

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**İMİDACLOPRİD'İN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ VE KARACİĞER
ÜZERİNE AKUT VE SUBKRONİK ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Vesile DÜZGÜNER

Danışman

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

HATAY/2010

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**İMİDACLOPRİD'İN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ VE KARACİĞER
ÜZERİNE AKUT VE SUBKRONİK ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Vesile DÜZGÜNER

Danışman

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
08 L 0201 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY/2010

TEŞEKKÜR

Doktora tezim sırasında bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen danıőmanım Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a, tezime yapmıő olduğu katkılarından dolayı Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, çalıőmalarım esnasında yardımlarından dolayı Veteriner Hekim doktora öğrencisi Altuė KÜÇÜKGÜL'e, saėlamıő olduğu bursdan dolayı TÜBİTAK'a ve gösterdikleri maddi, manevi destek ve anlayıőtan dolayı Sunay-Sabahattin CÖMERT'e ve ailem; Süheyl, Emile, Hikmet ve Sibel DÜZGÜNER'e tesekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Pestisitler.....	3
2.2 İnsektisitler.....	4
2.2.1 İmidacloprid.....	6
2.2.2 Nikotinik asetilkolin reseptörleri.....	8
2.2.3 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	9
2.3.1 Serbest Radikaller	9
2.3.2 Yangı ve Serbest Radikaller.....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	19
3.2 Hayvan materyali ve imidacloprid verilmesi.....	19
3.3 Kan ve Doku Örneklerinin Alımı.....	20
3.4 Biyokimyasal Analizler.....	20
3.4.1 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	20
3.4.2 Malondialdehit (MDA) Analizi.....	20
3.4.3 Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	21
3.4.4 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini.....	21
3.4.5 Glutasyon (GSH) Analizi.....	21
3.4.6 Katalaz Aktivitesi Analizi.....	22
3.4.7 Ksantin oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini.....	22
3.4.8 Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini.....	23
3.4.9 Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	23
3.5 RNA İzolasyonu.....	23
3.5.1 cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR).....	24
3.6 İstatistiksel Metot.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1 Akut Dönem Sonuçları.....	27
4.1.1 Kısa Süreli İmidacloprid Uygulamasının NO Üretimine Etkisi.....	27
4.1.2 İmidaclopride Maruz Bırakılan Ratların Dokularında Lipid Peroksidasyon Düzeyi.....	29
4.1.3 İmidaclopride Akut Maruziyetin Ksantin Oksidaz Aktivitesine Etkisi.....	31
4.1.4 İmidacloprid Enjeksiyonunun Myeloperoksidaz Aktivitesine Etkisi.....	32
4.1.5 İmidaclopride Kısa Süreyle Maruz Bırakılan Rat Dokularında Katalaz Aktivitesi.....	33
4.1.6 Kısa Süreli İmidacloprid Uygulamasının Süperoksit Dismutaz Aktivitesine	

Etkisi.....	34
4.1.7 İmidacloprid Enjeksiyonunun Beyin ve Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Etkisi.....	35
4.1.8 İmidaclopridin Kısa Süreli Uygulamasının Glutasyon Konsantrasyonuna Etkisi.....	36
4.1.9 İmidacloprid Uygulamasının Plazma Kalsiyum Düzeyine Etkisi.....	37
4.1.10 İmidaclopridin Kısa Süreli Uygulamasının Karaciğer Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	38
4.1.11 RT-PCR Yöntemi ile Yangısal Sitokin Transkripsiyon Analizi.....	40
4.1.12 RT-PCR Yöntemi ile Beyinde NOS Transkripsiyon Analizi.....	42
4.1.13. RT-PCR Yöntemi ile Karaciğerde NOS Transkripsiyon Analizi.....	45
4.2. Subkronik Dönem Sonuçları.....	47
4.2.1 Uzun Süreli İmidaclopride Maruziyetin Nitrik Oksit (NO) Üretimine Etkisi.....	47
4.2.2 İmidacloprid Uygulamasının Lipid Peroksidasyonuna Subkronik Etkisi.....	49
4.2.3 Subkronik İmidacloprid Uygulamasının Ksantin Oksidaz Aktivitesine Etkisi.....	51
4.2.4 İmidacloprid Uygulamasının Myeloperoksidaz Aktivitesine Kronik Etkisi.....	52
4.2.5 İmidacloprid Uygulamasının Beyin ve Karaciğer Dokularında Katalaz Aktivitesine Etkisi.....	53
4.2.6 İmidaclopride Uzun Süre Maruz Kalan Ratların Dokularında Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	54
4.2.7 Uzun Süreli İmidacloprid Uygulanan Ratlarda Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	55
4.2.8 İmidacloprid Verilen Ratların Beyin ve Karaciğer Dokularında Glutasyon Konsantrasyonu.....	56
4.2.9 İmidacloprid Uygulamasının Plazma Kalsiyum Düzeyine Etkisi.....	57
4.2.10 İmidacloprid'e Kronik Maruziyetin Karaciğer Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	58
4.2.11 RT-PCR Yöntemi ile Yangısal Sitokin Transkripsiyon Analizi.....	60
4.2.12 RT-PCR yöntemi ile beyinde NOS transkripsiyon analizi.....	62
4.2.13 RT-PCR yöntemi ile karaciğerde NOS transkripsiyon analizi.....	65
5. TARTIŞMA.....	67
5.1. Akut Dönem Tartışma.....	67
5.2. Subkronik Dönem Tartışma.....	72
6. SONUÇ.....	78
7. KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 2.1. İmidaclopridin etki mekanizması.....	7
Şekil 2.2. Nikotinic Asetilkolin Reseptörlerinin Şematik Yapısı.....	9
Şekil 2.3. Serbest Radikal Oluşum Reaksiyonları, Oksidan ve Antioksidan Enzimler	10
Şekil 2.4. Nitrik Oksit (NO) sentezi ve fonksiyonu.....	12
Şekil 2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin ve Antioksidanların Lokalizasyonu.....	13
Şekil 2.6. Antijenlerin Tanınması ve Fagosite Edilmeleri.....	16
Şekil 2.7. NADPH Oksidaz Sisteminin Uyarılması ve Fagolizozomda Gelişen Oksidatif Olaylar.....	17
Şekil 4.1. İmidacloprid uygulamasının plazma NO üretimine etkisi.....	27
Şekil 4.2. Akut imidacloprid maruziyetinin beyinde NO üretimine etkisi.....	28
Şekil 4.3. Kısa dönem imidacloprid enjeksiyonunun karaciğerdeki NO üretimine etkisi.....	28
Şekil 4.4. İmidacloprid uygulamasının plazma malondialdehid düzeyine akut etkisi.	29
Şekil 4.5. Kısa süreli imidacloprid maruziyetinin beyin malondialdehid düzeyine etkisi.....	30
Şekil 4.6. İmidacloprid intravenöz uygulamasının karaciğer malondialdehid düzeyine etkisi.....	30
Şekil 4.7. İmidacloprid uygulamasının beyin ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.....	31
Şekil 4.8. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının karaciğer ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.....	31
Şekil 4.9. İmidacloprid maruziyetinin beyin myeloperoksidaz aktivitesine akut etkisi.....	32
Şekil 4.10. Kısa süreli imidacloprid enjeksiyonunun karaciğer myeloperoksidaz aktivitesine etkisi.....	32
Şekil 4.11. İmidaclopridin kısa süreli uygulamasının beyin katalaz aktivitesine etkisi.....	33
Şekil 4.12. İmidacloprid uygulamasının karaciğer katalaz aktivitesine etkisi.....	33
Şekil 4.13. Kısa süreli imidacloprid maruziyetinin beyin süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.....	34
Şekil 4.14. İmidacloprid'in karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.....	34
Şekil 4.15. İmidaclopridin kısa dönemde beyin glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi.....	35
Şekil 4.16. İmidacloprid verilen ratlarda karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	35
Şekil 4.17. İmidaclopridin akut uygulamasının beyin glutatyon düzeyine etkisi.....	36
Şekil 4.18. İmidacloprid kısa süreli uygulamasının karaciğer glutatyon düzeyine etkisi.....	36
Şekil 4.19. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının plazma kalsiyum düzeyine etkisi...	37
Şekil 4.20. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının alanin aminotransferaz aktivitesine etkisi.....	38
Şekil 4.21. İmidacloprid'in akut maruziyetinin aspartat aminotransferaz aktivitesine etkisi.....	39
Şekil 4.22. İmidacloprid'in akut maruziyetinin laktat dehidrojenaz aktivitesine etkisi.....	39

Şekil 4.23. Akut imidacloprid maruziyeti sonrası rat beyinlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	40
Şekil 4.24. İmidacloprid uygulanan rat karaciğerlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	41
Şekil 4.25. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	42
Şekil 4.26. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	43
Şekil 4.27. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve nNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	43
Şekil 4.28. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	44
Şekil 4.29. İmidacloprid verilen rat karaciğerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	45
Şekil 4.30. İmidaclopride maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	46
Şekil 4.31. İmidaclopride maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	46
Şekil 4.32. Kronik imidacloprid maruziyetinin plazma nitrik oksit üretimine etkisi.....	47
Şekil 4.33. İmidaclopridin oral uygulamasının beyindeki NO üretimine etkisi.....	48
Şekil 4.34. İmidacloprid maruziyetinin karaciğerdeki NO üretimine etkisi.....	48
Şekil 4.35. İmidacloprid uygulamasının plazma malondialdehid düzeyine etkisi.....	49
Şekil 4.36. İmidacloprid uygulamasının beyin malondialdehid düzeyine kronik etkisi.....	50
Şekil 4.37. Kronik imidacloprid uygulamasının karaciğer malondialdehid düzeyine etkisi.....	50
Şekil 4.38. İmidacloprid kronik maruziyetinin beyin ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.....	51
Şekil 4.2.39 Otuz gün süreyle uygulanan imidaclopridin karaciğer ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.....	51
Şekil 4.40 İmidacloprid uygulamasının beyin myeloperoksidaz aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 4.41. İmidaclopridin ratlarda karaciğer myeloperoksidaz aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 4.42. Kronik imidacloprid maruziyetinin beyin katalaz aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 4.43. İmidaclopridin uzun süre verilmesinin karaciğer katalaz aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 4.44. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde süperoksit dismutaz aktivitesi.....	54
Şekil 4.45. İmidaclopridin oral uygulamasının karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.....	54
Şekil 4.46. İmidacloprid kronik uygulamasının beyin glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi.....	55
Şekil 4.47. İmidacloprid verilmesinin karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi.....	55
Şekil 4.48. İmidaclopride kronik maruziyetin beyin glutatyon düzeyine etkisi.....	56
Şekil 4.49. İmidacloprid maruziyetinin karaciğer glutatyon düzeyine subkronik etkisi.....	56
Şekil 4.50 Kronik imidacloprid uygulamasının plazma kalsiyum düzeyine etkisi.....	57
Şekil 4.51. Kronik imidacloprid uygulamasının alanin aminotransferaz aktivitesine etkisi.....	58

Şekil 4.52. Kronik imidacloprid uygulamasının aspartat aminotransferaz aktivitesine etkisi.....	59
Şekil 4.53. Kronik imidacloprid uygulamasının laktat dehidrojenaz aktivitesine etkisi.....	59
Şekil 4.54. Kronik imidacloprid uygulanan rat beyinlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	60
Şekil 4.55. İmidacloprid verilen rat karaciğerlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	61
Şekil 4.56. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	62
Şekil 4.57. İmidaclopride kronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	63
Şekil 4.58. İmidaclopride kronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve nNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	63
Şekil 4.59. İmidaclopride kronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	64
Şekil 4.60. İmidacloprid verilen rat karaciğerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.....	65
Şekil 4.61. İmidaclopride kronik maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	66
Şekil 4.62. İmidaclopride kronik maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa no
Çizelge 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları.....	26

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
CAT	: Katalaz
DDT	: Diklorodifeniltrikloretan
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentetaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorit
IMI	: İmidacloprid
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
LDH	: Laktat dehidrojenaz
MDA	: Malondialdehid
MPO	: Myeloperoksidaz
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptörleri
NADPH	: Nikotinamid dihidrojen fosfat
NK	: Doğal öldürücü
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	: Nitrik oksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
OH ⁻	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
⁻ OOCR	: Alkilperoksil radikali
PON	: Paraoksanaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Superoksit Dismutaz
XO	: Ksantin oksidaz

ÖZET

İmidacloprid'in Merkezi Sinir Sistemi ve Karaciğer Üzerine Akut ve Subkronik Etkilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Biyoloji Teknikleri ile Araştırılması

İmidacloprid insektlere olan yüksek afinitesi sebebiyle tarımsal pestlere ve evcil hayvanlarda da pire infestasyonlarına karşı yaygın olarak kullanılan bir neonikotinoid insektisittir. Bu çalışmada, imidaclopridin sinir sistemi ve karaciğer dokusu üzerine potansiyel akut ve subkronik toksik etkileri oksidatif-antioksidatif olaylar ve yangısal sistem analizleri ile ratlarda incelendi. Wistar cinsi dişi ratlar kontrol ve imidacloprid grubu olacak şekilde rastgele iki gruba ayrıldı (n=10 rat/grup). Fizyolojik tuzlu su içinde çözdürülmüş imidacloprid (10 µM) intravenöz olarak verildikten iki saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğer ve beyin dokuları alındı. Çalışmada nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA), ksantin oksidaz (XO), myeloperoksidaz (MPO), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH) analizleri spektrofotometrik yöntemle yapıldı. Sitokin ve nitrik oksit sentetaz (NOS) ekspresyon analizlerinde gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. İmidaclopride maruz bırakılan hayvanların beyin, plazma (p<0.001) ve karaciğer (p<0.003) örneklerinde NO düzeyinin anlamlı biçimde yükseldiği tespit edildi. Kantitatif mRNA transkripsiyon analizleri imidaclopridin neden olduğu NO artışının karaciğerde iNOS ve eNOS, beyinde ise sadece nNOS indüksiyonuna bağlı olduğunu gösterdi. Oksidan molekül üretici enzimlerden XO (p<0.001) ve MPO aktivitelerinin her iki dokuda arttığı (beyin: p<0.009; karaciğer: p<0.001) görülürken karaciğer (p<0.05) ve plazmada (p<0.001) anlamlı biçimde lipid peroksidasyonu tespit edildi. Antioksidan enzimlerden CAT, SOD ve GSH-Px aktiviteleri imidacloprid uygulamasına farklı yanıtlar verdi. İmidacloprid iki dokuda da hücre içi glutatyon düzeyinde (beyin: p≤0.001; karaciğer: p<0.05) anlamlı bir azalışa neden oldu. İmidacloprid beyin ve karaciğerde yangısal sitokinlerden TNF-α, IL-6 ve IL-1β mRNA transkripsiyonlarını stimüle ederek 2.5- 5.2-misli arttırdı. Buna karşın, yangı önleyici mediyatör IL-10 mRNA'sı her iki organda da baskılandı. Deneysel olarak yürütülen bu araştırmadan elde edilen verilere göre imidaclopridin hedef-dışı organizmalarda merkezi sinir sistemi ve karaciğerde oksidatif stres ve yangıya bağlı olarak önemli sağlık problemlerine neden olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İmidacloprid, Neonikotinoid, Oksidatif stres, Yangı, RT-PCR

ABSTRACT

Investigation of Acute and Subchronic Effects of Imidacloprid on Central Nervous System and Liver by Using Biochemical and Molecular Biology Techniques.

Imidacloprid is a neonicotinoid insecticide and has been extensively used as a crop pest and pet flea control programme because of its high affinity to insects. In the present study, potential acute and subchronic neuro and liver toxic effects of imidacloprid were analyzed in rats using antioxidant–oxidant and inflammatory system. In the study female Wistar rats were allocated randomly into 2 groups as control and imidacloprid treated group (n =10 rat/group). After intravenously administration of 10 μ M imidacloprid which dissolved in saline, the rats were sacrificed; liver and brains were surgically removed. Nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XO), myeloperoxidase (MPO), the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione (GSH) were analysed spectrophotometrically analyzed. Cytokine and nitric oxide synthase (NOS) expressions were measured by using real time PCR method. Exposure to imidacloprid led to significant increases in NO concentrations in brain, plasma ($p < 0.001$) and liver ($p < 0.003$) samples. The quantitative mRNA transcriptional analyses demonstrated that imidacloprid-elevated production of NO levels due to the induction of iNOS, eNOS expressions in liver and nNOS in brain. The oxidant-generating enzymes xanthine oxidase ($p < 0.001$; brain and liver) and myeloperoxidase activities (brain: $p < 0.009$; liver: $p < 0.001$) in both tissues were elevated and significant lipid peroxidation in liver ($p < 0.05$) and plasma ($p < 0.001$) was observed. CAT, SOD and GSH-Px activities were differently responded to imidacloprid administration. Significant intracellular GSH depletion (brain: $p \leq 0.001$; liver: $p < 0.05$) was also measured in both tissues. Imidacloprid treatment up regulated inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β mRNA transcriptions by 2.5- to 5.2-fold increases in brain and liver. Conversely, anti-inflammatory mediator IL-10 mRNA was down-regulated in the both organs. The results obtained from this experimental rat study suggest that imidacloprid causes essential health problems via oxidative stress and inflammation in central nervous system and liver in non-target mammalian organisms such as rats.

Keywords: Imidacloprid, Neonicotinoid, Oxidative stress, Inflammation, RT-PCR

1. GİRİŞ

Pestisitler zararlı hayvanların ya da böceklerin gelişimini önlemek, yok etmek veya azaltmak için geliştirilmiş kimyasal maddeler veya bunların karışımlarıdır. Günümüzde yaklaşık 900 aktif kimyasal içerik ile hazırlanmış 20000'den fazla pestisit çeşidi bulunmaktadır. Etkiledikleri organizmalara göre insektisitler, herbisitler, fungusitler ve rodentisitler olarak sınıflara ayrılmaktadırlar (Gubler 1998). Pestisitler gıda ve vektör kökenli hastalıkların kontrol edilmesiyle ekonomiye, çevreye ve toplum sağlığına anlamlı etkileri vardır. Bununla birlikte memeliler ve insanlar için toksik ve biyosidal etkili maddelerdir. Bu ajanların hedef organizmalarına karşı spesifik toksik etkileri olsa da; insanlarda ve diğer hedef-dışı canlılarda nörotoksik, genotoksik ve diğer potansiyel yan etkileri gelişebilmektedir (Weiss ve ark. 2004).

Yaygın olarak kullanılan pestisitlerin çoğu, farklı etki mekanizmalarına sahip çeşitli tipte kimyasal maddeler içermekle birlikte, insektisitlerin birçoğu sinir sistemi fonksiyonlarını bozarak etkilerini gösterirler. Malation ve paration gibi bileşiklerin yer aldığı organik fosforlular ve karbamilin bulunduğu karbamatlar sinir uçlarındaki asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe ederek nöral transmisyonun sonlanmasını bloke ederler. Diklorodifeniltrikloretan (DDT) gibi organik klorlular ise nöron membranlarında kation transferini etkileyerek nöral irritabiliteye ve merkezi sinir sisteminin eksitasyonuna neden olur. Deltametrin gibi piretrinler memeliler tarafından hızla metabolize edilmesine rağmen, bazı durumlarda alerjik reaksiyonlar oluşturabilmektedir (Chaudhuri ve ark. 1999, Simpson ve Schuman 2002, Weiss ve ark. 2004). Oksidatif stres, pestisit toksikasyon basamaklarının prooksidan ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması ile sonuçlanan son aşamasıdır (Banerjee ve ark. 2001).

İmidacloprid (IMI), thiacloprid ve acetamiprid gibi neonikotinoidler, son yıllarda organik fosforlular ve metilkarbamatlar yerine yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Neonikotinoidlerin diğer grup insektisitlere göre olumlu yanları, hedef seçici özellikte olmalarıdır. Etki mekanizmaları diğer canlılara göre insektlerde nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) daha yüksek spesifite göstermeleridir (Tomizawa ve Casida 2000, Tomizawa ve ark. 2007). Nikotinik asetilkolin reseptörleri ilk olarak sinir-kas sinaplarında tespit edilmiş olmakla birlikte, yapılan son çalışmalar bu reseptörlerin yalnızca sinir hücrelerinde bulunmadığını, aynı zamanda adipositler, makrofajlar, lenfositler,

keratinositler, karaciğer, akciğer ve bağırsak epitel hücrelerinde de eksprese edildiğini ortaya koymaktadır (Gahring ve Rogers 2006, Kalamida ve ark. 2007, Abou-Donia ve ark. 2008). Bu sebeple, insektisitlerin olumsuz etkilerinin merkezi sinir sistemi dışındaki diğer dokularda da ortaya çıkması muhtemeldir. Ancak bu konudaki araştırmalar oldukça sınırlıdır. İnsan periferal kan hücrelerinde yapılan bir çalışmada imidaclopridin DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Feng ve ark. 2005). Bazı araştırmalar imidacloprid uygulamasının sitogenetik, genotoksik, nörotoksik (Karabay ve Oğuz 2005) ve gebelikte yavru gelişimi üzerine olumsuz etkilerini göstermiştir (Abou-Donia ve ark. 2008).

Neonikotinoidlerin en önemli temsilcisi olan imidacloprid, klorlu bir nikotin olup kloronikotinil sınıfındandır. Bu sebeple hücre düzeyinde etkisini nikotine benzer şekilde spesifik olarak nAChR'ün alfa alt ünitelerine bağlanarak gösterir (Zafeiridou ve Theophilidis 2004). İmidacloprid böceklerde nöronal sinir uyarı iletimini bloke eder, asetilkolin birikimine yol açar ve önce paralyze ardından da ölüme neden olur (Kidd and James 1994). İmidacloprid kırmızı örümcekler, toprak piresi ve kırkayaklar gibi zararlıların tütün, pamuk, mısır, şeker pancarı, patates, domates, patlıcan ve bamyaya gibi bitkiler ile turunçgillere verdiği hasarları önlemek amacıyla tohum ilaçlamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Yue ve ark. 2003). Ayrıca kedi ve köpeklerde pire infestasyonlarının önlenmesi ve tedavilerinde topikal olarak da kullanılmaktadır (Schulz-Jander ve Casida 2005). Türk Gıda Kodeksinde imidacloprid için maksimum üst sınırlar pamuk tohumu için 0.1 ppm, armut, elma, şeftali, buğday, mısır ve soya 0.05 ppm, domates, patates ve şeker pancarı ise 0.02 ppm olarak belirlenmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2004/42 tebliğ). İmidaclopridin kedi ve köpeklerde harici olarak kullanılması, pamuk tohumunun küspe şeklinde ruminant rasyonlarına katılması, meyve ve sebzelerin ise insanlar tarafından doğrudan tüketilmesi bu insektisit besin zincirine kolayca girebileceğini göstermektedir. Yapılan sınırlı sayıdaki bilimsel araştırma imidaclopridin sinir sistemi üzerine olumsuz etkilerini ortaya koymaktadır (Tomizawa 2004, Matsuda ve ark. 2005). Fakat memeli canlılardaki sistemik etkileri üzerine yayınlanmış kapsamlı bir araştırma henüz yapılmamıştır.

Bu çalışmada, akut ve subkronik imidacloprid uygulanan ratlarda imidaclopridin başlıca hedef dokularından olan sinir sistemi ile metabolize edildiği karaciğerin fonksiyonları, lipid peroksidasyon, oksidatif hasar ve yangısal olaylar moleküler ve biyokimyasal teknikler kullanılarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Pestisitler

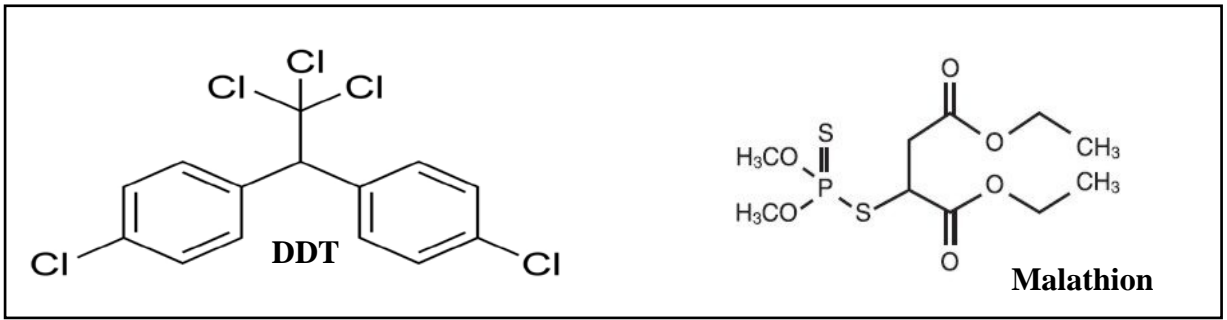
Pestisit; zararlı böcek ya da hayvanların gelişimini önlemek, bunları yok etmek veya sayılarını azaltmak için geliştirilmiş bir madde ya da karışımdır (Abdollahi ve ark. 2003). Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19. Yüzyılda zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimya endüstrisinden faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan yaklaşık %10'u ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup, yeterli mücadele yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'i kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin uzun yıllar kullanım potansiyeline sahip olacağı muhtemeldir (Moses 1992). Ülkemizde değişik ticari formülasyonlar şeklinde, yıllık 30 bin ton civarındaki pestisit tüketiminde, en yoğun kullanılanlar sırasıyla herbisitler, insektisitler ve fungusitlerdir (Güler ve Çabanoğlu 1994). Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucu gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalıntı olarak bulunabilmektedir. Böylece hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken; bazılarının kanserojen, nörotoksik ve hatta mutajenik etkiler saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) "Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi"ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunmasına izin verilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir (Morgan 1992, Moses 1992).

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler hava, su ve toprağa ve bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisit çevredeki hareketlerini; onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir. Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgârlarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bunlarda kalıntı ve toksisiteye neden olabilir. Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer omurgasız su organizmalarının ölmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar. Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal degradasyona; bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından tutulmakta veya kimyasal degradasyona uğramaktadırlar. Toprağın yapısına geçmiş pestisitler kapiller su vasıtasıyla toprak yüzeyine taşınmakta ve buradan havaya karışabilmektedir. Toprağın yapısı, kil çeşidi ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH'sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri tüm bu olayları etkileyen faktörlerdir. Toprakta pestisit tutulmasıyla hareketi ve biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli şekillerde degradasyonu ile ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine dönüşebilmektedir. Pestisit kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan yerleri veya organizmaları kontamine etmesi istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır (Koren ve Bisesi 1996, Morgan 1992, Moses 1992).

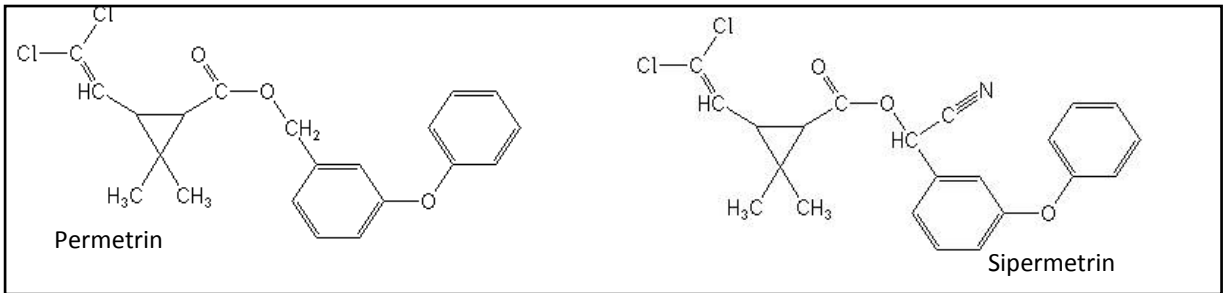
2.2 İnsektisitler

İnsektisitler yaygın olarak tarım, çevre sağlığı, insan ve hayvan sağlığı alanlarında kullanılan pestisit türüdür (Kanbur ve ark. 2008). Pestisitlerin çoğu, değişik etki mekanizmalarına sahip farklı tipte kimyasal maddeler içermekle birlikte, insektisit etkilerini çoğunlukla sinir sistemi fonksiyonlarını bozarak gösterirler (Gubler 1998).

İnsektisitler etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılırlar. Bunlar organik klorlular, organik fosforlular, karbamatlar, piretiroidler ve neonikotinoidlerdir. Organik klorlular, nöron membranlarında katyon transferini etkileyerek nöral iritabiliteye ve merkezi sinir sisteminin eksitasyonuna neden olur. Bu grubun en önemli temsilcisi ilk kez kullanılmaya başlanılan insektisitlerden biri olan diklorodifeniltrikloreten (DDT)'dir. Organik fosforlular ise sinir uçlarındaki asetilkolinesteraz aktivitesini engelleyerek, fosforilasyon sürecindeki enzimi inaktif hale getirirler ve nöral transmisyonu bloke ederler. Paration, diazinon gibi bileşiklerin yer aldığı organik fosforlulardan en yaygın kullanılanı malationdur. Karbamatlar da etkisini organik fosforlulara benzer şekilde gerçekleştiren insektisitlerdir. En sık kullanılan temsilcisi karbamildir (Simpson ve Schuman 2002, Weiss ve ark. 2004).



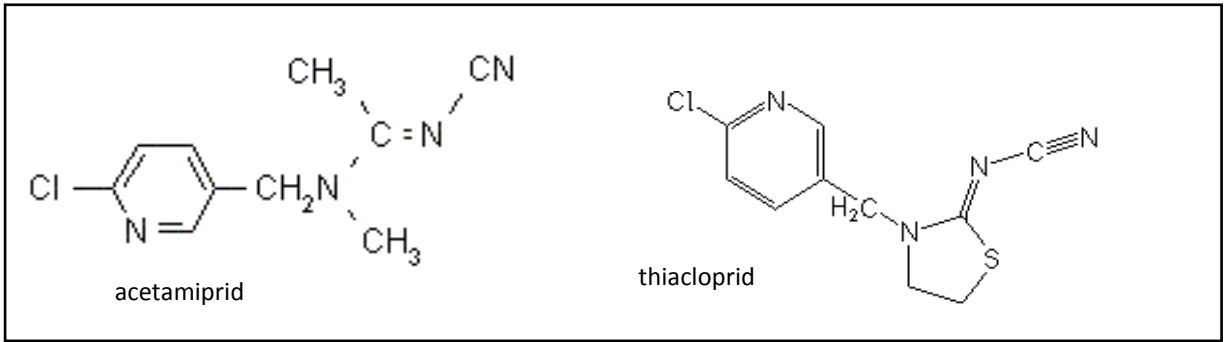
Piretiroidler, *Chrysanthemum* cinsi bitkilerden izole edilen doğal bileşiklerdendir (Shafer ve ark. 2008). Piretiroid insektisitler siyano grubuna sahip olup olmamalarına göre ikiye ayrılırlar. Buna göre permetrin gibi siyano grubu bulunmayan piretiroidler Tip I, sipermetrin ve fenvelerate gibi siyano grubu bulunduranlar Tip II olarak adlandırılırlar. Piretiroidler merkezi sinir sistemi üzerine toksik etkilerini özellikle voltaj bağımlı sodyum kanallarının aktivasyonunu ve kapanmasını inhibe edip membran geçirgenliğini artırarak yapmaktadır. Böylece daha uzun süre açık kalan membrandan daha çok sodyum iyonunun geçişine ve depolarizasyona neden olmaktadır (Ray and Fry 2006, Shafer ve ark. 2008).



İnsektisitlerin memeliler gibi hedef dışı organizmalara verdiği zararlı etkiler hakkında yapılan çalışmalarda bu ajanların toksik etkilerinin oksidatif stres ve yangı ile bağlantılı

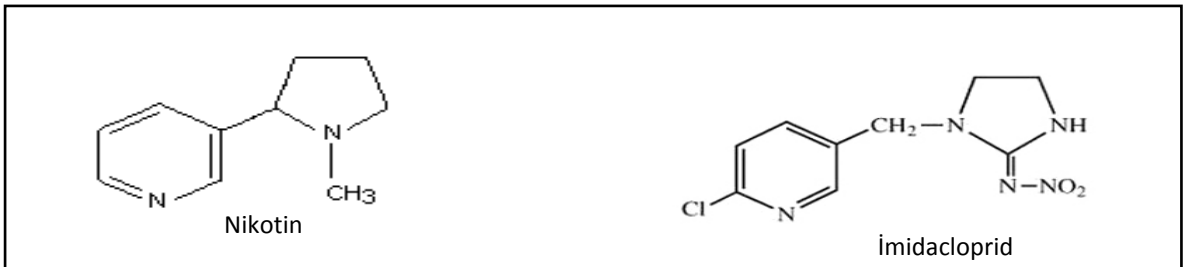
olduğu bildirilmiştir (Rodgers ve ark. 1996, Kale ve ark. 1999, El-Khatib ve ark. 2004, Possamai ve ark. 2007).

Son yıllarda hedef seçici özelliğinden dolayı diğer tür insektisitler yerine kullanılmaya başlanılan insektisit grubu ise neonikotinoidlerdir (Ihara ve ark. 2006). Etki tarzları diğer canlılara göre insektlerde nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) yüksek spesifite göstermeleridir. Thiacloprid, acetamiprid gibi bileşikler içeren sınıfın en önemli temsilcisi ise imidaclopridtir (Costa ve ark. 2009).



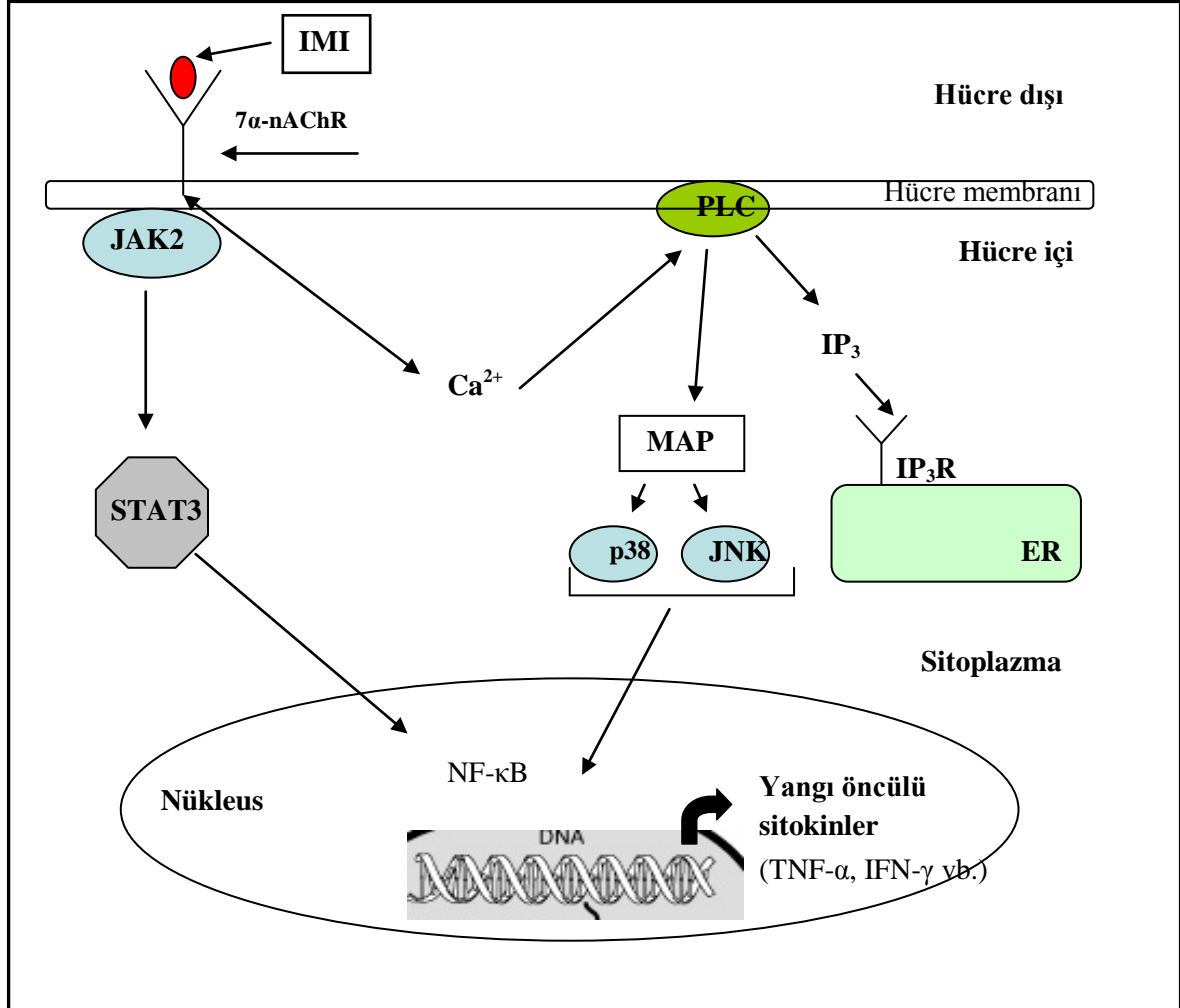
2.2.1. İmidacloprid

İmidacloprid, 1999 yılında yeni nesil insektisit grubu olan neonikotinoidlerin ilk üyesi olarak üretilen ve önemli bir sistemik insektisittir. İmidacloprid klorlu bir nikotin olup kloronikotinil sınıfındandır. Bu nedenle hücre düzeyinde etkisini nikotine benzer şekilde spesifik olarak nAChR'nün 7 alfa alt ünitesine bağlanarak gösterir (Şekil 2.1, Tomizawa ve Casida 2005, Abou-Donia ve ark. 2008). İmidacloprid böceklerde nöronal sinir uyarı iletimini bloke ederek asetilkolin birikimine yol açıp önce paralize, ardından ölüme neden olur.



İmidacloprid kedi ve köpeklerde pire infestasyonlarında topikal olarak kullanılan başlıca ajandır (Schulz-Jander ve Casida 2005). Bunun yanında permetrin ile kombine

edilerek köpeklerde kenelere karşı koruyucu etkili damla tarzında da kullanılmaktadır (Machida ve ark. 2008).



Şekil 2.1. İmidaclopridin etki mekanizması (Dajas-Bailador ve Wonnacott 2004, Tracey 2009).

İmidaclopridin LD₅₀ dozu ratlarda 450 mg/kg, farelerde ise 131 mg/kg/vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir (Kidd ve James 1994, Federal Register 1995, Meister 1995). İmidaclopridin akut toksik etkileri arasında inkoordinasyon, titreme, aktivite ve kilo kaybı gibi belirtiler sayılabilir. Yapılan araştırmalarda 1 yıl süreyle imidaclopride (17 mg/kg) maruz kalınmasının erkek ratlarda tiroid lezyonlarına, dişi ratlarda ise kilo artışının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. 100 mg/kg üzeri dozlar ise dişi ratlarda retina atrofisine neden olmaktadır (Kidd ve James 1994, Federal Register 1995, Meister 1995). Bunun yanında insan periferik kan hücrelerinde yapılan bir çalışmada imidaclopridin DNA hasarına neden olduğu rapor edilmiştir (Feng ve ark. 2005). Bazı araştırmalar imidacloprid

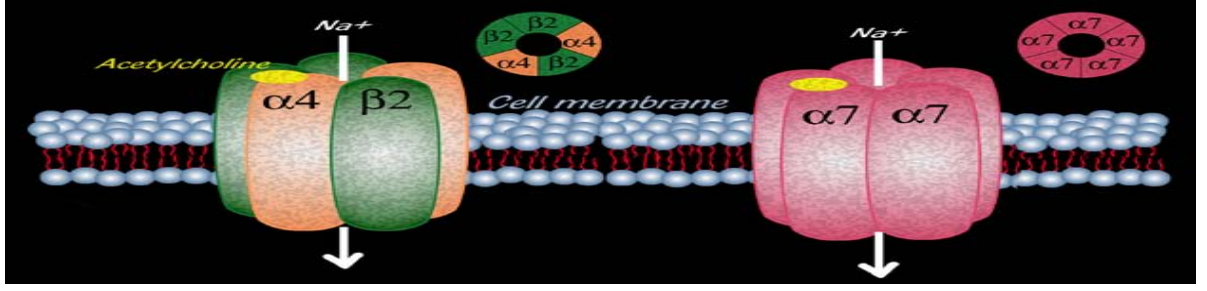
uygulamasının sitogenetik, genotoksik, nörotoksik (Karabay ve Oğuz 2005) ve gebelikte yavru gelişimi üzerine olumsuz etkilerini göstermiştir (Abou-Donia ve ark. 2008).

İmidaclopridin organizmadaki metabolizasyonu, sitokrom P450 tarafından imidazolidin hidrosilasyonu ardından NADPH'ın katıldığı 5-hidroksi-imidacloprid ve olefinin oluştuğu dehidrojenerasyon reaksiyonları ile başlar. Sitokrom P450 ve flavin monooksijenazların yürüttüğü nitroimin indirgenmesi ve ikincil amin oksidasyonu ile nitrosoimin, guanidin ve üre türevlerine kadar yıkımlanır (Parkinson 2001, Schulz-Jander ve Casida 2002).

2.2.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

Nikotinik asetil kolin reseptörleri ilk olarak sinir-kas sinapslarında tespit edilmiş olmakla birlikte, yapılan son çalışmalar bu reseptörlerin yalnızca sinir hücrelerinde bulunmadığını, aynı zamanda adipositler, makrofajlar, lenfositler, keratinositler, karaciğer, dendritik, akciğer ve bağırsak epitel hücrelerinde de eksprese edildiğini ortaya koymaktadır (Gahring ve Rogers 2006, Kalamida ve ark. 2007, Abou-Donia ve ark. 2008). Bu durum, imidaclopridin muhtemel olumsuz etkilerini, bu dokularda da gösterebileceğine dair kanıt olabilir.

Asetilkolin, nörotransmitterlerin prototipi olup bakteriler, algler, protozoalar ve ilkel bitkilerde bulunmaktadır. Kolin asetil transferaz enziminin katalize ettiği kolin ile asetil koenzim A reaksiyonu sonucu asetilkolin oluşmaktadır. Asetilkolinesteraz ise asetilkolini hidrolize eder. Asetilkolinin iki tip reseptörü vardır: nikotinik (nAChR) ve muskarinik (mAChR). nAChR 290 kDa ağırlığında bir proteindir. nAChR'leri Na^+ ve Ca^{2+} girişi ve K^+ çıkışı ile yönetilen klasik ligand-kapılı iyon kanal proteinleri veya iyonotropik reseptörlerdir. Alt ünite kompozisyonları bu reseptörlere değişik işlevsel ve farmakolojik özellikler kazandırmaktadır. Onyediyedi adet nAChR altünite geni pentamerik bir protein kodlar ve bu genler 9 adet α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$), 3 adet β ($\beta 2$ - $\beta 4$), γ , δ ve ϵ olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Alfa7, nAChRs hem akson ve sinaps gelişiminde hem de sinaptik plastisitede rol aldıklarından, gelişimsel nörotoksisitede olası hedeftirler (Matsuda ve ark. 2005, Abou-Donia ve ark. 2008).



Şekil 2.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerinin Şematik Yapısı (Georgi 2005).

Asetilkolinin nikotinik kolinoreseptör ile etkileşmesi (α alt-ünitesine bağlanarak) Na^+ iyon kanalının açılmasına neden olur. İçe doğru olan sodyum akışı membran depolarizasyonuna ve aksiyon potansiyelinin iskelet kasının transvers (T) tübüleri boyunca yayılmasına neden olur. Bu da, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınımını ve bunu takip eden kimyasal ve mekanik olaylar sonucu kasın kasılmasını sağlar. Beyindeki nAChRler sinaptik geçişi başlatmaktan çok, düzenlemekte görev alırlar. nAChR'leri Ca^{2+} için çok geçirgendir. Ca^{2+} 'nin bu düzenleyici etkilerde kritik bir rolü vardır. Reseptör uyarımının ardından gelişen iyon akıcı sürecinde birçok hücre içi oluşum ile karışır (Gahring ve Rogers 2006).

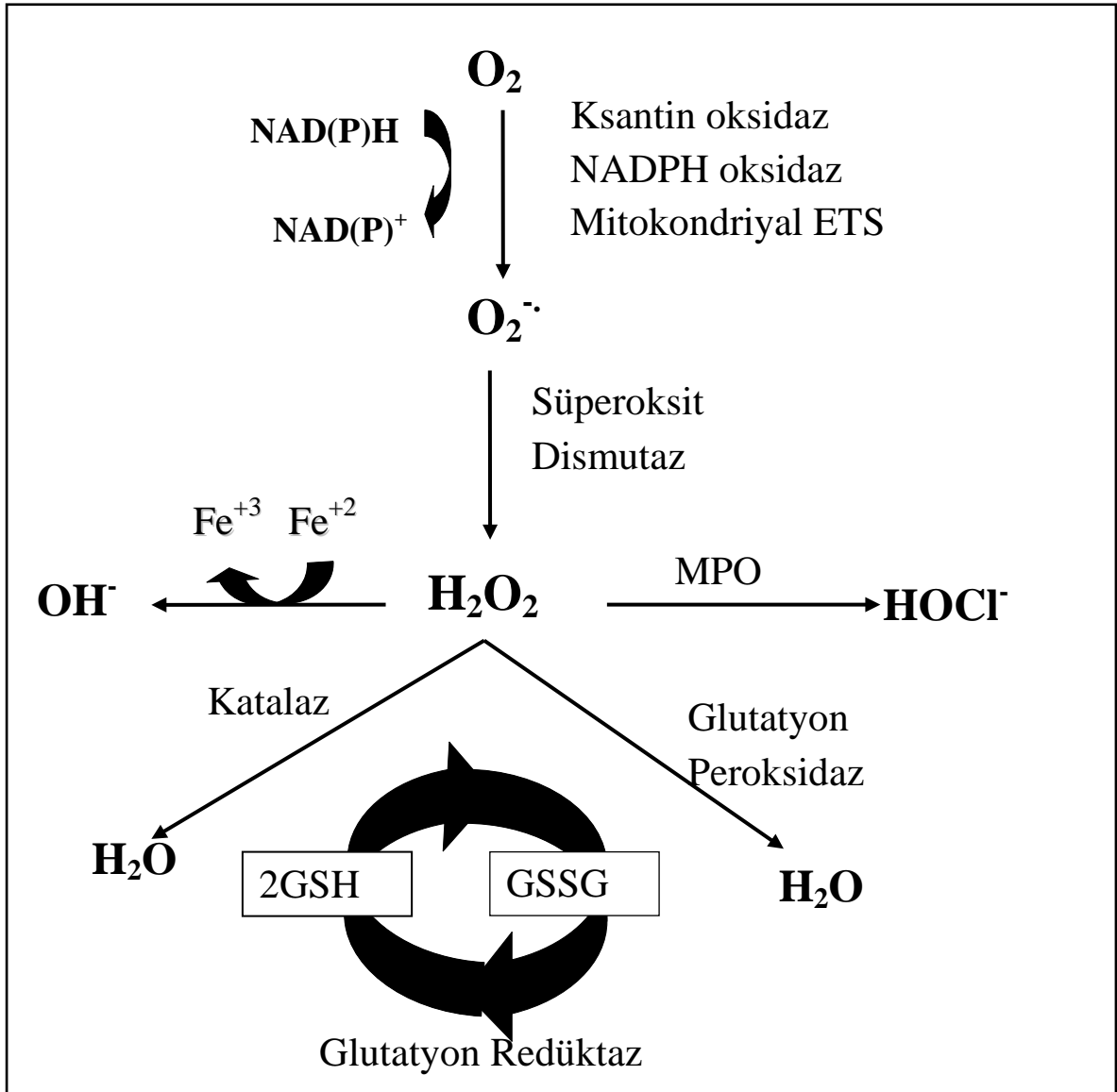
2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.3.1. Serbest Radikaller

Pestisitlerin kullanımıyla beraber insan ve hayvansal organizmalarda serbest oksijen ve azot radikallerine bağlı olarak önemli sağlık problemleri ve verim kayıpları ortaya çıkar. Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikaller sıklıkla transfer zincirinde veya oksidazlar aracılığıyla meydana gelen elektronların transferi ile oluşabildikleri gibi, moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla da üretilebilirler. Ayrıca iyonize radyasyon da serbest radikal kaynaklarından biridir. (Cherubini ve ark. 2005).

Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir konfigürasyona sahiptir. Bu yüzden biradikal olarak değerlendirilmektedir. Oksijen molekülü reaktif olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir (Vincent ve ark. 2004). Oksijen molekülü tek elektron

olarak süperoksiti (O_2^-), iki elektron indirgenmesi ile hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. Süperoksit, doğrudan zararlı bir serbest radikal olmamakla birlikte, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H_2O_2 kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir. Süperoksit fizyolojik pH'da kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) ile katalize edilen bir reaksiyonla H_2O_2 oluşturabilir (Vincent ve ark. 2004). Oluşan H_2O_2 ile demir tuzlarının reaksiyonu birçok radikalın oluşumuna zemin hazırlar.



Şekil 2.3. Serbest Radikal Oluşum Reaksiyonları, Oksidan ve Antioksidan Enzimler (Temple ve ark. 2005).

Fenton reaksiyonunda O_2^- öncelikle bir metal (Cu^{+2} veya Fe^{+3}) iyonu ile reaksiyona girer böylece indirgenmiş metal ve O_2 meydana gelir. Daha sonra indirgenen metal iyonu

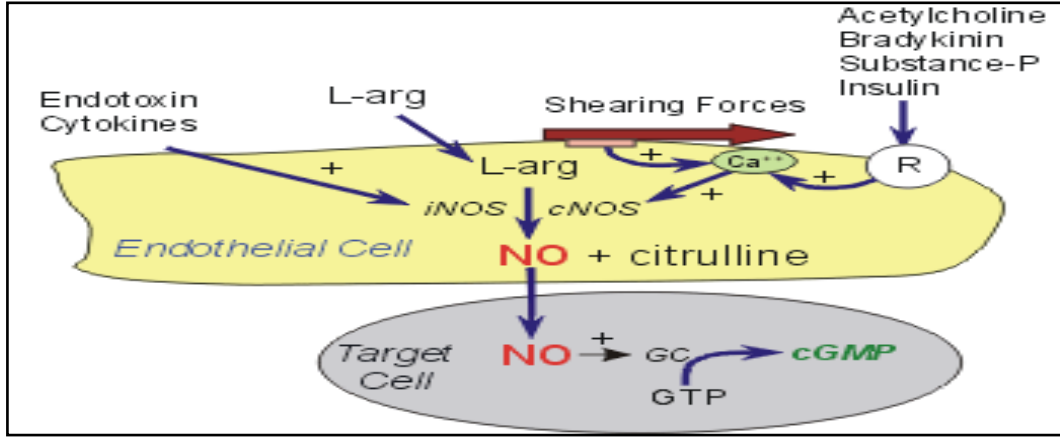
H₂O₂ ile reaksiyona girerek başlangıçtaki metal iyonunu ve hidroksil radikalini (OH⁻) oluşturur. H₂O₂ OH⁻ radikalini meydana getirmek için Cu⁺² ile Fe⁺² iyonuna oranla daha çok reaksiyona girer. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan polisakkaritler, aminoasitler, fosfolipidler, DNA bazları ve organik asitler gibi pek çok molekülle reaksiyona girebilir (Sies 1997).

Hidrojen peroksit, myeloperoksidaz enzimi (MPO) katalizörlüğünde Cl⁻ ile reaksiyona girerek daha güçlü bir radikal olan hipokloriti (HOCl⁻) meydana getirir (Şekil 2.3). HOCl⁻, alkilperoksil radikali (⁻OOOCR), O₂⁻ ve OH⁻ ile birlikte lipid peroksidasyonunu başlatan oksijen radikalidir (Patockova ve ark. 2003). Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması sonucu oluşur. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer birimlerine hasar verirler (Halliwell 1991).

Ortamda artmış olarak bulunan reaktif oksijen türleri nitrik oksit (NO) ile birleşip peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumuna yol açmaktadır. Peroksinitritin doğrudan DNA hasarına yol açarak apoptotik yolları tetikleme söz konusudur. NO memeli canlı hücreleri tarafından uygun miktarda üretildiğinde konak savunması, nöronal iletişim, yangı ve vasküler regülasyon gibi fizyolojik süreçlerde anahtar sinyal molekülü olarak görev yapar (Guo ve ark. 2003). Bunun yanında aşırı ve kontrol edilemeyen NO sentezi, insanlarda birçok ölümcül hasara neden olabilir. Bunların arasında en önemlileri inme, diyabet, nörodejenerasyon, artrit ve kronik yangı bulunmaktadır (Ebadi ve Sharma 2003). Nitrik oksit, NO sentetaz (NOS) adı verilen enzimler vasıtasıyla L-arjininden sentezlenen, kolaylıkla hücre içine ve hücre membranlarına difüze olup moleküler hedeflerle reaksiyona girebilen küçük, kısmen kararlı bir serbest radikal gazdır (Şekil 2.4). Farklı genlerden kaynaklanan ve değişik sinyal yollarıyla regüle edilen 3 tip NOS enzimi bulunmaktadır. Bunlar nöronal (nNOS), sitokin ve lipopolisakkarit-uyarılabilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) nitrik oksit sentetazdır (Shimomura-Shimizu ve ark. 2005).

Nitrik oksitin doğrudan etkisi daha ılımlı olmakla beraber, O₂⁻ ile birleşip ONOO⁻ oluşturarak olumsuz etkisini artırmaktadır. Peroksinitrit proteinlerdeki tirozin artıklarını nitrotirozinleri oluşturmak için modifiye eder. Nörofilamentlerin ve aktin gibi yapısal proteinlerin nitrasyonu patolojik şartların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İnsanlarda

ateroskleroz, myokardiyal iskemi, septik ve hasarlı akciğerler, yangısal bağırsak hastalığı ve amyotropik lateral skleroz gibi durumlarda nitrotirozinlerin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Maeda ve Akaike 1998, Coleman 2001).

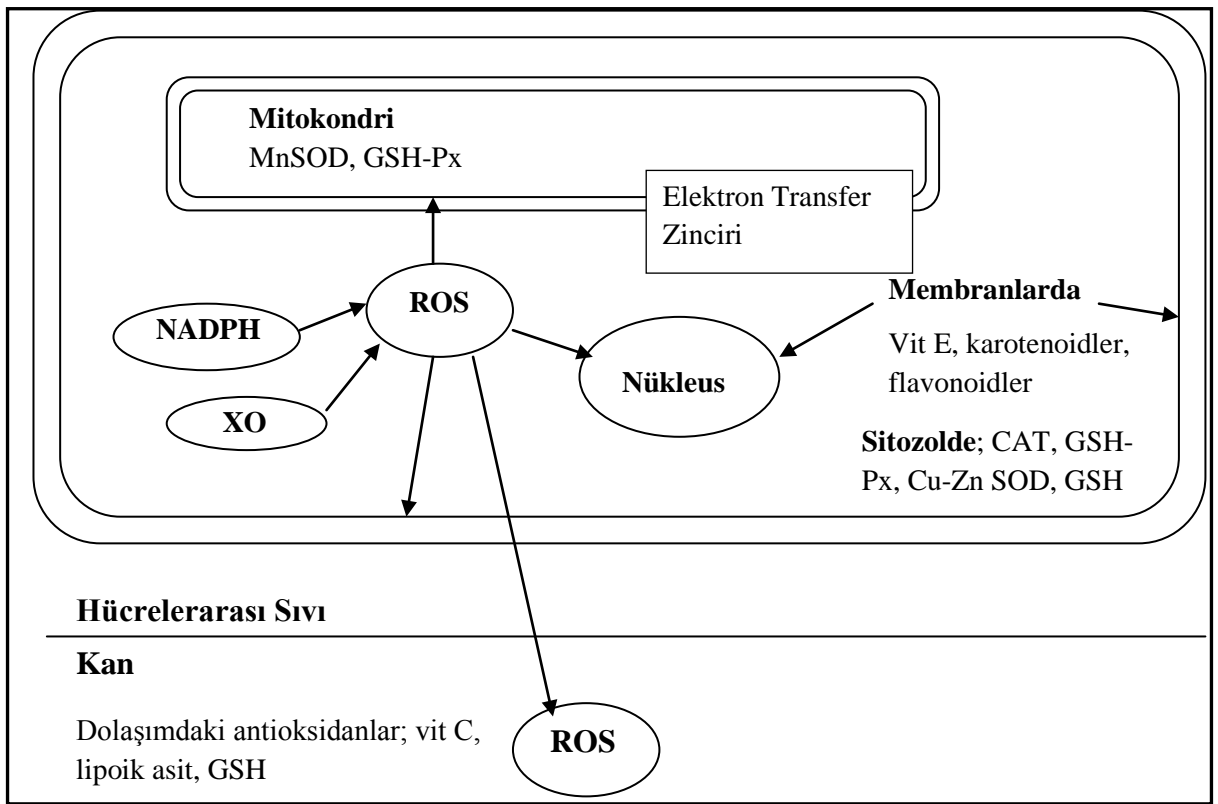


Şekil 2.4 Nitrik Oksit (NO) sentezi ve fonksiyonu (Anonim, 2009).

Reaktif oksijen türleri mitokondriyal solunum zinciri, sitokrom P450 (Blanck ve ark. 1991), ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, siklooksijenaz, monoamin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidatif enzimler (Toykuni 1999, De Groot 1994); ferrohemoglobin veya myoglobin gibi hem proteinlerinin otooksidasyonu ile oluşabilir. Bu hücre kaynakları yanı sıra radyasyon, UV ışınları, sigara ve bazı ilaçlar çevresel serbest radikal kaynakları olarak sayılabilir. Oksidanların özellikle ROS'lerin aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres (Opara ve ark. 1999), membran lipidlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliğini artırır, ayrıca membran seçiciliğini de değiştirir (Prasad ve ark. 1989).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun başlangıcında yer alan O_2^- , enzim aktivasyonlarında bozulmaya ve iyon transferinde aksaklıklara neden olurken, Fe^{+2} iyonu ile reaksiyona girip proteolizise neden olabilir (Giles ve ark. 2003). DNA'da ise; şeker halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlar, bazlardaki modifikasyonlara bağlı transkripsiyon hataları, zincir kırılmaları ile protein sentezinde inhibisyonlara neden olur, böylece hücre ölüme gidebilir (Evans ve ark. 2003, Giles ve ark. 2003). Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenez, mutajenez, infeksiyöz, karaciğer, akciğer, göz ve ürolojik hastalıklara da neden olabilir (Zima ve ark.1995).

Hücreleri ROS'a karşı koruyan birçok enzimatik ve non-enzimatik mekanizma bulunmaktadır. O_2^- 'i etkisizleştiren SOD, H_2O_2 'i hidrolize eden katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sistemleri ve paraoksanaz (PON); reaktif yan ürünleri ve lipid aldehydleri yok eden glutasyon transferazlar, çeşitli ROS'lerini elimine eden metallotioninler, hem oksijenazlar; oksidatif reaksiyonları başlatan Fe^{+2} gibi geçiş metallerini bağlayan seruloplazmin ve ferritin bunların arasında sayılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar düşük moleküler ağırlıklı glutasyon (GSH), vitamin E, askorbat, vitamin A, ubiquinon, ürik asit ve bilirubindir (Yu 1995, Halliwell 1999).



Şekil 2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin ve Antioksidanların Lokalizasyonu (Fineud ve ark. 2006).

Bakır-çinko SOD (Cu-Zn SOD) sitozolde ve mitokondriyi saran iki zarın arasında bulunurken, manganez içeren SOD (Mn-SOD) ise mitokondriyal matrikste yer alır. Her iki enzim de ROS kaynaklı toksisitenin engellenmesinde önemlidir (Fridovich 1997). CAT öncelikle peroksizomlarda bulunmaktadır. İki hidrojen peroksitin reaksiyona girip su ve moleküler oksijen oluşturduğu tepkimeyi kataliz eder. Glutasyon peroksidaz sistemi, GSH-Px, glutasyon redüktaz (GR) enzimlerini ve GSH ile NADPH'ı içeren birçok elemandan meydana gelmektedir. GSH bu sistemin önemli parçalarından biridir. Glutasyon

transferazın kofaktörü olarak ilaç ve kimyasalların ve reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır. Bütün bu fonksiyonlarından dolayı GSH muhtemelen hücredeki en önemli non-enzimatik antioksidandır (Parke 1999, Şekil 2.5).

Serbest radikaller, pestisitlerin ve çevresel kimyasalların toksisitesinde önemli rol oynamaktadır. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, pestisit kaynaklı oksidatif stresin vücutta toksikasyon mekanizmasının bir parçası olduğunu bildirmektedir. Pestisitler oksidatif stresi uyararak ROS'lerinin üretimini tetiklemekte ve antioksidanlar ve ROS temizleyici enzim sistemlerinde değişikliklere neden olmaktadır. Pestisit intoksikasyonu sonucu oluşan oksidatif stres memeli canlılar ve diğer organizmalarda hücre ve doku hasarına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi pestisit kaynaklı moleküler mekanizmalardan birisidir (Almeida ve ark. 1997, Oruç ve Üner 2000, Hazarika ve ark. 2003).

Pestisitler, hücrelerde sitokrom P450, peroksizomlar ve mitokondride enzimatik sistemleri değişikliğe uğratarak veya uyararak serbest radikaller oluştururlar. Ayrıca, serbest radikalleri yok ederek ya da etkisizleştirerek hücreleri koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan sistemleri tüketebilir, inhibe edebilir veya taşıyabileceklerinden daha fazla yük yüklerler. Hücrelerde oksidatif hasar oluşturarak lipid peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine yol açarlar. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (Aktivatör protein-1, Nükleer Faktör-kappa B) aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum, pH değişiklikleri veya hücre ölümü gibi hücre fonksiyon bozukluklarına yol açabilir (Bagchi ve ark. 1995, Lodovici ve ark. 1997).

Siklodienler, organik fosforlar, karbamatlar, piretiroidler gibi insektisitlerin, oksidatif stresin bir sonucu olarak lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına, aşırı nitrik oksit üretimine, antioksidan mekanizmalarda değişikliklere neden olduğu bildirilmektedir (Bagchi ve ark. 1995, Kanbur ve ark. 2008).

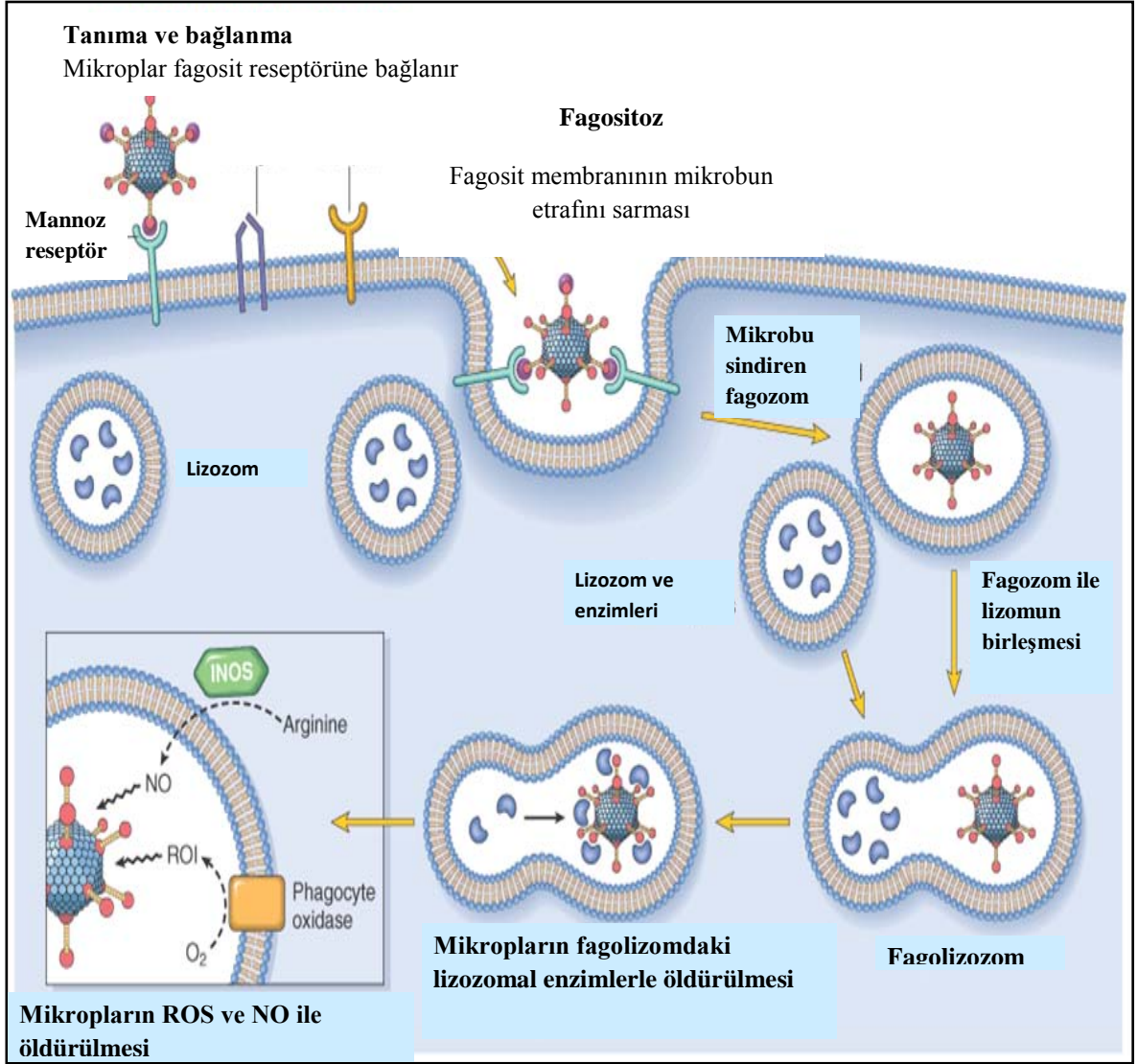
2.3.2. Yangı ve Serbest Radikaller

İmmün sistem vücudu çevresel stres faktörlerine karşı savunma fonksiyonuna sahip hücresel, moleküler ve kimyasal mediyatörleri kapsamaktadır. Bu stres faktörleri çeşitli mikroorganizmalar (viral, bakteriyel, fungal ajanlar), fiziksel hasar (yanıklar,

yaralanmalar) veya çevresel toksinler (yılan zehirleri, esansiyal olmayan metaller, kimyasallar) olabilmektedir. Yangı immun sistemin doku hasarına karşı ilk doğal korunma yanıtıdır. Öncelikle dokuya zarar veren yabancı antijenin tipine göre spesifik bir yanıt gelişir. Sonraki faktörler immun sistem hücrelerinin saldırı altındaki alana ulaşmaları açısından önemlidir. Bu fonksiyonu gerçekleştirenler beyaz kan hücreleri ve onların yardımcıları kompleman sistem ve sitokinlerdir. Vücuda giren antijeni fagositoz yoluyla elimine eden fagositik hücrelerdir. Bunlar granülositler, nötrofiller, monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerdir. Fagositik hücrelerin en çarpıcı fonksiyonu hasarlı bölgeye göçleridir. Görevleri sırasıyla: a) Marjinasyon ve yuvarlanma, b) Adezyon, c) Emigrasyon, d) Fagositoz ve intravasküler yıkım, e) Lökosit ürünlerinin ekstrasellüler salınımıdır (Şekil 2.6).

Fagositoz sırasında serbest oksijen ve azot radikallerinin oluşumu hücre içi patojenlerin öldürülmesi sırasında makrofajların ve nötrofillerin kullandığı başlıca mekanizmalardandır. Nötrofil ve makrofajlar kemotaksi, immünkompleksler veya fagositoz ile aktive edildiklerinde lizozomal enzimleri ve serbest oksijen radikalleri salarak inflamatuvar yanıtı eşlik ederler. Fagositik hücrelerin bakterisidal aktivitelerinin çoğu oldukça yüksek miktarda oksijen metabolitleri ve MPO içeren fagolizozomda meydana gelir. Oksidatif yangı, plazma membranı ilişkili NADPH oksidazın moleküler oksijeni indirgeyerek O_2^- oluşturması ve bu hücrelerin mikrobisidal gücünü oluşturan reaktif oksijen türlerinin üretimi ile başlar (Şekil 2.7, Wink ve ark. 1997).

Yangının diğer ve önemli elemanları sitokinlerdir. Sitokinler doğal ve spesifik immunitenin efektör fazında üretilirler, bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların oluşturulup düzenlenmesini sağlarlar. Sitokinler, doğal ve edinsel immunitede rol alan ve hücrelerin immun fonksiyonlarını sağlayan polipeptid moleküllerdir. Bu moleküller, lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol alırlar (Abbas ve Lichtman 2005). Doğal bağışıklıkta lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal ürünler mononükleer fagositleri doğrudan uyararak kendi sitokinlerini salgırlar. T hücrelerinden türeyen sitokinler yabancı antijenlerin özel olarak tanınmasına yanıt sonucu meydana gelir (Oppenheim ve Netta 1994).

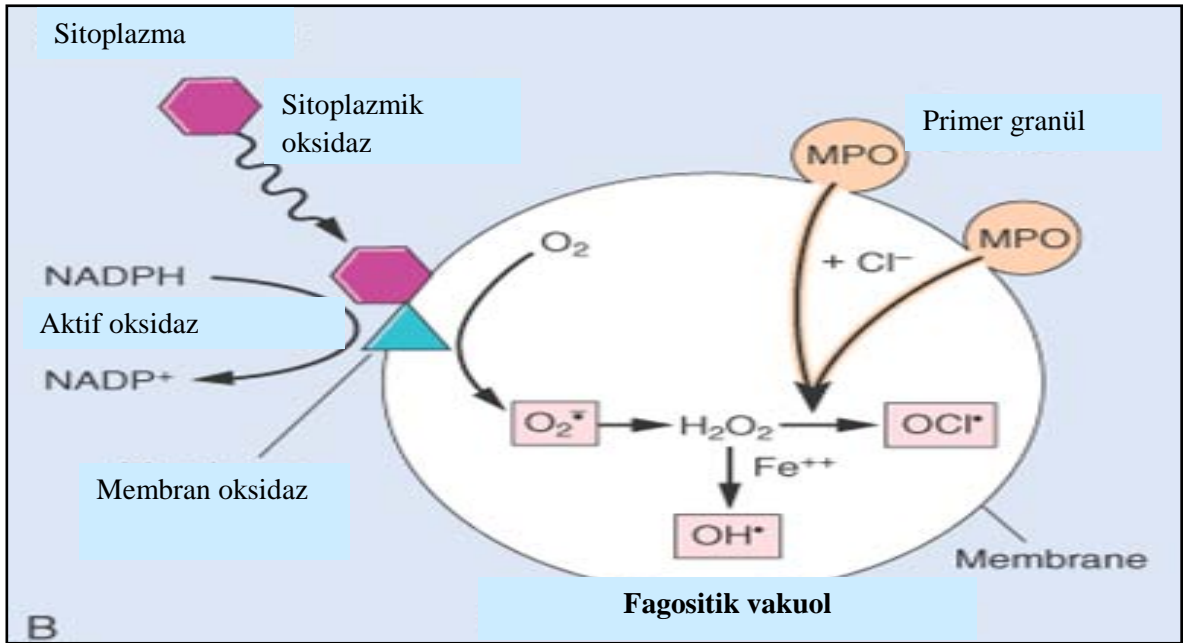


Şekil. 2.6. Antijenlerin Tanınması ve Fagosite Edilmeleri (Goldsby ve ark. 2002).

Yangıda rol alan en önemli sitokinler, interlökinler (IL) ve tümör nekroz alfa (TNF- α) dir. Özellikle IL-1 ve TNF- α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktif makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılırlar (Abbas ve Lichtman 2005).

TNF- α , immunoinflamatuvar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda (10^{-9} M) lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon-gama (IFN- γ) ile kombinasyonu sitotoksiktir. Çalışmalar, TNF- α 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral immünitede en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisi yönetir. TNF- α ; aktif monositler, makrofajlar ve daha düşük düzeyde aktif

T hücreler, B hücreler, mast hücreler, fibroblast, keratinosit, Kupffer hücreleri, düz kas, sinovial örtü hücreleri ve bazofil gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır. Fibroblastlar ve endotel hücreleri tarafından salgılanan TNF- α , damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Bu etkileri düz kas hücrelerine doğrudan etki ederek ve damar endotel hücreleri tarafından salgılanan proktasiklin ve NO gibi vazodilatatörleri uyararak indirekt yoldan yapar (Vasalli 1993, Deng ve ark. 1995, Goldsby ve ark. 2002).



Şekil 2.7. NADPH Oksidaz Sisteminin Uyarılması ve Fagolizozomda Gelişen Oksidatif Olaylar (Goldsby ve ark. 2002).

IL-1 düşük konsantrasyonlarda lokal yangı mediyatörüdür. IL-1 ailesinin 3 üyesi vardır: IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonist (IL-1Ra). Endotelial hücrelerde lökosit adezyonunu düzenleyen yüzey moleküllerin ekspresyonunu artırır. Yüksek konsantrasyonlarda dolaşıma geçerek koagülasyon yolağını aktive eder, karaciğeri uyararak akut faz proteinlerinin üretimini artırır ve makrofajları aktive eder. IL-1 başlıca monositler, makrofajlar, dendritik ve endotelial hücreler ve bazı epitelyal hücrelerde üretilir (Dinarello 1997).

IL-6 doğal ve edinsel immunitede rol alır. Mononükleer fagositler, vasküler endotelial hücreler ve fibroblastlarda sentezlenir. Hepatositlerden akut faz reaktanlarının

sentezlenmesi ve nötrofil yapımı doğal immunité olan rolleridir (Deng ve ark. 1995; Delves ve ark. 2006).

IL-12, intraselüler antijenlere karşı erken doğal yanıtta ana mediyatördür. Bu antijenlere karşı adaptif immun yanıtın anahtar indükleyicisidir. Özellikle doğal öldürücü (NK) aktivitesini aktive eder, T ve NK hücrelerinden interferon gama (IFN- γ) salınımını artırır. Ana kaynakları, aktif mononükleer fagositler ve dendritik hücrelerdir. Doğal immunitéde lipopolisakkarit (LPS), viral enfeksiyon ve intraselüler bakterilere karşı savunmada etkilidir (Delves ve ark. 2006).

IL-10, aktif makrofaj ve dendritik hücrelerin inhibitörüdür. Doğal immun reaksiyonların ve hücrel immunitenin kontrolünde görev alır. Aktif makrofaj ve dendritik hücrelerden IL-12 salınımını inhibe eder. IFN- γ , en önemli makrofaj uyarıcı sitokindir. Aktif makrofajların fagosite ettikleri antijeni öldürmesini uyarır. Nötrofilleri ve NK hücrelerinin sitolitik etkilerini uyarır (Goldsby ve ark. 2002).

Pestisitlerin yıkıcı etkileri ile ilgili olarak oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve yangı gibi çeşitli mekanizmalardan söz edilmektedir. İnsektisitlere maruz kaldığında mikrogliaların aktif hale geldiği ve bunun sonucunda yangı öncülü sitokinlerin ve serbest radikaller gibi sitotoksik moleküllerin açığa çıktığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 2002). Süperoksit radikalinin, NO ve TNF- α 'nın birlikte dopaminerjik nörodejenerasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Gao ve ark. 2003). Piretiroidlerden siflutrin ve organik fosforlu insektisitlerden klorprifos'un yangı mediyatörü olan IFN- γ ve IL-6 salınımını arttırdığı gösterilmiştir (Mense ve ark. 2006). Bir organik klorlu olan endosülfanın aynı şekilde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 salınımını arttırdığı ve iNOS gen ekspresyonunu uyardığı bildirilmiştir (Han ve ark. 2007).

Bu tez çalışmasında yeni nesil neonikotinoid insektisitlerden imidaclopridin memeli canlılar üzerine olası olumsuz etkileri yangı ve oksidatif stres açısından incelendi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler; imidacloprid (Fluka, USA), Bradford reagent, Trizol, ksantin (Sigma, USA), sodyum klorür, di sodyum hidrojen fosfat ayırıcı, hidrojen peroksit, triklor asetik asit, 2-thiobarbutirik asit, % 96'lık etanol, di potasyum EDTA, çinko sülfat, 2,2'- dinitro-5,5'-dithio-bis-dibenzoik asit, sodyum hidrokisit, bakır sülfat, glisin, sülfonilik asit, hidroklorik asit, dimetilsülfoksit (DMSO), n-naftil etilen daimin, n-butanol, kloroform, di sodyum hidrojen fosfat, potasyum di hidrojen fosfat, tetrametil benzidin, izopropanol (Merck, Almanya) dır.

3.2. Hayvan Materyali ve İmidaclopridin Uygulanışı

Bu araştırmada, 100–150 g ağırlığındaki Wistar cinsi dişi ratlar kullanıldı. Ratlar MKÜ Veteriner Fakültesi'nde özel oda ve rat kafesleri içerisinde sabit oda sıcaklığında ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve standart ticari rat pelet yemi ile beslendi. Hayvanların önlerinde daima yem ve su bulunduruldu. Ratların teminini takip eden on gün süresince adaptasyonları sağlandı. Tesadüfî örnekleme ile akut kontrol (Grup 1) ve akut imidacloprid grubu (Grup 2) ile kronik kontrol (Grup 3) ve subkronik imidacloprid (Grup 4) grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı (n=10 rat/grup).

İmidacloprid önce düşük hacimde DMSO içinde, daha sonra fizyolojik tuzlu suda (FTS) çözdürüldü. Araştırmanın ilk bölümü olan akut uygulama safhasında, hayvanlar ketamin (50 mg/kg i.p.) anestezisi altında 2.6 mg/100 g canlı ağırlık (10 μM) dozunda 250 μl hacmindeki imidacloprid subklavian venadan enjektörle yavaş bir biçimde verildi. Bu akut doz daha önce literatürde belirtilen (Kidd ve James 1994) LD_{50} 'nin $\frac{3}{4}$ 'üne olacak şekilde ayarlandı. İki saat sonra anestezisi altında ratların kalplerinden kan alınarak sakrifiye olmaları sağlandı. Kontrol grubu ratlara aynı miktarda DMSO içeren FTS verildi.

Araştırmanın kronik çalışma bölümünde ise imidacloprid dozu $\frac{1}{15} \text{LD}_{50}$ ve vücut ağırlıkları göz önüne alınarak hesaplandı (OECD 1998, guideline 408) ve ratlara mısır yağında çözdürülmüş 1 mg/kg canlı ağırlık/gün dozunda imidacloprid 30 gün süresince gavaj yoluyla verildi. Kontrol grubu hayvanlara da 30 gün boyunca aynı miktarda taşıt madde olan mısır yağı verildi. Ratlar her çalışma sonunda ketamin ile genel anesteziyeye alınarak yukarıda belirtildiği gibi sakrifiye edildi.

3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alımı

Her bir deneme sonunda anestezi altındaki ratlardan kan, beyin ve karaciğer doku örnekleri uygun koşullar altında alındı ve soğuk PBS ile yıkanıp poşetlenerek buz içerisine konuldu. Dokular proteaz inhibitör [aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid (NaF) (Sigma, USA)] karışımını içeren uygun homojenizasyon çözeltisi içinde homojenize edildi. Bu amaçla sağ karaciğer lobu ile total beyin dokusu kullanıldı. Sitoplazmik içeriği ayrıştırılan örnekler eppendorf tüplere konuldu ve 12000 xg, 4°C’de 10 dakika santrifüj (Heal Force; Neofuge 13R, Çin) edildi. Kalpten alınan kan örnekleri de 3000 rpm’de 15 dakika santrifüj (Nüve, Almanya) edilerek plazmaları çıkarıldı. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlardaki protein düzeyleri Bradford metodu ile tespit edildi. Plazma ve homojenatlar analize kadar -86°C’de saklandı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahip olduğundan protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max} = 465\text{nm}$) ve mavi ($\lambda_{max} = 595\text{nm}$) formu mevcuttur. Protein bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Deney şu şekilde uygulandı: doku homojenatlarından 20 μl alınarak üzerine 200 μl Bradford reagent ve 580 μl su ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra, absorbans 595 nm’de ölçüm yapıldı. Standartlar yardımıyla örneklerin protein düzeyleri hesaplandı (Bradford 1976).

3.4.2. Malondialdehit (MDA) Analizi

Plazma ve doku örneklerinde MDA tayini Yoshiko ve ark. (1979) tarafından modifiye edilen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbütirik asidin (TBA, Merck) reaksiyonu temeline dayanmaktadır. MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansının 535 nm’de spektrofotometrik ölçümü (UV mini-1240 Shimadzu) ile lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır. Elde edilen sonuçlar μmol cinsinden verildi.

3.4.3. Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma ve doku örneklerindeki NO ölçümünde bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olması nedeni ile NO düzeyi göstergesi olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla Griess metodu (Cortas ve Wakid 1990) kullanıldı. Kadmiyum granülleri (2-25 g.), süzgeç kâğıdından süzdürülerek 3 kez deiyonize su ile yıkandı. Glisin-NaOH tampon II (15 g/L, pH=9.7) içinde 5 mmol/L CuSO_4 solüsyolunda 5 dk karıştırılarak aktive edildi. 300 µl örnek alınarak 250 µl 75 mmol/L ZnSO_4 ve 350 µl 55mmol/L NaOH eklendi. 10000 xg 4°C'de 3 d santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 750 µl alınarak üzerine 250 µl glisin tampon I (45 g./L pH: 9.7) ilave edildi. Bunun üzerine aktifleştirilen kadmiyum granüllerinden her tüpe bir granül olacak şekilde konuldu. Bu şekilde 10 dk karıştırıldıktan sonra hazır hale gelen örneklerden 300 µl alınıp üzerine 1125 µl çözelti 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200 µl çözelti 2 (Sülfanilik asit, 3 mmol/L HCL) eklenerek; örnek yerine su ilave edilerek hazırlanan köre karşı 546 nm'de okuma yapıldı. Elde edilen veriler plazma örnekleri için µmol/L, doku örnekleri için µmol/mg protein cinsinden verildi.

3.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini

Karaciğer ve beyin doku homojenatlarında GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentine (1967) belirlediği yöntemle ticari kit (Randox-Ransel 505, İrlanda) kullanılarak yapıldı. Deneyin prensibi GSH-Px'in cumene hidroperoksit ile glutasyonun oksidasyonu esasına dayanır. Bu metotta H_2O_2 varlığında GSH-Px'in oluşturduğu okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile redükte glutatona (GSH) indirgenir. NADPH'ın NADP^{+} ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de tespit edilmesiyle GSH-Px aktivitesi U/g protein şeklinde hesaplandı.

3.4.5. Glutasyon (GSH) Analizi

İndirgenmiş glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968)'in geliştirdiği spektrofotometrik yöntemle göre gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, reaksiyon ortamına ilave edilen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in in sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol sülfidriye karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Elde edilen süpernatantlardan 250 µl alınıp aynı miktarda % 10'luk triklor asetik asit (TCA) ile karıştırılarak 8600 rpm'de 15 dk

santrifüj edildi. Deproteinize edilen örneklerden temiz bir tüpe 250 µl alınıp üzerine 2 ml 0.3 M'lık Na₂HPO₄ ilave edildi. Bu karışımın içine 250 µl DTNB eklenerek vortekslendi ve 5 d oda ısısında bekletildi. Ardından 410 nm'de spektrofotometrede distile suya karşı değerler okundu.

3.4.6. Katalaz Aktivitesi Analizi

Doku homojenatlarında katalaz aktivite tayini Luck (1965)'a göre yapıldı. Bu analizin prensibi H₂O₂'in ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesine dayanır. Uygun bir tampon içinde bulunan H₂O₂'nin numunede bulunan katalaz etkisiyle yıkılması sonucu 240 nm'de absorbansta azalma görülür. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Standart solüsyonun 240 nm'deki absorbansı 0.5 olmalıdır. Absorbans bu değerden düşükse küçük miktarlarda H₂O₂ ilave edilerek absorbansın 0.5 olması sağlanır. Fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH=7) için 3.522 g. KH₂PO₄ ve 14.61 g. Na₂HPO₄ distile suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlanarak pH 7'ye ayarlandı. Fosfat tamponunda H₂O₂ çözeltisi (10 mM), % 30'luk H₂O₂ çözeltisinden 0.16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltildi.

Her örneğin analizinden önce numunede bulunabilecek maddelerin sebep olabileceği absorbans yükselmesi saptamak amacıyla kör deney hazırlandı. Kör deney için quartz küvete 2.95 ml fosfat tamponu üzerine 50 µl numune kondu. Spektrofotometre kör deney olarak kabul edilen bu küvete göre sıfırlandı. Test işaretli quartz küvete ise 2.95 ml fosfat tampon içinde hazırlanmış H₂O₂ çözeltisi kondu ve 50 µl numune eklendi. Küvetler alt-üst edilerek iyice karışması sağlandı ve spektrofotometreye yerleştirildi. 240 nm'de 30 saniye içinde absorbansta kaydedilen azalma takip edilerek "k" hız sabiti hesaplandı. Okunan değerlerden yapılan hesaplama sonucu elde edilen veriler k/g protein türünden verildi.

3.4.7. Ksantin oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini

Ksantin oksidaz deneyi karaciğer ve beyin homojenatlarında Prajda ve Webwr (1975)'in geliştirdiği yöntemle göre çalışıldı. Bu yöntemin esası; numunede bulunduğu kabul edilen ksantin oksidazın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması prensibine dayanır. Oluşan ürik asit miktarı % 100'lük TCA solüsyonu eklenmesi ile sabitlenir.

Özetle, deneyde kullanılan kör ve numune tüpleri üzerine 50 µl ksantin ve 2.8 ml fosfat tamponu (PBS pH 7.4) konulup sadece numune tüplerine 150 µl örnek eklenerek su banyosunda 37°C de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra kör tüplerine de 150'şer µl örnek eklendi ve reaksiyon 100 µl TCA solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Tüpler 4000 g'de, oda ısısında 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantların absorbansları 293 nm'de ölçüldü. Elde edilen veriler U/g protein olarak verildi.

3.4.8. Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini

Myeloperoksidaz deneyi doku homojenatlarında Andrews ve Krinsky (1982) tarafından geliştirilen yöntemle göre çalışıldı. Myeloperoksidaz analizi için 1.6 mM tetrametilbenzidin (TMB), 80 mM sodyum fosfat buffer (pH 5.4) ve sodyum fosfat buffer içerisinde hazırlanmış 0.3 mM H₂O₂ çözeltisi kullanıldı. 5 ml'lik test tüpüne 2.1 ml H₂O₂, 0.6 ml PBS ve 100 µl TMB içeren reaksiyon karışımı konuldu. Bunun üzerine 200 µl homojenat eklendi ve 655 nm'de 1 dk arayla 4 ölçüm yapıldıktan sonra aradaki fark U/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.9. Karaciğer Fonksiyon Testleri

İmidaclopridin karaciğer fonksiyonları üzerine muhtemel etkisinin belirlenmesi amacıyla alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktiviteleri plazma örneklerinde ticari kitler (Thermo İfinity, USA) kullanılarak spektrofotometrik olarak tespit edildi.

3.5. RNA İzolasyonu

Moleküler analizlerde kullanılacak RNA eldesi şu şekilde yapıldı. Yaklaşık 100 mg doku steril ependorflar içerisine alınıp, üzerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Trizol Reagent) konuldu ve vorteksle karıştırıldı. Homojenat oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 12000 xg, 4° C'de 10 dakika santrifüj edildi. Açık renkli süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak oda ısısında 5 dakika bekletildi ve üzerine 0.2 ml kloroform ilave edilip, 15 saniye süreyle vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra örnekler 12000 xg, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan üstteki

renksiz faz (RNA içerir) yeni bir eppendorf tüpe alınıp, üzerine 0.5 ml izoprapanol ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5-10 dakika süreyle tutulduktan sonra 12000 xg 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Pelet üzerindeki süpernatant alınıp pelet RNA % 75'lik etil alkol ile yıkandı. Vorteks edilip, 7500 xg'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra RNA 10-15 dakika süreyle havada kurutuldu. 50-100 µl su (DEPC water-dietilpirokarbonatlı su) RNA peleti üzerine ilave edilip, birkaç kez pipetlenerek çözünmesi sağlandı. Total RNA miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ nm'de) belirlendi. RNA/DNA oranı 1.7-2.0 aralığındaki örneklerin saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.

3.5.1. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR)

Elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi (Fermentas ticari kiti kullanılarak) ise şu şekilde yapıldı; otoklav edilmiş 0.5 ml eppendorf tüplere 1-3 µg total RNA, 1 µl oligo(dT)₁₈ primer konulup 12 µl'ye DEPC uygulanmış su ile tamamlandı. Karışım 3-5 saniye 13000 g'de santrifüj edilip termal saykırda (Toshiba) 70° C'de 5 dakika reaksiyona tabi tutuldu. Süre sonunda karışım buz içinde soğutulup, santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 5x reaksiyon tamponu, ribolock ribonükleaz inhibitör (20 U/µl), 10 µl dNTP karışımı konulup karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi ve termal saykırda 37° C'de 5 dakika tutuldu. Tüplere 1 µl revertAid m-multi-v reverz transkriptaz ilave edildi. Termal saykırda 42° C'de 60 dakika süre ile RNA cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi ve kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlar altında oligonükleotid primer ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termosaykır yardımıyla çoğaltılma metodudur. PCR reaksiyonunda birinci döngü denatürasyon, ikincisi primer yapışması (annealing) ve üçüncü döngü zincir uzaması (extention) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Döngü sayısı 30-40 arasında değişir. PCR reaksiyonu için örneklerden hazırlanan cDNA'lardan 2 µl alındı, üzerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green PCR mastermiks ve her bir reaksiyona spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi. Reaksiyonda 100 ng düzeyinde TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1β ve iNOS, eNOS ve nNOS spesifik

primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yaptırılarak kullanıldı (Tablo 1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemi ile anlık PCR sistemi (Real-Time PCR, Stratagene, USA) kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri 2^{-DDCt} metodu ile hesaplandı (Pfaffl 2001). Bu hesaplamada;

$$DDCt = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü uygulanacak; hesaplanan değer her bir gen için 2^{-DDCt} formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanılacak ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. PCR çalışmalarında her gruptan 4 örnek rastgele seçilecek ve bunların 3 tekrarı yapılarak ortalamaları alındı.

Real Time PCR sisteminde syber green boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli (katı) cinsinden tablolarda verildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL METOT

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi. $p < 0.05$ ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata (S.E) şeklinde verildi.

Çizelge 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları.

Transkript		Primer sekansları	Ürün (bp)	PCR program
TNF- α	F	TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C	295	93°C-1 d/55°C-1 d/72°C-1 d (40 siklus)
	R	CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC		
IFN- γ	F	ATC TGG AGG AAC TGG CAA AAG GAC G	288	94°C-15s/60°C-75s/72°C-30s (35 siklus)
	R	CCT TAG GCT AGA TTC TGG TGA CAG C		
IL-10	F	GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT TGC	201	93°C-1 d/55°C-1 d/72°C-1d (40 siklus)
	R	CAC TGC CTT GCT CTT ATT TTC ACA		
iNOS	F	GGC AGA CTG GAT TTG GCT GGT C	945	Başlangıç: 94°C -2 d; 94°C-45 s/59°C-1 d/72°C-1 d; final: 72°C-1d (35 siklus)
	R	AGG TGT TCC CCA GGT AGG TAG C		
nNOS	F	ACC CCG TCC TTT GAA TAC CAG	444	Başlangıç: 94° 3 min; 94°-45 s/56°-1 min/72°-45s; final: 72°-7 min (35 siklus)
	R	GAC GCT GTT GAA TCG GAC CTT		
eNOS	F	AAGACAAGGCAGCGGTGGAA	292	94°-30s/ 60°-30s/ 72°-90s (35 siklus)
	R	GCAGGGGACAGGAAATAGTT		
β -Actin	F	CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C	466	95°C – 60 s/ 55°C – 70 s/72°C – 100 s 35 (35 siklus)
	R	CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G		
IL-12	F	AGA TGA CAT CAC CTG GAC CT	386	94°C-30s/ 60°C-30s/ 72°C-1d (35 siklus)
	R	CTT TGG TTC AGT GTG ACC TTC		
IL-1 β	F	ATA GCA GCT TTC GAC AGT GAG	748	94°C – 4d; 94°C – 30 s/50°C – 45 s/72°C – 90 s (30 siklus)
	R	GTC AAC TAT GTC CCG ACC ATT		
IL-6	F	TTG CCG AGT AGA CCT CAT AGT GAC C	614	94°C – 1d; 94°C – 30 s/55°C – 30 s/72°C – 1d; final: 72°C – 7d (35 siklus)
	R	CAA GAG ACT TCC AGC CAG TTG C		

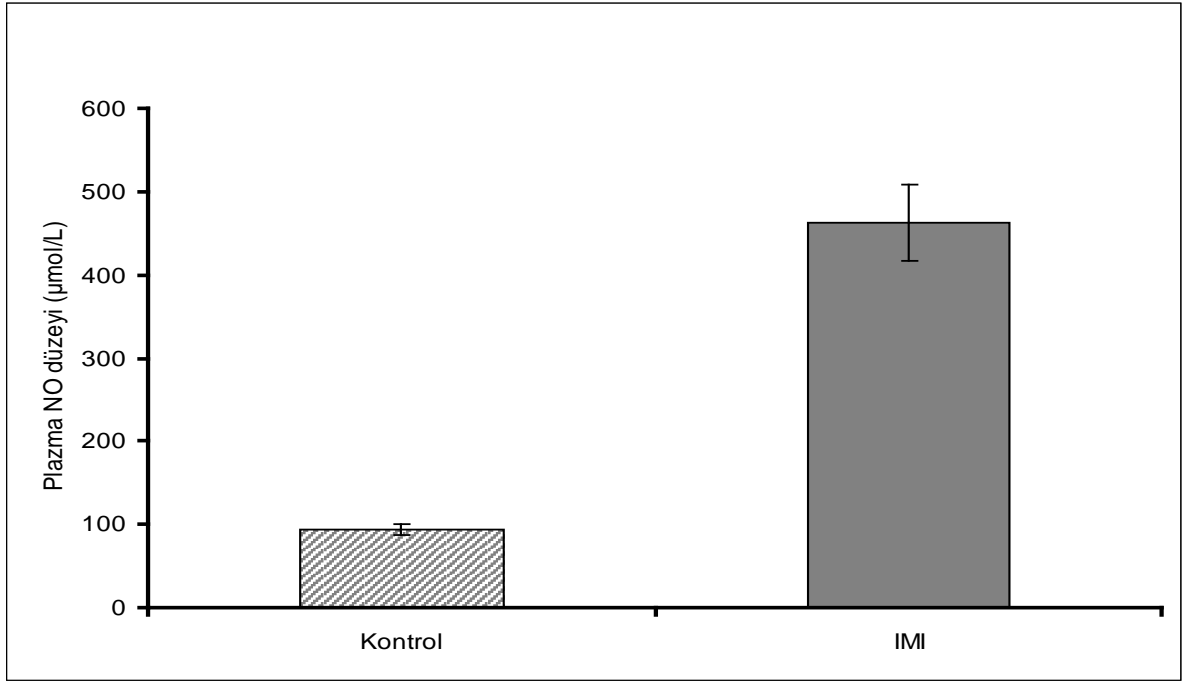
F: forward, ileri; R: reverse, geri

4. BULGULAR

4.1. Akut Dönem Sonuçları

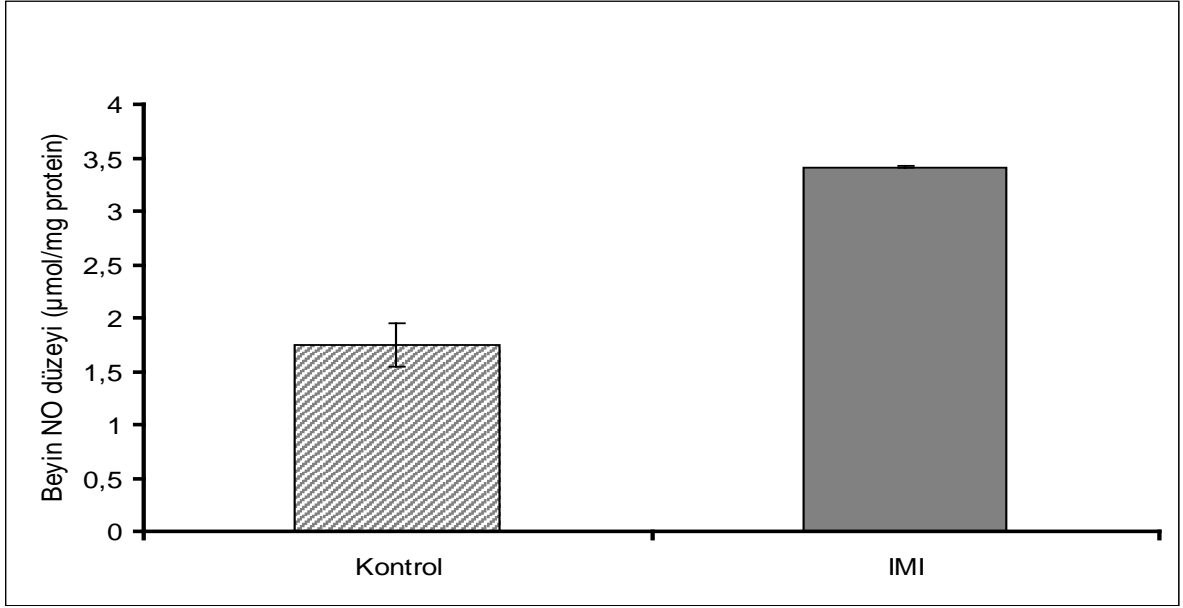
4.1.1. Kısa Süreli İmidacloprid Uygulamasının NO Üretimine Etkisi.

Ratlara intravenöz yolla imidacloprid enjeksiyonundan iki saat sonra hayvanlardan alınan plazma, beyin ve karaciğer dokularında Griess yöntemi ile NO düzeyleri saptandı. İmidacloprid grubunda NO düzeyinin sırasıyla plazma ve beyinde $p < 0.001$ önem düzeyinde ve karaciğerde ise $p < 0.01$ önem düzeyinde arttığı gözlemlendi.



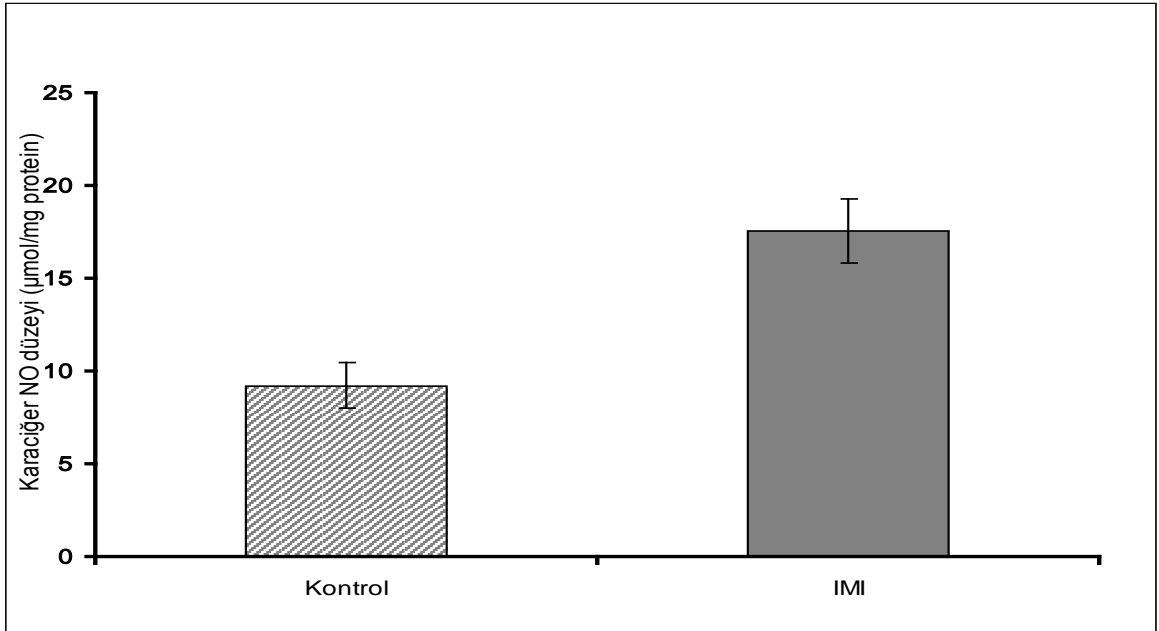
Şekil 4.1. İmidacloprid uygulamasının plazma NO üretimine etkisi.

İntravenöz olarak imidacloprid uygulanıp 2 saat bekletilen ratların plazma örneklerinde (429.72 ± 25.55) kontrol grubuna göre (101.82 ± 2.52) yaklaşık 4 kat artış tespit edildi ($p < 0.001$).



Şekil 4.2 Akut imidacloprid maruziyetinin beyinde NO üretimine etkisi.

İmidacloprid maruziyeti sonucu beyinde NO düzeyi kontrol grubunda 1.75 ± 0.02 , IMI grubunda ise 3.41 ± 0.007 olarak bulundu ($p < 0.001$).

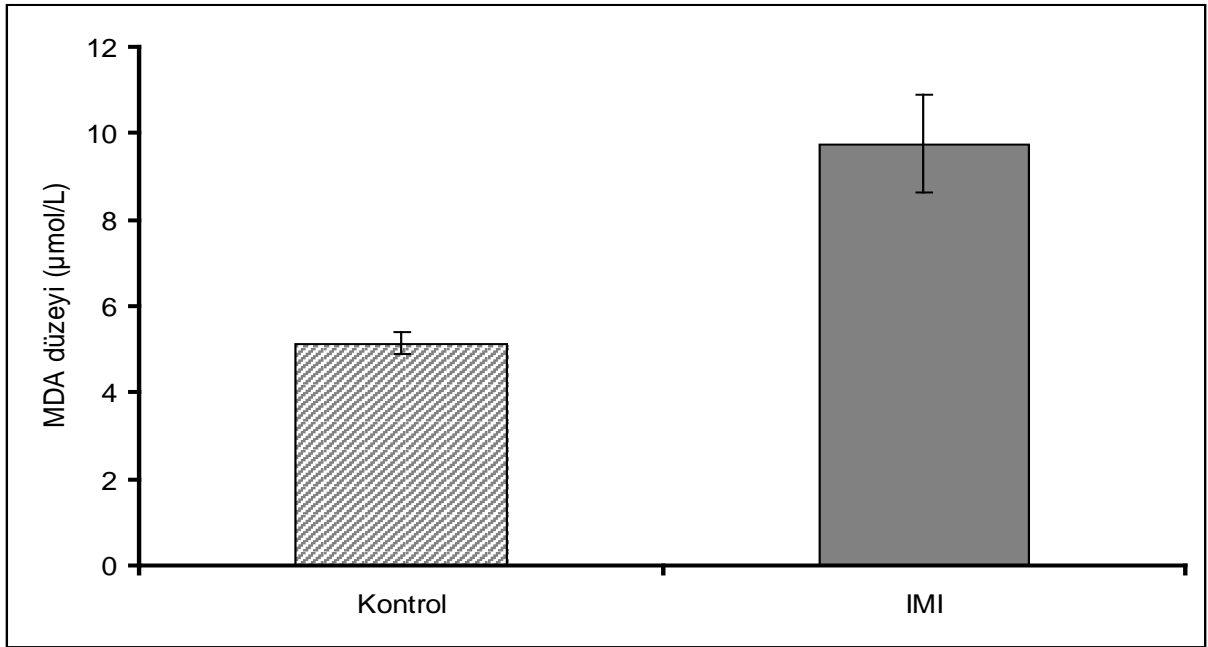


Şekil 4.3. Kısa dönem imidacloprid enjeksiyonunun karaciğerdeki NO üretimine etkisi.

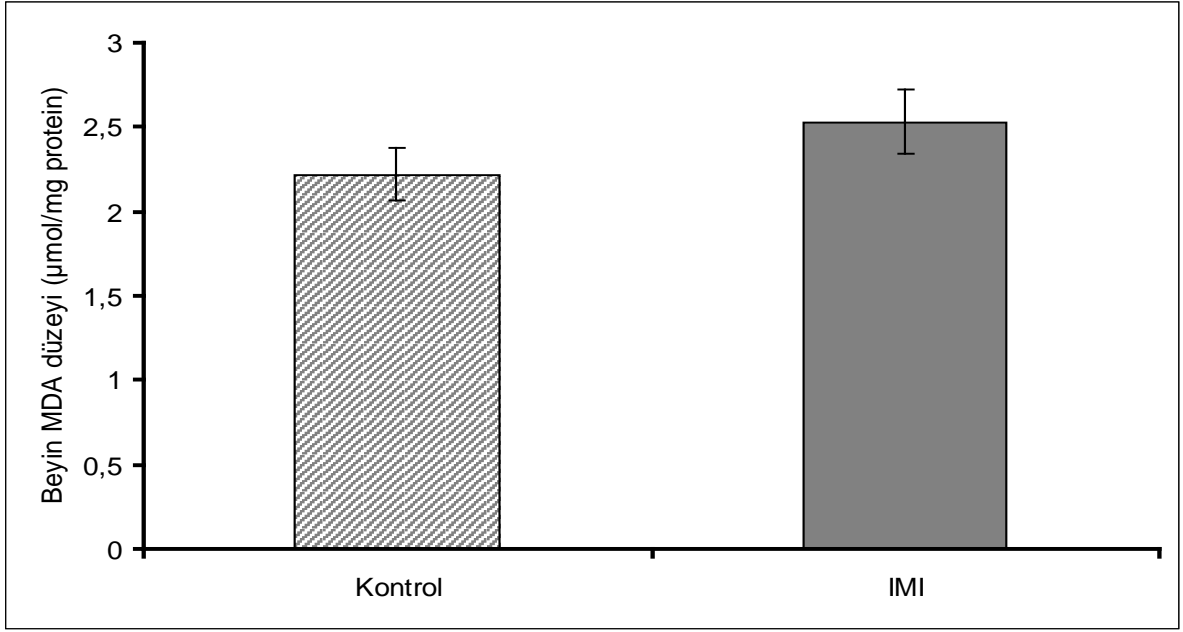
Karaciğerde NO düzeyi kontrol grubunda 9.21 ± 1.2 olarak ölçülürken, IMI grubunda bu değer yaklaşık iki kat artarak 17.55 ± 1.7 'e yükseldi ($p < 0.01$).

4.1.2. İmidaclopride Maruz Bırakılan Ratların Dokularında Lipid Peroksidasyon Düzeyi.

Malondialdehit (MDA), doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan ve lipid peroksidasyonun indeksi olarak en sık kullanılan parametredir. İmidaclopridin, 10 μ M dozunda intravenöz uygulanmasından iki saat sonra hayvanlardan alınan plazma ($p<0.001$) ve karaciğer ($p<0.05$) örneklerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı saptanırken beyinde ($p>0.05$) değişiklik gözlenmedi.

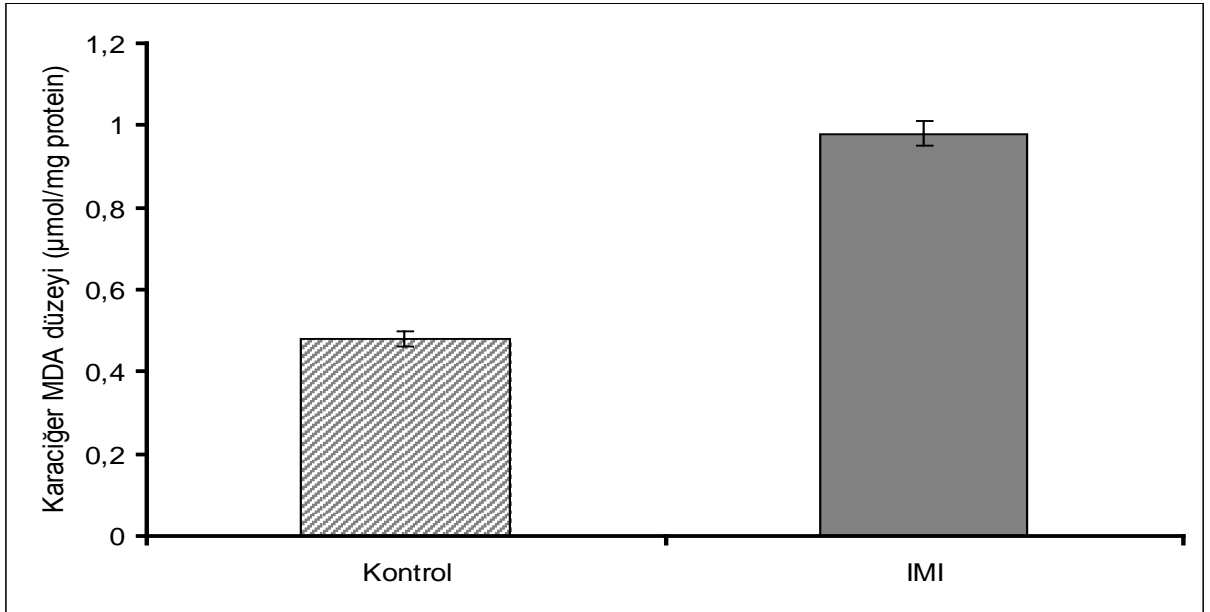


Şekil 4.4 İmidacloprid uygulamasının plazma malondialdehid düzeyine akut etkisi. İmidaclopride maruz kalan hayvanların plazma örneklerinde plazma MDA düzeyi kontrol grubuna (5.14 ± 0.27) göre IMI grubunda (9.76 ± 1.15) %50'lik bir artış görüldü ($p<0.001$).



Şekil 4.5 Kısa süreli imidacloprid maruziyetinin beyin malondialdehid düzeyine etkisi.

MDA düzeyi kontrol grubunda 2.22 ± 0.16 , IMI grubunda ise 2.53 ± 0.19 olarak tespit edildi $p > 0.05$.

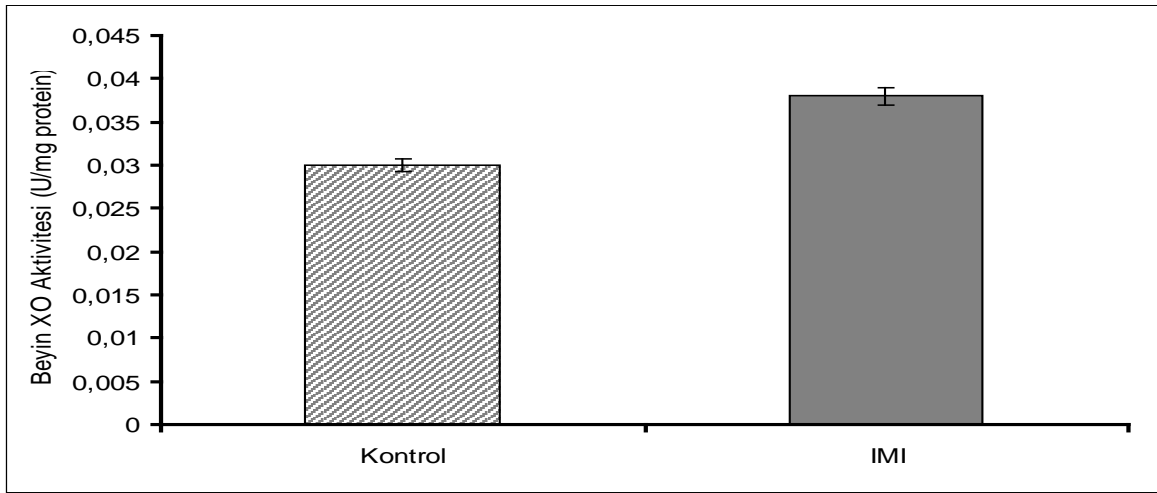


Şekil 4.6 İmidacloprid intravenöz uygulamasının karaciğer malondialdehid düzeyine etkisi.

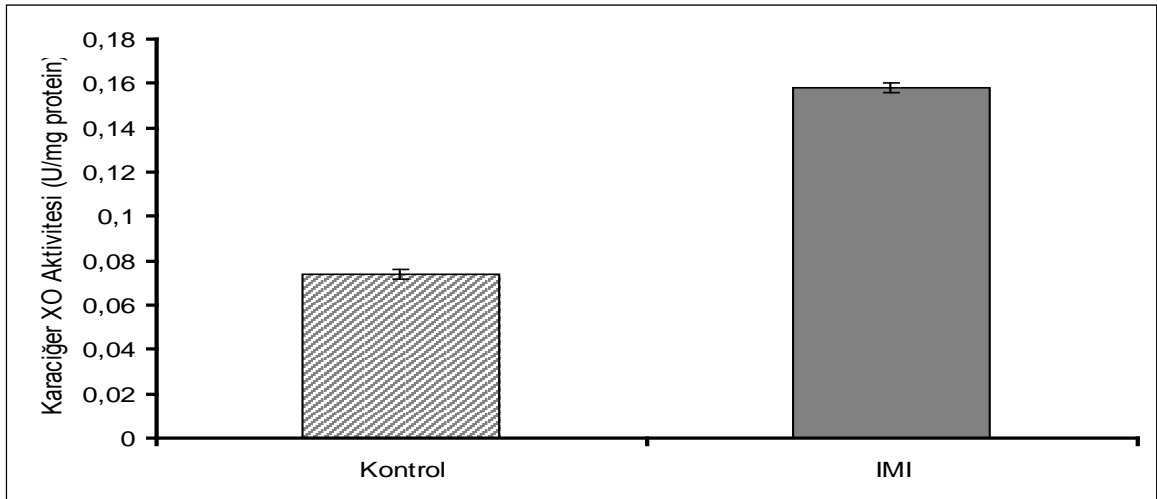
Karaciğerde lipid peroksidasyonu iki kat artış göstererek kontrol grubunda 0.48 ± 0.02 olan MDA düzeyi IMI grubunda 0.98 ± 0.03 bulundu ($p < 0.05$).

4.1.3. İmidaclopride Akut Maruziyetin Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesine Etkisi.

İki saat süreyle imidaclopride maruz bırakılan ratların dokularında süperoksit radikalinin oluşumunu katalize eden ve önemli bir oksidan enzim olan XO aktivitesi ölçülerek oluşan oksidatif hasar tespit edilmeye çalışıldı. Bunun sonucunda bu enzim aktivitesinin beyin ve karaciğerde ($p<0.001$) anlamlı biçimde arttığı belirlendi.



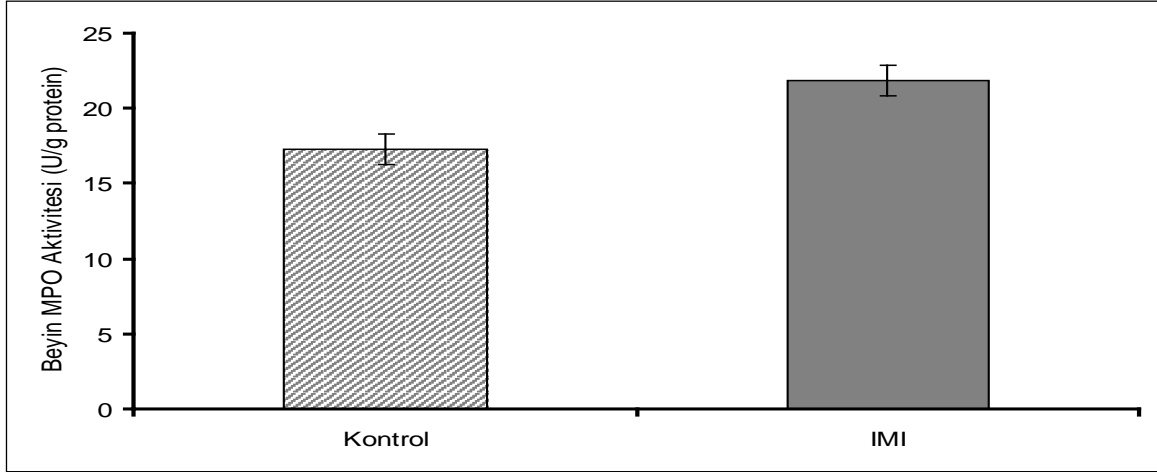
Şekil 4.7. İmidacloprid uygulamasının beyin ksantin oksidaz aktivitesine etkisi. 2.6mg/100g canlı ağırlık olacak şekilde uygulanan imidaclopridin XO aktivitesini %20 oranında arttırdığı görüldü ($p<0.001$).



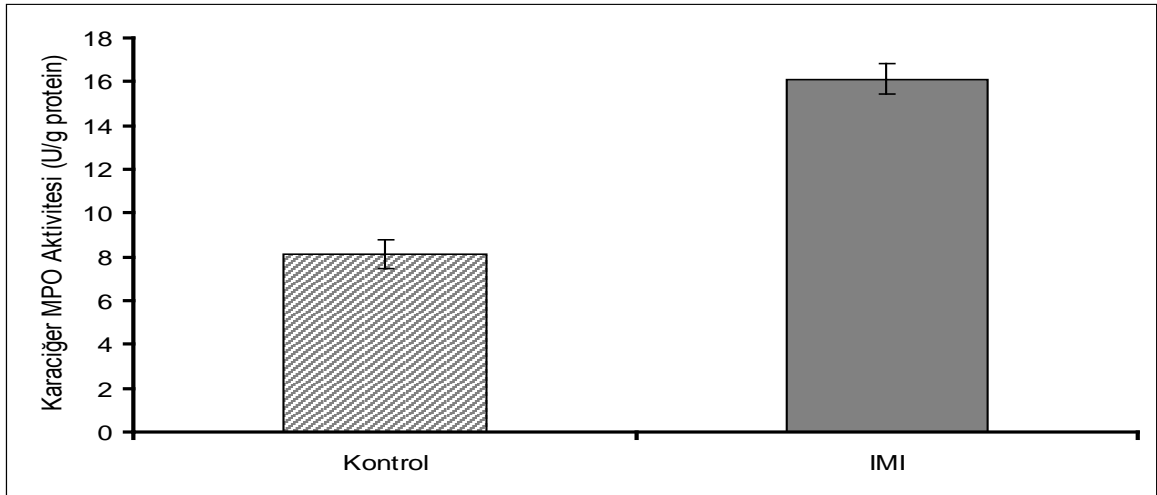
Şekil 4.8. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının karaciğer ksantin oksidaz aktivitesine etkisi. XO aktivitesinin karaciğerde artış gösterdiği tespit edilirken değerler kontrol grubunda 0.074 ± 0.002 , IMI grubunda 0.158 ± 0.003 olarak bulundu ($p<0.001$).

4.1.4. İmidacloprid Enjeksiyonunun Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesine Etkisi.

Özellikle yangı oluşumunda H_2O_2 'in Cl iyonu ile birleşip HOCl oluşturmasını kataliz eden diğer bir oksidan enzim olan MPO aktivitesinin beyinde ($p<0.009$) ve karaciğerde ($p<0.001$) önemli şekilde arttığı saptandı.



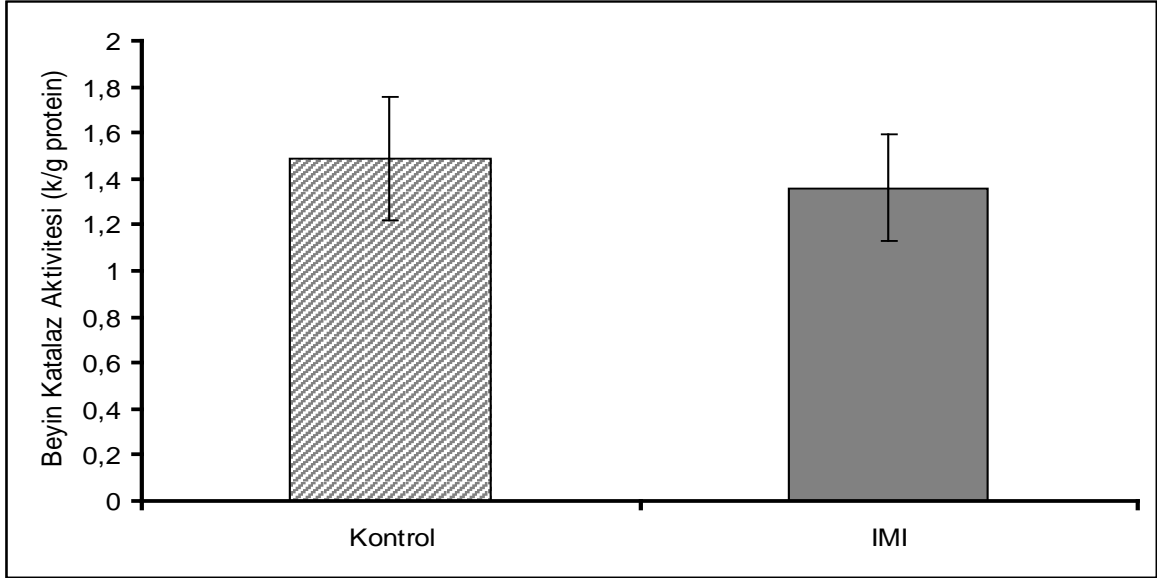
Şekil 4.9. İmidacloprid maruziyetinin beyin myeloperoksidaz aktivitesine akut etkisi. İmidacloprid maruziyetinin ardından beyinde MPO aktivitesi IMI grubunda (21.89 ± 1.02) kontrole göre (17.32 ± 1.01) artış gösterdi ($p<0.009$).



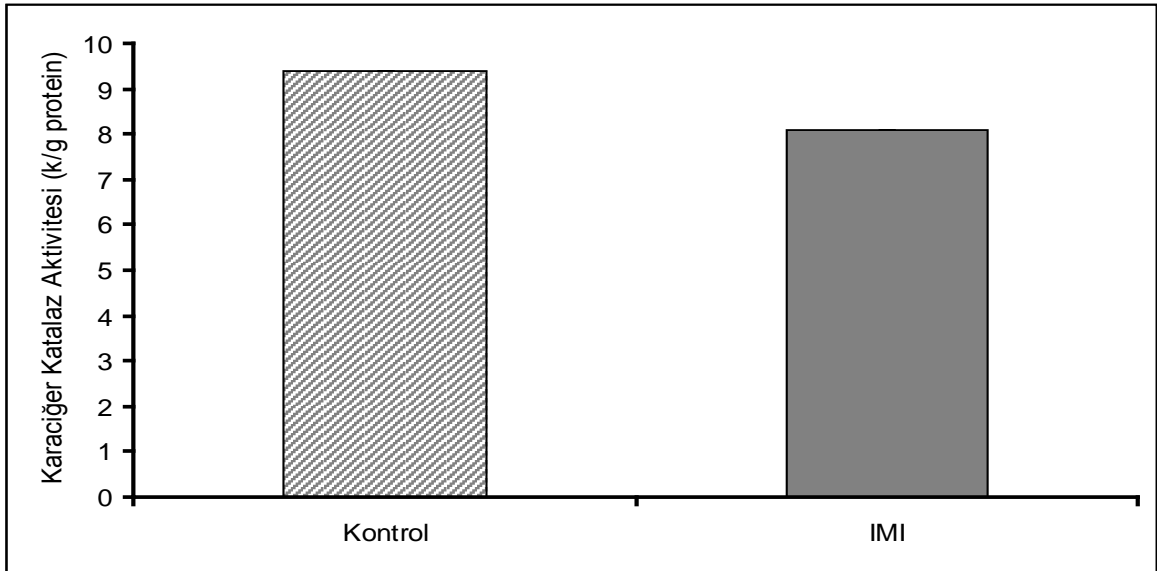
Şekil 4.10. Kısa süreli imidacloprid enjeksiyonunun karaciğer myeloperoksidaz aktivitesine etkisi. Karaciğer MPO aktivitesinin IMI grubunda (16.12 ± 0.72) kontrole göre (8.13 ± 0.68) iki kat arttığı görüldü ($p<0.001$).

4.1.5. İmidaclopride Kısa Süreyle Maruz Bırakılan Rat Dokularında Katalaz (CAT) Aktivitesi.

Hidrojen peroksitin etkisizleştirilmesinde görev alan antioksidan enzimlerden katalaz aktivitesi beyin ve karaciğerde değişikliğe uğramadığı tespit edildi ($p>0.05$).



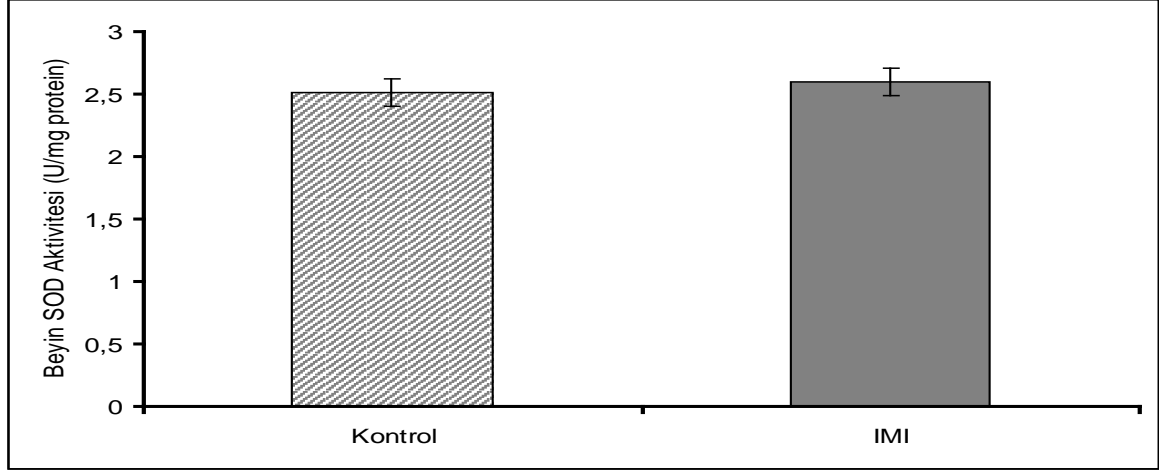
Şekil 4.11. İmidaclopridin kısa süreli uygulamasının beyin katalaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (1.49 ± 0.27), IMI grubu (1.36 ± 0.23). $p>0.05$



Şekil 4.12. İmidacloprid uygulamasının karaciğer katalaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (9.4 ± 0.001), IMI grubu (8.1 ± 0.001) $p>0.05$.

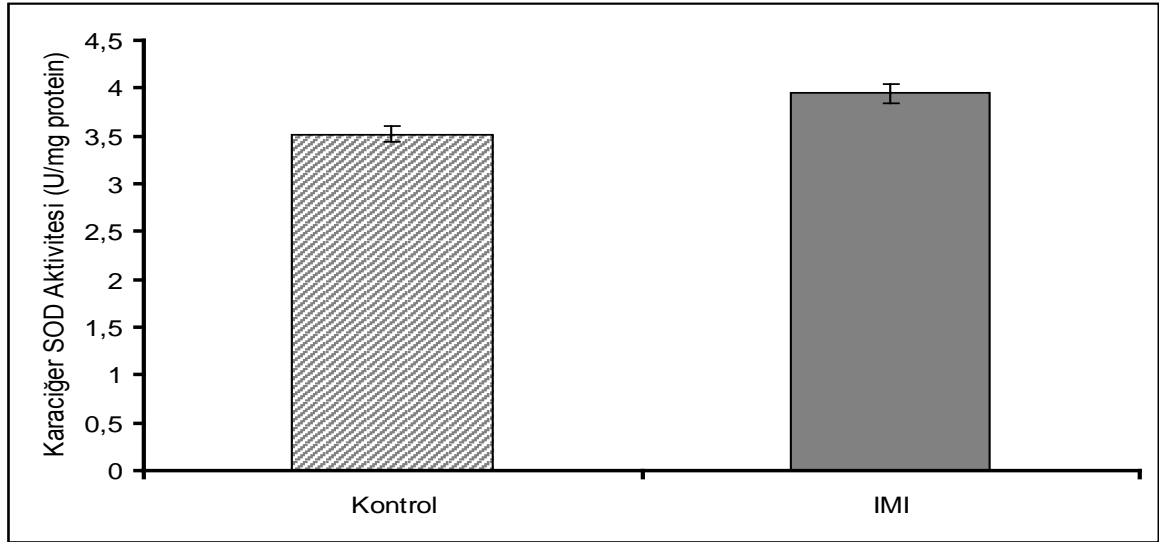
4.1.6. Kısa Süreli İmidacloprid Uygulamasının Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesine Etkisi.

Süperoksit anyonunun hidrojen peroksit'e dönüştürülmesi reaksiyonunu kataliz eden SOD enzim aktivitesi karaciğerde artış ($p<0.05$) gösterirken beyinde anlamlı bir değişiklik göstermedi ($p>0.05$).



Şekil 4.13. Kısa süreli imidacloprid maruziyetinin beyin süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.

Kontrol grubu (2.51 ± 0.11), IMI grubu (2.60 ± 0.11). $p>0.05$

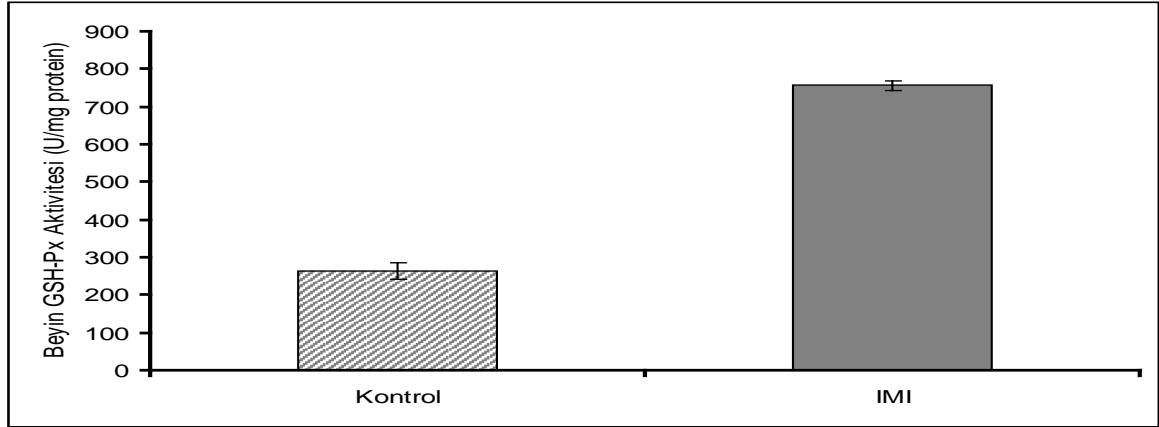


Şekil 4.14. İmidacloprid'in karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.

İmidaclopridin SOD aktivitesini artırdığı değerler kontrol grubunda 3.52 ± 0.08 , IMI grubunda 3.95 ± 0.1 olarak ölçüldü ($p<0.05$).

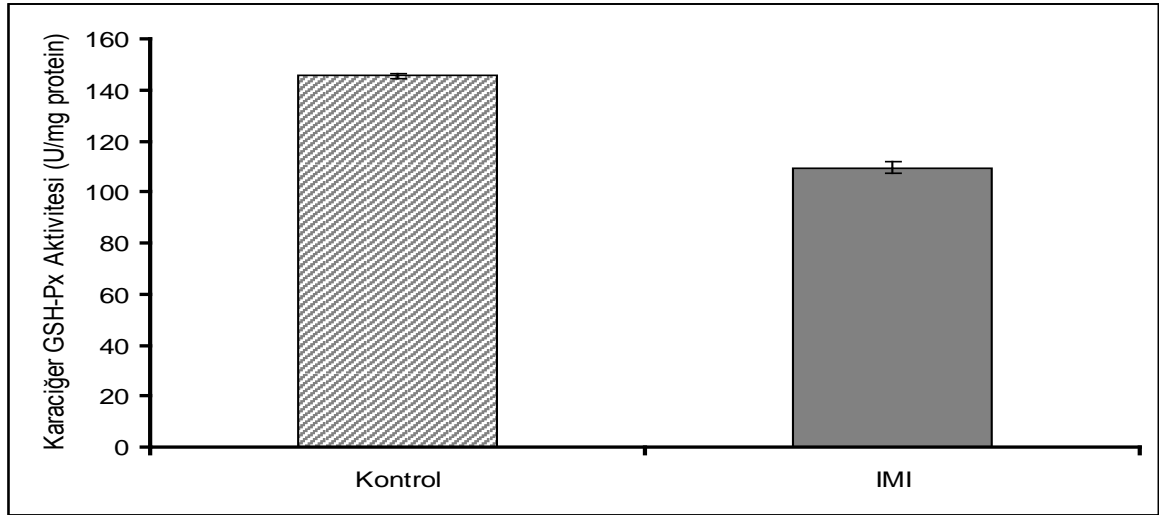
4.1.7. İmidacloprid Enjeksiyonunun Beyin ve Karaciğer Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesine Etkisi.

CAT gibi hidrojen peroksite su ve moleküler oksijene dönüştürülmesinde görev alan GSH-Px enzim aktivitesi beyinde istatistiksel anlamda artarken ($p < 0.001$), karaciğerde ise tam tersine bir düşüş saptandı ($p < 0.001$).



Şekil 4.15. İmidaclopridin kısa dönemde beyin glutasyon peroksidaz aktivitesine etkisi.

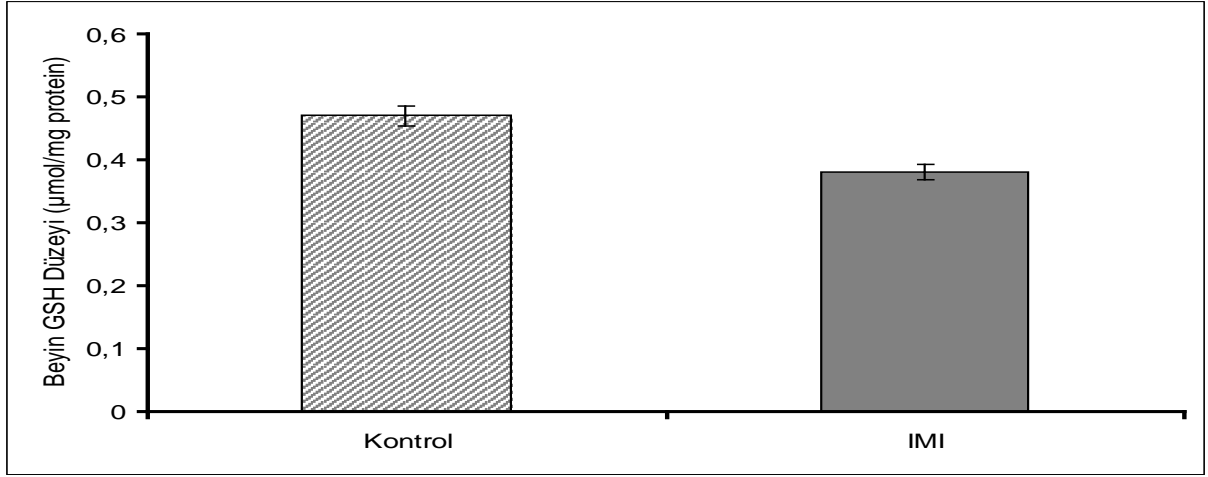
Bu enzimin aktivitesi beyinde yaklaşık 3 kat arttı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen verilerin ortalaması kontrol grubunda 264.39 ± 22.78 , IMI grubunda 755.94 ± 12.33 olarak bulundu ($p < 0.001$).



Şekil 4.16. İmidacloprid verilen ratlarda karaciğer glutasyon peroksidaz aktivitesi. Karaciğer GSH-Px aktivitesi beyindeki aksine yaklaşık %25 oranında azaldı ($p < 0.001$).

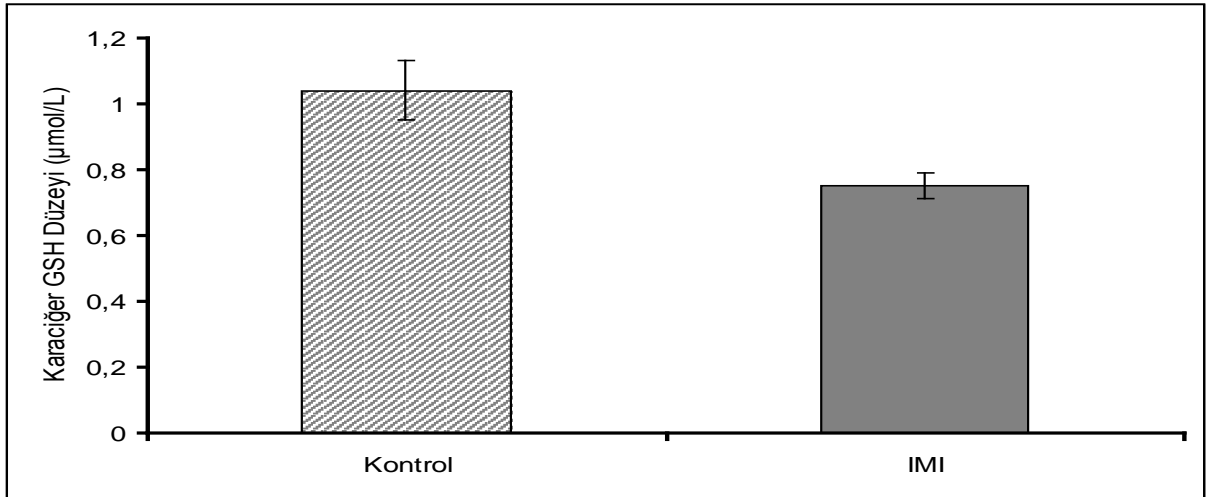
4.1.8. İmidaclopridin Kısa Süreli Uygulamasının Glutasyon (GSH) Konsantrasyonuna Etkisi.

Önemli hücre içi antioksidanlardan biri olan GSH (glisin, sistein, glutamik asit) konsantrasyonu beyinde ≤ 0.001 ve karaciğerde ($p < 0.05$) önemli düzeyde azaldı.



Şekil 4.17. İmidaclopridin akut uygulamasının beyin glutasyon düzeyine etkisi.

Beyin GSH düzeyi IMI grubunda (0.38 ± 0.012) kontrole (0.47 ± 0.016) istatistiksel anlamda azalma görüldü ($p \leq 0.001$).

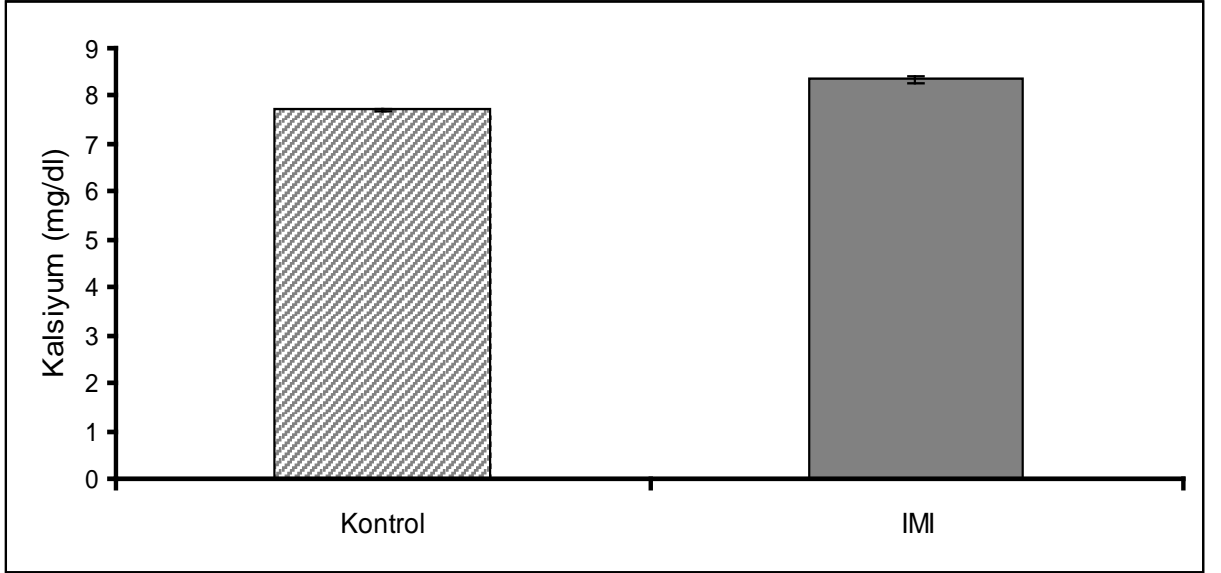


Şekil 4.18. İmidaclopridin kısa süreli uygulamasının karaciğer glutasyon düzeyine etkisi.

Karaciğerde GSH değeri beyine oranla daha çok azalarak kontrol grubunda 1.04 ± 0.09 iken IMI grubunda 0.75 ± 0.04 'e düştü ($p < 0.05$).

4.1.9. İmidacloprid Uygulamasının Plazma Kalsiyum Düzeyine Etkisi.

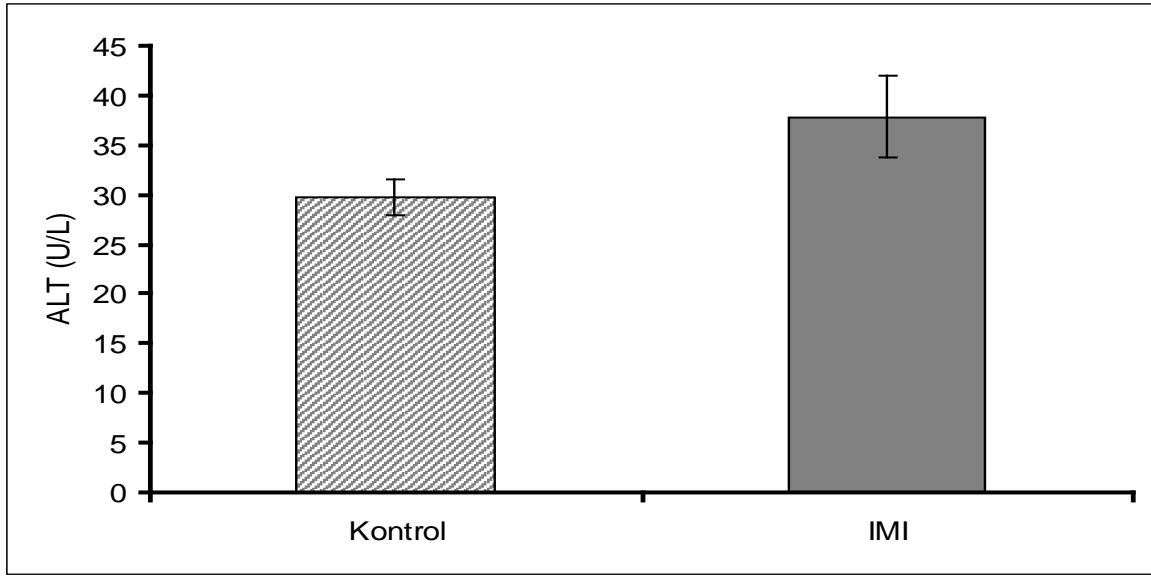
Kalsiyum düzeyi, imidacloprid uygulanan ratların plazmalarında kontrole göre daha yüksek bulundu ($p<0.001$).



Şekil 4.19. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının plazma kalsiyum düzeyine etkisi. Kontrol grubunda 7.72 ± 0.02 olan Ca^{2+} düzeyi, imidacloprid grubunda ortalama 8.34 ± 0.05 'e yükseldi ($p<0.001$).

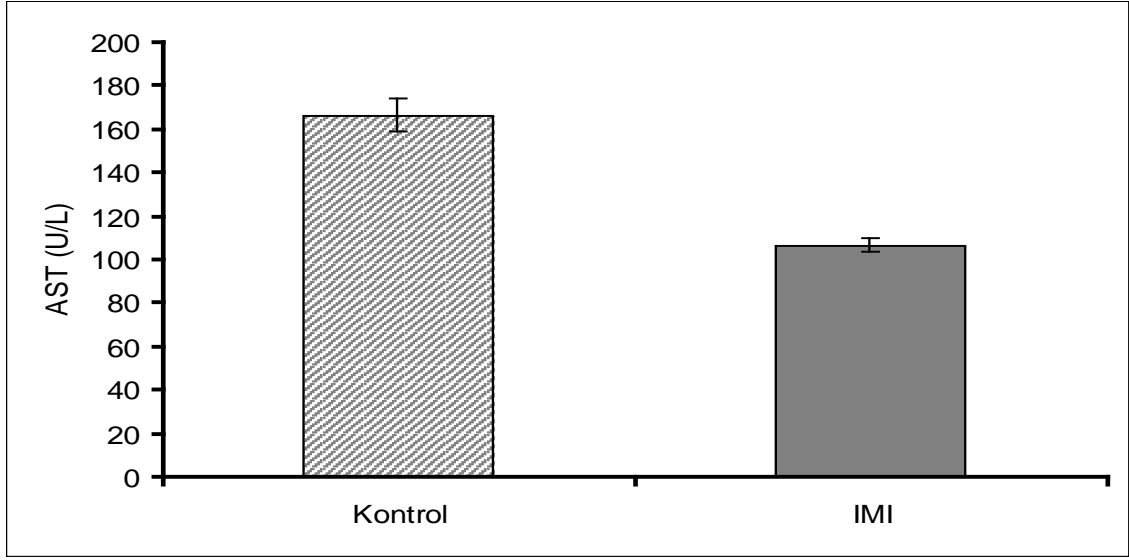
4.1.10. Kısa Süreli İmidaclopride maruziyetin Karaciğer Enzim Aktivitelerine Etkisi.

Karaciğer hücrelerinde oluşabilecek hasarın belirlenmesi için karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzimlerinin aktiviteleri ölçüldü. ALT aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken, AST ve LDH aktivitelerinin ($p < 0.001$) imidacloprid uygulanmasının ardından anlamlı biçimde azaldığı saptandı.



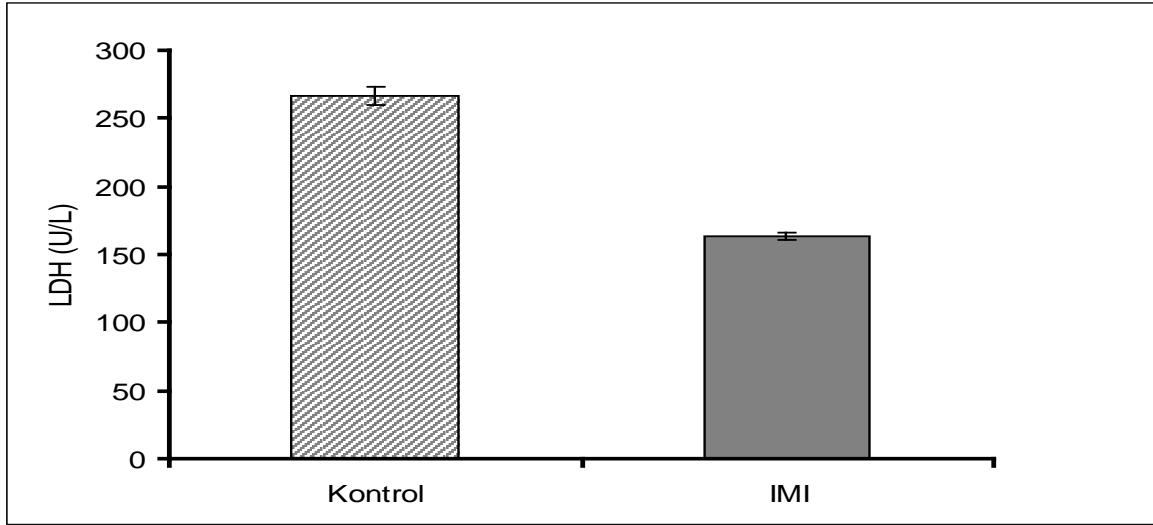
Şekil 4.20. Kısa süreli imidacloprid uygulamasının alanin aminotransferaz aktivitesine etkisi.

Alanin aminotransferaz aktivitesinin 2 saatlik imidacloprid uygulamasının ardından kontrol grubunda 29.79 ± 1.81 , IMI grubunda ise 37.8 ± 4.12 olduğu görüldü $p > 0.05$.



Şekil 4.21. İmidacloprid'in akut maruziyetinin aspartat aminotransferaz aktivitesine etkisi.

İmidacloprid uygulanan ratların plazmalarında ölçülen aspartat aminotransferaz aktivitesi kontrol grubu değerleri 166.44 ± 7.36 iken IMI grubunda azalarak 106.58 ± 3.45 oldu ($p < 0.001$).

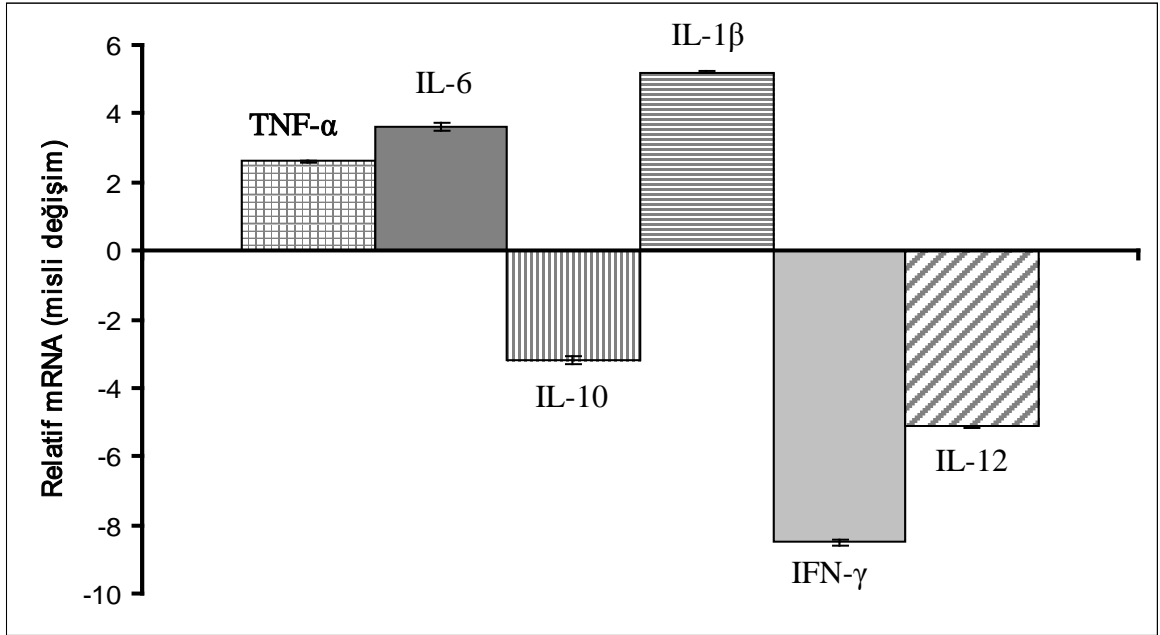


Şekil 4.22. İmidacloprid'in akut maruziyetinin laktat dehidrojenaz aktivitesine etkisi.

İmidacloprid maruziyeti ardından laktat dehidrojenaz aktivitesi IMI grubunda (163.03 ± 2.55) kontrol grubuna (266.49 ± 6.74) göre yaklaşık 1.5 kat azaldı $p < 0.001$.

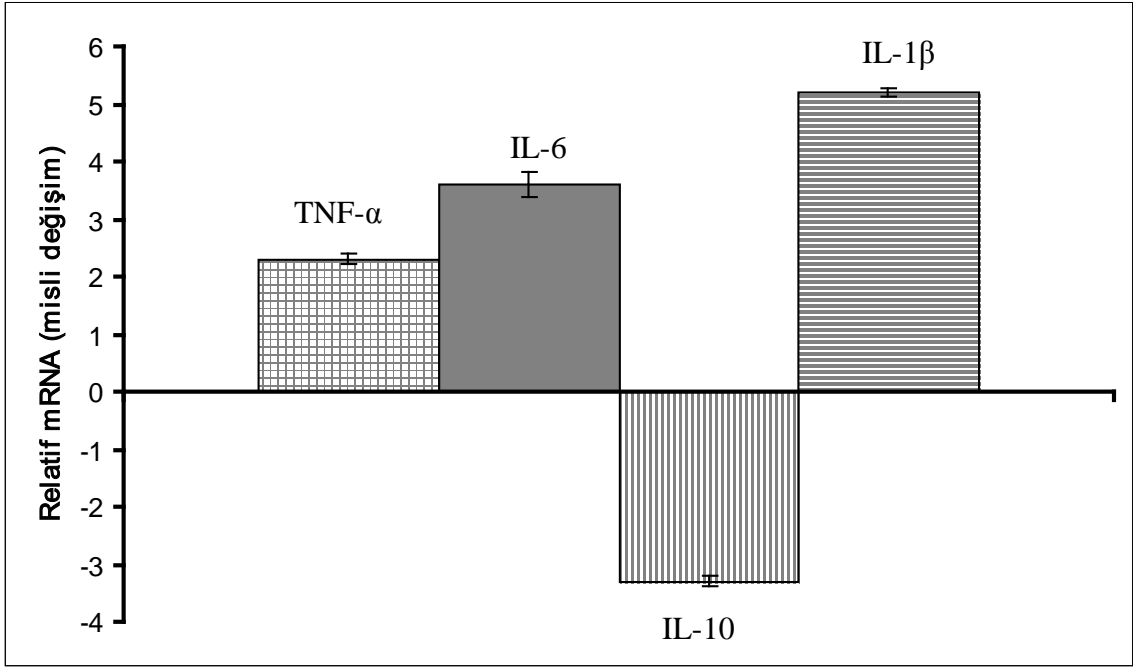
4.1.11. RT-PCR Yöntemi ile Yangısal Sitokinlerde Transkripsiyon Analizleri

Gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile yapılan kuantitatif mRNA analizlerinde imidacloprid uygulanan rat beyinlerinde TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA transkripsiyonlarının up-regüle olduğu saptandı. Diğer yandan IFN- γ ve IL-12 mRNA transkripsiyonlarının ise baskılandığı tespit edildi. Karaciğerde IFN- γ ve IL-12 mRNA transkripsiyonu belirlenemezken, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA transkripsiyonlarının beyinde olduğu gibi uyarıldığı tespit edildi. Anti-inflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-10 gen ekspresyonunun beyinde 3.2-misli ve karaciğerde 3.3-misli down-regüle olduğu belirlendi.



Şekil 4.23. Akut imidacloprid maruziyeti sonrası rat beyinlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.

TNF- α , IL-6 ve IL-1 β ekspresyonları kontrole göre sırasıyla, 2.6, 3.6, 5.2-misli artarken, IFN- γ ve IL-12 mRNA transkripsiyonları sırasıyla 8.51 ve 5.14 misli down-regüle oldu.

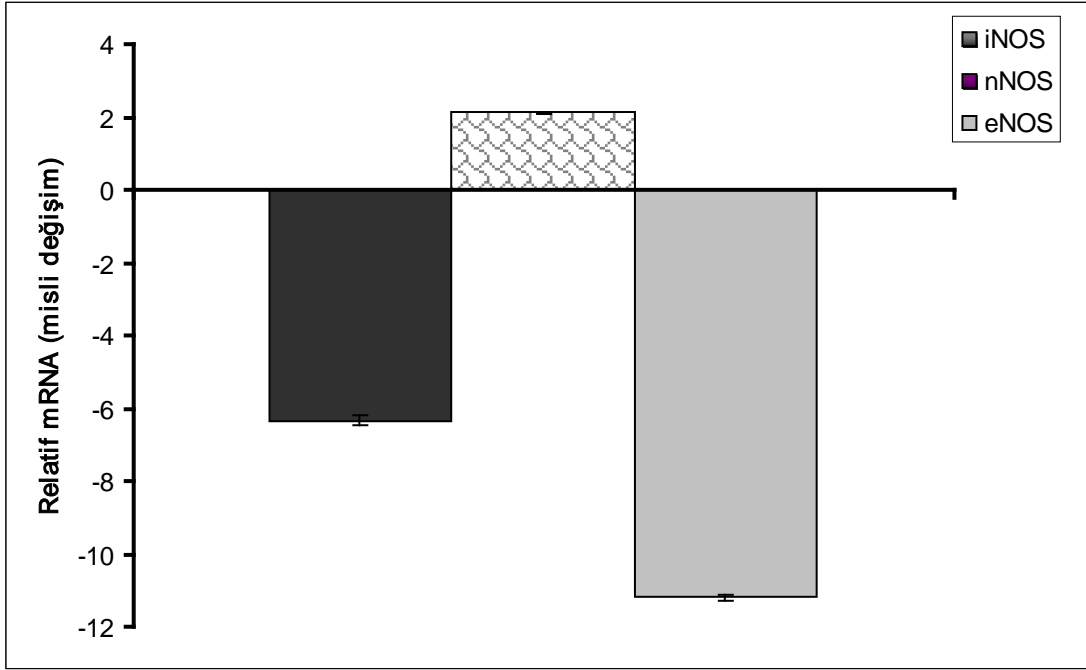


Şekil 4.24. İmidacloprid uygulanan rat karaciğerlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.

TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA transkripsiyonları kontrole göre sırasıyla, 2.3, 3.6, 5.2-misli up-regule olurken, IFN- γ ve IL-12 ekspresyonu saptanmadı.

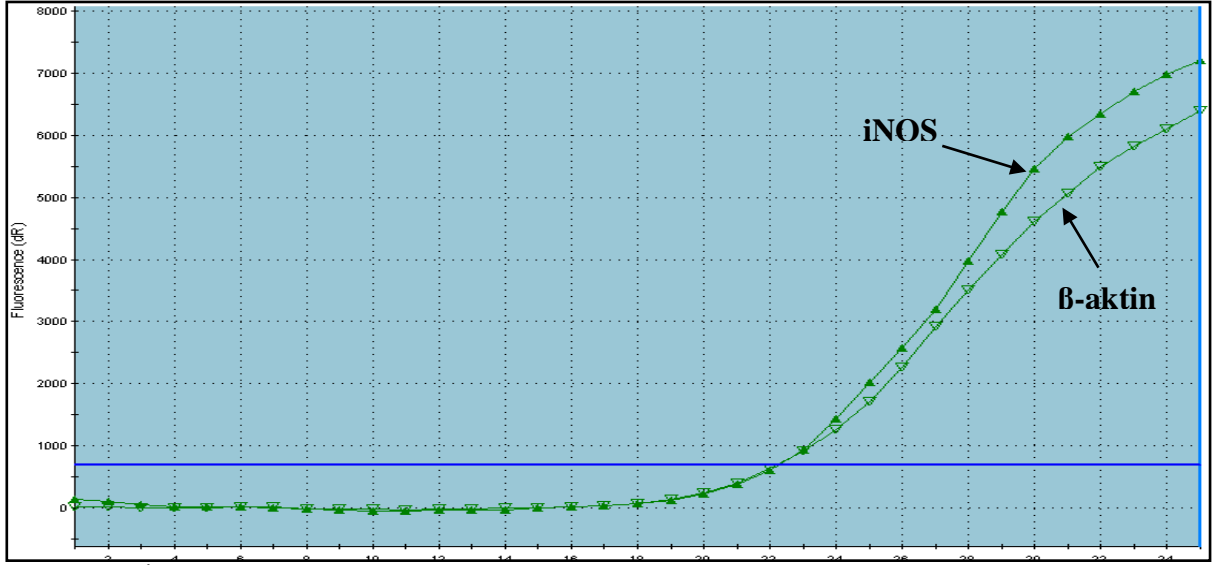
4.1.12. RT-PCR yöntemi ile beyinde NOS transkripsiyon analizi

İmidaclopride maruziyet sonrası, NOS enzimlerinden hangisinin, üretimi uyarılan NO'nin kaynağı olduğunu belirlemek amacıyla bu enzimlerin gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonu analizleri yapıldı. Bunun sonucunda beyin dokusunda iNOS ve eNOS mRNA transkripsiyonunun baskılandığı, nNOS mRNA transkripsiyonunun ise indüklendiği görüldü.

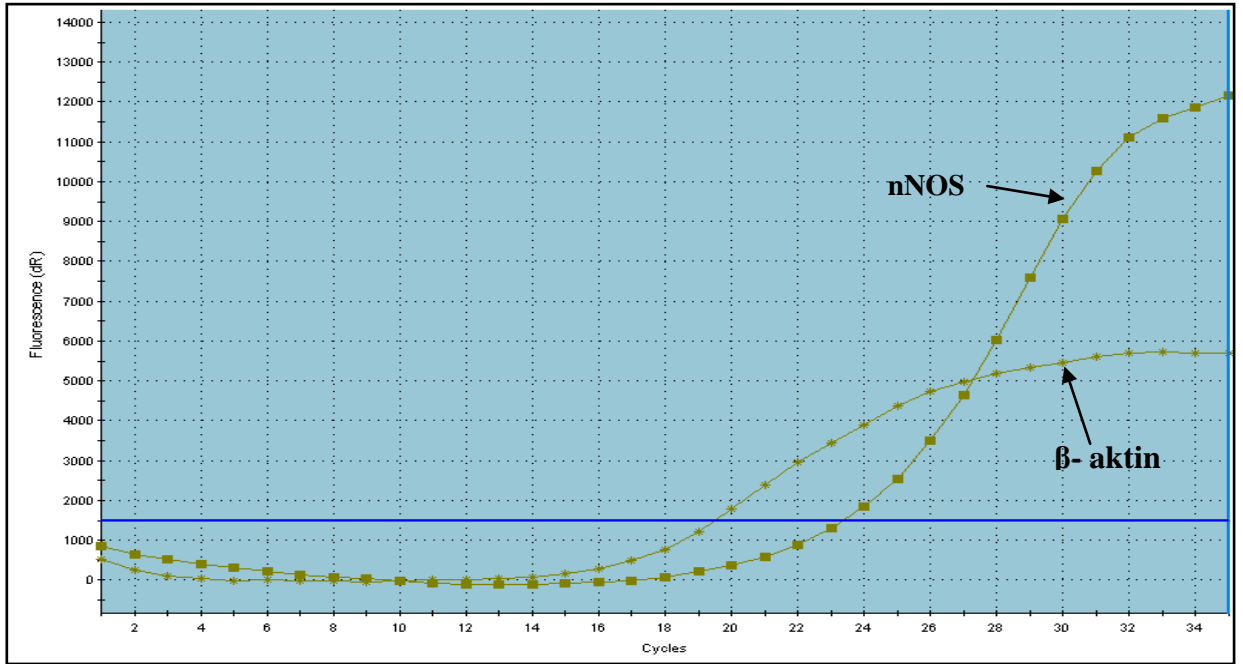


Şekil 4.25. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.

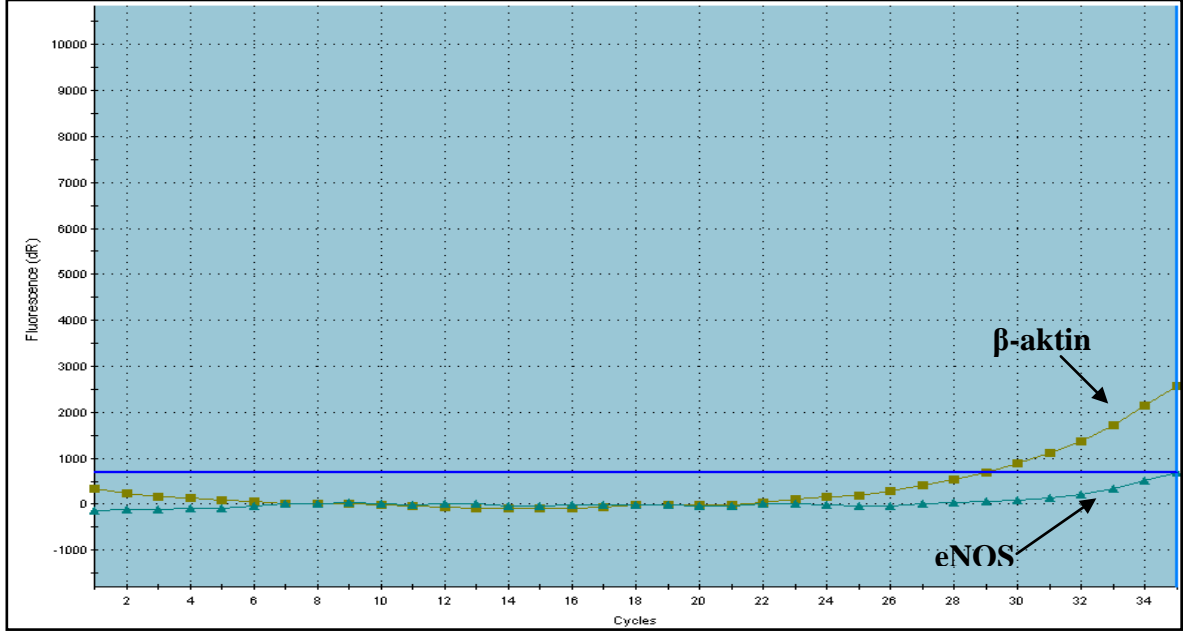
Yapılan RT-PCR analiz sonuçlarına göre beyinde iNOS 6.34-misli, eNOS 11.2-misli baskılanırken, nNOS mRNA transkripsiyonu 2.11-misli up-regüle oldu.



Şekil 4.26. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 23.65 ve β -aktin 23.47; kontrol grubu 24.53 ve β -aktin 21.67).



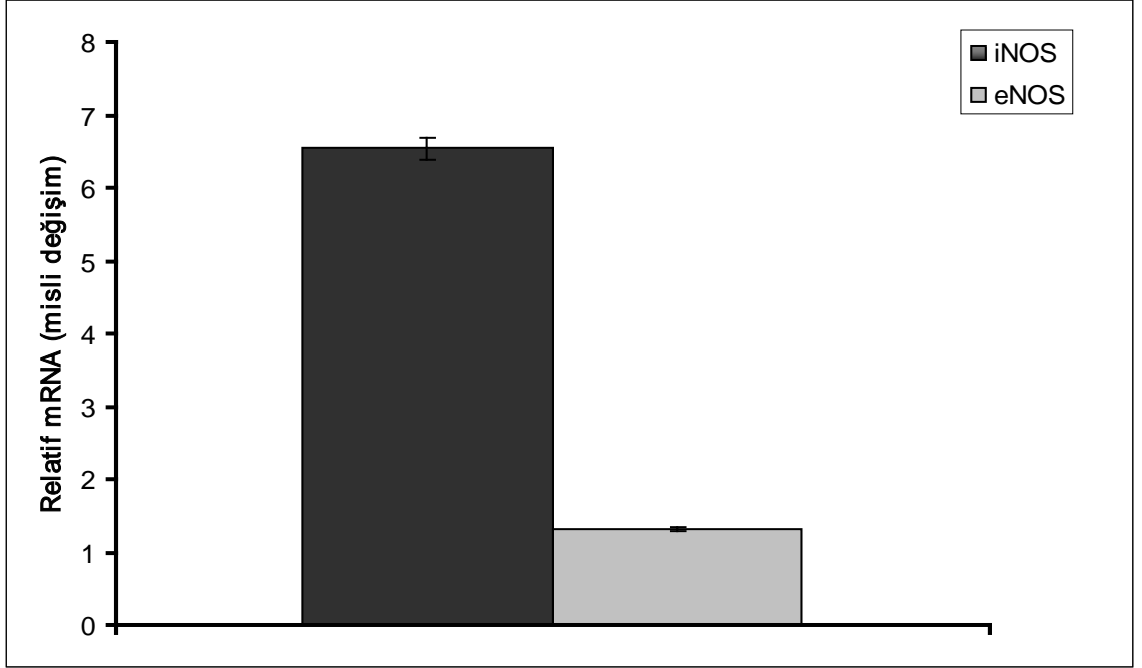
Şekil 4.27. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve nNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 23.97 ve β -aktin 19.45; kontrol grubu 23.55 ve β -aktin 20.12).



Şekil 4.28. İmidaclopride maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 34.19 ve β -aktin 25.22; kontrol grubu 34.05 ve β -aktin 21.59).

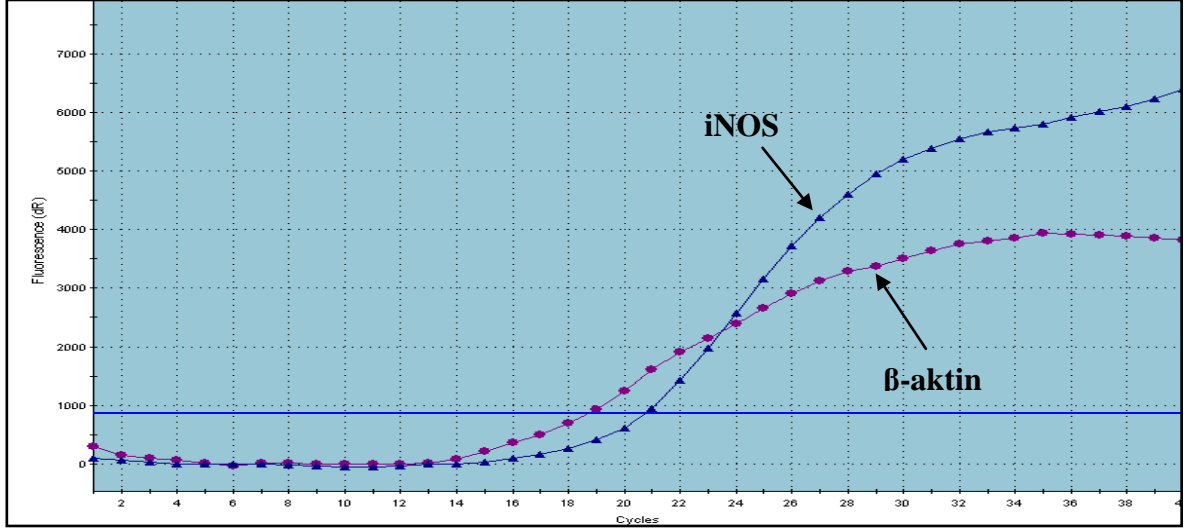
4.1.13. RT-PCR yöntemi ile karaciğerde NOS transkripsiyon analizi

İmidacloprid uygulanan ratların karaciğerlerinde RT-PCR ile yapılan gen ekspresyonu analizlerinde iNOS ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının up-regüle olduğu saptandı.

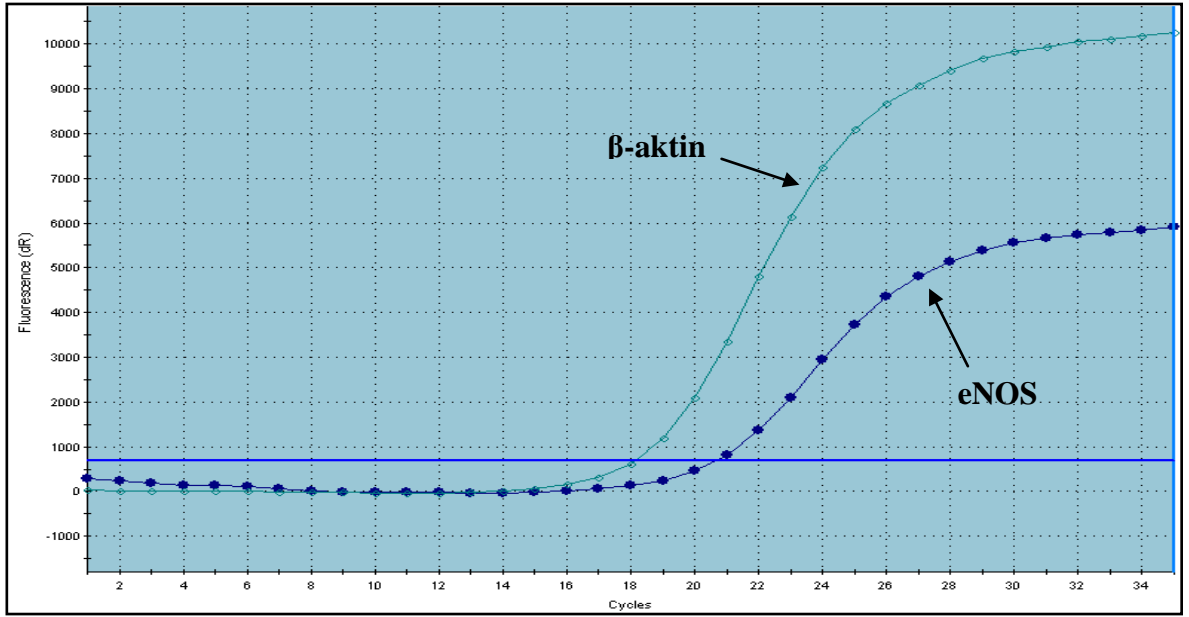


Şekil 4.29. İmidacloprid verilen rat karaciğerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.

Karaciğerde iNOS ve eNOS izoenzimlerinin her ikisinin ekspresyonu imidacloprid tarafından kontrole göre sırasıyla 6.54 ve 1.32-misli uyarıldı.



Şekil 4.30. İmidaclopride maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 21.86 ve β -aktin 18.64; kontrol grubu 22.13 ve β -aktin 21.61).

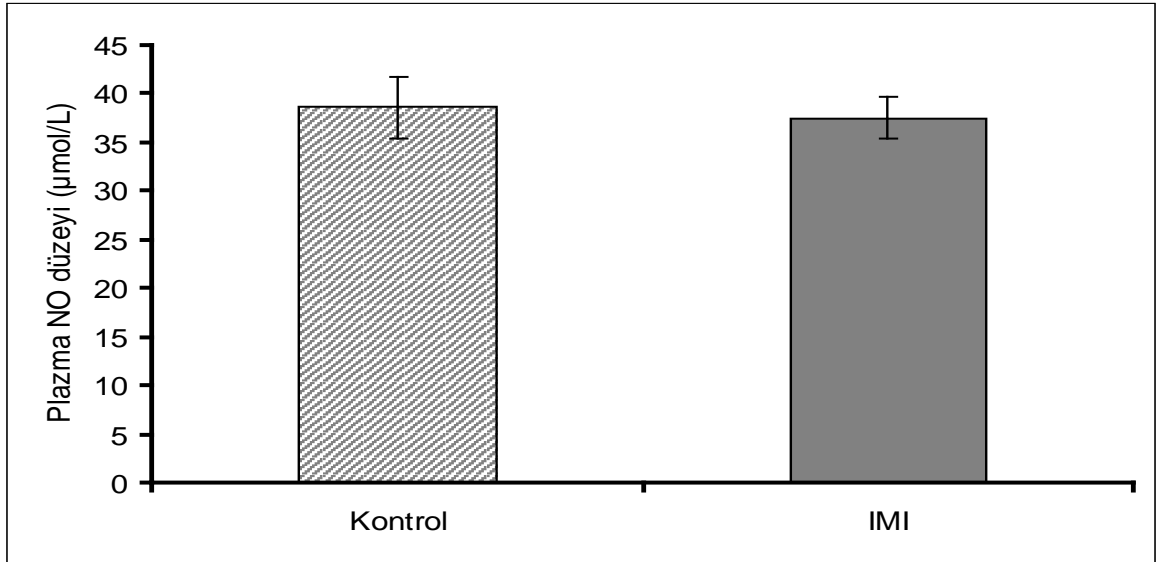


Şekil 4.31. İmidaclopride maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 21.67 ve β -aktin 18.95; kontrol grubu 22.38 ve β -aktin 20.06).

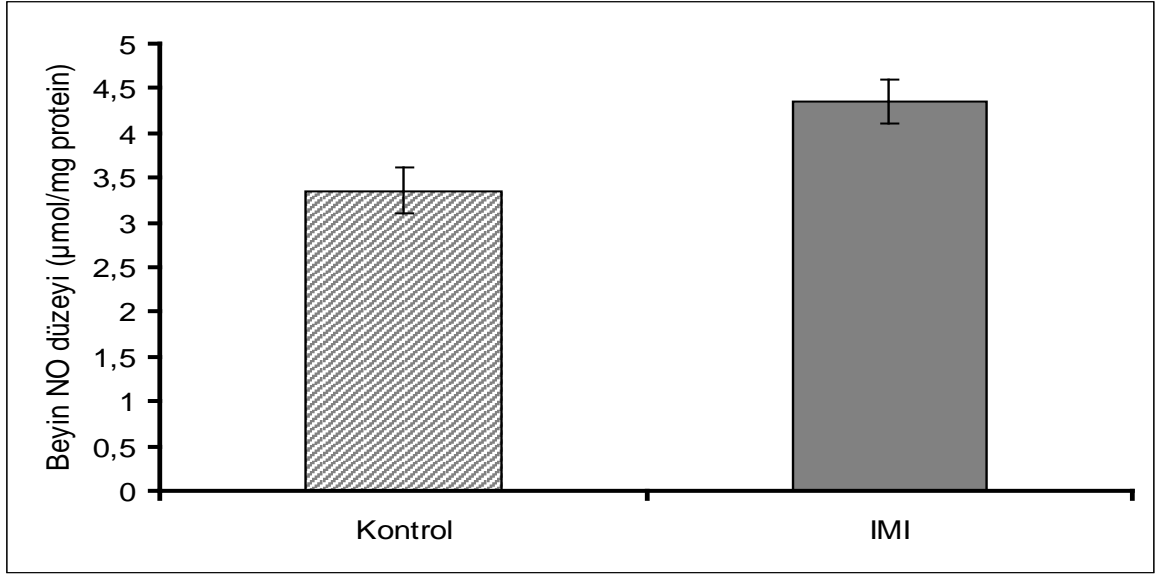
4.2. Subkronik Dönem Sonuçları

4.2.1 Uzun Süreli İmidaclopride Maruziyetin Nitrik Oksit (NO) Üretimine Etkisi.

Ratlara 30 gün süresince günde bir kez gavaj yoluyla imidacloprid (1mg/kg/gün) verildikten sonra ötenazi edilen hayvanlardan kan alınarak plazmaları çıkarıldı, beyin ve karaciğer homojenatları hazırlandı ve Griess yöntemi ile NO düzeyleri saptandı. Beyin ($p<0.05$) ve karaciğer ($p<0.001$) NO düzeyleri anlamlı biçimde artarken plazma örneklerinde istatistiksel bir anlam bulunmadı.

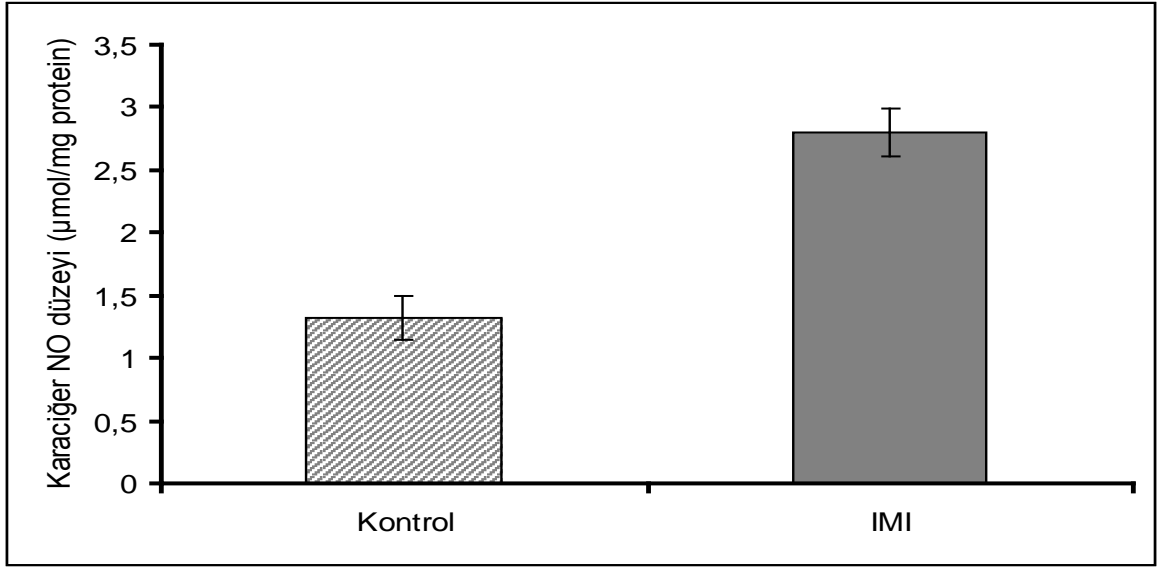


Şekil 4.32. Subkronik imidacloprid maruziyetinin plazma nitrik oksit üretimine etkisi. Kontrol grubu: 38.57 ± 3.2 , IMI grubu: 27.53 ± 2.24 , $p>0.05$.



Şekil 4.33. İmidaclopridin oral uygulamasının beyindeki NO üretimine etkisi.

30 gün imidacloprid verilen rat beyinlerinde kontrol grubunda 3.35 ± 0.26 olan NO düzeyi artarak İMI grubunda 4.35 ± 0.25 oldu $p < 0.05$.

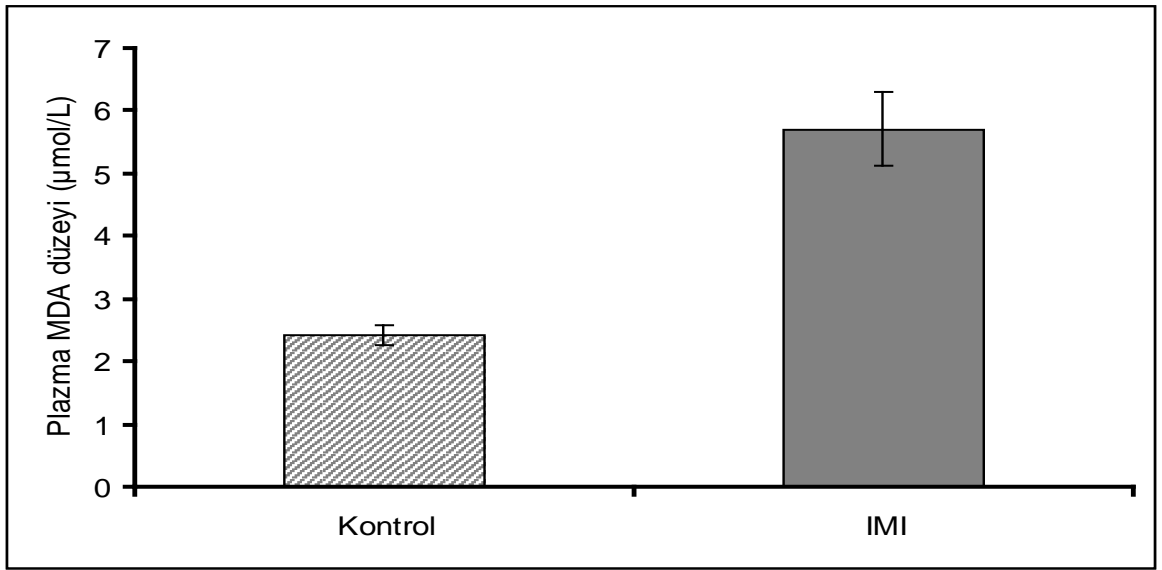


Şekil 4.34. İmidacloprid maruziyetinin karaciğerdeki NO üretimine etkisi.

İmidacloprid verilen grupta NO düzeyi (2.8 ± 0.19) kontrole göre (1.32 ± 0.16) yaklaşık 2 kat arttı $p < 0.001$.

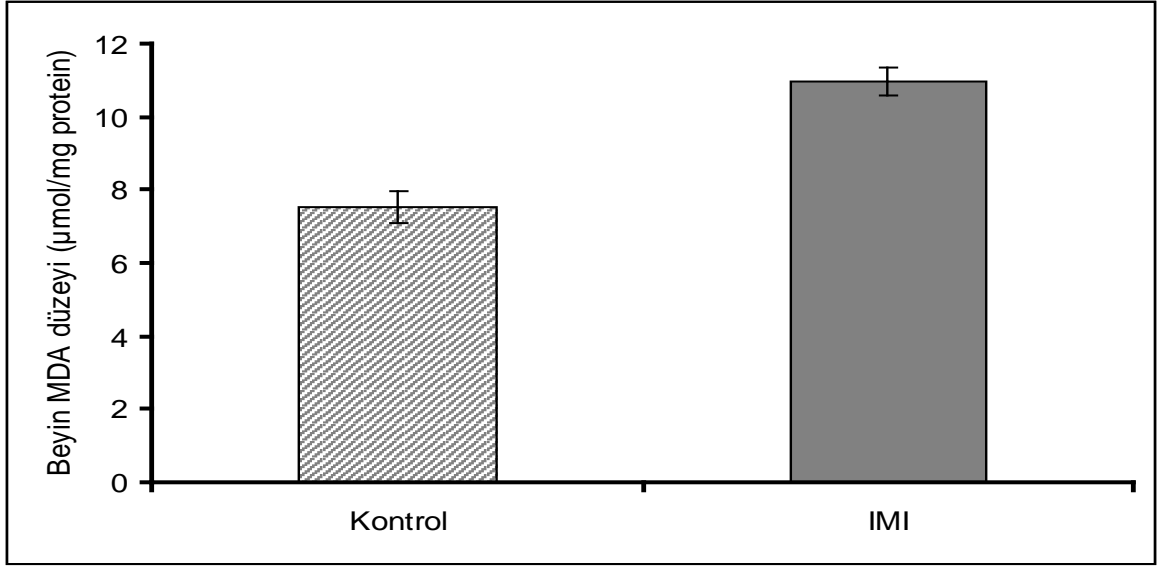
4.2.2. İmidacloprid Uygulamasının Lipid Peroksidasyonuna Subkronik Etkisi.

İmidaclopridin özellikle membran lipidlerine olası oksidan etkileri lipid peroksidasyon indeksi olan malaondialdehid (MDA) analizi yapılarak araştırıldı. Plazma, beyin ($p<0.001$) ve karaciğer ($p<0.003$) dokularında MDA düzeyinin anlamlı biçimde artmasıyla subkronik imidacloprid maruziyetinin lipid peroksidasyonuna neden olduğu belirlendi.



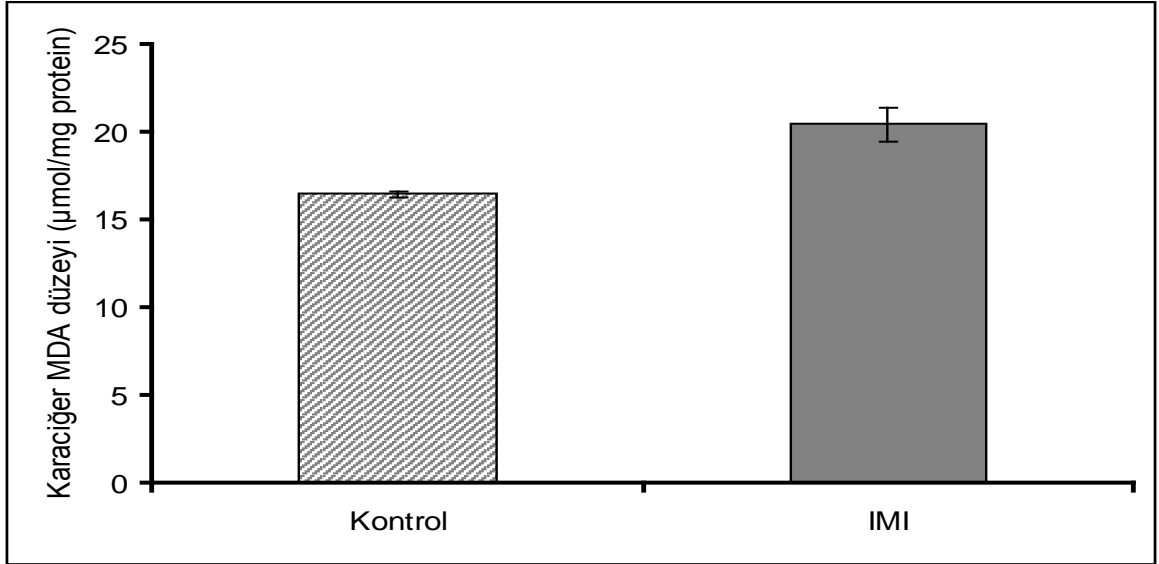
Şekil 4.35. İmidacloprid uygulamasının plazma malondialdehid düzeyine etkisi.

Plazma lipid peroksidasyon düzeyi kontrol grubunda 2.42 ± 0.15 olarak ölçülürken, IMI grubunda 5.71 ± 0.60 şeklinde bulundu $p<0.001$.



Şekil 4.36. İmidacloprid uygulamasının beyin malondialdehid düzeyine subkronik etkisi.

Kontrol grubunda 7.52 ± 0.46 olan beyin lipid peroksidasyon düzeyi IMI grubunda 10.95 ± 0.39 'a yükseldi $p < 0.001$.

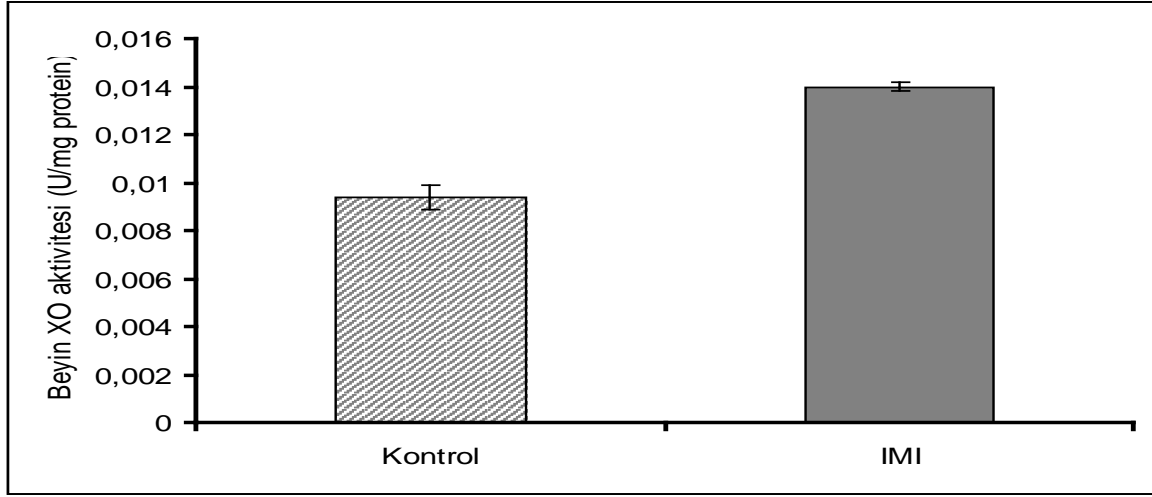


Şekil 4.37. Subkronik imidacloprid uygulamasının karaciğer malondialdehid düzeyine etkisi.

Lipid peroksidasyonu karaciğer dokusunda da (kontrol; 16.43 ± 0.21 , IMI: 20.4 ± 1) anlamlı biçimde arttı $P < 0.05$.

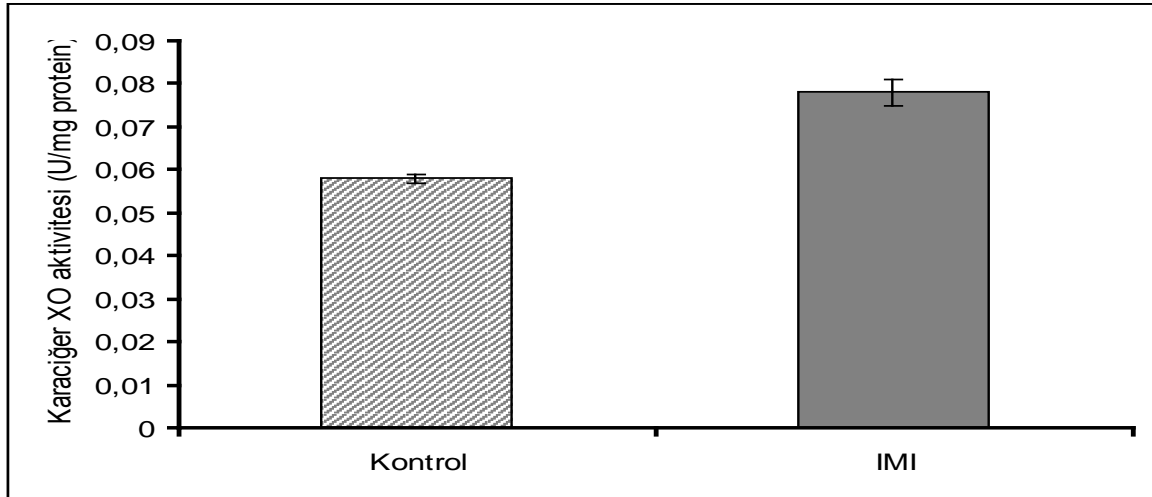
4.2.3. Subkronik İmidacloprid Uygulamasının Ksantin Oksidaz Aktivitesine Etkisi.

Hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olan oksidatif stres mekanizmasının önemli radikali süperoksitin oluşumunda görev alan XO enzim aktivitesi kısa dönemde olduğu gibi beyinde ve karaciğerde artış gösterdi ($p < 0.001$).



Şekil 4.38. İmidacloprid subkronik maruziyetinin beyin ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.

İmidacloprid maruziyetinin ardından beyinde XO aktivitesi IMI grubunda (0.014 ± 0.0002) kontrole göre (0.0094 ± 0.0005) artış gösterdi $p < 0.001$.

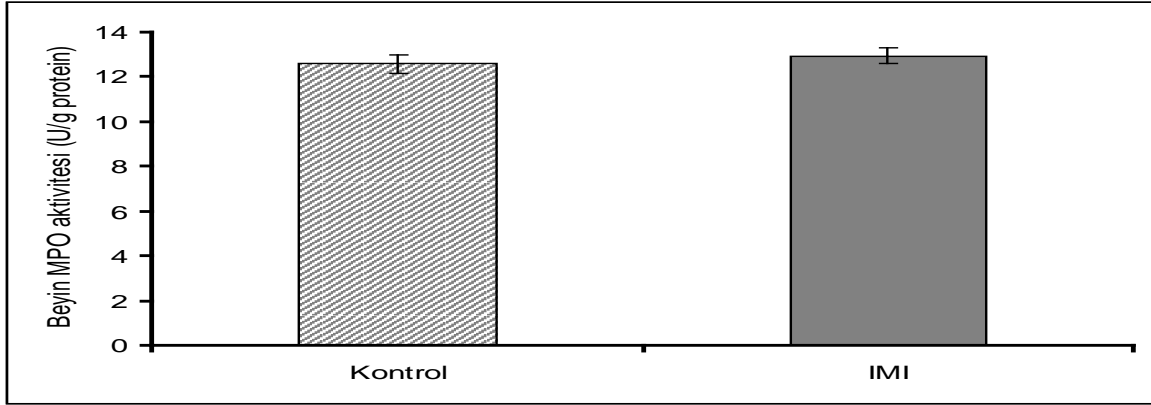


Şekil 4.39. Otuz gün süreyle uygulanan imidaclopridin karaciğer ksantin oksidaz aktivitesine etkisi.

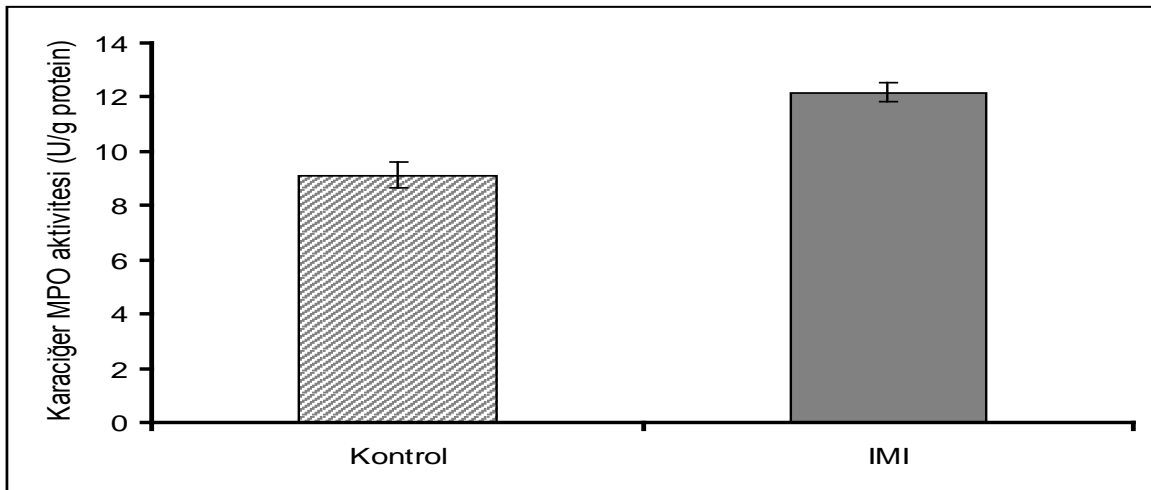
İmidaclopridin XO aktivitesini artırdığı değerler kontrol grubunda 0.058 ± 0.01 , IMI grubunda 0.078 ± 0.01 olarak ölçüldü $p < 0.001$.

4.2.4. İmidacloprid Uygulamasının Myeloperoksidaz Aktivitesine Subkronik Etkisi.

Myeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlar olup, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler. 30 günlük imidacloprid uygulaması ardından aktivitesi ölçülen MPO enzimi beyinde değişikliğe uğramazken, karaciğerde ($p<0.001$) istatistiksel anlamda artış tespit edildi.



Şekil 4.40. İmidacloprid uygulamasının beyin myeloperoksidaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (12.57 ± 0.43), IMI grubu (12.95 ± 0.35) $p>0.05$.

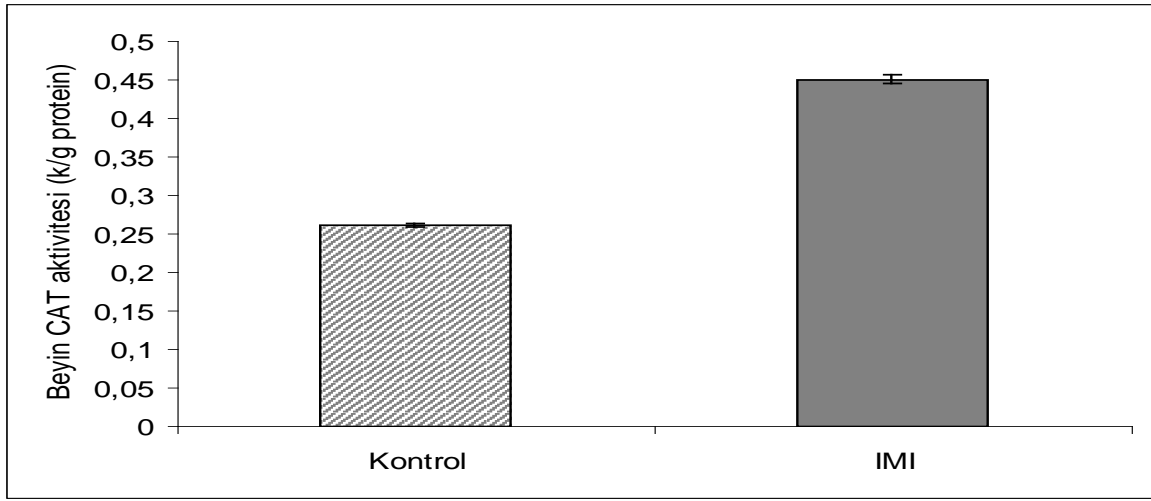


Şekil 4.41. İmidaclopridin ratlarda karaciğer myeloperoksidaz aktivitesine etkisi.

Bir ay boyunca 1mg/kg/gün olacak şekilde verilen imidaclopridin MPO aktivitesini %33 oranında arttırdığı görüldü $p<0.001$.

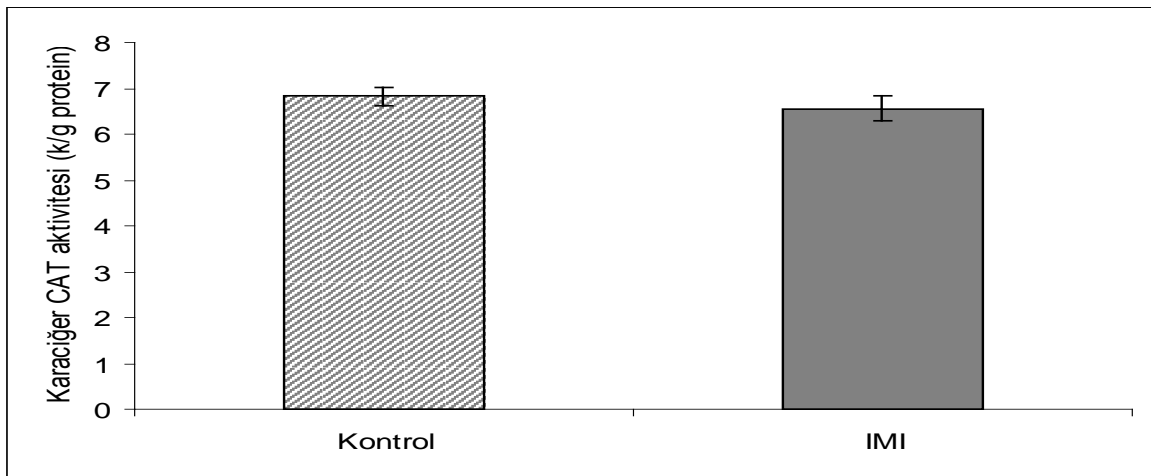
4.2.5. İmidacloprid Uygulamasının Beyin ve Karaciğer Dokularında Katalaz Aktivitesine Etkisi.

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2) hidroksil serbest radikali (OH^\cdot) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır. Gavaj yoluyla oral olarak verilen imidacloprid önemli antioksidan enzimlerden CAT aktivitesini beyin ($p<0.05$) homojenatlarında arttırırken, karaciğerde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı.



Şekil 4.42. Kronik imidacloprid maruziyetinin beyin katalaz aktivitesine etkisi.

Beyin CAT aktivitesinin IMI grubunda (0.261 ± 0.002) kontrole göre (0.451 ± 0.005) yaklaşık iki kat arttığı görüldü $p<0.05$.

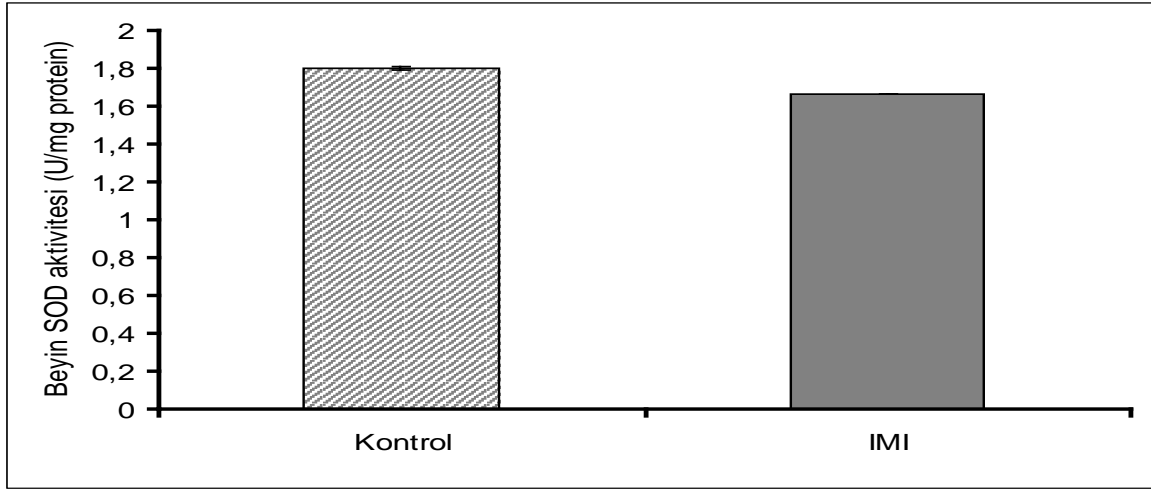


Şekil 4.43. İmidaclopridin uzun süre verilmesinin karaciğer katalaz aktivitesine etkisi.

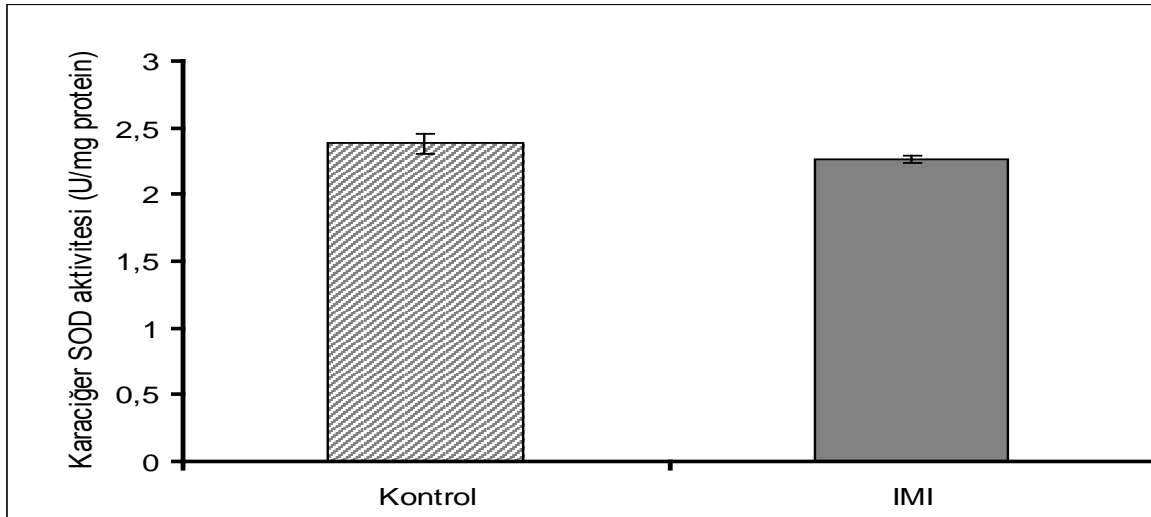
Kontrol grubu (6.82 ± 0.21), IMI grubu (6.56 ± 0.28) $p>0.05$.

4.2.6. İmidaclopride Uzun Süre Maruz Kalan Ratların Dokularında Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin imidaclopride 30 gün süresince maruziyet sonucunda beyin ve karaciğer dokularında herhangi bir değişikliğe uğramadığı tespit edildi ($p>0.05$).



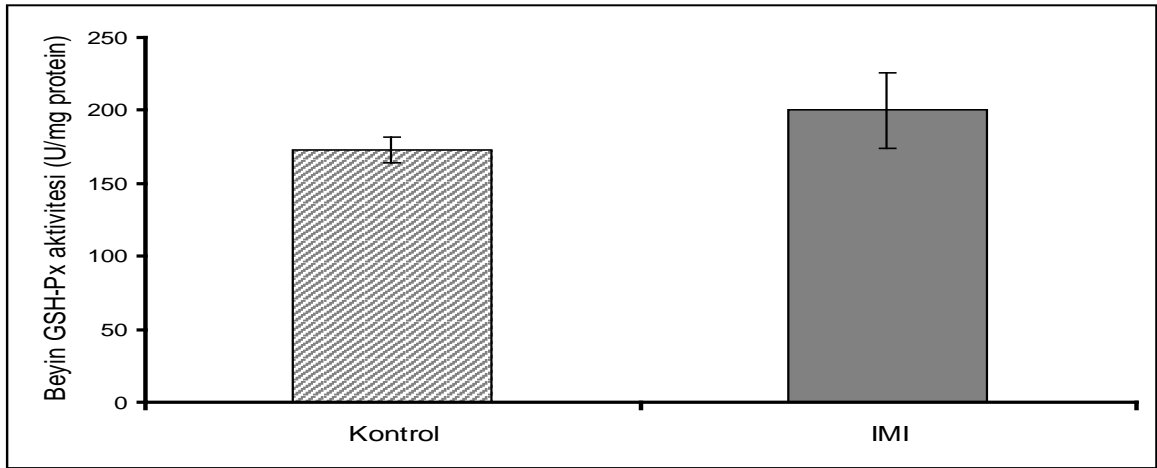
Şekil 4.44. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde süperoksit dismutaz aktivitesi. Kontrol grubu (1.801 ± 0.009), IMI grubu (1.665 ± 0.002) $p>0.05$.



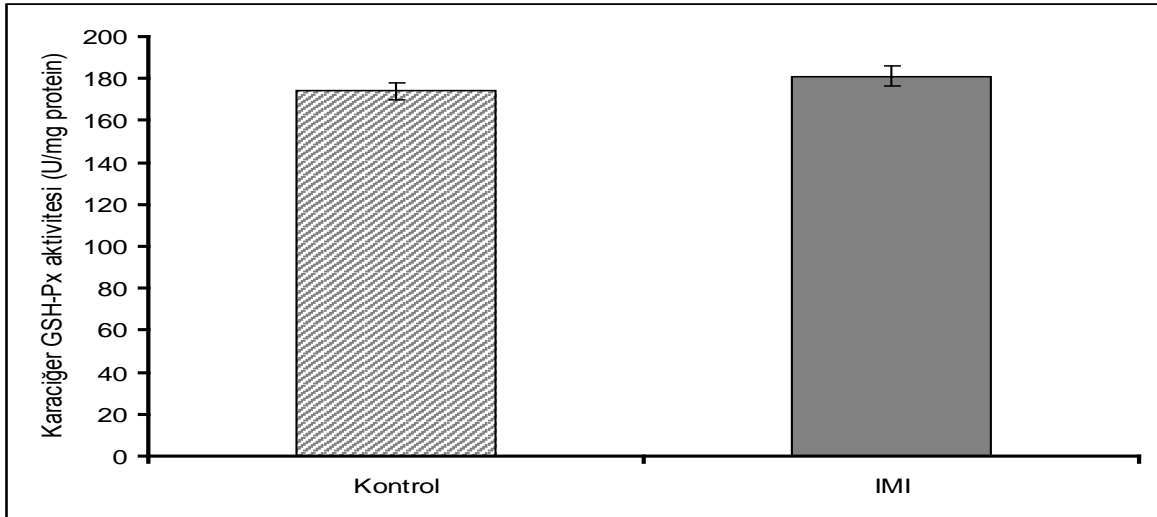
Şekil 4.45. İmidaclopridin oral uygulamasının karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (2.38 ± 0.07), IMI grubu (2.26 ± 0.03) $p>0.05$.

4.2.7. Uzun Süreli İmidacloprid Uygulanan Ratlarda Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Hücre içi antioksidan enzim olan GSH-Px aktivitesinin akut uygulamadaki sonuçların aksine beyinde ya da karaciğerde anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı ($p>0.05$).



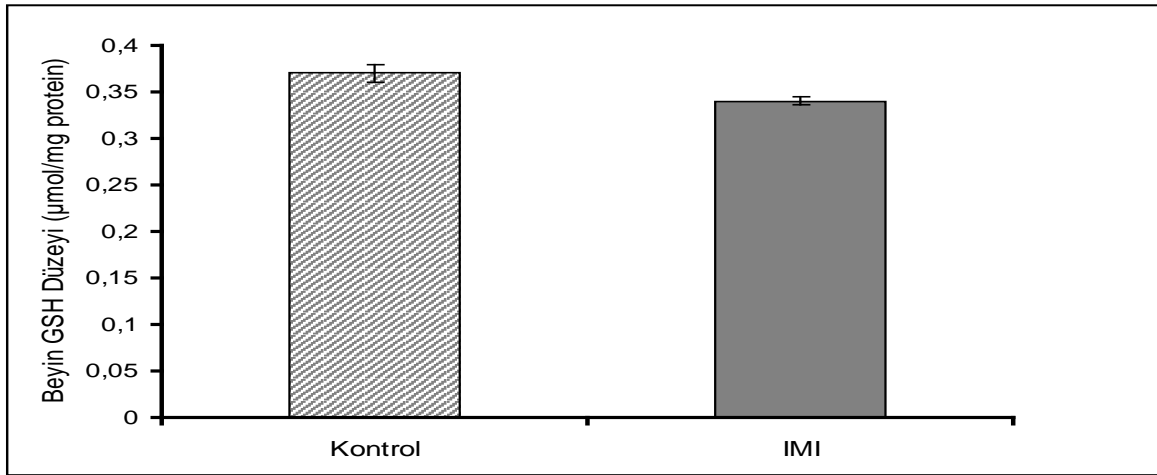
Şekil 4.46. İmidacloprid kronik uygulamasının beyin glutasyon peroksidaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (173.28 ± 8.98), IMI grubu (200.39 ± 25.88) $p>0.05$.



Şekil 4.47. İmidacloprid verilmesinin karaciğer glutasyon peroksidaz aktivitesine etkisi. Kontrol grubu (173.99 ± 4.25), IMI grubu (181.07 ± 4.95) $p>0.05$.

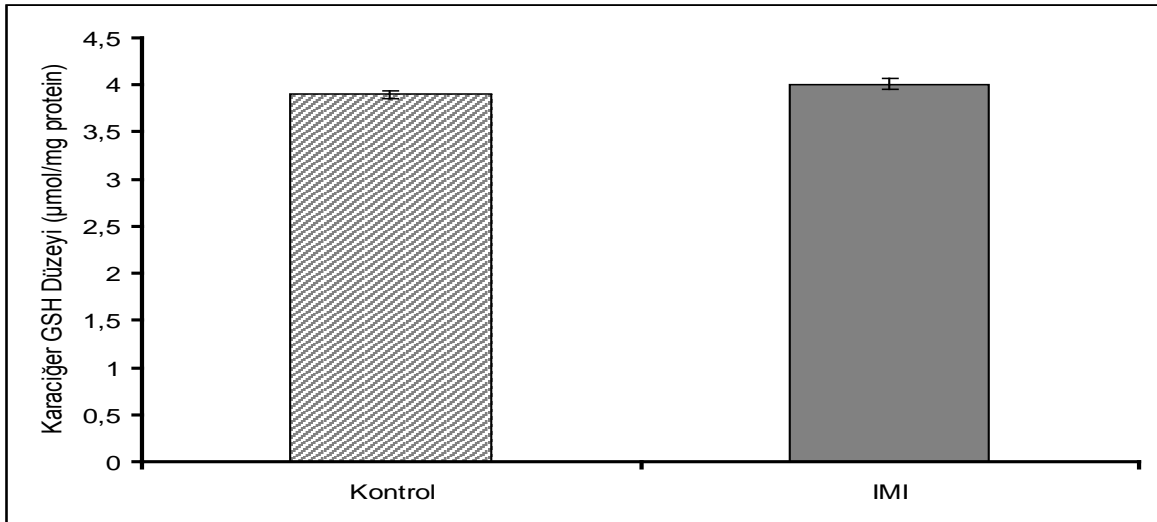
4.2.8. İmidacloprid Verilen Ratların Beyin ve Karaciğer Dokularında Glutasyon Konsantrasyonu.

Enzimatik olmayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlardan glutasyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Kronik maruziyet sonrası GSH düzeyi beyinde akut döneme benzer şekilde azalırken ($p<0.05$), karaciğerde aynı azalma görülmedi.



Şekil 4.48. İmidaclopride kronik maruziyetin beyin glutasyon düzeyine etkisi.

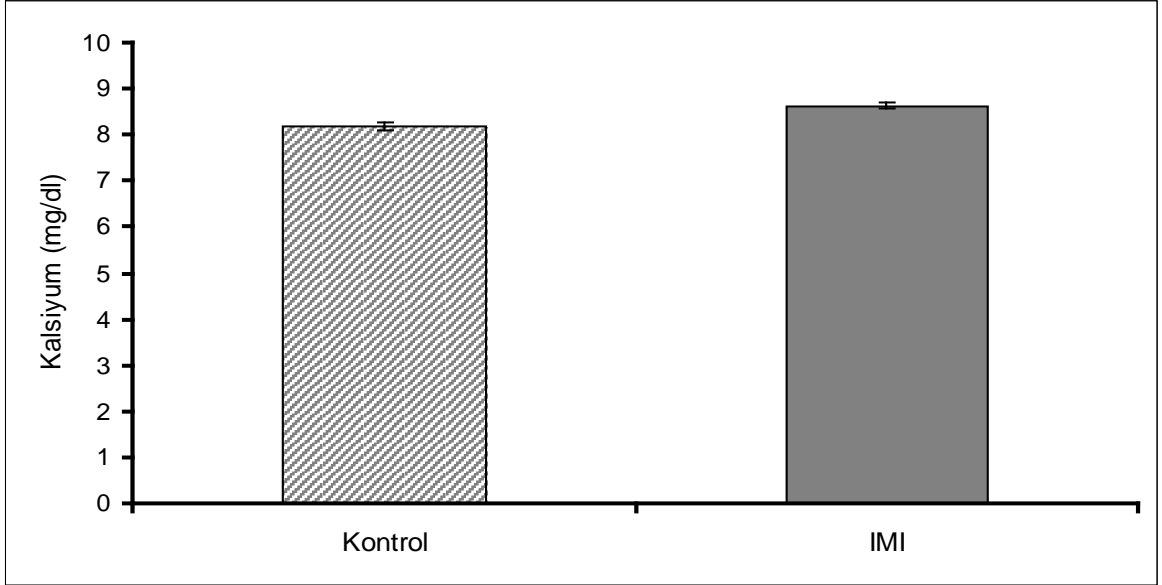
İmidaclopridin GSH düzeyini azalttığı değerler kontrol grubunda 0.37 ± 0.01 , IMI grubunda 0.34 ± 0.004 olarak ölçüldü $p<0.05$.



Şekil 4.49. İmidacloprid maruziyetinin karaciğer glutasyon düzeyine subkronik etkisi. Kontrol grubu (3.9 ± 0.04), IMI grubu (4.01 ± 0.06) $p>0.05$.

4.2.9. İmidacloprid Uygulamasının Plazma Kalsiyum Düzeyine Etkisi.

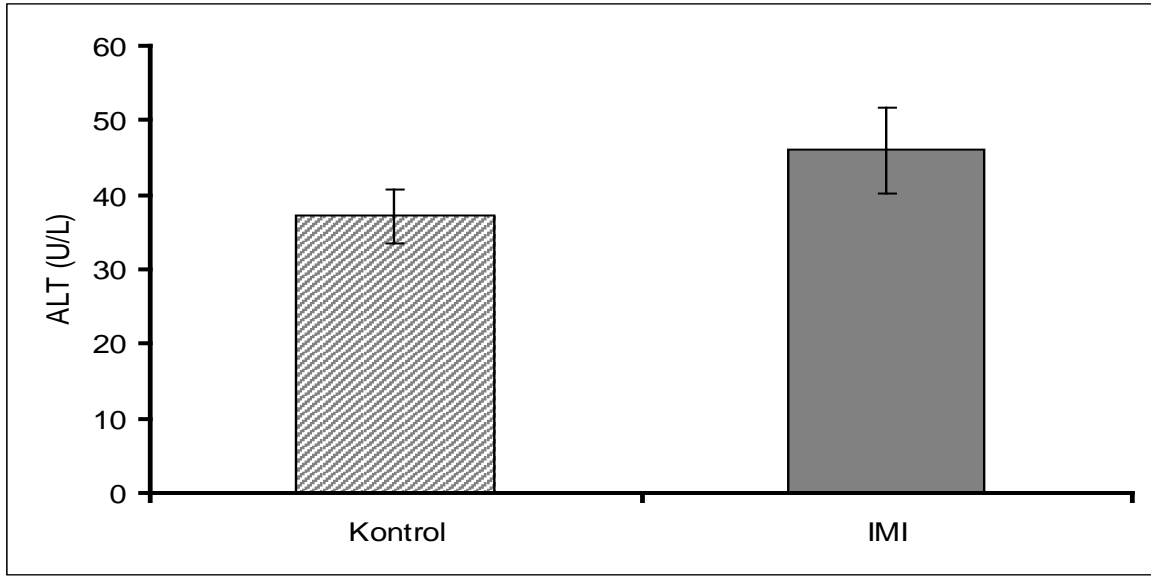
Nikotinic asetilkolin reseptör agonisti imidaclopridin akut uygulamasının Ca^{2+} düzeyini daha anlamlı etkilediği görüldü. Kronik dönemde de Ca^{2+} düzeyininin buna benzer şekilde istatistiksel anlamda arttığı ($p<0.05$) belirlendi.



Şekil 4.50. Subkronik imidacloprid uygulamasının plazma kalsiyum düzeyine etkisi. İmidacloprid maruziyetinin ardından plazma Ca^{2+} düzeyi IMI grubunda (8.19 ± 0.1) kontrole göre (8.62 ± 0.06) artış gösterdi $p<0.05$.

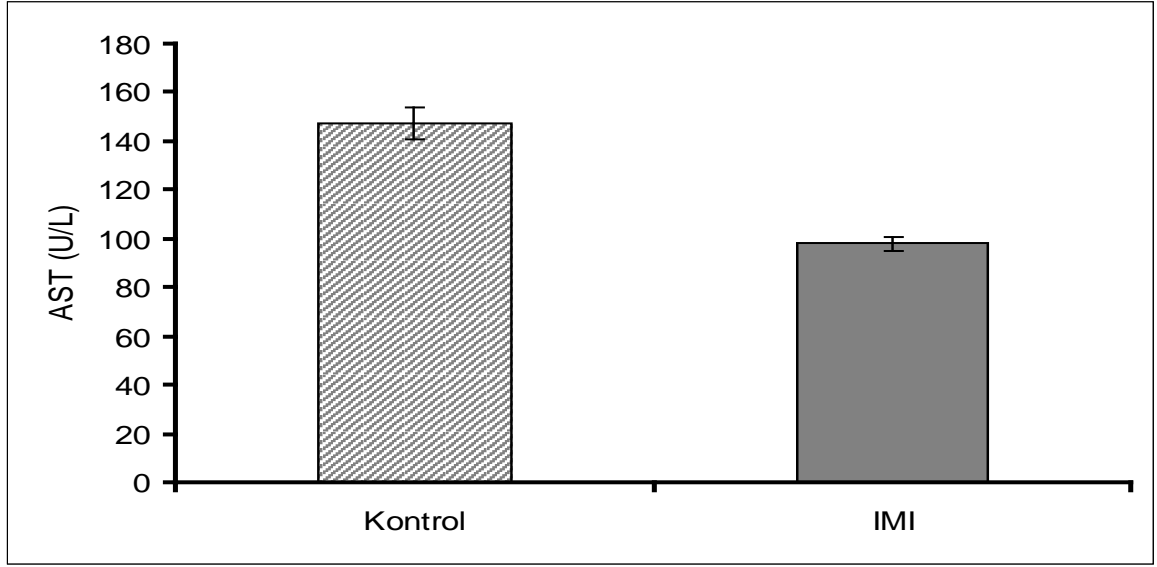
4.2.10. Subkronik Düzeyde İmidaclopride Maruz Bırakılan ratlarda Karaciğer Enzim Aktiviteleri.

Otuz gün süresince 1mg/kg/gün dozunda imidacloprid uygulanan ratlarda karaciğer fonksiyonları alanin aminotransferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST) ve laktat dehidrojenaz (LDH) aktiviteleri analiz edilerek değerlendirildi. Buna göre ALT aktivitesi değişmezken, imidaclopridin AST ve LDH aktivitelerinde ($p < 0.001$) anlamlı düzeyde inhibisyona neden olduğu tespit edildi.

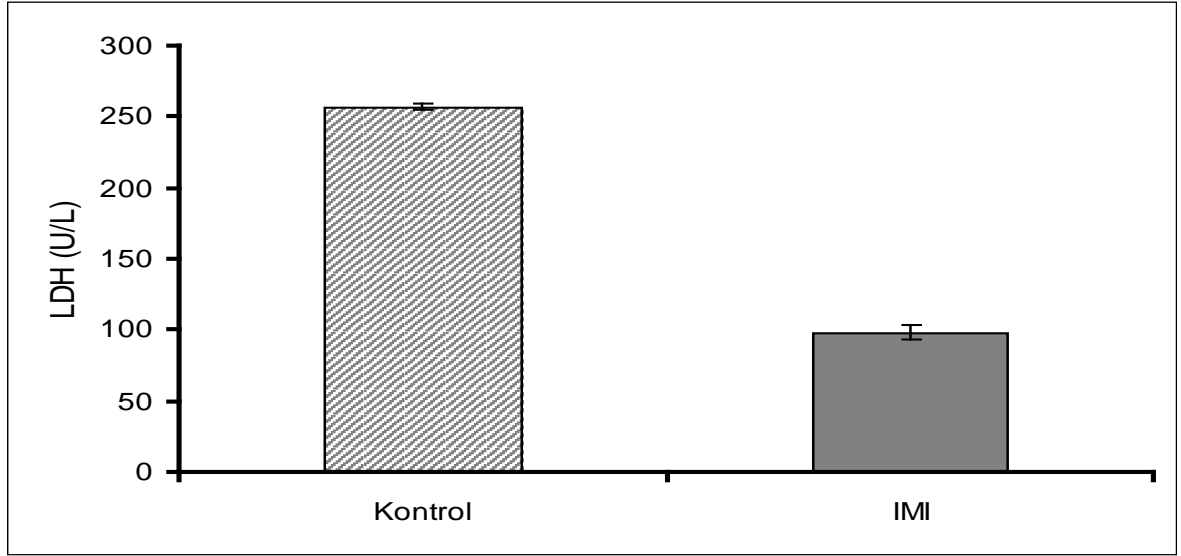


Şekil 4.51. Subkronik imidacloprid uygulamasının alanin aminotransferaz aktivitesine etkisi.

Değerler kontrol grubunda 37.11 ± 3.6 , IMI grubunda ise 46.01 ± 5.74 olarak bulundu ($p > 0.05$).



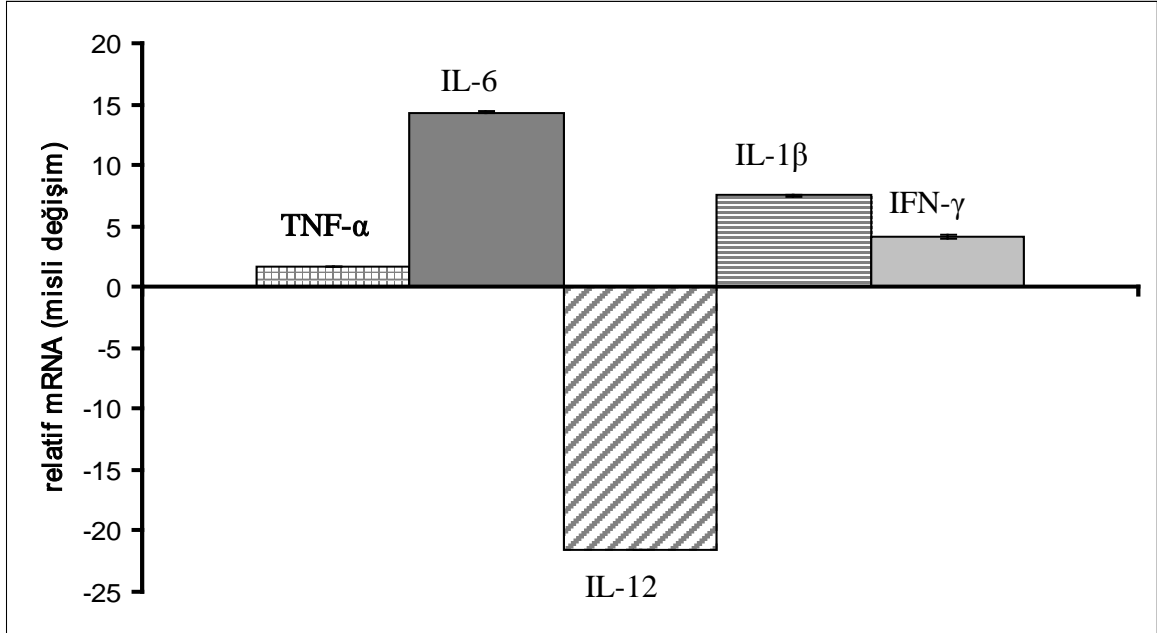
Şekil 4.52. Subkronik imidacloprid uygulamasının aspartat aminotransferaz aktivitesine etkisi. Gavaj yoluyla bir ay süresince uygulanan imidacloprid aspartat aminotransferaz aktivitesini IMI grubunda (97.84 ± 2.73) kontrol grubuna (147.06 ± 6.48) göre anlamlı biçimde ($p < 0.001$) azalttı.



Şekil 4.53. Subkronik imidacloprid uygulamasının laktat dehidrojenaz aktivitesine etkisi. İmidacloprid'e kronik maruziyet sonucu laktat dehidrojenaz aktivitesi IMI grubunda (98.24 ± 5.21) kontrol grubuna (256.79 ± 2.11) göre 2.5 kat azaldı ($p < 0.001$).

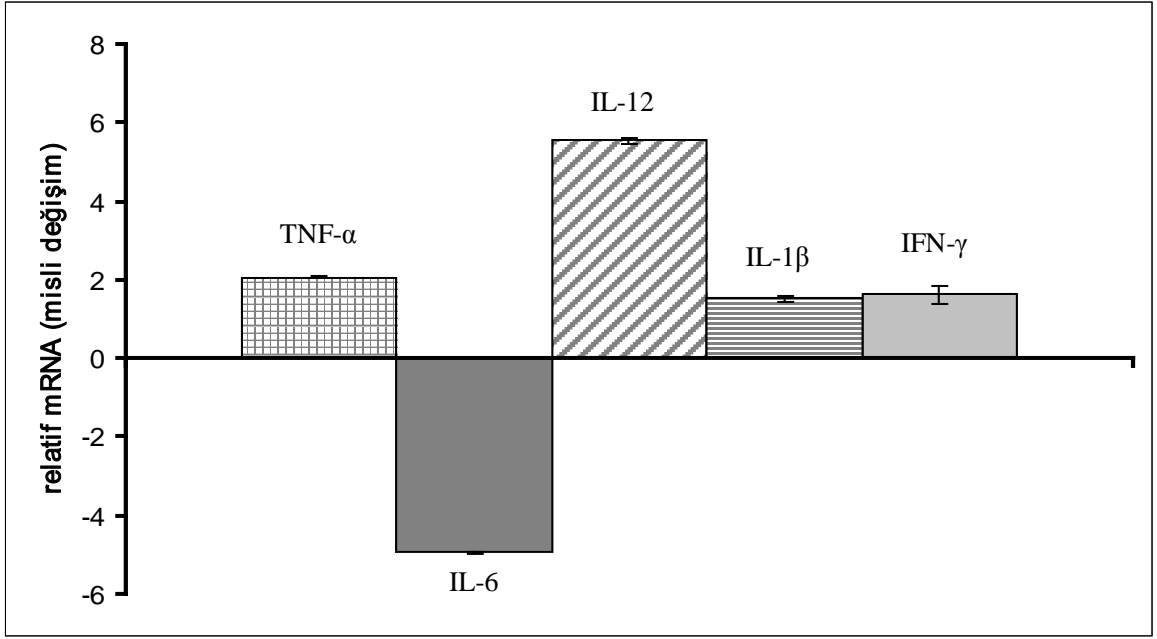
4.2.11. RT-PCR Yöntemi ile Yangısal Sitokin Transkripsiyon Analizi

Bir ay boyunca gavaj yoluyla imidacloprid uygulanan ratların beyin ve karaciğer dokularında gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile kuantitatif mRNA analizleri yapıldı. İmidacloprid uygulanan ratların beyinlerinde yangı mediyatörlerinden TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IFN- γ mRNA transkripsiyonlarının up-regüle olduğu görülürken, IL-12 ekspresyonunun baskılandığı belirlendi. Karaciğerde TNF- α , IL-1 β , IL-12 ve IFN- γ mRNA transkripsiyonları indüklenirken, IL-6 ekspresyonunun inhibe tespit edildi. Anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10'un ise beyin ve karaciğerde gen ekspresyonu tespit edilemedi.



Şekil 4.54. Subkronik imidacloprid uygulanan rat beyinlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değişimleri.

TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IFN- γ mRNA transkripsiyonları kontrole göre sırasıyla, 1.65, 14.32, 7.51, 4.19-misli artarken, IL-12 mRNA transkripsiyonu ise 21.55- misli baskılandı.

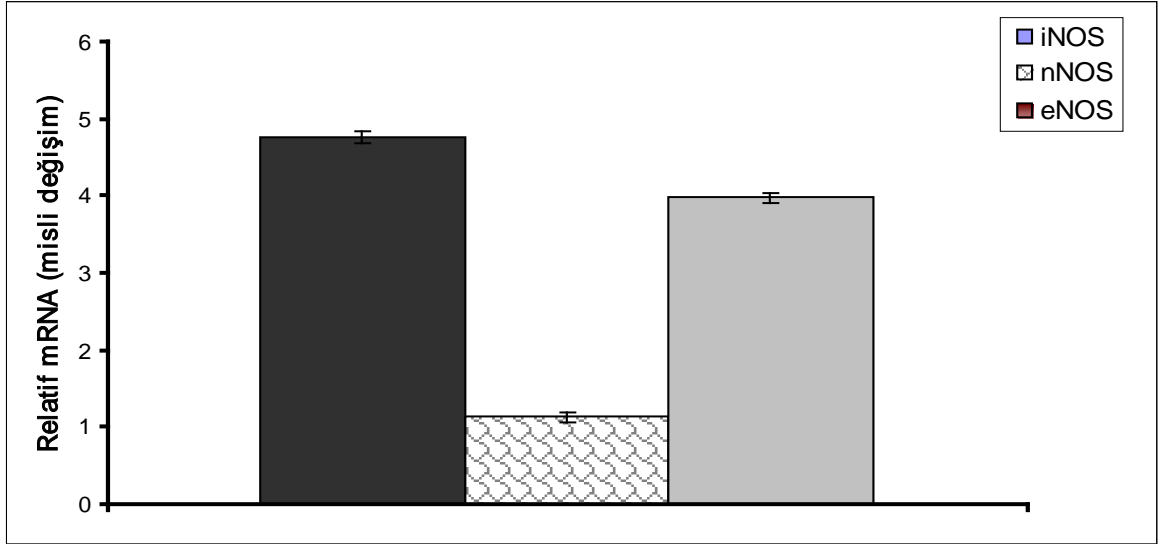


Şekil 4.55. İmidacloprid verilen rat karaciğerlerinde sitokinlerin mRNA transkripsiyonlarının misli değişimleri.

TNF- α , IL-12, IL-1 β ve IFN- γ gen ekspresyonlarının kontrole göre sırasıyla, 2.05, 5.54, 1.51, 1.63-misli uyarılırken, IL-6 mRNA transkripsiyonunun ise 4.95- misli inhibe oldu.

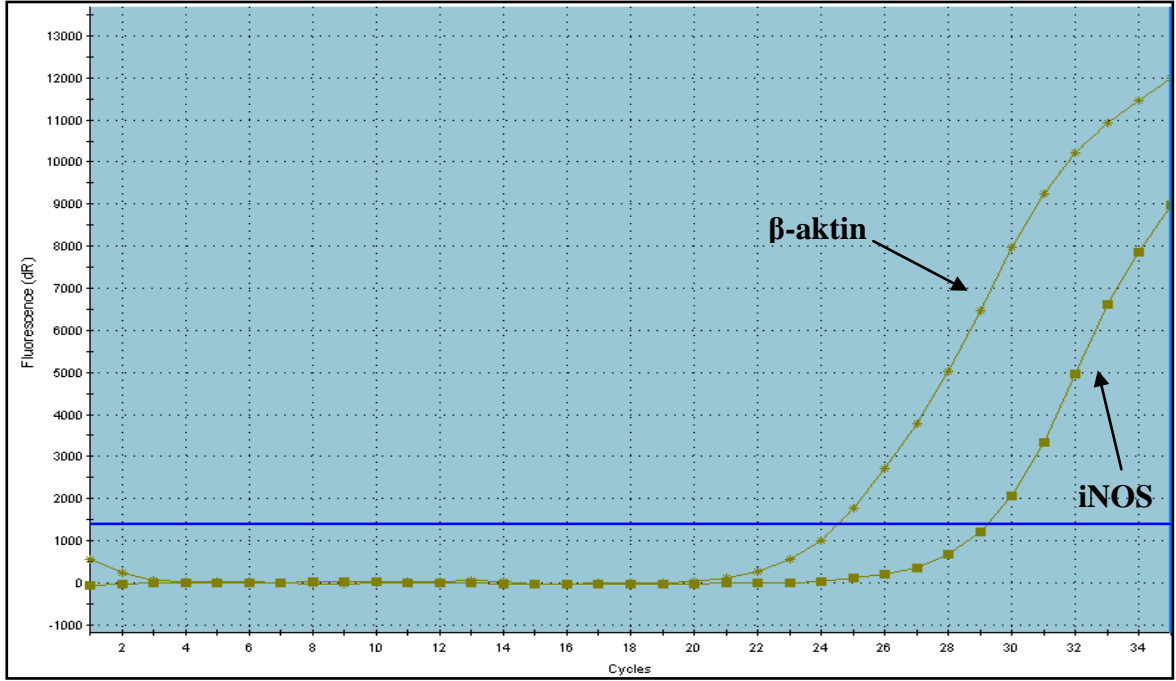
4.2.12. RT-PCR yöntemi ile beyinde NOS transkripsiyon analizi

Gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonu analizleri yapılan NOS enziminin beyinde üç izoformunun da (iNOS, nNOS ve eNOS) indüklendiği saptandı.

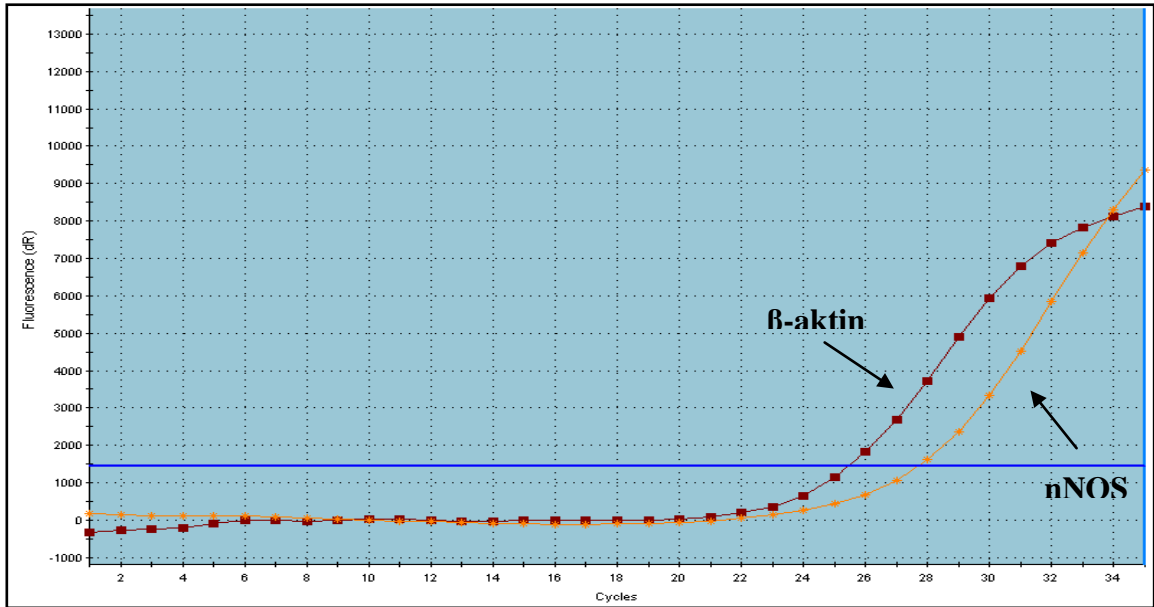


Şekil 4.56. İmidacloprid uygulanan rat beyinlerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değişimleri.

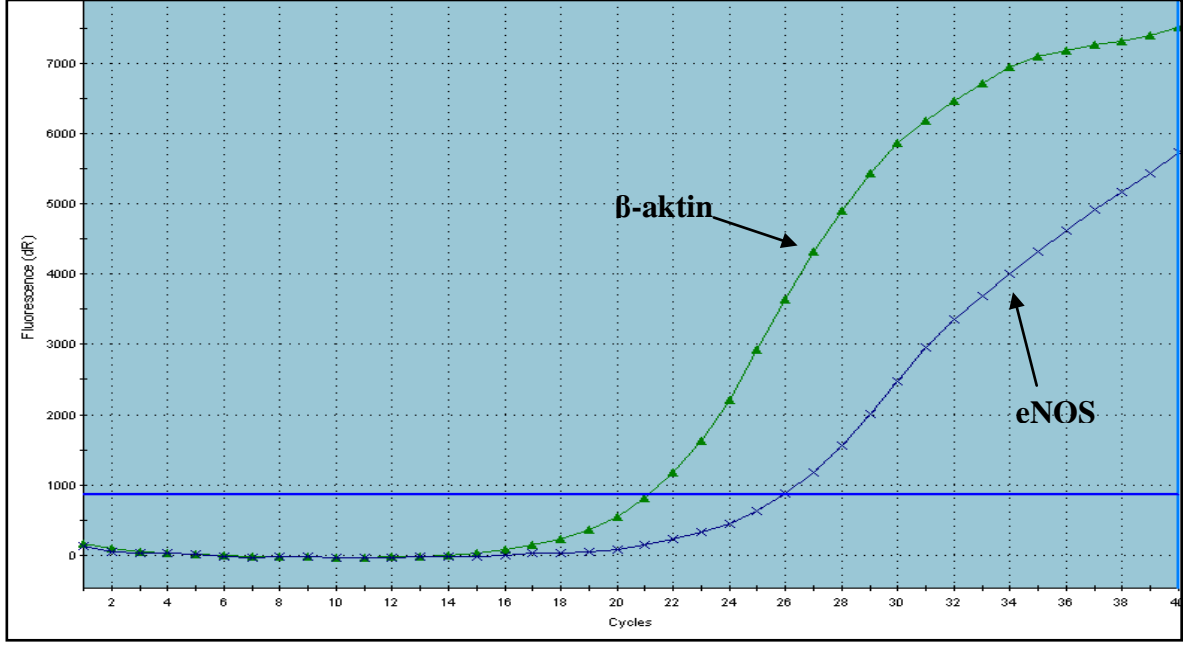
Yapılan RT-PCR mRNA transkripsiyon analizlerine göre beyinde iNOS 4.76-misli, nNOS 1.13, eNOS 3.97-misli up-regüle oldu.



Şekil 4.57. İmidaclopride subkronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 29.28 ve β -aktin 24.93; kontrol grubu 26.86 ve β -aktin 24.76).



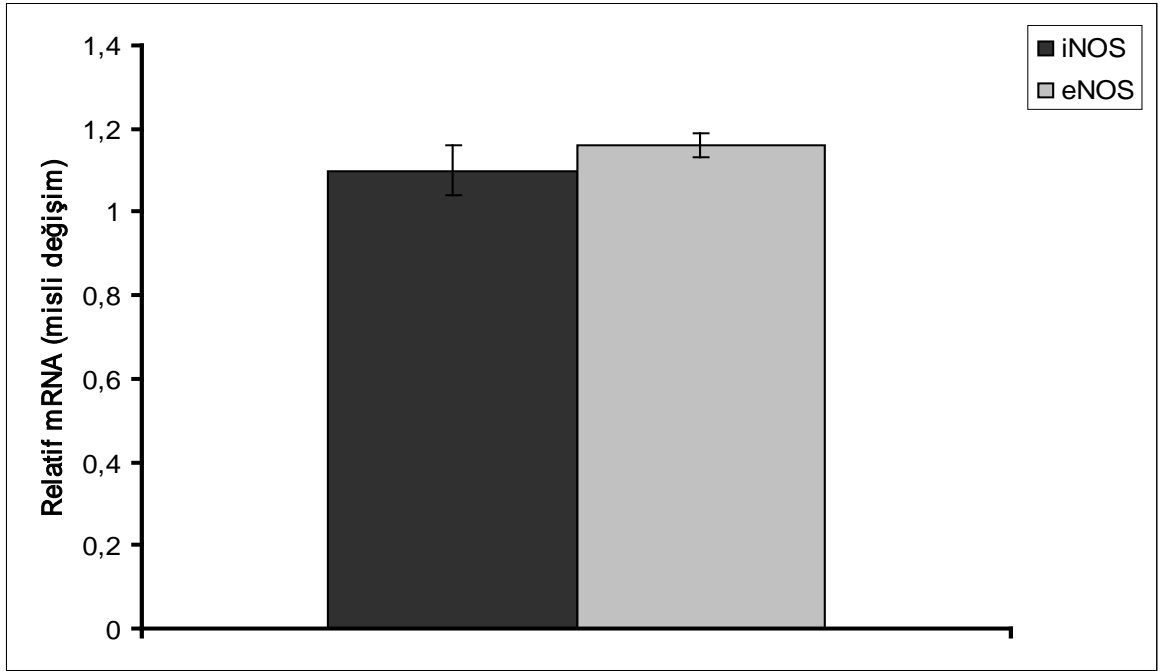
Şekil 4.58. İmidaclopride subkronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve nNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 27.41 ve β -aktin 25.85; kontrol grubu 25.37 ve β -aktin 24.01).



Şekil 4.59. İmidaclopride subkronik maruz kalan rat beyinlerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 26.03 ve β -aktin 21.10; kontrol grubu 24.84 ve β -aktin 21.90).

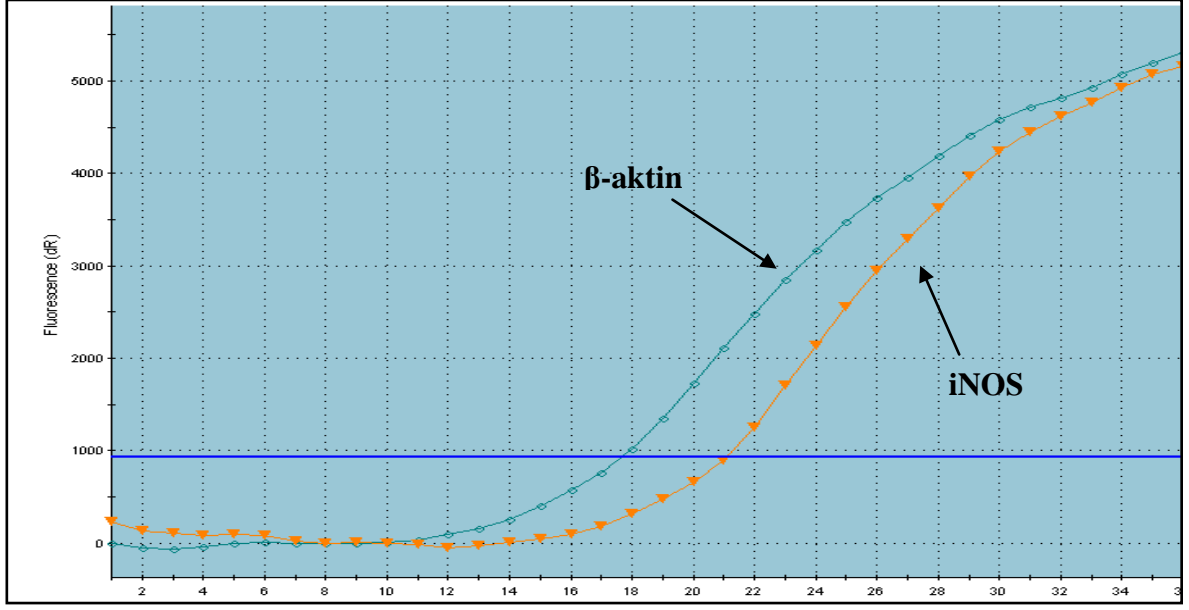
4.2.13. RT-PCR yöntemi ile karaciğerde NOS transkripsiyon analizi

Karaciğerde yapılan mRNA analizlerinde akut dönemde de belirlendiği gibi iNOS ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının up-regüle olduğu saptandı.

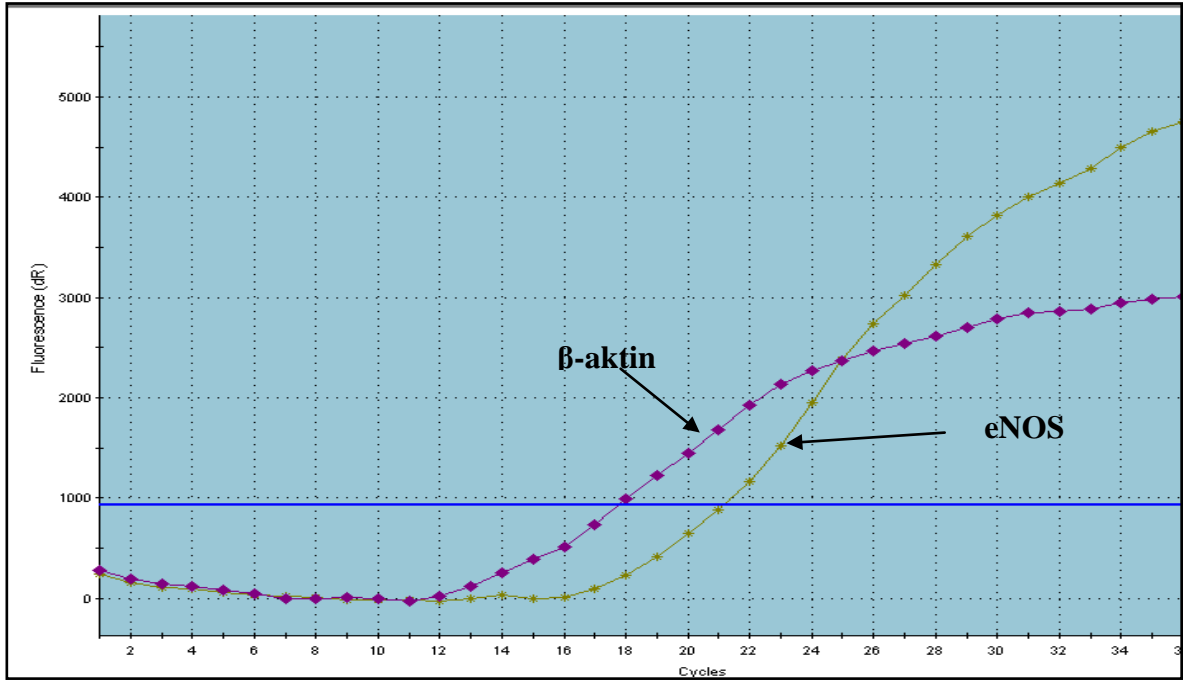


Şekil 4.60. İmidacloprid verilen rat karaciğerinde NOS mRNA transkripsiyonlarının misli değerleri.

Yapılan RT-PCR gen ekspresyon analizlerine göre karaciğerde artan NO kaynağının iNOS (1.1-misli) ve eNOS (1.16-misli) olduğu saptandı.



Şekil 4.61. İmidaclopride subkronik maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve iNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 21.72 ve β -aktin 18.04; kontrol grubu 21.65 ve β -aktin 18.17).



Şekil 4.62. İmidaclopride subkronik maruz kalan rat karaciğerinde β -aktin ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının amplifikasyon grafiği (ortalamayı en iyi yansıtan örnekler gösterilmiştir: Ct değerleri IMI grubu 21.57 ve β -aktin 18.01; kontrol grubu 21.63 ve β -aktin 18.29).

5. TARTIŞMA

5.1. Akut Dönem Tartışma

Yeni nesil pestisitlerden imidacloprid gibi neonikotinoidler delici ve emici insektlere karşı oldukça etkili olmaları ile karakterizedir. İmidacloprid böceklerde etkisini nAChR'lerine bağlanarak göstermesi bu reseptörlerin bulunduğu diğer canlıları özellikle memelileri olası hedefi haline getirmektedir (David ve ark. 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda insanlarda imidaclopridin neden olduğu zehirlenme vakaları rapor edilmiştir (Wu ve ark. 2001, Proenca ve ark. 2005, David ve ark. 2007, Shadnia ve Moghaddam 2008). Literatürde yapısı ve etki mekanizması tartışılmasına rağmen, yapılan araştırmalarda imidaclopridin memeli dokuları üzerine toksisitesi ile ilgili çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında imidaclopridin memeli canlı modeli olarak kullanılan ratların merkezi sinir sistemi ve karaciğer üzerine olası akut etkileri oksidatif stres ve yangısal olaylar yönünden incelenmiştir.

Nitrik oksitin moleküler oksijen varlığında reaktif nitrojen türlerini oluşturarak DNA gibi biyomoleküllere zarar verdiği, çeşitli enzimleri inhibe ettiği ve lipid peroksidasyonunu tetiklediği bilinmektedir (Wink ve Mitchell 1998). Bu çalışmada ratların 2 saat süresince 10 µM düzeyde imidaclopride maruziyeti plazma, beyin ve karaciğer dokularında NO düzeyini anlamlı biçimde arttırdı ve kontrole göre antioksidan kapasiteyi değiştirdi. Yapılan kantitatif mRNA analizleri imidacloprid tarafından uyarılan NO üretiminin karaciğerde iNOS, beyinde ise nNOS ekspresyonuna bağlı olduğunu gösterdi. nNOS ve eNOS izoformları Ca²⁺ bağımlı NOS'lar olarak adlandırılmaktadır. nNOS'un kalsiyum-kalmodullin tarafından aktive edildiği bilinmektedir (Bredt ve Synder 1990). NO fizyolojik şartlarda insan ve hayvanların sinir sisteminde yer alan bir sinyal iletim molekülüdür. Ancak yüksek konsantrasyonlarda süperoksit ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit birçok biyolojik molekülün oksidasyonuna ve DNA kırılmasına (fragmentasyonuna) da neden olabilir (Choi ve ark. 2006). İmidacloprid uygulaması ardından, NO üretiminin yanında, sırasıyla hipoklorit ve süperoksit oluşum reaksiyonlarını kataliz eden MPO ve XO aktivitelerinin beyin ve karaciğerde uyarıldığı saptandı. Serbest radikallerin üretimi arttıkça, antioksidan sistem zayıflar ve hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olur (Kalra ve ark. 1994, Kale ve ark. 1999, Rezg ve ark. 2008). Çalışılan tüm dokularda NO hasarı tespit edilmesine rağmen ratların sadece karaciğer ve

plazma örneklerinde lipid peroksidasyonu belirlendi. Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin oksidatif dejenerasyonu olarak tanımlanan ve oksidatif stresin belirteçlerinden biridir (Muthukumaran ve ark. 2008). Bu çalışmada, imidacloprid kaynaklı NO ve diğer reaktif oksijen türlerinin artışı ile lipidlerin peroksidasyonuna bağlı olarak doku hasarı olabileceği belirlendi. İmidacloprid ve NO üretimi ile ilgili yapılan bir çalışma henüz bulunmamasına rağmen, Haberberger ve ark. (2003) nAChR'lerinin rat dorsal kök ganglion nöronlarında NOS'u aktive ettiğini göstermiştir. Nagata ve ark. (1996) imidaclopridin rat PC12 hücrelerinde nAChR aracılı iletken akım oluşturduğunu bildirmişlerdir. nAChR agonisti nikotin sitokrom CYP2A6 indüksiyonu sonucu aşırı miktarda reaktif oksijen radikalleri oluşturup lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Yamazaki ve ark. 1999). Bulgularımız ve nikotin ile ilgili diğer çalışmaların paralellik göstermesi (Yıldız ve ark. 1998, Kovacic ve Cooksy 2005, Kalpana ve ark. 2007) imidaclopridin bazı hücre tiplerinde nAChRs üzerinden nikotine benzer şekilde etki edebileceğini göstermektedir. İmidaclopridin sinir sistemi dışında etkilerinin olması sürpriz değildir. Çünkü nAChR'lerinin makrofajlar, lenfositler, adipozitler, bağırsak, karaciğer ve akciğerde eksprese edildiği kanıtlanmıştır (Gahring ve Rogers 2006, Serobyan ve ark. 2007).

Kolinerjik nöronlar nAChRs eksprese ederler ve imidaclopride karşı oldukça duyarlıdırlar. İmidaclopridin voltaj-kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla Ca^{2+} miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Jepson ve ark. 2006). NO üretimindeki Ca^{2+} ihtiyacına bağlı olarak kanallardan geçen Ca^{2+} eNOS, nNOS ve nikotinik uyarım ile doğrudan ilişkilidir (Zayas ve ark. 2002). NO'in diğer sistemlerde kalsiyum aracılı hüresel toksisiteye dahil olduğu bildirilmiştir (Kobzik ve ark. 1994). Bunun yanında, oksidatif stres iyonik dengesizliğin ve artan Ca^{2+} 'un ortak ürünüdür. Bu çalışmada beyin ve karaciğerde MPO ve XO gibi oksidan enzimlerin aktivitelerinin önemli biçimde arttığı bulunmuştur. Bu artışın olası nedeni reaktif oksijen türlerinin üretimiyle beraber artan hücre içi kalsiyum düzeyi olabilir (Sharma ve Rohrer 2007). Analiz sonucu görülen imidaclopridin neden olduğu plazma kalsiyum düzeyindeki artışın, beyin ve karaciğerde NO üretiminin uyarılmasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Glutasyon (GSH) organizmada protein olmayan tiyol yapılu molekül olup reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikaller gibi toksik bileşiklere karşı hücre içi koruma mekanizmasında anahtar rol oynamaktadır (Anderson ve Luo 1998). Yapılan bu çalışmada

imidacloprid uygulaması sonucu beyin ve karaciğerde GSH konsantrasyonunun anlamlı biçimde düşmesi antioksidan kapasitenin GSH tarafından baskılandığının bir kanıtı olabilir. GSH herbisitlerin ve insektisitlerin oksidatif etkileşimlerinin antagonize edilmesinde önemli görevlere sahiptir (Parke ve Piotrowski 1996). Bir herbisit olan paraquatın neden olduğu GSH azalışının dokuları toksisiteye duyarlı hale getirdiği çok eski çalışmalarda ortaya konmuştur (Bus ve ark. 1976). Bu tezde elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Muthukumaran ve ark. (2008) nikotin uygulamasının rat karaciğer ve akciğerlerinde GSH düzeyini ve SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Nikotin ve imidacloprid gibi nAChR agonistlerinin memelilerde benzer şekilde farklı dokularda oksidatif olayları uyandırdığı ortaya konmuştur.

Daha önce yapılan araştırmalar süperoksit anyonunun ve H_2O_2 'in nikotin kaynaklı serbest radikal üretiminde ve hücrel antioksidanların azalışında ana neden olduğunu göstermektedir (Yıldız ve ark. 1998, Kalpana ve Menon 2004, Huang ve ark. 2005). SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerine karşı korumada çok önemli rolleri vardır. Endojen antioksidan enzimlerin performansı oluşan serbest radikalleri yok edebilmek için başlangıçta artar, fakat daha sonra azalma meydana gelir bu da oksidatif hasarı oluşturur (Kalra ve ark. 1994). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre imidacloprid uygulaması beyinde GSH-Px aktivitesini 3 kat artırırken karaciğerde anlamlı biçimde azalttığı tespit edildi. Bu sonuç imidaclopridin ROS'lerinin üretimini uyarılmış olduğunu fakat karaciğerde SOD'ın öncül savunmasıyla karşılaştığını ardından ortaya çıkan SOD'ın toksik yan ürünü H_2O_2 'in ise GSH-Px tarafından ortadan kaldırılmış olabileceğini göstermektedir (Vidyasagar ve ark. 2004). İkincil savunmanın GSH-Px tarafından yapılmasının nedeni bu enzimin H_2O_2 için daha düşük K_m değerine sahip olmasıdır. Üçüncü bariyer ise CAT enzimidir (Debnath ve Mandal 2000). Elde edilen verilere göre CAT aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer bir deyişle, imidacloprid maruziyetinden sonra sistem öncelikle SOD sonra GSH-Px aktivitesini artırarak koruma sağlamıştır (Winterbourn 1993). GSH-Px temelde karaciğerde sitozol ve mitokondride lokalize olmaktadır, bu sebeple karaciğer bu enzimin ana kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle GSH-Px aktivitesinin karaciğerde azalmasının nedeni imidaclopridin bu dokuda birikmesiyle oluşan oksidatif stresin enzim proteinini inaktif hale getirmesi olabilir (El Tawil ve Abdel-Rahman 2001, Giray ve ark. 2001).

Nitrik oksit yangı ve bağışıklığın gelişiminde önemli bir moleküldür. NO'in yangı kaynaklı hücre ve doku disfonksiyonuna neden olabileceği bildirilmektedir (Grisham ve ark. 1999). Ayrıca NO'in artrit, hemorajik şok, hepatit ve bazı otoimmün hastalıklar gibi kronik yangısal rahatsızlıkların mekanizmasına dahil olduğu düşünülmektedir (Loscalzo ve Welch 1995, Nathan 1997, Hierholzer ve ark. 1998). Han ve ark. (2007) NO üretiminin yangının derecesini yansıtabileceğini ve pestisitler gibi kimyasalların yangı süreci üzerine etkilerinin değerlendirilmesi bakımından önemli olduğunu savunmuşlardır. NO ve ROS'lerinin yanı sıra IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi yangı öncülü sitokinler de birçok otoimmün ve yangısal hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadırlar (Elenkov ve Chrousos 2002). Bu çalışmada, imidacloprid maruziyeti sonucu her iki dokuda da TNF- α , IL-6 ve IL-1 β ekspresyonları uyarılmıştır. IL-1 β immün ve yangısal yanıtların başlatılmasında ve regülasyonunda görevli önemli bir sitokindir ve içinde olgun T ve B hücreleri, monositler, nötrofiller, fibroblastlar ve endotelial hücrelerin olduğu geniş bir hedef hücre spektrumuna sahiptir (Dinerello 1997). İmidaclopride maruz kalan rat dokularında artan IL-1 β erken yangı öncülü reaksiyonlarının sonucu olduğunu göstermektedir (Eder 2006). Bazı yangı öncülü sitokinlerde artışla birlikte imidacloprid yangı önleyici IL-10 transkripsiyonunu inhibe etmiştir. Bu olay, yangısal olayların güçlü olması ile açıklanabilir. Beach ve Whalen (2006) insektisit maruziyetine bağlı olarak IL-10 sekresyonunda azalma olduğunu bildirmişleridir. Han ve ark. (2007) makrofajlarda nörotoksik bir organik klorlu insektisit olan endosülfanın NO üretimini ve yangı öncülü sitokinlerden TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeylerini ve bunların gen düzeyindeki ekspresyonlarının arttığını bildirmişlerdir. Çalışmalar nikotinin makrofajlardan TNF- α ve IL-1 β salınımını arttırdığını göstermiştir (Wang ve ark. 2004). Gao ve ark. (2003) tarım alanında kullanılan kimyasallara maruziyet sonucu aktive olan glial hücrelerin başlıca sitokinler olmak üzere, reaktif nitrojen türleri ve ROS'leri gibi nörotoksik faktörler salgılayarak beyin hasarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Çevresel faktörlerin merkezi sinir sistemindeki yangısal olayları tetiklediği böylece nöronal toksisiteyi arttırdığı bildirilmiştir (Campbell 2004).

Karaciğerdeki hücrelerin önemli bir kısmını teşkil eden hepatositler, enzim açısından zengin hücreler olduklarından organizmanın en aktif ve çeşitlilik gösteren enzimatik aktivitesine sahiptirler. Karaciğere spesifik başlıca enzimler alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrojenaz (LDH)'dır. ALT hepatositler

sitozolünde, AST ise mitokondride sentezlenir. Araştırmada, karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilebilmesi amacıyla ALT, AST ve LDH enzimlerinin aktiviteleri ölçüldü. Buna göre, imidacloprid ALT aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmazken, AST ve LDH aktivitelerini anlamlı biçimde azalttığı saptandı. Pestisitlerin, kullanıldığı tarım alanlarında insanlar üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalarda renal ve hepatik toksisiteyi arttırdığı belirlenmiştir (Browwer ve ark. 1991). Ayrıca, yapılan araştırmalarda pestisitlerin karaciğer ve kas dokularında fonksiyonel bozulmalara neden olduğu saptanmıştır (Izushi ve Ogata 1990). el Demerdash ve ark. (2003) sipermetrin ile yaptıkları bir çalışmada ALT ve AST aktivitelerinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Mishra ve Shukla (1997) endosülfan kullanarak yaptıkları *in vivo* ve *in vitro* çalışmada bu insektisit hem karaciğerde hem de iskelet kasında enzim ile kompleks oluşturarak inhibisyonuna böylece aktivitesinin azalmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu araştırmadan elde edilen bulgulara göre, gerek bitki insektleri ile mücadelede, gerekse kedi ve köpeklerde pirelerin kontrolünde yaygın olarak kullanılan imidaclopridin hedefinde bulunmayan organizmalarda da oksidatif stresi ve yangıyı tetikleyerek akut sağlık problemlerine neden olabileceği gösterilmiştir.

5.2. Subkronik Dönem Tartışma

Günümüzde pestisit kullanımı tarım zararlıları ve insektlere karşı mücadelenin başlıca metodudur. Fakat çevrede ve bitkilerde kalıntı bırakan bu kimyasallar hedef-dışı oraganizmalarda geri dönüşümsüz zararlar verebilmektedir. Dünyada yıllık yaklaşık 2.5 milyon ton kullanılan pestisitlerin %99.9'u hedef pestlere ulaşmadan çevreyi kirletmektedir (Qian ve ark. 2009). Pestisitlerin omurgalılarda yaptığı olumsuz etkiler arasında oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, dopamin taşıyıcıları ile etkileşim ve yangı yer alır (Ascherio ve ark. 2006). Pestisitlere akut maruziyetlerde nörotoksik etkilerin bağlantısı iyi bilinmesine rağmen (Lotti 2000), kronik düzeyde maruziyetin potansiyel etkileri tam olarak tespit edilememiştir (Alavanja ve ark. 2004). İmidacloprid gibi neonikotinoid insektisitler yüksek etkinlikleri, memeli canlılar gibi hedef-dışı organizmalara karşı düşük toksisitesi ile organik klorlular ve organik fosforlular yerine tercih edilmektedirler. Ancak etkilerini nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinden göstermeleri memeliler için de toksik olabileceğini göstermektedir (Chao ve Casida 1997). Bu tez çalışmasının ilk bölümünde imidaclopridin akut etkileri çalışılmış ve imidaclopride kısa süreli maruziyetin pestisitlerin toksikasyon mekanizmaları içinde kabul edilen oksidatif stresi ve yangıyı tetiklediği gösterilmiştir. Tezin bu ikinci aşamasında ise imidaclopridin olası subkronik etkileri ratlarda merkezi sinir sistemi ve karaciğer üzerine oksidatif stres ve yangısal olaylar yönünden analiz edildi.

Nitrik oksit kardiyovasküler, nöronal ve immun sistem homeostazında kritik rollere sahip diatomik bir moleküldür. Bu önemli fizyolojik fonksiyonlarına rağmen NO'nin aynı zamanda toksik bir ajan olduğu da bilinmektedir (Grisham ve ark. 1999). Bu çalışmada 30 gün boyunca gavaj yoluyla imidacloprid verilen ratların beyin ve karaciğer dokularında NO konsantrasyonunun önemli ölçüde arttığı saptandı. NO üreten enzimlerin gerçek zamanlı (Real Time)-PCR metodu ile yapılan mRNA ekspresyon analizleri sonucunda beyinde iNOS, nNOS ve eNOS; karaciğerde ise iNOS ve eNOS mRNA transkripsiyonlarının uyarıldığı tespit edildi. Bashkatova ve ark. (2004) ratlarda rotenon ile yaptıkları 60 günlük çalışma sonucunda beyin dokusunda NO düzeyinin çalışmamıza paralel şekilde arttığını göstermişlerdir.

Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörlerinin Ca^{2+} geçirgenliği oldukça fazladır. Ayrıca, nöronal nAChR'lerinin aktivasyonu sonucu artan Ca^{2+} üretimi önemli hücre içi

sinyaller oluşturabilir (Vernino ve ark. 1992, Dajas-Bailador ve Wonnacott 2004). Rathouz ve ark. (1996), nikotinik agonistlerin nAChR'lere bağlanmasıyla voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarının aktive olduğunu ve bunun sonucunda hücre içi Ca^{2+} salgılanmasını arttığını bildirmişlerdir. Tsuneki ve ark. (2000) uzun süreli nikotine maruz kalan farelerin beyinlerinde nAChR'lerinin 7α üniteleri üzerinden aktivasyonu ile Ca^{2+} mobilizasyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Plazma örneklerinde yaptığımız analizler kalsiyum düzeyinin uzun süreli imidacloprid verilmesinin ardından arttığını gösterdi. Bu sonuç farklı pestisit çalışmaları ile de desteklenirken (Imamura ve ark. 2006, Pourkhalili ve ark. 2009), Tomizawa ve Casida (2002) imidaclopridin metabolitlerinden desnitro-imidacloprid ile yaptıkları araştırmasında, bu metabolitin nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinden inozitol -3-fosfat aracılı (IP_3) hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu ve ekstraselüler sinyal regüle-edici kinaz (ERK) yolağını aktive ettiğini bildirmişlerdir. Heeschen ve ark. (2002) aynı şekilde nöronal hücrelerde bu yolağın α - nAChR üzerinden aktive edilmesi sonucu Ca^{2+} bağımlı endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) aktivasyonuna neden olduğunu saptamışlardır. Ayrıca nAChR'lerinin uyarılmasının NO üretimini arttırdığı farklı araştırmalarla da gösterilmiştir (Clouse ve ark. 2000, Green ve ark. 2000).

Karaciğer pestisit metabolizmasının yer aldığı başlıca organdır. Organizmanın toksik kimyasallara karşı etkili biçimde mücadele etmesini sağlamaktadır. Ancak pestisitlerin insan ve hayvanlarda karaciğer hasarı oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca, DDT, lindan gibi çeşitli pestisitlere kronik maruziyetlerde karaciğerde patolojik ve enzimatik değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir (Dikshith 1991). Pestisitlerin toksik etkileri sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri birçok oksidatif olayı ve lipid peroksidasyonu tetikleyerek doku hasarlarına neden olur (Kanbur ve ark. 2008). Beyin, yüksek oranda metabolik aktiviteye, düşük antioksidan kapasiteye ve yenilenemeyen nöronal hücrelere sahip olduğundan, oksidatif hasara karşı en hassas dokudur (Shohami ve ark. 1997). Bunun yanı sıra, insan beyni yüksek düzeylerde doymamış yağ asidi, demir ve bakır içerdiğinden lipid peroksidasyonuna karşı da oldukça duyarlıdır (Qureshi ve ark. 2004). Ateşşahin ve ark. (2005) sipermetrin ile yaptıkları bir çalışmada bu insektisit karaciğer, beyin, böbrek ve kanda lipid peroksidasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Fortunato ve ark. (2006) malationun subkronik etkilerini incelemek amacıyla ratlardan serobrospinal sıvı ve beyin örnekleri olarak yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Ksantin oksidaz aktivitesinin diğer insektisit uygulamalarına

benzer şekilde (Sakai ve ark. 1995, Terzi ve ark. 2004, Domico ve ark. 2007) bu çalışmada da kronik imidacloprid maruziyeti sonucu artması, ortama yüksek oranda süperoksit anyonunun üretildiğine işarettir. Bu bakımdan, bu araştırmada 30 gün süresince imidacloprid uygulanan ratlarda lipid peroksidasyon indeks parametrelerinden MDA düzeyinin plazma, beyin ve karaciğer dokusunda artışı önemlidir. Artan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak, membran akışkanlığının ve lipid içeriğinin bozulup sitotoksositeye ve hücrel ölüme neden olabileceği muhtemeldir (Lopez ve ark. 2007).

Pestisit metabolizması sonucu oluşan zincirleme oksidatif reaksiyonların yan ürünleri, peroksizomların proliferasyonu ile birlikte H_2O_2 ve DNA hasarına neden olan diğer radikallerin üretilmesini tetikleyebilmektedir (Hodgson ve Levi 1996). Bu durum çalışmamızda H_2O_2 'i su ve oksijene dönüştüren katalaz (CAT) aktivitesinin artışını da açıklamaktadır. Ancak SOD ve GSH-Px gibi diğer hücre içi antioksidan enzim aktivitelerinde bir değişiklik bulunmadı. Uzun süreli pestisit maruziyetlerinde antioksidan savunma mekanizmasının etkilendiği bildirilse de (Thapar ve ark. 2002) antioksidan enzim aktiviteleriyle ilgili çalışma sonuçları oldukça değişkenlik göstermektedir. Bazı çalışmalar pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres ve serbest radikalleri kompanze etmek amacıyla aktivasyonun arttığını bildirirken (Bayoumi ve ark. 2001.; Kalender ve ark. 2004), bazı araştırmalar enzimlerin pestisit metabolizması sonucu oluşan oksidan moleküllerin enzimlere bağlanarak aktivitelerini inhibe ettiğini göstermektedir (Panemangalore ve ark. 2000, Kanbur ve ark. 2008). Glutatyon (GSH) kimyasal detoksikasyonda kritik öneme sahip bir tripeptittir. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Glutatyon (GSH) yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. İmidaclopridin akut etkilerinin çalışıldığı bu araştırmada, tüm dokularda GSH düzeyi azalış göstermesine rağmen subkronik imidacloprid maruziyeti sonucu GSH düzeyinin sadece beyinde azaldığı, karaciğerde ise değişmediği saptandı. Beyindeki bu azalışın nedeni pestisitlerin neden olduğu serbest oksijen radikallerinin ve yan ürünlerinin üretimi sonucu GSH konjugasyonu veya GSH'un glutatyon disülfide (GSSG) oksitlenmesi olabilir (Banerjee ve ark. 1999). Della Morte ve ark. (1994) 7 farklı insektisitle (Alaklor, Atrazin, Benomil, Captan, Linuron, Metil Paration ve Propanil) yaptıkları çalışmada, insektisitlere maruziyet sonucu

doğal antioksidan savunmanın değişikliğe uğradığını, özellikle GSH düzeyinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Pestisitler, içerdiği bileşiğe ve dozuna göre immun sistem üzerine baskılayıcı ya da uyarıcı etkiye sahiptir. Uyarıcı etkileri otoimmün ve alerjik hastalıkların gelişmesine neden olabilmektedir (Ascherio ve ark. 2006). Myeloperoksidaz enzimi primer nötrofillerin granüllerinde yer alan bakterisidal özelliğe sahip hipokloritin (OCI) katalizlenmesinden sorumlu oksidan bir enzimdir (Tokarska-Rodak ve ark. 2004). Artan serbest radikallerin lökositlerin birikmesine ve dolaylı yoldan nötrofil aktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bir organik klorlu insektisit olan endosülfanın kronik maruziyetinde nötrofil aktivasyonu sonucu MPO aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Mor ve Özmen 2010). Gabbianelli ve ark. (2009) ratlarda permetrinin subkronik etkilerini incelediği çalışmasında süperoksit anyonunun 33 misli, hidrojen peroksit-myeloperoksidaz sisteminin aktivasyonunun ise 67 misli arttığını; bunun nedeninin nötrofillerin plazma membran düzeyindeki fizikokimyasal değişiklikler olabileceğini ileri sürmüştür. Buna dayanılarak uzun süre imidaclopride maruz kalan ratlarda karaciğer MPO aktivitesinin artmasının oksidatif süreçlerin yoğunluğunu ve yangının varlığını gösteren bir kanıt olabileceği düşünülebilir. Buna paralel şekilde bu çalışmada sitokinlerin yapılan mRNA transkripsiyon analizlerine göre; beyinde TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IFN- γ mRNA transkripsiyonları artarken, IL-12 ekspresyonu baskılandı. Karaciğerde ise TNF- α , IL-1 β , IL-12 ve IFN- γ mRNA transkripsiyonları indüklenirken, IL-6 ekspresyonunun inhibe edildiği görüldü. TNF- α yardımcı T-1 hücrelerinden, makrofajlardan ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde üretilir. IFN- γ 'nın ise ana kaynağı yardımcı T-1 hücreleri olmasına rağmen ayrıca CD8⁺ T hücreleri, NK hücreleri ve IL-18 tarafından uyarılan düz kas hücreleri de IFN- γ üretebilir (Gerdes ve ark. 2002, Tenger ve ark. 2005). IFN- γ ve TNF- α sinerjik etkili sitokinlerdir. Bunun nedeni uyardıkları sinyal yollarının etkileşimi ve IFN- γ 'nın, TNF- α reseptörlerinin yüzey ekspresyonlarını arttırması olabilir (Schoder ve ark. 2004). Ömürtag ve ark. (2008) endosülfanın subkronik maruziyeti sonucu oksidatif stresle bağlantılı olarak artan yangı öncülü sitokin ekspresyonuna (TNF- α ve IFN- γ) bağlı olarak hepatotoksisite meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bir organik klorlu olan dieldrinin 7 gün subkutan uygulanmasının (10 mg/kg/gün) IL-6 üretimini ve c-JUN aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Pruett ve ark. 2006). Alluwaimi ve Hussain (2007) splenositlerde bir organik fosforlu insektisit olan diazinonun 30 günlük uygulamasının ardından IFN- γ ve IL-12

mRNA sentezlerinin uyarıldığını tespit etmişlerdir. Makrofajlarda DDT metaboliti ile yapılan çalışmalarda ROS üretiminin ve oksidatif stresin bu metabolit tarafından tetiklenerek NF- κ B yolunun aktivasyonunu sağlayıp (Kim ve ark. 2004; Shi ve ark. 2009). Makrofajlardaki iNOS ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde kısmen NF- κ B tarafından düzenlendiği ve NADPH'a benzer şekilde, IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β gibi yangı öncülü sitokinler tarafından uyarıldığı bilinmektedir (Ustyugova ve ark. 2007). Nitrik oksit ve yangı öncülü sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6) üretimini uyardığını ayrıca gen ekspresyon düzeylerini up regüle ettiğini bildirmişlerdir (Kim ve ark. 2004). Dutta ve ark. (2008) DDT toksikasyonuna maruz kalan makrofajlarda NO ve TNF- α üretiminin arttığını böylece yangısal reaksiyonların, sitokin dengesizliği ve immun dis-regülasyonunun oluştuğunu bildirmişlerdir. Bir organik klorlu olan lindanın rat karaciğerinde oksidatif strese neden olarak NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini ve TNF- α 'nın NF- κ B bağımlı ekspresyonunu arttırdığını, böylece hepatotoksisite oluşturduğunu tespit etmişlerdir (Videla ve ark. 2004). Bu bilgilerle birlikte subkronik imidacloprid çalışmasında beyin ve karaciğerde NO artışı, yangı öncülü sitokinlerin ekspresyonlarının stimüle edilmesi ve yangı önleyici sitokin olan ayrıca diğer sitokinlerin salgılanmasını inhibe edip immun sistemi baskılayan IL-10 ekspresyonunun uyarılmaması imidaclopridin yangının kronikleşme aşamasında, diğer insektisitlere benzer biçimde, NF- κ B yolağı üzerine etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.

İmidaclopridin karaciğer fonksiyonları üzerine vereceği muhtemel hasar ALT, AST ve LDH aktiviteleri analiziyle tespit edilmeye çalışıldı. Buna göre, uzun süreli imidaclopride maruziyetin akut maruziyete benzer biçimde etkilediği ve sadece AST ve LDH aktivitelerinin önemli düzeyde inhibe ettiği saptandı. Bir araştırmada, ratlarda 13 hafta süreyle verilen klorpirifosun ALT ve AST düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Barnalloyd ve ark. 1990). Buna paralel şekilde Ambalı ve ark. (2007), klorpirifosa uzun süreli maruziyetin bu enzimlerin aktivitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Ribeiro ve ark. (1999) kimyasalların topraktaki canlılara toksisitesini değerlendirebilmek için paration ile yaptıkları çalışmada bu insektisit LDH ve asetilkolinesteraz aktivitelerini azalttığını ve bu parametrelerin toksisite testlerinde kriter olabileceklerini saptamışlardır.

Bu araştırmadan elde edilen bulgulara göre, diğer insektisitlerle karşılaştırıldığında daha güvenilir olduğu savunulan, bu sebeple dünyada oldukça yaygın biçimde kullanılan imidaclopridin kronik düzeyde hedef olmayan organizmalarda da oksidatif strese neden

olup kronik yangıyı tetikleyebileceği ve ciddi sağlık problemlerine neden olabileceği deneysel ortamda ortaya konmuştur.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, başta insanlar olmak üzere imidacloprid kullanımının diğer memeli canlı sağlığı üzerine yapabileceği olumsuz etkiler bu çalışmada rat modeli ile araştırıldı. Buna göre, hayvanların imidaclopride gerek düşük dozda kısa süreli, gerekse uzun süreli maruz kalmaları oksidan olaylara neden olduğu, buna bağlı olarak yangısal olayların aktive olduğu ve karaciğer fonksiyonlarından bazılarının da inhibe edildiği bu araştırma sonuçlarına göre tespit edildi. Kullanımının insan ve diğer yüksek yapılı canlılara karşı güvenilir olduğu iddia edilen imidaclopridin diğer etkileri yapılacak kapsamlı araştırmalar ile ortaya konması faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Abbas AK, Lichtman AH.** Cellular & Molecular Immunology, Saunders, UK, **2005**.
2. **Abou-Donia MB, Goldstein LB, Bulman S, Tu T, Khan WA, Dechkovskaia AM, Abdel-Rahman AA.** Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *J. Toxicol Environ Health*, **2008**, s. 71:119–130.
3. **Alavanja MCR, Hoppin JA, Kamel F.** Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annual Review of Public Health*, **2004**, 25: 155-197.
4. **Alluwaimi AM, Hussein Y.** Diazinon immunotoxicity in mice: Modulation of cytokines level and their gene expression. *Toxicology*, **2007**, s. 236(1-2): 123-131.
5. **Ambali S, Akanbi D, Igbokwe N, Shittu M, Kawu M, Ayo J.** Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C. *The Journal of Toxicological Sciences*, **2007**, 32(2): s. 111-120.
6. **Anderson ME, Luo JL.** Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis*, **1998**, s.18:415–424.
7. **Andrews PC, Krinski NI.** Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. *Anal Biochem*, **1982**, s. 127: 346-350.
8. **Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA, Thun MJ.** Pesticide Exposure and Risk for Parkinson's Disease. *Ann Neurol*, **2006**, s. 60:197–203
9. **Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan I, Pirinci I.** The effects of vitamin E and selenium on cypermethrin induced oxidative stress in rats. *Turk J Vet Anim Sci*, **2005**, s. 29: 385-391.
10. **Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ.** In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, **1995**, s. 104(1-3): 129-140.
11. **Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS.** Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*, **2001**, s. 16(1):1-40.
12. **Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK.** Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett*, **1999**, s. 107:33-47.
13. **Barna-Lloyd T, Szabo JR, Davis NL.** Chlorpyrifos-methyl rat subchronic dietary toxicity and recovery study. Un published report TXT: K-046193-0,31 from Dow chemical, Texas, USA. Submitted to WHO by Dow Elenco, **1990**, Indianapolis, USA.
14. **Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ.** Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Experimental Neurology*, **2004**, s. 186(2): 235-241.
15. **Bayoumi AE, Garcia-Fernandez AJ, Ordonez C, Perez-Pertejo Y, Cubria JC, Reguera RM, Balana-Fouce R, Ordonez D.** Cyclodiene organochlorine insecticide induced alterations in the sulfur-redox cycle in CHO-K1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **2001**, 130:315-323.
16. **Beach TM, Whalen MM.** Effects of organochlorine pesticides on interleukin secretion from lymphocytes, *Hum. Exp. Toxicol*, **2006**, 25:651–659.
17. **Blanck J, Ristau O, Zhukov AA, Archakov AI, Rein H, Ruckpaul K.** Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. *Xenobiotica*, 1991, s.21(1): 121-135.
18. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**, s. 72: 248–254.
19. **Bredt DS, Snyder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin- requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1990**, s. 87 :682–685.
20. **Brovwer EJ, Evelo CT, Verplanke AJ, van Welie RT, de Wolf FA.** Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3 dichloropropene: effects on liver and renal function and on glutathione conjugation. *Br J Ind. Med*, **1991**, 48 (3): s 167-172.
21. **Bus JS, Aust SD, Gibson JE.** Paraquat toxicity: proposed mechanism of action involving lipid peroxidation, *Environ. Health Perspect*, **1976**, s. 16:139–146.
22. **Campbell A.** Inflammation, Neurodegenerative Diseases, and Environmental Exposures. *Ann NY Acad Sci*, **2004**, s. 1035: 117–132.

23. **Casida JE, Quistad GB.** Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *J Pestic Sci*, **2004**, s. 29, 81–86.
24. **Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK.** Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. *Mutat Res*, **1999**, 439: 63-67.
25. **Chao SL, Casida JE.** Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of Mouse brain in relation to toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **1997**, s. 58:77-88. **Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK.** Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. *Mutat. Res*, **1999**, s. 439: 63-67.
27. **Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P.** Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, **2005**, s. 39(1): 841-852.
28. **Choi J, Hoffman LA, Rodway GW, Sethi JM.** Markers of lung disease in exhaled breath: nitric oxide, *Biol Res Nurs*, **2006**, 7:241–255.
29. **Clouse WD, Yamaguchi H, Phillips MR, Hurt RD, Fitzpatrick LA, Moyer TP, Rowland C, Schaff HV, Miller VM.** Effects of transdermal nicotine treatment on structure and function of coronary artery bypass grafts. *J. Appl. Physiol*, **2000**, s.89:1213–1223.
30. **Coleman JW.** Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, **2001**, s. 1(8): 1397-1406.
31. **Cortas NK, Wakid NW.** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, **1990**, s. 36(8 Pt 1):1440-3.
32. **Costa C, Silvari V, Melchini A, Catania S, Heffron JJ, Trovato A, De Pasquale R.** Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **2009**, s. 672(1): 40-44.
33. **Dajas-Bailador F, Wonnacott S.** Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2004**, s. 25(6):317-324.
34. **D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VBC, Tufik S.** Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neuroscience Letters*, **1997**, s. 235(1-2): 25-28.
35. **David D, George IA, Peter JV.** Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clin. Toxicol*, **2007**, s. 454:85–486.
36. **de Groot H.** Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology*, **1994**, s. 41:328-332.
37. **Debnath D, Mandal TK.** Study of Quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (ekalux 25E.C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague–Dawley Albino rats. *J.Appl. Toxicol*, **2000**, 20:197–204.
38. **Della Morte R, Villani GR, Di Martino E, Squillacioti C, De Marco L, Vuotto P, Belisario MA, Staiano N.** Glutathione depletion induced in rat liver fractions by seven pesticides. *Boll Soc Ital Biol Sper*, **1994**, 70(8-9):185-92.
39. **Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I.** Roitt's Essential Immunology, 11th Ed. Wiley-Blackwell, USA, **2006**.
40. **Deng MC, Erren M, Kammerling L, Gunther F, Kerber S, Fahrenkamp A, Assman G, Breýthardt G, Scheld HH.** The relation of interleukin-6, Tumor Necrosis Factor - α , IL - 2 and IL -2 receptor levels to cellular rejection, allograft dysfunction and clinical events early after cardiac transplantation. *Transplantation*, **1995**, 60 :1118-1124.
41. **Dikshith TSS.** Toxicology of pesticides in animals. CRC Press Boca Raton, Boston, **1991**.
42. **Dinarello CA.** Interleukin-1, *Cytokine Growth Factor Rev*, **1997**, 8: 253–265.
43. **Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD.** Reactive oxygen species generation by the ethylene bis-dithiocarbamate (ebdc) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, **2007**, s. 28(6): 1079–1091.
44. **Dowla HA, Panemangalore M, Byers ME.** Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agrochemicals. *Arch Environ Contam Toxicol*, **1996**, 31:107-114.
45. **Dutta R, Mondal AM, Arora V, Nag TC, Das N.** Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1-trichloroethane) on complement system and macrophages. *Toxicology*, **2008**, s. 252(1-3): 78-85.
46. **Duzguner V, Erdogan S.** Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2009**, Basımda.

47. **Ebadi M, Sharma SK.** Peroxynitrite and Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2003**, s. 5(3): 319-335.
48. **Eder KJ.** Effects of sublethal pesticide concentrations on juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): subcellular changes and alterations of immune-regulatory gene expression, Ph.D. Thesis, University of Tübingen, Tübingen, Germany, **2006**.
49. **Elbert A, Erdelen C, Kuhnhold J, Nauen R, Schmit HW.** Proc. Brighton Crop Protection Conf. Pests and Diseases, Brighton, UK, **2000**, p. 21.
50. **el-Demerdash FM, Yousef MI, Al-Salhen KS.** Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits. *J Environ Sci Health B*, **2003**, 38(3): s. 365-78.
51. **Elenkov IJ, Chrousos GP.** Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2002**, s. 966: 290–303.
52. **El-Khatib EH, Abdel-Aziz M, Badr Y, Kamal N.** *In-vivo* genotoxicity of the synthetic pyrethroid pesticide "cypermethrin" in rat liver cells by comet assay. *Arab J. Biotech.*, **2005**, 8(1): 67-82.
53. **El-Tawil OS, Abdel-Rahman MS.** The role of enzyme induction and inhibition on cypermethrin hepatotoxicity. *Pharmacol. Res.*, **2001**, s. 44: 33–40.
54. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Are Oxidative Stress –Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Diabetes*, **2003**, s. 52, 1-8.
55. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor: Ann Review of Immunology 1993 , 11:571-611.
56. **Federal Register.** Imidacloprid. *Pesticide Tolerances*, **1995**, 60(128):34943-24945.
57. **Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY.** Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **2005**, s. 61(2):239-46
58. **Finaud J, Lac G, Filaire E.** Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*, **2006**, s. 35 (4): 327-358.
59. **Fortunato JJ, Agostinho FR, Réus GZ, Petronilho FC, Pizzol FD, Quevedo J.** Lipid Peroxidative Damage on Malathion Exposure in Rats. *Neurotoxicity Research*, **2006**, s. 9(1): 23-28
60. **Fridovich I.** Superoxide Anion Radical, Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, s. 272(30): 18515–18517.
61. **Gabbianelli R, Falcioni ML, Nasuti C, Cantalamessa F, Imada I, Inoue M.** Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol Interact*, **2009**, s. 182(2-3):245-52.
62. **Gahring LC, Rogers SW.** Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Function on Nonneuronal Cells. *The AAPS Journal*, **2006**, s. 7 (4): 885-894.
63. **Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B.** Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **2003**, s. 23:1228 –1236.
64. **Georgi S.** Nicotinic Acetylcholine Receptors and Alzheimer's Disease Therapeutics: A Review of Current Literature. *The Journal of Young Investigators*, **2005**, 12(2):154-157.
65. **Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U.** Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med*, **2002**, s. 195: 245–570.
66. **Giles NM, Giles GI, Holley JE, Gutowski NJ, Jacob C.** Targeting Oxidative Stress- Related Diseases: Organochalcogen Catalysts as Redox Sensitizers. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, s. 66:2021-2028.
67. **Giray B, Gurbay A, Hincal F.** Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.*, **2001**, s.118:139–146
68. **Goldsby RA, Kindt, TJ, Osborne BA, Kuby J.** Immunology 5th Ed., W.H. Freeman Co, UK, **2002**.
69. **Green JT, Richardson C, Marshall RW, Rhodes J, Mckirdy HC, Thomas GAO, Williams GT.** Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, **2000**, s. 14:1429–1434.
70. **Grisham MB, Jour'd'Heuil D, Wink DA.** Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **1999**, s. 276:G315-G321.

71. **Gubler DJ.** Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*, **1998**, s. 4:442–450.
72. **Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC.** Osteopontin Is a Negative Feedback Regulator of Nitric Oxide Synthesis in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology*, **2001**, s. 166: 1079-1086.
73. **Güler Ç, Çobanoğlu Z.** Vektör, Kemirici ve Başıboş Hayvanların Kontrolü, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No. 31, TC Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara, **1994**.
74. **Haberberger RV, Henrich M, Lips KS, Kummer W.** Nicotinic receptor alpha7- subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem. Cell Biol*, **2003**, 120:173–181.
75. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, **1991**, s. 91(3): S14-S22.
76. **Halliwell B.** Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, **1999**, s. 31(4): 261-272.
77. **Han EH, Hwang YP, Kim HG, Jeong HG.** Inflammatory effect of endosulfan via NF- κ B activation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **2007**, s. 355860–886.
78. **Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK.** Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, **2003**, s. 185:1-8.
79. **Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP.** A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Clin. Invest*, **2002**, s. 110:527–536.
80. **Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes J.M, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Twardy DJ.** Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med*, **1998**, s. 187: 917–928.
81. **Hodgson E, Levi PE.** Pesticides: An Important but Underused Model for the Environmental Health Sciences. *Environ Health Perspect*, **1996**, s. 104(Suppl 1):97-106.
82. **Huang MF, Lin WL, Ma YC.** A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette *Indoor Air*, **2005**, s. 15: 135–140.
83. **Ihara M, Brown LA, Ishida C, Okuda H, Sattelle DB, Matsuda K.** Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *J. Pestic. Sci.*, **2006**, 31(1):35–40.
84. **Imamura L, Yasuda M, Kuramitsu K, Hara D, Tabuchi A, Tsuda M.** Deltamethrin, a Pyrethroid Insecticide, Is a Potent Inducer for the Activity-Dependent Gene Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurons. *JPET*, **2006**, s. 316:136–143.
85. **Izushi F, Ogata M.** Hepatic and muscle injuries in mice treated with heptachlor *Toxicol Lett*, **1990**, 54 (1): s. 47-54.
86. **Jepson JEC, Brown LA, Sattelle DB.** The actions of the neonicotinoid imidacloprid on cholinergic neurons of *Drosophila melanogaster*. *Invert. Neurosci*, **2006**, 6:33–40.
87. **John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D.** Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*, **2001**, s. 12:500-504.
88. **Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, Tzartos SJ.** Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity. *FEBS Journal*, **2007**, s. 274:3799–3845.
89. **Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D.** Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species, *Toxicol. Lett*, **1999**, 105:197–205.
90. **Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F.** Endosulphan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, **2004**, s. 202:227-235.
91. **Kalpana C, Menon VP.** Inhibition of nicotine-induced toxicity by curcumin and curcumin analog: a comparative study. *J. Med. Food*, **2004**, s. 7:467–471.
92. **Kalpana C, Sudheer AR, Rajasekharan KN, Menon VP.** Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity, *Singapore Med, J.* **2007**, s. 48 (2):124–130.
93. **Kalra J, Mantha SV, Prasad K.** Oxygen free radicals: key factors in clinical diseases, *Lab Med Int*, **1994**,13–19.

94. **Kanbur M, Liman BC, Eraslan G, Altinordulu Ş.** Effects of cypermethrin, propetamphos, and combination involving cypermethrin and propetamphos on lipid peroxidation in mice. *Environmental Toxicology*, **2008**, s. 23(4):473 – 479.
95. **Karabay NU, Oguz MG.** Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet Mol Res*, **2005**, s. 4(4):653-662.
96. **Kidd, H, James D.** *Agrochemicals Handbook*. 3rd Ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, **1994**.
97. **Kim JY, Choi CY, Lee KJ, Shin DW, Jung KS, Chung YC, Lee SS, Shin JG, Jeong HG.** Induction of inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression by *o,p'*-DDT in macrophages. *Toxicology Letters*, **2004**, 147(3): 261-269
98. **Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS.** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **1994**, s. 372: 546–548.
99. **Koren H, Bisesi M.** *Handbook of Environmental Health and Safety*, Lewis Publishers, Florida, **1996**.
100. **Kovacic P, Cooksy A.** Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer. *Medical Hypotheses*, **2005**, 64(1): 104-111.
101. **Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS.** Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*, **2002**, s. 962:318–331.
102. **Lodovici M, Casalini C, Briani C, Dolara P.** Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology*, **1997**, s.117(1): 55-60.
103. **López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parrón T, Villanueva E, Pla A.** Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides.
104. **Loscalzo, J., and G. Welch.** Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38: 87–104.
105. **Lotti M.** *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. 2nd Ed. Oxford University Press, New York, **2000**, pp. 911–918.
106. **Luck H.** *Catalase*. In: *Methods in Enzyme Analysis*. Bergmeyer, H.U. eds. Verlag-Chemic. Weinheim/Bergstrasse, Germany, **1965**.
107. **Machida H, Kondo T, Kanehira K, Hagimori I, Kamio T.** The inhibitory effect of a combination of imidacloprid and permethrin on blood feeding by mosquitoes in dogs raised under outdoor conditions. *Veterinary Parasitology*, **2008**, s. 154(3-4): 318-324.
108. **Maeda H, Akaike T.** Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer *Biochemistry*, **1998**, s. 63(7):854-865.
109. **Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB.** Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2005**, 69: 1442–1452.
110. **Meister R.T.** *Farm Chemicals Handbook '95*. Meister Publishing Company, Willoughby, **1995**.
111. **Mense SM, Sengupta A, Lan C, Zhou M, Bentsman G, Volsky DJ, Whyatt RM, Perera FP, Zhang L.** The Common Insecticides Cyfluthrin and Chlorpyrifos Alter the Expression of a Subset of Genes with Diverse Functions in Primary Human Astrocytes. *Toxicological Sciences*, **2006**, s. 93(1):125–135.
112. **Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY.** Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem*, **2009**, s. 34:55-65.
113. **Mishra R, Shukla SP.** Impact of Endosulfan on Lactate Dehydrogenase from the Freshwater Catfish *Clarias batrachus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **1997**, 57(3): s. 220-234.
114. **Mor F, Ozmen O.** Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2010**, 96(2): 108-112.
115. **Morgan. DB.** *Pesticides, Chemicals and Health*, The BMA Guide, British Medical Association, Eshvard Arnold, A division of Hodder & Soughton, London, **1992**.
116. **Moses M.** *Pesticides*, In: *Last Public Health and Preaventive Medicine*. 13th Ed. Prentice Hall Co., NewYork, **1992**.
117. **Muthukumaran S, Sudheer AR, Menon VP, Nalini N.** Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats, *Toxicology*, **2008**, s. 243:207–215.
118. **Nagata K, Aistrup GL, Song JH, Narahashi T.** Subconductance-state currents generated by imidacloprid at the nicotinic acetylcholine receptor in PC 12 cells, *Neuroreport*, **1996**, 7:1025.

119. **Nathan, C.** Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest*, **1997**, 100: 2417–2423.
120. **OECD.** Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. (Guideline 408), **1998**.
121. **Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE.** Depletion of Total Antioksidan Status Capacity in Type II Diabetes. *Metabolism*, **1999**, s.48(11), 1414-1417.
122. **Oppenheim J.J, Neta R.** Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity and inflammation. *FASEB J*, **1994**, s.8:158-162.
123. **Oruç EO, Üner N.** Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **2000**, s. 127(3): 291-296.
124. **Ömürtag GZ, Tozan A Şehirli AÖ, Şener G.** Melatonin protects against endosulfan induced oxidative tissues damage. *J Pineal Res*, **2008**, s. 44:432-438.
125. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the Quantitive and Qualitative Characterization of Erythrocyte GPx. *Journal of Laboratuary Clinical Medicine*, **1967**, s. 70(1), 158-169.
126. **Panemangalore M, Bebe FN.** Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant enzymes in tissues of rats. *J Environ Sci Health B*, **2000**, 35(4):399-416.
127. **Parke DV, Piotrowski JK.** Glutathione: its role in detoxication of reactive oxygen species and environmental chemicals. *Toxicology*, **1996**, s. 4 (1):1–13.
128. **Parke DV.** *Nutritional Antioxidants and Disease Prevention; Mechanism of Action*. In: Antioxidants in Human Health and Disease. CABI Publishing, UK, **1999**.
129. **Parkinson A.** Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons, sixth ed. McGraw-Hill, , s. 133–224, New York, **2001**.
130. **Patockova J, Marhol P, Tüмова E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkovska J, Andel M.** Oxidative Stress in the Brain Tissue of Laboratory Mice with Acute Post Insulin Hypoglycemia. *Physiological Research*, **2003**, s. 52:131-135.
131. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. **2001**, 29(9):e45.
132. **Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, Dal-Pizzol F.** Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2007**, s. 23(2):198-204.
133. **Pourkhalilii N, Pournourmohammadi S, Rahimi F, Vosough-Ghanbari S, Seyed MB.** Comparative effects of calcium channel blockers, autonomic nervous system blockers, and free radical scavengers on diazinon-induced hyposecretion of insulin from isolated islets of langerhans in rats. *Arh Hig Rada Toksikol*, **2009**, s. 60:157-164
134. **Prajda N, Webwr G.** Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett*, **1975**, s. 59:245-249.
135. **Prasad K, Karla J, Chan P ve Chaudhary AK.** Effect of Oxygen Free Radicals on Cardiovascular Function at Organ and Cellular Levels. *American Heart Journal*, **1989**, 117:1196-1202.
136. **Proenca P, Teixeira H, Castanheira F, Pinheiro J, Monsanto PV, Marques EP, Viera DN.** Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. *Forensic Sci. Int*, **2005**, s. 153:75–80.
137. **Pruett SB, Fan R, Oppenheimer S.** Greater Than Additive Suppression of TLR3-Induced IL-6 Responses by Administration of Dieldrin and Atrazine. *Journal of Immunotoxicology*, **2006**, 3(4): 253-262
138. **Qian H, Chen W, Sun L, Jin Y, Liu W, Fu Z.** Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the responseto oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, **2009**, s. 18:537–543
139. **Qureshi GA, Baig S, Sarwar M, Parvez SH.** Neurotoxicity, oxidative stress and cerebrovascular disorders. *NeuroToxicology*, **2004**, s. 25, 121-138.
140. **Rathouz MM, Vijayaraghavan S, Berg DK.** Elevation of Intracellular Calcium Levels in Neurons by Nicotinic Acetylcholine Receptors . *Molecular Neurobiology*, **1996**, 12(2):117-131.
141. **Ray DE, Fry JR.** A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, **2006**, s. 111(1): 174-193.
142. **Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N.** Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: effect on superoxide dismutase and catalase activities using native, PAGE. *C. R. Biol*. **2008**, s. 331(9):655–662.

143. **Ribeiro S, Guilhermino L, Sousa JP, Soares AMVM.** Novel Bioassay Based on Acetylcholinesterase and Lactate Dehydrogenase Activities to Evaluate the Toxicity of Chemicals to Soil Isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1999**, 44(3): s. 287-293.
144. **Rodgers K, St. Amand K, Xiong S.** Effects of Malathion on Humoral Immunity and Macrophage Function in Mast Cell-Deficient Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, **1996**, s. 31:252-258.
145. **Sakai M, Yamagami K, Kitazawa Y, Takeyama N, Tanaka T.** Xanthine oxidase mediates paraquat-induced toxicity on cultured endothelial cells. *Pharmacol Toxicol*, **1995**, s. 77:36-40.
146. **Sattelle DB, Breer H.** Cholinergic nerve terminals in the central nervous system of insects: molecular aspects of structure, function and regulation. *J Neuroendocrinol*, **1990**, s. 2:241-156.
147. **Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA.** Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol*, **2004**, s. 75:163-189.
148. **Schulz-Jander DA, Casida JE.** Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters*, **2002**, s. 132: 65-70
149. **Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, **1968**, s. 25(1):192-205.
150. **Seroby N, Jagannathan S, Orlovskaya I, Schraufstatter I, Skok M, Loring J, Khaldoyanidi S.** The cholinergic system is involved in regulation of the development of the hematopoietic system, *Life Sci*, **2007**, s. 80:2352-2360.
151. **Shadnia S, Moghaddam HH.** Fatal intoxication with imidacloprid insecticide, *Am. J. Emerg. Med*, **2008**, s. 26 (5): 634. e1-e4.
152. **Shafer TJ, Rijal SO, Gross GW.** Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *NeuroToxicology*, **2008**, s. 29(2): 203-212.
153. **Sharma AK, Rohrer B.** Sustained elevation of intracellular cGMP causes oxidative stress triggering calpain-mediated apoptosis in photoreceptor degeneration. *Curr. Eye Res*, **2007**, 32 (3):259-269.
154. **Shi Y, Song Y, Wang Y, Liang X, Hu Y, Guan X, Cheng J, Yang K.** p,p'-DDE Induces Apoptosis of Rat Sertoli Cells via a FasL-Dependent Pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**, s.1-11.
155. **Shimomura M, Yokota M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K.** Role in the Selectivity of Neonicotinoids of Insect-Specific Basic Residues in Loop D of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site. *Mol Pharmacol*, **2006**, s. 70:1255-1263.
156. **Shimomura-Shimizu M, Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K.** Alachlor and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- κ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**, s. 332(3): 793-799.
157. **Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M.** Oxidative stress in closed-head injury. *J. Cereb Blood Flow Metab*, **1997**, s. 17:1007- 1019.
158. **Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **1997**, s. 82(2): 291-295.
159. **Simpson WM, Schuman SH.** Recognition and management of acute pesticide poisoning. *Am Fam Physician*, **2002**, s. 65:1599-1604.
160. **Singh M, Sandhir R, Kiran R.** Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. *Indian J Exp Biol*, **2006**, s. 44:580-583.
161. **Sun Y, Oberley LW, Ying LA.** Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, **1988**, 34: 497-500.
162. **Temple MD, Perrone GG, Dawes IW.** Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, **2005**, 15 (6): 319-326
163. **Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X.** IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN- γ and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2005**, s. 25: 655-7.
164. **Terzi A, Iraz M, Şahin Ş, İlhan A, İdiz N, Fadilloğlu E.** Protective effects of erdoosteine on rotenone-induced oxidant injury in liver tissue. *Toxicology and Industrial Health*, **2004**, 20(6-10):141-147.
165. **Thapar A, Sandhir R, Kiran R.** Acephate induced oxidative stress in erythrocytes. *Indian J Exp Biol*, **2002**, 40:963-996.

166. Tokarska – Rodak M, Tos-Luty S, Haratym-Maj A. Selected parameters of immunological response in hop growers during the period of intensive application of pesticides. *Ann Agric Environ Med*, **2004**, s. 11:227–231.
167. Tomizawa M, Casida JE. Desnitro-imidacloprid Activates the Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade via the Nicotinic Receptor and Intracellular Calcium Mobilization in N1E-115 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2002**, 184(3): 180-186.
168. Tomizawa M, Casida JE. Imidacloprid, Thiachloprid, and Their Imine Derivatives Up- regulate the $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in M10 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **2000**, s. 169:114–120.
169. Tomizawa M, Talley TT, Maltby D, Durkinš KA, Medzihradzky KF, Burlingame AL, Taylor P, Casida JE. Mapping the elusive neonicotinoid binding site. *PNAS*, **2007**, s. 104 (21): 9075–9080
170. Tomizawa M. Neonicotinoids and Derivatives: Effects in Mammalian Cells and Mice. *J Pestic Sci*, **2004**, s. 29(3):177–183.
171. *Toxicology Letters*, **2007**, s. 171(3): 146-153.
172. Toykuni S. Reactive oxygen species induced molecular damage and its implication in pathology. *Pathol Int*, **1999**, 49: 19-102.
173. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nature Reviews Immunology*, **2009**, s. 9: 418–428.
174. Tsuneki H, Klink R, Le´na C, Korn H, Changeux JP. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci*, **2000**, s. 12:2475–2485.
175. Türk Gıda Kodeksi – Gıdalarada Maksimum Bitki Koruma Ürünleri Kalıntı Limitleri Tebliği (Tebliğ No:2004/42) Resmi Gazete, **2005**, s. 25697: 1-299.
176. Ustyugova IV, Frost LL, VanDyke K, Brundage KM, Schafer R, Barnett JB. 3,4-Dichloropropionaniline Suppresses Normal Macrophage Function. *Toxicological Sciences*, **2007**, s. 97(2): 364–374.
177. Vasalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Review of Immunology*, **1992**, s. 10:411-452.
178. Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron*, **1992**, s. 8(1):127-34 Videla LA, Tapia G, Varela P, Cornejo P, Guerrero J, Israel Y, Fernández V. Effects of Acute γ -Hexachlorocyclohexane Intoxication in Relation to the Redox Regulation of Nuclear Factor- κ B, Cytokine Gene Expression, and Liver Injury in the Rat. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2004**, 6(2): 471-480.
180. Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J Pharmacol*, **2004**, s. 36:76-9.
181. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, **2004**, s. 25(4):612–628.
182. Wang Y, Wang L, Ai X, Zhao J, Hao X, Lu Y, Qiao Z. Nicotine could augment adhesion molecule expression in human endothelial cells through macrophages secreting TNF- α , IL-1 β . *Int. Immunopharmacol*, **2004**, s. 4:1675– 1686.
183. Weiss B, Amler S, Amler RW. Pesticides. *Pediatrics*, **2004**, s 113:1030 –1036.
184. Wink DA, Cook JA, Kim S, Vodovotz Y, Pacelli R, Kirshna MC, Russo A, Mitchell JB, Jourd’heuil D, Miles AM, Grisham MB. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272: 11147–11151. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **1998**, s. 25(4-5): 434-456
186. Wink, D. A., and J. B. Mitchell. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med*, **1998**, s. 25: 434–456.
187. Winterbourn CC. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol Med*, **1993**, 14:85–92.
188. Wu IW, Lin JL, Cheng ET. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in N-methyl pyrrolidone. *J Toxicol Clin Toxicol*, **2001**, s. 39:617–621.
189. Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, Shimada T. Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch. Toxicol*, **1999**, s. 7: 65–70.

190. **Yıldız D, Ercal N, Armstrong DW.** Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology*, **1998**, s. 130:155–165.
191. **Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M.** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygens toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1979**, 135:372–376.
192. **Yu BP.** Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol. Rev.* 1995, 74(1): 139-162.
193. **Yue B, Wilde GE, Arthur F.** Evaluation of Thiamethoxam and Imidacloprid as Seed Treatments to Control European Corn Borer and Indianmeal Moth (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *J. Econ. Entomol.*, **2003**, s. 96(2): 503-509.
194. **Zafeiridou G, Theophilidis G.** The action of the insecticide imidacloprid on the respiratory rhythm of an insect: the beetle *Tenebrio molitor*. *Neuroscience Letters*, **2004**, s. 365 : 205–209
195. **Zayas RM, Qazi S, Morton DB, Trimmer BA.** Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons, *J. Neurochem*, **2002**, s. 83 (2):421–431.
196. **Zima T, Crkovska J, Merta M, , Stipek S, Nemecek K, Tesar V.** Activity of the Antioxidant Enzymes, Glutathione Peroxidase, on Autosomal Dominant polycystic kidney disease patient. *Biochemical Molecular Biology International*, **1995**, s. 35(4): 699-704.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Antakya'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 1998 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılı Şubat ayında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans programını 2006 yılı aralık ayında bitirdi. 2006 yılı ikinci öğretim yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında doktora programına başladı.