

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK ORGANOFOSFAT İNTOKSİKASYONU OLUŞTURULAN
RATLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN ARKA KÖK GANGLİYON
HÜCRELERİNDE KALSİYUM SİNYALİ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Serdar Bulut

**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Tülay TUNÇER PEKER**

ISPARTA – 2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay TUNÇER PEKER'e;

Asistanlık eğitimim süresince sosyal ve bilimsel alanda yetişmemde emeği geçen Anabilimdalı Başkanımız Prof. Dr. Füsun EROĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, değerli hocalarım Prof. Dr. Sadık ÖZMEN'e, Doç. Dr. Lütfi YAVUZ'a, Doç. Dr. Pakize KIRDEMİR'e, Doç. Dr. Dilek KARAASLAN'a, Yrd. Doç. Dr. Berit GÖKÇE CEYLAN'a, Yrd. Doç. Dr. Filiz ALKAYA'ya;

Uzmanlık eğitimim süresinde beraber çalışmaktan büyük zevk aldığım acı tatlı birçok anı birlikte paylaştığımız asistan doktor arkadaşlarıma, anestezi teknisyeni arkadaşlarıma, tüm ameliyathane ve yoğun bakım çalışanlarına ve sekreterlerimize;

Tezimin laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Biyofizik Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na Yrd. Doç. Dr. Abdülhadi Cihangir UĞUZ'a ve bölümdeki tüm asistan arkadaşlarıma;

Bana her konuda destek olan hiçbir zaman yalnız bırakmayan özellikle tezimin hazırlanması aşamasında her türlü anlayışı ve yardımı gösteren eşim Heval'e sevgili kızım Nehir ve sevgili oğlum Mahir'e;

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Serdar BULUT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Organofosfatlar	4
2.2. Organofosfat Zehirlenmesinde Tanı	5
2.3. Organofosfat İntoksikasyonları	7
2.3.1. Akut İntoksikasyon	7
2.3.2. Kronik İntoksikasyon.....	8
2.4. Organofosfatlara Bağlı Nörotoksisite.....	8
2.5. Diazinon.....	9
2.6. Oksidatif Stres	10
2.7. Serbest Oksijen Radikalleri	11
2.8. Antioksidanlar	12
2.8.1. N-Asetilsistein.....	13
2.8.2. Glutasyon.....	14
2.8.3. Glutasyon Peroksidaz	15
2.9. Malondialdehit.....	15
2.10. Apoptozis.....	15
2.10.1. Apoptozis Tanısı.....	16
2.11. Arka Kök Gangliyon Hücreleri	17
3. MATERYAL ve METOD	19
3.1. Arka Kök Gangliyon Hücrelerinin İzolasyonu.....	20
3.2. Spektroflorometri.....	23
3.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü ve Glutasyon Peroksidaz ..	24
3.4. Lipit Peroksidasyon Analizi	25
3.5. Hücre İçi Kalsiyum İyonu Salınışının Ölçülmesi.....	25
3.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	26
3.7. Protein Tayini	26

3.8. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	30
ÖZET.....	37
SUMMARY.....	38
KAYNAKLAR.....	39

KISALTMALAR DİZİNİ

AKE	Asetilkolinesteraz enzimi
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ATP	Adenozin tri-fosfat
ATPaz	Adenozin tri-fosfataz enzimi
AKG	Arka kök gangliyon
BHA	Bütillenmiş hidroksi anizol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
BKE	Bütirilkolinesteraz
cADPR	Siklik ADPR
Ca⁺²	Kalsiyum iyonu
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CCl₄	Karbontetraklorür
CHPO	Cumene hidroperoksit
DAG	Diaçilgliserol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-Ditiyobis (2-nitro-benzoik asit)
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
E. Coli	Escherichia Coli
FK 506	Takrolimus
Fura-2 AM	Fura-2'nin asetoksimetil ester formu (fura-2/AM; Molecular Probes)
GSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon transferaz
HADYEK	Hayvan deneyleri yerel etik kurulu
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	Hidroksietilpiperazine-N-2-ethanesülfonik asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
ICAM-1	İntrasellüler adhezyon molekülü-1
ICAM-2	İntrasellüler adhezyon molekülü-2
KCl	Potasyum klorür
LP	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MgCl₂	Magnezyum klorür
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAS-NAC	N-Asetilsistein
Na⁺-K⁺	Sodyum-Potasyum
O₂	Moleküler oksijen
O₂⁻	Süperoksit radikali (anyon)
OF	Organofosfat
.OH	Hidroksil radikali

OPICN	Organophosphate Induced Chronic Neurotoxicity
OSS	Otonom sinir sitemi
ROT	Reaktif oksijen türleri
r-SOD	Rekombinant süperoksit dismutaz
SD	Standard deviasyon
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiobarbitürik asit türevi aktif maddeler
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Diazinonun kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi	16
Şekil 3. Arka kök gangliyon hücrelerinin anatomik görüntüsü	18
Şekil 4. Kan alma işlemi	21
Şekil 5. Spinal kolonun diseke edilmesi	21
Şekil 6. Spinal kordun çıkarılması	22
Şekil 7. Arka kök gangliyon hücrelerinin stereomikroskopik görüntüsü	22
Şekil 8. Arka kök gangliyon hücrelerinde kalsiyum iyonu salınımı düzeyleri.....	28
Şekil 9. Arka kök gangliyon hücrelerinde hücre canlılığı değerleri	29

TABLULAR DİNİZİ

Tablo 1. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin analiz şeması.....	24
Tablo 2. Arka kök gangliyon hücrelerinde lipit peroksidasyonu, indirgenmiş glutasyon ve glutasyon peroksidaz düzeyleri.....	27

1. GİRİŞ

Organofosfat (OF) bileşikleri tüm dünyada yaygın olarak tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Oldukça toksiktirler ve hayatı tehdit edebilirler. Organofosfat zehirlenmeleri dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde en sık zehirlenme nedenlerinden biridir. Zehirlenmeler tarım işçilerinde ve çocuklarda yaygındır. Kolay elde edilebildikleri için intihar amaçlı olarak sık başvurulan bileşiklerdir (1). Bu bileşikler deri, mukozalar, gastrointestinal sistem, göz ve solunum sisteminden hızla emilebilirler. Organofosfat bileşikleri yağ dokusu, karaciğer ve böbrekte dağılır ve birikir. Yağ dokusunda depolandıkları için organizmadan uzaklaştırılmaları yavaştır (1).

Organofosfat bileşikleri asetilkolinesteraz (AKE) ve bütirikolinesteraz (BKE) gibi karboksilik ester hidrolazlar için güçlü inhibitördürler. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu asetilkolin birikir. Asetilkolin reseptörlerinin sürekli uyarılması ve paralizisi sonucu muskarinik, nikotinik ve merkezi sinir sistemi (MSS) bulguları ortaya çıkar. Zehirlenme derecesi neden olan bileşiğe göre değişir (2,3).

Organofosfat bileşiklerinin yıkımı esas olarak karaciğerde hidroliz ile oluşur ve bileşikler arasında farklılıklar gösterir. Metilparathion ve diazinon gibi bazı bileşiklerin lipit çözünürlükleri yüksektir ve yağ dokusundan yeniden salınma bağlı olarak gecikmiş toksisite bulgularına neden olabilirler (3). Organofosfat bileşiğinin AKE ile birleşmesinden sonra fosforile olan enzimin bir kısmı oksimler tarafından defosforile edilebilir. Bu süreçte enzim-fosforil bağı fosforil ekinden bir alkil grubunu kaybederek güçlenir. Bu aşamadan sonra oksimler etkisiz kalır. Reaktivasyonun derecesi inhibe olan enzimin kimyasal yapısına, zamana, reaktivatörün yapı ve konsantrasyonuna bağlıdır (4,5).

Akut OF zehirlenmelerinde klinik belirti ve bulgular asetilkolinin sinir kavşaklarında birikiminin yansımasıdır: Muskarinik bulgular, nikotinik bulgular, MSS bulguları, intermediate sendrom ve gecikmiş polinöropati ile karşımıza çıkar (3).

Intermediate sendrom akut OF zehirlenmeleri sonrasında mekanik ventilasyondan ayrılan hastaların yaklaşık % 10-40'ında görülür. Solunum kaslarının yorgunluğu ile birlikte solunum fonksiyonunun bozulması veya kaybını ifade etmektedir. Özellikle lipofilik özelliği yüksek bileşiklere bağlı görülmektedir (6).

Gecikmiş polinöropati çok az OF bileşiğinde görülmektedir. Uygun tedavi alan hastaların çoğunda bu olay görülmemektedir. Genellikle OF bileşiğine maruz kalınmasından sonraki 14-28. günlerde simetrik periferik kas güçsüzlüğü ile kendini göstermektedir. Bu olaydan sinir dokusunda bulunan nöropati target esteraz enziminin fosforilasyonu sorumlu tutulmaktadır (1).

Bazı epidemiyolojik çalışmalarda zehirlenme bulguları olmaksızın kronik düşük doz maruziyetin özellikle duyuşsal nöropati ile karakterize bazı nöropsikiyatrik bozukluklara neden olduğu ve bunun AKE inhibisyonu ile olmadığı gösterilmiştir. Mekanizması tam anlaşılamamıştır. Uzun dönem düşük doz OF maruziyeti lakrimasyon, salivasyon, miyozis ya da fasikülasyonlar gibi kolinerjik semptomlar olmaksızın çeşitli nörolojik bozukluklara neden olabilir. Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bu nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde MSS'inde OF duyarlı esteraz depoları, immun sistem ve oksidatif stresin sorumlu olabileceği düşünülmüştür (7,8).

Duyusal nöron hastalıkları periferik sinir sistemi bozukluklarının özel bir alt grubunu oluşturur. Arka kök gangliyon (AKG) hücrelerinin dejenerasyonu ile ilişkilidir. Hem santral hem periferik duyu iletimini bozar. Kısa ve uzun aksonları birlikte tutar. AKG'larındaki büyük hücrelerin dejenerasyonu ataksi, propriyoseptif duyu kaybı ve arefleksi ile sonuçlanırken, orta ve küçük boy hücrelerin dejenerasyonu ise ağrı, yanma, allodini ve hiperestezi gibi pozitif duyuşsal semptomlara neden olur. Bazı hastalarda eşlik eden otonom ganglionopati ya da postganglionik liflerin tutulumu da bildirilmiştir. Kronik edinsel duyuşsal nöron hastalıklarında etyolojik faktörler, immün kaynaklı, enfektif, toksik (organofosfatlar), vitamin ilişkili, paraneoplastik veya idyopatik olabilir (9).

Organofosfat zehirlenmelerinin moleküler mekanizmalarından biri de lipit peroksidasyonu ve sonuç olarak meydana gelen bileşiklerin eritrositlerin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarını bozmasıdır. Oksidatif stresin pestisid

kaynaklı nörotoksistide biyokimyasal değişiklikler kaskatında başrolü oynayarak nöronal hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (10).

Duyusal nörondaki disfonksiyon nöropatik ağrılı sendromlara neden olmakta tedavisi de birçok değişik uygulama gerektirmektedir. Kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) primer duyusal nöronda dominant ikincil mesajcıdır. Nöronal membranın elektrofizyolojik fonksiyonu, sitoplazmik ve nükleer fonksiyonları kritik bir kimyasal mesajcı olan Ca^{+2} ile regüle edilmektedir. Bu regülasyon nöronal diferensiyasyon, gen ekspresyonu, nörotransmitter salınımı, uyarılabilirlik ve apoptozis gibi olayları yönlendirmektedir (11,12).

Nöral hücrelerin hem apoptotik hem de nekrotik ölümünde reaktif oksijen türleri (ROT) önemli rol oynar. Reaktif oksijen türleri mitokondriyal disfonksiyona ve ATP üretiminin bozulmasına neden olur (13).

Bu bilgiler ışığında; kronik subletal doz organofosfat uygulamasının arka kök gangliyon hücrelerinde kalsiyum sinyali, malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ile hücre canlılığı üzerine etkilerini araştırmayı ve N-asetilsisteinin (NAS) bu patolojiye katkılarını değerlendirmeyi amaçladık.

Organofosfatların kronik etkileri çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda ve vaka takdimlerinde incelenmiş olmakla birlikte AKG hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Organofosfatlara kronik maruziyetin AKG hücrelerine etkilerinin ortaya konmasının ve NAS'in dejenerasyonu önlemede etkin olup olmadığının araştırılmasının literatüre yeni katkılar sağlayacağını düşünürüz. Ayrıca ülkemizde de yaygın olarak kullanılan OF'lara kronik maruziyetin neden olduğu nöropatilerde kullanılabilir farklı alternatiflerin belirlenebilmesi için yapacağımız araştırmanın yeni çalışmalara ışık tutabileceği kanısındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Organofosfatlar

Böcek öldürücü kimyasal maddeler tarımsal faaliyetlerin fazla olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılır. Bugün kullanılan böcek öldürücü kimyasal maddeler OF bileşikleri, karbamatlar, organoklorinler ve pretrinler olmak üzere dört grupta toplanır.

Sıklıkla kullanılan OF bileşikleri Diazinon, Orthene, Malathion, Parathion ve Chlorpyrifos'tur. Böcek öldürücü kullanımlarına ek olarak kimyasal savaş ajanı olarak 2. Dünya Savaşı'ndan bu yana kullanılmaktadırlar. Parathion gibi güçlü bileşikler öncelikle tarımda kullanılır. Coumaphos ve Trichlorfon gibi orta güçteki ürünler hayvan bakımında kullanılır. Diazinon ve Chlorpyrifos insanlarda nörotoksisiteye neden olduğu için evde kullanımları yasaklanmıştır. Ancak ülkemizde kullanımı kontrolsüz bir şekilde devam etmektedir. Zehirlenme tarımda, endüstride ve bu ürünlerin taşınmasında, ilaçlama yapanların kullanım alanlarında, evde kaza sonucu ve özkıyım amaçlı oluşabilir. Geniş alana yayılmış kimyasal maddelerin yiyeceklere bulaşması ile kitlesel zehirlenme olasılığı daima vardır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde özkıyım amaçlı OF kullanımı önemli bir sorundur. Organofosfatların emilimi solunum yolundan, sindirim sisteminden, konjonktivadan, deriden ve mukozalardan olur (1).

Organofosfat ve karbamatlı ürünler sinir sisteminde AKE baskırlar. Bu durum MSS, otonom sinir sisteminde (OSS) ve sinir kas kavşağında asetilkolinin birikimine yol açar. Bu aşırı uyarıyı MSS'de, otonomik gangliyonlarda, parasempatik ve bazı sempatik sinir sonları ile somatik sinirlerde kolinerjik sinaptik iletim felci takip eder. Organofosfat bileşikler AKE'ne kovalent bağ ile bağlanır. Geçici bir süre için OF'ın fosfat molekülü ile AKE arasında durgun fakat geri dönüşümlü bir bağ oluşur. Organofosfatın fosfor molekülünden bir grup ayrıldığında OF-enzim arasındaki bağ geri dönüşümsüz hale gelir. Bu durum "yaşlanma" olarak adlandırılır. Yaşlanma zamanı farklı ilaçlarda değişkendir, dakikalardan günlere kadar veya daha uzun süreli olabilir. Organofosfatlar ile zehirlenme sonrasındaki en kısa süre içinde pralidoksimin verilmesi yaşlanmayı geri çevirebilir. Yaşlanma

oluştığında kolinesteraz enzim aktivitesi kalıcı olarak bozulur. Klinik bulguların gerilemesi ve doğal enzimatik işlevlerin geri dönmesi için yeni enzim yapılmalıdır (2).

Çoğu OF'lar yağda çözünürlüğü yüksek bileşiklerdir. Hızla vücut dokularına dağılırlar. Karaciğer ve böbrekte yüksek yoğunlukta birikirler. Yağda çözünürlüğü yüksek olanlar kan-beyin engelini kolaylıkla geçerler ve bu sebeple MSS'ne etkilidirler. Başlıca karaciğerde esteraz hidrolizi ve konjugasyon ile yıkılırlar. Malathion ve Parathion'un oksidatif ürünleri (maloxon ve paraoxon) de etkili şekilleridir. Hidroliz ile etkisiz ürünlere dönüşürler. Organofosfatların ve ürünlerinin vücuttan atılımı çoğunlukla idrar, safra ve dışkı yolu ile olur (3).

Klinik bulgular alınan ürüne, alım şekline ve alınan miktara bağlı olarak değişir. Organofosfat bileşiklerine maruziyeti takiben genellikle 30 dakika ile 3 saat içinde zehirlenme bulguları görülür. Bununla birlikte yağda çözünürlüğü yüksek bileşikler yağ dokusundan tekrar salınarak tekrarlayan ya da geciken bulgulara sebep olurlar.

2.2. Organofosfat Zehirlenmesinde Tanı (Klinik ve Laboratuvar Bulguları):

Tanıda anamnez önemlidir. Çoğu olguda alınan veya maruz kalınan bileşiğin adının öğrenilmesi olasıdır ve bu durumda tanı koymak kolaydır. Her insektisit OF olmadığı için bileşiğin adının öğrenilmesi önemlidir.

Organofosfat bileşiklerinin kanda ve mide sıvısında belirlenmesi tanı koydurucudur. Ancak zor ve pahalı bir yöntemdir; bunu yapabilen merkez sayısı çok azdır. Eritrosit kolinesterazının ölçümü hem tanı hem de prognoz hakkında yardımcı olur. Plazma kolinesteraz ölçümü daha kolaydır ve tanı koymada yardımcı olabilir. Tanıyı doğrulamak için seri ölçümler yapmak gerekir. Ayrıca kronik maruz kalma durumlarının takibinde de yardımcı testlerdir (13).

Diğer laboratuvar bulguları katekolamin salınımındaki artışa bağlı hiperglisemi, oksidatif doku hasarına bağlı laktik dehidrogenaz artışı ve lökositozdur. Elektrofizyolojik çalışmalar intermediate sendrom tanısı için gerekebilir (14).

Kolinergic bulgular klinik olarak tanı koydurucudur. Organofosfat bileşiklerinin kokuları oldukça tipiktir. Solunumda ve kusmakta sarımsak benzeri keskin koku, miyozis, bradikardi, kas seyirmeleri, tükürük salgısı, solunum yolu salgıları ve gözyaşında artış belli başlı klinik bulgulardır. Bazı hastalarda taşikardi, hipertansiyon ve midriazis gibi nikotinic etkiler olabilir. İdrar, mide içeriği, cilt ve giysilerin OF ve ürünleri açısından incelenmesi yararlı olacaktır (5).

Asetilkolinesteraz enzimi, eritrositler, iskelet kası ve sinir dokusunda bulunurken, bütirilkolinesteraz enzimi özellikle karaciğer, plazma, kalp, beyin beyaz maddesi ve pankreasta bulunmaktadır. Kokain, süksinilkolin, morfin, kodein gibi ilaçlar BKE düzeyini etkilerler. Bazı nefrotik sendrom olgularında yüksek BKE düzeyi saptanabilir, bu durum serum albumin konsantrasyonu ve enzim etkinliği arasındaki ters ilişkiye bağlıdır.

Eritrosit AKE düzeyi organofosfatlarla ciddi miktarda baskılanır, bununla beraber anemide düşük seviyede olduğu bilinmektedir. Ayrıca sıtma tedavisinde bir miktar azalma görülür.

Bütirilkolinesteraz düzeyi enzimin kalıtsal eksikliği, gebelik, ergenlik, yenidoğan veya küçük çocukluk çağı, karaciğer hastalığı, akut hepatit, siroz, kollajen doku hastalıkları, akut enfeksiyonlar, karsinomalar, yetersiz beslenme, belirgin zayıflamanın olduğu kronik hastalıklar, yanıklar, hemodiyaliz, miksödem, miyokard enfarktüsü ve anemi, OF zehirlenmeleri ve monoaminoksidaz inhibitörleri kullanımı gibi durumlarda baskılanır.

Bütirilkolinesterazın baskılanma derecesine bağlı olarak bulgular değişir. Temel değerinin % 50'sinden fazla azalma olduğunda bulgular başlar, % 60 azalma ile birlikte baş ağrısı ve parasempatik uyarı gelişir. Bütirilkolinesteraz düzeyinde % 60-90 derecelik azalmada kas güçsüzlüğü, titreme, bilişsel bulgular oluşur. Bu azalma % 90'dan fazla ise nöbet, akciğer ödemi ve kas güçsüzlüğüne bağlı solunum yetmezliği, siyanoz, koma ve ölüm olur. Tedavisiz olgularda BKE 4-6 haftada, eritrosit kolinesterazı 90-120 günde normal değerine döner. Bütirilkolinesteraz seviyesi ile gereken atropin miktarı ve solunum desteği arasında ilişki yoktur. Uzun süreli temasta kolinesteraz düşüş hızı yavaş olduğundan klinik bulgular azdır.

2.3. Organofosfat İntoksikasyonları

2.3.1. Akut İntoksikasyon

Akut sistemik OF zehirlenmelerinde değişen MSS, muskarinik, nikotinik ve somatik motor nöron bulguları oluşur. Solunum yolu ile olan zehirlenmelerde başlangıç çok hızlıdır. Deriden emilim ise daha yavaştır. Ağızdan fazla miktarda alımlarda bulgular dakikalar içinde başlar. Akut OF zehirlenmelerinde akut kolinerjik sendrom, intermediate sendrom ve gecikmiş polinöropati olmak üzere üç ayrı tablo tariflenir (2).

Akut kolinerjik sendrom sinir reseptör alanında asetilkolinin birikimi sonucu oluşur. Klinik semptom ve bulgular muskarinik, nikotinik ve MSS bulgularıdır. Akut kolinerjik sendrom genellikle 24-48 saat sürer ve yoğun bakım ünitede tedavi gerektirir.

Asetilkolinin muskarinik alanda birikimi ile salgı artışı (bronkore, tükürük salgısında artış, terleme, gözyaşında artış), hava yollarında daralma (göğüste sıkışma, hırıltılı solunum), bradikardi, kusma, barsak hareketlerinde artış (batında gerginlik ve ağrı), sık idrara çıkma, miyozis ve bulanık görme oluşur.

Nikotinik alandaki asetilkolin artışının etkileri depolarizasyon bloğuna bağlı kaslarda seyirme ve paralizidir. Nikotinik reseptör uyarısına bağlı olarak hastalarda nadiren kalp hızında artma ve kan basıncında yükselme olur. Kalp bulguları sıklıkla ciddi sorunların ve ölümün sebebidir. Elektrokardiyografik bulgular uzamış Q-T aralığı, ST segment yüksekliği, T dalga çöküklüğü ve PR süresinde uzamadır. Sinüs bradikardisi, ventriküler ekstrasistol, ventriküler taşikardi ve fibrilasyon gibi anormal ritimler de olabilir.

Asetilkolinesterazın beyinde baskılanması baş ağrısı, uyuyamama, baş dönmesi, konfüzyon ve uykuya meyile yol açar. Şiddetli olgularda konuşma bozukluğu, bilinç bozukluğu ve solunum depresyonu oluşur. Ölüm akut kolinerjik sendrom dönemindeki kalp, solunum ve MSS etkilerine bağlıdır.

Intermediate sendrom solunum kaslarının yorgunluğu ile birlikte solunum fonksiyonunun azalması veya kaybını ifade etmektedir. Özellikle lipofilik özelliği yüksek bileşiklere bağlı olarak görülmektedir.

Gecikmiş polinöropati çok az OF bileşiminde görülmektedir. Genellikle OF bileşimine maruz kalınmasından sonraki 14-28. günlerde görülmektedir. Periferik kas güçsüzlüğü simetrik ve duyu bozukluk eşlik edebilir. Duyu bozukluğu motor bozukluktan daha hafiftir. Bacak kaslarında keskin kramp benzeri ağrı, el ve ayaklarda seyirme, uyuşukluk ve karıncalanma erken sinir sistemi bulgularıdır. Ağrı ve kas güçsüzlüğü hızla yayılır, hastalar çalışamaz ve kendi dengelerini koruyamaz hale gelir. Derin tendon refleksi baskılır. Üst ekstremitelerde benzer biçimde birkaç gün sonra etkilenir. Fizik muayenede baskın olarak motor polinöropatiye bağlı gevşek felç ve distal kaslarda güçsüzlük görülür. Bulgular şiddetli olgularda kuadriplejiye kadar değişir. Bazı işlevler zamanla iyileşebilir fakat piramidal ve merkezi nörolojik tutulumun çoğu kalıcıdır. Bu olaydan sinir dokusunda bulunan nöropati target esteraz enziminin fosforilasyonu sorumlu olabilir (15).

2.3.2. Kronik İntoksikasyon

Bazı epidemiyolojik çalışmalarda akut zehirlenme bulguları olmaksızın kronik düşük doz OF maruziyetinin özellikle duyu bozukluk ile karakterize bazı nöropsikiyatrik bozukluklara neden olduğu ve bunun AKE inhibisyonu ile olmadığı gösterilmiştir. Mekanizması tam anlaşılammıştır. Organofosfatlara kronik maruziyet sonrasında hastalarda duygulanımda dalgalanmalar, intihara meyil, bilişsel bozukluk ve kronik güçsüzlük görülür. Bu nöropsikiyatrik değişiklikler nefes darlığı, kardiyak problemler, parestezi, kas seyirmeleri, dental problemler, mide ağrısı, üriner şikayetler, osteoporotik kırıklar ve kollaps gibi diğer bir çok sistemi ilgilendiren semptomlarla birlikte olabilir.

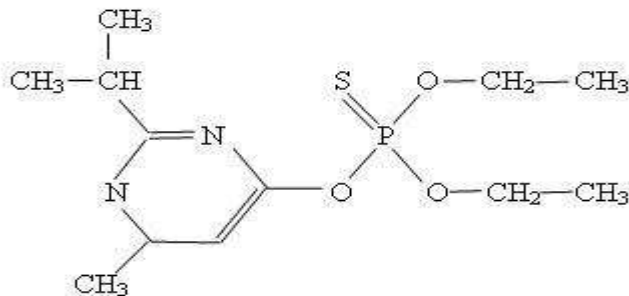
2.4. Organofosfatlara Bağlı Nörotoksisite

Organofosfatlarla ortaya çıkan nörotoksisite vaka takdimleri, epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan modelleri üzerinde dökümanete edilmiştir. Organofosfat bileşikleri 3 farklı nörotoksik tablo oluştururlar. Birinci tablo AKE'nin irreversibl

inhibisyonu sonucu asetilkolinin birikmesini takiben nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aşırı stimülasyonu ile ortaya çıkan akut kolinerjik sendromdur. Bunu akut zehirlenmeden 24-96 saat sonra, akut kolinerjik krizin iyileşmesini takiben ve gecikmiş nöropatinin başlangıcından önce bazı hastalarda meydana gelen intermediate sendrom izleyebilir. Parathion, Metilparathion, Diazinon, Malathion, Fenthion, Monocrotophos, Dimethoate ve Methamidophos ile sık oluşur. Bu sendromun oluşumunda yağda çözünen OF'ların yağ dokusundan yeniden salınması sorumlu tutulmaktadır. Fakat bu sendromun antikolinesterazın aktivitesinden oluştuğunu gösteren bir bilgi yoktur. Yetersiz oksim tedavisinden kaynaklandığını gösteren bildirimler vardır. Elektromyografik çalışmalar sinir kas kavşağında hasar olduğunu göstermiştir. Tam iyileşme yeterli solunum desteği ile 4-21 gün içinde olur. Organofosfatların neden olduğu gecikmiş polinöropati insanlarda nispeten nadir görülen nöro-dejeneratif bozukluktur. Omuriliğin inen ve çıkan yolunda ve periferik sinirlerin duyu ve motor aksonlarının uç bölgelerinde işlev kaybı vardır. Elektromiyografik bulgular kısmi denervasyon, motor dalga ve iletim hızında azalma göstermiştir. Organofosfatlar ile sinir dokusunda nöropati target esterazın geri dönüşümsüz baskılanması polinöropati oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nöropati target esteraz yüksek katalitik aktivite ile membran proteinine bağlıdır, fakat fizyolojik işlevi bilinmemektedir (16,17).

2.5. Diazinon

O, O - diethyl - O- (2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl) - phosphorothioate bileşiğinin genel adı diazinondur. Kimyasal formülü C₁₂H₂₁N₂O₃PS'dir (Şekil 1).



Şekil 1. Diazinonun kimyasal yapısı

Diazinon renksiz ve kokusuz bir madde olup; tarımda koyu kahverengi/yeşil sıvı formda kullanılmaktadır. Sudaki çözünürlüğü zayıftır. Kaynama noktası 83-84°C olup, 120°C'de bozular. Diazinon nötr ortamda stabil, alkali ortamda ise yavaş hidrolize olur. Diazinon mikrozomal enzim sistemi ile okside olarak diazoxon, hidroksidiazoxon, hidroksidiazinona dönüşür.

Diazinon intoksikasyonu ile acil servislere müracaat eden hastalarda; pulmoner, kardiyovasküler sistem vb. yaşamsal fonksiyonların tedavisine öncelik verilmesi, kan diazinon düzeylerinin ölçülmesinin de zorluğu nedeniyle insanlardaki toksik dozun tespiti mümkün olmamıştır. Bununla birlikte 0,02 mg/kg/gün dozda diazinon ile insanlarda herhangi bir toksik etki görülmediği bildirilmiştir. Hayvanlarda diazinon oral yoldan verildiğinde; hayvanın türüne, cinsine, uygulama esnasındaki bazı özelliklere göre değişiklik gösteren toksik değerler elde edilmiştir (18).

Organofosfatların değişik bölgelerine bağlanan sülfür ve fosfor grupları; AKE'a bağlanma derecesini, hidrolizin zamanını, gücünü ve semptomlarının ortaya çıkma zamanını belirler. Organofosfatların etki süresi; alınma yoluna, alınan miktara, yağda çözünürlüğüne, hidroliz olma zamanına, kolinesterazın aktif bölgesine afinitesine, toksinin direkt etkili olup olmamasına ve aktif metabolite dönüşüp dönüşmemesine bağlıdır (18).

2.6. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidanlara karşı antioksidan kapasitenin azalması ve/veya oksidanların artması olarak tarif edilmektedir. Biyolojik sistemlerde elektron alan moleküllere oksidan veya serbest radikal denir. Hidroksil radikali (.OH), süperoksit radikali (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) serbest radikallere örnek olarak verilebilir. Hedef moleküllerden elektron alarak o molekülün yapısını ve fonksiyonunu bozarlar. Oksidan maddeler, hücre dışı matriksin yapısını, biyolojik membranları, DNA hasarı yaparak hücrenin genetik yapısını bozar (19).

2.7. Serbest Oksijen Radikalleri

Başlıca moleküler oksijenin, metabolizması ve suya dönüşümü sırasında ortaya çıkan, dış halkasında çiftlenmemiş elektron bulunan, bu nedenle son derece reaktif olan moleküllere serbest radikaller adı verilir. Anyon, katyon veya nötral durumda bulunabilen serbest radikaller diğer moleküllerle hızla kimyasal reaksiyona girme ve onların yapısını değiştirme yeteneğine sahiptir (20).

Süperoksit, oksijenin indirgenme sürecinde oluşan ilk radikaldır. Oksijen bir elektron alarak indirgenir ve O_2^- oluşur. Sonra bir elektron daha alarak tekrar indirgenir ve H_2O_2 meydana gelir. Bütün elektronları çiftlenmiş olarak bulunan H_2O_2 aslında radikal değildir. Ancak bir elektron daha alarak $.OH$ ve hidroksil anyonuna dönüşmesi nedeni ile önem taşır. Hidroksil radikali ise güçlü bir kimyasal aktiviteye sahiptir. Çeşitli süreçlerde, endojen ve eksojen etkenler serbest oksijen radikalleri oluşmasına neden olabilir.

Aerobik organizmalar, oksidatif ortamda yaşamlarını sürdürebilmek için, hücrenin tüm komponentlerine zarar verme eğiliminde olan serbest radikalleri kontrol ve yok etmek zorundadır.

Oksijen radikallerinin etkin şekilde temizlenmemesi halinde bu radikaller; nükleik asitleri, lipitleri, karbonhidratları ve glikoproteinleri de içine alan tüm biyolojik materyallerle reaksiyona girerek bir zincir reaksiyonu ile reversibl veya irreversibl değişikliklere yol açarlar. Bu değişikliklerin başlıcaları hücre proteinlerinin zarar görmesi, enzim inaktivasyonu, membran ve serum lipitlerinde peroksidasyon, hücre yüzey reseptörlerinde değişiklik, Na^+-K^+ ATPaz, Ca^{++} ATPaz gibi hücre iyon transport proteinlerinin tahrip olması, DNA harabiyeti, bağ dokusunda bozulma, kollajenaz ve bazı proteazları içine alan katalitik enzimlerin aktivite kazanmasıdır (20).

Radikallere bağlı bu değişiklikler çeşitli klinik hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Kardiyovasküler hastalıklar, Parkinson, Alzheimer, kanser ve kimyasal karsinogenez, zehirlenmeler, artrit, diabetes mellitus gibi hastalıklarda serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı tespit edilmiştir (19).

2.8. Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin hasar yapıcı özelliklerine karşın, hücrelerin doğal olarak oksidatif hasarı azaltma veya sınırlama yetenekleri mevcuttur. Bu hücre koruyucu mekanizmalar oksijen radikallerini gidermek ve detoksifiye etmek üzere düzenlenmiş birkaç enzim sistemini içerirler. Antioksidanlar, hücresel protein, karbonhidrat, lipit ve DNA'ya karşı olan oksidatif hasarı azaltan veya yok eden maddeler olarak adlandırılır.

Doğal antioksidan etki başlıca; reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi, oluşmasının baskılama yolu ile engellenmesi, metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi, hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi ya da anti-death gen (anti-ölüm geni) Bcl-2'yi düzenleyerek apoptotik hücre ölümünü azaltmak şeklinde gerçekleşir (21).

Antioksidanlar “endojen antioksidanlar” ve “ ekzojen antioksidanlar” olarak iki grupta sınıflandırılabilirler. Doğal antioksidanlar enzimler [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz], suda eriyen radikal tutucular [glutatyon (GSH), C vitamini, ürik asit, glukoz, sistein], yağda çözünen radikal tutucular (E vitamini, β-karoten, bilirübin, ubikinon, flavonoidler), metal iyonlarını bağlayan proteinler (ferritin, transferrin, haptoglobulin, hemopeksin, seruloplazmin, albumin) olarak sayılabilir (22).

Ayrıca çok sayıda endojen ve ekzojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür:

- Sistein, histidin gibi amino asitler
- Safra asitleri
- Sitokinler
- Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz enzimlerinin inhibitörleri
- Lokal anestezikler
- Kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, nifedipin, nitrendipin)

- Steroid yapıda olmayan antiinflamatuvarlar (ibuprofen)
- Rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD)
- GSH-P_x aktivitesini arttıran veya benzer etki gösteren moleküller
- Serbest radikal toplayıcılar (DMSO, mannitol)
- Demir tutucuları (deferroksamin, EDTA)
- Besinlere eklenen koruyucular (BHA, BHT, sodyum benzoat)
- Nötrofil inhibitörleri (siklosporin A, FK 506, ibuprofen, steroidler)
- Nötrofile karşı monoklonal antikor (RP 3)
- Endotel reseptörlerine (ICAM-1, ICAM-2) karşı monoklonal antikor.

2.8.1. N-Asetilsistein

L-sisteinin N-asetil türevi ve bir thiol içeren bileşiktir. Bir mukolitik veya mukus düzenleyici olarak kabul edilen N-Asetilsistein (NAS), kronik bronşit ve diğer koyu kıvamlı mukus içeren hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ek olarak, NAS'in parasetamol intoksikasyonunun tedavisinde de yararlı ve kanser tedavisinde de etkili bir ajan olduğu görülmüştür.

Plazmada NAS kendi intakt ve redükte formunun yanısıra değişik okside formlarda da bulunabilir. Disülfid, N,N'-diasetilsistein haline okside olabilir ve sistein ve glutasyon gibi diğer düşük molekül ağırlıklı tiollerle reaksiyona girerek karışık (mixed) disülfidler oluşturabilir. Plazma proteinlerinin thiol grupları ile reaksiyona girerek okside olabilir. NAS'in ilaçlara bağlanan diğer bağlayıcı proteinlerden olmadığı akılda tutulmalıdır.

N-Asetilsistein, bağırsaklardan yüksek oranda absorbe edilebilir ve hızla metabolize olur, yaklaşık % 10'luk bir kısmı metabolize olmadan atılır. NAS'in büyük bir kısmı intrasellüler ortamda glutasyon üretimi için kullanılır ve sonuçta hücre içinde güçlü bir antioksidan olan thiol metabolitlerine dönüşür. N-Asetilsistein, glutasyonun kendisinden çok daha önemli bir antioksidandır. N-Asetilsistein, canlı organizmalardan üretildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asit türevi olduğundan

güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Thiol içeren bir bileşik olan NAS, serbest oksijen radikalleri ile etkileştiği ve son ana bileşik olan NAS-disülfide dönüştüğünün bilinmesinden bu yana bir antioksidan olarak kullanılmaktadır. NAS'in aynı zamanda O_2^- , H_2O_2 , $.OH$ ve hipoklorik asit ile etkileştiği de gösterilmiştir.

Sülfür içeren besinlerin detoksifikasyon özellikleri çok eskiden bu yana bilinmektedir. NAS başlıca şu ajanları detoksifiye edebilmektedir:

- Ağır metaller (cıva, kurşun, kadmiyum)
- Asetaminofen içeren ilaçlar
- Herbisitler
- Çevresel temizleyiciler (CCl_4 , ürethane)
- Aflatoksin içeren organizmalar ve E. Coli

N-Asetilsisteinin yapısındaki sülfhidril grubu doğrudan ağır metallerle reaksiyona girer, dolaylı olarak da sitokrom P-450 sistemini etkiler. Asetaminofen intoksikasyonunda karaciğer hasarının oluşumunu engeller. N-Asetilsisteinin, doxorubicin, ifosfamide, valproik asit ve alkol gibi ilaçların yan etkilerini azalttığını bildiren yayınlar vardır (23).

N-Asetilsistein hem antioksidan hem de detoksifikasyon etkisiyle kanser tedavisinde rol oynar. Ayrıca cisplatin ve oxazophosparine temelli ajanların toksik etkilerini azaltır. N-Asetilsistein ile tedavide plazma albumin düzeyi artar; böylece kanser hastalarında ve sağlıklı bireylerde hücre kitlesinin azalması önlenir.

2.8.2. Glutatyon

Glutatyon, başta karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutatyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (24).

2.8.3. Glutasyon Peroksidaz

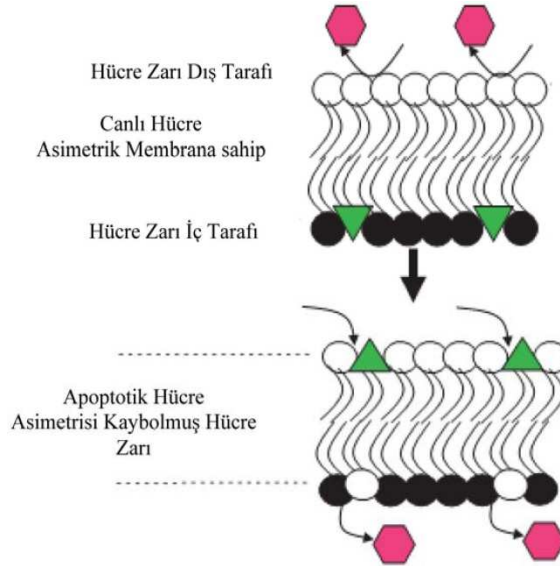
Organizmalar oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı endojen koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler (23). Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, oksijen sitotoksitesine karşı hücrel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir antioksidan enzimdir (10). Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup H_2O_2 ve lipit peroksidlerin redüksiyonunu kataliz eden, tetramerik yapılı, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir (10).

2.9. Malondialdehit

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehit (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Malondialdehit bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (22-24).

2.10. Apoptozis

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık, apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (25).



Şekil 2. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi

Uzun süren internal ve eksternal kontrol ve ikinci bir kontrol safhasından sonra hücrenin kendi kendini imha sürecine girmesine izin verilir. Bir hücrenin erimesi (melt-down) kendi içerisinde oluşan bir durumdur. Bütünlüğü bozulmamış, sağlam bir hücre zarı içerisindeki interior bileşenler ve yapısal elementlerin parçalanmasıyla hücre erimesi süreci başlatılır. Apoptotik hücre membranları çoğunlukla fosfolipit içeren çiftkatmanlı yapılarını hemen kaybetmezler. Bu korumalı birim bazı yangısal cevaplara sebep olabilecek hücre bileşenlerinin salınmasının önüne geçer. Bu son safhada bütün geri kalan atıklar ve son ürünler zar ile kaplanır. Minik boyutlarda paketçikler haline dönüşen apoptotik artıklar fagositoz yeteneğine sahip komşu hücreler tarafından toplanır ve sindirilir. Bu nedenle apoptoz diğer hücreler için zararsız bir süreç halini alır. Bu aynı zamanda daimi bir homeostazisin devam ettirilmesi için gereklidir (26,27).

2.10.1. Apoptozis Tanısı

Bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da

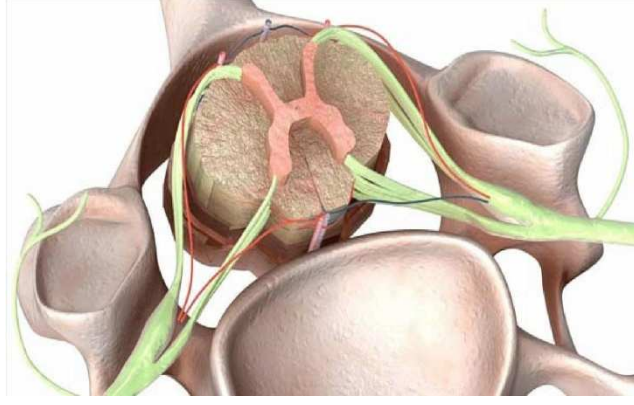
mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (28).

2.11. Arka Kök Gangliyon Hücreleri

Arka kök gangliyonlarını meydana getiren ünipolar yada psödounipolar nöronlar, nöral krest hücrelerinden köken alırlar. Başlangıçta spinal gangliyonlardaki nöronların aksonları bipolardır, fakat hemen sonra her iki uzantı birleşerek T-biçimli hücrelere dönüşürler. Spinal gangliyon hücrelerinin her iki uzantısı aksonların yapısal özelliklerine sahip olmasına rağmen periferik uzantı sinyali akan kısmı olup dendrit olarak fonksiyon görmektedir. Spinal gangliyon hücrelerinin periferik uzantıları, spinal sinirler içerisinde ilerleyerek somatik ve visseral yapılarda duyuusal sonlanmalar yaparlar. Santral uzantıları ise spinal sinirlerin dorsal köklerini oluşturarak medulla spinalise girer (31).

Anatomi ve nörolojide AKG, arka kökte yerleşmiş ve içerisinde afferent spinal sinir hücrelerinin gövde kısımlarını içeren bir yumrucuktur. AKG nöronları iki önemli fonksiyonuyla belirginleşmektedir: Uyarının iletimi, şifrelendirilmiş uyanların MSS aktanması. Somatosensöriyel iletimler sinir sistemine AKG hücreleri ile girmektedir. Her bir AKG hücresi, morfolojik yapısı ve moleküler özelliğinden dolayı farklı tipteki uyanlara seçici özellikte cevap verirler. AKG hücreleri somatik duyu sisteminde reseptördürler. Hücre gövdesi bir gangliyon içerisinde omurilik siniri boyunca uzanır bir vaziyette yerleştirilmiştir. Akson iki dallanma yapar. Bunlardan bir tanesi perifere doğru diğeri ise MSS'e doğru uzanır (32).

Arka kök gangliyon hücrelerinin perifere doğru yaptığı uzantılar iki çeşittir. Bunlardan bir tanesi kapsüllendirilmiş olanıdır ki, bu tipteki hücreler dokunma, sıcaklık ve ağrı hislerinden sorumludur. Sıcaklık ve ağrı hislerinden sorumlu olan AKG hücrelerinin aksonları küçük çaplıdır. Çok ince bir myelin kılıfına sahiptirler ya da myelin kılıfları yoktur. Bu çeşit sinir hücreleri uyarıları çok yavaş iletirler (33).



Şekil 3. Arka kök gangliyon hücrelerinin anatomik görüntüsü

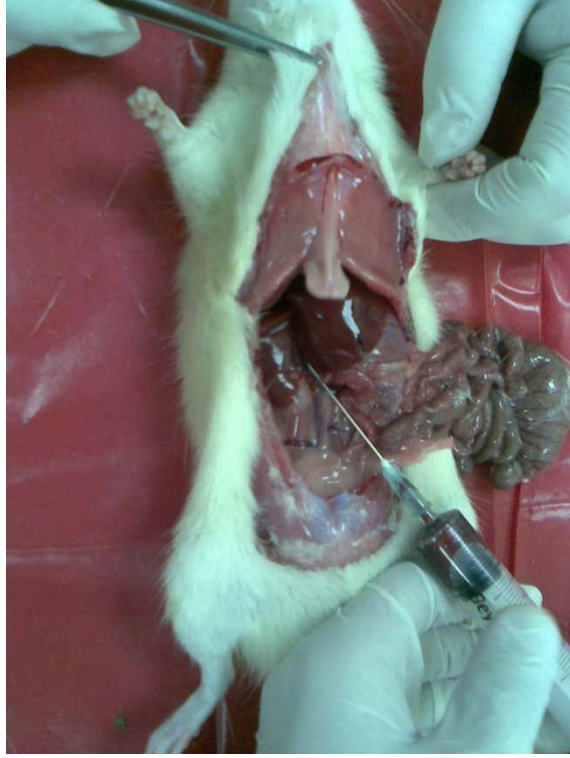
3. MATERYAL ve METOD

Çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) onayı alındıktan sonra Biyofizik Anabilim Dalı ile birlikte Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada yaşları 12-16 hafta, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 36 adet Wistar Albino rat kontrol (n=8), NAS (n=8), Diazinon (n=10), Diazinon + NAS (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki (Grup K) hayvanlara hiçbir uygulama yapılmadan AKG hücrelerinde Ca^{+2} sinyali, MDA, GSH, GPx ve hücre canlılığı değerlendirildi. N-Asetilsistein (Grup N) grubundaki hayvanlara 4 hafta süre ile her gün gavaj yolu ile 150 mg/kg dozda NAS, Diazinon grubundaki (Grup D) hayvanlara ise 30 mg/kg dozda diazinon uygulandı. Diazinon + NAS grubundaki (Grup D+N) hayvanlara ise 4 hafta süre ile hergün gavaj yolu ile 30 mg/kg dozda diazinon ve 150 mg/kg dozda NAS verildi. Kontrol grubunda yapılan incelemeler diğer grup hayvanlarında da çalışıldı. İncelemeler her gruptan rastgele hayvanlarda her gün gerçekleştirildi. Sakrifikasyon cerrahi sırasında eksanguinasyon ile gerçekleştirildi. Ratlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde ad libitum beslendi, herhangi bir kısıtlama uygulanmadı.

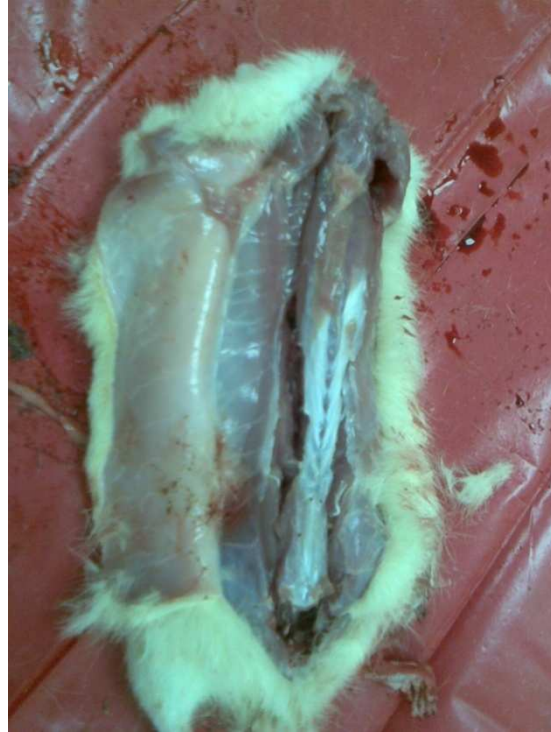
Deney Grupları	Hayvan Sayısı/Grup
Kontrol (Grup K)	8
N-Asetilsistein (Grup N)	8
Diazinon (Grup D)	10
Diazinon + N-Asetilsistein (Grup D + N)	10

3.1. Arka Kök Gangliyon Hücrelerinin İzolasyonu

Arka kök gangliyon hücreleri 12-16 haftalık ratlardan inhalasyon anestezisi altında elde edildi. Sakrifikasyon işlemine takiben hiç vakit kaybetmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı. Sırt omurları kas dokusundan olabildiğince ayrıldı ve ventral kısmından, özel olarak silikon maddesi ile kaplanmış yzeyeye hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar DMEM medyumunu (% 89 Dulbecco's Modified Eagle Medium, % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik kombinasyonu) konuldu. Bu işlemden sonra omurlar median hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrılmaya çalışıldı. Spinal kord ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında özenle yerleştirildiği alandan dış kısma alındı, bu sırada spinal kord ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya zen gösterildi. Her iki vertebra arasına özenle yerleştirilmiş olan hücre yumakları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alınarak içerisinde antibiyotikli medyum bulunan steril petri kaplarına konuldu. Tüm hücre yumakları alındıktan sonra içerisinde antibiyotikli medyum bulunan petri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantılarından ayrıldı ve bir saat süresince inkübatörde (37 °C ve % 5 CO₂) kollajenazlı solüsyon (% 2,5) içerisinde bekletildi. Bir saat sonra mekanik parçalama işlemine geçildi ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli, farklı genişliklerdeki pipet uçları ile daha sonra 200 µl hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalanma işlemi tamamlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücreler medyumlarından ayrılmak üzere santrifüj işlemine tabi tutuldu ve sonrasında Na⁺/HEPES tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2-AM maddesi ilave edilerek bir saat süresince 37 °C de çalkalamalı su banyosuna konuldu.



Şekil 4. Kan alma işlemi



Şekil 5. Spinal kolonun diseke edilmesi



Şekil 6. Spinal kordun çıkarılması



Şekil 7. Arka kök gangliyon hücresinin stereomikroskopik görüntüsü

3.2. Spektroflorometri

Bazı moleküller ışık enerjisini emerek uyarılma yeteneğine sahiptirler, uyarılan bir molekül daha yüksek bir enerji seviyesine çıkar ve bu durum uyarılma durumu olarak adlandırılır. Temel enerji seviyesindeki bir florofor, diğer moleküllere nazaran düşük enerji durumunda, sabit bir konfigürasyona sahip ve floresan ışık yaymayan bir durumdadır. Dış kaynaklı olarak bir ışık bir florofor molekülüne çarptığı zaman, florofor molekülü ışık enerjisini emer. Eğer emilen enerji yeterli seviyede ise florofor molekülü yüksek enerji seviyesine ulaşır, bu duruma uyarılmış durum denilir. Bu olayda uyarılma olarak bilinir. Dışarıdan gelen ışığın dalga boyuna ve enerjisine bağlı olarak bir floroforun erişebileceği çok farklı uyarılmış durumu ya da enerji seviyesi vardır. Florofor molekülünün yüksek enerji düzeylerinde sabit kalmamasından dolayı, nihayetinde yarı sabit olacağı, daha düşük enerji seviyesine düşecektir. Bir floroforun uyarılmış durumda kalan süresine uyarılma ömrü denilir ve 10^{-15} - 10^{-9} saniye gibi çok kısa bir zaman zarfında sonlanır. Sonra, florofor molekülü yarı-sabit uyarılmış durumundan temel haline geri döner ve fazla enerji salınır ve ışık olarak yayılır. Yayılan bu ışık düşük enerji taşımaktadır ve bu yüzden emilen ışıktan daha uzun dalga boyuna sahiptir. Bu da yayılan ışığın renginin, emilen ışığın renginden farklı olduğunu ifade etmektedir. Floresan işleminin döngüsü bir floroforun ışık enerjisini emerek uyarılması, geçici bir yaşam sürecinde bir miktar enerji kaybetmesi, taban durum seviyesine geri dönmesi işlemleriyle özetlenebilir. Bir florofor molekülü, teorik olarak, tekrarlayan şekillerde süresiz olarak floresan işlemlerine maruz kalabilir. Bu gerçekten de çok kullanışlı bir olaydır, çünkü bu olay bir florofor molekülünün birçok defa sinyal üretebilmesi anlamını taşımaktadır. Görünebilir ışığın dalga boyları 400-700 nm'dir. Kısa dalga boyuna sahip ışık dalgaları yüksek enerji ve yüksek frekansa sahiptirler. Uzun dalga boyuna sahip ışık dalgaları düşük enerji ve düşük frekansa sahiptirler. Uyarılmış bir florofor emdiğinden daha düşük enerjiye sahip ışık yaydığından her zaman emilen ve yayılan ışık arasında farklılık vardır. Bir floresan boyası belirli bir aralıktaki dalga boylarındaki ışığı absorbe eder ve her bir boya kendine has karakteristik uyarılma alanına sahiptir.

3.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü (İndirgenmiş Glutatyon ve Glutatyon Peroksidaz Analizleri)

Glutatyon düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA (% 10 trikloroasetik asit) solüsyonu ile karıştırıldı. 20 saniye boyunca vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu (0,4M pH:8,9) ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Tablo 1. Glutatyon peroksidaz aktivitesinin analiz şeması

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı		
Üzerine Tris tampon eklendi	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi	0.1 ml	0.1 ml

Glutatyon peroksidaz aktiviteyi Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometre ile belirlendi. Tris (1) HCl tampon solüsyonu (50 mM, pH:7,6), GSH solüsyonu, CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu, % 10 TCA solüsyonu, Tris (2) tampon (0,4 M pH: 8,9), DTNB solüsyonu kullanıldı. Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.4. Lipit Peroksidasyon Analizi

Arka kök gangliyon hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA tayinine dayanır. Malondialdehit tayini, Placer ve arkadaşlarının bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile çok hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV - 1800, Japonya) yapıldı.

Tüm AKG hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi.

3.5. Hücre İçi Kalsiyum İyonu Salınımının Ölçülmesi

Hücre içi Ca^{+2} salınım miktarının ölçümü için arka kök gangliyon hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4 μ M Fura 2-AM floresan boyası ile boyandı (Bejarano and Terron 2007). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NASI, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Fura 2-AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı.

3.6. Hücre Canlılığı Analizi

Her bir ependorf tüpü içerisinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir ependorfa 15 μ l [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] (MTT) kimyasalı ilave edildikten sonra bütün ependorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 500 g da 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfa 400'er μ l DMSO ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resüspanse edildi, sonra her bir küvete 250 μ l bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs 490 nm – Abs 650 nm: x).

3.7. Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan protein tayini deneyleri tüm örneklerde Lowry ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Arka kök gangliyon hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar SPSS, Windows 9.05 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı ANOVA Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Daha sonra gruplardaki istatistiksel önemler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Lipit Peroksidasyonu, Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri:

Grup K ile karşılaştırıldığında grup D’de lipit peroksidasyonunun önemli derecede arttığı görüldü ($p<0.05$). Grup K ile karşılaştırıldığında, grup N ve grup D + N gruplarında ise azaldığı görüldü. Bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grup D ile karşılaştırıldığında ise grup N ve grup D + N gruplarında anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$) (Tablo 2).

Grup K ile karşılaştırıldığında grup D’de indirgenmiş GSH düzeylerinin önemli derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$). Grup K ile karşılaştırıldığında, grup N ve grup D + N gruplarında ise arttığı görüldü. Bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grup D ile karşılaştırıldığında ise grup N ve grup D + N gruplarında anlamlı şekilde arttığı görüldü (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Arka kök gangliyon hücrelerinde lipit peroksidasyonu, indirgenmiş glutasyon ve glutasyon peroksidaz düzeyleri

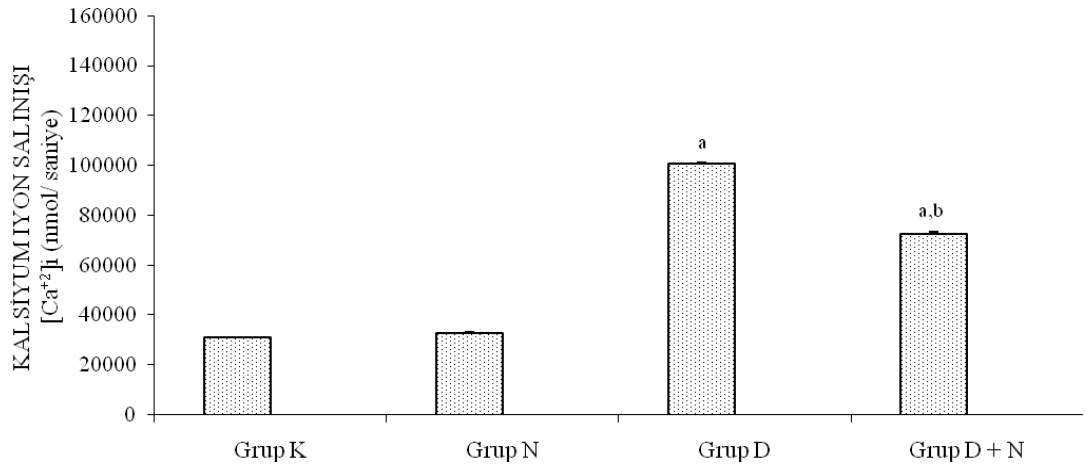
Değerler	Grup K (n=8)	Grup D (n=10)	Grup N (n=8)	Grup D + N (n=10)
MDA ($\mu\text{mol/g}$ protein)	4.60 ± 0.48	5.16 ± 0.62^a	4.06 ± 0.33^c	4.20 ± 0.37^c
GSH ($\mu\text{mol/g}$ protein)	2.25 ± 0.65	1.94 ± 0.28^a	2.74 ± 0.20^d	2.63 ± 0.69^c
GPx (IU/g protein)	3.98 ± 0.53	2.87 ± 0.65^a	$6.87 \pm 0.55^{b,e}$	$6.43 \pm 0.65^{b,e}$

Değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verilmiştir. MDA: Malondialdehit, GSH: İndirgenmiş glutasyon, GPx: Glutasyon peroksidaz, ^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ grup K ile karşılaştırıldığında, ^c $p<0.05$, ^d $p<0.01$ ve ^e $p<0.001$ grup D ile karşılaştırıldığında, ^f $p<0.05$ grup N ile karşılaştırıldığında

Grup K ile karşılaştırıldığında grup D’de GPx düzeylerinin önemli derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$). Grup K ile karşılaştırıldığında, grup N ve grup D + N gruplarındaki artışın çok önemli olduğu görüldü ($p<0.001$). Grup D ile karşılaştırıldığında ise grup N ve grup D + N gruplarında anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$) (Tablo 2).

Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum İyonu Salınımı Düzeyleri:

Grup K ve grup N ile karşılaştırıldığında grup D ve grup D + N’de kalsiyum iyonu salınımının önemli derecede arttığı görüldü ($p<0.001$). Grup D ile karşılaştırıldığında, D + N grubunda kalsiyum iyon salınımındaki artışın daha az olduğu görüldü ($p<0.01$).

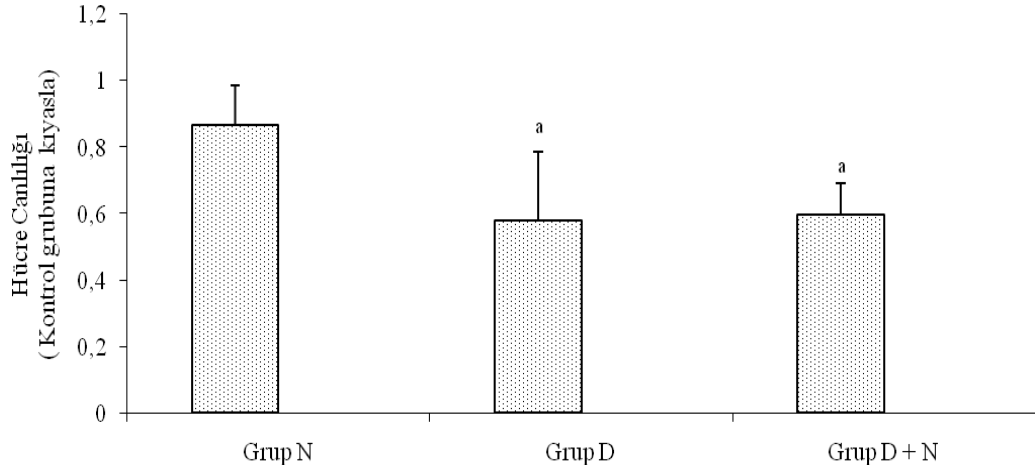


Şekil 8. Arka kök gangliyon hücrelerinde kalsiyum iyonu salınımı düzeyleri

(Değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verilmiştir. ^a $p<0.001$ grup K ve grup N ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0.001$ grup D ile karşılaştırıldığında)

Hücre Canlılığı Analizi:

Hücre canlılığının değerlendirildiği MTT analizi sonuçlarına göre Grup K ile karşılaştırıldığında grup N’de hücre canlılığının yaklaşık % 87, grup D’de % 58, grup D + N’de ise % 60 olduğu görüldü ($p<0.001$). Grup D ve grup D + N’deki değerlerdeki azalmanın istatistiksel olarak çok önemli olduğu görüldü ($p<0.001$).



(Değerler % olarak verilmiştir. ^a p<0.001 grup K ile karşılaştırıldığında)

Şekil 9. Arka kök gangliyon hücrelerinde hücre canlılığı değerleri

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kronik düşük doz diazinon uygulaması ile AKG hücrelerinde lipit peroksidasyonunun arttığını, GSH ve GPx düzeylerinin azaldığını gösterdik. Bu sonuçlar oksidatif stresin meydana geldiğini göstermektedir. Ca^{+2} sinyali ölçümlerinde diazinon grubunda hücre içi kalsiyum akışının normal değerlerin 25 kat üzerine çıktığı görüldü. Diazinon grubunda meydana gelen oksidan stresin kalsiyum homeostazını bozduğu bunun da hücreyi ölüme götürdüğü MTT analizi ile de gösterildi. Diazinon uygulamasına NAS eklenmesi lipit peroksidasyonunda önemli azalma, GSH ve GPx düzeylerinde önemli artışla sonuçlandı. Bu grupta hücre içi kalsiyum düzeylerinde de diazinon grubuna göre önemli azalma oldu ancak bu olumlu değişiklikler hücrelerin korunmasında yeterli olmadı.

Günümüzde OF insektisitlerin toplum sağlığı ve tarımda sıklıkla kullanımı çevre kirliliği ve çok sayıda akut kronik zehirlenme olaylarına neden olmaktadır. Bu durum insektisitlerin yiyecekler ve su kaynaklarında biriktiğine dair gittikçe büyüyen bir kamu düşüncesine neden olmuştur (35,36).

Organofosfatların ana hedefi major transmitterlerden biri olan asetilkolini hidrolize eden AKE'dir. Akut intoksikasyonda bu enzimi kanda ve sinir sisteminde geri dönüşümsüz olarak inhibe etmekte, asetilkolinin birikmesine ve ölümlerle sonuçlanabilen muskarinik, nikotinik reseptör aktivitesine neden olmaktadır. Asetilkolinin birikme hızı OF dozuna bağlıdır (37,38).

Birçok yazar bu bileşiklerin akut ve kronik intoksikasyonda antioksidatif enzimlerin aktivitesini değiştirerek ve birçok organda lipit peroksidasyonunu artırarak redoks prosesini bozduğunu düşünmektedir. Birçok deneysel çalışmada organ hasarı ile OF'a bağlı AKE inhibisyonunun derecesi arasında çok küçük korelasyon gösterilmiştir. Organofosfatların karaciğer, böbrek, kaslar, immun sistem, hematolojik sistem gibi birçok organ ve sistemlerde bozukluklara neden olduğuna ait bazı kanıtlar mevcuttur (39,40).

Epidemiyolojik çalışmalar bazı hastalıklar ile pestisit maruziyeti ve antioksidatif enzimatik aktivitelere değişiklikler arasında bir ilişki olduğunu

göstermiştir. Akut maruziyette temel mekanizma AKE inhibisyonu iken subkronik ya da kronik intoksikasyonda oksidatif stresin ana rolü oynadığı bildirilmiştir (41).

Reaktif oksijen türlerinin üretiminin artışı ve organizmanın antioksidan bariyerinin bozulması oksidatif stresi başlatabilir. Diğer bir deyişle oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile enzimatik, nonenzimatik antioksidan defans sistemi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (42).

Reaktif oksijen türleri sitokrom P450 enzimleri tarafından OF'ların metabolize edilmesinin bir sonucu olarak üretilebilir. Sitokrom P450 enzimleri monooksijenazlardır ve elektron transport yolağı ile moleküler oksijenin bir atomunu OF'a ekleyerek oksidasyonu katalizlerler. Bu reaksiyonla ROT meydana gelir. Organofosfatlar normal antioksidan homeostazisi bozarlar, antioksidanlarda azalmaya neden olurlar (43-45).

Reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasında bir diğer yol da Milatovic ve arkadaşlarının açıkladığı oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, karaciğerde glikojenolizin indüklenmesi ile ortaya çıkan glukoz salınımındaki artış ve takiben vücudun enerji ihtiyacını karşılamak üzere ATP salınımı ile birlikte olan yüksek enerji tüketimidir. Yüksek enerji tüketimi hücrelerin enerji seviyelerini koruma yeteneklerinin azalmasına neden olur. Böylece farklı organlarda aşırı miktarda ROT üretilebilir. Redoks sistemindeki bozukluk OF maruziyetinde ROT'nin oluşmasında bir diğer mekanizmayı oluşturmaktadır (46).

Reaktif oksijen türleri bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, stabil olmayan, oldukça reaktif partiküllerdir. Yakınlarındaki moleküllerden elektron koparıp ya da onlara elektron verip stabil hale gelmeye çalışırlar. Bu sırada bu moleküllerde hasar oluştururlar. Reaktif oksijen türleri hücredeki normal metabolik ve sinyal iletimi olaylarında meydana gelirler. Aynı zamanda çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Başta lipitler olmak üzere proteinler ve nükleik asitler gibi moleküllerin yapısını ve fonksiyonunu bozarlar (47,48).

Reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmaya çalışan enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler vardır. Enzimatik sistemler; süperoksit dismutaz, glutatyon

peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalazdır. Enzimatik olmayan sistemler ise; indirgenmiş glutatyon, E ve C vitamini, beta karoten olarak sayılabilir.

Antioksidatif sistemde yer alan her eleman spesifik bir aktivite ya da konsantrasyona sahiptir, ancak organizmanın antioksidan kapasitesini artırmak üzere sinerjik çalışırlar. Antioksidatif etki için GPx GSH'ü kullanır. Bu reaksiyonda GSH okside glutatyon haline gelir. Okside glutatyon glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar GSH haline geçer. Oksidatif stres GSH havuzunu azaltır. Aynı zamanda GSH düzeyi konjugasyon reaksiyonlarının ya da hücrenin GSH'ü rejenere etme yeteneğinin azalması nedeniyle düşebilir (49). Bizim çalışmamızda da diazinon uygulanan grupta AKG hücrelerinde GSH seviyeleri önemli oranda azaldı. Bu durum kronik OF uygulamasının meydana getirdiği oksidatif stres nedeniyle gangliyon hücrelerinde antioksidan defans elemanlarının kullanıldığını, ROT'nin hücrelerde oluşturduğu hasara bağlı olarak GSH havuzunun tamamlanamadığını düşündürmektedir.

Birçok yazar, insan ve hayvanlarda OF bileşikleri ile meydana gelen hem akut hem de kronik intoksikasyonun, çeşitli organlarda antioksidatif enzimlerin aktivitelerini değiştirerek ya da nonoksidatif antioksidanların miktarını azaltarak oksidatif stresi indüklediğini düşünmektedir. Aynı yazarlar artmış ROT gibi lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA düzeylerinin artışı ile de oksidatif stresi göstermişlerdir (41,50,51). Biz de çalışmamızda lipit peroksidasyonunu MDA düzeyleri ile değerlendirdik. Diazinonla oluşturduğumuz kronik intoksikasyon çalışmasında diazinon grubunda MDA düzeylerini artmış olarak tespit ettik.

Ratlarda oluşturulan subkronik OF intoksikasyonunda diazinon karaciğer hücrelerinde artmış enerji ihtiyacının göstergesi olan vakuollere ve mitokondrilerde şişmeye neden olmuştur (52).

Birçok çalışmada OF'ların antioksidatif parametreler üzerine etkileri eritrositler ve karaciğer dışındaki çeşitli organlarda da gösterilmiştir. Beyin dokusu kolayca peroksidasyona giden çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasara özellikle hassastır. Dahası beyin dokusu nispeten düşük antioksidan enzim aktivitesine rağmen yüksek miktarlarda oksijen kullanır (50,53). Bizde çalışmamızda kronik intoksikasyonun arka kök gangliyon hücrelerine etkilerini

değerlendirdik. Lipit peroksidasyonunun arttığını, glutatyon ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin düştüğünü izledik.

Vidyasagar ve arkadaşları akut OF intoksikasyonu ile gelen hastalarda eritrosit asetilkolinesteraz aktivitesindeki azalma kadar MDA ve SOD düzeylerinde artış olduğunu gösterdiler. Organofosfat intoksikasyonlarının klasik pralidoksim tedavisinden sonra da oksidatif stres parametrelerinin düzelmediğini gördüler. Lipit peroksidasyonundaki artış hücre ölümü ile sonuçlanan hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olur (54). Rajnbar ve arkadaşları da akut OF intoksikasyonu ile gelen hastalarda plazma total antioksidan kapasite, total tiyol gruplarının azaldığını ve tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin arttığını bildirdiler. Organizma bu kısa periyotta antioksidanların tüketimini kompanse edemediği için reaktif oksijen türlerinin ani aşırı üretimi lipit peroksidasyonunda artışa neden olur (42). Organofosfatlara kronik maruziyetin değerlendirildiği birkaç çalışmada DNA'da oksidatif hasar gösterilmiştir (10,55).

Organofosfatlara kronik düşük doz maruziyet spesifik semptomlara neden olmadığından tanı koymak oldukça güçtür. Organofosfat intoksikasyonlarının belirteci olan AKE aktivitesi değişmeden kalmasına rağmen bazı antioksidatif parametrelerde değişiklikler olmaktadır. Bazı çalışmalar OF'lara mesleki olarak maruz kalan kişilerin eritrositlerinde antioksidatif enzim aktivitelerinin arttığını, asetilkolinesteraz aktivitesinin değişmediğini göstermiştir. Oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi profesyonel olarak OF'lara maruz kalan kişilerin monitorizasyonunda önemlidir (10,56).

Literatüre bakıldığında OF intoksikasyonlarında en sık test edilen antioksidan bileşik NAS'dir. N-Asetilsistein organizmaya sülfidril grupları sağlayarak hücre içi GSH düzeylerini artırır. Doğrudan ROT'ni azaltıcı etkisi vardır. Geniş terapötik indekse sahip olduğundan güvenli bir bileşiktir. Organofosfat intoksikasyonları için antidot olarak önerilmiştir. Kişilerin OF'lara toleransı hücre içi GSH düzeylerini koruyabilme ve devam ettirebilme yeteneklerine bağlıdır (57,58).

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda antioksidan özelliğinden yaralanmak üzere grup N'deki ratlara NAS verdik. Arka kök gangliyon hücrelerinde GSH ile

GPx düzeylerinde artış ve lipit peroksidasyonunda azalma izledik. Ayrıca diazinon ile intoksikasyon oluşturduğumuz grup D + N'deki ratlara da diazinon ile eş zamanlı NAS uyguladık. Bu grup ratlarda da yalnız diazinon verilen ratlara kıyasla GSH ile GPx düzeylerinde artış ve lipit peroksidasyonunda azalma olmakla birlikte hücreleri canlı tutmada yeterli olmamıştır. Buna neden olarak NAS dozunun yetersiz olması düşünülebilir. Antioksidan defansda birçok mekanizma rol oynamaktadır. N-Asetilsistein ile birlikte başka antioksidan sistemlerin de desteklenmesi gerekebilir.

Oksidatif stres GSH havuzunu azaltır, antioksidan defans bozulur (59). Biz de çalışmamızda kronik düşük doz diazinon zehirlenmesinin GSH ve GPx düzeylerini azalttığını gösterdik. Aynı zamanda ROT'nin temel hedeflerinden biri olan lipit peroksidasyonunun diazinonla arttığını MDA düzeylerindeki artışla ortaya koyduk. N-Asetilsistein uygulaması ile lipit peroksidasyonu azalıp antioksidan mekanizmaların bir kısmı düzeldi. Ancak bunlar apoptozisin engellenmesinde yeterli olmadı. Daha önce yapılan çalışmalarda lipit peroksidasyonun azaldığı, antioksidan mekanizmaların bir kısmının düzeldiği gösterilmekle birlikte bu sonuçların hücre fonksiyonlarını ne derecede koruduğunu göstermemişlerdir.

Diazinonla akut, subakut intoksikasyon oluşturulan ratlarda E vitamini ve NAS'in koruyucu etkisi gösterilmiştir. Ancak diazinonun neden olduğu AKE inhibisyonuna etkisi olmamıştır (58,60). Methyl parathion ile subakut intoksikasyon oluşturulan ratlarda E ve C vitamini uygulaması ile artmış MDA seviyelerinde önemli düşme izlenmiştir. Yazarlar bu kombinasyonun ROT'ni inaktive ettiğini bildirmişlerdir (61).

Büyükokuroğlu ve arkadaşları teofilin ve sildenafil gibi fosfodiesteraz enzim inhibitörlerinin farklı organlarda oksidatif stresi başarı ile azalttığını bildirmişlerdir. Ancak henüz hangi mekanizma ile gerçekleştiği açık değildir (62). Ghafour-Rashidi ve arkadaşları da akut diazinon intoksikasyonunun neden olduğu oksidatif stres ve hipergliseminin restorasyonunda teofilin ve sildenafilin antioksidan potansiyelini gözlemlemişlerdir. Aynı şekilde güçlü endojen bir antioksidan olan melatoninin de akut fenthion intoksikasyonuna bağlı oksidatif stresde koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (63).

Reaktif oksijen türleri hücreler için yalnızca tehlikeli moleküller değildirler aynı zamanda sinyal iletim yolağında fizyolojik rol oynarlar. Reaktif oksijen türleri farklı moleküler mekanizmalarla erken ve geç fazda apoptozisin regülasyonunda görev alırlar. Apoptozis sırasında mitokondriyal membran permeabilitesi artar ve proapoptotik faktörlerin sitozole geçişi apoptozise neden olur. Apoptozisin başlatılmasında mitokondri başrolü oynarken mitokondri tarafından üretilen ROT hücreyi ölüme götürür. Bu toksik bileşikler normalde hücre tarafından detoksifiye edilir, yetmezlik durumunda oksidan stres meydana gelir (64).

Normal fizyolojik koşullarda hücrelerde, az miktarda da olsa ROT meydana gelmekte, bunlar varolan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Oksidan stres ile antioksidan defans arasındaki denge defans aleyhine bozulduğunda hücreyi ölüme kadar götürebilen değişiklikler meydana gelmektedir. Kalsiyum iyonunun hücre içi miktarındaki değişimler de oksidatif stresle tetiklenmektedir. Bu değişimler hücrenin ortadan kaldırılmasını başlatabilmektedir (65). Bizim çalışmamızda da kronik subletal doz diazinon uygulaması AKG hücrelerinde oksidan strese neden oldu. Bu gruptaki hayvanlarda lipid peroksidasyonu arttı. Antioksidan mekanizmalardan olan GPx ve GSH düzeyleri kullanıldıkları için azaldı.

Organofosfatlara kronik maruziyet sonrasında birçok hastada nöropsikiyatrik bozukluklar meydana gelmektedir. Bu bozukluklardan biri de nöropatik ağrıdır. Nöropatik ağrının ortaya çıkışında ve ortadan kaldırılmasında hücre içi kalsiyum iyonu değişimlerinin kontrolü önemli rol oynamaktadır. Daha önce de bahsettiğimiz gibi hücre içerisinde kalsiyum iyonunun aşırı artışı hücreleri ya çalışamaz hale getirmekte veya ölüme kadar götürmektedir. Hücre zarında bulunan kalsiyum kanallarındaki fonksiyon bozuklukları da hücre içerisindeki Ca^{+2} seviyelerinin ve hücrenin uyarılabilirlik sıklığının değişimi ile sonlanmaktadır. Primer eferent nöronların uçlarında ve sinir hücrelerinin gövdelerinde bulunan T tipi Ca^{+2} kanallarının aktivitesinin farklı kimyasal ajanlarla azaltılmasının sinir hücresi hasarıyla oluşan nöropatik ağrının giderilmesinde etkin olduğu bildirilmiştir. Hücre içerisine giren Ca^{+2} , glutamat gibi ağrının algılanmasında rol oynayan nörotransmitter maddelerin sinapslara boşaltılmasına neden olur. Ağrının şiddetinin azaltılmasında Ca^{+2} 'un hücre içerisine giriş yollarını bloke etmek hedeflenmektedir. Schroeder ve

arkadaşları opiatların G proteini aracılığı ile presinaptik uçlardaki Ca^{+2} 'un hücre içerisine girişini bloke ederek ağrı algısını azalttığını bildirmişlerdir. Ca^{+2} homeostazisinde anormallikler hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarının artmasına neden olmakta ve bu anormal artış da uyanabilir hücrelerde anormal ağrının hissedilmesine neden olmaktadır (66).

Arka kök gangliyon hücreleri vücutta ağrı duyumunun oluşumunda önemli role sahiptir. Arka kök gangliyon hücrelerinin zarlarında oluşabilecek oksidatif hasara bağlı değişiklikler bu hücrelerin harabiyetine ve sinir hücreleri arasındaki iletim bozukluklarına neden olabilmektedir. Duyusal nöronların bozukluklarına bağlı hastalıklarda altta yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir. Aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stresin AKG hücre patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösteren artan sayıda kanıt vardır (67,68).

Çalışmamızda apoptozisin engellenememesinin aşırı ROT artışına bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Farklı dozlarda NAS uygulanarak çalışma tekrarlanabilir. Antioksidan defansda yer alan diğer mekanizmaların da desteklenmesi gerekebilir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar kronik OF zehirlenmesinin arka kök ganglion hücrelerinde oksidan strese ve apoptozise neden olduğunu gösterdi. N-Asetilsistein uygulaması antioksidan defansı desteklemiş ancak hücrelerin korunmasında yetersiz kalmıştır. Bu çalışmanın farklı doz NAS uygulamaları ya da farklı kombinasyonlarda antioksidanlarla ile yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

Organofosfat intoksikasyonlarında antidot tedavi ile birlikte NAS kullanımı sekelleri önlemede yardımcı olabilir. N-Asetilsistein terapötik etkisi kadar proflaktik olarak da rol oynar. Organofosfat intoksikasyonlarında geleneksel antidot tedavisi olan atropin ve oksim tedavilerine antioksidan maddelerin eklenmesi çok önemlidir. Farklı antioksidanların farklı OF bileşikleriyle olan intoksikasyonlardaki koruyucu özellikleri ve etkinliği klinik çalışmalarla da desteklenmelidir.

ÖZET

Organofosfatlar tıp, endüstri ve tarımda yaygın olarak kullanılan potent nörotoksik kimyasal ajanlardır. Birçok çalışmada akut kolinerjik toksisiteye neden olan akut yüksek doz maruziyet ya da uzun dönem sublinik düşük dozlarda maruziyetten kaynaklanan uzun dönem kalıcı kronik nörotoksisite semptomlarının olduğu bildirilmiştir. Organophosphate induced chronic neurotoxicity (OPICN) olarak isimlendirilen bu nörodejeneratif bozukluğun mekanizması henüz tam olarak bilinmese de yüksek toksik doz organofosfat bileşiklerinin beyinde nekrotik nöronal hücre ölümlerine, subletal ya da sublinik dozların ise apoptotik nöronal hücre ölümü ve oksidatif strese neden olduğunu düşündürmektedir.

Etik kurul onayı alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g, 12-16 haftalık 36 adet erkek Wistar albino rat rastgele dört gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki (Grup K, n=8) ratlara hiçbir uygulama yapılmadı. N-Asetilsistein (NAS) grubundaki (Grup N, n=8) ratlara 150 mg/kg NAS, diazinon grubundaki ratlara (Grup D, n=10) 30 mg/kg diazinon diazinon + NAS grubundaki ratlara (Grup D + N, n=10) ise 30 mg/kg diazinon ve 150 mg/kg NAS 28 gün gavaj yolu ile verildi. Yirmi dokuzuncu gün arka kök gangliyon hücreleri çıkartılarak MDA, glutasyon, glutasyon peroksidaz, kalsiyum sinyali ve MTT analizleri yapıldı.

Grup K ile kıyaslandığında grup D'de arka kök gangliyon hücrelerinde lipit peroksidasyonunun arttığı, indirgenmiş glutasyon ve glutasyon peroksidaz düzeylerinin azaldığı görüldü. Ca^{+2} sinyali ölçümlerinde diazinon grubunda hücre içi kalsiyum akışının önemli oranda attığı tespit edildi. MTT analizinde grup K ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının yaklaşık grup D'de % 58, grup D + N'de ise % 60 olduğu görüldü ($p<0.001$). Diazinon uygulamasına N-asetilsistein eklenmesi lipit peroksidasyonunda önemli azalma, indirgenmiş glutasyon ve glutasyon peroksidaz düzeylerinde önemli artışla sonuçlandı. Bu grupta hücre içi kalsiyum salınımı diazinon grubuna göre düşük oldu.

Sonuç olarak kronik organofosfat zehirlenmesi arka kök gangliyon hücrelerinde oksidan strese ve apoptozise neden oldu. N-Asetilsistein uygulaması antioksidan defansı desteklemiş ancak hücrelerin korunmasında yetersiz kalmıştır. Organofosfat maruziyetinde farklı antioksidanların koruyucu etkiliğini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Diazinon, N-Asetilsistein, oksidatif stres, apoptozis, arka kök gangliyonları

SUMMARY

Organophosphorus compounds are potent neurotoxic chemicals that are widely used in medicine, industry, and agriculture. Many studies have reported long-term, persistent, chronic neurotoxicity symptoms in individuals as a result of acute exposure to high doses that cause acute cholinergic toxicity, or from long-term, low-level, subclinical doses of these chemicals. The author attempts to define the neuronal disorder that results from organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity (OPICN), which leads to long-term neurological and neurobehavioral deficits. Although the mechanisms of this neurodegenerative disorder have yet to be established, the sparse available data suggest that large toxic doses of organophosphorus compounds cause acute necrotic neuronal cell death in the brain, whereas sublethal or subclinical doses produce apoptotic neuronal cell death and involve oxidative stress.

After approval of ethic committee 36 Wistar albino male rats, 3-4 months of age and weighing 250-300 g, were randomly allocated into 4 groups. Group C were administered anything. Group D rats were orally administered diazinon at dose 30 mgkg⁻¹ body weight for consecutive 28 days. Group N rats were administered N-Acetylcystein (NAC) at dose 150 mgkg⁻¹ body weight for consecutive 28 days. Group D+N rats were orally administered diazinon in dose 30 mgkg⁻¹ and NAC at dose 150 mgkg⁻¹ body weights for consecutive 28 days. On 29th day were analyzed the levels of lipid peroxidation (MDA) and glutathion, the activity of glutathion peroxidase, calcium signalling, MTT in the dorsal root ganglia. Administration of diazinon resulted in significant increase in lipid peroxidation level and significant decrease in glutathion and the activity of glutathion peroxidase compared to control group. Group D rats were revealed a significantly increasing in [Ca²⁺]_i compared to group K. Viability via MTT analyze showed significant decrease in group D and group D+N compared to group K (58% and 60% respectively). Supplementation of NAC to diazinon showed significant alteration in glutathion and the activity of glutathion peroxidase. Cytosolic Ca²⁺ release was significantly lower in group D+N than in those group D (p<0,05).

In conclusion, chronically organophosphate intoxication resulted in oxidative stress and apoptosis. Supplementation of NAC did not have protective effects on [Ca²⁺]_i release and apoptosis in DRG cells although enhanced the antioxidant defence. Experimental trials are needed to explore efectiveness of different antioxidants in protection of those who are in exposure to OP compounds.

Key words: Diazinon, N-Acetylcystein, oxidative stres, apoptosis, dorsal root ganglia

KAYNAKLAR

1. Güven M. Organik fosfor zehirlenmeleri. *Yoğun Bakım Derg* 2004; 4:113-21.
2. Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid* 2005; 13:1744-55.
3. Karalliedde L, Senanayake N. Organophosphorus insecticide poisoning. *Br J Anaesth* 1989; 63:736-50.
4. Pawar KS, Bhoite RR, Pillay CP, Chavan SC, Malshikare DS, Garad SG. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368:2136-41.
5. Sungur M, Güven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care* 2001; 5:211-5.
6. Yang CC, Deng JF. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. *J Chin Med Assoc* 2007; 70:467-72.
7. Pancetti F, Olmos C, Dagnino-Subiabre A, Rozas C, Morales B. Noncholinesterase effects induced by organophosphate pesticides and their relationship to cognitive processes: implication for the action of acylpeptide hydrolase. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2007; 10:623-30.
8. Gbaruka BC, Ogwo EI, Igwe JC, Yu H. Organophosphate induced chronic neurotoxicity: Health, environmental and risk exposure issues in developing nations of the world. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8(20): 5137-41.
9. Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64:463-8.
10. Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N, Abdollahi M. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24:439-45.
11. Fuchs A, Rigaud M, Sarantopoulos CD, Filip P, Hogan QH. Contribution of calcium channel subtypes to the intracellular calcium signal in sensory neurons: the effects of injury. *Anesthesiology* 2007; 107:117-27.
12. Hogan QH. Role of decreased sensory neuron membrane calcium currents in the genesis of neuropathic pain. *Croat Med J* 2007; 48:9-21.
13. Ng V, Koh D, Wee A, Chia SE. Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occup Med* 2009; 59:120-2.
14. Marinovic J, Ljubkovic M, Stadnicka A, Bosnjak Z J, Bienengraeber M. Role of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel in oxidative stress-induced apoptosis: mitochondrial connection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1317-25.
15. Jayawardane P, Senanayake N, Dawson A. Electrophysiological correlates of intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning. *Clin Toxicol* 2009; 47:193-205.
16. Abou-Donia MB, Lapadula DM. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: type I and type II. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.1990; 30:405-40.
17. Jokanović M, Kosanović M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010; 29:195-201.
18. Stokes L, Stark A, Marshall E, Narang A. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. *Occup Environ Med* 1995; 52: 648-53.
19. Marrs TC. Toxicological Evaluations Diazinon (addendum). Food Standards Agency, London, United Kingdom. Pesticide residues in food 2001.

20. Toxicological Profile for Diazinon. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1996.
21. Bagh MB, Thakurta IG, Biswas M, Behera P, Chakrabarti S. Age-related oxidative decline of mitochondrial functions in rat brain is prevented by long term oral antioxidant supplementation. *Biogerontology* 2011; 12:119-31.
22. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119:598-620.
23. Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 2004; 62:497-504.
24. Mansour SA, Mossa AH. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2009; 93: 34-9.
25. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; 18(9): 567-79.
26. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004; 134(11): 3143-63.
27. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 2004; 90(6): 1281-9.
28. Sharma DR, Sunkaria A, Bal A, Bhutia YD, Vijayaraghavan R, Flora S J S, et al. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 240(2): 208-18.
29. Pushpinder K, Bishan R, Ranjana MW, Gill K D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology* 2007; 28(6): 1208-19.
30. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; 38: 325-9.
31. Damasceno A, França MC, Nucci A. Chronic acquired sensory neuron diseases. *European Journal of Neurology* 2008; 15(12): 1400-5.
32. Geza G, Marcel R, Koopmeiners AS, Poroli M, Vasiliki J, Hogan QH. Calcium signaling in intact dorsal root ganglia: New observations and the effect of injury. *Anesthesiology* 2010; 113(1): 134-46.
33. Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, et al. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Experimental Neurology* 2004; 188(1): 149-60.
34. Kamanyire R, Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occupational Medicine* 2004; 54(2): 69-75.
35. Hayes AL, Wise RA, Weir FW. Assessment of occupational exposure to organophosphates in pest control operators. *American Industrial Hygiene Association Journal* 2010; 41(8): 568-75.
36. Jaga K, Dharmani C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Pan American Journal of Public Health* 2003; 14(3): 171-85.
37. Jaipieam S, Visuthismajarn P, Siriwong W, Borjan M, Robson MG. Inhalation exposure of organophosphate pesticides by vegetable growers in the Bang-Rieng subdistrict in Thailand. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Environmental and Public Health* 2009; 1-6.

38. Bouchard M, Carrier G, Brunet RC, Dumas P, Noisel N. Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in a group of horticultural greenhouse workers. *Ann Occup Hyg* 2006; 50(5): 505-15.
39. Cocker J, Mason H J, Garfitt S J, Jones K. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology letters* 2002; 134(1-3): 97-103.
40. Davies R, Ahmed G, Freer T. Chronic exposure to organophosphates: background and clinical picture. *Advances in Psychiatric Treatment* 2000; 6: 187-92.
41. Abdollahi M, Rainba A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticide and oxidative stress: a review. *Med Sci Monitor* 2004; 10: 141-7.
42. Ranjbar A, Solhi H, Mashayekhi FJ, Susanabdi A, Rezaie A, Abdollahi M. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environ Toxicol and Pharmacol* 2005; 20: 88-91.
43. Chambers E, Carr RL, Boone S, Chambers HW. The metabolism of organophosphorus insecticides. *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, USA, Ed. II, 2001; 2: 919-27.
44. Jakoby WB, Ziegler DM. The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* 1990; 265: 29715-8.
45. White RE. The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases. *Pharmacol Ther* 1991; 49: 21-42.
46. Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Sci World J* 2006; 6: 295-310.
47. Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipids rafts and oxidative stress – induced cell death. *Antioxidants and redox signaling*.2007; 9: 1-13.
48. Zasadowski A, Wysocki A, Barski D, Spodniewska A. Some aspects of reactive oxygen species (ROS) and antioxidative system agent's action. *Acta Toxicol* 2004; 12: 5-21.
49. Rahimi R, Abdollahi M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 88:115-21.
50. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 205-8.
51. Poovala VS, Huang H, Salahudeen AK. Role of oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1746-52.
52. Kalender Y, Kalender S, Uzunhisarcikli M, Ogutcu A, Acikgoz F, Durak D. Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. *Toxicology* 2004; 200: 205-11.
53. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
54. Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J Pharmac* 2004; 36: 76-9.
55. Tope AM, Panemangalore M. Assessment oxidative stress due to exposure to pesticides in plasma and urine of traditional limited resource farm workers: Formation of DNA-adduct 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine (8-OHdG). *J Environ Sc Health* 2007; 42: 151-5.
56. Gomes J, Dawodu AH, Lloyd O, Revitt DM, Anilal SV. Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Human and Experimental Toxicology* 1999; 18: 33-7.

57. Lukaszewicz-Hussain A, Moniuszko-Jakoniuk J, The influence of pretreatment with N-acetylcysteine on serum cholinesterase activity and liver glutathione level in rats intoxicated with chlorfenvinphos. *Pol J Environ Stud* 2004; 13(1): 69-72.
58. Cankayali I, Demirag K, Eris O, Ersoz B, Moral AR. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. *Adv Ther* 2005; 22: 107-16.
59. Rice-Evans C, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 77-96.
60. Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective effects of alpha-tocopherol and N-Acetylcysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Toxicology mechanisms and methods* 2007; 17(2): 109-15.
61. Guney M, Oral B, Demirin H, Ozguner M, Take G, Mungan T, Altuntas I. Evaluation of caspase apoptosis during methyl parathion - induced endometrial damage in rats: Ameliorating effect of vitamins E and C. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 221-7.
62. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y, Aslan A. Antioxidant role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol Toxicol* 2008; 24: 151-8.
63. Ghafour-Rashidi Z, Dermenaki-Farahani E, Aliahmadi A, Esmaily H, Mohammadirad A, Ostad SN, Abdollahi M. Protection by cAMP and cGMP phosphodiesterase inhibitors of diazinon-induced hyperglycemia and oxidative/nitrosative stress in rat Langerhans islets cells: Molecular evidence for involvement of non-cholinergic mechanisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 87: 261-70.
64. Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002; 84(2-3): 131-41.
65. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell* 2007; 131(6): 1047-58.
66. Gemes G, Rigaud M, Koopmeiners AS, Poroli MJ, Zoga V, Hogan QH. Calcium signaling in intact dorsal root ganglia: New observations and the effect of injury. *Anesthesiology* 2010; 113: 134-46.
67. Massicotte C, Jortner BS, Ehrich M. Morphological effects of neuropathy-inducing organophosphorus compounds in primary dorsal root ganglia cell cultures. *NeuroToxicology* 2003; 24: 787-96.
68. Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *PNAS* 2002; 99(12): 8360-5.