

**PESTİSİD KALINTISI BULUNAN İÇME  
SULARIYLA BESLENEN  
HAYVANLARDA KAN LİPİD  
PEROKSİDASYONU VE  
ANTIOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİ**

**Hüseyin TUNÇMEN**

**Yüksek Lisans Tezi  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2004**

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PESTİSİD KALINTISI BULUNAN İÇME SULARIYLA BESLENEN  
HAYVANLARDA KAN LİPİD PEROKSİDASYONU VE  
ANTİOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİ**

**HÜSEYİN TUNÇMEN**

**Danışman: Yrd.Doç.Dr.M.Nalan TÜZMEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ISPARTA, 2004**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Namık DELİBAŞ

Üye : Prof.Dr. A.Güleren ALSANCAK

Üye : Yrd.Doç.Dr. M.Nalan TÜZMEN

ONAY

Bu tez ...../...../20.. tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Prof.Dr.Remzi KARAGÜZEL**  
**Enstitü Müdürü**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 SERBEST RADİKALLER .....	2
1.2 METABOLİZMADAKİ SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI .....	13
1.3 ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ .....	15
1.4 PESTİSİTLER VE OKSİDATİF STRES .....	20
<b>2 KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>29</b>
3.1 MATERYAL .....	29
3.1.1 Deneysel hayvanlarının gruplandırılması: .....	29
3.1.2 Kan numunelerinin hazırlanması: .....	29
3.1.3 Kullanılan malzeme ve cihazlar: .....	30
3.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler: .....	31
3.1.5 Kullanılan çözeltiler .....	33
3.2 METOD.....	36
3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD) tayini.....	36
3.2.2 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tayini .....	38
3.2.3 Katalaz (CAT) tayini .....	39
3.2.4 Lipid peroksidasyon tayini .....	40
3.2.5 GSH tayini.....	41
<b>4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b> .....	<b>43</b>
<b>5 KAYNAKLAR</b> .....	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>55</b>

## ÖZET

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

Uluborlu'dan Hoyran/Eğirdir gölüne kadar uzanan yaklaşık 13000 hektar alanı kaplayan Uluborlu- Senirkent-Büyükkabaca ovasında yoğun bir şekilde sulu tarım ve meyvecilik yapılmakta ve yılda yaklaşık 15000 ton gübre, 500 ton tarımsal ilaç doğrudan yer altı sularına karışmaktadır. Büyükkabaca kasabasının içme suyu da bu ovaya açılmış 150 metrelik iki sondaj kuyusundan temin edilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, pestisid kalıntılı Büyükkabaca içme suyunun oksidan-antioksidan sisteme etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Pestisid kalıntısı içeren su ile beslenen deney grubu ratların kanında, kontrol grubuna kıyasla SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri azalırken CAT aktivitesi ile MDA ve GSH düzeyleri artış göstermiştir. Reaktif oksijen türlerindeki (ROS) pestisid kaynaklı olası artış, GSH-Px aktivitesini inhibe etmiş olabilir. Lipid peroksidasyon ürünlerindeki (MDA) artışın, bu antioksidan enzimin koruyucu özelliğindeki azalmaya bağlı olduğu düşünülebilir. Sonuç olarak, lipid peroksidasyonundaki bu artışın, bölge insanının sağlığını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amacıyla ileri çalışmalar yapılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Serbest radikal, antioksidan enzim, lipid peroksidasyonu, pestisid

## ABSTRACT

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

Uluborlu-Senirkent- Büyükkabaca plain covers an area of 13000 hectares starting from Uluborlu to Hoyran/ Eğirdir Lake. In this region, agriculture and fruit growing are heavily done and each year about 15000 tons of fertilizer, 500 tons of pesticides contaminate the ground water. Drinking water of Büyükkabaca are obtained from two 150 meter aquifers in this plain. Therefore, aim of this study is to investigate effects of pesticide on oxidant/antioxidant system in Büyükkabaca's drinking water.

In the blood of the rats administered water containing pesticide residue, SOD and GSH-Px enzyme activities decreased, CAT activity, MDA and GSH levels enhanced compared to the control group. Probable increase of reactive oxygen species (ROS) caused by pesticides can inhibit GSH-Px activity. Also, the increase in MDA can be depend on the decrease of the protective properties of this enzyme. Therefore, further studies must be done to investigate the effect of the increased lipid peroxidation on human health in that region.

**Key words:** Free radical, antioxidant enzyme, lipid peoxidation, pesticide

## ÖNSÖZ

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

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

Tez çalışmamın deneysel kısmında laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Namık DELİBAŞ'a, emeği geçen tüm arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında imkanlarından faydalandığım Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

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

**SİMGELER DİZİNİ**

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



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 1.1 Lipid peroksidasyonu.....	11
Şekil 1.2 Toksik Azot Oksitleri.....	12
Şekil 1.3 Memeli hücrelerinde oksijen, azot radikalleri ile diğer reaktif türlerin üretimi .....	13
Şekil 1.4 Glutasyon Redüktaz reaksiyonları.....	19
Şekil 1.5 Memeli hücrelerinden oksijen, azot serbest radikalleri ile diğer reaktif türlerin uzaklaştırılması.....	19
Şekil 1.6 Pestisidlerin kontaminasyon yolları.....	22
Şekil 3.1 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin konsantrasyona bağımlı değişimi.....	37
Şekil 3.2 Kan SOD inhibisyon yüzdesinin log C'ye bağımlı değişimi.....	38
Şekil 3.3 Glutasyon kalibrasyon grafiği .....	42
Şekil 4.1 Eritrositlerdeki enzim aktiviteleri ile MDA ve GSH düzeyleri .....	44

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar .....	30
Çizelge 3.2 SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler .....	31
Çizelge 3.3 GSH-Px tayininde kullanılan kimyasal maddeler.....	32
Çizelge 3.4 CAT tayininde kullanılan kimyasal maddeler .....	32
Çizelge 3.5 Lipid peroksidasyon tayininde kullanılan kimyasal maddeler.....	32
Çizelge 3.6 GSH tayini için kullanılan kimyasal maddeler .....	33
Çizelge 4.1 Eritrosit enzim aktiviteleri ile kan GSH ve MDA düzeyleri.....	43

## 1 GİRİŞ

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve hücrelerin serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı koyabilme yetileri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder (Simonian ve Coyle, 1996). Reaktif oksijen bileşiklerinin herhangi bir nedenle aşırı oluşumu veya antioksidan savunma sistemi ve onarım sistemlerindeki yetersizlikler sonucu oksidatif stres gelişir (Kökoğlu, 1998). Oksidatif stres, serbest radikaller üretildiğinde artar, serbest radikallerin temizlenmesiyle veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Oksidatif stresin kronikleşmesi, hücrelerde prooksidan-antioksidan dengenin bozulmasına ve oksidatif hasarın başlamasına neden olur. Bu dengesizlik, hücresel disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilen oksidatif modifiye moleküllerin yapılanmasıyla sonuçlanır (Reiter, 1998). Oksidatif etki genelde proteinlerin modifikasyonuna, mitokondrial fonksiyon bozukluğuna neden olabildiği gibi lipid peroksidasyonuna ve DNA'daki hasarın artmasına da yol açabilmektedir.

Pestisidler, ürün kalitesi ve verimliliği artırmak, tarımdaki zararlı populasyonu kontrol altına almak amacıyla kullanılan toksik maddelerdir. Toksik tarımsal ajanlar,

- besin zincirindeki biyolojik birikme,
- çiftlik hayvanları ve tarımda pestisidlerin kullanımının aşırılığı,
- pestisid kalıntılarının bozunmasından önce ürün hasadının yapılması,
- yiyeceklerin hazırlanması, satılması, taşınması ya da depolanması sırasındaki kirlenme,
- pestisid atıklarının imha edilmesindeki yetersizlikler nedeniyle insan sağlığını olumsuz etkilemektedirler.

Ayrıca, tarımda yaygın olarak kullanılan pestisidler, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna

da yol açarlar. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebildikleri gibi enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına da neden olabilirler.

Pestisidler aracılığıyla oluşan bu radikaller, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna neden olurlar. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılmadıklarında oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir. Literatürlerde, pestisidlere maruz kalan kişilerde, akciğer ve mesane kanseri ile lösemi riskinin önemli derecede artış gösterdiği belirtilmektedir.

Uluborlu'dan Hoyran/Eğirdir gölüne kadar uzanan yaklaşık 13000 hektar alanı kaplayan Uluborlu- Senirkent-Büyükkabaca ovasında yoğun bir şekilde sulu tarım ve meyvecilik yapılmaktadır. Bu ovada tarımsal ilaç olarak Parathion ve Methidathion (I.sınıf toksik maddeler) gibi insektisidler kullanılmakta ve yılda yaklaşık 15000 ton gübre, 500 ton tarımsal ilaç doğrudan yer altı sularına karışmaktadır. Büyükkabaca kasabasının içme suyu da bu ovaya açılmış 150 metrelik iki sondaj kuyusundan temin edilmektedir. Son yıllarda kasaba halkında kanser vakalarının artış göstermesi göz önünde bulundurulacak olursa, hayvan denemesi ile pestisidlerin oksidan-antioksidan sisteme etkisi belirlenerek gerekli önlemler alınması doğrultusunda girişimlerde bulunulabilir.

Bu amaçla, bu çalışmada, pestisid kalıntılı Büyükkabaca içme suyunun oksidan-antioksidan sisteme etkisi belirlenmiş ve pestisid aracılı radikal oluşumunun bölge insanının sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği tartışılmıştır.

## **1.1 Serbest Radikaller**

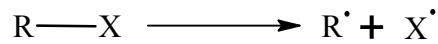
Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler.

Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" denir (Halliwell ve Chirico, 1993). Serbest radikal, en dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektron içeren herhangi bir atom, atom grubu ya da moleküldür (örneğin nitroz oksid [NO] ya da azot dioksit [NO<sub>2</sub>]). Biradikal, dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içerir (örneğin moleküler oksijen [O<sub>2</sub>]). Radikal iyon ise pozitif (örneğin [H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>]) ya da negatif (örneğin [O<sub>2</sub><sup>-</sup>]) bir yük taşıyan serbest radikaldir (Pryor, 1982). Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş tek elektron içeren bu bileşikler kendi orbitallerini tamamlamak için komşu moleküllerden elektron kopararak zincir reaksiyonlarını başlatırlar (Rabideau, 2001). Oksijen radikali serbest elektronunu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığı anda diğer molekülü kararsız hale getirir. Bu nedenle, serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler (Cheeseman ve Slater, 1993, Halliwell ve Chirico, 1993).

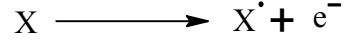
Serbest radikal türlerinin, oksijen-merkezli, karbon-merkezli (R<sup>•</sup>, RCOO<sup>•</sup>) ya da azot-merkezli (NO<sup>•</sup>, ONOO<sup>-</sup>) (olmak üzere birçok türü vardır Kalyanaraman, 1982; Whiteman vd., 1996). Serbest radikallerin birçoğu, kimyasalların bir yada daha fazla reaktif ara ürüne metabolize olmalarıyla meydana gelirler (Rabideau, 2001). Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak da adlandırılan serbest radikaller, süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) ve singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) gibi türleri içerirler.

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

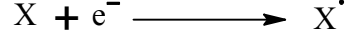
- 1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla



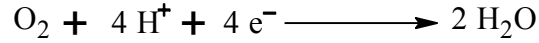
- 2- Bir molekülden bir elektronun ayrılmasıyla



3- Bir moleküle bir elektronun katılmasıyla

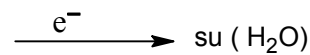
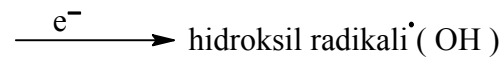
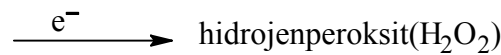
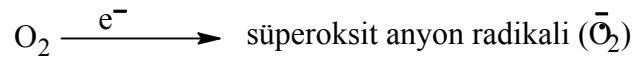


Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmediği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar. İnsan hücrelerine giren oksijenin %90'ından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



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

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



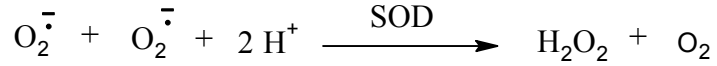
Yukarıdaki eşitliklerden de görüldüğü gibi, oksijenin suya indirgenmesi esnasında birçok serbest radikal ürünü ve oldukça reaktif türler oluşur. Birinci elektronun transferi ile süperoksit anyon radikali ( $O_2^- \cdot$ ) oluşur. İkinci elektronun alınmasıyla, peroksit radikalinin protonlanmış şekli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

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

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

- 1)NADPH oksidaz ile NADPH'nin oksidasyonu
- 2)Ksantin oksidaz ile hipoksantin yada ksantin oksidasyonu
- 3)Mitokondrial elektron taşıma sistemi yolu ile indirgenme ürünlerinin (örneğin, nikotinamid adenin dinükleotid [indirgenen; NADH], NADPH, ve  $FADH_2$  [indirgenen FAD]) oksidasyonu
- 4)Geçiş metallerinin eser miktarlarının varlığında monoaminlerin (dopamin,epinefrin, ve norepinefrin), flavinlerin ve hemoglobinin otooksidasyonu
- 5)Sitokrom P-450 ile  $O_2$ 'nin bir elektron kaybetmesi
- 6)Arginin ya da tetrahidrobiopterin eksikliğinde nNOS ya da eNOS ile  $O_2$ 'nin bir elektron kaybetmesi

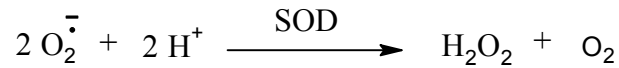
Diğer radikallerle kıyaslandığında süperoksit anyon radikalinin reaktivitesi çok düşüktür. Ancak bu radikal, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hidroperoksil radikali gibi oluşumuna neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Aynı zamanda  $O_2^{\cdot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



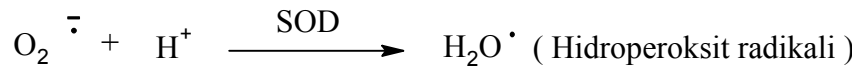
Bu reaksiyon difüzyon sınırlıdır ve bilinen en hızlı enzimatik reaksiyondur ( $k = 3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) (Donnelly, 1989). Süperoksit dismutaz enzimi bir metaloproteindir ve katalitik aktivitesi için Fe, Mn veya Cu'a gereksinim duyar.

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

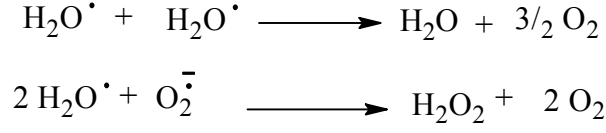
- 1- Daha önce de belirtildiği gibi, süperoksit anyon radikalleri SOD ile dismutasyona uğrayarak hidrojen peroksit oluşumuna yol açabilirler.



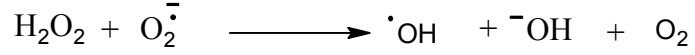
- 2-  $O_2^{\cdot -}$ , ortamdan bir proton alarak hidroperoksit radikali oluşturabilir.



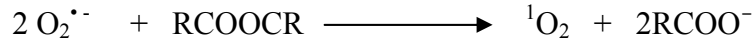




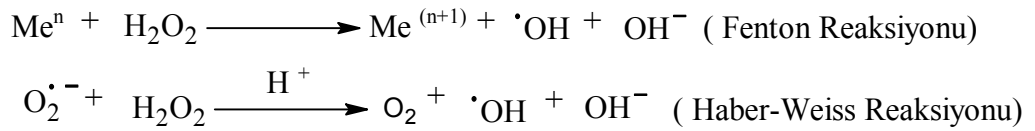
- 3- Süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ile tepkimeye girip hidroksil radikali oluşturabilir.



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



Hidrojen peroksit, süperoksit anyonlarının dismutasyonu sırasında, ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonunda, mitokondriyal elektron transportunda ve nötrofillerde üretilir (Chance vd., 1979; Halliwell ve Chirico, 1993).  $\text{H}_2\text{O}_2$ , küçük ve yüksüzdür; kolaylıkla hücre membranından difüze olur ve bu nedenle üretildiğinden uzak bölgelere de yayılabilir. Hidrojen peroksit, gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden önemli bir oksidandır. Geçiş metallere varlığında Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikale ( $\text{}^\bullet\text{OH}$ ) indirgenir (Reiter, 1998).

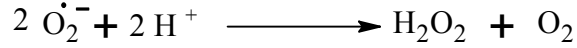


Hidrojen peroksit oluşum yolları aşağıda gösterilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993; Reiter, 1998):

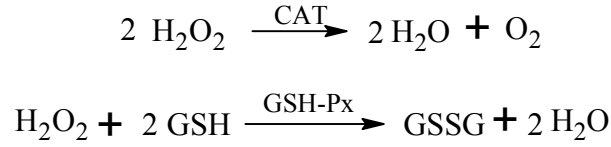
1. Oksijenin iki elektron ile indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



2. İki süperoksit anyon radikalinin tepkimeye girmesiyle  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2$  oluşur.



Hücrelerin çoğunda  $\text{H}_2\text{O}_2$ , iki önemli antioksidan enzimin fonksiyonuyla zararsız ürünlere dönüştürülebilir. Bunlar, katalaz (CAT) ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). GSH-Px, katalazın merkezi sinir sisteminin birçok bölgesindeki düşük aktivitesinden dolayı beyin için daha önemlidir (Jain vd., 1991). GSH-Px, indirgenmiş glutatyonun (GSH) disülfidine (GSSG) dönüşümü süresince hidrojen peroksit ve hidroperoksitleri sübstrat olarak kullanır (Guemouri vd., 1991).



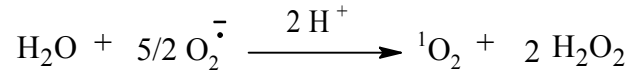
Oksijen radikalleri içerisinde en toksik ve en reaktif olanı hidroksil radikalidir ( $\cdot\text{OH}$ ). Yukarıdaki eşitliklerden de görüleceği üzere, hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde Haber-Weiss reaksiyonuna göre ya da bir metal kompleksi varlığında gerçekleşen Fenton reaksiyonuna göre  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in süperoksit anyonu ile indirgenmesiyle oluşturulur (McCord ve Day, 1978; Cheesemann ve Slater, 1993). Hidroksil radikali oluşur oluşmaz üretildiği yerin birkaç Å uzaklığındaki herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Yüksek reaktivliğinden dolayı, 37°C'da beklenen yarılanma ömrü  $1 \times 10^{-9}$  saniye'dir.  $\cdot\text{OH}$ , DNA'ya, membran lipidlerine ve karbonhidratlara zarar verir. DNA hasarının gerçekleştiği en az iki yol vardır.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DNA yakınındaki moleküllere bağlı olan  $\text{Fe}^{2+}$  veya  $\text{Cu}^+$  ile reaksiyona girdiği için bozulmuş DNA oluşabilir; bu nedenle toksik  $\cdot\text{OH}$  radikali oluştuğunda, onun ilk hedefi komşu nükleik asitlerdir

(Arouma ve Halliwell, 1987). Hücre içi serbest  $\text{Ca}^{+2}$  artışı, çekirdekdeki nükleaz enzimlerini aktive eder, bu  $\cdot\text{OH}$  oluşumu ve DNA hasarıyla sonuçlanır (Reiter, 1998). Bu yarı-indirgenmiş oksijen türü, lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere membran lipidleriyle etkileşir. Bu etkileşim,  $\cdot\text{OH}$ 'nin PUFA'dan allelik bir  $\text{H}^+$ 'yı uzaklaştırmasıyla gerçekleşir ve bir radikalik zincir reaksiyonuyla sonuçlanır (Reiter, 1998).

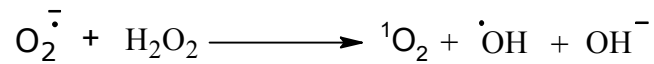
Singlet oksijen,  $\text{O}_2$ 'e enerji transfer edildiği fotooksidatif şartlar altında üretilen diğer bir reaktif oksijen türüdür. Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış en dış elektronları spinlerini değiştirebilir. Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere PUFA'dan bir  $\text{H}^+$ 'yı koparabilir. Bu yüzden, biyolojik sistemlerde  $^1\text{O}_2$ , membran lipidlerinin peroksidasyonunda önemli bir role sahiptir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Ayrıca bu reaktif oksijen türünün DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu da gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Halliwell ve Chirico, 1993).

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

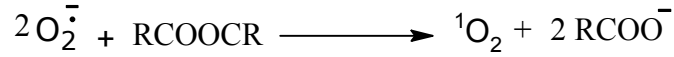
- 1- Süperoksit anyon radikalinin kendiliğinden dismutasyonu ile singlet oksijen oluşabilir.



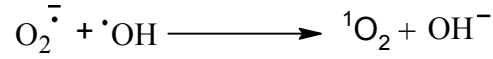
- 2- Haber-Weiss tepkimesi sonucunda singlet oksijen oluşabilir.



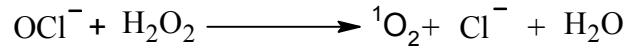
- 3- Süperoksit anyon radikallerinin diaçil peroksitlerle verdiği tepkime ile singlet oksijen oluşur.



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

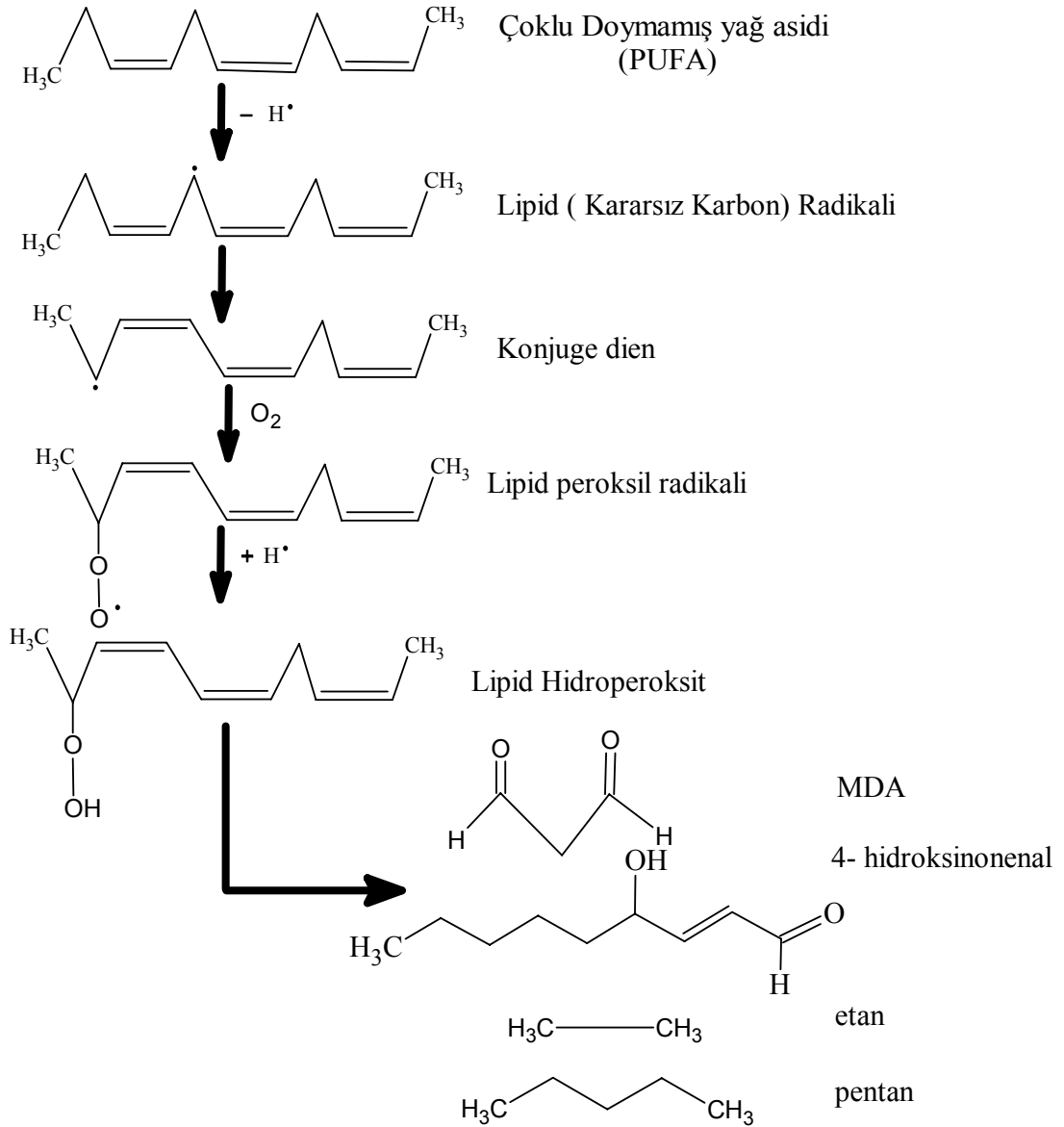


- 5- Fagositoz sırasında lökositlerden salınan miyeloperoksidazın katalizlediği reaksiyonda hipoklorit ( $\text{OCl}^-$ ) oluşur. Hidrojen peroksit ve hipoklorit arasındaki reaksiyonda da singlet oksijen oluşur (Aruoma ve Halliwell, 1987).



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

Serbest radikaller ve diğer reaktif türler, (örneğin;  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ ) doymamış yağ açıl zincirinden (örneğin;  $\omega$ -6 çoklu doymamış yağ asidi [PUFA]) bir hidrojen atomu açığa çıkarırsa, karbon merkezli lipid radikali ( $\text{L}\cdot$ ) oluşur. Bunu takiben  $\text{L}\cdot$  radikale oksijen ilavesi ile lipid peroksil radikali ( $\text{LOO}\cdot$ ) oluşur. Lipid hidroperoksit ( $\text{LOOH}$ ), kolaylıkla lipid alkoksi radikali ( $\text{LO}\cdot$ ) oluşturacak şekilde bozunabilir. ROS-başlatıcılı lipid peroksidasyonu, lipid, lipid peroksit, lipid alkoksi radikallerinin oluşumu ile sonuçlanır.

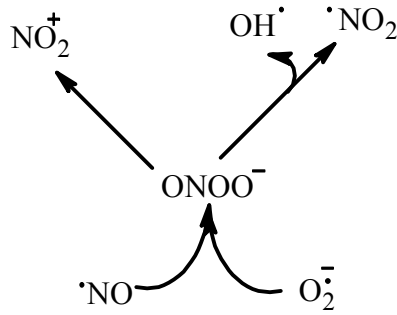


**Şekil 1.1** Lipid peroksidasyonu

Bakteriler, asit yağmurları, jetler, egzoz gazları ve sigara dumanı reaktif azot oksitleri üretir. Bu reaktif azot oksitler aynı zamanda karsinojenik etkiye de sahiptirler. NO, stabil bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, serebral kan akışı ve nöroendokrin sekresyonu gibi birçok fonksiyonda rol oynar (Pryor, 1982; Simonian ve Coyle, 1996). Ancak, hücre içi konsantrasyonu aşırı arttığında, nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. NO, biyolojik sistemlerde,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet -}$  ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren

proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktiviteleri veya protein fonksiyonlarında zayıflamaya neden olur.

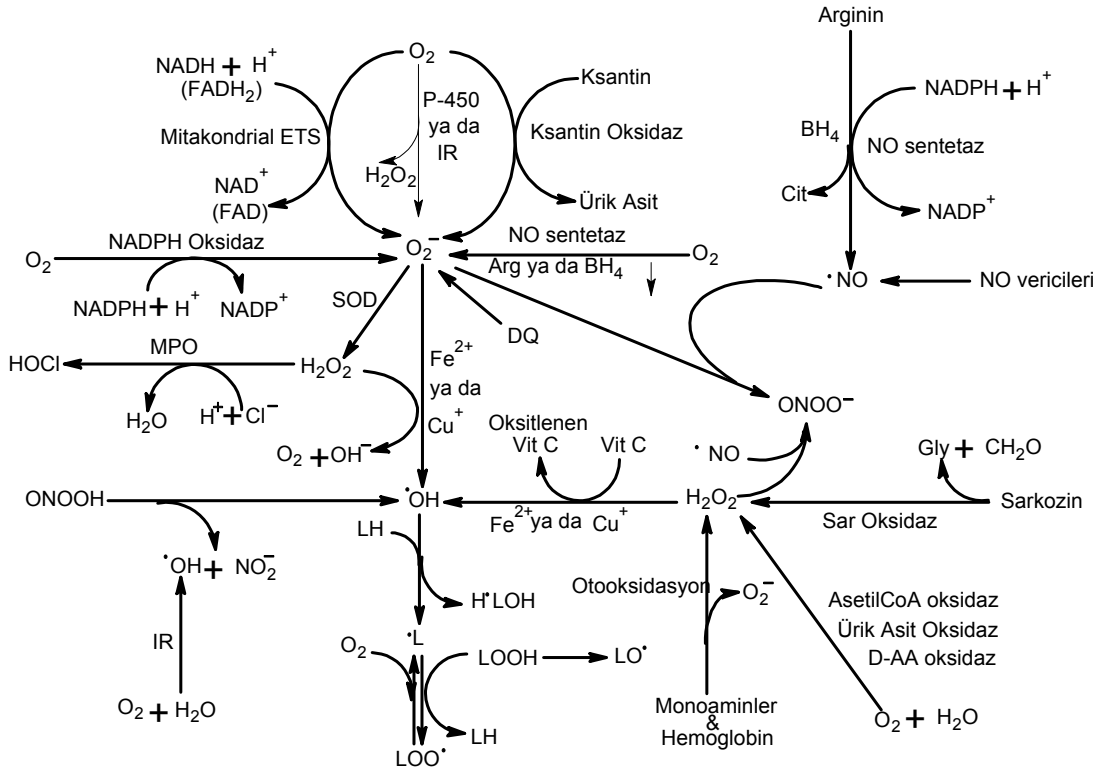
Nitrik oksidin yarı ömrü birkaç saniyedir. NO, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek biyolojik inaktif nitrite döner ve bundan dolayı, NO süperoksit anyon radikalinin hücelere olan toksik etkileri için kimyasal bariyer rolü oynar. Ancak, NO ile süperoksit anyon radikalinin birleşmesi peroksinitrit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



**Şekil 1.2** Toksik Azot Oksitleri

$\text{ONOO}^-$ , basit bir moleküldür, ancak reaktivitesi,  $\text{OH}^\cdot$  ve  $\text{NO}_2^\cdot$  ile hemen hemen eşdeğerdir.  $\text{ONOO}^-$  anyonunun zararlı etkisi, amino asit kalıntılarının aromatik halkalarını direkt olarak nitrolaması ve hidroksillemesinden, lipid, protein ve DNA'nın yanı sıra çinko-tiyolat kalıntıları ve sülfidrillerle reaksiyona girmesinden kaynaklanır(Beckman ve Ames, 1997). Bu aktivitesi  $\text{ONOO}^-$  anyonunu, nöronal fizyoloji üzerinde yıkıcı etkisi olan bir molekül haline getirir (Reiter vd., 1996a; Reiter, 1998).

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



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

## 1.2 Metabolizmadaki Serbest Radikal Kaynakları

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

### • Biyolojik Kaynakları

- ✓ Aktive olmuş fagositler
- ✓ Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine
- ✓ Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- ✓ Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisidler, sigara dumanı, çözenler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar, radyasyon
- ✓ Stres: Streste artan katekolaminin oksidasyonu

### • İntrasellüler Kaynakları

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

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

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

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı pestisitler gibi yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler (Cross vd., 1987; Oruç ve Üner, 2004).



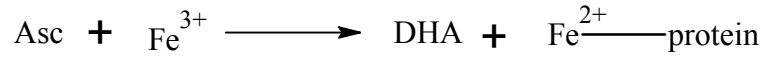
### 1.3 Antioksidan Savunma Sistemleri

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

Birincil savunma sistemleri iki grubu içerir:

1. Antioksidan bileşikler
2. Antioksidan savunma enzimleri

Antioksidan bileşikler, glutatyon,  $\beta$ -karoten, ürik asit, C ve E vitaminlerini içerir. E vitamini, bilinen yüksek lipofilik özelliğinden dolayı önemli bir hücre içi antioksidandır. Yağda çözülmüş olarak bulunur, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif diffüzyon ile emilir. Lipid membranının yakınında ya da içinde bulunan  $O_2^- \bullet$ ,  $\bullet OH$  ve  $LOO \bullet$  radikallerini daha az reaktif hale dönüştürerek antioksidan etkisini gösterir. Glutatyon peroksidaz ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini de peroksitlerin sentezini engeller (Cheeseman ve Slater, 1993). C vitamini hidrofilik olması ve vücutta geniş dağılım göstermesi nedeniyle etkili bir hücre dışı antioksidandır.  $\bullet OH$  ve  $O_2^- \bullet$  radikallerini sönümler, nötrofil antioksidanları nötralize eder ve tokoferoksil radikalinin  $\alpha$ -tokoferole indirgenmesini sağlar. C vitamini, antioksidan özelliğinin yanı sıra oksidan özellik de göstermektedir. Askorbat, proteine bağlı  $Fe^{3+}$  indirgeyerek  $Fe^{2+}$  'ye dönüştürür. Böylece Fenton reaksiyonunu tetikleyerek  $O_2^- \bullet$  oluşumuna katkıda bulunur.

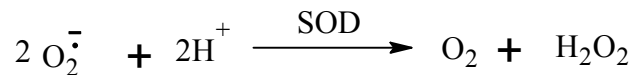


A vitamini ve  $\beta$ -karoten lipofiliktirler,  $\text{O}_2^- \bullet$  radikalini sönümler ya da peroksil radikali ile reaksiyona girerler. Ürik asit, hidrofiliktir ve  $\text{O}_2^- \bullet$ ;  $\bullet\text{OH}$  ve peroksil radikallerini sönümler. Geçiş metalleri ile bağ yaparak C vitaminin oksitlenmesini engeller. Glutasyon hem nükleofilik hem de indirgen özellik göstermesi nedeniyle, elektrofilik ve oksitleyici moleküllerle reaksiyona girerek nükleik asit ve proteinleri radikal hasarına karşı korur (Bump ve Brown 1990, Cereser vd., 2001). Proteinlerdeki  $-\text{SH}$  gruplarını indirgenmiş formda tutarak fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin yükseltgenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede önemli rolü vardır (Akkuş, 1995).

Antioksidan sönümleme enzimleri;

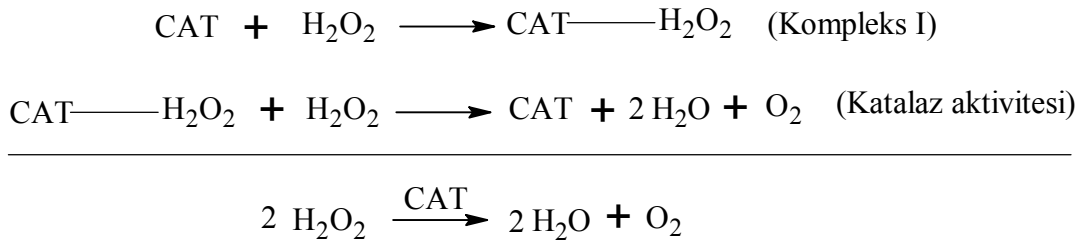
- süperoksit dismutaz (SOD),
- katalaz (CAT),
- glutasyon peroksidaz (GSH-Px)
- glutasyon redüktaz (GR) dır.

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

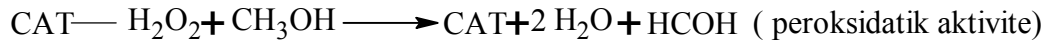


İnsanda SOD (SOD; E.C. 1.15.1.1)'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitazolde bulunan, Cu ve Zn içeren dimerik izomer (Cu, Zn-SOD) ve mitokondride bulunan, Mn içeren tetramerik (Mn-SOD) izomerdir. Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit anyon radikalinin zararlı etkisine karşı korur. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan hücrelerde fazladır ve dokudaki O<sub>2</sub> basıncı arttıkça artar. Metabolizmada normal şartlar altında çok fazla süperoksit anyon radikali üretilir, ancak, SOD hücre içi radikal seviyesinin oldukça düşük olmasını sağlayacak şekilde aktivite gösterir (Wheeler vd., 1990). Çeşitli dokular arasındaki SOD aktivitesi farklıdır, fakat en yüksek aktivite karaciğer, adrenal gland, hipofiz bezi ya da safra kesesi, böbrek ve dalaktadır (Rabideau, 2001). SOD, USA ve bazı Avrupa ülkelerinde anti-enflamatuar ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, iskemi tedavisinde de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (McGoff vd., 1988; Rabideau, 2001). SOD, meme ve barsak kanseri ile katarakt oluşumunu önlemede koruyucu bir mekanizmaya sahiptir (Reiter, 1998).

Katalaz (CAT; E.C. 1.1.1.6), hidrojen peroksidin oksijen ve suya dönüşümünü katalizler (Shimuzu vd., 1984). Katalazın bu reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, kompleks I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması ile oluşur. Kompleks I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır (Chance vd., 1979; Gebicka vd., 1989; Akertek 1994; Mc Cord, 2000).

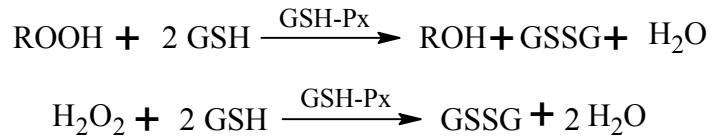


Eğer, metanol, etanol gibi bir hidrojen verici kompleks I ile reaksiyona girerse, oluşan ürün su ve bir aldehittir.



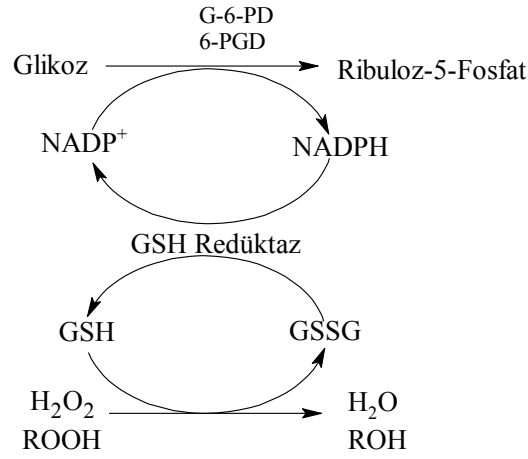
Katalaz, % 1,1 hematin, % 0,09 demir içeriğine sahip dört hematin grubu bulundurur (Aebi 1974). Enzim, labil tersiyer strüktüre sahiptir ve enzimin prostetik grubu olan protohematin IX proteine zayıf bir şekilde bağlıdır. Enzimin yapısındaki demir üç değerlidir. Katalaz,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin yüksek konsantrasyonlarında ( $\text{H}_2\text{O}_2$  için  $K_m = 1 \text{ mM}$ ) daha etkilidir. Daha düşük  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun söz konusu olduğu durumlarda, bu aktif türün sönmülmesinde glutatyon peroksidaz (GSH-Px ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  için  $K_m$ ;  $\mu\text{M}$  düzeyinde) daha etkilidir.

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

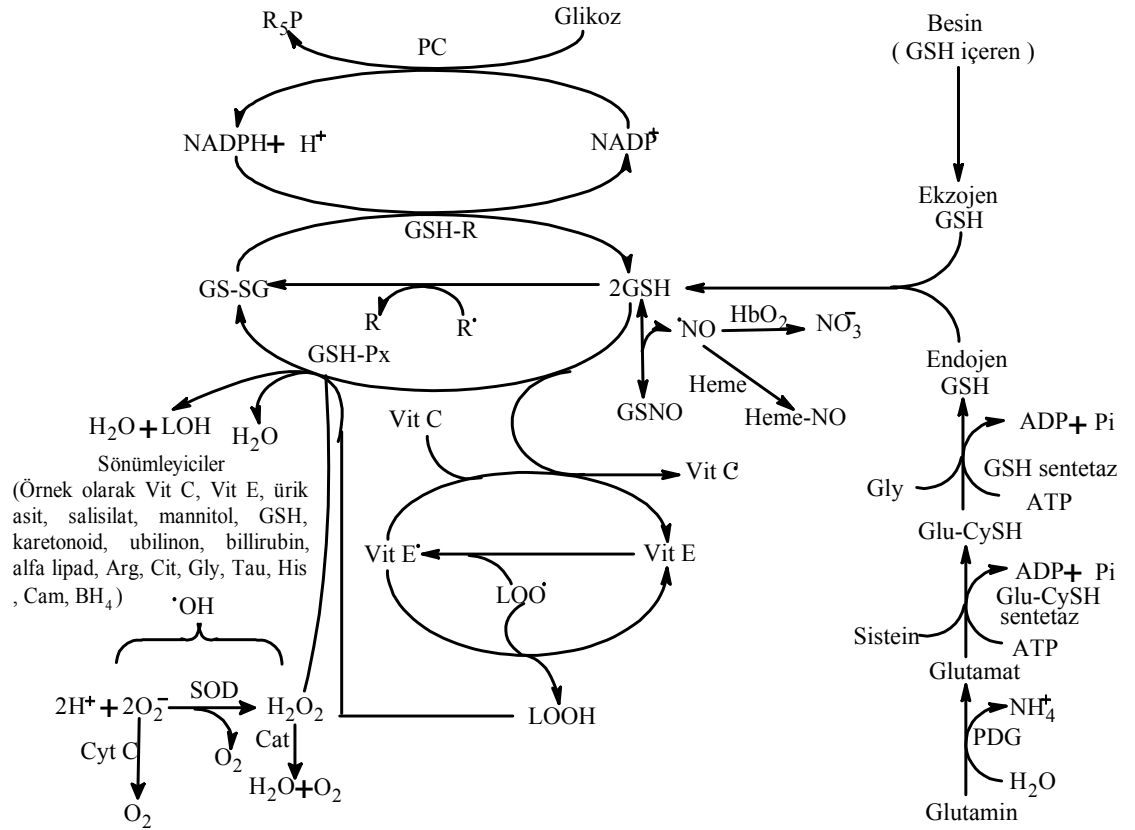


Glutatyon peroksidazlar membran bağımlı ve çözünen tür olmak üzere iki gruptur. Membran bağımlı olanlar lipid hidroperoksitlerini indirgerler. Selenyum bağımlı olan çözünenler ise,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve organik hidroperoksitlerin glutatyon tarafından indirgenmesini katalize ederler.

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



Şekil 1.4 Glutasyon Redüktaz reaksiyonları



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

İkincil savunma sistemleri, lipolitik ve proteolitik enzimleri içerir. Her iki grup enzim de, hasar görmüş, değişmiş ya da bozunmuş yağ ya da proteinlerin

temizlenmesiyle savunmada ikincil bir hat gibi görev alırlar. Bu proses reaktif hücresel bileşenleri uzaklaştırır, aksi taktirde ortamda daha fazla oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilmektedir (Rabideau, 2001).

#### 1.4 Pestisitler ve Oksidatif Stres

Tarım sektörü doğa ile iç içe bir sektördür. Doğal faktörlerin etkisi verimliliği doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla, çevrenin kirlenmesi, toprak ve su gibi tarım için oldukça önemli olan doğal kaynakların bileşimlerinin değişmesi, tarım ürünlerinin kalite ve miktarlarını olumsuz etkilemektedir. Hayvansal ve bitkisel üretim organik bir bütün olduğundan, sonuçta insanların en önemli protein veya besin kaynakları çevre kirliliğinden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir. Pestisidler, ürün kalitesi ve verimliliği artırmak amacıyla tarımdaki zararlı popülasyonu kontrol altına almak için kullanılan toksik maddelerdir. Ancak, bilinçsiz ve büyük miktarlarda kullanılmaları, çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle tarım sektöründe çalışanlar için önemli bir sağlık tehlikesi oluşturan pestisidler kullanım amaçlarına göre bazı gruplara ayrılırlar.

- ✓ İstenmeyen sinekler ve böcekleri öldürmek amacı ile kullanılanlar insektisid,
- ✓ Otlarla mücadele amacı ile kullanılanlar herbisid,
- ✓ Fare vb. hayvanlara karşı kullanılanlar rodentisid,
- ✓ Mantarlara karşı kullanılanlar ise fungusid

olarak adlandırılır.

Bu gruplar arasında en çok kullanılanlar insektisidler olup en yaygın bilinen örnek organik fosforlu bileşiklerdir. DDT gibi güçlü pestisidler ilk olarak 1930'ların sonlarında pamuk ve tütün gibi gıda olarak tüketilmeyen ürünlerde kullanılmıştır. Bu durum insektisid, herbisid ve fungusidlerin dünya üzerinde yoğun olarak kullanımıyla sonuçlanmıştır. II. Dünya savaşı sonrasında, batılı ülkeler, gıda

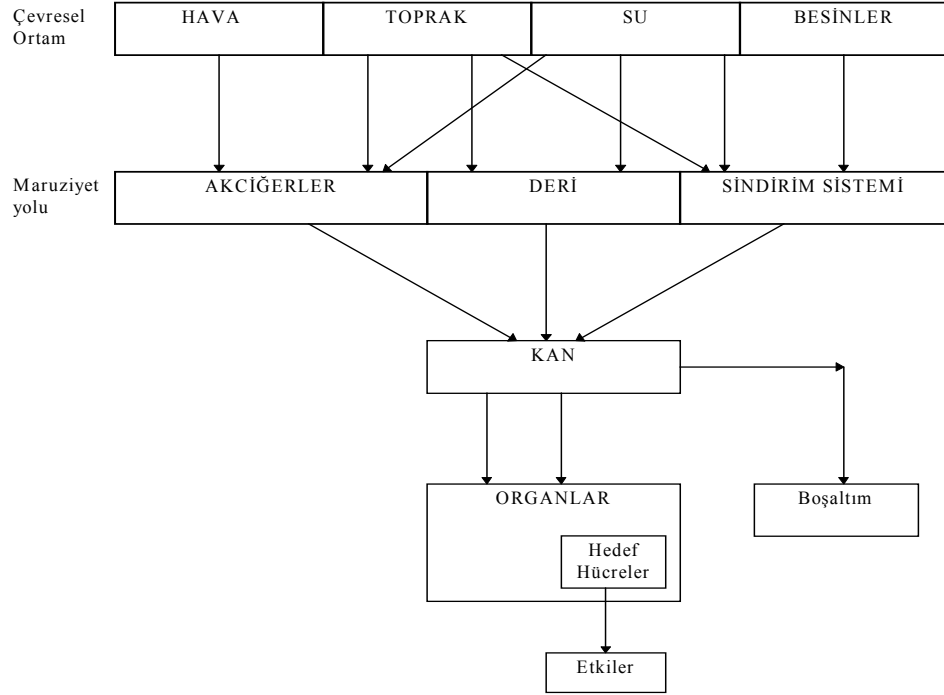
üretimini arttırmaya yönelik, tarım zararlılarının kontrolünü sağlayan tarımsal kimyasalların geliştirilmesine ait araştırmalar yapmıştır. Bu çalışmalar, bugün kullanılan böcek öldürücü ilaçların, yabancı otların ve mantarların ortadan kaldırılmasına yol açan ilaçların bulunmasını sağlamıştır (Karaer ve Gürlük, 2003). Oysa pestisidlerin modern tarımda yaygın biçimde kullanımı yan etkilere neden olmuş, flora ve faunaya zarar verilmiş, yer altı sularının kirlenmesi, yüzeysel sular ile denizlerin kirlenmesi söz konusu olmuştur.

Günümüzde 80 000 civarında kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. Gerek kimyasal maddelerin her alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanması gerekse kontrolsüz kullanımın yarattığı ciddi sağlık ve çevre sorunları, toplumlarda kimyasal kullanımına karşı oluşan korku ve tepkinin nedenidir. Dünyada bugün kullanılmakta olan yüzlerce pestisid bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), pestisidleri insan sağlığına tehlikeli olma durumlarına göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmada; en çok kullanılan 700 civarındaki pestisidten 33'ü insan sağlığına çok zararlı olan grupta (Sınıf 1a), 48'i oldukça tehlikeli grupta (Sınıf 1b), 118'i orta dereceli tehlikeli grupta (Sınıf 2) ve 239'u da daha az tehlikeli grupta (Sınıf 3) yer almaktadır. 149 pestisid türü ise normal kullanımda zararlı etkisi olmayan grupta (Sınıf 4) yer almaktadır. 164 pestisid ise henüz sınıflandırmaya girmemiştir.

Toksik tarımsal ajanlar,

- besin zincirindeki biyolojik birikme,
- çiftlik hayvanları ve tarımda pestisidlerin kullanımının aşırılığı,
- pestisid kalıntılarının bozunmasından önce ürünlerin hasadının yapılması,
- yiyeceklerin hazırlanması, satılması, taşınması ya da depolanması sırasında kirlenme,
- pestisid atıklarının imha edilmesindeki yetersizlikler nedeniyle insan sağlığını olumsuz etkilemektedirler.

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



**Şekil 1.6** Pestisidlerin kontaminasyon yolları

Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisidler, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O_2^- \cdot$ ) ve hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilirler, enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olabilirler. Pestisidler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonuna neden olurlar. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılmazlarsa oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir. Bazı çalışmalarda, pestisidlere maruz kalan işçilerde, akciğer kanseri, mesane kanseri ve lösemi riskinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra organofosfatlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını da içeren birçok nöropatolojik oluşumlara da yol açmaktadır. Çünkü bu kimyasalların hedefi, korteks ve hipokampüsteki sinirsel uyarılabilirliğin ana düzenleyicisi olan GABAerjik ve kolinerjik sistemlerdir



(Castillo vd., 2002). Organofosfatların toksisitesi, asetilkolinesterazın inhibisyonundan dolayı asetilkolinin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Asetilkolinin fazlalığı, kolinerjik reseptörler ile asetilkolinin etkileşimine bağlı olarak başlayan olayları olumsuz yönde etkiler (Hazarika vd., 2003).

Nörotoksisite birçok pestisitın ortak karakteristiğidir. Organofosfatlar, asetilkolin esterazın aktivitesini inhibe ederek sinir sinaplarında asetilkolin birikmesine neden olur. Bu, merkezi ve periferel sinir sisteminde nöral geçişin bozulmasına neden olur. Düşük dozda organofosforlu pestisitlere maruz kalmanın çeşitli biyokimyasal değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bunların bazılarının olumsuz biyolojik etkilere neden olabileceği insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Organofosfatların biyolojik etkilerini, beyin ve diğer dokuların hücrenel bileşenlerine özellikle elektrofilik saldırı yaparak gösterdiği öne sürülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, in vivo sistemlerde olduğu kadar in vitro sistemlerde de bir çok pestisidin reaktif oksijen türü üretme, DNA hasarı oluşturma ve sitotoksisite potansiyeli olduğunu göstermiştir. Pestisidler, membran bağılı enzimlerin ve reseptörlerin değişmesine, membran potansiyelini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar (Gupta vd., 1998; Fang vd., 2002; Seth vd., 2000). Bu tür olaylar özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek, nöral hücreleri yenilenemeyen beyinde dramatik sonuçlara neden olabilir (Gupta vd., 1998).

## 2 KAYNAK ÖZETLERİ

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve hücrelerin serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı koyabilme yeteleri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder (Simonian ve Coyle, 1996). Reaktif oksijen bileşiklerinin herhangi bir nedenle aşırı oluşumu veya antioksidan savunma sistemi ve onarım sistemlerindeki yetersizlikler sonucu oksidatif stres gelişir (Kökoğlu, 1998). Oksidatif stres, serbest radikaller üretildiğinde artar, serbest radikallerin temizlenmesiyle veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Oksidatif stresin kronikleşmesi, hücrelerde prooksidan-antioksidan dengenin bozulmasına ve oksidatif hasarın başlamasına neden olur. Bu dengesizlik, hücresel disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilen oksidatif modifiye moleküllerin yapılanmasıyla sonuçlanır (Reiter, 1998). Oksidatif etki genelde proteinlerin modifikasyonu, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, lipid peroksidasyonunun ve DNA'daki hasarın artması şeklinde gözlenmektedir.

Pestisidler, tarımda yaygın olarak kullanılırlar. Bunlar organizmada, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidroksil ( $^*OH$ ) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olurlar. Pestisidler, serbest radikallerin oluşumu ve antioksidanlar ya da oksijen serbest radikallerinde, sönmüleme enzimlerinde değişimlere yol açarak oksidatif stres oluşturabilirler. Pestisidler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu olarak adlandırılan bir seri zincir reaksiyonunu başlatırlar. Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda pestisid aracılı oluşan oksidatif stresin DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlarla sonuçlandığı bilinmektedir.

Altuntaş ve arkadaşları, çalışmalarında, Isparta çevresinde yaygın olarak kullanılan organofosforlu pestisid olan fasolonun in vitro olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemleri üzerine nasıl etkiler göstereceğini incelemişlerdir. Fasolon, MDA oluşumunun artmasına, SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde azalmalara neden olmuştur. Ancak, bu etkiyi sadece fasolonun oldukça yüksek konsantrasyonu olan öldürücü doz seviyesinde gözlemişlerdir (Altuntaş vd., 2003).

John ve çalışma grubu, organofosfatlı pestisidlerin neden olduğu radikal hasarına karşı E vitamininin etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada ratlara 6 hafta süreyle haftada 2 kez 250 mg/kg olacak şekilde oral olarak E vitamini, ardından yine oral olarak düşük tek doz (% 0,01 LD<sub>50</sub>) dimethoate ve malathione uygulamışlardır. Sonuçta, OP ile muamele edilen ratlarda lipid peroksidasyonunun arttığı, bununla birlikte önceden E vitamini verilerek OP uygulanan ratlarda lipid peroksidasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Dimethoate ve/ya da malathion ile muamele edilen ratların eritrositlerinde toplam –SH içeriği ile SOD ve CAT aktivitelerinde artış gözlemişlerdir (John vd., 2001).

Yapılan bir diğer çalışmada, 5 yıl boyunca pestisite maruz kalan toplam 41 erkek sağlıklı tarım ilaçlama işçisi, yaş ve ekonomik durumu aynı olan 21 bireyle serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu, antioksidan durumu ve hücrel enzimlerin aktivitesi tayin edilerek karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tarım işçilerinde MDA önemli derecede artmıştır. Glutasyon, α-tokoferol, askorbik asit ve seruloplazmin gibi antioksidanların konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede değişmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri tarım işçileri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında önemli derecede artış göstermiştir (Prakasam vd., 2001).

Banerjee ve arkadaşları, hastaneye lindan, malathion ve propoksur zehirlenmesi ile başvuran hastalardan alınan kan numunelerinde lipid peroksidasyonu, oksijen serbest radikali sönmüleme enzimleri ile glutasyon düzeylerini incelemişler, pestiside maruz kalma sonucunda, MDA düzeyi ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde artış, GSH seviyesinde azalma belirlemişlerdir (Banerjee vd., 1999).

Vidyasagar ve çalışma grubu, organofosforlu pestisidlere maruz kalmış hastalarda tedavi öncesi ve sonrası antioksidan sistemin göstergesi olan SOD aktivitesi ve MDA düzeylerindeki değişiklikleri incelemişler ve pestisite maruz kalan hastalarda MDA seviyesinin yaklaşık iki kat artış gösterdiğini ( $3,6 \pm 0,92$ 'den  $6,7 \pm 2,3$  nM/mL'ye), ancak tedavi sonrasında MDA seviyelerinin normale döndüğü, SOD aktivitesinin de

maruz kalmanın seviyesiyle doğru oranda arttığını, fakat tedavi sonrasında normale dönmediğini gözlemlemişlerdir (Vidyasayar vd., 2004).

Seth ve çalışma grubu, propoksurun subkronik/kronik etkilerini incelemek amacıyla ratlardan alınan kan numunelerinde lipid peroksidasyonu, OFR sönümlenme enzimleri ve glutatyon düzeylerini tayin etmişlerdir. MDA düzeyi ile SOD, CAT aktiviteleri, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinde 30 günlük propoksur uygulaması takiben doza bağlı olarak artış, kan glutatyon seviyesinde azalma gözlemlemişlerdir (Seth vd.,2001).

Pestisid aracılı toksisitenin maruz kalma süresine bağlı değişimini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 10 günlük rat yavrularına 21 ya da 45 günlük olana kadar oral olarak 0,5 mg/kg kinalfos uygulanmış, bir gruba da 21 günlük olana kadar kinalfos uygulaması yapılmış ve 45 günlük olduklarında kesilerek çalışma bitirilmiştir. Kinalfos uygulaması sonucu, beyin ve kanda AChE azalmış, fakat uygulama kesildikten sonra geri kazanılmıştır. Bu grup, kinalfos uygulamasının oksidan-antioksidan sisteme etkisini incelememiştir (Gupta vd., 1998).

Hazarika ve çalışma grubu, malathionun MFO inhibitörü olarak kullanıldığında anilofosun toksisitesinin değiştirebilirliğini kan, beyin, karaciğer dokularındaki bazı biyokimyasal özellikleri tayin ederek incelemiştir. Malathion, anilofos ve bunların karışımı, toksisitenin göstergesi olabilecek açık bir bulgu oluşturmamıştır. Malathion, kan, beyin, karaciğer dokusunda anilofosun AChE hareketini değiştirmemiştir. LPO, kan, beyin, karaciğer dokularında anilofos, malathion ve her ikisinin kombinasyonunda artmıştır. Malathion ile ön muamele yapılarak anilofos verilen ratlarda LPO ürünleri sadece anilofos verilenlerden önemli ölçüde büyüktür. Malathion, kan ve karaciğerde glutatyon (GSH) içeriğini düşürmüştür. Karaciğerdeki Glutatyon-S-transferaz aktivitesi anilofos, malathion ve her ikisinin kombinasyonu ile düşmüştür (Hazarika vd.,2003).

Oldukça yaygın kullanım alanı bulan ve organofosfat sınıfından bir pestisid olan kinalfosun oksidan-antioksidan sisteme etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada Sprague-Dawley ratlara 250 ve 500 mg/kg olacak şekilde iki farklı dozda kinalfos uygulanmış, işlem sonunda MDA seviyesinin düşük dozda yüksek dozdan daha fazla artış gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmada, serbest radikal sönmeme enzimlerinin ( SOD, CAT ve GSH-Px ) yüksek dozda daha yüksek aktivite sergiledikleri de ifade edilmektedir. Bu durum, yüksek dozda bazı fizyolojik savunma mekanizmalarının harekete geçtiğini göstermektedir ( Debnath vd., 2000).

Organoklorlu ve organofosforlu pestisidlerin toksisitesinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) yer aldığı bilinmektedir. Kale ve grubu çalışmalarında, fenvalerate muamelesi yapılan ratlarda serbest radikallerin üretilmesi ile kan ve böbrekte LPO'nun arttığını gözlemişlerdir. Süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) veya  $H_2O_2$  gibi ROS'leri oksidatif prosesleri değiştirir ve hücre membranlarında oksidatif hasar oluştururlar.  $\cdot OH$  radikalinin, demir-katalizli Fenton reaksiyonu sonucu LPO'nu başlattığı düşünülmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Eritrositler, çoklu doymamış yağ asitlerinin ( PUFA) varlığında oksidatif hasara karşı son derece duyarlıdır. Pestisitlerin, kan yolu ile karaciğere metabolize olmak üzere taşınırken, eritrositlerde hücresel hasar oluşturabileceği ileri sürülmektedir. Eritrositlerdeki süperoksit anyonunu dismutase eden SOD,  $H_2O_2$ 'i su ve moleküler oksijene yıkan CAT gibi enzimler piretroid-aracılı oksidatif strese karşı koyabilmektedirler. Glutatyon peroksidaz yolu ile  $H_2O_2$  'i indirgemekte gerekli olan glutatyon gibi diğer antioksidanların da, ROS türlerinin toksik etkilerinin azaltılmasında önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Konuyla ilgili bir diğer çalışmada, piretroid-aracılı lipid peroksidasyonunun tayini amaçlanmış, piretroid zehirlenmesinin eritrositlerdeki antioksidan sisteme etkisi incelenmiştir. Piretroid pestisidleri, uygulamanın ilk 3 gününde lipid peroksidasyonunu arttırdığı, fakat pestisid uygulamasının 14. gününde eritrositlerdeki LPO'nun kontrol grubuna doğru azaldığı gözlenmiştir (Kale vd., 1999).

Pestisidlerin büyük miktarlarda kullanılması çevre kirliliğine yol açmaktadır. Bu nedenle, organoklorlu ve organofosforlu pestisid atıklarının toprakta, su kaynaklarında, sebzelerde, meyvelerde ve diğer yiyecek maddelerinde tespiti mümkündür. Organofosforlu pestisidler hedef dokuda asetilkolin esteraz aktivitesini inhibe ederek, asetilkolinin birikmesine neden olurlar. Bu da kasılmalara ve ölümlere neden olur. Bununla birlikte, yiyecek ve sudan organofosforlu pestisidlerin alınması sonucu organofosfor zehirlenmesinin açık belirtileri görülmeyebilir, fakat eritrosit ve dokularda AChE'nin inhibisyonu tespit edilebilir. Son zamanlarda tavuk ve fareler üzerinde yapılan çalışmalar, dimethoate zehirlenmesinin serbest radikallerin üretilmesi ile oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir. Zehirlenen insanların ya da hayvanların kanında bazı organofosfatlar bulunabilir; bu da eritrositlerde oksidatif stres oluşturabilir ( John vd., 2001).

### **3 MATERYAL VE METOD**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması:**

Bu çalışmada, Wistar-Albino türü ratlar kullanılarak deney ve kontrol grubu olmak üzere 8'er hayvan içeren iki grup oluşturuldu. Çalışmada 3 aylık erkek ratlar kullanıldı. Kontrol grubundaki ratlar, pellet yem ve normal Isparta şehir şebekesinden alınan su ile, deney grubundaki ratlar ise, pellet yem ve Isparta-Büyükbabaca ilçesinde halkın içme suyu ihtiyaçlarını karşıladıkları artezyen kuyularından alınan su ile 16 hafta süreye beslendi. Bu süre sonunda ratlar, eter anestezisi altında dekapite edilip, laparotomi ile renal venden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı.

##### **3.1.2 Kan numunelerinin hazırlanması:**

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

### 3.1.3 Kullanılan malzeme ve cihazlar:

Deneyleerde kullanılan cihazlar, Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** Deneyleerde kullanılan cihazlar

<b>Malzeme/Cihaz</b>	<b>Markası</b>
Hassas terazi	Scaltec, Precisa
Manyetik karıştırıcı	Nüve
Santrifüj	Nüve, Eppendorf, Hereaus
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Vorteks	Nüve
Mikropipet	Eppendorf, Biohit, Gilson
Derin dondurucu	Uğur, Facis, Snijders Scientific
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1201, 1600
Hemogram cihazı	Coulter Max
pH- metre	Mettler Toledo
Homojenizatör	IKA, Ultra Turrax T25



### 3.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler:

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

**Çizelge 3.2** SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler

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

**Çizelge 3.3** GSH-Px tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Formülü	Markası
Glutasyon	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Sigma
Glutasyon redüktaz	GR	Sigma
$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( $\beta$ -NADPH)	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$	Sigma
Kümen hidroperoksit	$C_9H_{12}O_2$	Sigma
Potasyum siyanür	KCN	Sigma
Potasyum ferrisiyanür	$K_3Fe(CN)_6$	Sigma
Potasyum bikarbonat	$KHCO_3$	Sigma

**Çizelge 3.4** CAT tayininde kullanılan kimyasal maddeler

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

**Çizelge 3.5** Lipid peroksidasyon tayininde kullanılan kimyasal maddeler

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

**Çizelge 3.6** GSH tayini için kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Formülü	Markası
Metafosforik asit	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	Sigma
Ellman reaktifi (DTNB)	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	Sigma
EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck
Disodyum hidrojen fosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Sodyum sitrat	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Sigma
Sodyum klorür	NaCl	Sigma

### 3.1.5 Kullanılan çözeltiler

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (10,5 mM):** % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 107 µL alınır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,00) ile 100 mL'ye tamamlanır.

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

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

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

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

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

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

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

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

**Fosfat tamponu (50 mM):** 6,81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 7,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılıp bir miktar bidistile suda çözülerek son hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

**Fosfat tamponu (10 mM):** 1,362 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

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

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

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

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

**Disodyumhidrojenfosfat çözeltisi (0,3 M):** 4,29 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

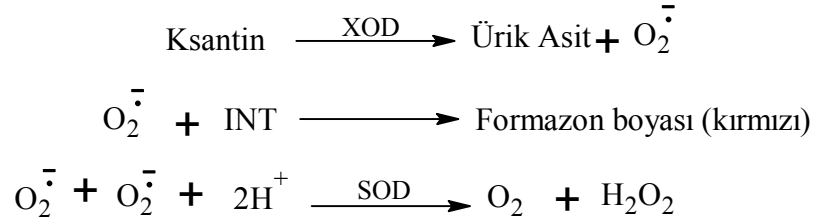
**DTNB çözeltisi:** 40 mg DTNB ve 1 g sodyum sitrat tartılır, bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 100 mL olacak Şekilde bidistile su ile tamamlanır. Çözelti, +4°C'da muhafaza edildiğinde üç hafta süreyle stabildir.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD) tayini

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

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



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

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

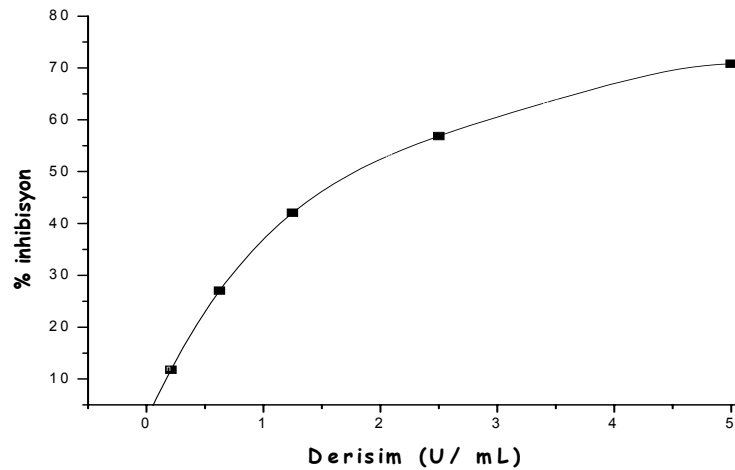
İnhibe edilmemiş reaksiyon hızı, %100 kabul edilip tüm standart ve numune hızları aşağıdaki bağıntı ile hesaplandı.

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

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

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

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

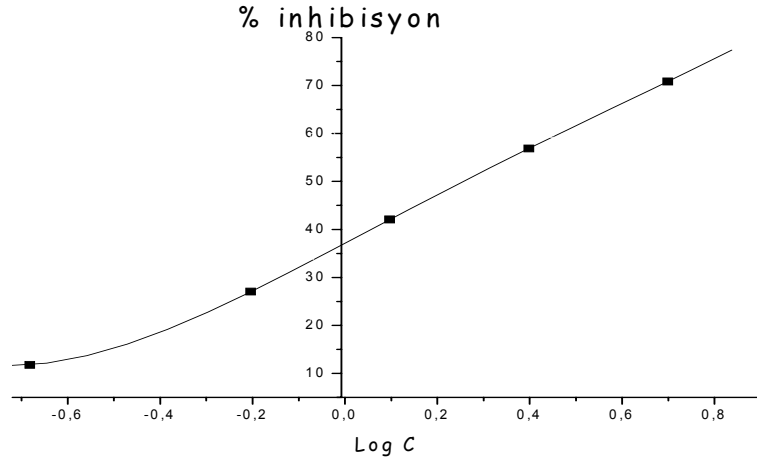


**Şekil 3.1** Kan SOD inhibisyon yüzdesinin konsantrasyona bağımlı değişimi

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir:

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

$$R^2=1$$



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

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir:

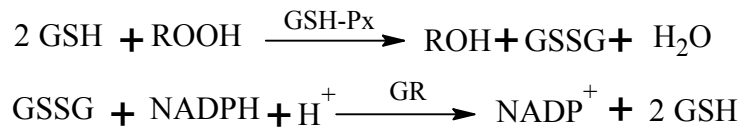
$$y = 37,13 + 50,74x + 1,82x^2 - 17,25x^3 + 13,47x^4$$

$$R^2 = 1$$

### 3.2.2 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tayini

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

**Deneyin prensibi:** Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksidin glutasyon (GSH) varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutasyonun yükseltgenmiş formu (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir.



**Deneyin yapılışı:** 0,050 mL hemolizata, 1,000 mL seyreltici reaktiften ilave edildi. 5 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 1,000 mL Double Drabkin çözeltisinden



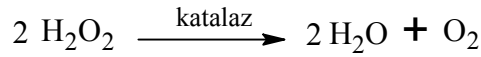
ilave edilip karışım vortekslendi. Aynı bir deney tüpünde 1,000 mL glutatyon (4mM), glutatyon redüktaz (0,5U/L) ve  $\beta$ -NADPH (0,28mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 0,020 mL numune karıştırılıp ölçümden hemen önce 0,040 mL kümen hidroperoksit (0,18mM) ilave edildi. Enzim aktivitesi, 340 nm'deki absorbans değişimi ve seyrelme faktörleri kullanılarak U/L olarak hesaplandı ve aşağıdaki bağıntı ile U/g Hemoglobin şeklinde ifade edildi.

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

### 3.2.3 Katalaz (CAT) tayini

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

**Deneyin prensibi:** Katalaz, hidrojen peroksidin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler .



Çalışmada, katalaz aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir.

**Deneyin yapılışı:** Katalaz aktivitesinin tayini amacıyla daha önce hazırlanan hemolizatlar, 50 mM fosfat tamponu (pH=7,00) ile 1:500 oranında seyreltildiler. 2,00 mL hemolizat üzerine 1,00 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (30 mM) ilave edilip homojenleştirildikten sonra 240 nm'deki absorbans değişimleri, 15'şer saniye aralıklarla kaydedildi. Benzer işlemler, 2,00 mL hemolizat ve 1,00 mL fosfat tamponu içeren kör denemeye de tekrarlandı.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in bozunması, başlangıçta (yaklaşık ilk 30 saniye) birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uymaktadır. Bu nedenle, aktivite hesabı, başlangıç ve 30. saniye absorbanları dikkate alınarak aşağıdaki formüle göre yapıldı.

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

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

### 3.2.4 Lipid peroksidasyon tayini

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

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

**Deneyin yapılışı:** 0,5 mL serum üzerine 2,5 mL %10'luk TCA eklenip, tüpler vortekste karıştırıldı. 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip derhal soğutuldu. 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 2'şer mL başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1 mL %0,67'lik TBA eklenip vortekste karıştırıldı. Numuneler tekrar 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip hemen soğutulduktan sonra 532 nm'deki absorbansları kaydedildi. MDA miktarı, oluşan MDA-TBA kompleksinin en yüksek absorbansa özgülü 532 nm'deki absorbans değerlerinden ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) yararlanılarak hesaplandı.

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

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

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

A : Absorbans

l : ışık yolu, cm

$\epsilon$  : Molar soğurma katsayısı

c : konsantrasyon

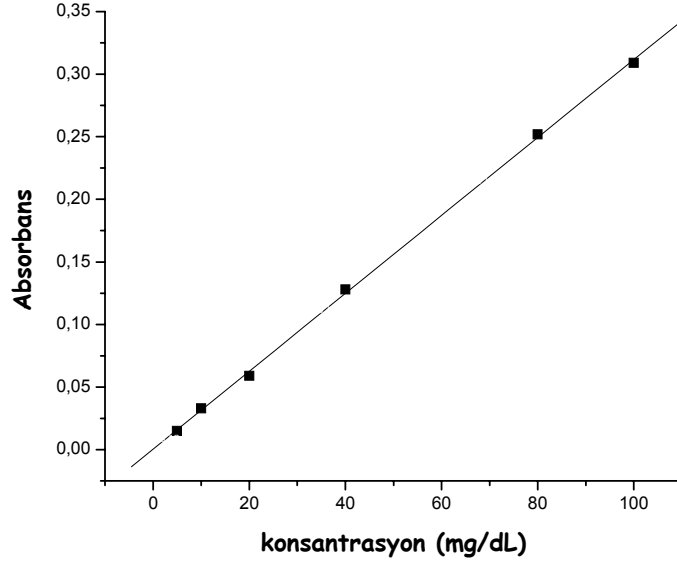
### 3.2.5 GSH tayini

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

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

**Deneyin yapılışı:** 50  $\mu$ L eritrosit üzerine 450  $\mu$ L distile su ve 750  $\mu$ L metafosforik asit çözeltisinden eklenip, tüpler vortekste karıştırıldı. 5 dakika süreyle buzlu suda bekletilip 3000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 500'er  $\mu$ L başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 2 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinden eklenip vortekste karıştırıldıktan sonra üzerine 250  $\mu$ L DTNB çözeltisinden ilave edildi ve 412 nm'deki absorbansları kaydedildi. GSH miktarı, oluşan ürünün 412 nm'deki molar absorbans değerleri kullanılarak daha önce çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplandı. GSH konsantrasyonunun hesabında aşağıdaki formül kullanıldı.

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



**şekil 3.3** Glutatyon kalibrasyon grafiği

Grafiğin fonksiyonu aşağıdaki bağıntı ile ifade edilmektedir.

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

$$r = 0,99973$$

#### 4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Pestisid kalıntısı bulunan içme sularıyla beslenen hayvanlardaki kan lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, materyal-metotta belirtilen koşullarda CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile GSH ve MDA düzeyleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma cinsinden Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.1** Eritrosit enzim aktiviteleri ile kan GSH ve MDA düzeyleri

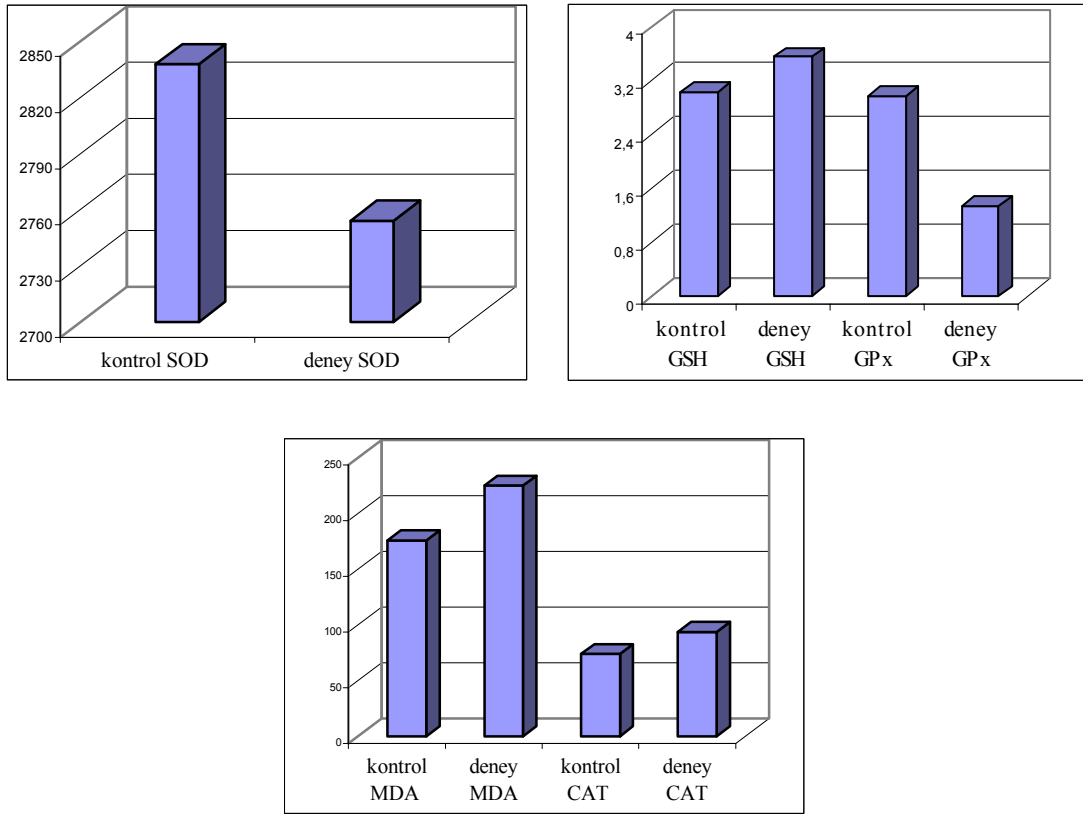
Parametreler	Kontrol Grubu	Deney Grubu	P
<b>SOD ( U / g Hb )</b>	2837.81 $\pm$ 309,98	2754,15 $\pm$ 247,70	0,64
<b>GSH-Px ( U / g Hb )</b>	2,97 $\pm$ 0,79	1,34 $\pm$ 0,18	0,02*
<b>CAT ( k / g Hb )</b>	73,74 $\pm$ 21,31	93,60 $\pm$ 18,09	0,13
<b>MDA ( nmol / g Hb )</b>	175,59 $\pm$ 9,10	224,46 $\pm$ 22,07	0,01*
<b>GSH ( mg /hemotokrit )</b>	3,03 $\pm$ 0,29	3,54 $\pm$ 0,63	0,11

Sonuçlar Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiki olarak değerlendirildi. %95 güven düzeyine göre farklı olan gruplar, yukarıdaki çizelgede \* işareti ile gösterilmektedir.

Yukarıdaki çizelgeden görüleceği üzere, pestisid kalıntısı içeren su ile beslenen deney grubu ratların kanında, kontrol grubuna kıyasla SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri azalırken CAT aktivitesi ile MDA ve GSH düzeyleri artış göstermiştir.

Kandaki normal eritrosit fonksiyonu, pestisidleri de içeren birçok toksik faktörün hedefi olan eritrosit membranının bozulmasına bağlı olarak değişir. Pestisidlerin hidrojen peroksit, süperoksit ve hidrosil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve dolayısıyla oksidatif doku hasarına neden olduğu literatürlerde belirtilmektedir (Seth vd., 2000; John vd., 2001; Altuntaş vd., 2003). SOD, CAT ve GSH gibi serbest radikal sönmleyiciler ile  $\gamma$ -glutamil peptidaz, GSH-Px, GR ve GSH-S-transferaz gibi metabolizma düzenleyici enzimler, hücresel sistemi pestisid

kaynaklı serbest radikallerin yıkıcı etkilerinden koruyabilirler. Bununla birlikte, antioksidan savunma mekanizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerinin, hem in vitro hem de in vivo olarak insektisidlerden etkilendiği literatürlerde ifade edilmektedir (Gültekin vd., 2000b; 2001; Oncu vd., 2002).



**Şekil 4.1** Eritrositlerdeki enzim aktiviteleri ile MDA ve GSH düzeyleri

Şekil 4.1, antioksidan enzim aktiviteleri ile MDA ve GSH düzeylerinin pestiside maruz kalan ratlardaki değişimini göstermektedir. Organofosforlu insektisidlerin SOD ve GSH-Px aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu literatürlerde belirtilmektedir (Naqvi ve Hasan, 1992; Altuntaş vd., 2003). Hemoglobinin ksenobiyotik ya da diğer yükseltgeyici ajanlarla etkileşimi, eritrositlerdeki radikal oluşumunun temel nedenidir. Yukarıdaki şekilden de görüleceği üzere, çalışmamızda gözlenen MDA artışı, pestisid gibi yükseltgeyici bir ajan ile etkileşim sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artışa bağlı olabilir. Bu etkileşim sonucu

oluşan singlet oksijen ve peroksil radikalleri de SOD aktivitesini inhibe etmiş olabilir.

Blum ve Fridovich, süperoksit radikallerinin GSH-Px aktivitesini inhibe edebileceğini ifade etmektedirler (Blum ve Fridovich, 1985). Bu nedenle çalışmamızda gözlenen GSH-Px aktivitesindeki düşüşün nedeninin pestisid kaynaklı oluşan ROS artışı olduğu düşünülebilir.

Şekil 4.1'den görüleceği üzere, çalışmamızda, CAT aktivitesi ile GSH düzeyi deney grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış göstermiştir. Bu durum, pestisidlerin hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artıracığı, CAT ve GSH'nin de bu artışı dengeleyecek ve GSH-Px aktivitesindeki düşüşü kompanse edecek yönde hareket edeceği şeklinde açıklanabilir.

Süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksil radikali ( $^{\bullet}OH$ ) veya hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri oksidatif prosesleri değiştirir ve hücre membranlarında oksidatif hasar oluştururlar. Hidroksil radikalının ( $^{\bullet}OH$ ), demir katalizli Fenton reaksiyonu sonucu lipid peroksidasyonunu başlattığı önerilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Eritrositler, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) varlığında oksidatif hasardan oldukça etkilenirler. Pestisidler, kan yolu ile karaciğere metabolize olmak üzere taşınırken eritrositlerde hücresel hasar oluşumuna neden olabilmektedirler. Pestisidler ayrıca, DNA ve protein hasarına, membran bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonuna ve sonuçta membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Bu tür olaylar, özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek, nöral hücreleri yenilenemeyen beyinde dramatik sonuçlara neden olabilir (Gupta vd., 1998).

Sonuç olarak, Büyükkabaca içme suyunun lipid peroksidasyonunu artırdığı, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Bu hasarın bölge insanının sağlığını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amacıyla ileri çalışmalar yapılmalıdır. Bunun yanı sıra, süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet -}$ ) veya hidrojen

peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri ile Long Term Potensiasyonunun (LTP) uyarıldığı bilinmektedir. Pestisidlerin yağlı dokularda biriktiği ve beyin de çoklu doymamış yağ asitlerince (PUFA) zengin bir organ olduğu göz önüne alınacak olursa, pestisidlerin kan, beyin ve hipokampus dokusundaki oksidan-antioksidan sisteme etkisinin incelenmesi, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında etkin olan reseptör aktivasyonlarının saptanması, özellikle tarımla uğraşan insanların pestisid aracılı nörodejeneratif bozunmalara ne derece maruz kaldığının belirlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması açısından son derece önemlidir



## 5.KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1974. Catalase, In Methods of Enzymatic Analysis (Bergemeyer, H U., ed) Academic Press, 673-684, New York-London
- Akertek, E., 1994. Characterization of immobilized catalase and their application in the milk sterilization with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Masters Thesis of DEU , İzmir
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya
- Altuntaş, İ., Delibas, N., Doguc, D.K., Özmen, S., Gultekin F., 2003. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro, Toxicology in Vitro, 17, 153–157
- Aroumo, O.I., Halliwell, B., 1987. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, Biochem. J., 248, 973- 976
- Banerjee, B.D., Seth V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers, Toxicology Letters, 107, 33–47
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287
- Beckman, K. B., Ames, B. N., 1997. Oxidative decay of DNA, J. Biological Chemistry, 272(32), 19633- 19636
- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical, Archives of Biochemistry and Biophysics, 240 (2), 500-508

- Bump, A. E., Brown, J M., 1990. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo, *Pharmac. Ther.*, 47, 117- 136
- Castillo, C.G., Montante, M., Dufour, L., Martinez, M.L., Jimenez-Capdeville, M.E., 2002. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 797–804
- Cereser, C., Guichard, J., Drai, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A., 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts, *J. Chromatography B*, 752, 123- 132
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605
- Cheeseman, K H., Slater, T F., 1993. An introduction to free radical biochemistry, *Free Radicals in Medicine*, 481- 493
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames, B N., Saul, R., Mc Cord, J M., Harman, D., 1987. Oxygen radicals and human disease, *Annals of Internal Medicine*, 107, 526- 545
- Depnath, D., Mandal, T.K., 2000. Study of Quinalphos ( an environmental Oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E:C:)-induced damage of testicular tissues and antioxidant defence systems in sprague-Dawley albino rats, *Journal of Applied Toxicology* 20, 197-204
- Donnelly, J.K., McLellan, K.M., Walker, J.L., Robinson, D.S., 1989. Superoxide dismutases in foods, *Food Chemistry*, 33, 243- 270

- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 186, 421-431
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radical, antioxidants, nutrition, *Nutrition* 18, 872-879
- Floyd, R A., 1999. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders, *Experimental Biology and Medicine*, 222, 236- 245
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters, *J. Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18525
- Gebicka, L., Metodiewa, D., Gebicki, J.L., 1989. Pulse radiolysis of catalase in solution. I. Reactions of  $O_2^{\cdot-}$  With catalase and its Compound I, *Int. J. Radiat. Biol.*, 55(1), 45- 50
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G., 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathine peroxidase and catalase in blood, *Clin. Chem.*, 37 (11), 1932- 1937
- Gupta, A., Gupta, A., Shukla, G.S., 1998. Effects of neonatal Quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain, *Journal of Applied Toxicology*, 18(1), 71-77
- Gültekin, F., Öztürk, M., Akdoğan, M., 2000b. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro), *Archives of Toxicology*, 74, 533-538
- Gültekin, F., Delibaş, N., Yaşar, S., Kılınc, İ., 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of Vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats, *Archives of Toxicology*, 75, 88-96

- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715S-725S
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. Oxygen radicals and singlet oxygen, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 93-109
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. Metabolism of transition metals in the human body, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 111-150
- Hazarika, A., Sankar, A.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study, *Toxicology*, 185, 1-8
- Heikkila, R E., Cabbat, F., 1976. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine, *Analytical Biochemistry*, 75, 356- 362
- Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A. M., Meister, A., 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1913-1917
- John, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 500-504
- Kale, M., John, S., Rathore, N., Bhatnagar, D., 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species, *Toxicology Letters*, 105, 197-205

- Kalyanaraman, B., Mason, R.P., Tainer, B., Eling, T.E. 1982. The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoprotein-derived, *J. Biol. Chem.*, 257 ( 9), 4764-4768
- Karaer, F., Gürlük, S., 2003. Gelişmekte Olan Ülkelerde Tarım-Çevre-Ekonomi Etkileşimi, *Doğus Üniversitesi Dergisi*, 4 (2) 2003, 197-206
- Kökoğlu, E., 1998. Oksidatif stres ve yaşlanma, *Yaşlanmaya Biokimyasal Yaklaşım Uluslararası Sempozyumu*, Ankara
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, *J. Biological Chemistry*, 244 (22), 6049-6055
- McCord, J. M., Day, E D., 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron- EDTA complex, *FEBS Letters*, 86 (1), 139-142
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am J. Med.*, 108, 652-659
- McGoff, P., Baziotis, A C., Maskiewicz, R., 1988. Analysis of polyethylene glycol modified superoxide dismutase by chromatographic, electrophoretic, light scattering, chemical and enzymatic methods, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (8), 3079-3091
- Moscone, D., 1988. Determination of superoxide dismutase activity with an electrochemical oxygen probe, *Analytica Chimica Acta*, 211, 195-204
- Naqvi, S. M., Hasan, M., 1992. Acetylhocystein thiolactone protection against phosphamidon-induced alteration of regional superoxide dismutase activity in the central nervous system and its correlation with altered lipid peroxidation, *Indian Journal of Experimental Biology*, 30, 850-852

- Oncu, M., Gultekin, F., Karaoz, E., Altuntas, I., Delibas, N., 2002. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants, *Hum. Exp. Toxicol.* 21 (4), 223-30
- Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137, 43-51
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts, *Analytical Biochemistry*, 154, 536-541
- Prakasam, A., Sethupathy, S., Lalitha, S., 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers, *Clinica Chimica Acta*, 310, 107-112
- Pryor, W.A., 1982. Free radical biology: Xenobiotics, cancer and aging, *Annals New York Academy of Sciences*, 1-22
- Rabideau, C.L., *Pesticide Mixtures Induce Immunotoxicity: Potentiation of Apoptosis and Oxidative Stress*, Blacksburg, 185, Virginia
- Reddy, S.V.K., Venkaiah, B., 1988. Chemical modification studies on isoenzymes of superoxide dismutase from bajra seedlings, *Phytochemistry*, 27 (7), 1959-1960
- Reiter, R.J., Pablos, M., Agapito, T.T., Guerrero, J M., 1996a. Melatonin in the context of the free radical theory of aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 786, 362-378
- Reiter, R.J., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin, *Progress in Neurobiology*, 56, 359-384

- Sanchez-Moreno, M., Garcia-Ruiz, M A., Sanchez- Navas, A., Monteloiva, M., 1989. Physico-chemical characteristics of superoxide dismutase in *Ascaris Suum*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B(4), 737-740
- Seth, V., Banerjee, B.D., Chakravorty, A.K., 2001. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood rats exposed to propoxur, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71, 133-139
- Seth, V., Banerjee, B.D., Bhattacharya, A., Chakravorty, A.K., 2000. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of human poisoning with Propoxur, *Clinical Biochemistry*, 33 (8), 683-685
- Shimizu, N., Kobayashi, K., Hayashi, K., 1984. The reaction of superoxide radical with catalase , *J. Biological Chemistry*, 259 (7), 4414-4418
- Simonian, N. A., Coyle, J. T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83-106
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522
- Vidyasagar, J., Karunakar, N., Reddy, M.S., Rajnarayana, K., Surender, T., Krishna, D.R., 2004. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorus insecticide poisoning, *Indian J Pharmacol*, 36 (2), 76-79
- Wheeler, C.R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Korte, D. W., 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity, *Analytical Biochemistry*, 184, 193-199

Whiteman, M., Tritschler, H., Halliwell, B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and  $\alpha_1$ -antiproteinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid , FEBS Letters, 379, 74-76

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



**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Hüseyin TUNÇMEN

Doğum Yeri : İZMİR

Doğum Yılı : 1977

Medeni Hali : Bekar

**Eğitim ve Akademik Durumu:**

Lise 1991 – 1994 İzmir Aliğa Endüstri Meslek Lisesi-Petrokimya Bölümü

Lisans 1996 – 2000 Süleyman Demirel Üniversitesi-Kimya Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

**İş Deneyimi:**

2000 – 2001 S.D.Ü. Tem. ve Uyg. Bil. Araş. ve Uyg. Mer.- Kimyager

2001 – - S.D.Ü. Den. ve Göz. Öğr. Araş ve Uyg. Mer. - Okutman