

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)  
ANABİLİM DALI

**D-FENOTRİN'E MARUZ BIRAKILAN RATLARIN ÇEŞİTLİ  
DOKULARINDA OKSİDATİF DNA HASARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

Enes ATMACA

Samsun  
Aralık - 2012



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)  
ANABİLİM DALI

**D-FENOTRİN'E MARUZ BIRAKILAN RATLARIN ÇEŞİTLİ  
DOKULARINDA OKSİDATİF DNA HASARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

Enes ATMACA

Danışman: Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY

Samsun  
Aralık - 2012

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Enes ATMACA tarafından Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY'un danışmanlığında hazırlanan "D-Fenotrin'e Maruz Bırakılan Ratların Çeşitli Dokularında Oksidatif DNA Hasarının Araştırılması" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 14/12/2012 tarihinde yapılan sınav ile Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Yüksel KESİM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Oğuzhan YAVUZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Yrd.Doç.Dr. Yavuz Kürşad DAŞ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.../.../.....

**Prof.Dr. Süleyman KAPLAN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum doktora eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, titiz ve disiplinli çalışmayı öğreten, değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca gerek aldığım derslerle gerekse laboratuvar çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, hocalarım sayın Doç.Dr. Oğuzhan YAVUZ ve sayın Yrd.Doç.Dr. Yavuz Kürşad DAŞ'a, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, çalışma arkadaşım sayın Dr. Dilek GÜVENÇ'e ve PYO.VET.1904.10.002 no'lu proje ile doktora tez çalışmamızı destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan ve varlıklarıyla güven veren çok kıymetli sevgili ailem'e ve sabrı ve hoşgörüsü için sevgili eşim'e ayrıca teşekkür ederim.

## ÖZET

### D-FENOTRİN'E MARUZ BIRAKILAN RATLARIN ÇEŞİTLİ DOKULARINDA OKSİDATİF DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Piretroid insektisitler veteriner hekimliği, tarımsal mücadele ve halk sağlığı alanlarında yaygın olarak kullanılmakta ve hedef canlılarda çok zehirli ancak memeliler üzerinde düşük zehirlilik derecesine sahip olmaları ve çabuk yıkımlanmalarından ötürü tercih edilmektedirler. Oral biyoyararlanımları bileşiklere göre değişmekle birlikte yaklaşık olarak % 40-60 oranındadır. Piretroidlerin yapılan çalışmalarla bazı memeli sistemlerinde oksidatif stresin oluşmasında potansiyel teşkil ettikleri bildirilmiştir. 8-okso-2'-deoksiguanozin (8-oksodG), oksidatif stres ve DNA hasarının belirlenmesinde önemli ve hassas bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Çalışma ile d-fenotrin maruziyeti sonucu rat karaciğer ve böbreğinde oksidatif strese bağlı olarak şekillenebilecek genotoksisite riskinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** 8-oksodG/10<sup>6</sup> 2'-deoksiguanozin (dG) düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) - diode array detektör (DAD) ve elektrokimyasal detektör (ECD) tekniği ile ölçüldü. Çalışmada erkek Wistar albino ratlardan rastgele (~ 6 haftalık, 150-200 g) her grupta on adet rat olmak üzere beş deney ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Deney hayvanlarına 25 mg/kg (grup I), 50 mg/kg (grup II), 66,7 mg/kg (grup III), 100 mg/kg (grup IV) ve 200 mg/kg (grup V) dozlarında d-fenotrin ve kontrol grubuna sadece taşıt madde (dimetil sülfoksit, DMSO) periton içi (Pİ) yolla 14 gün boyunca uygulandı. Çalışmanın sonunda servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edilen hayvanlardan elde edilen karaciğer ve böbrekler soğuk serum fizyolojik solüsyonu (% 0,9 sodyum klorür) ile yıkandıktan sonra hızlı bir şekilde sıvı azot ile donduruldu. DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany; cat.no. 11 814 770 001) kullanılarak izole edilen DNA'lar nükleaz P1 ve alkalın fosfataz (ALP) enzimleri ile hidrolize uğratıldıktan sonra analizleri yapılmak üzere HPLC cihazına enjekte edildi. dG düzeyleri DAD ve 8-oksodG düzeyleri ECD ile analiz edildi.

**Bulgular:** Deney gruplarındaki ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri grup I, II, III, IV ve V için sırasıyla karaciğerde 48,15±7,43, 68,92±20,66, 82,07±14,15, 85,08±28,50, 89,14±21,73 ve böbrekte 39,06±7,63, 59,69±14,22, 61,13±17,46,

65,13±23,40, 72,66±19,04, kontrol grubu ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri karaciğerde 44,96±12,66 ve böbrekte 39,07±4,80 olarak tespit edildi. Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında d-fenotrine maruz kalan hayvanların her iki organında da doza bağımlı şekilde oksidatif DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı (p < 0,05) artış gözlemlendi. Karaciğerde meydana gelen DNA hasarı böbreğe göre daha yüksek düzeyde bulunmuş olup aralarında çok anlamlı (p < 0,01) korelasyon tespit edildi.

**Sonuç:** Sonuç olarak, d-fenotrine 14 gün boyunca Pİ yolla maruz kalan ratların karaciğer ve böbreklerinde doza bağımlı olarak serbest radikal üretimi ve bunun sonucunda oksidatif DNA hasarı şekillendiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek; d-fenotrin; HPLC-ECD/DAD; karaciğer; oksidatif DNA hasarı

**Enes ATMACA, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık - 2012**

## ABSTRACT

### OXIDATIVE DNA DAMAGE IN SEVERAL TISSUES OF RATS EXPOSED TO D-PHENOTHRIN

**Objective:** Pyrethroid insecticides are widely used in veterinary medicine and public health for agricultural and domestic purposes because they show high toxicity to a wide range of insects and low toxicity to mammals and rapid biodegradability. Although their oral bioavailability varies with regard to the compound, approximately 40-60 % of an orally ingested dose is absorbed. Several studies have indicated that certain pyrethroids have the potential to induce oxidative stress in organs of some mammalian systems. One of the oxidized products of nucleic acids, 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), is a sensitive biomarker of oxidative stress and DNA damage. The objective of this study was to assess the risk of genotoxicity of d-phenothrin in rat liver and kidney caused by oxidative stress.

**Material and Method:** The level of 8-oxodG/ $10^6$  2'-deoxyguanosine (dG) was measured by using high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array (DAD) and an electrochemical detector (ECD). Sixty male Wistar albino rats (~6-week-old, 150-200 g body weight) were randomly divided into five experimental groups and one control group of ten rats/group. D-phenothrin was administered intraperitoneally (Pi) to the animals at 25 mg/kg (group I), 50 mg/kg (group II), 66.7 mg/kg (group III), 100 mg/kg (group IV) and 200 mg/kg (group V) for 14 consecutive days and the control group received only the vehicle, dimethyl sulfoxide (DMSO). At the end of the experiment, rats were euthanized by cervical dislocation. The livers and kidneys were excised and after rinsing with ice-cold physiological saline solution (0.9 % sodium chloride), samples were frozen immediately in liquid nitrogen. DNA from frozen samples was isolated by using a DNA isolation kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany; cat.no. 11 814 770 001). Following digestion with nuclease P1 and alkaline phosphatase, hydrolysed DNA was subjected to HPLC. The dG level was analyzed by DAD and 8-oxodG by ECD.

**Results:** In the experimental groups, mean 8-oxodG/ $10^6$  dG levels were 48.15±7.43, 68.92±20.66, 82.07±14.15, 85.08±28.50, 89.14±21.73 in livers and 39.06±7.63, 59.69±14.22, 61.13±17.46, 65.13±23.40, 72.66±19.04 in kidneys of groups



I, II, III, IV and V, respectively. The mean 8-oxodG/10<sup>6</sup> dG levels in the control group were 44.96±12.66 in liver and 39.07±4.80 in kidney. A statistically significant (p < 0.05), dose-dependent increase in oxidative DNA damage was observed in both organs of animals exposed to d-phenothrin, when compared to controls. The liver showed significantly higher oxidative DNA damage than the kidney (p < 0.01).

**Conclusion:** In conclusion, d-phenothrin administered to rats intraperitoneally for 14 consecutive days generated free radical species in a dose-dependent manner and caused oxidative DNA damage in rat liver and kidney.

**Key Words:** d-phenothrin; HPLC-ECD/DAD; kidney; liver; oxidative DNA damage

**Enes ATMACA, PhD Thesis**

**Ondokuz Mayıs University - Samsun, December - 2012**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

8-oksodG	8-okso-2'-deoksiguanozin
8-oxodG	8-oxo-2'-deoxyguanosine
AcP	Asit fosfataz
KGA	Kabul edilebilir günlük alım miktarı
ALP	Alkalin fosfataz
A-T	Adenin-Timin
ATP	Adenozin trifosfat
$\alpha$	Alfa
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
CAS	Kimyasal Kısaltmalar Servisi
Cu	Bakır
CYP	Sitokrom P450
DAD	Diode array detektör
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
DFAM	Desferoksamin mesilat
dG	2'-Deoksiguanozin
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift zincirli DNA
$\epsilon$	Epsilon
ECD	Elektrokimyasal detektör
ELISA	Enzim işaretli antikor yöntemi
USA-EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
ESCODD	Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi
ESCUA	İdrar DNA Lezyonlarında Avrupa Standartları Komitesi
FAPyG	2,6-diamino-4-okso-5-formamidopirimidin
Fe	Demir
fmol	Femtomol
Fpg	Formamidopirimidin glikozilaz

g	Yerçekimi ivmesi
G-C	Guanin-Sitozin
GC-MS	Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
GSH	Glutatyon
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HOCl	Hipokloroz asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
PI	Periton içi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
L	Litre
LD <sub>50</sub>	Öldürücü doz elli
LOD	Tespit alt limiti
LOQ	Hesaplama alt limiti
LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
LC-MS-MS	Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi
MDA	Malondialdehit
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
mtDNA	Mitokondrial DNA
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz

nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NMWL	Nominal moleküler ağırlık limiti
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub>	Azot dioksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
•OH	Hidroksil radikali
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit anyonu
ODS	Oktadodesilsilil silika
OF	Organik fosforlu
OK	Organik klorlu
<sup>32</sup> P	Radyoaktif fosfor
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pg	Pikogram
pH	Hidrojen potansiyeli
PHS	Prostaglandin-H-sentetaz
PVDF	Poliviniliden florid
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SIM	Seçili iyon görüntüleme
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
İTK	İnce tabaka kromatografisi
Ü	Ünite
UNEP	Birleşmiş Milletler Çevre Programı
v/v	Hacim/hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

$<$	Küçük
$>$	Büyük
$\geq$	Büyük eşit

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Pestisitlerin Kısa Tarihçesi ve Gelişimi .....	3
2.1.1. Sentetik Piretroid Pestisitler .....	6
2.1.2. D-Fenotrin .....	8
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	10
2.3. Oksidatif DNA Hasarı ve Oluşum Mekanizması.....	13
2.3.1. 8-okso-2-deoksiguanozin ve Oluşum Mekanizması .....	15
2.4. Pestisitler ve Oksidatif DNA Hasarı .....	16
2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri .....	18
2.5.1. İmmunokimyasal Testler .....	19
2.5.2. <sup>32</sup> P-Post Labeling Ölçüm Teknikleri .....	20
2.5.3. Alkalın Elüsyon ve Comet Testi.....	20
2.5.4. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (GC-MS) .....	21
2.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Elektrokimyasal Detektör (HPLC-ECD).....	23
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	27
3.1. MATERYAL.....	27
3.1.1. Deney Hayvanları.....	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	27
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	28
3.2. METOT .....	29
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Uygulamalar .....	29
3.2.2. Doz .....	29
3.2.3. Deneme Süresi.....	30

3.2.4. Test Metodunun Prensipleri.....	30
3.2.5. Reaktifler, Tamponlar ve Solüsyonlar.....	30
3.2.6. Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması .....	31
3.2.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusundan DNA İzolasyonu .....	31
3.2.8. DNA Konsantrasyonu Ölçümü.....	34
3.2.9. Hidroliz.....	35
3.2.10. HPLC-ECD ile 8-oksodG ve HPLC-DAD ile dG'in Analizi.....	35
3.2.11. HPLC Analiz Sonuçlarının Hesaplanması .....	37
3.2.12. İstatistiksel Değerlendirme .....	37
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. DNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü Sonuçları .....	38
4.2. 8-oksodG ve dG Standart Kalibrasyonları .....	39
4.2.1. 8-oksodG Standart Kalibrasyonu .....	39
4.2.2. dG Standart Kalibrasyonu .....	41
4.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularında 8-oksodG/10 <sup>6</sup> dG Düzeyleri ve Klinik Bulgular .....	43
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>68</b>

## 1. GİRİŞ

Pestisitler pest (böcek, kemirici, yabancı ot, mikroorganizmalar) denilen zararlılardan korunmak, onları yok etmek, uzaklaştırmak veya sayılarını azaltmak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir (Costa, 2008). Bu kimyasallar doğrudan çevreye, bitkilere, hayvan barınakları, insan ve hayvanların vücuduna uygulandıktan; canlılarda birçok istenmeyen etkilere yol açabilirler (Kaya ve Bilgili, 2002). Vücudun antioksidan savunma mekanizması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, pestisitlerin neden olduğu toksisitenin olası bir mekanizması olarak son 20 yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (Agrawal ve Sharma, 2010). Pestisitler, serbest radikal üretimi yoluyla oksidatif stresin oluşmasına neden olabilirler. Böylece açığa çıkan reaktif oksijen türleri hücre zarları, deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) gibi yapılarda oksidatif hasarın oluşmasına yol açabilir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırılmaları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Cooke ve ark., 2003). Bu durum, pestisitlerin karaciğer, böbrek, sinir, kas ve benzeri yerlerde yol açtıkları hasarın başlıca nedenleri arasındadır (Kaya ve Bilgili, 2002).

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır (Kulaksız ve Sancar, 2007). DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücre metabolitler (Reaktif oksijen türleri, ROS) ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Bu değişimler sonuçta tek hücreli organizmalarda ölüme; çok hücreli organizmalarda ise dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (Sancar ve ark., 2004).

Reaktif oksijen türleri DNA'da 25'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (Cadet ve ark., 2011). Hasara uğrayan bazlar arasında 8-oksodG mutajenitesi en iyi bilinen ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı biyobelirteçidir. Bu nedenle 8-oksodG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır (De Martinis ve Bianchi, 2002).



Günümüzde veteriner hekimliği, halk sağlığı ve tarımsal mücadelede diğer pestisitlere oranla çevrede çabuk yıkımlanıp kalıntı sorununa yol açmamaları, hedef canlılarda yüksek zehirliliğe sahip olmaları ve memelilerde oldukça güvenli olmaları gibi nedenlerden ötürü sentetik piretroid grubu insektisitler tercih edilmektedir. Bu grupta bulunan d-fenotrin 1977'den bu yana ticari olarak üretilmekte olup; depolanmış ürünleri ve tahıl tanelerini korumak, çiftlik hayvanlarında iç ve dış parazitleri kontrol altına almak, ev, işyeri ve dış ortamlardaki haşerelerle mücadele etmek ve insanlarda bit mücadelesi amacıyla dünya çapında yoğun olarak kullanılmaktadır. D-fenotrin memeliler için oldukça güvenli bir madde olarak kabul edilir ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından zehirliliği açısından Tablo 5 (Normal Kullanım Şartları Altında Güvenli) gruba dahil edilmektedir (WHO, 1990). Ancak, d-fenotrinin DNA hasarı yapıcı etkisi ile ilgili yapılan çalışma bulunmamakta ve hangi dozlarda DNA hasarına yol açtığı bilinmemektedir.

Son yıllarda pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres mekanizmasına ışık tutmak açısından çeşitli organlarda meydana gelebilecek biyokimyasal ve moleküler düzeydeki değişimleri izlemek amacıyla akut ve subakut dozlarda pestisit maruziyeti uygulamalarına dayanan hayvan deneyleri çalışmaları yapılmaktadır (Agrawal ve Sharma, 2010).

Tez çalışması ile insektisit aktivitesi Tip II piretroidlere göre düşük ancak memeliler için daha güvenli Tip I piretroid grubu insektisit olan d-fenotrine Pİ yolla 14 gün süre ile maruz bırakılan ratların, vücutta biyotransformasyon ve detoksifikasyondan sorumlu, enzimatik tepkimelerin büyük bölümünün gerçekleştiği organ olan karaciğer ve atılımdan sorumlu organ olan böbreklerinde 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinin son derece hassas bir yöntem olan HPLC ECD/DAD sistemi ile ölçülerek DNA hasarının varlığının araştırılması ve böylece oksidatif strese bağlı olarak şekillenebilecek genotoksisite riskinin değerlendirilmesi amaçlandı. D-fenotrinin potansiyel tehlikeleri arasında olan genotoksik etkisinin belirlenmesinin, insan ve hayvan sağlığı açısından risk değerlendirmesi amacıyla önemli bir veri olması beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pestisitlerin Kısa Tarihçesi ve Gelişimi

Pestisitler tarih öncesi dönemlerden bugüne kadar kullanılan kimyasal maddelerdir. Ebers Papirüsü'nde milattan önce 1500'lü yıllarda evlerden pire kaçırın formüllerden bahsedilmektedir. Milattan sonra 900 yılında Çin'de bahçe haşereleri için arseniğin kullanıldığı kaydedilmiştir. Arsenik ve kükürt 1800'lü yılların başlarında insektisit ve herbisit olarak kullanılmışlardır. Ondokuzuncu yüzyıl sülfür bileşiklerinin keşfi ve bu bileşiklerin fungusit olarak kullanılmaya başlamasıyla pestisit çağı olarak kabul edilmiştir. Yine bu dönemde arsenik bileşikleri sebze ve meyve zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılmışlardır. Paul Müller 1939 yılında DDT'nin pestisit olarak kullanılabilceğini keşfetmiştir. DDT, 1942 yılında ticari olarak üretimi yapıldıktan sonra, tarımsal alanda, sıtma ve diğer haşere kaynaklı hastalıkların kontrol edilmesinde geniş kullanım alanı bulmuştur. Ancak organik klorlu (OK) pestisitlerin 1970'li yıllarda kullanımlarının önce sınırlandırılması sonraları da tümüyle yasaklanması ile organik fosforlu (OF), karbamat ve sentetik piretroidler zararlılarla mücadelede daha ön plana çıkmıştır (Costa, 2008).

İkinci dünya savaşından sonra sentetik pestisitler ABD'nde geniş ölçüde kullanılmıştır. Günümüzde bazı pestisit formülasyonlarını oluşturan etken maddeler aslında birer savaş silahı amacıyla geliştirilmişlerdir. Sentetik pestisitlerin geliştirilmesinden önce tarımsal alanda zararlılarla mücadelede doğal bileşikler olan arsenik ve piretrum kullanılmakta iken 1950'li yıllardan itibaren zamanla tarımsal üretimin artışına bağlı olarak doğal tehditleri önlemek amacıyla sentetik pestisit kullanımı da tarım uygulamalarında yerini almıştır (Levine, 2007).

Bugün dünyada yıllık pestisit kullanımının 4.6 milyon ton civarında olduğu ve çevreye uygulanan pestisitlerin sadece % 1'inin etki gösterdiği, geri kalan % 99'lük kısmının hedef olmayan arazilere, su kaynaklarına ve atmosfere yayıldığı ve böylece hedef olmayan organizmalara ulaştığı bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) raporuna göre dünya çapında yılda 220.000'i ölümlle sonuçlanan 26 milyonun üzerinde pestisit zehirlenmesi görülmektedir. Pestisit kullanımı bakımından Avrupa'da şu anda Almanya en büyük üretici ve Fransa'dan sonra en büyük ikinci tüketici konumunda olup; İtalya, İspanya ve İngiltere

diğer büyük ölçüde pestisit kullanan ülkeler arasındadır (Zhang ve ark., 2011). Ülkemizde ise yılda yaklaşık 20 bin tonun üzerinde pestisit tüketilmektedir (Delen ve ark., 2010). Almanya ve Fransa'da yıllara göre pestisit tüketimi Tablo 1'de, ülkemiz genelinde yıllara göre tüketilen pestisit miktarı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Gelişmiş ülkelerle, örneğin Almanya ve Fransa ile karşılaştırıldığında, Türkiye'de daha az pestisit kullanıldığı anlaşılmaktadır. Ancak ülkemizde bilinçsiz ve kontrolsüz biçimde uygulanan bu kimyasal maddeler, zararlı organizmalarda pestisitlere duyarlılığın azalması, çevre kirliliği, insan ve hayvanlarda sağlık sorunları ve zehirlenmelere neden olabilmektedir (Delen ve ark., 2010).

**Tablo 1.** Almanya ve Fransa'da yıllara göre pestisit tüketimi (ton) (Zhang ve ark., 2011)

<b>Pestisit Grubu</b>	<b>Ülke</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
İnsektisitler	Almanya	1380.4	1308.7	1412.3	1038.1	1201.7	963.31	776.24	1370.4
	Fransa	3103	2488	2308	2224	2460	2506	2140	2101
Herbisitler	Almanya	16610.8	14942.2	14327.9	15349.5	15922.9	15610.3	17062.8	17163.7
	Fransa	30845	32122	28779	24508	26102	29209	23068	26808
Fungisit ve Bakterisitler	Almanya	9375.9	8021.9	9915.8	9827.4	7858.4	9543.2	9523.4	10311.7
	Fransa	52834	54130	43351	39317	37175	35921	35957	36919

**Tablo 2.** Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (L veya kg) (Delen ve ark., 2010)

<b>Yıllar</b>	<b>İnsektisitler</b>	<b>Fungisitler</b>	<b>Herbisitler</b>	<b>Fumigantlar ve Nematisitler</b>
1979	2.287.658	1.537.315	2.451.977	315.665
1980	2.245.811	1.426.073	1.934.663	157.765
1981	3.163.475	1.327.622	1.585.610	85.587
1982	3.318.890	1.465.511	2.020.078	117.980
1983	3.403.763	2.659.381	3.279.882	166.231
1984	3.769.758	2.843.420	3.620.887	205.543
1985	3.532.222	2.607.081	2.074.688	116.168
1986	3.793.371	2.561.065	2.813.537	217.594
1987	3.303.446	2.611.960	3.495.044	322.227
1988	2.989.532	2.589.368	3.736.481	395.967
1989	3.215.342	2.344.142	2.938.088	479.626
1990	3.170.726	2.643.612	2.973.950	895.355
1991	2.471.761	2.311.907	3.375.567	720.315
1992	2.997.669	2.300.802	2.772.023	577.841
1993	2.230.688	2.571.864	4.652.495	920.141
1994	2.064.991	2.201.406	3.902.588	530.738
1995	2.463.072	2.179.747	3.590.738	758.711
1996	3.027.380	2.951.192	3.643.971	1.072.662
1997	3.174.388	3.207.444	3.833.527	1.236.418
1998	3.908.537	2.625.626	2.499.205	1.244.698
1999	2.534.194	2.623.435	3.357.903	1.548.964
2000	2.694.080	2.692.457	3.197.078	994.445
2001	2.607.229	2.044.440	3.097.483	741.070
2002	2.250.898	1.964.292	3.697.397	1.554.489
2004	3.295.758	3.060.219	3.267.168	1.583.448
2006	3.406.403	4.431.597	5.400.034	2.650.016
2007	3.567.866	4.945.056	4.637.684	3.031.224
2008	3.219.216	4.901.205	5.581.447	4.146.398

### 2.1.1. Sentetik Piretroid Pestisitler

Piretroidler, doğal piretrinlerden hazırlanan sentetik maddelerdir. Piretrin insektisitler krizantem çiçeğinden (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Pyrethrum cinerariaefolium*, *Tanacetum cinerariaefolium*) elde edilir. Doğal piretrinler, piretrin I ve II, sinerin I ve II, jasmolin I ve II olmak üzere altı çeşit bileşikten oluşur. Bu maddeler ışığa maruz kaldıklarında hızlı bir şekilde yıkımlandıklarından, bu şartlarda daha stabil ve etkili sentetik analogları olan piretroidler geliştirilmiştir (Anadon ve ark., 2009).

Sentetik piretroidler memeli ve kanatlılar için güvenli, ancak biyotransformasyon hızlarının yavaş ve vücuttaki yarı ömürlerinin uzun olması (genellikle 48 saat) nedeniyle su ürünleri ve arılar için oldukça zehirli maddelerdir. Sentetik piretroidler etki hızlarına göre yere serici (bioalletrin, tetrametrin, siflutrin gibi) ve öldürücü (d-fenotrin, permetrin, resmetrin gibi) etkililer diye iki gruba ayrılırlar. Ayrıca yapılarında  $\alpha$ -siyano grubu içermeyenler tip I (d-fenotrin, alletrin, permetrin gibi) ve yapılarına  $\alpha$ -siyano grubu eklenerek insektisit etkinin artırıldığı tip II (sifenotrin, deltametrin, sipermetrin, gibi) bileşikler olarak sınıflandırılabilirler. Çevrede uzun süre kalıcı değildirler (Kaya ve Bilgili, 2002).

Sentetik piretroidler etkilerini sinir hücrelerinde voltaja bağımlı sodyum kanalları üzerinden gösterirler. Özellikle merkezi sinir sistemindeki aksonlar olmak üzere sinir hücrelerinde negatif art potansiyel artar ve süresi uzar. Bu etki daha çok presinaptik sinir uçlarında meydana gelerek sinaptik iletim etkilenir ve nörotransmitter madde salınımı artar. Piretroidlerin bu şekilde gösterdikleri etki mekanizması DDT'ye benzer. Fakat Tip II maddeler sodyum kanallarını daha uzun süre açık tutarak tip I bileşiklerden farklı bir şekilde etki gösterirler. Ayrıca piretroidler sinirlerde Ca, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz'ın etkinliğini de engellerler (Ecobichon, 1996; Williams ve ark., 2000). Tip I bileşiklere yüksek düzeyde maruz kalan hayvanlarda dış uyarılara hassasiyet, titreme, vücut ısısında artış ve ardından ölüm şekillenir. Tip II piretroidlere maruziyette ise, davranışlarda bozukluk, tükürük salgısında artış, pupillada daralma, kalp hızında yavaşlama, titreme nöbetleri, seslere karşı korkuyla tepki verme ve kaslarda koordinasyon bozukluğu görülür (Williams ve ark., 2000).

Oral biyoyararlanımları bileşiklere göre değişmekle birlikte yaklaşık olarak % 40-60 oranındadır. Piretroid esterleri, birçok türde nonspesifik karboksilesterazlar

tarafından hidrolize uğratılırlar. Mikrozomal monooksijenaz sistemi (sitokrom P450 ve NADPH P450 redüktaz) memelilerde, balıklarda ve haşerelerde bu bileşiklerin zehirsizleştirilmesinde rol almaktadır (Ecobichon, 1996).

Veteriner hekimliğinde piretroidler daha çok hayvanlarda dış parazitlere karşı mücadelede çeşitli formülasyonlar halinde kullanılmaktadırlar. Kedi ve köpeklerde çeşitli piretrin ve piretroid kullanımları Tablo 3'te, çiftlik hayvanlarında çeşitli piretrin ve piretroid kullanımları Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Veteriner hekimliğinde kedi ve köpeklerde piretrin ve bazı piretroidlerin kullanımı (Anadon ve ark., 2009)

<b>Etken Madde</b>	<b>Formülasyon</b>	<b>Konsantrasyon (%)</b>	<b>Hayvan Türü</b>
Piretrinler	Şampuan	0.2	Köpek
Siflutrin	Tasma	2.5	Köpek ve kedi
Sipermetrin	Çözelti	5	Köpek ve kedi
Deltametrin	Tasma	4	Köpek
Fenvalerat	Çözelti (Suda Çözdürülen)	6	Kedi
Flumetrin	Tasma	0.225	Köpek
Permetrin	Çözelti	40-71.5	Köpek ve kedi
	Çözelti (Suda Çözdürülen)	94	Köpek ve kedi
	Tasma	0.8-1.5	Köpek
	Aerosol	0.2-1	Köpek
	Şampuan	1	Köpek
Fenotrin	Şampuan	0.25	Köpek ve kedi
Tetrametrin	Çözelti	0.6	Köpek
	Şampuan	0.2	Köpek

**Tablo 4.** Veteriner hekimliğinde çiftlik hayvanlarında piretroidlerin kullanımı (Anadon ve ark., 2009)

<b>Etken Madde/İzomer Oranı</b>	<b>Kullanım Şekli</b>	<b>Doz/Hayvan</b>
Siflutrin (8 enantiomeri)	Dökme	100 mg/sığır
Sihalotrin (A ve B cis izomeri 60:40)	Dökme	0.2 mg/sığır, 0.1 mg/koyun ve domuz
	Sprey	250 mg'a kadar
	Daldırma	50 g'a kadar/1000 L su
Deltametrin (% 98 cis)	Daldırma, Sprey,	0.25-1.5 mg/kg, her 3-6 haftada (sığır),
	Dökme	0.94-4.5 mg/kg (koyun), 0.08 mg/kg (kanatlılar)
	Banyo	2 µg/L 30 dk. süreyle (kapalı konteynırda) veya 3 µg/L 30 dk. süreyle (kapalı konteynırda) (balık)
Permetrin (cis:trans 80:20, 40:60, 25:75)	Sprey(meme spreyi dahil), toz, dökme, kulak küpesi	4 mg/kg (sığır),~ 6 mg/kg (koyun, kanatlılar)

### 2.1.2. D-Fenotrin

D-fenotrin, sarı-soluk kahve renkte, ışığa duyarlı sentetik piretroid bir insektisittir. Kimyasal yapı olarak 4:1 (1R-trans:1R-cis) oranında iki stereoizomerden oluşur (WHO, 2004). İlk olarak 1969 yılında sentezlenmiş, 1976'da ABD Çevre Koruma Ajansı (USA-EPA) tarafından kayıt altına alınmıştır (WHO, 1990). Ticari olarak 1977'den bu yana üretilmekte ve dünya çapında kullanılmaktadır. Halk sağlığı ve veteriner hekimlikte geniş bir kullanım alanı vardır. Genel olarak, depolanmış ürünleri ve tahıl tanelerini korumak; pet ve çiftlik hayvanlarında iç ve dış parazitleri kontrol altına almak; ev, işyeri ve dış ortamlardaki haşerelerle mücadele etmek ve insanlarda bit mücadelesi amacıyla kullanılır. Dünya çapında üretimi yaklaşık yılda 70-80 ton civarındadır (Cox, 2003). D-fenotrinin kimyasal yapısı Şekil 1, fizikokimyasal özellikleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

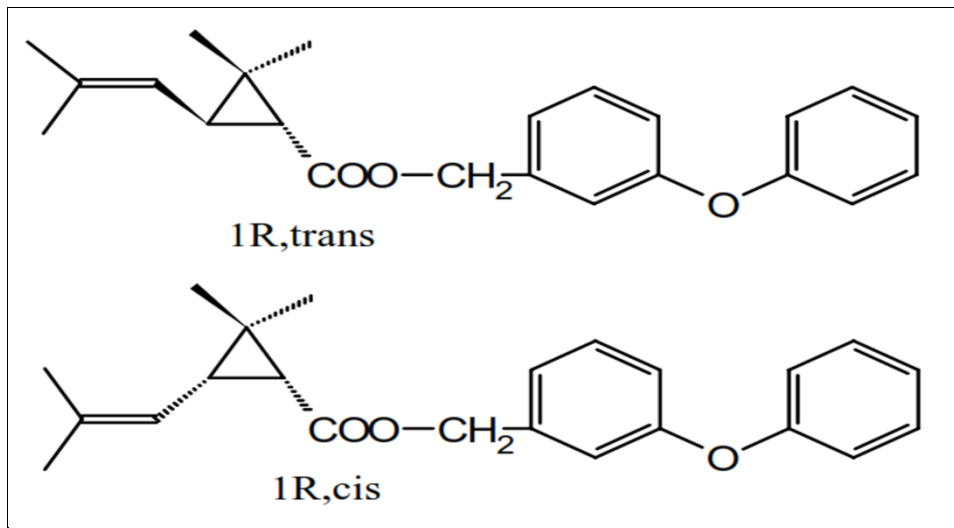
D-fenotrin memeliler için oldukça güvenli bir madde olarak kabul edilir. Kabul edilebilir günlük alım miktarı (KGA) 0.07 mg/kg, ratlar için oral, dermal ve Pİ LD<sub>50</sub> değeri 5000 mg/kg olup WHO tarafından zehirliliği açısından Tablo 5 (Normal

Kullanım Şartları Altında Güvenli) gruba dahil edilmektedir. Balık ve arılara karşı zehirlidir (WHO, 1990; 2004).

Genellikle 0.5-2 g/kg konsantrasyonlarında su ve yağ bazlı aerosol, sıvı konsantre, emülsifiye olabilen konsantre, toz, şampuan ve losyon formülasyonlar halinde hazırlanır. Lepidoptera (kelebekler), Hemiptera (tahtakurusu), Diptera (sivrisinek, karasinek, tatarcık), hamamböcekleri ve bitleri kontrol altına almak amacıyla kullanılır. Böceklere temas ve mide zehiri olarak etkir. Tip I piretroid insektisit olan d-fenotrin bir nörotoksin olup, sinir hücre zarındaki voltaja duyarlı sodyum kanallarına dönüşümlü olarak bağlanıp uzun süre açık kalmasını sağlayarak titreme ve eksitasyona neden olur. Ratlarda vücutta hidroliz, oksidasyon ve konjugasyon yoluyla metabolize olduktan sonra idrar (%96) ve dışkı yoluyla atılır. Damar içi uygulanmasını takiben ilk 0.5-1 saat içinde kalp çarpıntısı, titreme, yavaş solunum, salya artışı, gözyaşı, kaslarda koordinasyon bozukluğu ve felç gelişir (WHO/FAO, 1994).

D-fenotrinin karaciğer ve böbrekte hasara neden olduğu, karaciğerde kanser riskini artırdığı ve anemiye yol açtığı bildirilmiştir (Cox, 2003).

Kediler d-fenotrine duyarlı hayvanlardır. Pire ve kene mücadelesinde kullanılan preparatların kedilerde titreme, nöbet ve salyada artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle ABD’nde 2005 yılında erişkin ve yavru kedilerde kullanımı yasaklanmıştır (Jackson ve ark., 2011).



Şekil 1. D-fenotrinin kimyasal yapısı (WHO’dan, 2004)



**Tablo 5.** D-fenotrinin fizikokimyasal özellikleri (WHO, 2004)

Parametre	Değerler
Kimyasal İsim	CAS: (3-phenoxyphenyl)methyl (1 <i>R</i> )- <i>cis</i> - <i>trans</i> -2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl) cyclopropanecarboxylate IUPAC: 3-phenoxybenzyl (1 <i>R</i> )- <i>cis</i> , <i>trans</i> -chrysanthemate
Eş İsim	Sumitrin, S-2539F, S-2539 Forte
Fiziksel Görünüm	Sıvı
Renk	Sarı-soluk kahve renk
Kimyasal Formül	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>
Molekül Ağırlığı	350.46 g/mol
Buhar Basıncı	0.16 MPa( 20°C’de)
Suda Çözünübilirlik	2 mg/L (25°C’de)

## 2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır (Halliwell, 2011).

Serbest radikallerin kimyasal olarak mevcudiyeti konusunda, yaklaşık 100 yıl önce bir sonuca ulaşılmakla birlikte, varlıkları ilk 30-40 yıl boyunca dünya çapında kabul görmemiştir. Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki varlığı ve önemi 1950’lerin ortalarına kadar kabul görmese de, reaktif oksijen biyokimyasını kuran bir grup bilim adamının katkıları ile varlıkları ve önemleri aydınlatılmıştır (Çakatay ve Kayalı, 2006).

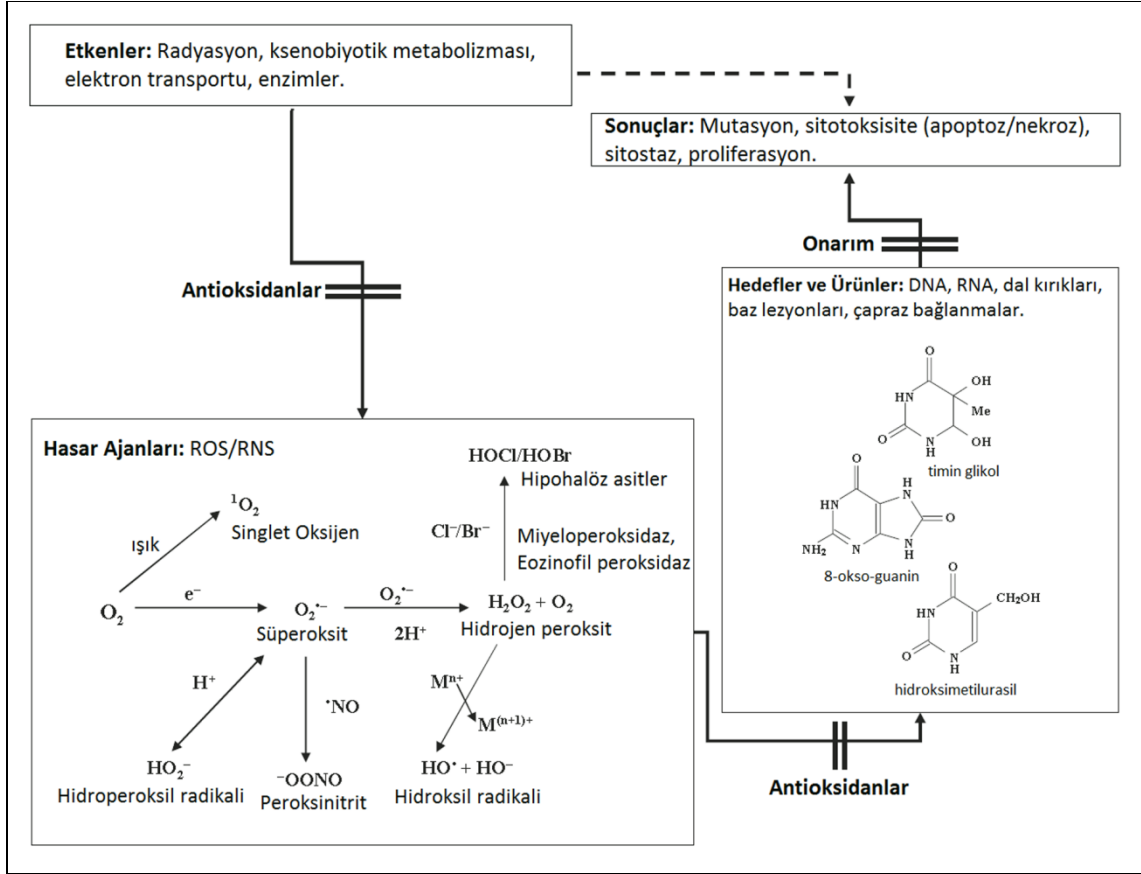
Daniel Gilbert ve Rebecca Gerscheman 1956 yılında serbest radikallerin toksik ajanlar olduğunu ileri sürmüşler ve iyonize radyasyonun aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumuna neden olarak oksijen düzeylerini yükselttiğini ve böylece toksisiteye yol açtığını bildirmişlerdir (Gutteridge ve Halliwell, 2006). Çağın bilim adamları tarafından serbest radikallerin çok fazla reaktif olmasından ötürü biyolojik materyallerde bulunamayacağını savunarak eleştirilen hipotez, bu moleküllerin biyolojik doku ve yaşayan organizmalarda elektron spin rezonans tekniği ile ölçülmesi ile birlikte literatürde yerini almıştır. Harman 1954 yılında yaşlanma ile ilgili olarak

geliştirdiği serbest radikal teorisi ile organizmadaki önemli makromoleküllerde geri dönüşümsüz olarak biriken hasarın zamanla hastalığa ve yaşlanmaya yol açtığını öne sürmüştür (Acworth, 2003).

Joe McCord ve Irwin Fridovich 1968 yılında süperoksit anyonunun ( $O_2^{\cdot-}$ ) oksijenin majör toksik formu olduğu teorisini geliştirmişler ve organizmayı bu radikalden koruyan SOD enzimini keşfetmişlerdir. Bu aşamadan sonra SOD enzimi, yaşayan organizmalarda serbest radikal varlığının ve reaksiyon mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında değerli bir biyolojik parametre olarak kullanılmıştır (Acworth, 2003; Davies ve Pryor, 2005).

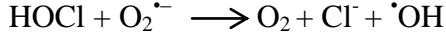
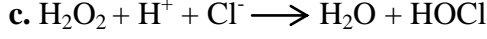
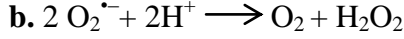
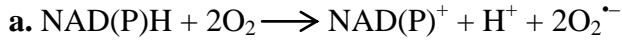
DNA'daki in vivo oksidatif hasarın varlığı 1980'li yıllara kadar saptanamamıştır. Frenkel ve ark. 1981 yılında ince tabaka kromatografisi (İTK) tekniğini kullanarak fare karaciğerinin DNA'sında oksidatif hasar sonucu timidin glikol oluştuğunu göstermişlerdir. Floyd ve ark. ise 1986 yılında diğer bir oksidatif DNA hasarı parametresi olan, 8-oksodG, HPLC-ECD yöntemi ile analiz ederek, bu alandaki çalışmaların ivme kazanmasını sağlamışlardır. Bruce Ames'in Kaliforniya'daki laboratuvarı 1990 yılında, yaşlanmanın DNA oksidasyonu üzerine olan etkisiyle ilgili ilk verileri yayımlamıştır (Çakatay ve Kayalı, 2006).

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik (pestisitler vb.) metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROS oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. Stabil bir molekül olan DNA, lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (Şekil 2) (Burçak ve Andican, 2004).



Şekil 2. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı (Cooke ve ark.'dan, 2006)

ROS, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etkenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen etkenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Organizmadaki başlıca kaynakları fagositler (makrofajlar), granüositler, mitokondriyal elektron taşıma sistemi ve prostaglandinlerdir. Bu yapılarda prostaglandin-H-sentetaz (PHS) gibi peroksidazlar, ksantin oksidaz, monoamin oksidaz, NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), miyelinperoksidaz gibi enzimlerin aracılığındaki tepkimeler sırasında  $O_2^{\bullet-}$ , nitrik oksit (NO), azotdioksit ( $NO_2$ ), hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) ve hipokloroz asit (HOCl) gibi etkin gruplar açığa çıkar. Solunum patlamaları esnasında makrofajlar ve granüositler tarafından hücre zarına bağlı bir enzim olan NADPH oksidaz etkinleştirilir, bu enzim moleküler oksijenden süperoksit anyonunu oluşturur (Şekil 3a). Birbirini izleyen iki tepkime ile süperoksit anyonundan hidroksil radikalini şekillendirir (Şekil 3b) ve ilk tepkimeye süperoksit dismutaz (SOD) ikincisine ise geçiş metalleri (Fenton tepkimesi) aracılık eder (Kaya ve Bilgili, 2002).



**Şekil 3.** Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşumu tepkimeleri (Kaya ve Bilgili'den, 2002)

Granülositlerden ayrıca hücreler arasında lizozomal enzimler olan miyeloperoksidazlar salıverilir; bu enzim klor ve hidrojen peroksit'e etkiyerek son derece güçlü yükseltgen bir madde olan HOCl oluşturur (Şekil 3c). Hidrojen peroksit'e benzer şekilde HOCl,  $\text{Fe}^{+2}$  veya  $\text{O}_2^{\bullet-}$  'ndan elektron aktararak  $\text{OH}^\bullet$  radikalini şekillendirir. Granülositlerdeki bu tepkimeler makrofajlarda oluşmaz (Kaya ve Bilgili, 2002).

ROS oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklı etkenler arasında stres; pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları; iyonize ve ultraviyole radyasyon; hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler; sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler; sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar; hiperbarik oksijen; trisiklik antidepresanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa, arsenik gibi metal iyonları; asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B<sub>1</sub> sayılabilir (Williams ve Jeffrey, 2000; Mercan, 2004).

Organizmada doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle ROS'nin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırılmaları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Cooke ve ark., 2006).

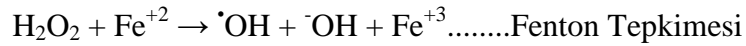
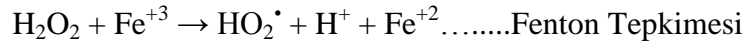
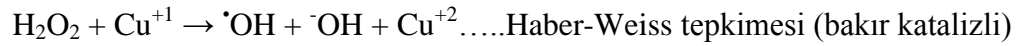
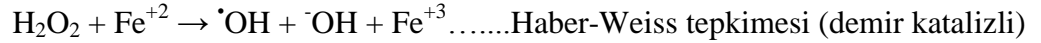
### **2.3. Oksidatif DNA Hasarı ve Oluşum Mekanizması**

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. Genomik

DNA'nın bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır. DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücrel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir (Kulaksız ve Sancar, 2007).

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücrel metabolitler (ROS) ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Bu değişimler, sonuçta tek hücreli organizmalarda ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (Sancar ve ark., 2004).

DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır. Bunlardan Fenton kimyası hipotezinde  $\cdot\text{OH}$  radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur.  $\text{O}_2^-$  gibi  $\text{H}_2\text{O}_2$  de doğrudan DNA'da hasar yapmaz.  $\cdot\text{OH}$  radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan  $\cdot\text{OH}$  radikalinin hücre içine diffüze olarak çekirdeğe geçme olasılığı azdır. Olası mekanizma, membranı kolayca geçebilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in çekirdekte demir ve bakır (Cu) iyonları ile tepkimeye girerek (Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri)  $\cdot\text{OH}$  radikallerini oluşturmasıdır (Van Remmen ve ark., 2003).



DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $\text{Fe}^{+2/+3}$  ve  $\text{Cu}^{+1/+2}$  iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden ayrılarak da DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in DNA üzerinde tepkimeye girmesi sonucu oluşan  $\cdot\text{OH}$  radikalleri,  $\cdot\text{OH}$  radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca,  $\cdot\text{OH}$  radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir. Doku kültür ortamının  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyon

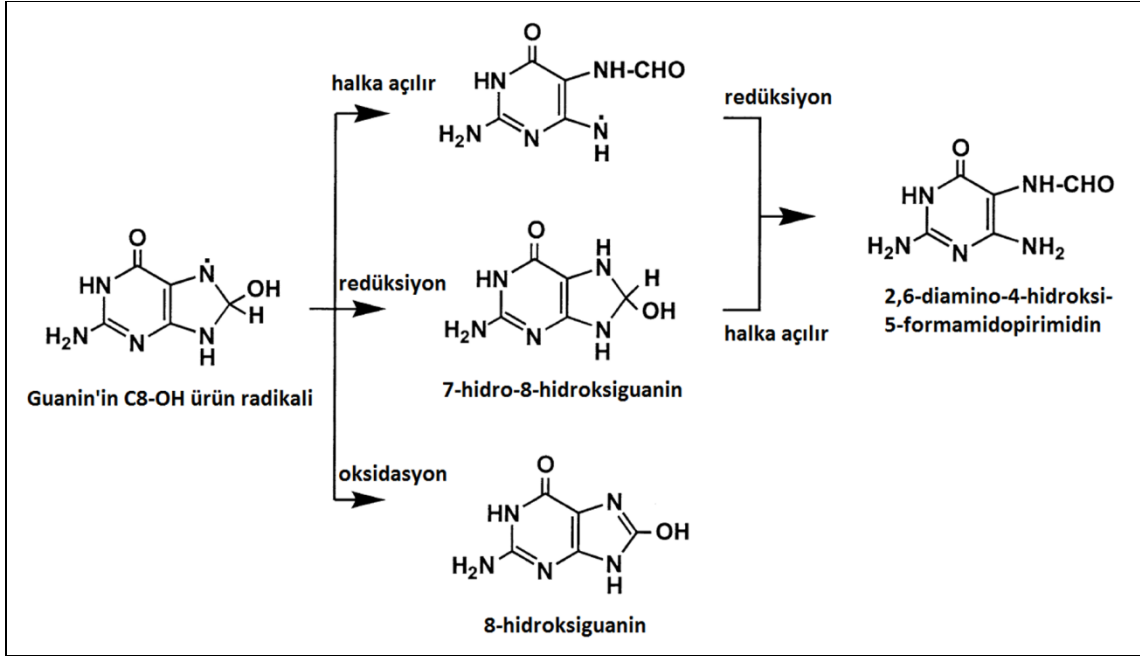
konsantrasyonunun arttırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılan hücrelerde bakır veya demir şelatörlerinin (desferoksamin mesilat vb.) kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (Burçak ve Andican, 2004).

DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir şelatörleri ve radikal temizleyicilerinin birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür. <sup>•</sup>OH radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) çok daha seçicidir. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-oksodG ve FAPy-Guanin (FAPyG) oluşturmaktadır (Cadet ve ark., 2003). Hücrede DNA ile birlikte bulunan Cu<sup>+2</sup> iyonlarının bazı fenollerle tepkimeye girmesi ile ROS oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA baz-fenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir. <sup>•</sup>OH radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Örneğin bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki karbon (C) atomlarına veya adeninin 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına <sup>•</sup>OH radikali katılarak çeşitli ürünler oluşmaktadır (Dizdaroğlu ve ark., 2002).

### **2.3.1. 8-okso-2-deoksiguanozin ve Oluşum Mekanizması**

8-oksodG, ROS'nin DNA'da yaptığı 25'den fazla oksidatif baz hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinenidir. Guanin, DNA bazları içerisinde en düşük redüksiyon potansiyeline (1.29 V) sahip bileşiktir. Bu sebeple de ROS'nin başlıca hedefidir (DeMott ve Dedon, 2010). İnsan vücudunun her bir hücresinde günde yaklaşık 2.000 guanin kaynaklı oksidatif modifikasyonun olduğu bildirilmiştir. Oluşan 8-oksodG lezyonları, organizma tarafından onarılmadıkça DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'e dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi arttırır. Bu nedenle 8-oksodG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır. 8-oksodG, 8-hidroksiguanin (8-OHGua)'in deoksiriboz'a bağlanmış hali olan bir modifiye nükleozit ve ekzonukleazlar olarak adlandırılan enzimlerin okside olmuş DNA'yı onardığında ekstrakte edilen bir baz modifikasyonudur (Loft ve ark., 2008).

8-oksodG, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen veya eksojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir.  $\cdot\text{OH}$  radikali, guanin'in 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki C atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluştururlar (Şekil 4) (Dizdaroglu ve ark., 2002).



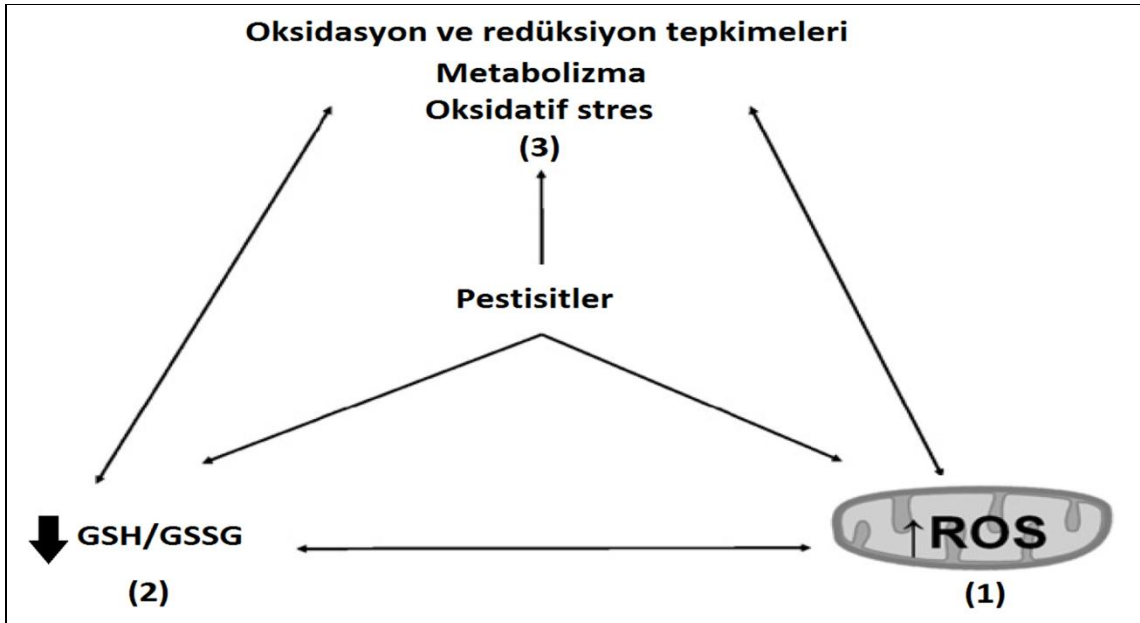
Şekil 4. C8- $\cdot\text{OH}$  ürün radikalinden guanin son ürünlerinin oluşum mekanizması (Dizdaroglu ve ark.,'dan, 2002)

#### 2.4. Pestisitler ve Oksidatif DNA Hasarı

Serbest radikaller pestisit zehirlenmelerinde önemli rol oynamaktadırlar. Pestisitler organizmada serbest radikal ve lipit peroksidasyon oluşumuna veya antioksidan enzim sistemlerinde değişimlere yol açarak oksidatif strese neden olabilirler (Abdollahi ve ark., 2004).

Pestisit zehirlenmelerinin olası bir mekanizması olarak düşünülen oksidatif stres son 20 yılda toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir. Serbest radikallerin insan ve hayvanların vücudunda sürekli olarak birikimi sonucu hayati öneme sahip çeşitli doku ve organlarda bazı patofizyolojik etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Agrawal ve Sharma, 2010). Bugüne değin yapılan çalışmalarla pestisitlerin organizmada nörolojik ve immunolojik fonksiyonlarda değişikliklere yol açtığı ve bunun sonucu olarak kanser ve nörodejeneratif hastalıklara yatkınlığa neden olduğu kanıtlanmıştır.

Pestisitlerin genel olarak üç mekanizma ile hücrel redoks (oksidasyon ve redüksiyon olayları) dengesini değiştirdiği bilinmektedir (Şekil 5). Bunlardan ilki pestisitlerin enzimatik olarak sekonder reaktif ürünlere dönüşmesi ve ROS oluşumu, ikincisi antioksidan savunma mekanizmalarının yok edilmesi ve üçüncüsü antioksidan enzimlerin bozulmasına yol açmasıdır. Bu işlevlerin sonucu olarak hücrelerde ROS ve lipit peroksidasyon sonucu gelişen oksidatif stres DNA'ya ve diğer makromoleküllere hasar vermektedir (Franco ve ark., 2009).



Şekil 5. Pestisitlerin redoks dengesini değiştirme mekanizması (Franco ve ark.,'dan, 2009)

Yapılan çeşitli deneysel maruziyet çalışmalarında piretroid grubu bazı insektisitlerin eritrosit hücrelerinde, beyin, böbrek, karaciğer gibi organlarda oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Abdollahi ve ark., 2004). Fetoui ve ark. (2008)'nı yaptığı çalışmada Tip II piretroid olan lamda sihalotrinin erkek Wistar ratların kan hücreleri ve beyin dokusunda oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir. Yine Tip II piretroidlerden deltametrinin antioksidan ve nörotransmitter enzimlerin etkinliğini engelleyerek ve lipit peroksidasyona yol açarak vücutta oksidatif stres oluşturduğu, aynı grupta bulunan sipermetrinin rat beyin ve karaciğer dokusunda oksidatif hasar şekillendirdiği bildirilmiştir (Giray ve ark., 2001; Yousef ve ark., 2007). Yarsan ve Cakir (2006)'ın yaptığı çalışmada OF bir insektisit olan diklorvosun lipit peroksidasyon yapıcı etkisini araştırılmış, bu amaçla 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarda diklorvos içme suyu ile erkek



Swiss Albino farelere verilmiştir. Lipid peroksidasyon oluşumu plazma MDA ve eritrositlerde SOD ve CAT düzeyleri ölçülerek belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda diklorvos uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre MDA düzeyleri artış gösterirken, subakut ve subkronik dönemde CAT etkinliği azalmış, SOD etkinliği ise subakut dönemde artmış subkronik dönemde azalmıştır. Benzer bir çalışmada Yarsan ve ark. (1999) karbamat grubu insektisitlerden aldikarb ve OF insektisit malatinyonun plazma MDA düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi genelde  $\alpha$ -siyano grubu içerdiğinden zehirlilik derecesi Tip I piretiroidlere nazaran daha yüksek olan Tip II piretiroidlerle ilgili deneysel zehirlilik modelleri uygulanmış ve bu maddelerin oksidatif stres üzerinde rolü araştırılmış olmakla birlikte Tip I piretiroid olan d-fenotrinin bu etkisiyle ilgili araştırmalar mevcut değildir.

## **2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri**

Organizmada oksidatif stres sonucu gelişen DNA hasarı oluşum mekanizmasını ve bu durumun biyolojik sistemdeki sonuçlarını açıklığa kavuşturabilmek için hasara uğrayan bazların çeşitli analitik tekniklerle ölçülmesi ve düzeylerinin belirlenmesi gerekmektedir (Guetens ve ark., 2002).

Son 20 yılda hücre DNA'larında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda analitik yöntem geliştirilmiştir. Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde kullanılan bu analitik teknikler genel olarak kromatografik yöntemler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS), enzimatik testler (alkalin elusyon tekniği, tek hücre jel elektroforezi - Comet testi) ve diğer yöntemler (immunokimyasal testler - ELISA, <sup>32</sup>P-postlabeling ölçüm teknikleri) olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılır (Cadet ve ark., 2011). Bu yöntemler arasında HPLC-ECD ve GC-MS en çok kullanılan iki ölçüm yöntemidir (Guetens ve ark., 2002). Ancak GC-MS ve LC-MS gibi kütle spektrometrik yöntemlerin kullanıldığı analizlerde yapay oksidasyondan dolayı beklenenden daha fazla DNA hasar düzeylerinin tespit edilmesi bu tekniklerin bir dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında, çeşitli dezavantajlarından ötürü immunokimyasal ve <sup>32</sup>P-postlabeling yöntemlerinin uygulanması tavsiye edilmemektedir (Cadet ve ark., 2011).

Günümüzde oksidatif DNA hasarının tespitinde HPLC-ECD yöntemi ile 8-oksodG ölçümü, düşük miktarda DNA'da (100 µg) 1-2 (1-2 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG) lezyonun bile tespit edilebildiği, en hassas ve laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, DNA'nın izolasyonunu takiben enzimatik hidrolizinin gerçekleştirilmesi ve böylece guanin bazından ayrılan 8-oksodG nükleozidinin ölçümü esasına dayanır (Cadet ve ark., 2011).

Oksidatif DNA hasarının tespitinde ortaya çıkabilecek hataların en aza indirgenmesi, analizi yapan kişilerden kaynaklanan hataların tespit edilmesi, laboratuvar sonuçları arasındaki farklılığın elimine edilmesi ve herkes tarafından kabul edilen protokollerin hazırlanmasını gerektirmektedir. Bu amaçla 1997 yılında Avrupa'da 27 laboratuvarın katılımıyla kurulan Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi (European Standarts Comitte on Oxidative DNA Damage- ESCODD) tarafından ölçümlere bir standardizasyon getirmek amacıyla buzağı timus DNA'sı stok olarak kullanılmış ve bu materyal 8-oksodG seviyesinin belirlenmesi için farklı laboratuvarlara gönderilmiştir. Gelen sonuçların birbirlerinden oldukça farklı olduğu gözlemlenmiş ve bunun nedeninin farklı laboratuvarların ve farklı analiz tekniklerinin kullanılmış olması sonucuna varılmıştır. Standardizasyonla ilgili diğer bir kurum olan İdrar DNA Lezyonlarında Avrupa Standartları Komitesinin (European Standarts Comitte of Urinary DNA Lesion Analysis - ESCULA) ise idrarda 8-oksodG ve kreatinin konsantrasyonu ölçümlerinde farklı yöntemleri ve idrardaki diğer lezyonlarla 8-oksodG düzeylerini karşılaştırmak ve böylece laboratuvarlar arası bir fikir birliği sağlamak gibi amaçları vardır (Collins, 2002).

### **2.5.1. İmmunokimyasal Testler**

İmmunokimyasal yöntemler, hasarlı DNA lezyonlarına ilgi gösteren spesifik monoklonal veya poliklonal antikorların kullanıldığı tekniklerdir. Bu yöntemle 8-oksodG ölçümlerinde, bu hasarlı baza yüksek ilgi gösteren N45.1 ve 1F7 olarak adlandırılan monoklonal antikorlar kullanılır. Bu antikorlar genellikle ELISA yönteminde kullanılarak ölçümler gerçekleştirilir (Guertens ve ark., 2002). Genellikle hazır kitlerin kullanıldığı, uygulama prosedürü basit, az zaman alıcı ve fazla sayıda numunenin birarada çalışılmasına imkan sağlayan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı spesifik antikorların benzer yapıya sahip başka bir hasarlı bazla

çapraz reaksiyona girerek doğru ve güvenilir ölçümlerin yapılmasına imkan tanımamasıdır (Cadet ve ark., 2011). Laboratuvarlar arası yapılan yöntem karşılaştırma çalışmalarında ELISA yöntemi ile yapılan 8-oksodG ölçümleri arasındaki farkın beklenenden çok daha fazla düzeylerde saptandığı bildirilmiştir (Cooke ve ark., 2008).

### **2.5.2. <sup>32</sup>P-Post Labeling Ölçüm Teknikleri**

Bu yöntemde radyoaktif fosfor (<sup>32</sup>P) işaretleme için kullanılır. DNA, önce nükleaz ve fosfodiesterazlar ile nükleotid monofosfatlara hidroliz edilir. Nükleotid monofosfatlar, polinükleotid kinaz ve radyoaktif işaretli adenozin trifosfat (ATP) ile inkübe edilip 5' pozisyonunda fosforillenerek işaretlenirler. 5' pozisyonunda <sup>32</sup>P ile işaretli deoksिनükleotidler, İTK ile birbirinden ayrılır (Guetens ve ark., 2002).

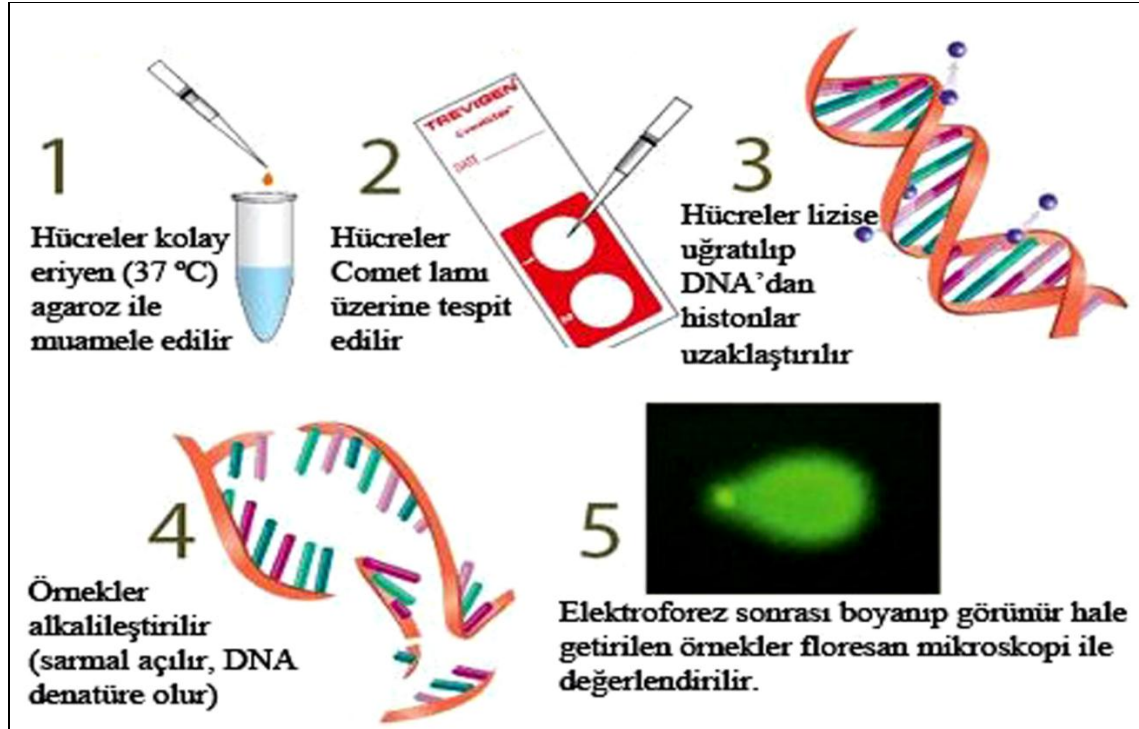
### **2.5.3. Alkalın Elüsyon ve Comet Testi**

Alkalın elüsyon testi, DNA'ya [<sup>3</sup>H]-timidin dahil edilmesi ve sonrasında küçük ve büyük çaptaki DNA fragmanlarının filtre sisteminden elüe edilmesine dayanan bir analiz yöntemidir. Formamidopirimidin glikozilaz (Fpg) proteini, endonükleaz III (endo III), ekzonükleaz III (ekzo III), T4 endonükleaz V gibi çeşitli onarım endonükleazları ile birlikte oksidatif baz modifikasyonlarının kararlı durum düzeylerini belirlemek için kullanılır. Spesifik enzimler, DNA'yı modifiye bazların bulunduğu noktalardan kırarak yeni tek dal kırıkları oluşturur. Enzimatik işlemde önce ve sonra saptanan dal kırıklarının karşılaştırılması ile modifiye pürin bazları, okside pirimidin bazları ve abazik bölgeler ölçülebilir (Epe, 1996).

Comet yönteminde, jel üzerine yerleştirilen hücreler lizise uğratarak elektroforetik alanda yürütülür. Hasarsız DNA jel üzerinde hareketsiz kalır ancak dal kırığı veya DNA sarmalının kırılması gibi çeşitli nedenlerle hasar görmüş DNA hücre çekirdeğinden çıkıp jel üzerinde hareket ederek normalden daha uzun bir görünüme sahip olur. Elektroforez sonucu çeşitli kimyasallarla (YOYO1-floresan DNA boyası) boyanan DNA “kuyrukluyıldız (comet)” görünümünü alır ve kuyruk uzunluğu hesaplanarak hasar tespiti yapılır (Collins ve ark., 1995) (Şekil 6).

Her iki yöntem DNA dal kırıklarının ölçümü için hassasiyeti yüksek ancak seçiciliği düşük tekniklerdir. Ancak çeşitli DNA modifikasyonlarına özgü spesifik enzimler kullanılarak seçicilik sağlanabilir. Bu iki yöntemin avantajları, daha az

miktarlarda hücre gerektirmesi ve DNA saflaştırılmasının gerekmemesidir (Guetens ve ark., 2002).



Şekil 6. Comet test prosedürü (Anon.'dan, 2012a)

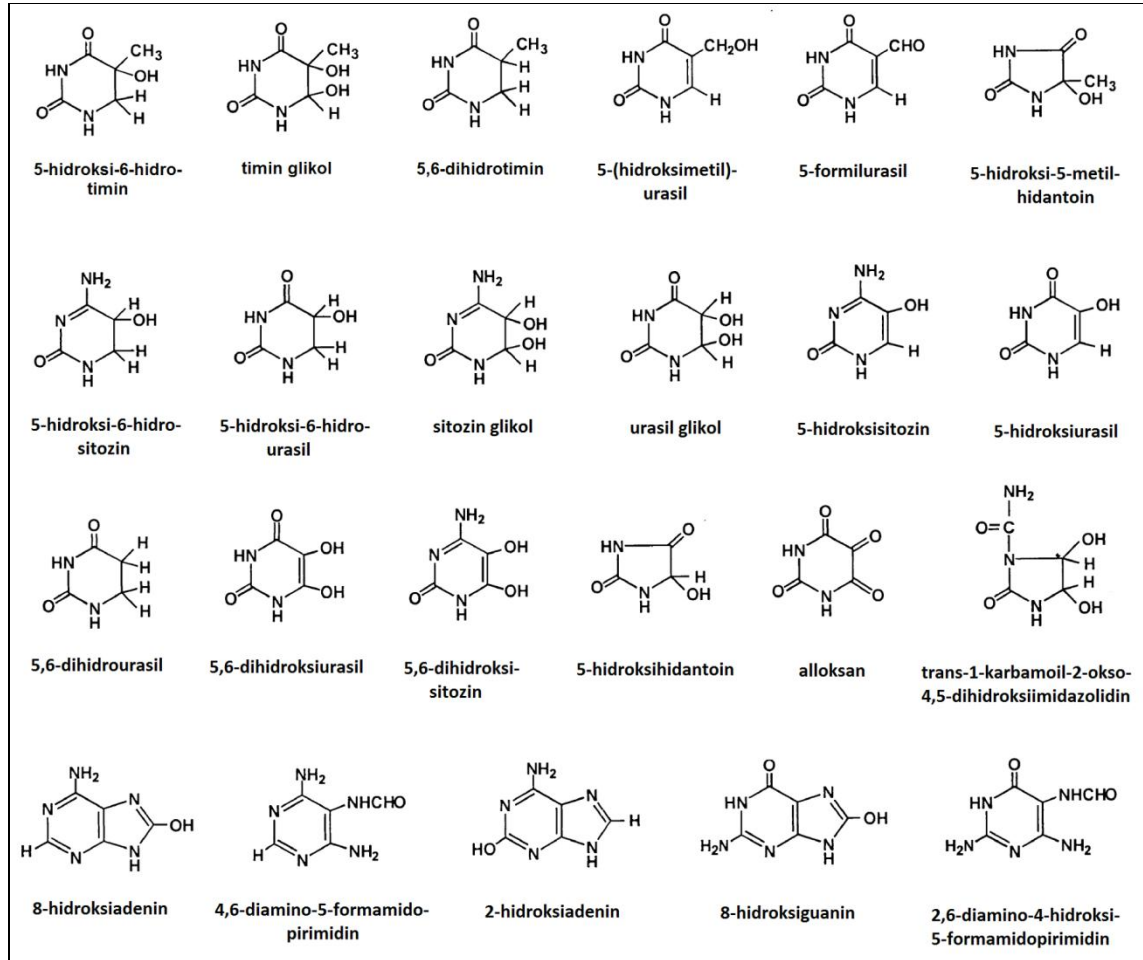
#### 2.5.4. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Gaz kromatografisi kütle spektrometresi yöntemi ile oksidatif DNA hasarı analizleri 1980'li yılların başında Miral Dizdaroğlu tarafından geliştirilmiş ve kısa sürede referans yöntem haline gelmiştir (Cadet ve ark., 2011).

Şimdiye kadar kullanılan teknikler içerisinde GC-MS, hasara uğramış DNA'da ve doğrudan kromatinin kendisinde, dört bazda da oluşan hasar ürünlerinin belirlenmesine olanak sağlayan tek tekniktir. Ayrıca GC-MS, DNA onarım enzimlerinin eksizyon (kesip çıkarma) kinetiğini ve hücresel DNA onarım düzeyini ölçmek için de kullanılabilir. GC-MS ile analizde öncelikle DNA, sağlam ve modifiye bazları elde etmek için asitle hidrolize edilir veya sağlam ve modifiye nükleozidleri elde etmek için endo ve ekzonükleazlarla muamele edilir. Asidik hidroliz yerine *Escherichia coli* Fpg proteini ve *Escherichia coli* Nth proteini gibi onarım enzimleri kullanılabilir. Hidroliz aşamasında DNA onarım enzimlerinin kullanılmasının avantajı ise asidik hidrolize nazaran ortama hiçbir sağlam bazın salınmamasıdır. Elde edilen hidrolizatlar

trimetilsilil çözültüsüyle türevlendirilip uçucu formlarına dönüştürülerek analiz edilirler. GC-MS'in dezavantajı ise türevlendirme işlemi sırasında guaninin de aralarında bulunduğu bazlardan bir bölümünde yapay oksidasyonların (308 lezyon/10<sup>6</sup> G vb.) oluşmasıdır. GC-MS ile Seçili İyon Görüntüleme (Selected Ion Monitoring-SIM) modunda DNA hasar ürünlerinin düşük konsantrasyonlarını ölçmek mümkündür. Bu yöntem ile 5 fmol'dan daha düşük miktarlarda 8-oksoG düzeyi belirlenebilmektedir (Dizdaroglu ve ark., 2002). GC-MS ile ölçülebilen hasarlı baz ürünleri Şekil 7'de gösterilmektedir.

ESCODD'un son 10 yıl raporlarına göre oksidatif DNA hasarı tespitinde GC-MS yöntemi kullanımının artık uygun görülmediği bildirilmektedir (Cadet ve ark., 2011).



Şekil 7. GC-MS ile ölçülebilen serbest radikal atakları sonucu oluşan hasarlı baz ürünleri (Dizdaroglu ve ark.'dan, 2002)

### **2.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Elektrokimyasal Detektör (HPLC-ECD)**

İlk olarak Floyd ve ark. (1986) tarafından geliştirilen 8-oksodG nükleozidinin ölçümünün oktadodesilsilil silika (ODS) jel kolon kullanılarak gerçekleştirildiği HPLC-ECD yöntemi oksidatif DNA hasarı ölçümlerinde son derecede duyarlı, seçici ve laboratuvarlarda en sık kullanılan ve günümüzde çeşitli çalışmalarda izole hücre DNA'sında, hayvansal dokularda, idrarda ve çeşitli kan hücrelerinde çok düşük miktarlarda (50 fmol - 2 lezyon / 10<sup>6</sup> normal baz) 8-oksodG düzeylerinin ölçülmesine imkan sağlayan çok hassas bir yöntemdir (Guetens ve ark., 2002).

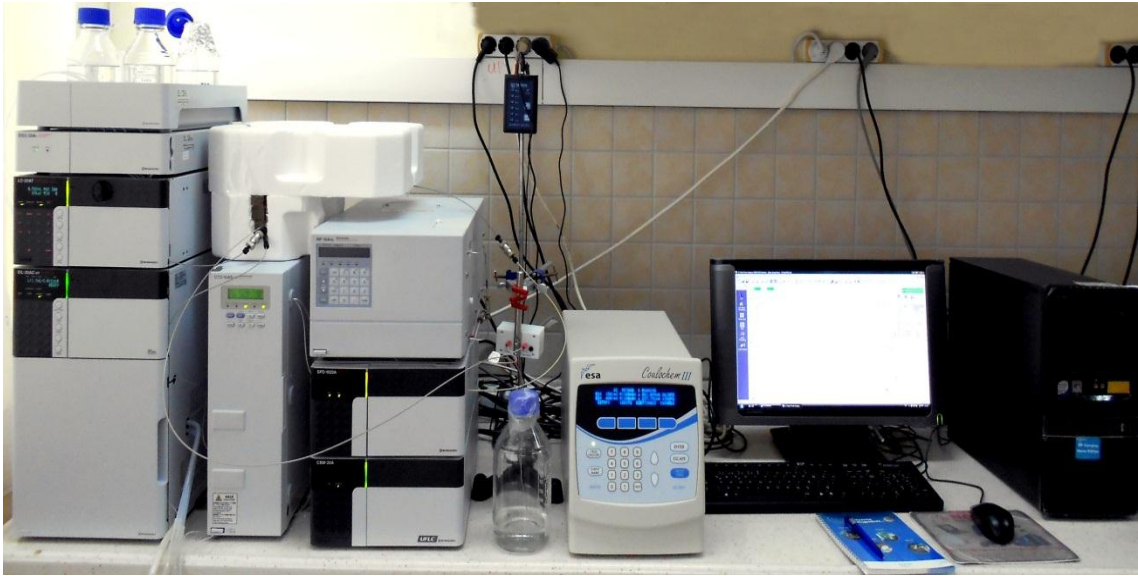
### **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Sıvı kromatografi, Rus botanikçi Tswett tarafından, sıvı-katı kromatografi şeklinde ilk keşfedilen kromatografi modeli olarak bilinir. Tswett, 1890'lı yıllarda sıvı bir çözücü içerisindeki bitkisel pigmentleri absorban (tutucu) bir yatakta ilerleterek ayırmış ve bulduğu bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir. Sıvı kromatografide hareketli fazda çözülmüş bileşikler, kolon içerisinde sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir detektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir. HPLC günümüzde bütün analitik ayırma teknikleri içerisinde en yaygın olarak kullanılanıdır. Uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin analizi için son derece duyarlıdır ve bu sayede çok geniş bir analiz spektrumuna sahiptir. HPLC analizlerine uygun binlerce maddeye örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar (antibiyotikler, steroidler vb.), terpenoidler, pestisitler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler verilebilir (Yavuz, 2010).

Bir HPLC sistemini temel üniteleri şunlardır:

- Hareketli faz deposu
- Pompa(lar)
- Enjektör (örnek yükleme birimi)
- Kolon(lar) (ayırma birimi)
- Detektör(ler) (ölçüm birimi)
- Bilgi işlem birimi (Bilgisayar veya integratör), yazım birimi
- Atık deposu

Tez çalışmasında kullanılan HPLC sistemi Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. HPLC- ECD/DAD sistemi

### **Elektrokimyasal Detektör (ECD)**

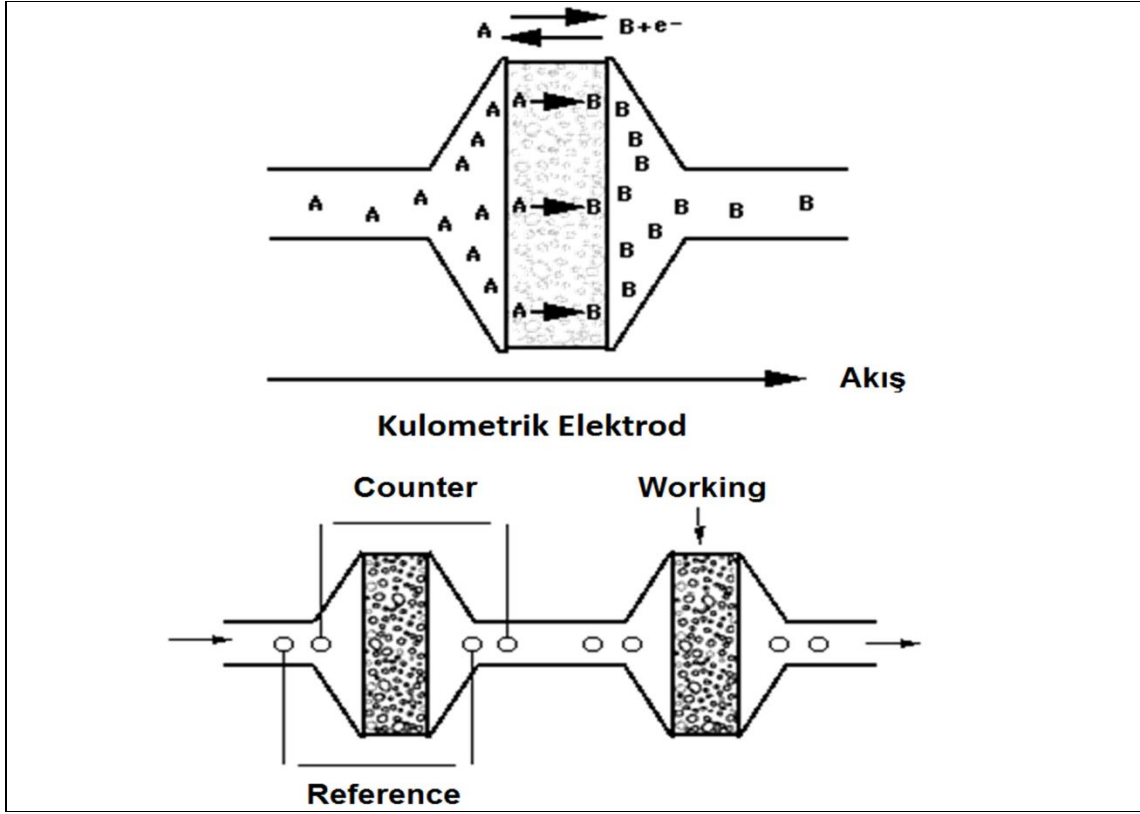
Oksidasyon, bir molekülün oksijen kazanması, hidrojen, proton veya elektron kaybetmesi, redüksiyon ise bu durumun tersine molekülün oksijen kaybetmesi, hidrojen veya elektron kazanması olarak tanımlanabilir. Her iki tepkime birbirini tamamlayıcı durumda olup oksidasyon işlemi sonrasında mutlaka redüksiyon işlemi de gerçekleşir. Organizmada da şekillenen bu tepkimeler REDüksiyon-OKSIdasyon veya REDOKS

tepkimleri olarak adlandırılır. Redoks biyokimyası prensibi ile çalışan farklı detektörler arasında en iyi olanı elektrokimyasal detektördür (Acworth, 2003).

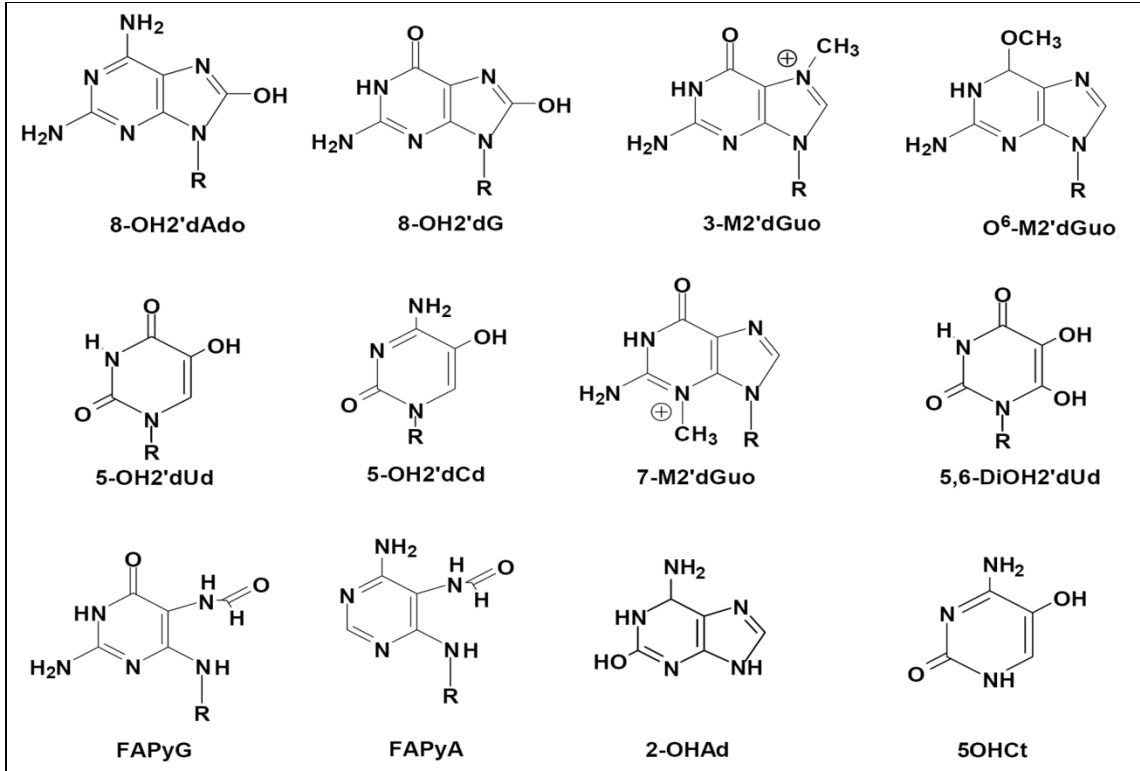
HPLC sistemi ile kullanılan elektrokimyasal detektörlerde “working” (çalışma), “counter” (karşıt) ve “reference” (referans) elektrod olarak adlandırılan üç farklı elektrod bulunur. Farklı potansiyeller uygulanan working ve reference elektrodlar arasında oluşan elektrokimyasal akım sonucu working elektrodun üzerinde elektrokimyasal bir tepkime meydana gelir. Meydana gelen bu tepkime karşı konumdaki counter elektrod tarafından dengelenir. Sonuçta working elektrod üzerindeki elektrokimyasal tepkime yükseltilerek (amplifikasyon) kaydedici cihazda pik olarak elde edilir (Wolfender, 2009).

Elektrokimyasal detektörler genellikle geometrik yapısına göre kolometrik ve amperometrik olmak üzere iki türdür. Kolometrik ölçümde analit, working elektrodun arasından geçerek, amperometrik ölçümde ise elektrodun yüzeyinde ölçülür. Bunlardan ilk olarak geliştirilen amperometrik teknikte seçicilik ve hassasiyet düşük olup analitin ancak % 5-10’u ölçülebilmekte iken yüksek hassasiyette olan kolometrik teknikte analitin % 100’ü ölçülebilmekte, pmol ve fmol düzeylerinde ölçümler yapılabilmektedir (Anon., 2012b). Şekil 9’da kolometrik elektroda ait şema, Şekil 10’da ECD detektörle tespit edilebilen elektrokimyasal olarak aktif bazı hasarlı bazlar gösterilmektedir.





Şekil 9. Kolometrik teknik, working, counter ve reference elektrodlar (Anon.'dan, 2012b)



Şekil 10. HPLC-ECD ile ölçümü yapılabilen bazı hasarlı baz ürünleri (Acworth'den, 2003)

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan yaklaşık 6 haftalık ortalama 150-200 g ağırlığındaki erkek Wistar Albino ratlar kullanıldı.

Araştırma amacıyla deney hayvanlarına uygulanan işlemler ve çalışma protokolü Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nca onaylandı (Sayı: HADYEK/82, Tarih: 23.09.2009).

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Cihazı** (Shimadzu LC-20AT Prominence, 228-45001-38)
  - **Rezervuar Tablası** (Shimadzu, 228-45041-91)
  - **Degaz Ünitesi** (Shimadzu DGU-20A5, 228-45019-32)
  - **Otomatik Örnekleyici** (Shimadzu SIL-20ACHT, 228-45120-38)
  - **Kolon Fırını** (Shimadzu CTO-10ASVP, 228-45059-38)
  - **Arabirim Modülü** (Shimadzu CBM-20A, 228-45012-38)
  - **Diode Array Detektör** (Shimadzu SPD-M20A, 228-45005-38)
  - **Elektrokimyasal Detektör** (ESA, Coulochem III)
  - **Koruyucu Cell** (ESA, Model 5020)
  - **Analitik Cell** (ESA, Model 5010A)
  - **Bilgisayar** (HP Compaq, dx7500 Microtower)
  - **Lazerjet Yazıcı** (HP, P1505)
- **HPLC Koruyucu Kolon** (GL Science, Inertsil ODS-3, 5µm x 20 x 4.0 mm)
- **HPLC Analiz Kolonu** (GL Science, Inertsil ODS-3V, 5µm x 250 x 4.6mm)
- **Spektrofotometre** (Shimadzu, UVmini-1240)
- **Kuvars Mikroküvet** (Helma, 500 µl)
- **Homojenizatör** (Daihan Scientific, WiseTis HG-15D)
- **Çalkalayıcı Su Banyosu** (Nüve, ST 402)

- **Hassas Terazı** (Shimadzu, AUW 220 D)
- **pH Metre** (Thermo, Orion 710A+)
- **Manyetik Karıştırıcı** (Labart, SH-5)
- **Vorteks** (Velp Scientifica, Zx<sup>3</sup>)
- **Soğutmalı Santrifüj** (Nüve, NF 800R)
- **Ultrasaf Su Cihazı** (Millipore, Milli-Di Simplicity 185)
- **Ultrasonik Banyo** (Daihan Scientific, WiseClean WUC-A03H)
- **Dijital Otomatik Pipet** (Eppendorf , 20-300 µl ve 50-1000 µl)
- **Derin Dondurucu (-85 °C)** (Nüve, DF 490)
- **Santrifüjlü Filtre Aparatı** (Millipore, UFC500396)
- **Ependorf Tüp** (DNase, RNase Free, 0.5-2 ml)
- **PVDF Membran Filtre** (Filtration Membranes, 0.22 µm x 47 mm)
- **Septum Kapaklı Vial ve Vial İserti** (AIM, 2-5 ml)
- **Falkon Tüp** (DNase, RNase Free, 15-50 ml)
- **PVDF Disk Filtre** (13 mm x 0.22 µm)
- **Sıvı Azot Tankı**
- **Vakumlu Mobil Faz Süzme Sistemi**
- **Enjektör**
- **Bistüri**
- **Aluminyum Folyo**

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- **Doku DNA İzolasyon Kiti** (Roche, 11 814 770 001)
- **Standart Maddeler**
  - **8-oksodG** (Sigma, H 5653)
  - **dG** (Sigma, D 7145)
  - **D-Fenotrin** (Sumitomo Chemical (UK) Plc, Batch No. 060604)
- **Sodyum Asetat Trihidrat** (Sigma, 236500)
- **Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat** (Sigma, C3434)
- **Desferoksamin Mesilat** (Sigma, D 9533)
- **Nükleaz P1** (Sigma, N8630)

- **ALP** (Sigma, P5931)
- **Tris HCl Tamponu** (Invitrogen, Gibco 15568-025)
- **Magnezyum Klorür** (Merck, 105833)
- **Çinko Klorür** (Sigma, 14422)
- **Metanol** (Sigma, 34885)
- **Etanol** (Sigma, 34870)
- **İzopropanol** (Merck, 100995)
- **DMSO** (Merck, 116743)
- **Glasiyel Asetik Asit** (Merck, 100056)
- **Serum Fizyolojik** (Biosel)

### **3.2. METOT**

#### **3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Uygulamalar**

Deney hayvanları, alışmaları açısından denemeye başlamadan 1 hafta önce gruplandırılarak kafeslerine yerleştirildi ve çalışma boyunca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu,  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve  $\% 60 \pm \% 5$  bağıl nem koşullarında barındırıldı. Yem ve suları *ad libitum* olarak verildi. Çalışmada, sentetik piretroid insektisitlerden d-fenotrin etken maddesi DMSO içinde çözülerek erkek Wistar albino ratlara 14 gün boyunca farklı dozlarda Pİ yolla enjekte edildi.

Araştırmada, d-fenotrinin 5 farklı dozu denendi ve verilen dozlarda 14 gün süresince mortalite ve klinik semptomlar gözlemlendi. Deneme protokolünde her grupta 10 hayvan olmak üzere 5 deneme grubu ve kontrol için toplam 60 adet erkek Wistar albino rat kullanıldı. Hayvanlar 14 günün sonunda servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edilerek karaciğer ve böbrekleri alındı. Elde edilen organlar soğuk serum fizyolojik solüsyonu ( $\% 0.9$  sodyum klorid) ile yıkandıktan sonra hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurularak DNA izolasyonları yapılmak üzere  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### **3.2.2. Doz**

Çalışmada kullanılan dozlar Tablo 6'da verilmiştir. Uygulanan günlük dozlar d-fenotrinin ratlar için Pİ LD<sub>50</sub> değeri (5000 mg/kg) baz alınarak belirlendi (WHO, 1990).

Buna göre hayvanlara Pİ LD<sub>50</sub> değerinin 1/200 (25 mg/kg), 1/100 (50 mg/kg), 1/75 (66.7 mg/kg), 1/50 (100 mg/kg) ve 1/25 (200 mg/kg)'i oranında d-fenotrin uygulandı.

**Tablo 6.** Çalışmada uygulanan dozlar ve hayvan sayıları

<b>Gruplar</b>	<b>Uygulanacak Madde</b>	<b>Uygulama Dozu (mg/kg)</b>	<b>Hayvan Sayısı</b>	<b>Uygulama Yolu</b>
Grup 1	d-fenotrin	25	10 erkek	Pİ
Grup 2	d-fenotrin	50	10 erkek	Pİ
Grup 3	d-fenotrin	66.7	10 erkek	Pİ
Grup 4	d-fenotrin	100	10 erkek	Pİ
Grup 5	d-fenotrin	200	10 erkek	Pİ
Kontrol	DMSO (Taşıt)	-	10 erkek	Pİ

### **3.2.3. Deneme Süresi**

Çalışmanın esası kısa süreli tekrarlanan düşük doz maruziyeti sonucu oluşacak oksidatif DNA hasarının tespit edilmesine dayandığından, denemeler 14 gün boyunca sürdürüldü.

### **3.2.4. Test Metodunun Prensibi**

Test metodu, deneme hayvanlarının farklı doz gruplarına ayrılıp d-fenotrinin Pİ yolla uygulanması, 14 gün boyunca hayvanlardaki klinik bulgular ve mortalitenin gözlenmesi ve deneme sonunda karaciğer ve böbrekten izole edilen DNA'nın spektrofotometre ile konsantrasyonunun ölçümü sonrası HPLC-DAD ile dG ve HPLC-ECD yöntemiyle oksidatif DNA hasarının biyobelirteci olan 8-oksodG düzeylerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

### **3.2.5. Reaktifler, Tamponlar ve Solüsyonlar**

- Hücresel lizis tamponu
- Protein çöktürme solüsyonu
- Proteinaz K

- RNase A
- İzopropanol (HPLC saflığında)
- Etanol (HPLC saflığında)
- Desferoksamin mesilat (DFAM)
- Nükleaz P1
- Nükleaz P1 tamponu
- Tris-HCl tamponu
- Alkalın fosfataz (Penicillium citrinum)
- Alkalın fosfataz solüsyonu
- Ultrasaf su
- Metanol (HPLC saflığında)

### **3.2.6. Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması**

#### **Nükleaz P1 Tamponu**

40 mM sodyum asetat ve 0.1 mM çinko klorür, pH: 5.1'e ayarlanarak hazırlandı. Nükleaz P1 enzimi bu tamponda çözdürülerek kullanıldı.

#### **Alkalın Fosfataz Solüsyonu**

1 mM magnezyum klorür olarak hazırlandı. ALP enzimi bu solüsyonda (-20 °C) çözdürülerek hazırlandı.

#### **% 70 Etanol Solüsyonu**

HPLC saflığındaki (% 99.9) etanol, ultrasaf su ile seyreltilerek % 70 etanol solüsyonu hazırlandı.

### **3.2.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusundan DNA İzolasyonu**

Çalışmada Roche® doku DNA izolasyon kiti kullanıldı (Roche, 2010).

## **Prensip**

DNA izolasyon kiti, organik ekstraksiyon, anyon değiştirme kolonları veya kaotropik ajanlar gerektirmeden hücre ve dokulardan hızlı bir şekilde DNA elde edilmesine olanak sağlar. Elde edilen genomik DNA, 50-150 kb boyutundadır.

Bu izolasyon tekniği ile yaklaşık 1 gram'a kadar doku ile çalışılıp fazla miktarda DNA elde edilebilir. 400 mg rat böbrek dokusundan ortalama 1647 µg, aynı miktarda rat karaciğer dokusundan ortalama 1276 µg DNA elde edilebilir.

Oksidatif DNA hasarı çalışmalarında en az 100 µg DNA'ya ihtiyaç vardır (Taghizadeh ve ark., 2008).

İzolasyonda kullanılan prosedür ile DNA'yı kontamine eden RNA ve diğer proteinler uzaklaştırılarak yüksek kalitede DNA elde edilir. Elde edilen izolat Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), sekanslama ve Southern Blot gibi uygulamalara uygundur.

İzolasyon DNA'da yapay oksidasyona neden olabilecek fenol-kloroform çöktürmesi gerektirmemektedir.

## **Yöntem**

İzolasyon aşamaları, kullanılan ticari kitte belirtildiği şekilde yapıldı (Roche, 2010). Kullanılan reaktifler ve solüsyonların miktarları 100 mg doku (40 adet izolasyon)'ya göre hesaplandı.

İzolasyona başlamadan önce hücresel lizis tamponu ve protein çöktürme solüsyonu 2-8 °C'den çıkarılıp oda sıcaklığında bekletildi. Hücresel lizis tamponu 37 °C'de 5 dk. bekletilip tekrar süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Çalkalayıcı su banyosu 65 °C, santrifüj 24 °C'ye ayarlandı.

İşlem süresince ilave oksidasyonu önlemek amacıyla hücresel lizis tamponu ve protein çöktürme solüsyonuna 100 µM olacak şekilde metal şelatörü desferoksamin mesilat eklendi.

DNA izolasyonu; lizis ve RNA'nın uzaklaştırılması, proteinlerin çöktürülmesi ve DNA'nın çöktürülmesi olmak üzere üç aşamada uygulandı.

Tüm aşamalar 24 °C'de laboratuvar ortamında gerçekleştirildi.

### **Lizis ve RNA'nın Uzaklaştırılması**

- 100 mg doku hassas terazide tartıldı.
- 50 ml'lik DNase-RNase free falkon tüpe aktarılıp üzerine 2.5 ml hücresel lizis tamponu eklendi.
- 13500 rpm'de süspanse olana kadar (yaklaşık 1 dk.) homojenize edildi.
- Üzerine 2.5 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi.
- Tüpün ağzı kapatılıp 2-3 sn hafifçe vorteks cihazıyla karıştırıldı.
- 65 °C'de çalkalayıcılı su banyosunda 1 saat bekletildi (Bu basamak 2 saatten fazla uygulandığında diğer basamaklar ve DNA eldesi olumsuz yönde etkilenir).
- Tüp su banyosundan çıkartılıp kapağı gevşetilerek havalandırıldı.
- Üzerine hızlı bir şekilde 10 mg/ml RNase stok solüsyonundan 125 µl eklenip 2-3 sn vorteks cihazıyla karıştırıldı.
- Tüpün tamamen soğumasına izin verilmeden 37 °C'de çalkalayıcılı su banyosunda 1 saat bekletildi.

### **Proteinlerin Çöktürülmesi**

- Su banyosundan çıkarılan numunenin üzerine 1.5 ml protein çöktürme solüsyonu eklenip 5-10 sn kuvvetli şekilde vorteks cihazıyla karıştırıldı.
- Proteinlerin çökmesini kolaylaştırmak amacıyla numune buz üzerinde 5 dk. bekletildi.
- 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılan numune 14000 g'de 24 °C'de 20 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant, alttaki protein peletine temas etmeden dikkatli bir şekilde 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.

### **DNA'nın Çöktürülmesi**

- Süpernatantın üzerine 0.7 katı hacimde izopropanol (-20 °C'de soğutulmuş) eklenip hafifçe alt üst edildi. DNA iplikleri görünür hale geldi.
- 1370 g'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.



- DNA peletinin üzerine 2.5 ml % 70 soğuk etanol (-20 °C) eklendikten sonra tüp hafifçe tıklatılarak peletin tüpün dibinden ayrılmasını sağlandı. Bu işlem tüm peletin % 70 etanolle yıkanmasını sağladı.
- 1370 g'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüp kurutma kağıdının üzerine ters çevirilerek havayla temas etmeden çekerocak altında 20 dk. boyunca kurumaya bırakıldı.
- Kuruma işlemi sonunda etanolü tamamen uzaklaştırılan DNA peleti 50 µl ultrasaf su ile çözüldü.
- 2-8 °C'de 1 gece bekletilerek DNA'nın suda çözünmesi sağlandı.

### 3.2.8. DNA Konsantrasyonu Ölçümü

DNA, RNA, oligonükleotidler ve mononükleotidler seyreltilmiş veya seyreltilmemiş sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığı altında sahip oldukları absorpsiyon A (optik yoğunluk, OD) üzerinden direkt olarak ölçülebilir.

Nükleik asitlerin konsantrasyonları genellikle  $A_{260}$  nm dalga boyunda ölçülerek belirlenir. Kontaminantların varlığı oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler  $A_{280}$  nm dalga boyunda absorpsiyon verdiği için  $A_{260}/A_{280}$  oranı nükleik asidin saflığını hesaplamak için kullanılır (Somma, 2011).

Bu oran  $\geq 1.6$  ise DNA saf olarak kabul edilir (Hu ve ark., 2010; Fazeli ve ark., 2010; Lee ve ark., 2010).

Ayrıca kullanılan kuvars küvetin üzerinde olası kirlilikten gelebilecek absorpsiyon belirlemek amacıyla  $A_{320}$  nm dalga boyunda ölçüm yapılarak bu değer  $A_{260}$  ve  $A_{280}$  ölçümlerinden çıkarılarak oranlama yapılması daha doğru bir yöntemdir. Buna göre oranlama  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$  şeklinde yapılır.

Beer-Lambert kuralına göre absorpsiyon (emilim) A (optik yoğunluk, OD olarak da adlandırılır) ile makromolekülün konsantrasyonu (c) arasında aşağıdaki denklemde verilen doğrusal bir ilişki vardır.

$$A = OD = \epsilon \cdot I \cdot c$$

$\epsilon$ : molar sönüm katsayısı (molar extinction coefficient), **c**: konsantrasyon ve **I**: küvetin ışık yolu uzunluğudur. 10 mm'lik bir ışık yolu ve 260 nm dalga boyu için  $A=1$  absorpsiyon, yaklaşık 50 µg/ml ( $\epsilon=50 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) çift zincirli DNA (dsDNA)'ya denk gelmektedir (Somma, 2011).

Çalışmada 10 mm ışık yollu kuvars mikroküvet kullanıldı ve konsantrasyon yukarıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

DNA ultrasaf su içinde çözüldüğünden ilk olarak suyun verdiği absorbans ölçülerek  $A_{260}=0$  olarak ayarlandı. Daha sonra örnek okutulurak  $A_{260}$ 'da verdiği absorbansa göre hesaplama yapıldı.

### **3.2.9. Hidroliz**

Hidroliz aşaması Siomek ve ark. (2007) yöntemine göre yapıldı. Bu aşamanın amacı DNA izolasyonunu takiben enzimler aracılığıyla (nükleaz P1 ve alkalın fosfataz) 8-oksodG nükleozidinin guanin bazından serbest kalmasını sağlayarak HPLC-ECD'de analiz edilebilir hale getirmektir. Bu amaçla;

- Spektrofotometrik olarak ölçülen DNA'nın 100 µg'ı kullanıldı.
- 0.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılan 100 µg DNA'nın üzerine 1.1 µl nükleaz P1 (1Ü/µl) ve 55 µl Nükleaz P1 tamponu eklenip vorteks cihazıyla karıştırıldı.
- 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 1 saat inkubasyona bırakıldı.
- Su banyosundan çıkarılan numunenin üzerine 30 µl 1M Tris-HCl tamponu (pH 8.5) ve ardından 5 µl (0.26 Ü/ µl) ALP eklenip vorteks cihazıyla karıştırıldı.
- 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 1 saat inkubasyona bırakıldı.
- İnkubasyonu tamamlanan numune filtre ünitesine (rejenere selüloz membran, 3000 NMWL) aktarılıp 20 °C'de 14000 g'de 40 dk. santrifüj edildi. (Filtre ünitesine numune aktarılmadan önce 300 µl ultrasaf su eklenip 20 °C'de 14000 g'de 40 dk. santrifüj edilerek ön yıkama yapıldı).
- Santrifüj sonrası numune insertli vialle alınarak HPLC- ECD/DAD sistemine enjeksiyona hazır hale getirildi.

### **3.2.10. HPLC-ECD ile 8-oksodG ve HPLC-DAD ile dG'in Analizi**

Analiz Siomek ve ark. (2007) ve Acworth (2011) yöntemine göre yapıldı.

## HPLC-ECD/DAD Cihaz Koşulları

- **Koruyucu Kolon:** C<sub>18</sub>, 5µm x 20 x 4.0 mm
- **Analiz Kolonu:** C<sub>18</sub>, 5µm x 250 x 4.6 mm
- **Mobil Faz:** 25 mM sodyum asetat, 12.5 mM sodyum sitrat, % 12 metanol, % 88 su (v/v), pH: 5
- **Akış Hızı:** 1 ml / dk. (izokratik)
- **Enjeksiyon Hacmi:** 20 µl
- **Kolon Fırını Sıcaklığı:** 31 °C
- **ECD:** ESA, Coulochem III
- **Guard Cell:** E = +850 mV
- **Analitik Cell:** E1 = +400 mV, E2 = +800 mV
- **DAD Dalga Boyu:** 254 nm
- **Oda Sıcaklığı:** 24 °C
- **Analiz Süresi:** 30 dk.

## Mobil Fazın Hazırlanması ve Sistemin Şartlandırılması

Mobil faz 25 mM sodyum asetat, 12.5 mM sodyum sitrat, % 88 ultrasaf su ile hazırlandıktan sonra glasiyel asetik asit ile pH 5'e ayarlandı. Daha sonra % 12 metanol ilave edildi. Hazırlanan mobil faz 0.22 µm PVDF membran filtreden süzöldükten sonra içerisindeki mikrobalonları elimine etmek amacıyla 10 dk. ultrasonik banyoda tutuldu.

Son olarak fazların birbirine iyice karışması için 10 dk. manyetik karıştırıcıda karıştırılıp HPLC-ECD/DAD sistemine hazır hale getirildi.

## 8-oksodG ve dG Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

### 8-oksodG Standart Çözeltisi

8-oksodG standardından ultrasaf su (pH 5.2) ile 0.1 mM (10<sup>5</sup> fmol/µl) stok çözelti hazırlandı (ESCODD, 1999). Stok standart çözelti 0.22 µm PVDF disk filtreden süzöldükten sonra seyreltmeler ile 31.25 fmol/µl, 35 fmol/µl, 50 fmol/µl, 62.5 fmol/µl, 100 fmol/µl, 125 fmol/µl, 250 fmol/µl konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltileri 20 µl enjeksiyon hacminde cihaza enjekte edildi. Analiz

sonucunda 625, 700, 1000, 1250, 2000, 2500 ve 5000 fmol 8-oksodG'e karşılık gelen alanlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizdirildi.

### **dG Standart Çözeltisi**

dG standardından ultrasaf su ile (pH 5.2) 1 mM (1 nmol/μl) stok çözelti hazırlandı. Stok standart çözelti 0.22 μm PVDF disk filtreden süzöldükten sonra seyreltmeler ile 0.05 nmol/μl, 0.15 nmol/μl, 0.2 nmol/μl, 0.25 nmol/μl, 0.3 nmol/μl, 0.35 nmol/μl, 0.5 nmol/μl konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltileri 20 μl enjeksiyon hacminde cihaza enjekte edildi. Analiz sonucunda 1, 3, 4, 5, 6, 7 ve 10 nmol dG'e karşılık gelen alanlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizdirildi.

### **3.2.11. HPLC Analiz Sonuçlarının Hesaplanması**

ESCODD, oksidatif DNA hasarı çalışmalarında analiz sonuçlarının hesaplanmasını 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG; yani hücresele DNA'daki her 10<sup>6</sup> normal deoksiguanozinde bulunan 8-oksodG sayısı olarak tanımlamaktadır (Collins ve ark., 2004). Bu oran fmol (10<sup>-15</sup> mol) düzeyinde ölçülen 8-oksodG lezyonunun nmol (10<sup>-9</sup> mol) düzeyinde ölçülen dG miktarına bölünmesi ile elde edilmektedir.

### **3.2.12. İstatistiksel Değerlendirme**

Veriler öncelikle Shapiro-Wilk testi ile normal dağılışa uygunluk testine tabi tutuldu ve normal dağılım gösterdikleri saptandı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (one way- ANOVA) uygulandı, gruplardan en az biri farklı görüldüğü takdirde, Tukey's HSD çoklu karşılaştırma testi ile ikişerli grup karşılaştırmaları yapıldı. Oksidatif DNA hasarı bakımından karaciğer ve böbrek arasındaki ilişki basit korelasyon testi (Pearson correlation test) ile analiz edildi.

Gruplar arası farkın önem derecesi  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı,  $p < 0.01$  olan değerler çok anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü Sonuçları

Karaciğer ve böbrek DNA örneklerinde ortalama  $A_{260}/A_{280}$  oranları değerlendirilerek nükleik asit saflığının kabul edilebilir düzeylerde ( $\geq 1.6$ ) olduğu belirlendi.

İzolasyonları yapılan DNA örneklerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7.** DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü sonuçları

	Karaciğer				Böbrek			
	A260	A280	A320	*DNA Konsantrasyonu	A260	A280	A320	*DNA Konsantrasyonu
Kontrol Grubu	0.341	0.216	0.003	1.59±0.01	0.435	0.273	0.002	1.60±0.003
Grup I (25 mg/kg)	0.457	0.289	0.013	1.60±0.02	0.448	0.282	0.003	1.59±0.01
Grup II (50 mg/kg)	0.417	0.266	0.012	1.59±0.01	0.454	0.289	0.004	1.58±0.005
Grup III (66.7 mg/kg)	0.295	0.188	0.009	1.59±0.01	0.361	0.228	0.002	1.58±0.01
Grup IV (100 mg/kg)	0.309	0.200	0.011	1.58±0.01	0.436	0.278	0.002	1.57±0.005
Grup V (200 mg/kg)	0.502	0.316	0.015	1.62±0.01	0.439	0.277	0.003	1.59±0.01

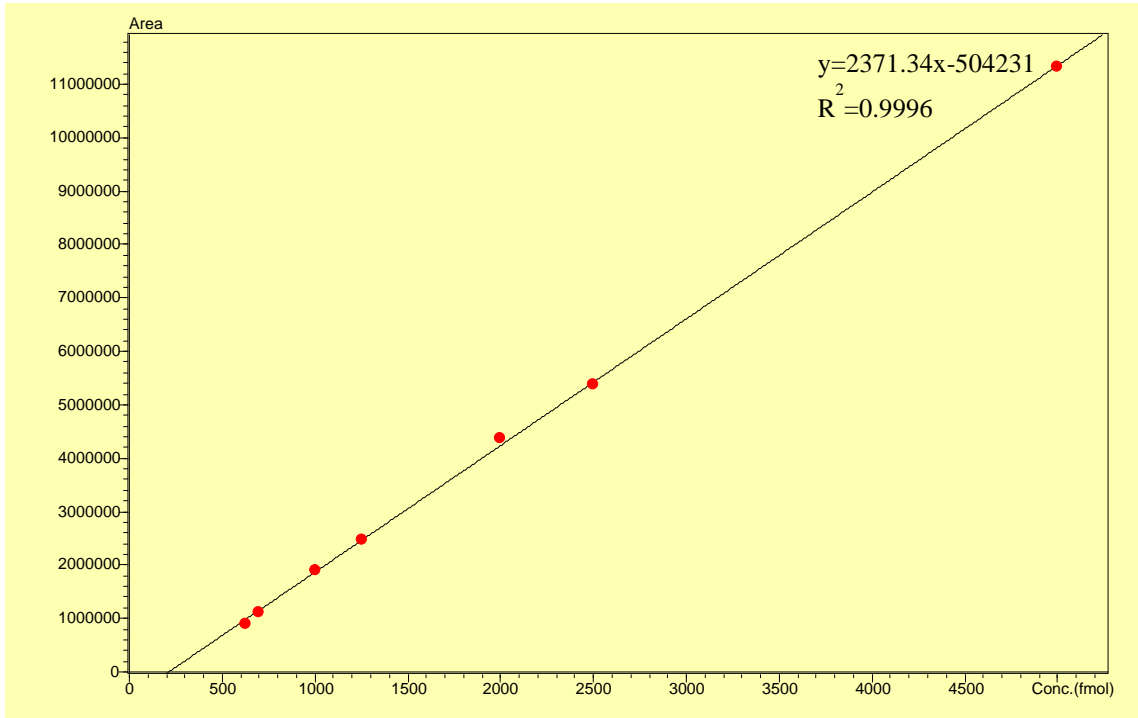
\*  $(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$ , Ortalama  $\pm$  Standart Sapma

## 4.2. 8-oksodG ve dG Standart Kalibrasyonları

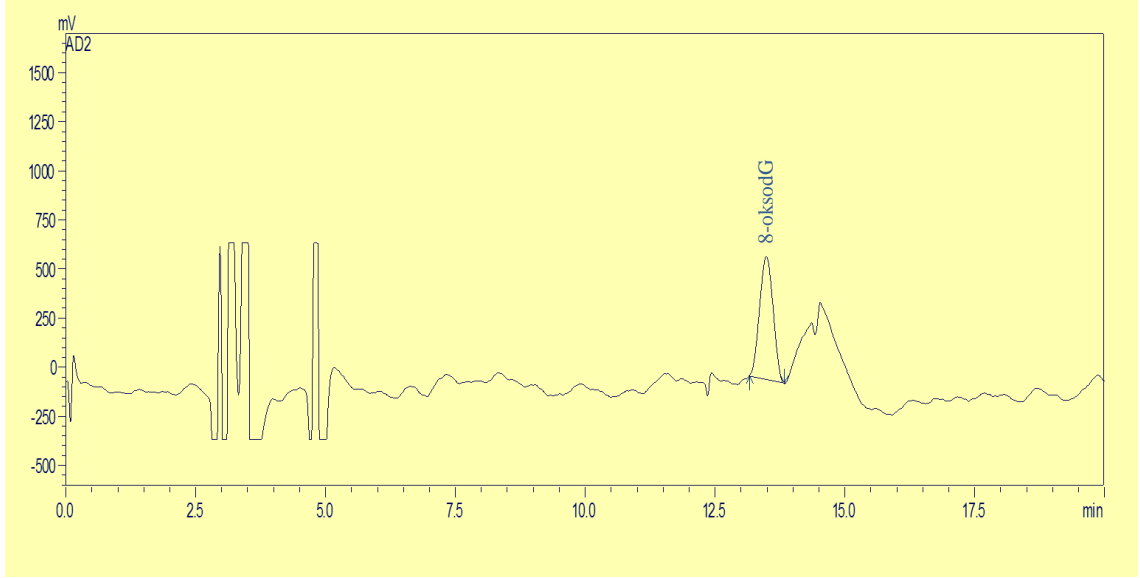
### 4.2.1. 8-oksodG Standart Kalibrasyonu

Alıkonma zamanı belirlenen 8-oksodG standardının 625, 700, 1000, 1250, 2000, 2500 ve 5000 fmol konsantrasyonlarındaki çözeltileri analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizdirildi. Kalibrasyon eğrisi Şekil 11, en yüksek konsantrasyondaki 8-oksodG standartına ait kromatogram Şekil 12, en düşük konsantrasyondaki 8-oksodG standartına ait kromatogram Şekil 13'de gösterilmiştir.

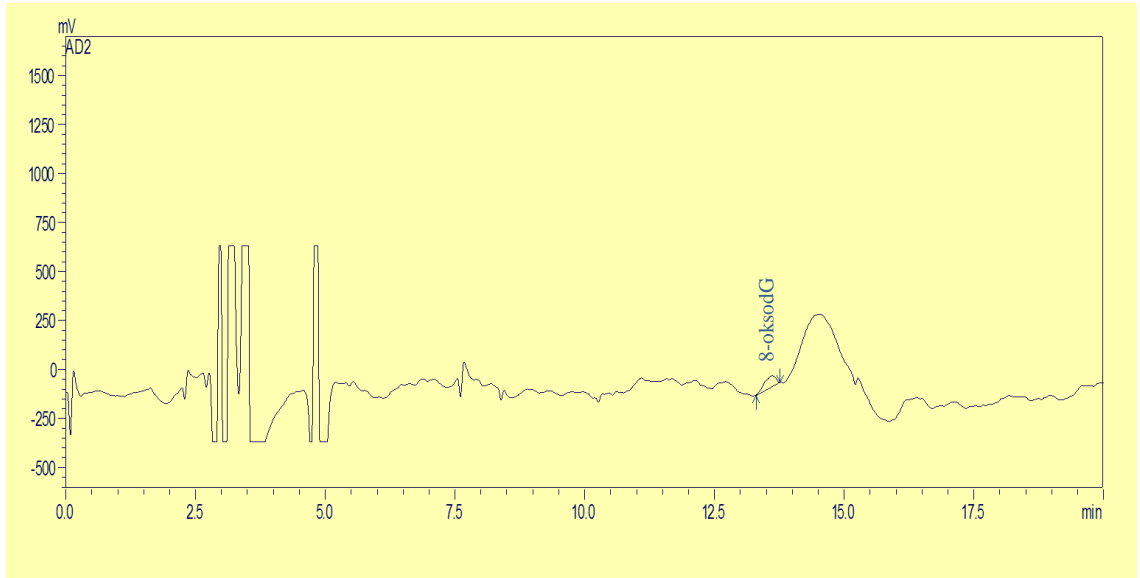
Kalibrasyon eğrisi çizdirilen bileşiğin metodun kesinlik (precision) ve gerçekliğiyle (accuracy) ilgili parametrelerden olan Tespit Alt Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Hesaplama Alt Limiti (Limit of Quantification, LOQ) değerleri hesaplandı. Nükleozide ait alıkonma zamanı, LOD ve LOQ değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.



Şekil 11. 8-oksodG standardına ait kalibrasyon eğrisi



**Şekil 12.** 5000 fmol 8-oksodG standardına ait HPLC-ECD kromatogramı

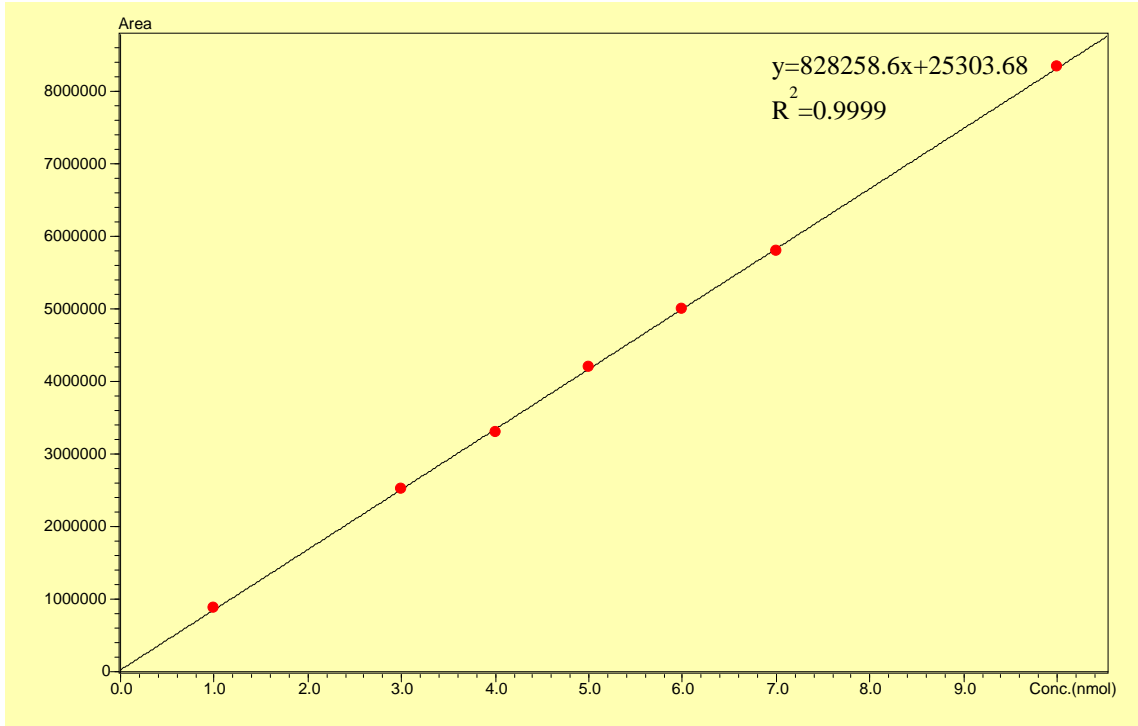


**Şekil 13.** 625 fmol 8-oksodG standardına ait HPLC-ECD kromatogramı

#### 4.2.2. dG Standart Kalibrasyonu

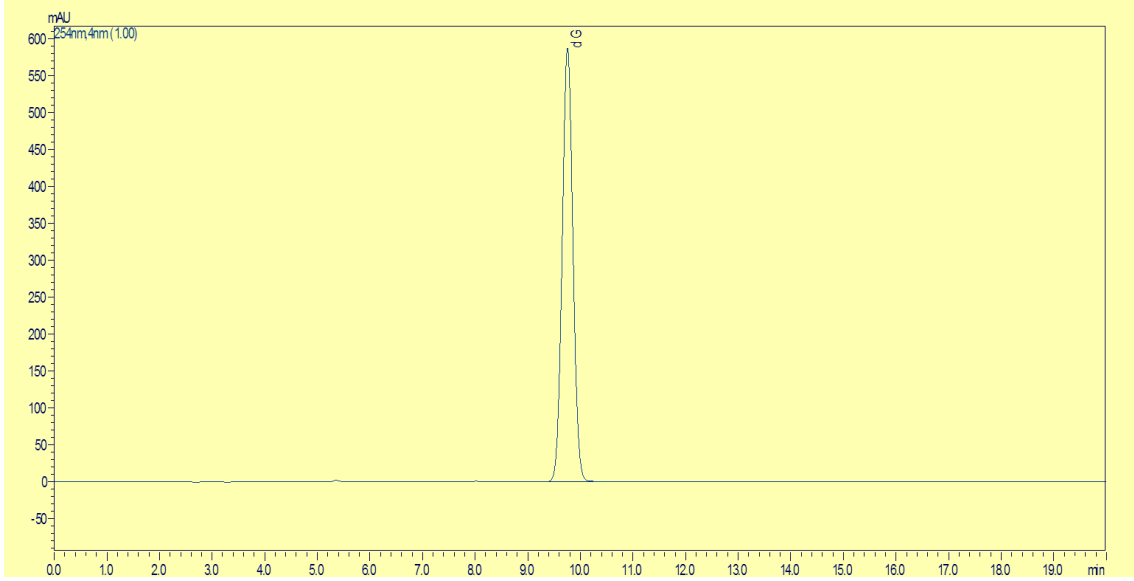
Alıkonma zamanı belirlenen dG standardının 1, 3, 4, 5, 6, 7 ve 10 nmol konsantrasyonlarındaki çözeltileri analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizdirildi. Kalibrasyon eğrisi Şekil 14, en yüksek konsantrasyondaki dG standartına ait kromatogram Şekil 15, en düşük konsantrasyondaki dG standartına ait kromatogram Şekil 16'da gösterilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi çizdirilen bileşiğin metodun kesinlik (precision) ve gerçekliğiyle (accuracy) ilgili parametrelerden olan Tespit Alt Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Hesaplama Alt Limiti (Limit of Quantification, LOQ) değerleri hesaplandı. Nükleozide ait alıkonma zamanı, LOD ve LOQ değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

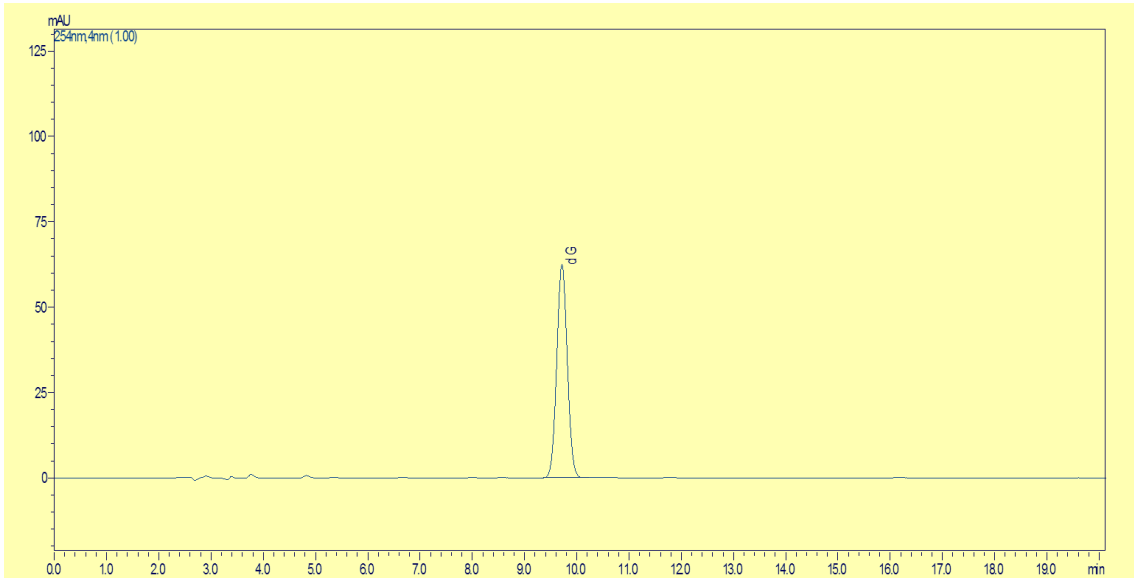


Şekil 14. dG standardına ait kalibrasyon eğrisi





Şekil 15. 10 nmol dG standardına ait HPLC-DAD kromatogramı



Şekil 16. 1 nmol dG standardına ait HPLC-DAD kromatogramı

**Tablo 8.** Standartlara ait, alıkonma zamanları, LOD ve LOQ değerleri

Standart	Alıkonma Zamanı (dk.)	LOD	LOQ
8-oksodG	13.4	37.27 fmol	112.93 fmol
dG	9.7	0.15 pmol	0.45 pmol

### 4.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularında 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG Düzeyleri ve Klinik Bulgular

Çalışmanın sonunda yüksek doz grubu olan grup 5'te (200 mg/kg) bulunan 1 numaralı hayvanda tortikollis (eğri boyun) durumu gözlemlendi, grup 2 (50 mg/kg) ve grup 4'te (100 mg/kg) bulunan birer adet deneme hayvanında mortalite gerçekleşti. Diğer deneme grubu hayvanlarında herhangi bir anormal klinik bulgu gözlemlenmedi.

Deneme sonunda analizleri yapılan karaciğer ve böbrek dokularında ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri Tablo 9'da gösterilmiştir.

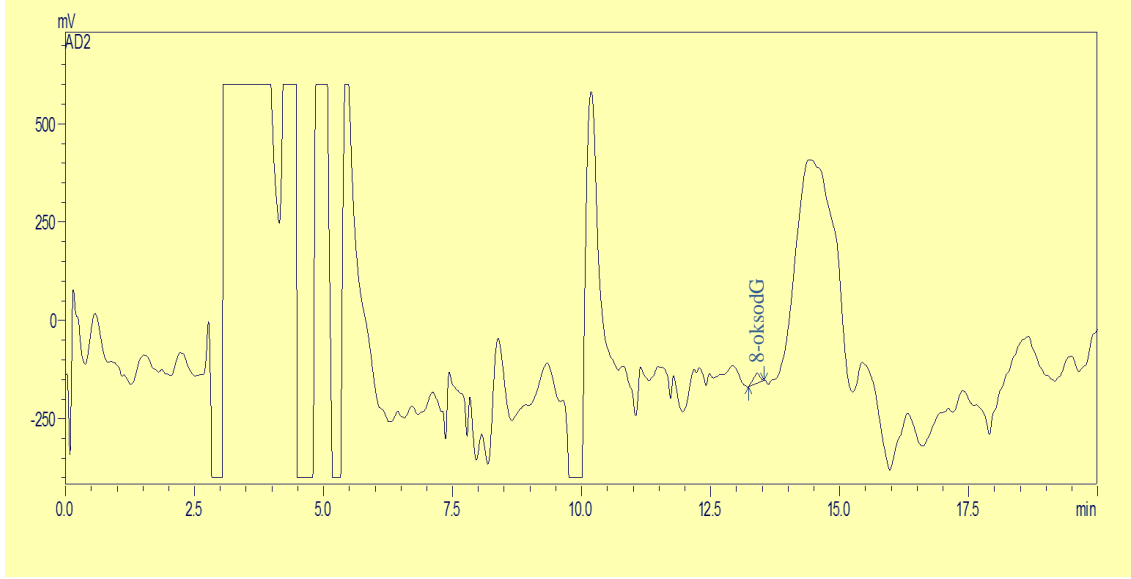
**Tablo 9.** Karaciğer ve böbrek dokularında ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri

Grup	n	Karaciğer 8-oksodG/10 <sup>6</sup> dG Ortalama±Standart Sapma	Minimum, Maksimum	Böbrek 8-oksodG/10 <sup>6</sup> dG Ortalama±Standart Sapma	Minimum, Maksimum
Kontrol	10	44.96 ± 12.66 <sup>a</sup>	32.93-73.00	39.07 ± 4.80 <sup>a</sup>	32.38-44.64
Grup 1	10	48.15 ± 7.43 <sup>a</sup>	38.39-60.57	39.06 ± 7.63 <sup>a</sup>	32.55-58.43
Grup 2	9	68.92 ± 20.66 <sup>ab</sup>	40.34-101.82	59.69 ± 14.22 <sup>ab</sup>	45.03-84.73
Grup 3	10	82.07 ± 14.15 <sup>b</sup>	58.33-107.93	61.13 ± 17.46 <sup>b</sup>	43.62-95.87
Grup 4	9	85.08 ± 28.50 <sup>b</sup>	61.78-155.32	65.13 ± 23.40 <sup>b</sup>	38.08-120.55
Grup 5	10	89.14 ± 21.73 <sup>b</sup>	56.68-136.33	72.66 ± 19.04 <sup>b</sup>	52.19-117.39

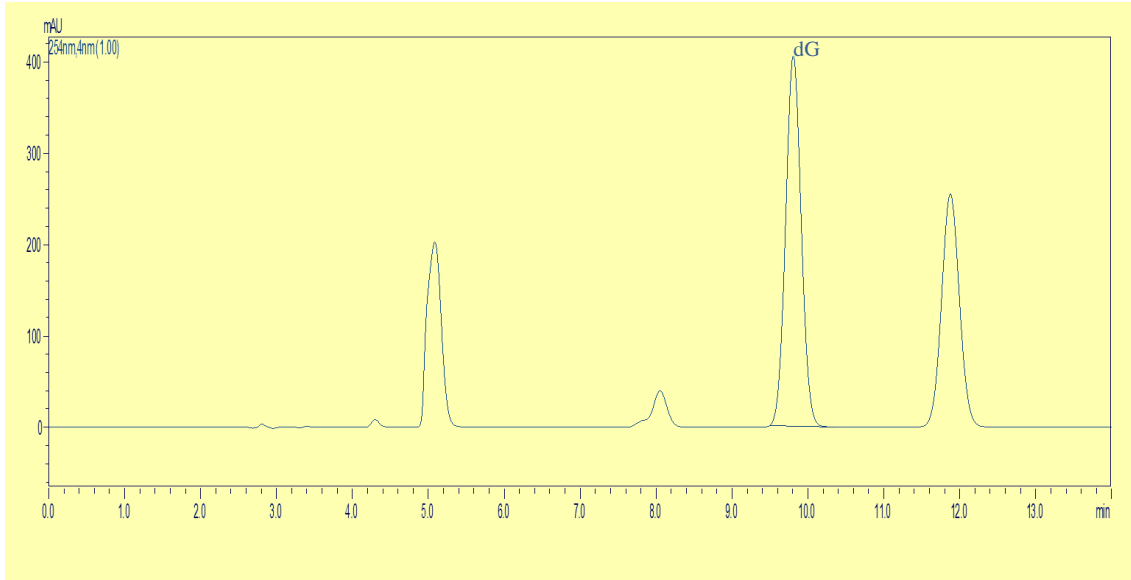
<sup>a,b</sup>Her sütunda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak gruplar arasındaki anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Analiz sonuçlarından elde edilen karaciğer ve böbrek dokularındaki ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG değerlerine göre gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Buna göre karaciğerdeki DNA hasarı bakımından; kontrol grubu ile grup 1 arasında istatistiksel

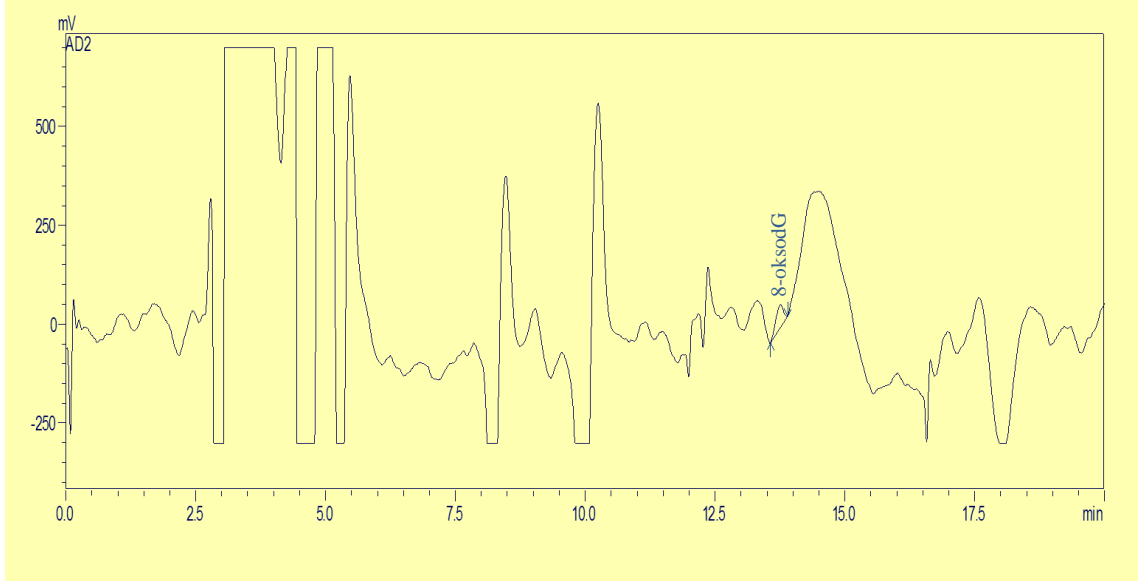
olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmazken grup 3, grup 4 ve grup 5 ile arasında çok anlamlı farklılık bulundu ( $p < 0.01$ ). Grup 2’de ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi hem kontrol grubu hem de 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinin yüksek bulunduğu grup 3, grup 4 ve grup 5’e yakınlık gösterdi. Karaciğer dokusunda DNA hasarının bu gruptan itibaren grup 3, grup 4 ve grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldiği gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Kontrol grubu karaciğer numunesine ait örnek kromatogramlar Şekil 17 ve 18, 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun karaciğer numunesine ait örnek kromatogramlar ise Şekil 19 ve 20’de gösterilmiştir.



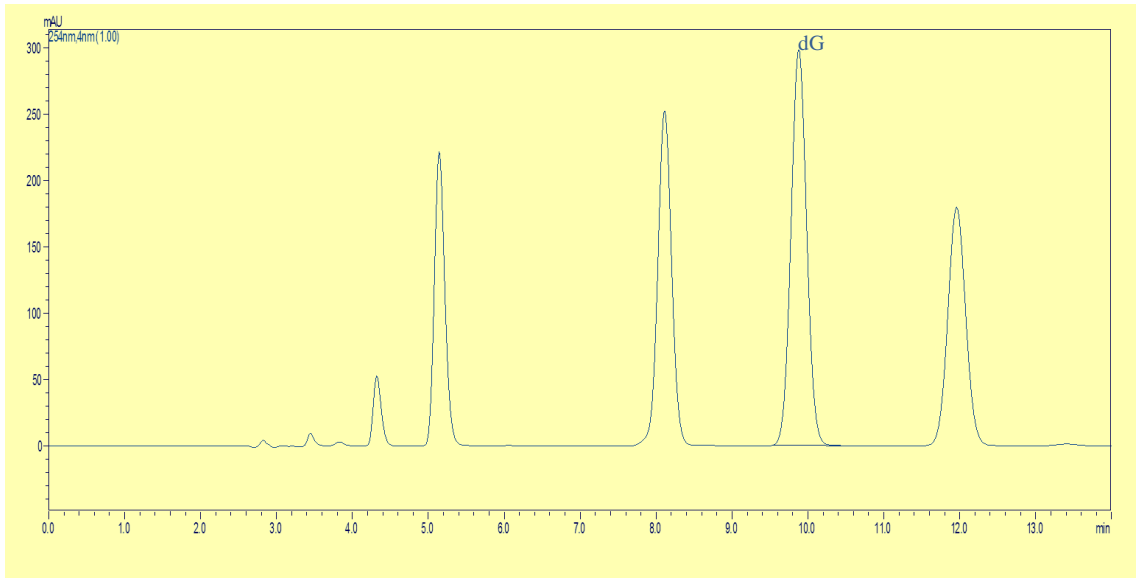
Şekil 17. Kontrol grubu karaciğer numunesine ait örnek HPLC-ECD kromatogramı



Şekil 18. Kontrol grubu karaciğer numunesine ait örnek HPLC-DAD kromatogramı

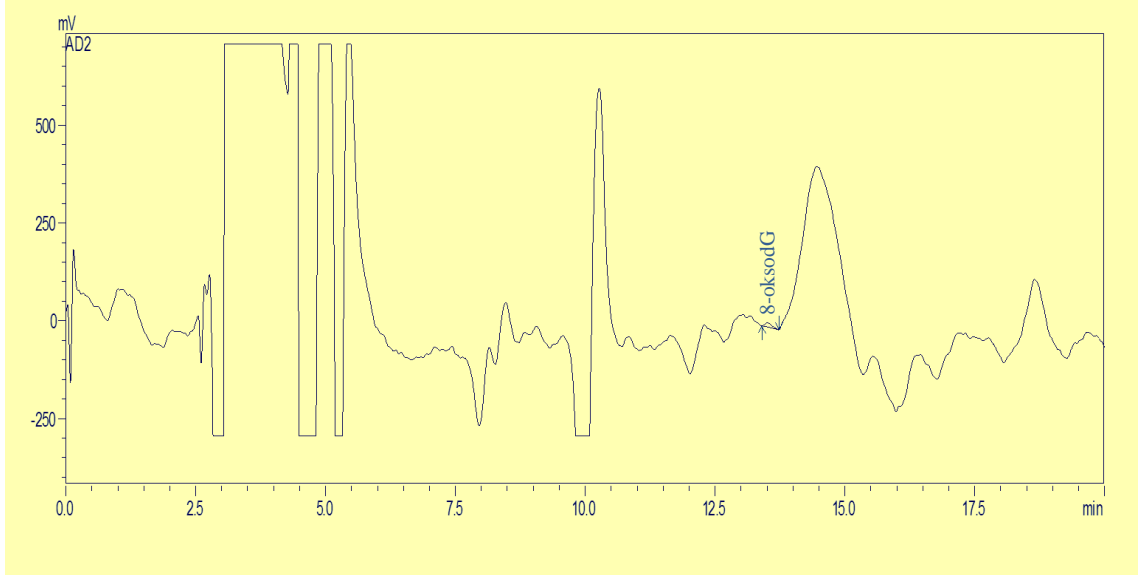


**Şekil 19.** 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun karaciğer numunesine ait örnek HPLC-ECD kromatogramı

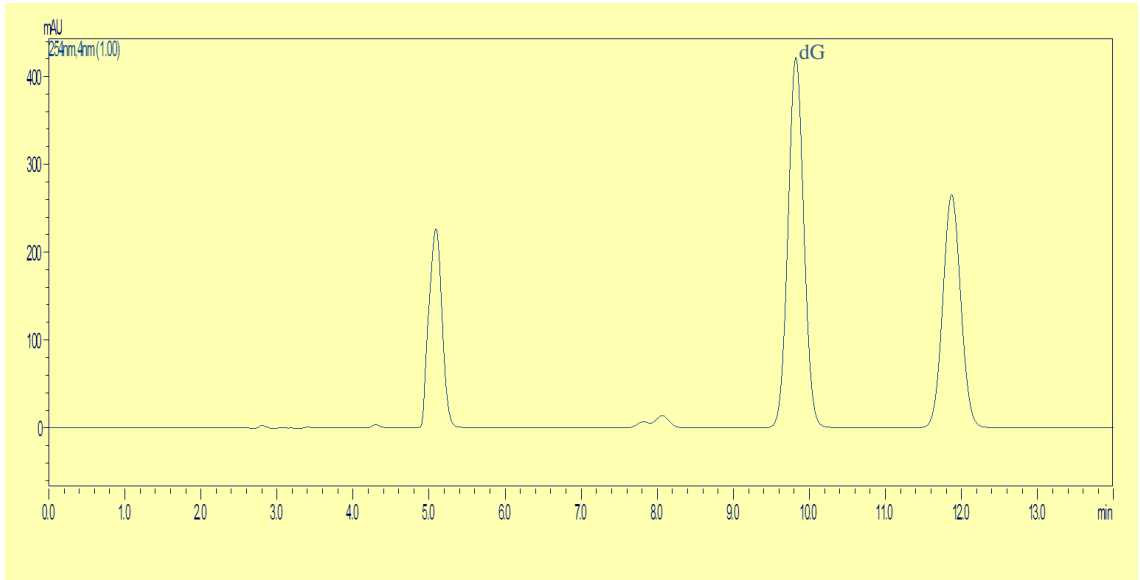


**Şekil 20.** 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun karaciğer numunesine ait örnek HPLC-DAD kromatogramı

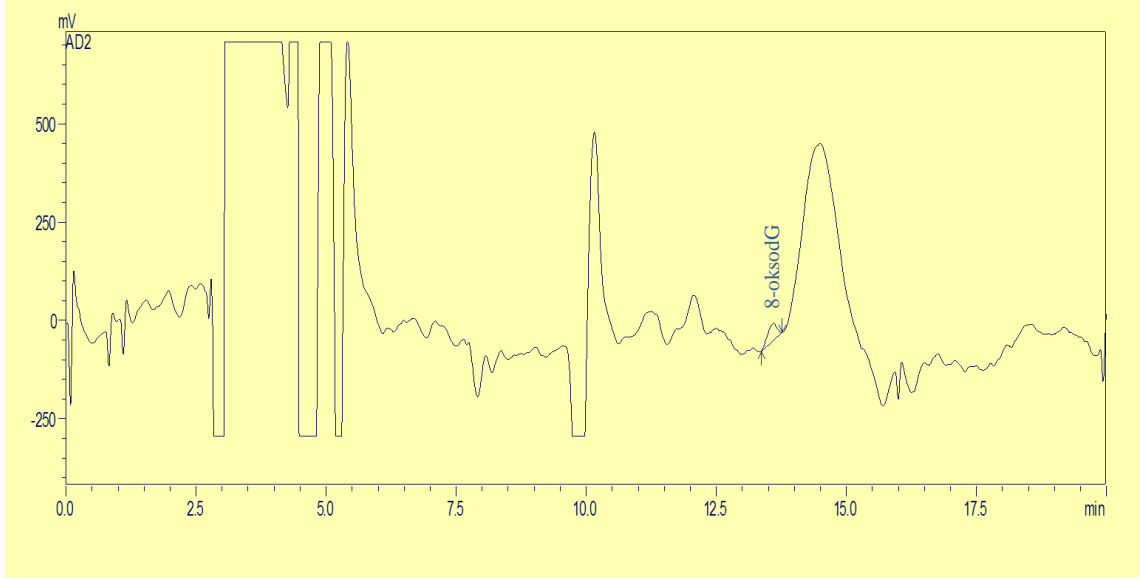
Böbrekteki DNA hasarı bakımından; kontrol grubu ve grup 1’de ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi aynı miktarda ölçüldü. Grup 2’de ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi hem kontrol grubu hem de 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinin yüksek bulunduğu grup 3, grup 4 ve grup 5’e yakınlık gösterdi. Karaciğerde olduğu gibi böbrekteki DNA hasarının da bu gruptan itibaren grup 3, grup 4 ve grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldiği gözlemlendi (p < 0.05). Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmadı (p > 0.05). Kontrol grubu böbrek numunesine ait kromatogramlar Şekil 21 ve 22’de, 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun böbrek numunesine ait kromatogramlar Şekil 23 ve 24’de gösterilmiştir.



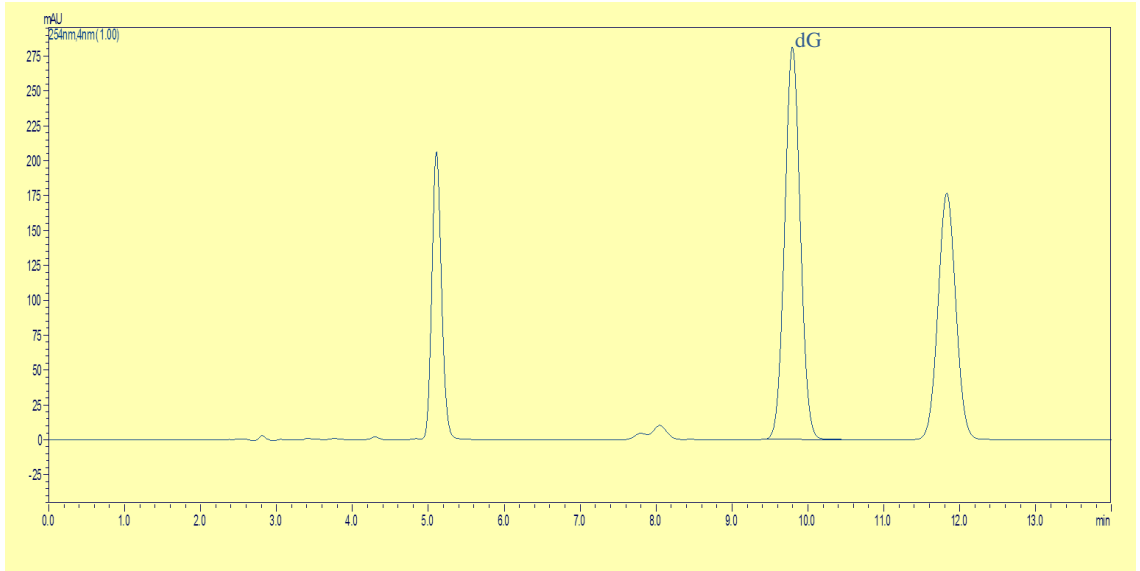
**Şekil 21.** Kontrol grubu böbrek numunesine ait örnek HPLC-ECD kromatogramı



**Şekil 22.** Kontrol grubu böbrek numunesine ait örnek HPLC-DAD kromatogramı



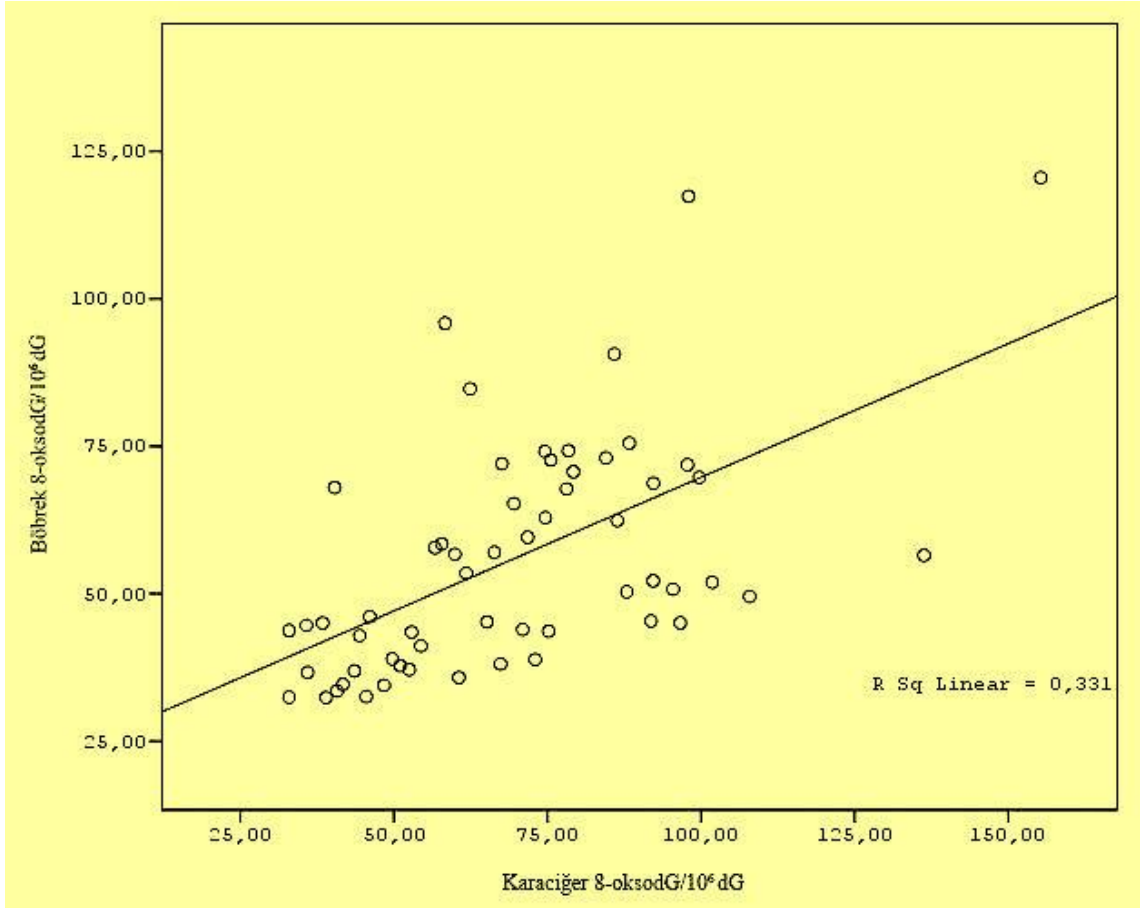
**Şekil 23.** 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun böbrek numunesine ait örnek HPLC-ECD kromatogramı



**Şekil 24.** 200 mg/kg d-fenotrin uygulanan grubun böbrek numunesine ait örnek HPLC-DAD kromatogramı



Böbrekte meydana gelen DNA hasarı karaciğere göre daha düşük düzeyde gerçekleşmiş olup istatistiksel olarak aralarında çok anlamlı pozitif korelasyon bulundu ( $p < 0.01$ ) (Şekil 25).



Şekil 25. Oksidatif DNA hasarı bakımından karaciğer ve böbrek arasındaki korelasyon grafiği

## 5. TARTIŞMA

ROS (hidroksil, süperoksit, lipit peroksitler vb.) aerobik organizmalarda hücrel metabolizma sonucu veya ekzojen kaynaklı şekillenen normal metabolizma ürünleridir (Pilger ve Rüdiger, 2006). Bu metabolitler organizmada genellikle endojen enzimatik (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve diğer peroksidazlar) ve enzimatik olmayan (glutatyon, arjinin, sitrülün, taurin, selenyum vitamin E, C ve A vb.) savunma mekanizmaları tarafından etkisiz hale getirilip hücre zarındaki lipitler ve diğer moleküllerle (proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, DNA, RNA) etkileşimlere girmeleri ve bu yapılarda hasara yol açmaları önlenmiş olur (Falcioni ve ark., 2010). Ancak çeşitli nedenlerle ROS üretiminin artması ve antioksidan savunma sistemlerinin bu metabolitlerle baş edememesi sonucu organizmada oksidan/antioksidan denge bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin DNA'da tek ve çift zincir kırılmaları, baz modifikasyonları, abazik bölgelerin oluşumu ile DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olduğu ve sonuç olarak Parkinson, Alzheimer, diyabet, ateroskleroz, neoplastik oluşumlar, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca ROS temizleyici enzim düzeylerindeki değişmelerin lipit peroksidasyona neden olarak toksikolojik olayları şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Tope ve Panemangalore, 2007).

Hücrel düzeyde pestisitlerin lipit peroksidasyonunu katalizlediği, ROS oluşumuna neden olduğu, antioksidan enzim düzeylerinin değiştirerek oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir (Abdollahi ve ark., 2004; Tope ve Panemangalore, 2007).

Pestisitlere akut veya düşük dozlarda uzun süreli kronik maruziyet sonucu şekillenen oksidatif stres, organizmada sitogenetik hasara yol açmakta ve sonuçta astım, solunum sistemi hastalıkları, alerjik dermatit gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bunun yanında pestisitlere uzun süreli düşük dozlarda maruziyet kan kanseri, mesane kanseri, pankreas kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (Daniels ve ark., 1997; Ji ve ark., 2001).

Karaciğer ve böbrek vücutta ksenobiyotik metabolizmasından sorumlu iki önemli organdır. Bu organ hücrelerinde yerleşim gösteren enzimler, özellikle sitokrom P450 ve flavin monooksijenazlar ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynarlar ve geniş çapta substrat seçicilikleriyle beraber inaktif bileşikleri yüksek derecede reaktif ve potansiyel kanserojenik ara ürünlere dönüştürebilirler. Yüklü

elektrofiller (elektron alma eğiliminde olan atom veya moleküller) hücresel proteinler ve nükleik asitlerle etkileşime girerek DNA hasarına ve bunun sonucunda genotoksisiteye yol açarlar.

Nükleik asitlerin oksidasyon ürünlerinden biri olan 8-oksodG, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir biyobelirtecidir. ROS ve DNA molekülü arasındaki tepkimenin sonucu olarak şekillenen 8-oksodG hücre içi ROS birikimi ve genotoksisite arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Mutajenik özelliği olan bu hasarlı ürün guanin bazının yerini alarak DNA replikasyonunu sürdürebilmekte ve ileriki aşamalarda DNA onarım mekanizmasını yavaşlatabilmektedir (Tope ve Panemangalore, 2007).

İlk defa Floyd ve ark. (1986) 8-oksodG lezyonunun HPLC ile etkin bir biçimde deoksiguanozinden ayrıldığını ve elektrokimyasal detektör ile çok hassas bir şekilde tespit edilebildiğini göstermişlerdir. Bu teknik günümüzde de dokuda çeşitli kimyasalların ve kanserojenik maddelerin yol açtığı DNA hasarı tespitinde çok hassas ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Valavanidis ve ark., 2009).

Piretroidlerin memelilerde yol açtığı oksidatif stres ile ilgili az sayıda çalışma bulunmakla beraber bazı piretroidlerin vücutta önemli doku ve organlarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunda potansiyel teşkil ettiği bildirilmiştir (Agrawal ve Sharma, 2010). Tip II piretroid grubunda olan lamda-sihalotrinin erkek Wistar ratların kan ve beyin dokusunda oksidatif strese yol açtığı ve vitamin C ile bu etkinin azaltıldığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada eritrositler ve beyin hücrelerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek düzeyde ölçülmüş, her iki dokuda da antioksidan enzim etkinliği değişmiştir (Fetoui ve ark., 2008). Yine Tip II piretroidlerden sipermetrinin rat beyin ve karaciğer dokularında oksidatif hasara yol açtığı, vitamin E ve allopurinol uygulamasıyla iyileşmenin sağlandığı gösterilmiştir (Giray ve ark., 2001).

Tez çalışmasında d-fenotrinin ratlarda Pİ LD<sub>50</sub> değeri baz alınarak hesaplanan doz uygulamaları sonucu karaciğer ve böbrekteki oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri HPLC-ECD/DAD yöntemiyle ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre karaciğerdeki 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinde, kontrol grubu ile en düşük dozun uygulandığı grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmazken grup 3, grup 4 ve grup 5 ile arasında çok anlamlı farklılık bulundu (p < 0.01). Grup 2'deki ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi hem kontrol grubu hem de 8-

oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinin yüksek bulunduğu grup 3, grup 4 ve grup 5'e yakınlık gösterdi. Karaciğer dokusunda DNA hasarının bu gruptan itibaren grup 3, grup 4 ve grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldi. Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmadı (p > 0.05).

Böbrekte, kontrol grubu ve en düşük dozun uygulandığı grup 1'de ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi aynı miktarda ölçüldü. Grup 2'de ortalama 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyi hem kontrol grubu hem de 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeylerinin yüksek bulunduğu grup 3, grup 4 ve grup 5'e yakınlık gösterdi. Karaciğerde olduğu gibi böbrekteki DNA hasarı da bu gruptan itibaren grup 3, grup 4 ve grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldi (p < 0.05). Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuçlar Tip I piretroid olan d-fenotrine Pİ yolla 50 mg/kg ve üzerindeki dozlarda 14 gün süre ile maruz kalındığında karaciğer ve böbrekte oksidatif DNA hasarı şekillendiğini göstermektedir.

Piretroidlerin organizmada metabolize olarak yıkımlanması çoğu memeli türlerinde benzer yolu izlemektedir. Genel olarak piretroidler gastrointestinal sistemde hidrolize olup emildikten sonra hızlı bir şekilde metabolize olurlar. Bu işlem metil grupları ve aromatik halkaların oksidasyonu, ester bağının hidrolizi ve konjugasyon tepkimeleri (glukuronid, glisin, taurin, sülfat ve/veya glutamat ile konjuge edilmiş metabolitler) sonucu bileşiğin metabolitlerine dönüştürülmesi şeklinde olmakta ve bu tepkimeler karaciğer, böbrek ve diğer organlarda gerçekleşmektedir. Piretroidlerin karaciğer mikrozomal ilaç metabolizasyon fonksiyonu üzerindeki etkisi hakkında literatürde kısıtlı bilgi bulunmaktadır (Anadon ve ark., 2009). Carlson ve Shoening (1980), ratlarda farklı dozlarda permetrin uygulaması sonrasında karaciğerde mikrozomal sitokrom P450 ve NADPH-sitokrom c redüktaz enzimlerinin salınımının gerçekleştiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde deltametrinin beyin ve karaciğerde CYP1A1/2 ve CYP2B1, siflutrin ve lamda sihalotrinin CYP1A1/2 ve CYP4A1 enzimlerini etkinleştirdiği bildirilmiştir (Dayal ve ark., 1999; Martinez-Larranaga ve ark., 2002). Ayrıca pestisitlerin de dahil olduğu birçok kimyasal maddenin metabolizmasında rol alan CYP2E1 enziminin ROS üretimi ile ilişkili olduğu ve bu enzimin salınımının serbest radikal oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (Bolognesi, 2003). İn vitro olarak insan ve ratların karaciğer mikrozomlarında yapılan çalışmada in vivo mekanizmaya benzer şekilde piretroidlerin ester bağı hidrolizine ve oksidasyona

uğradığı bildirilmiştir. Ayrıca trans-fenotrinin metabolizmasında oksidasyondan sorumlu sitokrom P450 enzimlerinden insanda CYP2B6, 2C19, 2C9 ve 2D6, ratta CYP1A1, 2C6, 2C11 ve 3A2 izoformlarının etkinleştirildiği gösterilmiştir (Kaneko, 2011). Ksenobiyotiklerin metabolizması sonucu mikrozomal sitokrom P450 enzim sistemi aktivasyonunun ROS üretimine neden olduğu bilgisi ışığında d-fenotrinin bu mekanizma ile karaciğer hücrelerinde ROS üretimine ve bundan kaynaklı DNA hasarına yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Ratlarda böbrekler karaciğerdekinin % 13'ü kadar sitokrom P450 enzim içeriğine sahiptir (Gad ve Johnson, 2007). Böbrekteki DNA hasarı düzeyinin de karaciğere göre daha düşük düzeyde olmasının d-fenotrinin böbreklerde metabolizması esnasında daha az miktarda enzim salınımı ve ROS üretimine neden olabileceği düşünülmüştür. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara paralel olarak Patel ve ark. (2006) yaptığı çalışmada sipermetrin erkek Swiss albino farelere Pİ yolla 5 gün boyunca 12.5, 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda uygulanmış ve beyin, böbrek, karaciğer, dalakta gelişen DNA hasarının doza bağımlı olarak artış gösterdiğini ve organlar arasındaki DNA hasarı düzeyi farklılığının dokulardaki onarım genleri bazal düzeylerinin ve sitokrom P450 enzim düzeylerinin farklılık göstermesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda bazı piretroid insektisitlerin ve diğer gruptaki pestisitlerin çeşitli dokularda farklı mekanizmalarla lipit peroksidasyona yol açtığı gösterilmiştir. Kale ve ark. (1999) erkek Wistar ratlara sipermetrin ve fenvaleratın oral LD<sub>50</sub> değerinin % 0.001 oranında tek doz olarak uygulamışlar ve uygulama sonrası hayvanlar 0, 1, 3, 7 ve 14. günlerde ötenazi edilerek ve karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda bu bileşiklerin lipit peroksidasyon yapıcı etkisi ve antioksidan sistem üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre 14. günün sonunda karaciğer, böbrek ve kalpte lipit peroksidasyonda artışa bağlı olarak oksidatif stres geliştiğini göstermişlerdir. Bu durumun olası nedenini dokulardaki SOD ve CAT aktivitesindeki artışa bağlamışlar ve bu artışın piretroid toksisitesi sonucunda oluşan ROS üretimine bir cevap olarak şekillendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak piretroid toksisitesinde hücrelerde üretilen ROS'nin lipit peroksidasyona neden olduğu ve antioksidan sistemde değişimlere yol açtığı ve bu bilgiler ışığında oksidatif stresin piretroid toksisitesinin patogenezinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Yine benzer başka bir çalışmada lamda sihalotrin ve fenitrotiyon kombinasyonunun antioksidan savunma

sistemi ve rat karaciğer fonksiyonu enzimleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu insektisitlerin doza bağımlı olarak glutatyon S-transferaz (GST), SOD ve CAT enzim aktivitelerinin önemli derecede inhibisyonuna ve GSH'un indirgenmesine neden olduğu bildirilmiştir. Buna ilave olarak transaminazlar (AST, ALT) ve fosfatazların (AcP, ALP) aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (El-Demerdash, 2011).

Serbest radikal temizleyici enzimlerden CAT  $H_2O_2$  ile SOD ise  $O_2^{\bullet-}$  ile tepkimeye girip bu bileşikleri etkisizleştirerek organizmayı zararlı etkilerinden korurlar. El-Demerdash (2011) yaptığı çalışmada piretroid insektisit olan lamda sihalotrinin rat karaciğer hücrelerinde GST, SOD, CAT düzeylerinde önemli derecede azalmaya yol açarak antioksidan enzim sistemi yetmezliğine ve bunun sonucu olarak ROS üretimine sebep olduğunu bildirmiştir. Serbest radikallerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bu enzimlerin yetersizliği, lipid peroksidasyon, DNA hasarı ve hücre ölümünden sorumlu  $\bullet OH$  radikalinin kaynağı olan  $H_2O_2$ 'in ortamda birikmesine neden olur (El-Demerdash, 2011). DNA'da 8-oksodG oluşumunda ROS, özellikle de  $\bullet OH$  radikalleri,  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'in sorumlu olduğu bilgisi doğrultusunda (Mouret ve ark., 1991) ratlarda d-fenotrine maruziyet sonucu karaciğer ve böbrek DNA'sında meydana gelen 8-oksodG oluşumunun olası bir diğer mekanizmasının antioksidan enzim sistemi etkinliğinin zayıflatılması sonucu ortama salınan ROS'nin DNA'da hasar oluşturduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Çeşitli yöntemlerle yapılmış hücre ve dokularda oksidatif DNA hasarının önemli göstergesi olan 8-oksodG/ $10^6$  dG düzeylerinin ölçümlerine dayalı pestisitlerin neden olduğu DNA hasarı çalışmaları bulunmaktadır.

De Zwart ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) erkek Wistar ratlara Pİ yolla 0.25, 0.50 ve 1.00 ml/kg dozlarda tek seferde uygulanmış ve idrar ve karaciğer 8-oksodG/ $10^6$  dG düzeyleri HPLC-ECD yöntemiyle analiz edilmiştir. Karbon tetraklorürün en yüksek dozunun (1.00 ml/kg) uygulandığı gruptaki hayvanların karaciğerinde ölçülen 8-oksodG/ $10^6$  dG düzeyi ile ( $129 \pm 39$ ) kontrol grubu 8-oksodG/ $10^6$  dG düzeyi ( $106 \pm 39$ ) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır.

Lin ve ark. (2002) herbisit olarak kullanılan ve farelerde kansere yol açtığı bilinen pentaklorofenol (PCP) bileşiğinin karsinojenik etkisinin ilaç metabolizması sırasında oluşan ROS ile ilişkili olabileceğini düşünmüşler ve aynı zamanda bu bileşiğin

türler arasındaki kanser yapıcı etkisini araştırmak amacıyla ratlara tek doz 30, 60, 120 mg/kg ve beş gün boyunca 30, 60 mg/kg dozda PCP uygulamışlardır. Bu hayvanlardan elde edilen karaciğer dokuları ve günlük 60 mg/kg PCP ile beslenen iki yıl süreli karsinojenite testine tabi tutulmuş ratların karaciğer dokularındaki 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyleri HPLC-ECD yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tek seferde ve beş gün süreyle PCP'e maruz kalmış ratların karaciğer 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyinde artış gözlemlenmezken karsinojenite testine tabi tutulmuş ratlarda kontrol grubuna göre iki kat artış belirlenmiştir. Sonuç olarak PCP'e kronik maruziyet sonucunda 8-oksodG/10<sup>6</sup> dG düzeyinin yükseldiğini ancak bu artışın rat karaciğerinde kanser oluşumuna yol açmadığını göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada yine herbisit olarak kullanılan parakuatın rat karaciğer ve akciğerinde HPLC-ECD yöntemiyle oksidatif DNA hasarı yapıcı etkisi araştırılmış; bu amaçla erkek Wistar ratlara 20 mg/kg dozunda Pİ yolla parakuat uygulamasını takiben hayvanlar bir ve beşinci günün sonunda otenazi edilerek karaciğer ve akciğer dokularında 8-oksodG düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmadan sağlanan verilerle parakuatın belirtilen organlarda önemli sayılabilecek oksidatif DNA hasarına yol amadığı sonucuna varılmıştır (Sorensen ve Loft, 2000).

Lodovici ve ark. (1997) HPLC-ECD yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada difenilamin (0.09-1.4 mg/kg) ve klorotalonilin (0.13-1 mg/kg) erkek Wistar ratların karaciğerinde doza bağımlı olarak 8-oksodG düzeyini artırdığı ve oksidatif hasara yol açtığını tespit etmişlerdir.

Yaygın olarak ts formunda kullanılan bir diğer pestisit fosfinin rat böbrek ve kalp dokusunda oksidatif DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Hsu ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada erkek Wistar ratlara Pİ yolla 4 mg/kg dozunda fosfin maruziyetinde şekillenen oksidatif DNA hasarında endojen GSH'un koruyucu etkisi ve böbrek ve kalp dokusundaki zehirliliği araştırılmış, bu pestisit GSH, GSH peroksidaz ve CAT enzim düzeylerini önemli derecede azalttığı, lipit peroksidasyon (MDA) ve DNA oksidasyonunu (8-oksodG) artırdığını göstermişlerdir.

Comet yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada sipermetrinin fare beyin, böbrek, karaciğer, dalak, kemik iliği ve lenfosit hücrelerinde genotoksik etkisi araştırılmış, deney planında erkek Swiss albino farelere 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/kg dozlarda beş gün boyunca Pİ yolla sipermetrin uygulaması sonucunda tüm organlarda

doza bağımlı olarak DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) derecede artış meydana geldiği gösterilmiştir (Patel ve ark., 2006).

Organik fosforlu pestisitlerden malatyonun rat beyin dokusu ve periferel kan hücrelerindeki DNA hasarı yapıcı etkisinin Comet yöntemi kullanılarak analiz edildiği çalışmada 100 ve 150 mg/kg dozlarda Pİ yolla akut ve kronik olarak malatiyona maruz kalan ratların hipokampus ve periferel kanında DNA hasarında artış meydana geldiği bildirilmiştir (Reus ve ark., 2008).

Saquib ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada sistemik bir fungusit olan metil tiyofanatın oksidatif DNA hasarı yapıcı etkisi  $^{32}\text{P}$ - post labeling yöntemi ile analiz edilmiş,  $37^\circ \text{C}$ 'de 60 dk. boyunca 50 ve 100  $\mu\text{M}$  yoğunluklarda metil tiyofanat ile muamele edilen buzağı timus DNA'sında 8-oksodG düzeylerinin herhangi bir uygulama yapılmamış örneğe göre artış gösterdiği ( $p < 0.05$ ) bildirilmiştir.

Organizmada oksijen metabolizmasının sonucunda normal koşullarda da sürekli olarak ROS üretilmekte ve bu metabolitlerin DNA ile etkileşime girmesi sonucunda hücrelerde bazal düzeyde DNA baz lezyonları (8-oksodG) oluşmaktadır (Valavanidis ve ark., 2009). ESCODD'un gerçekleştirdiği denemelere göre farklı laboratuvarlarda farklı kromatografik tekniklerle analiz edilen buzağı timus bazal hücresel 8-oksoGua / 8-oksodG düzeyleri de farklılık göstermektedir (Dizdaroglu ve ark., 2002). Ayrıca laboratuvarlarda kullanılan çeşitli DNA izolasyon yöntemleri de bu düzeylerin ölçüm sonuçlarını etkilemektedir. Örneğin, fare karaciğer mitokondrial DNA (mtDNA)'sında HPLC-ECD yöntemi ile 8-oksodG/dG düzeyi  $25 / 10^5$  ölçülmüşken bu oran GC-MS yöntemi ile  $700 / 10^5$  olarak bulunmuştur. GC-MS yöntemi ile yapılan analizde belirtilen oranın yüksek ölçülmesinin nedeninin formik asit ile türevlendirme aşamasında DNA'da meydana gelen yapay oksidasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Kasai, 1997).

Schmerold ve Niedermüller (2001) tarafından yapılan çalışmada genç ve yaşlı Sprague-Dawley ratların 12 farklı organ hücresel DNA'larında bazal 8-oksodG düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmada DNA izolasyonunda Qiagen hazır DNA izolasyon kiti kullanılmış, enzimatik hidrolizleri nükleaz P1 ve alkalın fosfataz enzimleriyle yapılan DNA örnekleri HPLC-ECD yöntemiyle analiz edilmiştir. Genç ratların organlarındaki 8-oksodG düzeyleri 10-90  $\mu\text{mol} / \text{mol dG}$  ( $10-90$  8-oksodG/ $10^6$  dG) olarak ölçülmüş en yüksek oranlar sırasıyla yemek borusu (90.3), kas (61.6), beyin



(65.5), karaciğer (59), böbrek (34.5), dalak (57.4) ve testislerde (63.4) tespit edilmiştir. Akciğer, kalp, ince ve kalın bağırsaklardaki değerler 28-38  $\mu\text{mol}$  8-oksodG / mol dG arasında bulunmuştur. Yaşlı rat organlarında bu değerler yemek borusu (100), kas (80), beyin (51.5), karaciğer (168.8), böbrek (163), dalak (51.2) ve testislerde (43.1) tespit edilmiştir. Akciğer, kalp, ince ve kalın bağırsaklardaki değerler 33-64  $\mu\text{mol}$  8-oksodG / mol dG arasında bulunmuştur. Tez çalışmasında sözkonusu çalışma ile benzer şekilde hazır kit kullanılarak izole edilen organ DNA'larının enzimatik hidrolizleri nükleaz P1 ve alkalın fosfataz enzimleri ile yapıp HPLC-ECD/DAD yöntemi ile analiz edildi. Çalışmanın sonucunda bazal 8-oksodG/ $10^6$  dG düzeyleri karaciğerde  $44.96 \pm 12.66$  ve böbrekte  $39.07 \pm 4.80$  değerlerinde ölçüldü. Tespit edilen bu değerler hemen hemen aynı şartların kullanıldığı Schmerold ve Niedermüller (2001)'in ölçüm sonuçları ile paralellik gösterdi.

Başka bir çalışmada genç ve yaşlı (1-24 aylık) Fischer 344 ratların çeşitli organlarında (karaciğer, böbrek, beyin, bağırsak ve testis) 8-oksodG düzeyleri 8 ila 73 /  $10^6$  dG aralığında bulunmuştur (Fraga ve ark., 1990).

Anson ve ark.'nın (1999) yaptığı çalışmada genç ve yaşlı Wistar ratların karaciğerinde GC-MS yöntemi ile 8-oksoGua/ $10^6$  Gua düzeyleri ölçülmüş ve düzeyler genç ratlarda  $263 \pm 67$ , yaşlı olanlarda ise  $149 \pm 34$  lezyon olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada DNA izolasyonunda yapay oksidasyona yol açtığı bilinen fenol/kloroform karışımı kullanılmış ve yine yapay oksidasyonun kaynağı olabileceği bildirilen formik asit türevlendirmesi yapılmıştır. Çalışmada oldukça yüksek bulunan bu düzeylerin muhtemelen yapay oksidasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında yapay oksidasyonları minimize etmek amacıyla dokuların DNA izolasyonunda fenol/kloroform yöntemi yerine hazır kit kullanıldı ve örnek işleme esnasında demirin ( $\text{Fe}^{+2}$ ) katalizlediği oksidasyon tepkimelerini önlemek için kitin ihtiva ettiği tüm tampon çözeltilere metal şelatörü olan desferoksamin mesilat eklendi. Ayrıca düşük miktarlarda ( $<100 \mu\text{g}$ ) DNA ile çalışmak bir diğer yapay oksidasyon nedeni olduğundan (Guetens ve ark., 2002) her bir örnek için  $100 \mu\text{g}$  DNA kullanıldı. Elde edilen ölçüm sonuçları benzer izolasyon ve analiz yöntemlerinin (HPLC-ECD) kullanıldığı çalışmalarla paralellik gösterdi.

DNA hasarı çalışmalarında ölçümlerinin en sık yapıldığı, DNA diziliminde G-C A-T dönüşümüne neden olarak mutasyona yol açtığı kanıtlanmış biyobelirteç olan

8-oksodG'in düşük düzeylerde (pmol/fmol) tespit edilebilmesi esastır. HPLC-ECD yöntemi oldukça hassas, fmol düzeylerinde 8-oksodG ölçümlerine olanak sağlayan ve laboratuvarlarda en sık kullanılan analitik tekniklerden biridir (Valavanidis ve ark., 2009). Bu teknik, en az 100 µg DNA analiz edildiğinde yaklaşık olarak 50 fmol veya 2 lezyon / 10<sup>6</sup> dG miktarında tespit limitlerine kadar imkan sağlar (Powell ve ark., 2005).

Tez çalışmasında yöntemin hassasiyetini gösteren tespit alt limiti (LOD) 8-oksodG için 37 fmol (10.5 pg) olarak hesaplandı ve bu değer yöntemin oldukça hassas olduğunu gösterdi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde insan ve hayvanların daha kaliteli bir yaşam sürdürebilmelerine olanak sağlamak amacıyla veteriner hekimliği, tarım uygulamaları ve çeşitli vektörel hastalıkların önüne geçmede kullanılan geleneksel pestisitlerin (OF, OK vb.) yerini hedef canlılarda oldukça zehirli ancak memelilerde son derece güvenli olan sentetik piretroid grubu insektisitler devralmıştır. Bu maddelerin doğru ve amacına yönelik kullanımlarının çok önemli faydaları yanında bilinçsiz kullanımlarının sonucu olarak insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından önemli riskler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çeşitli şartlarda farklı yollarla ve farklı dozlarda bu kimyasallara maruz kalan insan ve hayvanlarda organizmadaki zararlı etkilerinin araştırılması önem arz etmektedir.

Son yıllarda genetik toksikoloji, birçok kimyasal maddenin DNA üzerinde meydana getirdiği etkilerin, hangi mekanizmalarla hasara yol açtığı, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin araştırılmasında gerekli hale gelmiştir.

Tez çalışmasında erkek Wistar Albino ratlara tekrarlanan maruziyette (14 gün) Pİ yolla farklı dozlarda tip I piretroid insektisitler grubundan olan d-fenotrin uygulandı ve bu bileşiğin ksenobiyotik metabolizmasından sorumlu öncül organlar olan karaciğer ve böbrekteki oksidatif DNA hasarı yapıcı etkisi HPLC-ECD/DAD yöntemiyle analiz edildi. Çalışmanın sonucunda d-fenotrinin belirli dozlarda böbrekte daha düşük olmak üzere her iki organda da oksidatif DNA hasarına yol açtığı belirlendi. Yapılan çalışmalarda nörotoksik olduğu bilinen sentetik piretroidlerin genellikle beyin dokusu ve sinir sisteminde DNA hasarı yapıcı etkileri araştırılmış olup d-fenotrinin biyotransformasyon, detoksifikasyon ve atılımdan sorumlu organlar olan karaciğer ve böbrek dokularında DNA hasarı yapıcı etkisi araştırılmamıştır. D-fenotrinin HPLC-ECD/DAD yöntemiyle karaciğer ve böbrekteki DNA hasarı yapıcı etkisi ilk defa tez çalışmasıyla araştırıldı ve yöntem laboratuvara kazandırıldı.

Normal kullanım koşulları altında oldukça güvenli olduğu bilinen bu bileşiğin, bilinçsiz kullanımından kaynaklanabilecek genotoksik etkilerinin insan ve hayvan sağlığı açısından farklı genotoksisite testleri ile ortaya konulması risk değerlendirmesi açısından önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004;10(6):141-147.
- Acworth I. *The handbook of redox biochemistry.* Chelmsford, ESA Inc. 2003;1-35.
- Acworth I. Free radical biology and medicine: the use of hplc with electrochemical detection for the measurement of pro-oxidants, damage markers, and protective mechanisms, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/110417-PO-HPLC-FreeRadical-Biology-16Mar2011-LPN2720-01.pdf>, 2011.
- Agrawal A, Sharma B. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *Int J Biol Med Res.* 2010;1(3):90-104.
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Martinez MA. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal.* 2009;182:7-20.
- Anonim.(2012a). Comet assay procedure <http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx>, 2012.
- Anonim.(2012b). How electrochemical detection for HPLC works [http://www.esainc.com/resources/Detector\\_tech/How\\_EC\\_works](http://www.esainc.com/resources/Detector_tech/How_EC_works), 2012.
- Anson RM, Sentürker S, Dizdaroglu M, Bohr VA. Measurement of oxidatively induced base lesions in liver from wistar rats of different ages. *Free Radical Bio Med.* 1999;27:456-462.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2003;543:251-272.
- Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpasa Tıp Derg.* 2004;35:159-169.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003;531:5-23.
- Cadet J, Douki T, Luc-Ravanat J. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):3-12.
- Carlson GP, Shoening GP. Induction of liver microsomal NADPH cytochrome c reductase and cytochrome P-450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicol Appl Pharm.* 1980;52(3):507-512.
- Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995;336: 69-77.

- Collins A. Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8- dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: An approach to consensus. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):2129-2133.
- Collins AR, Cadet J, Moller R, Poulsen HE, Vina J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?. *Arch Biochem Biophys*. 2004;423:57-65.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanism, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 2003;17:1195-1214.
- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance?. *Clin Chim Acta*. 2006;365:30-49.
- Cooke MS, Olinski R, Loft S. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:3-14.
- Costa LG. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD, editor. *Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons*. 7th Ed., U.S.A., McGraw-Hill Companies, Inc. 2008;883-930.
- Cox C. Sumithrin (d-phenothrin). *Journal of Pesticide Reform*. 2003;23(2):10-14.
- Çakatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Derg*. 2006;37:162-167.
- Daniels JI, Olsha AR, Savitz DA. Pesticides and childhood cancers. *Environ Hlth Persp*. 1997;105:1068-1077.
- Davies KJA, Pryor WA. The evolution of free radical biology & medicine: a 20-year history. *Free Radical Bio Med*. 2005;39:1263-1264.
- Dayal M, Parmar D, Dhawan A, Dwivedi UN, Doehmer J, Seth PK. Induction of rat brain and liver cytochrome P450 1A1/1A2 and 2B1/2B2 isoenzymes by deltamethrin. *Environ Toxicol Phar*. 1999;7:169-178.
- De Martinis BS, Bianchi MLP. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacol Res*, 2002;46(2):129-31.
- De Zwart LL, Hermanns RCA, Meerman JHN, Commandeur JNM, Salemink PJM, Vermeulen NPE. Evaluation of urinary biomarkers for radical-induced liver damage in rats treated with carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharm*. 1998;148:71-82.
- Delen N, Kınay P, Yıldız F, Yıldız M, Altınok HH, Uckun Z. Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşım olanakları. VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara ,Özet kitabı, 2010;2:609-625.

- DeMott MS, Dedon PC. Chemistry of inflammation and DNA damage: biological impact of reactive nitrogen species. In: Geacintov NE, Broyde S, editors. *The chemical biology of DNA damage*. Weinheim, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010;21-52.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damaged to DNA: mechanism and measurement. *Free Radical Bio Med*. 2002;32(11):1102-1115.
- Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Casarett&Doull's toxicology, the basic science of poisons. In: Klaassen CD, editor. 5th ed., U.S.A., The McGraw-Hill Companies Inc., 1996;643-689.
- El-Demerdash FM. Oxidative stress and hepatotoxicity induced by synthetic pyrethroids-organophosphate insecticides mixture in rat. *J Environ Sci Heal C*. 2011;29:145-158.
- Epe B. DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1996;127:223-249.
- ESCODD (European Standarts Committee on Oxidative DNA Damage). Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free Rad Res*. 1999;32:333-341.
- Falcioni ML, Nasuti C, Bergamini C, Fato R, Lenaz G, Gabbianelli R. The primary role of glutathione against nuclear DNA damage of striatum induced by permethrin in rats. *Neuroscience*. 2010;168:2-10.
- Fazeli G, Oli RG, Schupp N, Stopper H. The role of the dopamine transporter in dopamine-induced DNA damage. *Brain Pathology*. 2011;21:237-248.
- Fetoui H, Garoui El M, Makni-Ayadi F, Zeghal N. Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008;26:225-231.
- Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad Res Comm*. 1986;1:163-172.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:4533-4537.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat Res*. 2009;674:3-22.
- Gad SC, Johnson MD. The rat. In: Gad SC, editor. *Animal models in toxicology*, 2nd Ed., Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007;147-275.

- Giray B, Gürbay A, Hincal F. Cypermethrin induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin C or allopurinol. *Toxicol Lett.* 2001;118:139-146.
- Guertens G, De Boeck G, Highley M, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Cl Lab Sci.* 2002;39(4-5):331-457.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann Ny Acad Sci.* 2006;899:136-147.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(3):125-130.
- Hsu CH, Chi BC, Liu MY, Li JH, Chen CJ, Chen RY. Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. *Toxicology.* 2002;179:1-8.
- Hu CW, Yen CC, Huang YL, Pan CH, Lu FJ, Chao MR. Oxidatively damaged DNA induced by humic acid and arsenic in maternal and neonatal mice. *Chemosphere.* 2010;79:93-99.
- Jackson D, Luukinen B, Gervais J, Buhl K, Stone D. D-phenothrin technical fact sheet. <http://npic.orst.edu/factsheets/dphentech.pdf>, 2011.
- Ji BT, Silverman DT, Steward PA, Blair A, Swanson GM, Baris D, Greenbers RD, Hayes R, Brown LM, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG, Hoover RN. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med.* 2001;40:225-25.
- Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species. *J Nutr Environ Med.* 1999;9:37-46.
- Kaneko H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. *J Agr Food Chem.* 2011;59:2786-2791.
- Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997;387:147-163.
- Kaya S, Bilgili A. Pestisitler. Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A, Editörler, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji'de, İkinci Baskı, Ankara; Medisan Yayınevi. 2002;385-535.
- Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turk J Biochem.* 2007;32(3):104-111.

- Lee JH, Park Y, Choi JR, Lee EK, Kim HS. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Med J.* 2010;51(1):104-110.
- Levine MJ. *Pesticides: a toxic time bomb in our midst.* 1st Ed., U.S.A.; Praeger Publishers. 2007;2-3.
- Lin PH, La DK, Upton PB, Swenberg JA. Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis.* 2002;23(2):365-369.
- Lodovici M, Casalini C, Briani C, Dolara P. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology.* 1997;117:55-60.
- Loft S, Moller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?. *Eur J Nutr.* 2008;47(2):19-28.
- Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ, Martinez MA, Martinez M, Frejo MT, Castellano VJ, Fernandez R, Anadon A. Induction of cytochrome P4501A1/2 and P4504A1 activities by pyrethroids. In: *Proceedings of the 41th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville, Tennessee, U.S.A.* *Toxicol Sci.* 2002;66:320.
- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004;15(1-2):91-96.
- Mouret JF, Polverelli M, Sarrazini F, Cadet J. Ionic and radical oxidations of DNA by hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact.* 1991;77:187-201.
- Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutat Res.* 2006;607:176-183.
- Pilger A, Rüdiger HW. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006;80:1-15.
- Powell CL, Swenberg JA, Rusyn I. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer Lett.* 2005;229:1-11.
- Reus GZ, Valvassori SS, Nuernberg H, Comim CM, Buss Stringari RB, Padilha PT, Leffa DD, Tavares P, Dagostim G, Paula MMS, Andrade VM, Quevedo J. DNA damage after acute and chronic treatment with malathion in rats. *J Agric Food Chem.* 2008;56:7560-7565.
- Roche (2010). *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues, Version 5.0.* Cat. No. 11 814 770 001, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany.



- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85.
- Saquib Q, Al-Khedhairy AA, Singh BR, Arif JM, Musarrat J. Genotoxic fungicide methyl thiophanate as an oxidative stressor inducing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine adducts in DNA and mutagenesis. *J Environ Sci Heal B.* 2010;45:40-45.
- Schmerold I, Niedermüller H. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp Gerontol.* 2001;36:1375-1386.
- Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Guz J, Olinski R. Higher leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans?. *Antioxid Redox Sign.* 2007;9(1):143-150.
- Somma M. Gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş organizma analizleri. Bölüm 4, DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması, <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum4.pdf>, 2011.
- Sorensen M, Loft S. No significant paraquat-induced oxidative DNA damage in rats. *Free Rad Res.* 2000;32:423-428.
- Taghizadeh K, McFaline JL, Pang B, Sullivan M, Dong M, Plummer E, Dedon PC. Quantification of DNA damage products resulting from deamination, oxidation and reaction with products of lipid peroxidation by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1287-1298.
- Tope AM, Panemangalore M. Assesment of oxidative stress due to exposure to pesticides in plasma and urine of traditional limited-resource farm workers: formation of the DNA-adduct 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine (8-OHdG). *J Environ Sci Heal B.* 2007;42:151-155.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal C.* 2009;27:120-139.
- Van Remmen H, Hamilton ML, Richardson A. Oxidative damage to DNA and aging. *Exerc Sport Sci Rev.* 2003;31(3):149-153.
- Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S, Aydın A. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1999;63:575-581.
- Yarsan E, Cakir O. Effects of dichlorvos on lipid peroxidation in mice on subacute and subchronic periods. *Pestic Biochem Phys.* 2006;86:106-109.

- Yavuz O. Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (hplc). Üçüncü Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Kuşadası, AYDIN. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Yayınları, Ankara, Farmakoloji ve Toksikoloji’de kromatografik teknikler ve analiz öncesi örnek hazırlama yöntemleri çalıştay notları, 2010;31-39.
- Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicol.* 2007;227:240-247.
- WHO (1990). Environmental Health Criteria 96: D-phenothrin. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc96.htm>, 2012.
- WHO (2004). WHO specifications and evaluations for public health pesticides. D-phenothrin. [http://www.who.int/whopes/quality/en/dPhenothrin\\_Spec\\_Eval\\_Oct\\_2004.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/en/dPhenothrin_Spec_Eval_Oct_2004.pdf), 2012.
- WHO/FAO (1994). WHO/FAO data sheet on pesticides no.85. D-phenothrin. [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest85\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest85_e.htm), 2012.
- Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000;32(3):283-292.
- Williams PL, James RC, Roberts SM. Principles of toxicology environmental and industrial applications. 2nd Ed., Wiley-Interscience Publication, U.S.A, 2000;345-366.
- Wolfender JL. HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta Med.* 2009;75:719–734.
- Zhang WJ, Jiang FB, Ou JF. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences.* 2011;1(2):125-144.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Enes ATMACA

**Doğum Yeri:** Bafra / SAMSUN

**Doğum Tarihi:** 21.07.1983

**Medeni Hali:** Evli

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):** Yüksek Lisans (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2006)

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007-2012

**İletişim Bilgileri:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun  
e-posta: eatmaca@omu.edu.tr

