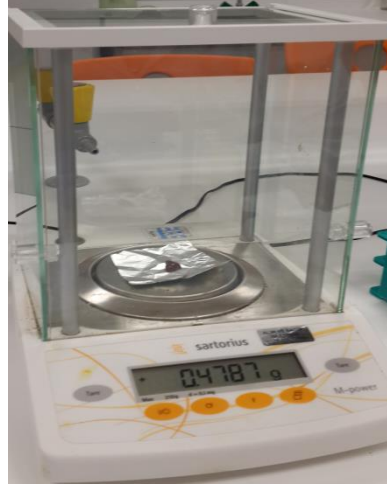
Soğutmalı santrifüj	Hettich Rotina 420 R(Almanya)
Santrifüj	Hettich Micro 200 R (Almanya)
Derin dondurucu (-80)	Nüve (Türkiye)
Hassas terazi	Sartorius (Kanada)
Vorteks	Scilogex (USA)
Otomatik pipetler	Eppendorf (Amerika) ve ThermoScientific (Finlandiya)
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1800 (Japonya)
Homojenizatör	Ultra Turrax T18 (Almanya)
Manyetik karıştırıcı	IKA; RTC (Almanya)
Ultrasonik su banyosu	Nüve (Türkiye)

2.3.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

pH 7,5, 0,2 mM Tris-HCl tamponu; 0,2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve hidroklorik asit (HCl) solüsyonu, 50/39,9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı (Akkuş, 1997). Deneyin tüm aşamalarında hazırladığımız aynı tampon kullanıldı.

2.3.2.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Hassas terazide yaş ağırlıkları tartılan dokular (Şekil 2.3) soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Homojenizasyon esnasında enzimlerin ısıdan zarar görmemesi için cam tüp, buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirildi. Cam tüpteki dokular 13.500 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlıklarıyla orantılı olarak doku ağırlıklarının 2,5 ya da 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Dokular tekrar homojenize edilerek homojenizasyon süresi 3 dakikaya tamamlandı. Elde edilen homojenatlardan MDA ve homojenat protein tayini (Lowry metodu ile) yapıldı.



Şekil 2.3. Dokuların hassas terazide yaş ağırlıklarının ölçümü.

Homojenatlar, 3200 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4°C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantların CAT ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4°C 'de santrifüj edildi. Üst kısımda oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

2.4. Biyokimyasal Ölçümler

Enzim aktiviteleri ve MDA miktarı tayinleri multidisipliner laboratuvarında spektrofotometre ile yapıldı.

2.4.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini

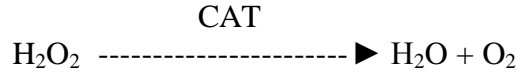
SOD aktivitesi Sun ve ark.'nın metoduna (Sun ve ark., 1988.) ve Durak ve ark.'nın tarif etmiş olduğu modifikasyona göre yapıldı (Durak ve ark., 1993).

Kullanılan Reaktifler ;

SOD reaktifi [0,3 mmol/litre ksantin, 0,6 mmol/litre EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/litre NBT, 400 mmol/litre Na₂CO₃, 1g/litre bovine serum albumin (BSA)], 167 U/litre ksantin oksidaz (XO), 0.8 mmol/litre CuCl₂.

2.4.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Metodun prensibi: CAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (Aebi, 1974.). H₂O₂ 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanır, bu ise ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde görülmektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir;



Kullanılan reaktifler;

Fosfat tamponu (pH 7,5 mM), absorbansı 0,500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂ 'li fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi).

2.4.3. Malondialdehit Miktarının Tayini

Deneyin prensibi: Wasowicz ve ark.'nın metodu ile çalışıldı (Wasowicz, ve ark., 1993). Malondialdehit, 90°C'de tiyobarbitirik asit ile reaksiyona girer ve reaksiyon sonucunda pembe bir renk oluşur. Numuneler 90°C'de on beş dakika inkübe edildikten sonra hızla soğutulduktan sonra spektrofotometrik olarak absorbanslarının 532 nm'de okunmasıyla sonuçlar elde edildi.

Kullanılan reaktifler:

29 mmol/litre tiyobarbitirik asit (TBA) çözeltisi (pH'sı 2,8), 6 M HCl ve n-Butanol.

2.4.4. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz Numunelerde Protein Tayini

Deneyin prensibi (Lowry Metodu): Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Rengin koyu olması ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Lowry ve ark., 1951).

Kullanılan kimyasallar:

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi.

2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Rstudio programı (v.0.98.501) ve R script dili kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistik; değişkenlerin ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterildi. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumda iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı ve ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Karaciğer Dokusu Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Karaciğer dokusundaki CAT ve SOD enzim aktiviteleri ve MDA miktarları Tablo 3.1'de, gruplar arasındaki karaciğer CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının karaciğerdeki CAT, SOD enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 (n=8)	0,93±0,31	0,10±0,03	3,68±0,74
Grup 2 (n=11)	1,53±0,33	0,13±0,02	5,21±1,80
Grup 3 (n=11)	1,08±0,32	0,12±0,02	3,15±0,73
Grup 4 (n=11)	0,93±0,14	0,10±0,01	2,79±0,30
Grup 5 (n=11)	0,93±0,23	0,10±0,01	3,70±1,30
Grup 6 (n=11)	1,07±0,15	0,09±0,01	4,92±1,49

CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, MDA: Malondialdehit.

Tablo 3.2. Çalışma gruplarının karaciğer CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 ve 2	0,002	0,091	0,032
Grup 1 ve 3	0,058	0,131	0,117
Grup 1 ve 4	0,322	0,283	0,004
Grup 1 ve 5	0,509	0,364	0,620
Grup 1 ve 6	0,248	0,099	0,099
Grup 2 ve 3	0,006	0,364	0,003
Grup 2 ve 4	0,000	0,000	0,001
Grup 2 ve 5	0,001	0,000	0,053
Grup 2 ve 6	0,002	0,000	0,870
Grup 3 ve 4	0,011	0,003	0,250
Grup 3 ve 5	0,071	0,006	0,491
Grup 3 ve 6	0,450	0,000	0,003
Grup 4 ve 5	0,670	0,768	0,123
Grup 4 ve 6	0,071	0,008	0,001
Grup 5 ve 6	0,094	0,011	0,071

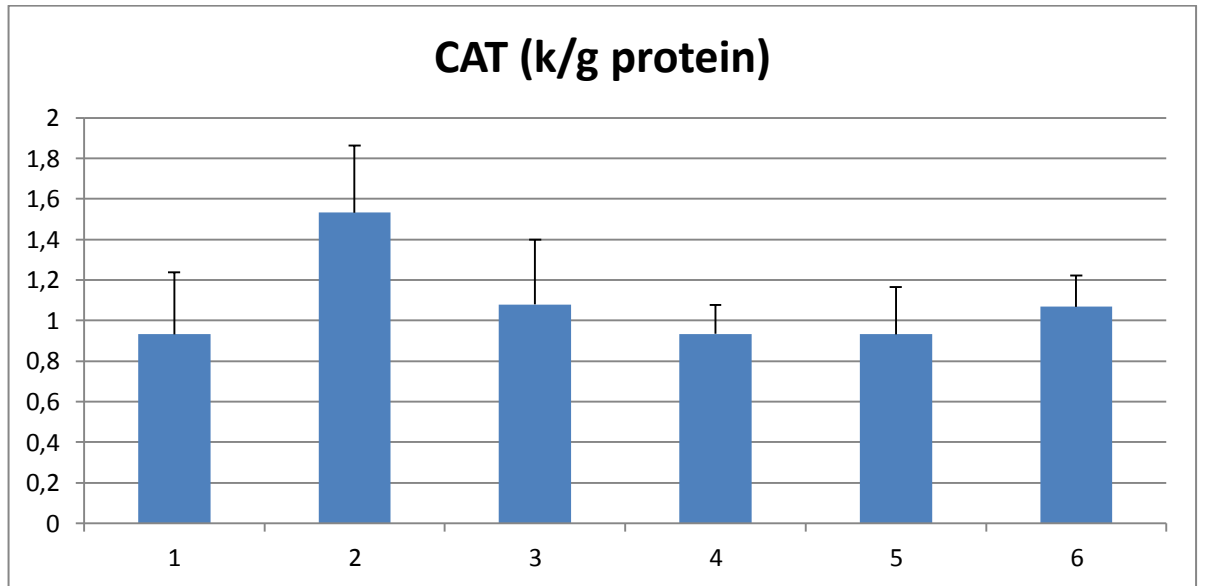
CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, MDA: Malondialdehit.

3.1.1. Katalaz

Karaciğer dokusu gruplar arası CAT aktivitesi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Fenthion verilen grubun (Grup 2) katalaz aktivitesinin, kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yükseldiği ($P_{G1-G2}=0,002$) görüldü. Fenthion öncesi melatonin uygulanan grup (Grup 3) ile Fenthion grubu karşılaştırıldığında (Grup 2), katalaz aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu saptandı ($P_{G2-G3}=0,006$).

Pinealektomi uygulanan grubun (Grup 4) katalaz aktivitesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmedi ($P_{G1-G4}=0,322$). Pinealektomi (Grup 4) ile Pinealektomi+Fenthion uygulanan grup (Grup 5) arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($P_{G4-G5}=0,670$).

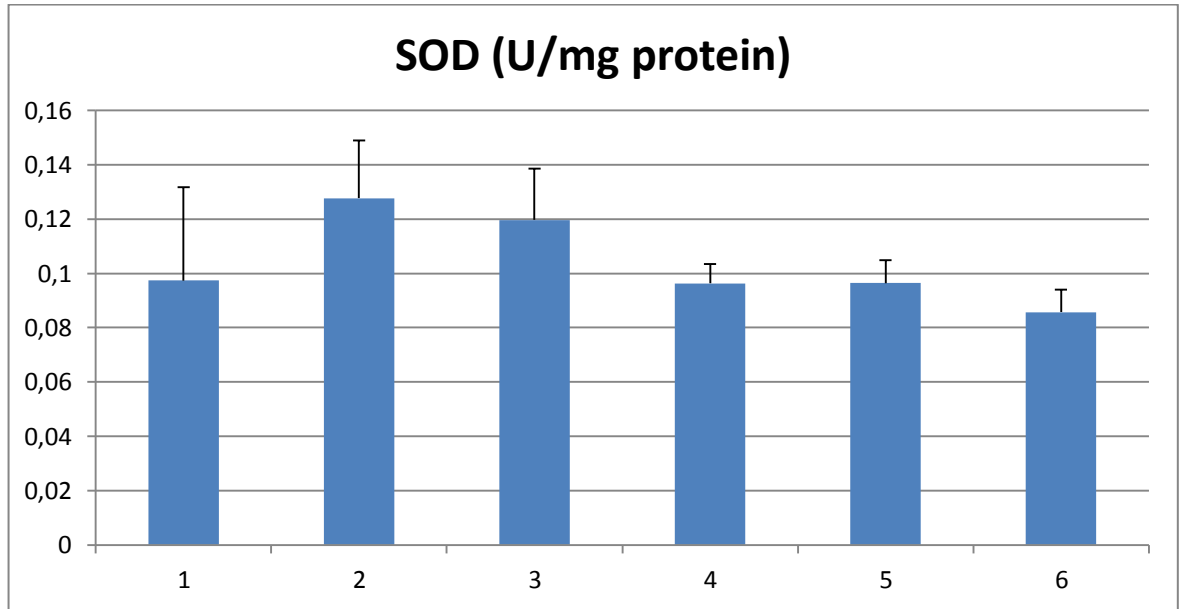
Pinealektomi+fenthion uygulanan grup (Grup 5) ile Grup 1 katalaz aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($P_{G1-G5}=0,509$). Pinealektomi+Fenthion+Melatonin grubu (Grup 6) ile Grup 1, Grup 4 ve Grup 5 katalaz aktiviteleri arasında anlamlı değişiklik görülmedi ($P_{G1-G6}=0,248$; $P_{G5-G6}=0,094$; $P_{G4-G6}=0,07$).



Şekil 3.1. Karaciğer dokusu CAT enzim aktiviteleri.

3.1.2. Süperoksit Dismutaz

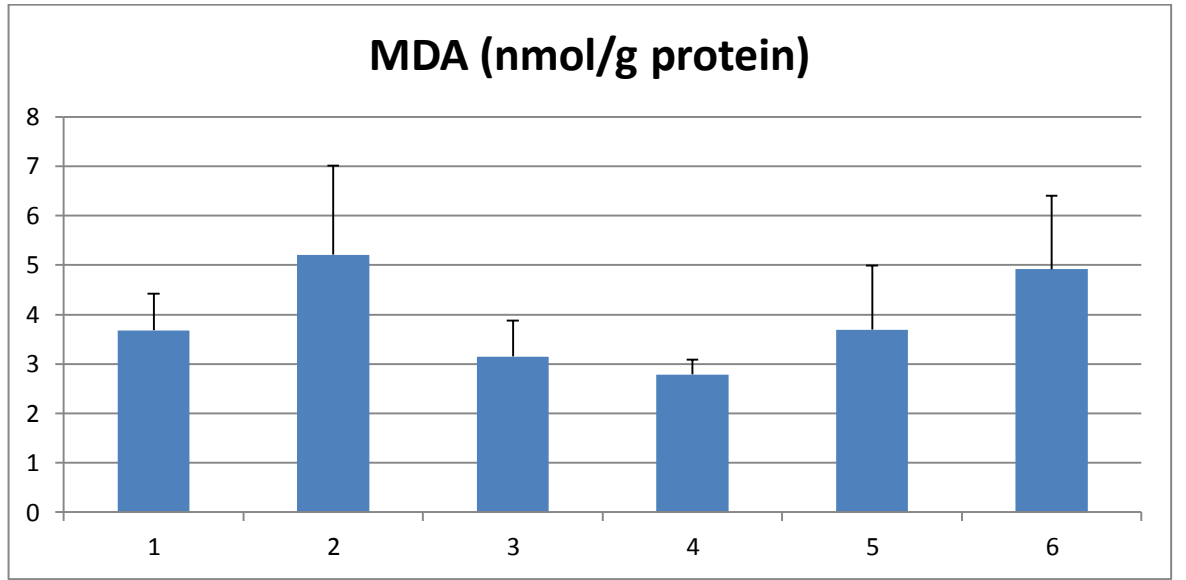
Karaciğer dokusu gruplar arası SOD enzim aktivitesi Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Grup 2 SOD enzim aktivitesinde Grup 1’e göre anlamlı olmayan bir artış saptandı ($P_{G1-G2}=0,091$). Grup 3 SOD enzim aktivitesinin Grup 2’ye göre anlamlı olmayan şekilde azaldığı görüldü ($P_{G2-G3}=0,364$). Grup 4 SOD enzim aktivitesi Grup 1’e göre ($P_{G1-G4}=0,283$); Grup 5 SOD enzim aktivitesi Grup 1 ve Grup 4’e göre anlamlı bir değişiklik göstermedi ($P_{G1-G5}=0,364$; $P_{G4-G5}=0,768$). Grup 6 SOD enzim aktivitesinde Grup 4 ve Grup 5’e göre anlamlı bir azalma görüldü ($P_{G4-G6}=0,008$; $P_{G5-G6}=0,011$).



Şekil 3.2. Karaciğer dokusu SOD enzim aktiviteleri.

3.1.3. Malondialdehit

Karaciğer dokusu gruplar arası MDA aktivitesi Şekil 3.3’de gösterilmiştir Grup 2 MDA düzeyinde Grup 1’e göre anlamlı bir artış görüldü ($P_{G1-G2}=0,032$). Grup 3 MDA düzeyi Grup 2 ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir şekilde azalma olduğu saptandı ($P_{G2-G3}=0,003$). Grup 5’in MDA düzeyinde, Grup 4’e göre anlamlı olmayan bir artış görüldü ($P_{G5-G4}=0,123$). Grup 6 MDA düzeyinde, Grup 4’e göre anlamlı bir artış saptandı ($P_{G4-G6}=0,008$).



Şekil 3.3. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.

3.2. Böbrek Dokusu Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Böbrek dokusundaki CAT ve SOD enzim aktiviteleri ve MDA miktarları Tablo 3.3'de; gruplar arasındaki böbrek CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması ise Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışma gruplarının böbrekteki CAT, SOD ve MDA değerleri.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 (n=8)	0,71±0,15	0,07±0,01	9,53±1,56
Grup 2 (n=11)	0,83±0,38	0,07±0,01	7,61±1,98
Grup 3 (n=11)	0,73±0,54	0,07±0,01	8,15±1,92
Grup 4 (n=11)	0,88±0,13	0,08±0,01	9,63±1,96
Grup 5 (n=11)	0,79±0,13	0,08±0,01	9,74±1,57
Grup 6 (n=11)	0,87±0,12	0,08±0,01	8,83±1,54

CAT: katalaz, SOD: süperoksit dismutaz, MDA: malondialdehit.

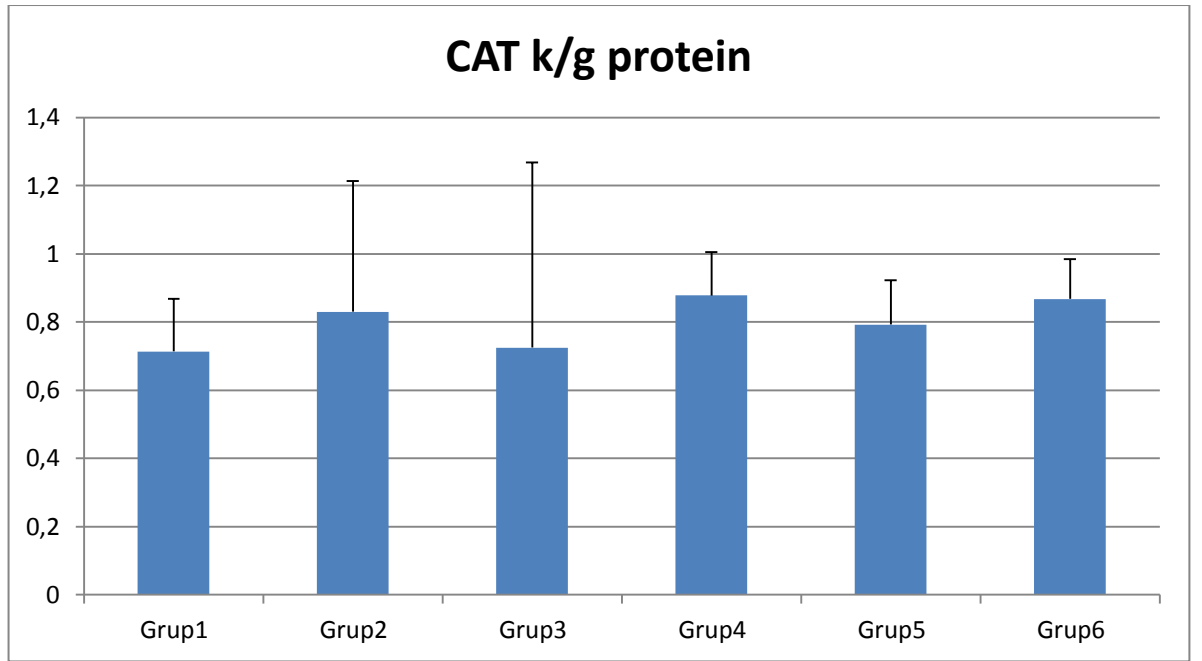
Tablo 3.4. Çalışma gruplarının böbrek CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 ve 2	0,790	0,286	0,041
Grup 1 ve 3	0,099	0,160	0,186
Grup 1 ve 4	0,032	0,283	0,563
Grup 1 ve 5	0,186	0,680	0,934
Grup 1 ve 6	0,039	1,000	0,322
Grup 2 ve 3	0,291	0,573	0,573
Grup 2 ve 4	0,231	0,024	0,029
Grup 2 ve 5	0,673	0,041	0,029
Grup 2 ve 6	0,291	0,139	0,105
Grup 3 ve 4	0,002	0,014	0,108
Grup 3 ve 5	0,008	0,045	0,045
Grup 3 ve 6	0,001	0,094	0,375
Grup 4 ve 5	0,140	0,412	0,870
Grup 4 ve 6	0,768	0,670	0,279
Grup 5 ve 6	0,224	0,670	0,224

CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, MDA: Malondialdehit.

3.2.1. Katalaz

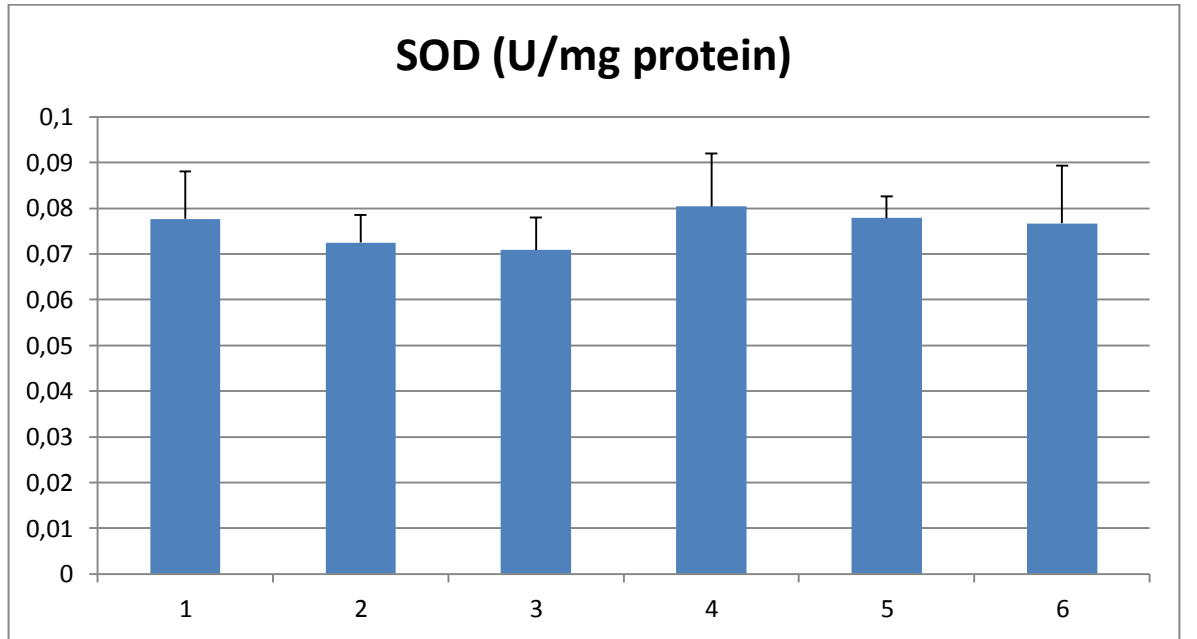
Böbrek dokusu gruplar arası CAT aktivitesi Şekil 3.4'de gösterilmiştir Grup 2 katalaz aktivitesi, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir artış ($P_{G1-G2}=0,790$); Grup 3 katalaz aktivitesi Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir düşüş saptandı ($P_{G2-G3}=0,291$). Grup 5 katalaz aktivitesinin Grup1 ve Grup4 ile arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($P_{G1-G5}=0,186$; $P_{G1-G4}=0,032$; $P_{G4-G5}=0,140$). Grup 6 katalaz aktivitesinin, Grup 4 ve Grup 5 ile arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($P_{G4-G6}=0,768$; $P_{G5-G6}=0,224$). Grup 6 katalaz aktivitesinin Grup 1'e göre ($P_{G1-G6}=0,039$); Grup 4 katalaz aktivitesinin de Grup 1'e göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü ($P_{G1-G4}=0,032$).



Şekil 3.4. Böbrek dokusu CAT enzim aktiviteleri.

3.2.2. Süperoksit Dismutaz

Böbrek dokusu gruplar arası SOD enzim aktivitesi Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Grup 2 SOD enzim aktivitesinde, Grup 1'e kıyasla göre anlamlı olmayan bir düşme saptandı ($P_{G1-G2}=0,286$). Grup 3 SOD enzim aktivitesinde, Grup 1'e göre anlamlı olmayan bir azalma olduğu ancak, Grup 2 ile arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P_{G1-G3}=0,160$; $P_{G2-G3}=0,573$). Grup 5 SOD enzim aktivitesinde, Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı bir artış olduğu görüldü ($P_{G2-G5}=0,041$; $P_{G3-G5}=0,045$).

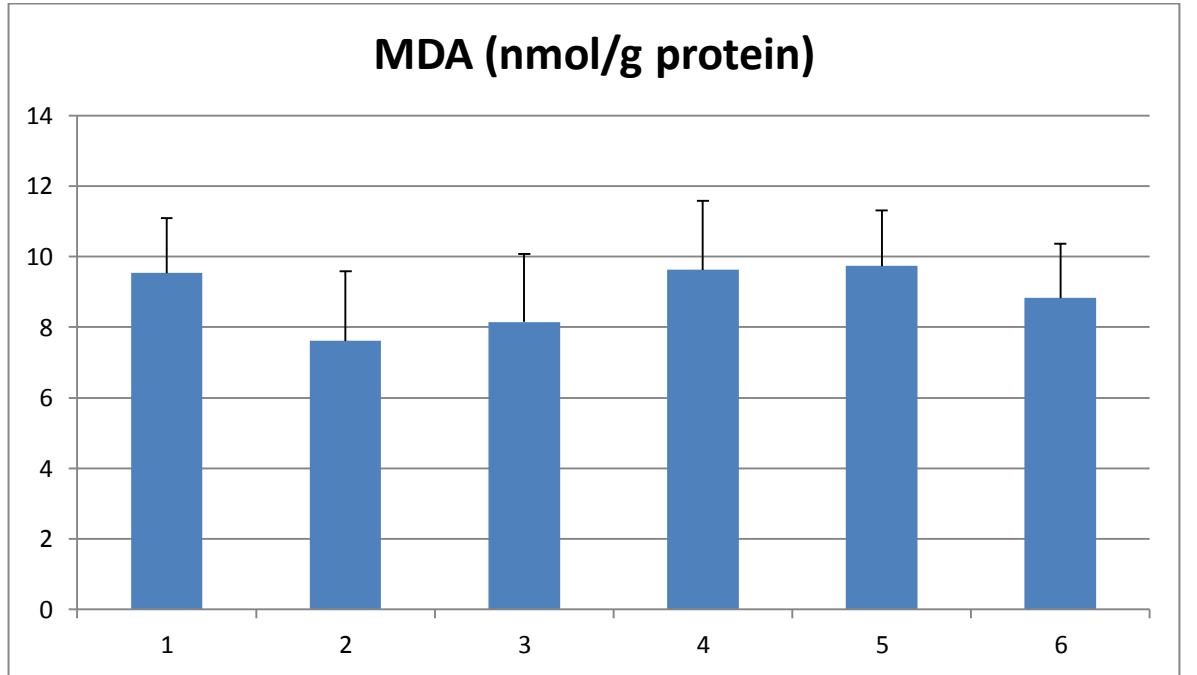


Şekil 3.5. Böbrek dokusu SOD enzim aktiviteleri.

3.2.3. Malondialdehit

Böbrek dokusu gruplar arası MDA aktivitesi Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Grup 2 MDA düzeyinin Grup 1'e göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($P_{G1-G2}=0,041$). Grup 3 MDA düzeyi, Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir şekilde azaldığı görüldü ($P_{G2-G3}=0,573$).

Grup 5 ile Grup 4 MDA düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik görülmedi ($P_{G4-G5}=0,870$). Grup 6 ile Grup 4 MDA düzeyleri arasında anlamlı olmayan şekilde azalma olduğu görüldü ($P_{G4-G6}=0,279$).



Şekil 3.6. Böbrek dokusu MDA düzeyleri.

3.3. Beyin Dokusu Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Beyin dokusundaki CAT, SOD enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri Tablo 3.5’de; gruplar arasındaki beyin CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışma gruplarının beyindeki CAT, SOD ve MDA değerleri.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 (n=8)	0,05±0,02	0,10±0,01	11,16±2,09
Grup 2 (n=11)	0,04±0,01	0,11±0,02	12,48±3,08
Grup 3 (n=11)	0,03±0,01	0,10±0,03	9,64±1,85
Grup 4 (n=11)	0,04±0,02	0,118±0,01	11,11±2,18
Grup 5 (n=11)	0,05±0,03	0,10±0,02	12,49±1,93
Grup 6 (n=11)	0,05±0,02	0,11±0,01	12,85±3,58

CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, MDA: Malondialdehit.

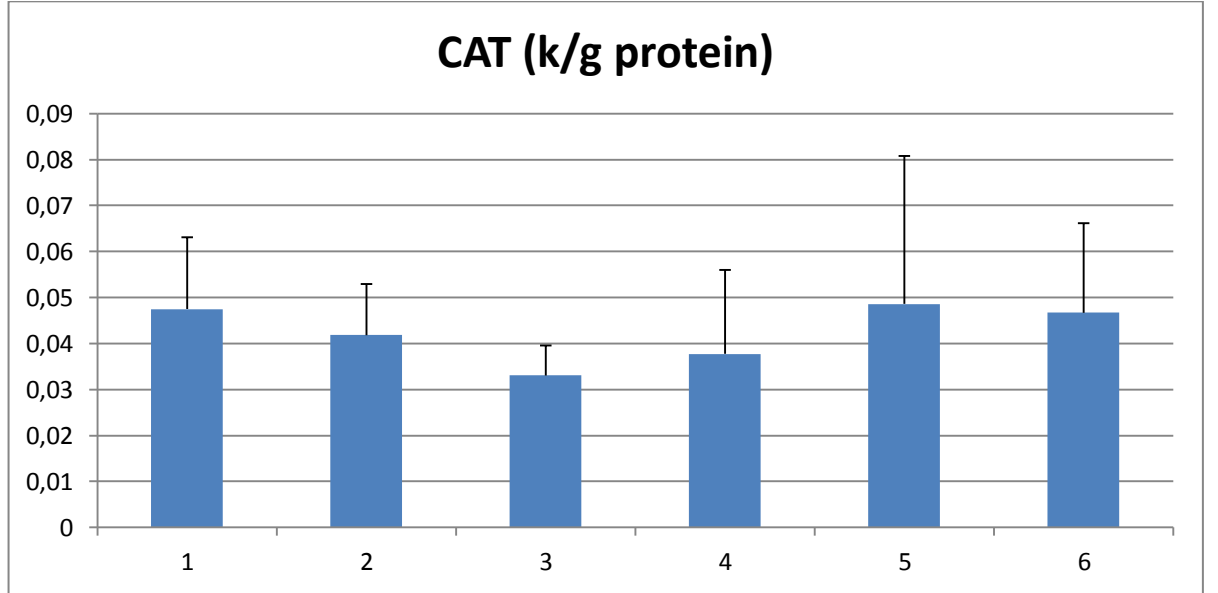
Tablo 3.6. Çalışma gruplarının beyin CAT, SOD ve MDA değerlerinin karşılaştırılması.

	CAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
Grup 1 ve 2	0,409	0,048	0,563
Grup 1 ve 3	0,026	0,804	0,117
Grup 1 ve 4	0,069	0,058	0,934
Grup 1 ve 5	0,322	0,509	0,137
Grup 1 ve 6	1,000	0,010	0,248
Grup 2 ve 3	0,045	0,030	0,009
Grup 2 ve 4	0,140	0,491	0,491
Grup 2 ve 5	0,577	0,309	0,622
Grup 2 ve 6	0,768	0,224	0,533
Grup 3 ve 4	0,670	0,033	0,094
Grup 3 ve 5	0,224	0,533	0,004
Grup 3 ve 6	0,071	0,014	0,020
Grup 4 ve 5	0,393	0,189	0,082
Grup 4 ve 6	0,200	0,131	0,178
Grup 5 ve 6	0,577	0,017	0,818

CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, MDA: Malondialdehit.

3.3.1. Katalaz

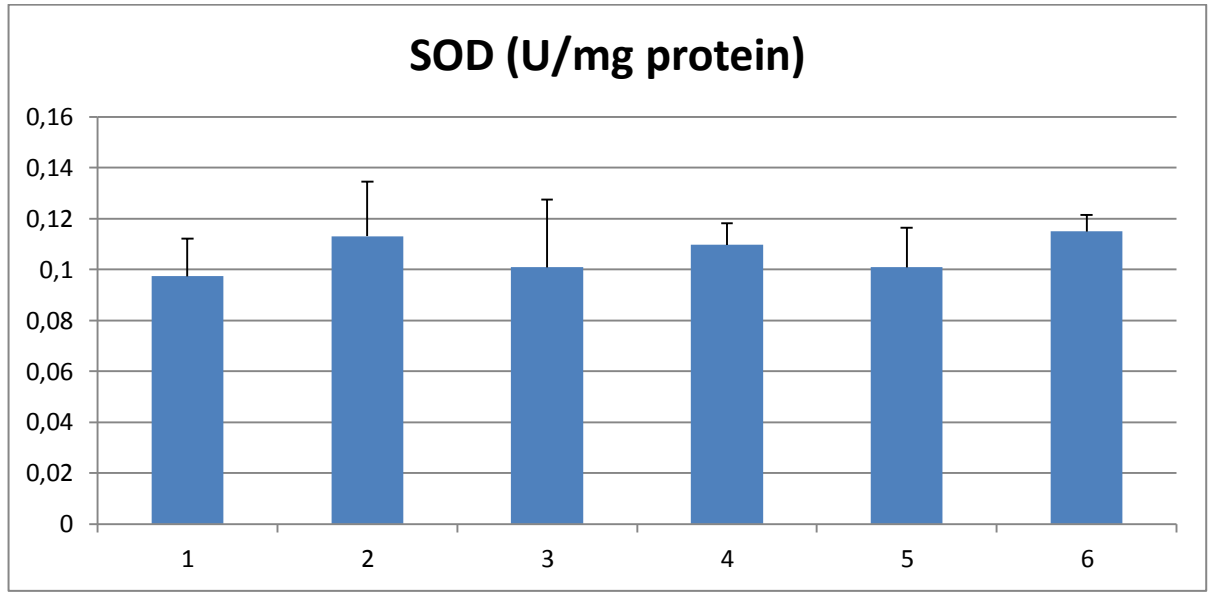
Beyin dokusu gruplar arası CAT aktivitesi Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Grup 2 katalaz aktivitesinde Grup 1’e göre anlamlı bir değişiklik görülmedi ($P_{G1-G2}=0,409$). Grup 3 katalaz aktivitesinde, Grup 1’e göre anlamlı bir azalma saptandı ($P_{G1-G3}=0,026$). Grup 5 katalaz aktivitesi ile Grup 1 ve Grup 4 arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P_{G1-G5}=0,322$; $P_{G4-G5}=0,393$). Grup 6 katalaz aktivitesi ile, Grup 1, Grup 4 ve Grup 5 arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($P_{G1-G6}=0,100$; $P_{G4-G6}=0,200$; $P_{G5-G6}=0,577$).



Şekil 3.7. Beyin dokusu CAT enzim aktiviteleri.

3.3.2. Süperoksit Dismutaz

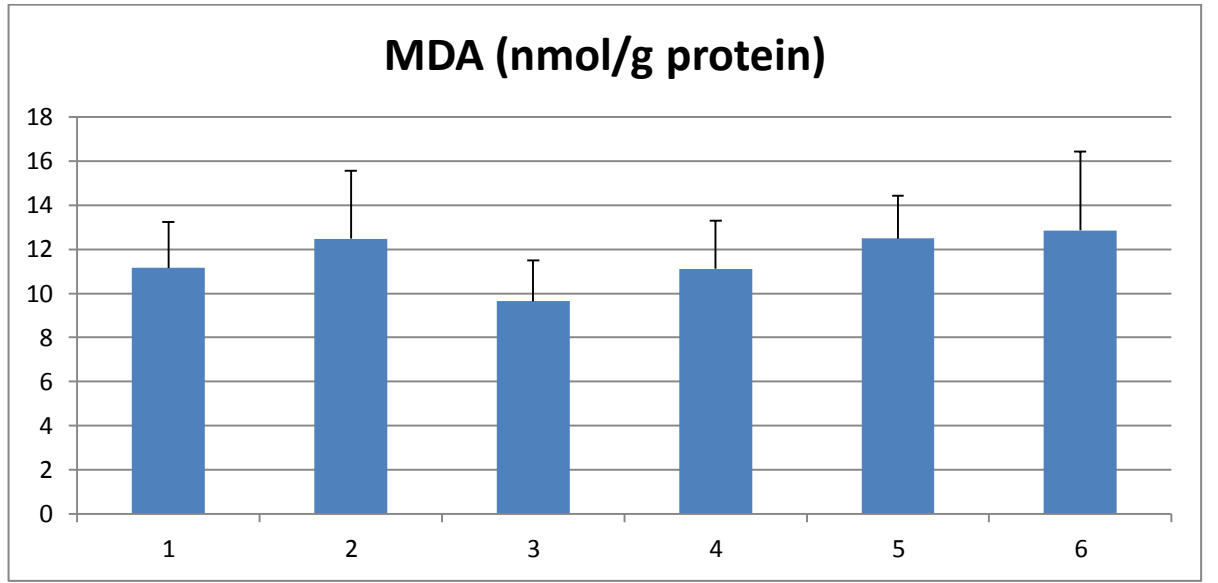
Beyin dokusu gruplar arası SOD enzim aktivitesi Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Grup 2 SOD enzim aktivitesinde, Grup 1’e göre anlamlı şekilde artış saptandı ($P_{G1-G2}=0,048$). Grup 3 SOD enzim aktivitesinin Grup 2’ye göre anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($P_{G2-G3}=0,030$). Grup 5 SOD enzim aktivitesinde, Grup 4’e göre anlamlı değişiklik görülmedi. Grup 6 SOD enzim aktivitesinde Grup 5’e göre anlamlı artış olduğu saptandı ($P_{G5-G6}=0,017$).



Şekil 3.8. Beyin dokusu SOD enzim aktiviteleri.

3.3.3. Malondialdehit

Beyin dokusu gruplar arası MDA aktivitesi Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Grup 2 MDA düzeyinde Grup 1’e göre anlamlı olmayan bir artış görüldü ($P_{G1-G2}=0,563$). Grup 3 MDA düzeyinin Grup 2’ye göre anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($P_{G2-G3}= 0,009$). Grup 5 MDA düzeyinde Grup 4’e göre anlamlı olmayan bir artış görüldü ($P_{G4-G5}=0,082$). Grup 6 MDA düzeyinin Grup 5 ile arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($P_{G5-G6} =0,818$).



Şekil 3.9. Beyin dokusu MDA düzeyleri.

4. TARTIŞMA

4.1. Katalaz

4.1.1. Karaciğer

Oksidatif stres sonucu artan serbest radikallerden H₂O₂, CAT enzimi tarafından oksijen ve suya dönüştürülmektedir (Chance ve ark., 1979; Duthie, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Fenthion uygulaması ile oksidatif stres oluşmakta ve CAT enzim aktivitesi artmaktadır (Sefi ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda karaciğer dokusunda fenthionun neden olduğu serbest oksijen radikallerindeki artış sonucunda fenthion uygulanan grubun (Grup 2) CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Buyukokuroğlu ve ark. yapmış olduğu çalışmada melatonin, antioksidan etkisi ile oksidatif stresi azaltarak CAT enzim aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Buyukokuroglu ve ark., 2008). Bu çalışmaya paralel olarak çalışmamızda fenthion öncesi melatonin uygulanan grupta (Grup 3), melatoninin serbest radikal toplayıcı etkisi sayesinde serbest oksijen radikalleri artış gösterememiş, buna paralel olarak da karaciğer dokusu CAT aktivitesinde fenthion grubuna (Grup 2) göre anlamlı bir azalış gözlenmekle beraber kontrol grubuna (Grup1) göre anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

4.1.2. Böbrek

Çalışmamızda fenthionun neden olduğu serbest oksijen radikallerindeki artış sonucunda fenthion grubu (Grup 2) böbrek dokusu CAT enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan artış gözlenmiştir. Buyukokuroğlu ve arkadaşları'nın

yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak çalışmamızda böbrek dokusunda, fenthion öncesi melatonin uygulanan grupta (Grup 3), melatoninin serbest radikal toplayıcı etkisi sayesinde serbest oksijen radikalleri artış gösterememiş, buna paralel olarak da böbrek dokusu CAT enzim aktivitesinde fenthion grubuna (Grup 2) göre anlamlı olmayan bir azalış gözlenmiş ve kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmamızda melatonin uygulamasının, fenthion uygulaması ile oluşan oksidatif strese karşı koruyucu antioksidatif etki gösterdiği düşünülebilir.

4.1.3. Beyin

Fenthion uygulaması ile beyin dokusunda CAT aktivitesini arttıracak serbest radikal miktarında yeterli artış olmadığından fenthion grubu (Grup 2) CAT enzim aktivitesinde artış görülmemiştir. Bununla birlikte, fenthion+melatonin uygulanan grubun (Grup 3) CAT enzim aktivitesindeki düşüş, melatonin uygulaması ile serbest radikal oluşumunda azalma sonucu gerçekleşmiş olabilir.

4.2. SOD

4.2.1. Karaciğer

Oksidatif strese neden olan faktörler SOD enzim aktivitesinde artışa neden olmaktadır (Güney ve ark., 2008). Sefi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak fenthion uygulaması ile oksidatif stres oluşmakta ve SOD enzim aktivitesi artmaktadır (Sefi ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda fenthion uygulanan grupta (Grup 2) SOD enzim aktivitesi anlamlı olmayan şekilde artış göstermiştir. Souzaa'nın yapmış olduğu bir araştırmada melatoninin, antioksidan etkisi ile oksidatif stresi azaltarak SOD enzim aktivitesini azalttığını gözlemlemiştir (Souzaa, 2014). Bizim çalışmamızda ise fenthion ile birlikte uygulanan melatonin (Grup 3), SOD enzim aktivitesini fenthion uygulanan gruba (Grup 2) göre anlamlı olmayan şekilde azaltmıştır.

4.2.2. Böbrek

Böbrek dokusunda fenthion uygulanan grupta (Grup 2) SOD enzim aktivitesinde anlamlı değişiklik görülmemiştir. Uygulanan 54 mg/kg fenthion dozunun böbrek dokusunda serbest radikal miktarında yeterli artışı gerçekleştirememesi sonucu SOD enzim aktivitesinde anlamlı değişiklik görülmediği düşünülebilir. Pinealektomi uygulanan gruplarda (Grup 4; 5; 6), SOD enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre (Grup 1) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Fenthion uygulamasının, pinealektomili ve pinealektomisiz grupların böbrek dokularında yeteri kadar oksidatif hasar oluşturmadığı düşünülebilir.

4.2.3. Beyin

Oksidatif strese neden olan faktörler SOD enzim aktivitesinde artışa neden olmaktadır (Güney ve ark., 2008). Sefi ve arkadaşlarının fenthion ile yapmış

oldukları çalışmada, fenthion uygulaması ile oksidatif stres oluşmakta ve SOD enzim aktivitesi artmaktadır (Sefi ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda fenthion uygulanan grupta (Grup 2) SOD enzim aktivitesi anlamlı olmayan şekilde artış göstermiştir. Souza'nın yapmış olduğu çalışmada SOD aktivitesi melatonin uygulaması ile antioksidan etki göstererek oksidatif stresi azaltarak SOD enzim aktivitesini azaltmaktadır (Souzaa, 2014). Bizim çalışmamızda fenthion ile birlikte uygulanan melatonin (Grup 3), SOD enzim aktivitesini fenthion uygulanan gruba (Grup 2) göre anlamlı şekilde azaltmıştır. Melatoninin serbest radikal toplayıcı etkisi SOD aktivitesindeki artışa engel olduğu düşünülmektedir.

Pinealektomi+fenthion grubunda (Grup 5) SOD aktivitesi, pinealektomi grubuna (Grup 4) göre anlamlı olmayan şekilde azalmıştır. Pinealektomi+fenthion+melatonin grubunda (Grup 6) SOD aktivitesi pinealektomi+fenthion grubuna (Grup 5) göre anlamlı şekilde artmıştır. Pinealektomili ratlarda fenthion uygulaması sonucu oluşan serbest radikaller SOD enziminin aşırı tüketimi sonucu aktivitesinin düşmesine neden olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte pinealektomili ratlarda fenthion ile birlikte melatonin uygulamasının serbest radikal oluşumunu azaltması sonucu SOD enziminin tüketimini engelleyerek aktivitesinin artışına neden olduğu düşünülebilir. Kuş ve ark. da pinealektomili ratlarda SOD aktivitesinin düştüğünü ve melatonin uygulamasıyla normal değere ulaştığını göstermişlerdir (Kuş ve ark; 2012).

4.3. MDA

4.3.1. Karaciğer

Oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan MDA, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir. Oksidatif strese neden olan faktörler MDA düzeyinde artışa neden olmaktadır (Kuş ve ark., 2012). Fenthion uygulaması ile oksidatif stres oluşmakta ve MDA düzeyi artmaktadır (Sefi ve ark., 2013). Çalışmamızda fenthion uygulanan grupta (Grup 2) MDA düzeyi kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı artış göstermiştir.

Melatonin, antioksidan etkisi ile oksidatif stresi azaltarak MDA düzeyini azaltmaktadır (Çöl ve ark., 2010). Çalışmamızda fenthion ile birlikte uygulanan melatoninin (Grup 3), serbest radikal oluşumunu azaltarak MDA düzeyinin fenthion uygulanan gruba (Grup 2) göre anlamlı şekilde azalmasını sağladığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda pinealektomi+fenthion uygulanan grupta (Grup 5) MDA düzeyi pinealektomi grubuna göre (Grup 4) anlamlı olmayan şekilde artış göstermiştir. Fenthion uygulaması sonucu oluşan oksidatif hasarın, MDA düzeyinin artışına neden olduğu söylenebilir. Pinealektomi+fenthion+melatonin uygulanan grupta (Grup 6) MDA düzeyi pinealektomi+fenthion grubuna (Grup 5) göre anlamlı olmayan artış göstermiştir. Pinealektomi+fenthion uygulanan ratlarda, eksojen melatoninin (Grup 6) MDA düzeyindeki artışı önlemede yetersiz kaldığı görülmektedir.

4.3.2. Böbrek

Fenthion uygulaması yaptığımız grupta (Grup 2) serbest radikal artışının MDA düzeyinde artışa neden olması beklenirdi. Fenthion uygulamasının böbrek dokusunda belirgin bir oksidatif hasar oluşturmadığı düşünülebilir.

4.3.3. Beyin

Kuş ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada oksidatif strese neden olan faktörler MDA düzeyinde artışa neden olmaktadır (Kuş ve ark., 2012). Sefi ve arkadaşlarının çalışmasında ise fenthion uygulaması ile oksidatif stres oluşmakta ve MDA düzeyi artmaktadır (Sefi ve ark., 2013). Çalışmamızda fenthion uygulanan grupta (Grup 2) MDA düzeyi kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı olmayan artış göstermiştir.

Melatonin, antioksidan etkisi ile oksidatif stresi azaltarak MDA düzeyini azaltmaktadır (Çöl ve ark., 2010). Çalışmamızda fenthion ile birlikte uygulanan melatoninin (Grup 3), serbest radikal oluşumunu azaltarak MDA düzeyinin fenthion uygulanan gruba (Grup 2) göre anlamlı şekilde azalmasını sağladığı görülmektedir. Pinealektomi+fenthion uygulanan grupta (Grup 5) MDA düzeyi pinealektomi grubuna göre (Grup 4) anlamlı olmayan şekilde artış göstermiştir. Pinealektomi+fenthion+melatonin uygulanan grupta (Grup 6) MDA düzeyi pinealektomi+fenthion grubuna (Grup 5) göre anlamlı olmayan artış göstermiştir. Pinealektomili ratlarda uygulanan eksojen melatoninin (Grup 6) MDA düzeyindeki artışı önlemede yetersiz kaldığı görülmektedir.

Akut fenthion toksisitesinin karaciğer ve böbrek üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, 50 mg/kg fenthion uygulamasının ratlarda belirgin toksik etki göstermediği, ancak 75 ve 100 mg/kg fenthion uygulanan grupta belirgin karaciğer ve böbrek toksisitesi olduğu gözlenmiştir (Kerem ve ark; 2007). Çalışmamızda da 54 mg/kg uygulanan fenthion, böbrek dokusunda belirgin hasar oluşturmadığı için CAT ve SOD enzim aktivitelerinde değişiklikler ve MDA düzeylerinde artış gözlenmemiştir.

Pinealektomi yapılan gruplarda uygulanan melatonin, yeterli antioksidan etkiyi gösterememiştir. Pinealektomili gruplara melatonin uygulaması diğer gruplara

benzer şekilde fenthion uygulamasından iki gün önce başlanmış ve pinealektomisiz gruplarla aynı dozda 10 mg/kg olarak uygulanmıştır. Pinealektomi yapılmış ratlar üzerindeki çalışmalarda melatonin bir hafta süreyle 20 mg/kg olarak uygulanmaktadır (Çöl ve ark; 2010). Çalışmamızda pinealektomili gruplarda gerek melatonin uygulama süresi, gerekse uygulama dozunun pinealektomisiz gruplarla aynı olması, melatonin dozu ve süresinin yetersiz kaldığını ve böylece yeterli antioksidan etkinin sağlanamadığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda tarım alanında kullanılan bir organofosfat insektisit olan fenthion uygulaması sonucu dokularda oluşan antioksidan enzim aktivite değişiklikleri ve lipid peroksidasyon ürünü olana MDA düzeyleri değerlendirilerek oksidatif hasar gösterilmeye çalışıldı. Fenthion uygulaması ile ratlarda karaciğer ve beyin dokusunda belirgin; böbrek dokusunda ise hafif derecede olmak üzere oksidatif hasar olduğu, buna bağlı olarak da, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde değişiklikler ve MDA düzeylerinde artış olduğu görüldü. Endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece yarısında verilen eksojen melatoninin, dokularda oluşan oksidatif hasarı büyük ölçüde önlediği; ancak pinealektomili ratlara uygulanan eksojen melatoninin yeterli antioksidatif etkiyi gösteremediği görüldü.

Fenthion maruziyetinin oluşturduğu oksidatif hasarı önlemek amacıyla, fenthion ile karşılaşma öncesi oksidatif hasarı koruyucu etkisi olan eksojen melatoninin verilmesi, doku hasarını engelleyici etki gösterebilir. Eksojen melatonin uygulaması, özellikle endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece geç saatlerde yapılırsa, antioksidatif koruyucu etki daha da güçlenecektir. Ayrıca, muhtemel fenthion maruziyeti, endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece geç saatlerde gerçekleşirse, endojen melatoninin koruyucu etkisinden de yararlanılabilecektir.

Dokularda oluşan oksidatif hasar, histopatolojik, immünohistokimyasal ve moleküler düzeyde değişikliklerle birlikte görülebilmektedir. İleriki çalışmalarda bu açılardan da değerlendirmeler yapılarak, doku hasarı ve diğer değişiklikler daha net biçimde ortaya konulabilir.

ÖZET

Endojen Melatoninin ve Pinealektomili Ratlarda Eksojen Melatoninin Organofosfat İnsektisit Fenthion İle Oluşturulan Toksikite Üzerine Koruyucu Etkisi

Bir organofosfat insektisit olan fenthion, uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, bu insektisit zararlı etkileri ve bu etkilerden korunmayı amaçlayan çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmanın amacı, akut fenthion maruziyetine bağlı oluşan toksisite üzerine endojen ve eksojen melatoninin koruyucu etkisini süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve malondialdehit (MDA) parametreleri ile değerlendirmektir.

Wistar-albino cinsi 63 adet erkek rat, kontrol grubu 8, diğer gruplar 11'er adet olmak üzere altı gruba ayrıldı: kontrol (G1), fenthion (G2), fenthion + melatonin (G3), pinealektomi (G4), pinealektomi+fenthion (G5), pinealektomi+fenthion+melatonin (G6). Endojen melatoninin etkisini görebilmek için fenthion oral yoldan tek doz 54 mg/kg olarak gece verildi. Melatonin ise iki gün süreyle günde tek doz 10 mg/kg intraperitoneal olarak gündüz uygulandı. Fenthion uygulamasından 24 saat sonra ratlar sakrifiye edildi. Karaciğer, böbrek ve beyin doku örneklerinde SOD, CAT enzim aktiviteleri ile MDA seviyeleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi. İstatistiksel olarak iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Karaciğer dokusunda fenthion uygulaması ile G2 CAT ve MDA değerlerinde anlamlı artış gözlenirken, SOD enzim aktivitesinde anlamlı fark saptanmadı (CAT; $P_{G1-G2}=0,002$; $P_{G2-G3}=0,006$) (MDA; $P_{G1-G2}=0,032$; $P_{G2-G3}=0,003$). Karaciğer G6 SOD enzim aktivitesinde, G4 ve G5'e göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi ($P_{G4-G6}=0,008$; $P_{G5-G6}=0,011$). Böbrek G1,2,3 grupları arasında CAT ve SOD aktivitelerinde anlamlı fark gözlenmedi. Pinealektomili grupların (G4,5,6) CAT ve SOD aktivitelerinin diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (CAT; $P_{G1-G4}=0,032$, $P_{G1-G6}=0,039$) (SOD; $P_{G2-G5}=0,041$, $P_{G3-G5}=0,045$). Beyin dokusunda fenthion uygulaması ile (G2) SOD aktivitesinde anlamlı artış görülürken, melatonin uygulaması ile (G3) normale döndüğü gözlemlendi (CAT; $P_{G2-G3}=0,026$, SOD; $P_{G1-G2}=0,048$, $P_{G2-G3}=0,030$, MDA; $P_{G2-G3}=0,009$).

Fenthion uygulaması ile ratlarda karaciğer ve beyin dokusunda belirgin; böbrek dokusunda ise hafif derecede olmak üzere oksidatif hasar oluştuğu, buna bağlı olarak da, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde değişiklikler ve MDA düzeylerinde artış olduğu görüldü. Endojen melatonin salgısının yüksek olduğu gece yarısında verilen eksojen melatoninin, dokularda oluşan oksidatif hasarı büyük ölçüde önlediği; ancak pinealektomili ratlara uygulanan eksojen melatoninin yeterli antioksidatif etkiyi gösteremediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: fenthion, melatonin, pinealektomi, süperoksit dismutaz, katalaz.

SUMMARY

Protective Effect of Endogenous Melatonin and Exogenous Melatonin in Pinealectomized Rats on Toxicity Induced with Organophosphate Insecticide

Fenthion is an organophosphate insecticide which has been used for many years. Yet studies on the harmful effects of fenthion and their prevention are still being conducted. The aim of this study is to evaluate toxicity induced through acute fenthion exposure and the protective quality of exogenous and endogenous melatonin. This will be tested using following parameters; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA).

63 male rats from genus of wistar-albino were separated into 6 groups where control group had 8 rats while other groups were given 11 rats each: control (G1), fenthion (G2), fenthion + melatonin (G3), pinealectomy (G4), pinealectomy+fenthion (G5), pinealectomy+fenthion+melatonin (G6). In order to observe the effects of endogenous melatonin, fenthion was administered orally one day before with a dosage of 54mg/kg. Melatonin was administered for two days intraperitoneally during daytime in a single dose of 10 mg/kg. 24 hours following the application of fenthion, rats were sacrificed. Liver, kidney and brain tissue samples' SOD, CAT and enzyme activities and MDA levels were determined with spectrophotometric method. Statistical comparison of two independent groups were done with Mann-Whitney U test and whenever more than two independent groups were compared, Kruskal- Wallis H test was used. Meaningfulness level was determined to be $p < 0.05$.

Upon administration of fenthion on liver tissue, a significant increase in G2 CAT and MDA values was detected while no significant difference was observed in SOD enzyme values. (CAT; $P_{G1-G2}=0,002$; $P_{G2-G3}=0,006$) (MDA; $P_{G1-G2}=0,032$; $P_{G2-G3}=0,003$). G6 Liver SOD enzyme activity recorded a significant decrease compared to G4 and G5. ($P_{G4-G6}=0,008$; $P_{G5-G6}=0,011$). G1-G2-G3 kidney groups showed no significant difference in their CAT and SOD activities. Pinealectomized groups' CAT and SOD values had a significant increase compared to other groups. (CAT; $P_{G1-G4}=0,032$, $P_{G1-G6}=0,039$) (SOD; $P_{G2-G5}=0,041$, $P_{G3-G5}=0,045$). Fenthion application on brain tissue resulted in a significant increase in (G2)'s SOD activity while application of melatonin in (G3) caused it to move to normal levels. (CAT; $P_{G2-G3}=0,026$, SOD; $P_{G1-G2}=0,048$, $P_{G2-G3}=0,030$, MDA; $P_{G2-G3}=0,009$).

Administration of fenthion to rats caused an apparent oxidative damage in liver and brain tissues while the oxidative damage was mild in the kidney and therefore we have observed changes in SOD and CAT enzyme activities and an increase in the MDA levels. Exogenous melatonin which was given at midnight when the endogenous melatonin secretion was high, greatly prevented oxidative damage in tissues however it was observed that pinealectomized rats did not see enough anti oxidative effect of exogenous melatonin.

Key words: fenthion, melatonin, pinealectomy, superoxide dismutase, catalase.

KAYNAKLAR

- ABDOLLAHI, M., JALALI, N., SABZEVARI, O., HOSEINI, R., GHANEA, T. (1997). A retrospective study of poisoning in Tehran. *J Toxicol Clin Toxicol*, **35**: 387-393.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., ESCAMES, G., VENEGAS, C., DÍAZ-CASADO, M.E., LIMA-CABELLO, E., LÓPEZ, L.C., ROSALES-CORRAL, S., TAN, D.X., REITER, R.J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*, **71**: 2997-3025.
- AEBI, H. (1974). Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed: BERGMAYER, U. Academic Press, New York and London. 673-677 pp.
- AGAR, N.S., SADRZADEH, S.M., HALLAWAY, P.E., EATON, J.W. (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*, **77**: 319-321.
- AKKUŞ, İ. (1995). Serbest oksijen radikalleri ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya.
- AKKUŞ, İ. (1997). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. Öz Eğitim Bas Yay Dağ., Konya. sy. 314-315.
- ARENDR, J. (1988). Melatonin. *Clin Endocrinol*, **29**: 205-229.
- ARENDR, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod*, **3**: 13-22.
- ARINCI, K., ELHAN, A. (1995). Anatomi. Cilt. 2. Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara.
- ARINCI, K., ELHAN, A. (2006). Corpus pineale. Anatomi. Güneş Kitabevi Ltd.Şti. 4.Baskı ANKARA, **2**: sy.289.
- AYDINOGLU, H., DURSUN, H.Y., BAYRAKTAR, L. (2002). Bitki koruma ürünleri. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara. sy. 336.
- BALTACI, A. K. (2001). Melatonin, immun sistem ve çinko. *SÜ Tıp Fak Derg*, **17**: 267-272.
- BALTACI, A. K., MOGULKOC, R., BEDİZ, C. S., PEKEL, A. (2005). Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Biological trace element research*, **104**: 47-56.
- BAGCHI, D., BAGCHI, M., HASSOUN, E.A., STOHS, S.J. (1995). In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species. DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, **104**: 129-140.

- BEJMA, J., JI, L. (1999). Aging and Acute Exercise Enhance Free Radical Generation in Rat Skeletal Muscles. *J. Appl Physiol*, **87**: 465-470.
- BİRDSALL, T.C. (1996). The biological effects and clinical uses of the pineal hormone melatonin. *Alternative Medicine Review*, **2**: 94-102.
- BOUCHARD, M.F., BELLINGER, D.C., WRIGHT, R.O., WEISSKOPF, M.G. (2010). Attention deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics*, **125**: 1270-1277.
- BRONSTEIN, A.C., SPYKER, D.A., CANTILENA, L.R., J.R., GREEN, J.L., RUMACK, B.H., GIFFIN, S.L. (2010). 2009 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 27th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)*, **48**: 979-1178.
- BUETTNER, G.R. (1998). Antioxidant enzymes and functions. Sunrise free radical school, Society for Free Radical Biology and Medicine.
- BULKLEY, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, **94**: 407-411.
- BUYUKOKUROGLU, M.E., CEMEK, M., YURUMUZ, Y., YAVUZ, Y., ASLAN, A. (2008). Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol Toxicol*, **24**: 151-158.
- BÜLBÜLLER, N., DOĞRU, O., UMAÇ, H., GÜRSU, F., AKPOLAT, N. (2005). The effects of melatonin and pentoxifylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, **11**: 108-114.
- CAGNACCI, A. (1996). Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res*, **21**: 200-213.
- CALVERT, G.M., PLATE, D.K., DAS, R. (2004). Acute occupational pesticide-related illness in the US, 1998-1999: surveillance findings from the SENSOR-pesticides program. *Am J Ind Med*, **45**: 14-23.
- CANKURTARAN, M. (2005). Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. 7. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitapçığı. sy. 1-5.
- CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**: 527-605.
- CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, **49**: 481-493.
- CHERUBINI, A., RUGGIERO, C., POLIDORI, M.C., MECOCCHI, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic BiolMed*, **39**: 841-852.
- CLAUSTRAT, B., BRUN, J., CHAZOT, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, **9**: 11-24.

- COSTA, L.G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*, **366**: 1-13.
- ÇAM, A., ERDOĞAN, M.F. (2003). Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **56**: 103-112.
- ÇELİKER, A., ÖZKAYA, G., NEMUTLU, N., HINCAL, F. (2003). A ten year analysis of pesticide poisoning cases of hacettepe drug and poison information center. *5th International Congress of Turkish Society of Toxicology*, Antalya- Turkey.
- ÇÖL, C., DİNLER, K., HASDEMİR, O., BÜYÜKAŞIK O., BUĞDAYCI, G. (2010). Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **9**: 78-82.
- DEISSEROTH, A., DOUNCE, A.L. (1969). The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase. *Arch Biochem Biophys*, **131**: 18-29.
- DURAK, I., YURTARSLANI, Z., CANBOLAT, O., AKYOL, O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*, **214**: 103-104.
- DUTHIE, G.G., WAHLE, K.W.J., JAMES, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr Res Rev*, **2**: 51-62.
- ECOBICHON, D.J. (1991). Toxic effects of pesticides. In: *The basic science of Poisons Casarett and Doull's toxicology*. Ed: AMDUR, M.O., DOULL, J., KLAASSEN, C.D. , 4th Ed. Pergamon Press, New York, NY, USA. 565-622 pp.
- EPA. (2001). (11 March 2015). Fenthion Facts. United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C). EPA 738-F-00-011.
- EPA (2002). (11 March 2015). FY 2002 Annual Report. Washington, DC: US Environmental Protection Agency. [<http://www.epa.gov/oppfead1/annual/2002/2002annualreport.pdf>].
- EPA. (2003). (18 March 2015). Fenthion; Notice of receipt of request to voluntarily cancel certain pesticide registrations. Environmental Protection Agency, OPP-2003-0122;FRL-7304-6, 68, 104, 32495-32497.
- EPA. (2013). (11 March 2015). Pyrethroids and Pyrethrins. [http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4.pdf]
- ERLICH, S.S., APUZZO, M.L.J. (1985). The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. *J Neurosurg*, **63**: 321-341.
- EXTOXNET. (1993). (20 March 2015). [<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/fenthion-ext.html>].
- EYER, P., SZINICZ, L., THIERMANN, H., WOREK, F., ZILKER, T. (2007). Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. *Toxicology*, **233**: 108–119.

- FRANCIS, J.I., BARNES, J.M. (1963). Studies on the mammalian toxicity of fenthion. *Bull World Health Organ*, **29**: 205-212.
- FREEMAN, B. A., CRAPO, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **47**: 412.
- FRIDOWICH, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**: 875-877.
- GOLDFRANK, L.R., FLOMENBAUM, N.E., LEWIN, N.A., HOWLAND, M.A., HOFFMAN, R.S., NELSON, L.S. (2006). Pesticides: an overview with a focus on principles and rodenticides. In: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 8th Ed. McGraw-Hill co, Newyork. 1469-1477 pp.
- GRAY, H. (1995). Gray's Anatomy. 38th Ed., Churchill Livingstone, London.
- GÜLER, Ç., ÇOBANOĞLU, Z. (1997). Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. 1^{nci} Baskı. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara. sy. 37-38.
- GÜNEY, M., ORAL, B., KARAHAN, N., MUNGAN, T. (2008). Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. *Fertil Steril*, **89**: 934-942.
- HALLIWELL, B. (1974). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto*, **73**: 1075-1086.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **344**: 721-724.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. (1997). Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem*, **69**: 1330-1331.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Ed. Clarendon Press, UK.
- HOTCHKISS, A.K., NELSON, R.J. (2002). Melatonin and immune function: Hype or Hypothesis? *Clinical Reviews in Immunology*, **22**: 351-371.
- IANĂȘ, O., OLINESCU, R., BĂDESCU, I. (1991). Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie*, **29**: 147-153.
- JEYARATNAM, J. (1985). Health problems of pesticide usage in the Third World. *Br J Ind Med*, **42**: 505-506.
- JEYARATNAM, J., De ALWIS SENEVIRATNE, R.S., COPPLESTONE, J.F. (1982). Survey of pesticide poisoning in Sri Lanka. *Bull World Health Organ*, **60**: 615-619.
- KAMANYIRE, R., KARALLIEDDE, L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup Med (Lond)*, **54**: 69-75.
- KAPPERS, J.A. (1976). The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir*, **34**: 109- 149.

- KARABULUT, B., KABAKÇI, T. (1995). Serbes Radikaller. *Akademi*, **1**: 28-35.
- KATZ, K.D., BROOKS, D.E. (15 March 2015). Toxicity Organophosphate. [<http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview>]
- KEHRER, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, **23**: 21-48.
- KELEŞTİMUR, H. (1996). İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **10**: 141-147.
- KERMAN, M., CİRAK, B., ÖZGÜNER, M.F., DAĞTEKİN, A. (2005). Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp Brain Res*, **163**: 406-410.
- KEREM, M., BEDİRLİ, N., GÜRBÜZ, N., EKİNCİ, Ö., BEDİRLİ, A., AKKAYA, T., ŞAKRAK, Ö., PAŞAOĞLU, H. (2007). Effects of acute fenthion toxicity on liver and kidney function and histology in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **37**: 281.
- KIERSZENBAUM, A. L. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi. Ed. DEMİR, R. Palme yayıncılık. Ankara. Sy. 493-497.
- KOCH, O.R., PANI, G., BORRELLO, S., COLAVITTI, R., CRAVERO, A., FARRE, S., GALEOTTI, T. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med*, **25**: 191-198.
- KONTUREK, S.J., KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKA, I. (2007). Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*, **58**: 381-405.
- KUSZAK, J., ODIN, M. (1977). A new technique of pinealectomy for adult rats. *Experientia*, **33**: 283-284.
- KUŞ, İ., SARSILMAZ, M. (2002). Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **22**: 221-226.
- KWONG, T.C. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Moni*, **24**: 144-149.
- LEJA-SZPAK, A., JAWOREK, J., TOMASZEWSKA, R., NAWROT, K., BONIOR, J., KOT, M. (2004). Melatonin precursor; L-tryptophan protects the pancreas from development of acute pancreatitis through the central site of action. *J Physiol Pharmacol*, **55**: 239-254.
- LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*, **235**: 1992-1997.
- LJUBUNCIC, P., TANNE, Z., BOMZON, A. (2000). Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut*, **47**: 710-716.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.

- MALONE, W.F. (1991). Studies evaluating antioxidants and beta carotene as chemopreventives. *Am J Clin Nutr*, **53**: 305-313.
- McEVEN, F.L., STEPHENSON, G.L. (1979). The use and significance of pesticides in the environment. John Wiley & Sons Pub., New York. 538 pp.
- MEMİŞOĞULLARI, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidan etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, **3**: 30-39.
- MILLS, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, **229**: 189-197.
- MOLLAOĞLU, H., ÖZGÜNER, M.F. (2005). Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **12**: 52-56.
- NAGAMI, H., NISHIGAKI, Y., MATSUSHIMA, S., MATSUSHITA, T., ASANUMA, S., YAJIMA, N., USUDA, M., HIROSAWA, M. (2005). Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998-2002. *Int J Occup Environ Health*, **11**: 180-184.
- NORDBERG, J., ARNER, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, **31**: 1287-1312.
- OBARE, S.O., DE, C., GUO, W., HAYWOOD, T.L., SAMUELS, T.A., ADAMS, C.P., MASİKA, N.O., MURRAY, D.H., JAFFREZİC-RENAULT, N. (2010). *Sensors*, **1**: 60-74.
- OLMEZ, E., ŞAHNA, E., AGKADİR, M., ACET, A. (2000). Melatonin: Emeklilik yaşı 80 olur mu? *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **7**: 177-187.
- OZTEKİN, E., MOGULKOC, R., BALTACI, A.K., TİFTİK, A.M. (2006). The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-alpha levels in ovariectomized and pinealectomized rats. *Acta Biol Hung*, **57**: 275-81.
- OZTURK, A., BALTACI, A.K., BEDİZ, C.S., MOGULKOC, R., GUNGOR, S. (2003). Effects of Zinc and Melatonin on Testicular Tissue of Rats. *Biol Trace Elem Res*, **96**: 255-262.
- PALAOĞLU, O.S., BEŞKONAKLI, E. (1998). Pineal gland and aging. *Turkish Journal of Geriatrics*, **1**: 13-18.
- PATRICKSON, J.W., SMITH, T.E. (1987). Innervation of the pineal gland in the rat: an HRP study. *Exp Neurol*, **95**: 207-215.
- PENˆA-LLOPÍS, S. (2005). Antioxidants as potentially safe antidotes for organophosphorus poisoning. *Curr. Enzyme Inhib*, **1**: 147-156.
- PERCIVAL, M. (1998). Anti-oxidants. *Clin Nutr Insight*, **31**: 1-4.
- REITER, R.J. (1981). The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat*, **162**: 287-313.
- REITER, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol Rev*, **12**: 151-180.

- REITER, R.J. (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered freeradicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res*, **26**: 1141-1155.
- REITER, R.J. (2003). Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **17**: 273-285.
- REITER, R. J., TAN, D.X., FUENTES-BROTO, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule, *Progress in Brain Research*, **181**: 125–151.
- ROBEY, W.C., MEGGS, W.J. (2004). Insecticides, Herbicides and Rodenticides. In: *Emergency Medicine: a Comprehensive Study Guide*. Ed: Tintinalli, J.E., Kelen, G.D., Stapczynski, J.S. 6th Ed. McGraw-Hill Co, New York. 1134–1143 pp.
- Rohr, U. D., Herold, J. (2002). Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*, **41**: 85-104.
- SATALOĞLU, N., AYDIN, B., TURLA, A. (2007). Pestisit zehirlenmeleri. *Kor Hek*, **6**: 169-174.
- SEFİ, M., TROUDİ, A., HAMİDA, F.B., SOUDANİ, N., BOUDAWARA, T., ZEGHAL, N. (2013). Protective effects of *Artemisia campestris* upon fenthion-induced nephrotoxicity in adult rats and their progeny. *Gen. Physiol. Biophys*, **32**: 577–588.
- SEN, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sport Exerc*, **33**: 368-370.
- SOUZAA, L. C., WILHELMEC, E. A., BORTOLATTO, C. F., NOGUEİRAC, C. W., BOEİRA, S. P., JESSEA, C. R. (2014). The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. *Behavioural Brain Research*, **271**: 316–324.
- SUN, Y., OBERLEY, L.W., YING, L. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, **34**: 497-500.
- TAN, D., MANCHESTER, L.C., REITER, R.J. (1999). High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci*, **65**: 2523-2529.
- TAYSI, S., GUL, M., SARI, R.A., AKCAY, F., BAKAN, N. (2002). Serum oxidant/antioxidant status in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*, **40**: 684-688.
- TAYSI, S., POLAT, F., GUL, M., SARI, R.A., BAKAN, E. (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, **21**: 200-204.
- TOUITOU, Yvan. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental gerontology*, **36**: 1083-1100.
- TURGUT, M., BAKA, M., YURTSEVEN, M. (2002). Pineal gland'dan salgılanan bir nörohormon olan melatoninin etkileri. *Arşiv*, **11**: 453-470.
- Ulusal Zehir Danışma Merkezi 2008 yılı çalışma raporu özeti. (2009). *Türk Hij Den Biyol Derg*, **66** (3) Ek 3.

- ULUSOY, E. (2010). Anzer balı poleninın yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fenolik bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan özellikleri. Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Van Der HOEK, W., KONRADSEN, F. (2005). Risk factors for acute pesticide poisoning in Sri Lanka. *Trop Med Int Health*, **10**: 589-596.
- WASOWICZ, W., NEVE, S., PERETZ, A. (1993). Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*, **39**: 2522-2526.
- WATSON, W.A., LITOVITZ, T.L., KLEIN-SCHWARTZ, W. (2004). 2003 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med*, **22**: 335-404.
- WEBB, S.M., DOMİNGO, M.P. (1995). Role of melatonin in health and disease. *Clin Endocrinol*, **42**: 221-234.
- WEXLER, P. (2005). Encyclopedia of Toxicology. 2nd Ed. Vol:2. Academic Press, 325- 328 pp.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1986). Informal consultation on planning strategy for the prevention of pesticide poisoning, WHO, Geneva, WHO/VBC/86.926.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1989). Public health impact of pesticides used in agriculture, Report of WHO/UNEP working group, WHO, Geneva.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1990). Public health impact of pesticides used in agriculture, WHO, Geneva.
- YALÇIN, A.S. (1992). Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, **4**: 40-43.
- YOUNG, I. S., WOODSIDE, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, **54**: 176-186.
- YOUNG, I.S., WOODSIDE, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54**: 176-186.
- ZAOBORNÝJ, T., VALDEZ, L.B., La PADULA, P., COSTA, L.E., BOVERIS, A. (2005). Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol (1985)*, **98**: 2370-2375.
- ZHANG, J.L., QİAO, C.L., LAN, W.S. (2004). Detoxification of organophosphorus compounds by recombinant carboxylesterase from an insecticide-resistant mosquito and oxime-induced amplification of enzyme activity. *Inc. Environ. Toxic.* **19**: 154-159.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma Karakuş

Doğum Yeri ve Tarihi: Tavas / 08.11.1987

Yabancı Dil: ÜDS Puanı: 83

Öğrenim Durumu:

1993-1998: Şehit Öğretmen Ayşe Konakçı İlk Öğretim Okulu (İlk ve Orta Öğretim) /
Denizli

2001-2004: Tavas Lisesi / Denizli

2005-2006: Bakü Devlet Üniversitesi (Rusça Hazırlık)/ Azerbaycan

2006-2010: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/
Afyonkarahisar

Katıldığı Bilimsel Kurs ve Eğitimler:

1. "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 2-20 Haziran 2014, Denizli
2. "Pinealektomi Sertifikası" Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (SDU-HADYEK), 10-11 Aralık 2014, Isparta

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği