SİBEL ÖZDEN

DİKKAT Teziniz yazmaya başlamadan once Tez Yazım Kılavuzu ekindeki "TEZ YAZIM ŞABLONUN KULLANIMI"nı okuyunuz.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit cilt sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

SİBEL ÖZDEN İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. DOKTORA TEZİ İSTANBUL-2006

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

BAZI PESTİSİDLERİN OKSİDATİF STRES OLUŞTURMA POTANSİYELLERİNİN VE ANTİOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI

UZM. ECZ. SİBEL ÖZDEN

DANIŞMAN
PROF. DR. BUKET ALPERTUNGA

ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ A.B.D.

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı : Eczacılık Fakültesi

Programın seviyesi : Doktora (X)

Anabilim Dalı : Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

Tez Sahibi : Sibel Özden

Tez Başlığı : Bazı Pestisidlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması

Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi

Sınav Tarihi :

Tez Sınav Jürisi

1.Prof. Dr. Buket Alpertunga, (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji A.B.D.)

2. Prof.Dr. Oya Keleş (İ.Ü. Veteriner Fakültesi/Farmakoloji ve Toksikoloji A.B.D.)

3. Doç.Dr. Münevver Açıkkol (İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü)

4. Doç.Dr. Gülden Omurtag (M.Ü. Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji A.B.D.)

5. Yard.Doç.Dr. Gül Özhan (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji A.B.D.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sibel Özden (İmza)

İTHAF

Eşime ve aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım çok değerli danışman hocam Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya;

Hayvan denemelerinin yapılmasında bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, bölümündeki laboratuvarın tüm olanaklarını kullanmama izin veren İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Bölümü Başkanı Prof.Dr. Tuncay Altuğ ve bölüm çalışanlarına;

Anabilim Dalı olanaklarından yararlanmama izin veren M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Doç.Dr. Gülden Z. Omurtag'a;

Deneysel çalışmalarım esnasında bana maddi ve manevi her konuda destek olan Araş. Gör. Betül Karademir'e;

Doktoram süresince manevi desteğini esirgemiyen Yard.Doç.Dr. Gül Özhan'a;

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim arkadaşlarıma;

Ve eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan sevgili aileme;

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-338/03112003 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 2
2.1.Oksidatif Stres 2
2.2.Serbest Radikaller 2
2.3.Reaktif Oksijen Türleri 5
2.4.Serbest Radikallerin Kaynakları 11
2.5.Serbest Radikallerin Hasar Yapıcı Etkileri 16
2.6.Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi 21
2.7.Antioksidan Savunma Sistemleri 27
2.8.Methiocarb 48
2.9.Pestisidler ve Oksidatif Stres 54
3.GEREÇ VE YÖNTEM 57
3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler 57
3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler 58
3.3.Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 60
3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler 64
3.5.İstatistiksel Değerlendirme 74

4.BULGULAR..... ……..……75
4.1.ProteinTayini 75
4.2.Lipid Peroksidasyon Düzeylerine İlişkin Bulgular 76
4.3.İndirgenmiş Glutatyon Düzeylerine İlişkin Bulgular 86
4.4.Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular 93
4.5.Katalaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular 100
4.6.Glutatyon Peroksidaz Aktivitelerine İlişkin Bulgular 106
4.7.Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular 113
5. TARTIŞMA..... 120
KAYNAKLAR..... 126
ETİK KURUL KARARI..... 155
ÖZGEÇMİŞ..... 156

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1-Serbest radikaller ve yol açtıkları reaksiyonlar 4
Tablo 2.2-Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri 5
Tablo 2.3-Biyolojik sistemlerdeki antioksidanlar 29
Tablo 4.1-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri 77
Tablo 4.2-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri 79
Tablo 4.3-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri 81
Tablo 4.4-Tek doz, 5 ve 28 gün methiocarb karaciğer MDA (HPLC) 83
Tablo 4.5-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri 87
Tablo 4.6-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri 89
Tablo 4.7-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri 91
Tablo 4.8-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri 94
Tablo 4.9-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri 96
Tablo 4.10-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri 98
Tablo 4.11-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri 100
Tablo 4.12-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri 102
Tablo 4.13-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri 104
Tablo 4.14-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri 107
Tablo 4.15-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri 109
Tablo 4.16-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri 111
Tablo 4.17-Tek doz methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri 114
Tablo 4.18-5 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri 116
Tablo 4.19-28 gün methiocarb karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri 118

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen radikalleri 6
Şekil 2.2-$O_2^{\cdot -}$ radikali ve H_2O_2 den $OH^{\cdot}$ radikali oluşumu 9
Şekil 2.3-Endojen serbest radikal kaynakları 11
Şekil 2.4-Araşidonik asid metabolizması sonucu oluşan serbest radikaller 12
Şekil 2.5-Eksojen serbest radikal kaynakları 15
Şekil 2.6-Hücresel serbest radikal hasarı 16
Şekil 2.7-Hücre fosfolipid tabakası 19
Şekil 2.8-Lipid peroksidasyon mekanizması 20
Şekil 2.9-Lipid peroksidasyonu ürünlerinin tayini 22
Şekil 2.10-MDA'nın kimyasal yapısı 22
Şekil 2.11-HNE'nin kimyasal yapısı 24
Şekil 2.12-PGG_2 ara ürünleri (I-IV) ve F_2-izoprostan izomerleri 26
Şekil 2.13-Se-GSH-Px enziminin katalitik döngüsü 35
Şekil 2.14-$O_2^{\cdot -}$ radikalinin detoksikasyonu 36
Şekil 2.15-GSH'un yapısı 37
Şekil 2.16-GSH konjugasyonu ve merkaptürik asid biyosentezi 38
Şekil 2.17-GSH ve GSSG döngüsü 39
Şekil 2.18-Tokoferollerin kimyasal yapıları 40
Şekil 2.19-Tokoferolün bazı oksidasyon ürünleri 42
Şekil 2.20-Taurinin kimyasal yapısı 44
Şekil 2.21-Taurinin sentezi 45
Şekil 2.22-Methiocarbın kimyasal yapısı 48
Şekil 2.23-Methiocarbın memelilerde biyotransformasyonu 50
Şekil 3.1-MDA'in TBA ile reaksiyonu 68
Şekil 3.2-GSH'un DTNB İle reaksiyonu 70
Şekil 3.3-NBT'un süperoksid radikali tarafından redüksiyonu 71
Şekil 4.1-Protein standart ölçü eğrisi 75
Şekil 4.2-Spektrofotometrik yönteme göre hazırlanan MDA ölçü eğrisi 76
Şekil 4.3-HPLC yöntemine göre hazırlanan MDA ölçü eğrisi 76

Şekil 4.4-Tek doz methiocarb karaciğer MDA düzeyleri 78
Şekil 4.5-Tek doz methiocarb böbrek MDA düzeyleri 78
Şekil 4.6-5 gün methiocarb karaciğer MDA düzeyleri 80
Şekil 4.7-5 gün methiocarb böbrek MDA düzeyleri 80
Şekil 4.8-28 gün methiocarb karaciğer MDA düzeyleri 82
Şekil 4.9-28 gün methiocarb böbrek MDA düzeyleri 82
Şekil 4.10-Tek doz methiocarb karaciğer MDA düzeyleri (HPLC) 84
Şekil 4.11-28 gün methiocarb karaciğer MDA düzeyleri (HPLC) 84
Şekil 4.12-5 gün methiocarb karaciğer MDA düzeyleri (HPLC) 85
Şekil 4.13-GSH standart ölçü eğrisi 86
Şekil 4.14-Tek doz methiocarb karaciğer GSH düzeyleri 88
Şekil 4.15-Tek doz methiocarb böbrek GSH düzeyleri 88
Şekil 4.16-5 gün methiocarb karaciğer GSH düzeyleri 90
Şekil 4.17-5 gün methiocarb böbrek GSH düzeyleri 90
Şekil 4.18-28 gün methiocarb karaciğer GSH düzeyleri 92
Şekil 4.19-28 gün methiocarb böbrek GSH düzeyleri 92
Şekil 4.20-SOD standart ölçü eğrisi (logaritmik) 93
Şekil 4.21-Tek doz methiocarb karaciğer SOD aktiviteleri 95
Şekil 4.22-Tek doz methiocarb böbrek SOD aktiviteleri 95
Şekil 4.23-5 gün methiocarb karaciğer SOD aktiviteleri 97
Şekil 4.24-5 gün methiocarb böbrek SOD aktiviteleri 97
Şekil 4.25-28 gün methiocarb karaciğer SOD aktiviteleri 99
Şekil 4.26-28 gün methiocarb böbrek SOD aktiviteleri 99
Şekil 4.27-Tek doz methiocarb karaciğer CAT aktiviteleri 101
Şekil 4.28-Tek doz methiocarb böbrek CAT aktiviteleri 101
Şekil 4.29-5 gün methiocarb karaciğer CAT aktiviteleri 103
Şekil 4.30-5 gün methiocarb böbrek CAT aktiviteleri 103
Şekil 4.31-28 gün methiocarb karaciğer CAT aktiviteleri 105
Şekil 4.32-28 gün methiocarb böbrek CAT aktiviteleri 105
Şekil 4.33-GSH-Px standart ölçü eğrisi 106
Şekil 4.34-Tek doz methiocarb karaciğer GSH-Px aktiviteleri 108
Şekil 4.35-Tek doz methiocarb böbrek GSH-Px aktiviteleri 108
Şekil 4.36-5 gün methiocarb karaciğer GSH-Px aktiviteleri 110

Şekil 4.37-5 gün methiocarb böbrek GSH-Px aktiviteleri 110
Şekil 4.38-28 gün methiocarb karaciğer GSH-Px aktiviteleri 112
Şekil 4.39-28 gün methiocarb böbrek GSH-Px aktiviteleri 112
Şekil 4.40-GSH-Rd standart ölçü eğrisi 113
Şekil 4.41-Tek doz methiocarb karaciğer GSH-Rd aktiviteleri 115
Şekil 4.42-Tek doz methiocarb böbrek GSH-Rd aktiviteleri 115
Şekil 4.43-5 gün methiocarb karaciğer GSH-Rd aktiviteleri 117
Şekil 4.44-5 gün methiocarb böbrek GSH-Rd aktiviteleri 117
Şekil 4.45-28 gün methiocarb karaciğer GSH-Rd aktiviteleri 119
Şekil 4.46-28 gün methiocarb böbrek GSH-Rd aktiviteleri 119

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

GSH : Glutatyon
SOD : Süperoksid dismutaz enzimi
CAT : Katalaz enzimi
GSH-Px : Glutatyon peroksidaz enzimi
GSH-Rd : Glutatyon redüktaz enzimi
MDA : Malondialdehid
$O_2^{\cdot -}$: Süperoksid radikali
H_2O_2 : Hidrojen peroksid
$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali
(O-O) : Eşlenmiş elektron
$HO_2^{\cdot}$: Hiperoksid radikali
$^1O_2$: Singlet oksijen
NADPH : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotid
-SH : Tiyol
$FMNH_2$: İndirgenmiş flavin mononükleotid
$FADH_2$: İndirgenmiş flavin adenin dinükleotid
8-OhdG : 8-hidroksi-2-deoksiguanozin
$L^{\cdot}$: Lipid radikali
LH : Çoklu doymamış yağ asidi
$LOO^{\cdot}$: Lipid peroksil radikali
LOOH : Lipid hidroperoksid
TBARS : Tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler
HNE : 4-hidroksi-2-trans-nonenal
TBA : Tiyobarbitürik asid
BHT : Butilhidroksitoluen
TCA : Trikloroasetik asid
HPLC : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
DNPH : Dinitrofenilhidrazin
LC-UV : UV-dedektör donanımlı likid kromatografisi

GC-MS : Kütle spektrometri donanımlı gaz kromatografisi

LC-ECD : Elektrokimyasal dedektör donanımlı likid kromatografisi

FOX : Demirin ksilenoloranj ile oksidasyonu

PG : Prostaglandin

8-iso-PG-$F_{2\alpha}$:8-izoprostaglandin $F_{2\alpha}$

GST : Glutatyon-S-transferaz

G6PD : Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz

NBT : Nitroblu tetrazolyum

NO_2^- : Nitrit anyonu

NO_3^- : Nitrat anyonu

Hg : Elementel civa

Hg^{2+} : Civa (II)

Se-GSH-Px : Selenyuma bağlı glutatyon peroksidaz enzimi

GSSG : Okside glutatyon

Pl-GSH-Px : Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz enzimi

-S-S- : Disülfür

DTNB : 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asid

LDL : Plazma lipoproteinleri

Vit E : E vitamini

DHA : Dehidroaskorbik asid

Vit C : C vitamini

Vit $C^{\cdot}$: Dehidroaskorbat radikal anyonu

P5P : Pridoksal-5-fosfat

CSAD : Sistein sülfinik asid dekarboksilaz

MC : Methiocarb

FMO : Flavin monooksijenaz

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

TEP : 1,1,3,3, Tetraetoksipropan

BSA : Sığır serum albumini

i.g. : İntragastrik

i.p. : İntraperitonal

ÖZET

Özden S. Bazı Pestisidlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2006.

Bu çalışmada, N-metilkarbamat grubu pestisidlerden methiocarbın sıçanlarda oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve antioksidan sistemler üzerine etkisi araştırıldı. Tek doz (1/4 LD50), 5 günlük doz (1/10 LD50) ve 28 günlük tekrarlanan dozlar (1/50 LD50) şeklinde olmak üzere üç deneme gerçekleştirildi. Her bir deneme üç bölümden oluşturuldu. Birinci bölümde methiocarb tarafından oluşturulan oksidatif hasarın derecesi, ikinci bölümde maddenin glutatyon (GSH) ve antioksidan enzimlerden süperoksid dizmütaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) üzerine etkisi, üçüncü bölümde ise, taurinin diğer iki bölümde ölçülen parametreler üzerine etkisi standart bir antioksidan olan E vitamini ile kıyaslanmak suretiyle araştırıldı. Denemelerde son uygulamadan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları çıkarılarak doku homojenatlarında malondialdehid (MDA) ve GSH seviyeleri, SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-Rd antioksidan enzim aktivitelerinin tayini yapıldı.

Yapılan tüm denemelerde MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı görüldü. Tek dozda GSH düzeyi, SOD, CAT enzim aktiviteleri artarken, 5 ve 28 günlük tekrarlanan dozlarda azaldığı ve GSH-Px enzim aktivitesinin ise tek doz ve 5 günlük dozlarda artarken, 28 günlük tekrarlanan dozda azaldığı gözlendi. Denemeler sonucunda GSH-Rd aktivitesinde ise değişiklik olmadığı gözlendi. Taurin, her üç denemede de methiocarbın oluşturduğu oksidatif hasarı antioksidan etkisi ile büyük ölçüde azalttı. Sonuç olarak, methiocarbın sıçanlarda oksidatif stresi indüklediği, antioksidan savunma sistemlerini değiştirdiği ve taurinin ise bu etkileri azaltıcı yönde özelliği olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Methiocarb, lipid peroksidasyon, antioksidan enzimler, taurin, E vitamini

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-338/03112003 nolu no'lu proje olarak desteklemiştir.

ABSTRACT

Ozden S. The Investigation of The Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctoral Thesis. İstanbul. 2006.

In the present study, methiocarb, a N-methylcarbamate pesticide, was investigated about the potency to induce oxidative stress and effect on antioxidant systems.

This study was carried out with the groups of single dose (1/4 LD50), 5 days (1/10 LD50) and 28 days (1/50 LD50) repeated doses. For each groups different subjects were investigated; (I) the degree of the oxidative damage caused by methiocarb, (II) the effects of methiocarb on glutathione (GSH) and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and glutathione reductase (GSH-Rd), (III) the effect of taurin on these parameters compared to a standard antioxidant, vitamin E. Rats were sacrificed after 24 hours the last administration and liver and kidney tissues were removed. Levels of malondialdehyde (MDA) and GSH, the activities of antioxidant enzymes SOD, GSH-Px, CAT and GSH-Rd were determined in the liver and kidney tissue.

The results show that treatment with methiocarb increased significantly MDA levels in all experiments when compared to control groups. Level of GSH, activities of SOD and CAT were increased in single dose however in 5 and 28 days period, these parameters were decreased. Activity of GSH-Px was increased in single dose and 5 days period and decreased in 28 days period. GSH-Rd remained unchanged in all experiments. Taurin pretreatment reduced methiocarb induced oxidative stress in all experiments with antioxidant activity. As a result, it was observed that methiocarb induced oxidative stress and affected the antioxidant defense mechanism in rats and taurin ameriolated these effects of methiocarb.

Key Words: Methiocarb, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, taurine, vitamin E

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-338/03112003.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmada serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Çeşitli endojen ve eksojen faktörlerin etkisi ile serbest radikallerin aşırı düzeyde oluşması ve antioksidan savunmanın yetersiz kalması vücutta oksidatif hasara yol açar. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların en önemli mekanizmalarından biri, hücre membranlarındaki çoklu duymamış yağ asidleri ile etkileşim sonucu başlayan lipid peroksidasyonudur.

Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türleri oluşumunun ana kaynakları ksenobiyotikler ve ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Birçok maddenin serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Ksenobiyotikler içerisinde önemli bir grubu oluşturan pestisidlerin neden olduğu toksik etkilerin ortaya çıkmasında da serbest radikal oluşumunun önemli rol oynadığı çeşitli araştırmaların sonucunda ortaya çıkarılmıştır.

N-metilkarbamat grubu pestisidler çeşitli alanlarda organofosfatlara alternatif olarak çok yoğun bir şekilde kullanılan maddelerdir. Kolay parçalanmaları nedeniyle tercih edilen bu maddelerin yaygın kullanımları maruziyet risklerini de arttırmaktadır. Asetilkolinesteraz enziminin reversibl inhibitörleri olan bu maddelerin toksik etkileri ile oksidatif hasar ilişkisinin araştırılmasına yönelik literatürde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Amacımız, N-metilkarbamat grubu pestisidler içerisinde toksisitesi yönünden en az araştırılan bir madde olan methiocarbın oksidatif stres oluşturma potansiyelinin in vivo araştırılmasıdır. Çalışmada, sıçanlara tek doz, 5 gün ve 28 günlük tekrarlanan dozlarda methiocarb uygulanmasının ardından, i) oluşan oksidatif hasarın derecesi, ii) antioksidan enzimler ve glutatyon sistemi üzerine etkisi iii) muhtemel hasarın taurin ile önlenip önlenemeyeceğinin araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Oksidatif Stres

Serbest radikaller, vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir. Oksidatif stres, antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalmasıyla yada çeşitli durumlarda serbest radikallerin artmasıyla oluşur. Bunun sonucunda, hücrede DNA, protein, lipid, karbonhidrat ve enzimler zarar görebilir (1-5).

Oksidatif stres, ateroskleroz, diabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi patofizyolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (5-9).

2.2.Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu atom veya molekül ortaklanmamış elektronunu bir başka moleküle vererek veya başka bir molekülden alarak daha kararlı hale gelme eğilimindedir. Bu nedenle serbest radikaller son derece reaktif bileşiklerdir (4, 10-11).

Elektronlar, atomlarda orbital denilen bölgelerde bulunur ve her bir orbitalde birbirinin aksi yönde dönen en fazla iki elektron bulunur. Bir orbitalde yalnız başına bulunan elektrona ortaklanmamış elektron (üst kısma yazılan nokta ile ifade edilir) denir. Biyolojik moleküllerin çoğu ortaklanmış elektron taşırlar.

2.2.1.Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

1.*Kovalent bağların homolitik bölünmesi:* Kovalent bağlı (: elektron çiftini ifade eder) molekülün bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan birisi kalır.

$$X : Y \rightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}$$

2.*Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:* Kovalent bağın açılması esnasında moleküldeki atomlardan birisi iki elektronu da alır.

$$X : Y \rightarrow X:^{-} + Y^{+}$$

3.*Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:*

$$X + e^{-} \rightarrow X^{\cdot -}$$

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler (4).

2.2.2.Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girerler (Tablo 2.1):

1.İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (11).

$$H^{\cdot} + H^{\cdot} \rightarrow H_2$$

2.Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

- Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal)

  $$X \rightarrow e^{-} + X^{\cdot +}$$

- Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal)

  $$X^{\cdot} + Y \rightarrow X^{+} + Y^{\cdot -}$$

- Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.

  $$X^{\cdot} + Y \rightarrow [X\text{-}Y]^{\cdot}$$

- Radikal, C-H bağından bir hidrojen atomu koparabilir.

  $$CH + OH^{\cdot} \rightarrow C^{\cdot} + H_2O$$

Ancak bu reaksiyonların sonunda, radikal olmayan bileşik de radikal haline gelir. Bu nedenle de serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonları şeklinde olur (4, 12-13).

Tablo 2.1-Serbest radikaller ve yol açtıkları reaksiyonlar (4)

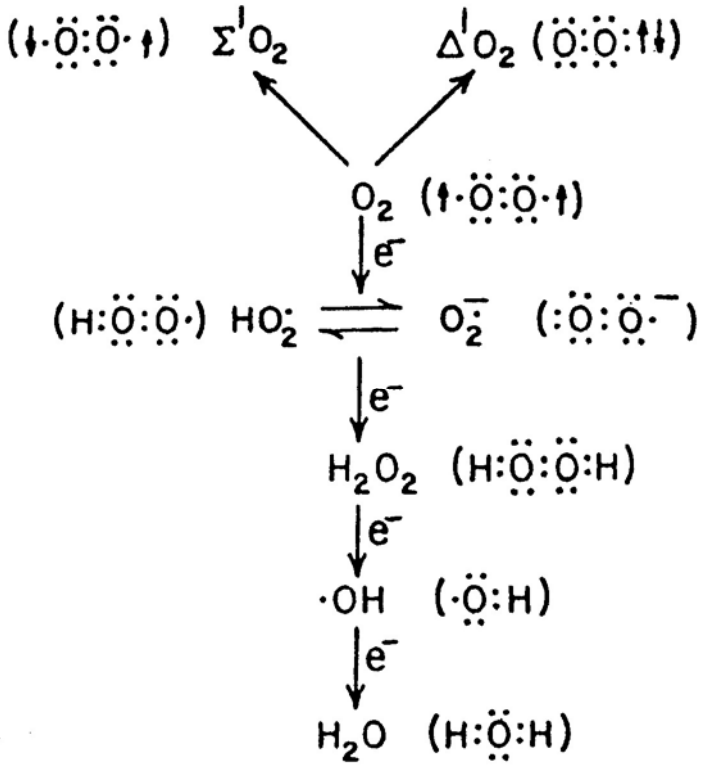
Süperoksid	**$^{\cdot}O\text{-}O^{-}$**	Fe^{2+} ve Cu^{+} iyonlarını geri kazanma yoluyla Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleme, hidrojen peroksid veya peroksinitrit oluşumu
Hidrojen peroksid	**HO-OH**	Hidroksil radikali oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hidroksil radikali	**$OH^{\cdot}$**	Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipid peroksidlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
Ozon	**$O{=}O^{+}\text{-}\ O^{-}$**	Bütün biyomoleküllerin özellikle çift bağ içerenlerin oksidasyonu, sitotoksik aldehid ve ozonit oluşumu
Oksijen	**O = O**	Çifte bağlarla reaksiyon, peroksidlerin oluşumu, aminoasidlerin ve nükleotidlerin oluşumu
Nitrik oksid	**$^{\cdot}N = O$**	Peroksinitrit oluşumu, diğer radikallerle reaksiyon
Peroksinitrit	**$O = N - O - O^{-}$**	Hidroksil radikali oluşumu, tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonu, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hipoklorit	**ClO^{-}**	Amino ve kükürt içeren grupların oksidasyonu, klorin oluşması
Radikal	**$R^{\cdot}$**	Hidrojen çıkarılması; peroksil radikalleri ve diğer radikallerin oluşumu, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması
Peroksil radikali	**$R - O - O^{\cdot}$**	Hidrojen çıkarılması, radikallerin oluşumu; lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması
Hidroperoksid	**R - O - OH**	Biyomoleküllerin oksidasyonu, biyolojik membranların bozulması
Bakır ve demir iyonları	**Cu^{2+}** **Fe^{3+}**	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikali oluşumu

2.3.Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, moleküler oksijenden türeyen oksijen radikalleridir (Tablo 2.2). Moleküler oksijen, taşıdığı iki ortaklanmamış elektron (O-O) nedeniyle bir diradikal olarak değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği diğer serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen elektron alarak en son suya indirgenir. %98 oranında mitokondrilerde gerçekleşen bu indirgenme sonucunda çok reaktif ürünler olan süperoksid radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve hidrojen peroksid (H_2O_2) meydana gelir (11, 14-15) (Şekil 2.1).

Tablo 2.2-Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (4)

Radikaller	Non-radikaller
Süperoksid, $\mathbf{O_2^{\cdot -}}$	Hidrojen peroksid, $\mathbf{H_2O_2}$
Hidroksil, $\mathbf{OH^{\cdot}}$	Hipokloröz asid, **HOCl**
Peroksil, $\mathbf{RO^{\cdot}_2}$	Ozon, $\mathbf{O_3}$
Alkoksil, $\mathbf{RO^{\cdot}}$	Singlet oksijen, $\mathbf{O^{\cdot}}$
Hidroperoksil, $\mathbf{HO^{\cdot}_2}$	Peroksinitrit, $\mathbf{ONOO^-}$
Nitrik oksid, $\mathbf{NO^{\cdot}}$	Hidroperoksid, **L(R)OOH**



Şekil 2.1-Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen radikallerinin oluşumu (15)

2.3.1.Süperoksid Radikali

Canlılarda oluştuğu bilinen ilk radikal $O_2^{\cdot -}$ radikalidir ve başlıca şu mekanizmalarla oluşmaktadır (4, 16, 20-22):

1.İndirgeyici özellikteki biyolojik moleküller, oksijene tek elektron verip kendileri yükseltgenirken $O_2^{\cdot -}$ radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler bunlara örnek verilebilir.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$$

2.Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, enzimlerin katalitik etkisi sırasında $O_2^{\cdot -}$ radikali bir ürün olarak oluşabilir.

3.Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükletid dehidrojenaz (NADH dehidrojenaz) ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan, oksijene elektron kaçağı sonucu tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı $O_2^{\cdot -}$ oluşumuna neden olur.

4.Aktive edilen fagositik lökositler, $O_2^{\cdot -}$ üreterek $O_2^{\cdot -}$ i fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Yer aldığı reaksiyonlar:

1.$O_2^{\cdot -}$ radikali, direkt olarak fazla zararlı değildir. Asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarını indirgeyici olmasıdır.

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2}$$

SOD enzimi tarafından katalize edilen bu tepkime "dismutasyon tepkimesi" olarak adlandırılır. $O_2^{\cdot -}$ radikali, özellikle hafif asidik koşullarda SOD enzimi olmadan da kendiliğinden dismutasyonla H_2O_2 e çevrilebilir.

2.$O_2^{\cdot -}$ radikali, hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Ferrisitokrom c'nin ya da nitroblu tetrazolyum'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Bu reaksiyonlar, SOD enzimi tarafından inhibe edilir. Bundan yararlanılarak SOD enzim aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen $O_2^{\cdot -}$ tayini yapılır.

$$\mathbf{Sit\ c\ (Fe^{3+}) + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + Sit\ c\ (Fe^{2+})}$$

Oksidan olarak görev yaptığında ise, epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve H_2O_2 e indirgenir.

3.$O_2^{\cdot -}$ radikalinin nitrik oksid ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-}$$

Böylece nitrik oksidin etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit, $OH^{\cdot}$ radikali ve nitronyum iyonu gibi toksik ürünlere de dönüşürler.

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi ile hücrelerde $O_2^{\cdot -}$ birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda $O_2^{\cdot -}$ yapımının artmasıyla $O_2^{\cdot -}$ e özgü tepkimeler görülmeye başlar (23) :

- $O_2^{\cdot -}$ radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı $OH^{\cdot}$ radikali yapım tepkimelerini hızlandırır.

- Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da indirgenmiş nükleotidleri, bazı aminoasidleri ve antioksidan bileşikleri oksidler.

- $O_2^{\cdot -}$ radikali, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve $O_2^{\cdot -}$ radikali burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksid radikalini ($HO_2^{\cdot}$) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları yükseltgeyebilir (24-25).

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow HO_2^-}$$

2.3.2.Hidrojen Peroksid

Biyolojik sistemlerde $O_2^{\cdot -}$ radikallerinin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur (4, 11, 16).

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2} \quad \text{(enzimatik)}$$

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2} \quad \text{(non-enzimatik)}$$

Non-enzimatik dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Enzimatik dismutasyonda; $O_2^{\cdot -}$ radikalinin SOD enzimi tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında gerçekleşir.

H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü $O_2^{\cdot -}$ radikali ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturur (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu) (17, 18, 26).

H_2O_2 oksitleyici ve indirgeyici özelliğinin zayıf olması ve reaktif olmamasına karşılık, moleküler yapısında su bulundurmasından dolayı biyolojik membranları kolaylıkla geçebilir. $O_2^{\cdot -}$ radikalinde ise bu özellik yoktur. H_2O_2, bu sayede oluştuğu yerden çok uzaklara gidip hücre kompartmanları boyunca ve hücreler arasında serbest radikal indüklü hasarı iletmektedir. Proteinleri, tiyol

grubu içeren enzimleri, fosfolipidleri, karbonhidratları ve DNA'yı hedef alıp Fenton reaksiyonu aracılığıyla hasarlara yol açabilir (27-28).

2.3.3.Hidroksil Radikali

$OH^{\cdot}$ radikali, biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif radikal molekülüdür ve çok yönlü reaksiyonlar sonucu oluşabilir (4, 16):

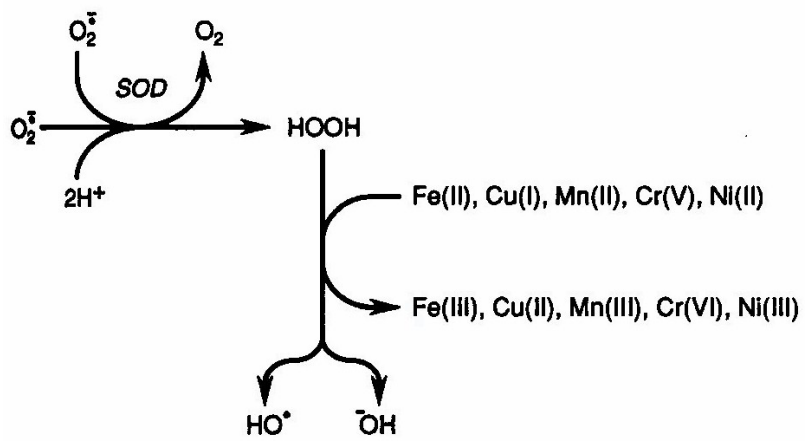
1.H_2O_2 deki O-O bağının homolitik fizyonu ile 2 $OH^{\cdot}$ radikali oluşur. Homolitik fizyon ısı yada iyonize radyasyonla oluşabilir.

$$\mathbf{H - O - O - H \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot}}$$

2.H_2O_2 ve Fe^{2+} tuzlarının bir arada bulunmasıyla $OH^{\cdot}$ radikali oluşur. Fenton reaksiyonu olarak da bilinen bu reaksiyon aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.2).

$$\mathbf{H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}}$$

Bu basit reaksiyon, biyolojik sistemlerde birçok seri radikal reaksiyonlarının oluşumunu tetikler.



Şekil 2.2-$O_2^{\cdot -}$ radikali ve H_2O_2 den $OH^{\cdot}$radikali oluşumu (4)

3.H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ radikalinin etkileşmesi sonucu $OH^{\cdot}$ radikali oluşur.

$$\mathbf{H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}}$$

Yukarıda geçen reaksiyon 1934 senesinde F. Haber ve J. Weiss tarafından bulunmuştur ve Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinmektedir.

Reaksiyonun hız sabiti sulu çözeltilerde hemen hemen sıfırdır. Bununla beraber ortamda geçiş metal iyonlarının bulunması reaksiyonun hızlı bir şekilde cereyan etmesine sebep olmaktadır. Geçiş metalleri, bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içerir ve elektron alıp verme yeteneğindedirler. İnsan organizması için en önemli geçiş metalleri demir ve bakırdır. Demir ve bakır bir çok enzimin aktif bölgelerinde ve mitokondriyel elektron taşıma zincirinde yer almaktadır. Demir, transferrin proteini tarafından taşınmakta, ferritin ve hemosiderin şeklinde depo edilmektedir. Bakır ise seruloplasmin proteinine bağlıdır. Çeşitli nedenlerle fizyolojik koşullar bozulduğunda, kontrol mekanizmalarının da zarar görmesi sonucu Haber-Weiss reaksiyonu demir ve bakırın katalizörlüğünde gerçekleşebilir. Demir iyonları ile katalizlenen reaksiyon aşağıdaki şekilde yürür (4-5, 17-18).

Haber-Weiss reaksiyonu:

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Net reaksiyon:

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

$OH^{\cdot}$ radikali, hücrelerde hemen hemen her tip molekülle reaksiyona girebilen, bilinen en reaktif oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Karbonhidratlar, aminoasidler, fosfolipidler, DNA bazları ve organik asidler gibi elektronca zengin birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, hidrojen atomu koparma, katılma ve elektron transferi şeklinde gerçekleşir (19).

2.3.4.Singlet Oksijen

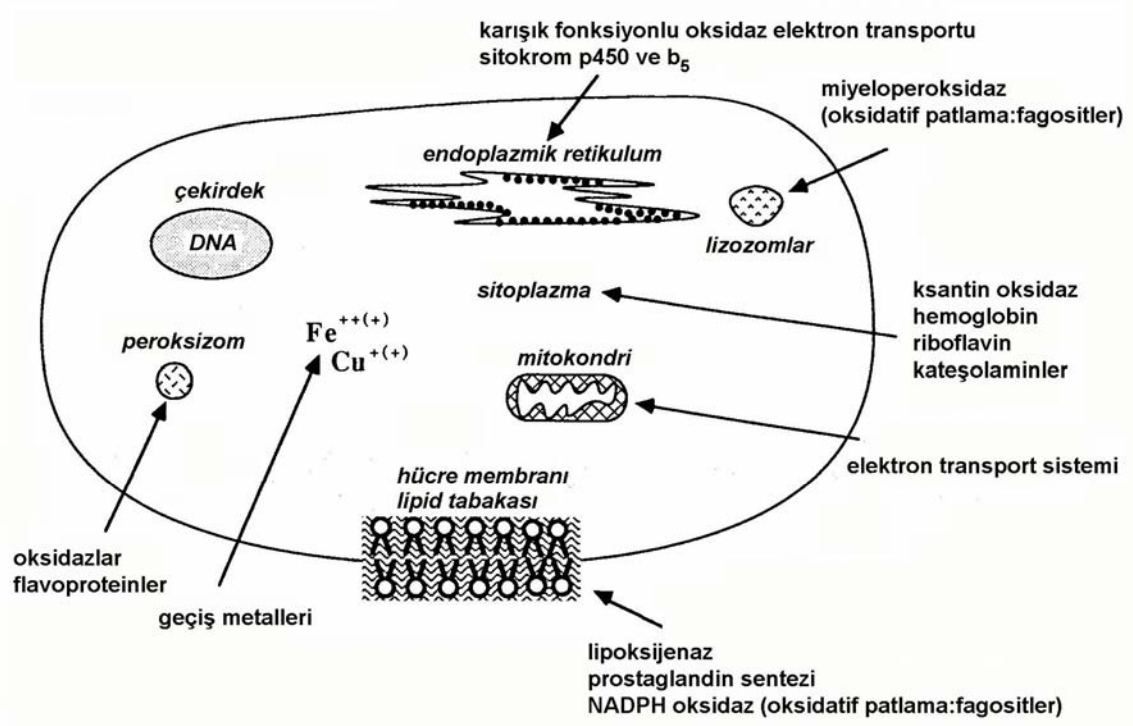
Singlet Oksijen ($^1O_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan bir reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale geçmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere 2 şekli vardır. $^1O_2$, uyarılmış elekronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar. $^1O_2$ in kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir (4, 14).

2.4.Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller organizmada metabolik aktivite sonucu olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında yada çeşitli dış kaynaklı etkenler ile oluşabilir (29-30).

2.4.1.Endojen Serbest Radikal Kaynakları

Endojen serbest radikal kaynakları Şekil 2.3'de özet olarak verilmiştir.

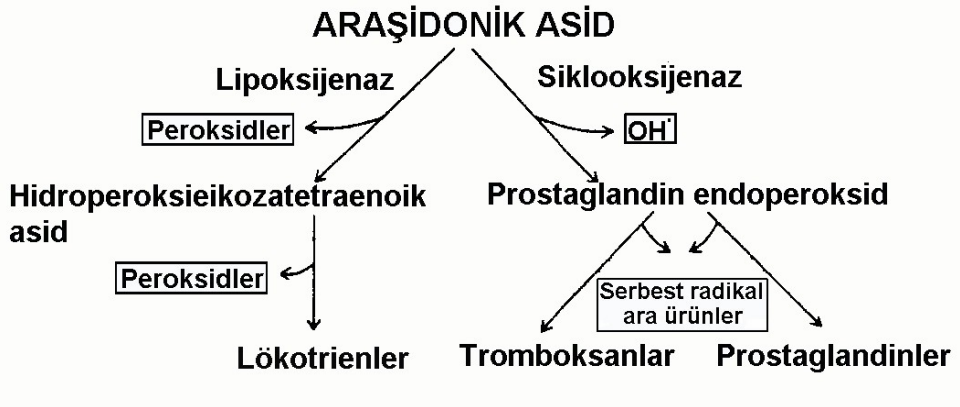


Şekil 2.3-Endojen serbest radikal kaynakları (30)

Plazma membranları

Plazma membranları, hem serbest radikal oluşturma hem de serbest radikallere hedef olup zincir reaksiyonlarının ve lipid peroksidasyonun gerçekleştiği yer olması nedeniyle büyük öneme sahiptir.

Prostaglandin sentezinde, siklooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenen araşidonik asidin oksidasyonu sırasında $OH^{\cdot}$ radikali oluşur (Şekil 2.4) (31).



Şekil 2.4-Araşidonik asid metabolizması sonucu oluşan serbest radikaller (29)

Enzimler

Aktive fagositik hücrelerde, plazma membranındaki indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) $O_2^{\cdot -}$ radikali üretimine aracılık eder (32).

En çok çalışılan enzimlerden biri de ksantin oksidazdır. İn vivo olarak ksantin/hipoksantin oksidasyonu ksantin dehidrojenaz enzimiyle katalizlenir. Bu enzim; substratlardan aldığı elektronları, O_2 den çok nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'e taşır. Ksantin dehidrojenaz, purifikasyonu esnasında proteolitik enzimler tarafından tutulması veya tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonu nedeniyle ksantin oksidaza dönüşür. Normal in vivo koşullarda, hayvan ve bitki dokularının sitozollerinde yerleşmiş olan bu enzim ile katalizlenen ksantin/hipoksantin metabolizması sonucu $O_2^{\cdot -}$ radikali oluşmaz. Bununla birlikte, doku hasarı oluştuğunda dehidrojenaz-oksidaz dönüşümü meydana gelir. Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantinin ürik aside oksidasyonunu katalizler ve bu esnada da O_2, $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 e indirgenir (4).

Sitokrom P-450, detoksikasyon reaksiyonları sırasında $O_2^{\cdot -}$ radikalleri oluşumuna neden olur (33).

Otooksidasyon Reaksiyonları

Bazı biyolojik moleküller oksijen varlığında oksidlenir ve bu esnada O_2, $O_2^{\cdot -}$ e dönüşür. Bu moleküller, gliseraldehid, indirgenmiş flavin mononükleotid ($FMNH_2$), indirgenmiş flavin adenin dinukleotid ($FADH_2$), adrenalin, noradrenalin, L-dopa, dopamin, tetrahidropteridinler ve sistein gibi tiyol

bileşikleridir. Tetrahidropteridinler; nitrik oksid sentetaz, fenil alanin hidroksilaz ve tirozin hidroksilaz gibi oksijenaz enzimlerinin kofaktörüdür.

O_2, çok reaktif olmadığı için bu otoksidasyonlar demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının eklenmesiyle hızlandırılır, yani metal iyonlarıyla katalizlenir (4, 29).

Hem Proteinleri

Demir, hemoglobin ve miyoglobinin hem halkalarında Fe^{2+} şeklindedir ve O_2 bağlanana kadar bu şekilde kalır.

$$\textbf{hem} - Fe^{2+} - O_2 \leftrightarrow \textbf{hem} - Fe^{3+} - O_2^{\cdot -}$$

Fe^{2+} ye O_2 nin bağlanmasıyla, Fe^{3+} e de $O_2^{\cdot -}$ bağlanır. Oksihemoglobin molekülünün dekompozisyonu ile ise $O_2^{\cdot -}$ açığa çıkar.

$$\textbf{hem} - Fe^{2+} - O_2 \rightarrow \textbf{hem} - Fe^{3+} + O_2^{\cdot -}$$

Hem halkasındaki Fe^{3+} O_2 ne bağlanamaz, bu yüzden inaktiftir ve methemoglobin olarak bilinir (miyoglobin ve metmiyoglobin için de durum aynıdır). İnsan eritrositlerindeki hemoglobinin %3'ünün her gün bu şekilde oksidasyona uğradığı saptanmıştır. Hemoglobin ve miyoglobin oksidasyonu nitrit iyonu veya geçiş metal iyonlarının (özellikle bakır) varlığında hızlanır (34, 35).

Mitokondriyel Elektron Transportu

Çoğu aerobik hücrelerde de $O_2^{\cdot -}$ radikalinin en önemli kaynağı, elektron transport zincirleridir. Bunlar bakteriyel membranlarda ve ökaryotik hücrelerin mitokondri ve endoplazmik retikulumlarında bulunur.

Mitokondrilerde solunum zincirindeki elektron taşıyıcılarından kaçan elektronlar moleküler oksijenle birleşerek $O_2^{\cdot -}$ oluşturabilir.

Memeli sitokrom oksidaz aktivitesinin O_2 ne doygun olduğu durumlarda elektron taşınma oranı ve dolayısıyla $O_2^{\cdot -}$ radikal oluşumu mitokondriler tarafından arttırılır.

Fizyolojik O_2 düzeylerinde, O_2 nin yaklaşık %1-3'ü mitokondride $O_2^{\cdot -}$ e dönüştürülür. Mitokondrinin hasarı sonucu elektron taşınması ve $O_2^{\cdot -}$ oluşumu artar (36).

Mitokondriyel DNA

Solunum zincirinde mitokondri tarafından O_2 radikallerinin oluşumu; mitokondriyel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya hasar verir. Mitokondriyel DNA'daki mutasyonlar yaşlı dokularda birikir (37-38).

Bakteriyel Süperoksid Oluşumu

E. Coli üzerindeki çalışmalar, bazı sitozolik enzimlerin $O_2^{\cdot -}$ oluşturduğunu fakat başlıca $O_2^{\cdot -}$ kaynağının elektron transport zinciri olduğunu göstermiştir (39).

Peroksizomlar

Peroksizomlar, yüksek konsantrasyonlarda oksidazlar içermelerinden dolayı hücresel H_2O_2 in önemli kaynaklarıdır ve H_2O_2 in prekürsörü olarak da $O_2^{\cdot -}$ in oluştuğu gösterilmiştir. Peroksimal H_2O_2 oluşturan enzimler arasında D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, L-α-hidroksiasid oksidaz ve yağ asidi-açil-CoA oksidaz bulunur (40).

Endoplazmik Retikulum

Farklı dokulardan izole edilen ve endoplazmik retikulum içeren mikrozomal fraksiyonlar, NADPH ile inkübe edildiğinde $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 oluştuğu gösterilmiştir. Bu oluşum oranı, yüksek O_2 konsantrasyonlarında artar. Bu reaktif oksijen türleri, büyük ölçüde sitokrom P-450 sisteminden kaynaklanmaktadır (33, 41).

Çekirdek

Hücre çekirdeğini çevreleyen membran, NADH veya NADPH varlığında ve O_2 konsantrasyonlarının artması ile $O_2^{\cdot -}$ oluşturan elektron transport zinciri içerir. Bu yol, oluşan oksijen radikallerinin nükleer DNA'ya yakın olmasından dolayı canlılar açısından önemlidir (4).

Metal İyonlarının Ayrışması

Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunurlar. Oksidasyon basamakları arasındaki elektron alışverişi yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları ile olur.

$$Fe^{3+} + e^- \leftrightarrow Fe^{2+}$$

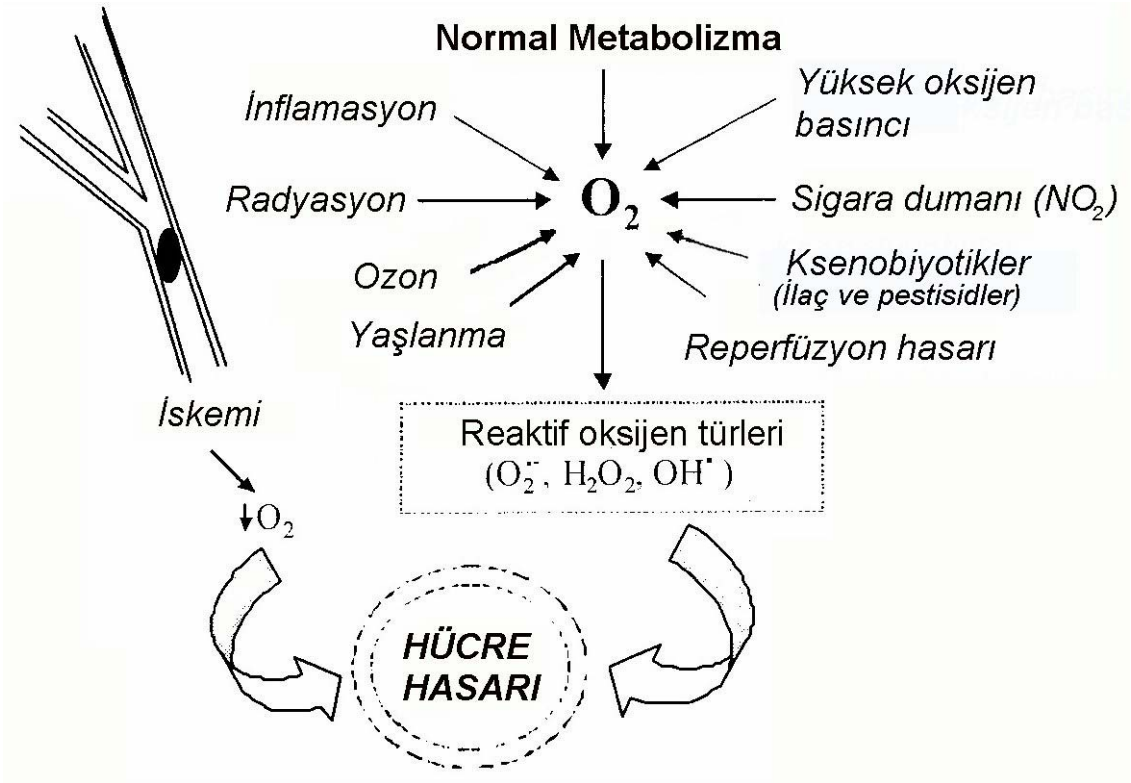
$$Cu^{2+} + e^- \leftrightarrow Cu^{+}$$

Geçiş metalleri bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ den $OH^{\cdot}$ sentezini katalizlerler.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemli etkileri ise ise lipid peroksidasyon üzerine olanlardır (4, 14, 30, 42).

2.4.2.Eksojen Serbest Radikal Kaynakları

Eksojen serbest radikal kaynakları olarak ise radyasyon, doğal gaz, sudaki klor ve ozon gibi çevre kirlilikleri, sigara dumanındaki nitrik oksid ve aldehidler ve ayrıca ilaçlar, pestisidler ve diğer ksenobiyotikler gösterilebilir (Şekil 2.5) (43-45).

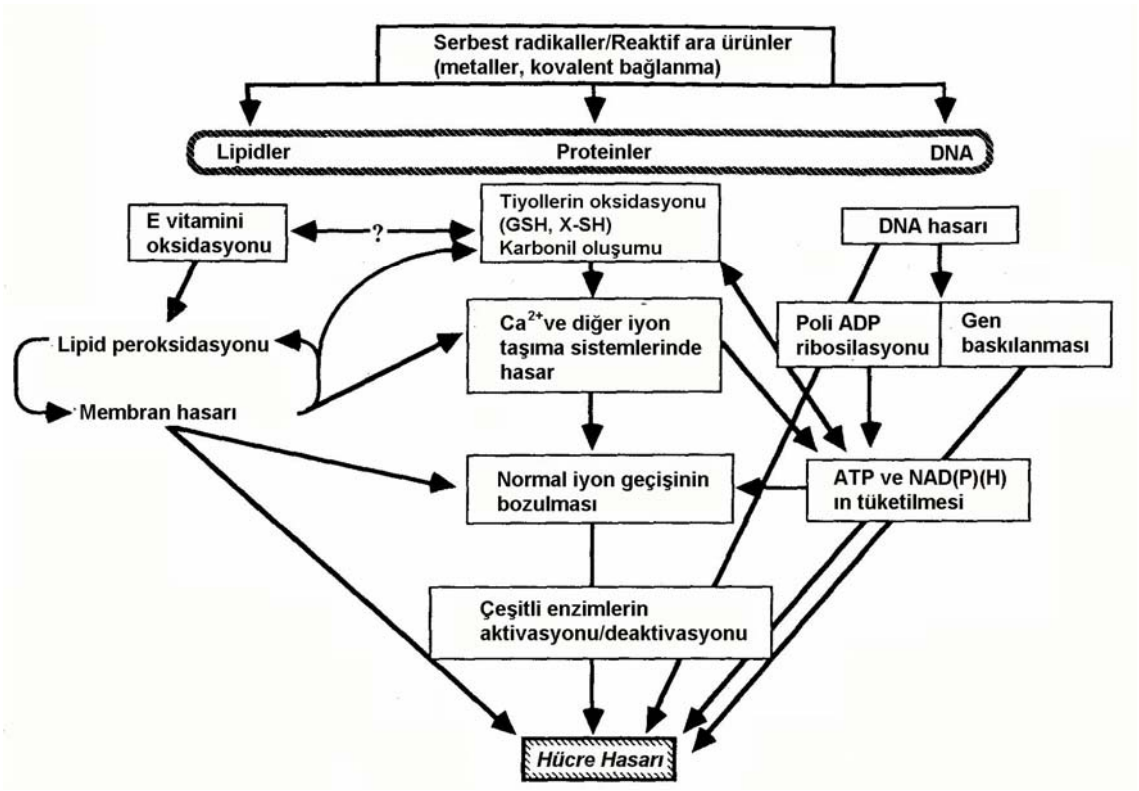


Şekil 2.5-Eksojen serbest radikal kaynakları (44)

2.5.Serbest Radikallerin Hasar Yapıcı Etkileri

Serbest radikaller; proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asidler ve DNA üzerinde hasar yapma kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle, hücre içi savunma mekanizmalarını inaktive etmeye yeterli konsantrasyona ulaştıklarında hücre içi bileşenlerle reaksiyona girerek metabolik ve hücresel bozukluklara sebep olabilirler (Şekil 2.6).

.



Şekil 2.6-Hücresel serbest radikal hasarı (30)

Oksidatif stresin hedefi, hücrenin cinsine, maruz kalınan strese ve şiddetine göre değişir. Örneğin; karbontetraklorür hücrelerde lipid peroksidasyon yoluyla hasar oluştururken, H_2O_2 in hücresel hasarı ise DNA üzerindedir (29, 30, 46).

2.5.1.Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkiler

Reaktif oksijen türleri, DNA üzerine direkt kimyasal saldırı ile ya da indirekt mekanizmalarla DNA hasarına neden olabilir. DNA hasarına neden olan radikal oluşum mekanizmaları şunlardır:

- İyonize radyasyona maruz kalma, yüksek O_2 konsantrasyonu, aktive fagositik hücreler, redoks döngü kimyasalları, sigara dumanı veya ozona maruziyet,
- H_2O_2, peroksinitrit, nitröz asid ve organik hidroperoksidlerin artışı,
- Otooksidasyon kimyasallarına maruz kalma (dihidroksifumarat, dopamin, L-dopa, noradrenalin, adrenalin)
- Ksantin oksidaz substratları olan ksantin veya hipoksantine maruziyet,
- Tümör nekroz faktör (TNFα) artışı.

DNA hasarı, baz değişiklikleri, tek ve çift zincir kırılmaları veya kromozomal ayrılmalar şeklinde gerçekleşmektedir. Oksidatif DNA hasarının mutajenez, karsinojenez, yaşlanma, diyabet, inflamasyon hastalıkları, karaciğer hastalıklarının gelişiminde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (46-49).

Oksidatif strese maruz kalmış memeli hücrelerinde, guaninin $OH^{\cdot}$ radikali tarafından oksidasyonu sonucu 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşmaktadır, bu ürün DNA'nın yapısını değiştirir ve mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahiptir. Bu ürünü, idrarda takip etmek suretiyle oksidatif DNA hasarının derecesini saptamanın mümkün olduğu ileri sürülmekte ve bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmektedir (50).

2.5.2.Proteinlere Etkiler

Proteinler, son yıllarda serbest radikal hasarının hedefi olarak önem kazanmıştır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (46, 51).

Pirolin ve lizin H_2O_2, $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ radikalleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler.

Hipokloröz asid gibi oksidatif moleküller, metal katalizörlüğünde (protein yapısına metal bağlanarak) tirozinin, 3-klorotirozine ve histidinin, 2-okso histidine oksidlenmesine sebep olur.

Hem proteinleri de serbest radikaller tarafından etkilenen moleküllerdir. H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ radikalinin etkisi ile oksihemoglobin methemoglobine dönüşür (35).

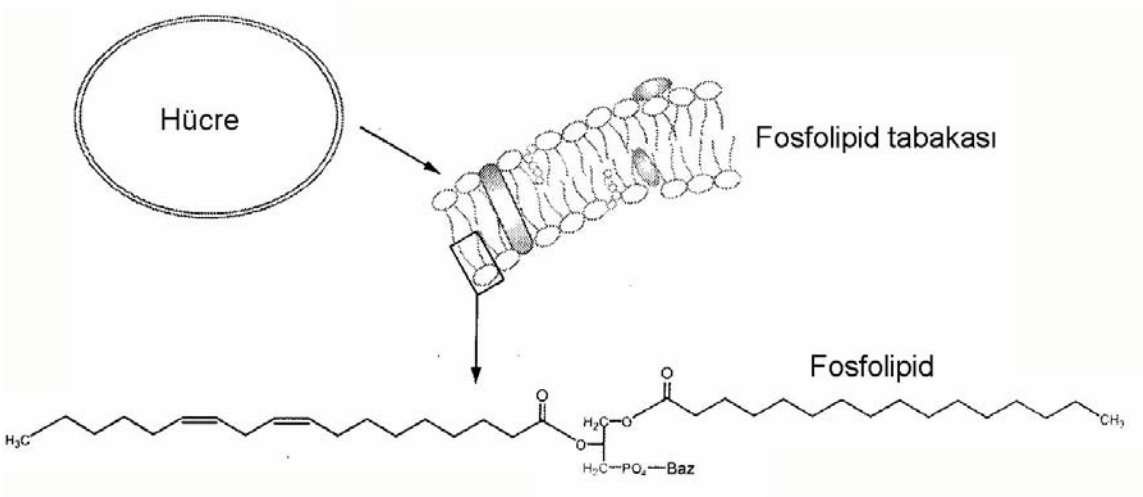
Protein oksidasyonunun, ateroskleroz, diyabet, iskemi-reperfüzyon hasarı, romatoid artrit, alzheimer, parkinson ve yaşlanma gibi birçok patolojik hastalıkların gelişmesi ile ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (52, 53).

2.5.3.Karbonhidratlara Etkiler

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu; H_2O_2, peroksid ve okzoaldehid yapısında ürünler meydana gelir. Bunlar, diyabet, kanser, sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma olaylarında rolü olduğu düşünülmektedir (54).

2.5.4.Membran Lipidlerine Etkiler

Biyolojik membranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum), membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asidlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdırlar (Şekil 2.7). Bundan dolayı, serbest radikallerin atakları sonucunda lipid peroksidasyonu denilen bir seri reaksiyon başlar. Lipid peroksidasyonu, membran lipidlerinin oksidatif hasarı sonucunda hücre membran yapısının bozulmasıdır. Hücre membranlarının bütünlüğü ve akıcılığı, hücrenin devamlılığı açısından önemlidir (4).



Şekil 2.7-Hücre fosfolipid tabakası (55)

2.5.4.1.Non-enzimatik Lipid Peroksidasyon

Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir (Şekil 2.8) (55-62):

1-Başlangıç Aşaması: Organizmada oluşan bir serbest radikalin membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi (RH) zincirindeki bir metilen grubundan H^+ atomunu koparması ile başlar. Yağ asidlerindeki çifte bağ varlığı C-H bağını zayıflatarak H^+ atomunun kopmasını kolaylaştırır. İlk H^+ atomunu koparacak aktivitedeki radikaller; $OH^{\cdot}$, alkoksil, peroksil ve hidroperoksil radikalleridir. Hidrojen kopması sonucunda yağ asidi zinciri, karbon merkezli bir lipid radikali ($R^{\cdot}$) özelliği kazanır. Bir veya sıfır çifte bağı olan yağ asidleri, bu tip saldırılara çoklu doymamış yağ asidlerine oranla daha dirençlidir.

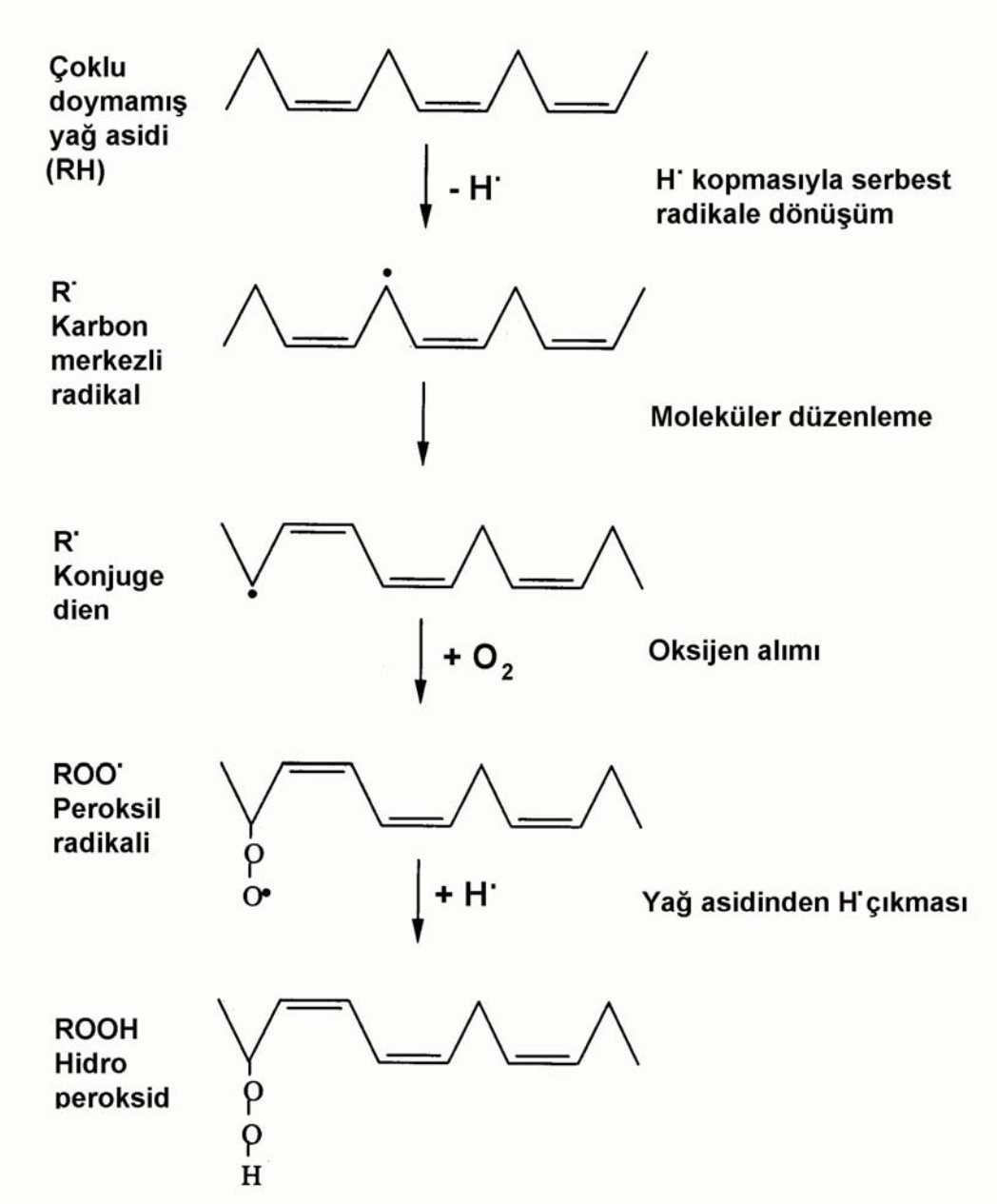
2-Gelişme Aşaması*:* Lipid radikali, moleküler bir düzenleme ile konjuge dien formuna dönüşerek stabilize edilir. Bunu takiben moleküler oksijen ile reaksiyon sonucu lipid peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) oluşur.

$$\mathbf{R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}}$$

Lipid peroksil radikali, komşu yağ asidlerini de etkileyerek yeni lipid radikallerinin ($R^{\cdot}$) oluşumuna yol açarken, kendisi de açığa çıkan $H^{\cdot}$ i alarak lipid hidroperokside (ROOH) dönüşür. Böylece zincir reaksiyonları kendi kendine katalizlenerek devam eder.

$$\mathbf{ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R}$$

Sonuçta, birçok yağ asidi zinciri lipid hidroperoksidlere çevrilmiş olur. Hidrofilik özellikteki lipid hidroperoksidler, membranlarda bütünlüğü, akıcılığı ve geçirgenliğini önemli ölçüde zarara uğratır.



Şekil 2.8-Lipid peroksidasyon mekanizması (62)

Lipid hidroperoksidler, oldukça dayanıklı moleküllerdir. Fakat yıkımlanmaları yüksek sıcaklık ve metal iyonlarının varlığında artar ve böylece lipid peroksidasyon hızlanır.

$$2\ ROOH \xrightarrow{Cu^{+2},\ Fe^{+2}} ROO^{\cdot} + RO^{\cdot} + H^{+} + OH^{-}$$

Reaksiyon zincirinin sonlanması, oksijen konsantrasyonu ve zincir kırıcı antioksidanların miktarı gibi faktörlere bağlıdır.

3- Sonlanma Aşaması*:* Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikalinin etkileşimi ile radikal olmayan bir ürün oluşuncaya kadar devam eder.

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow ROOR$$

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow RR$$

Lipid hidroperoksidlerin yıkımı sonucunda sekonder lipid peroksidasyon ürünleri olan hidrokarbon gazları ve aldehidler oluşur. Bu ürünler, peroksidasyonun olduğu bölgeden hücrenin diğer bölümlerine difüze olarak hücre bileşenlerine zarar verirler (58, 63).

2.5.4.2.Enzimatik Lipid Peroksidasyon

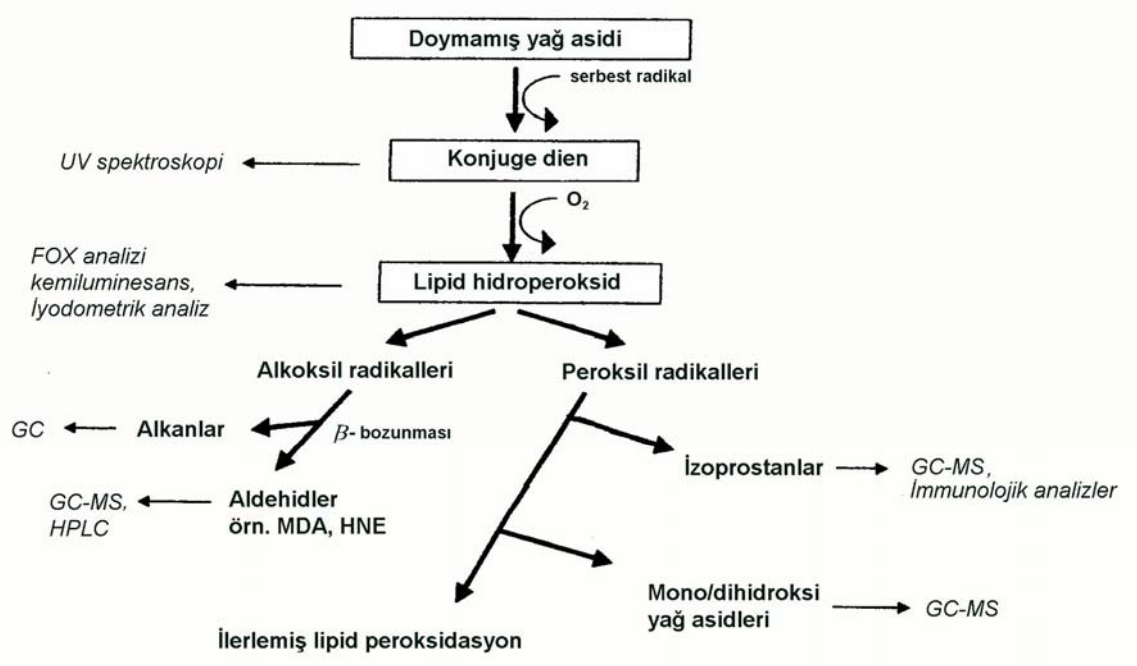
Siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri, kendilerinin substratları olan yağ asidlerinde belirli bir oranda lipid peroksidasyonu meydana getirirler ve bunun sonucunda önemli biyolojik fonksiyonlara sahip hidroperoksidler ve endoperoksidler oluşur. Prostaglandinler, siklooksijenazlar tarafından katalize edilen araşidonik asidin peroksidasyonu sonucu oluşurlar (62, 64).

2.6.Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi

Lipid peroksidasyon düzeyi, çoklu doymamış yağ asitlerinin hasarı ve birincil ve ikincil peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi ile belirlenir (Şekil 2.9) (55, 59, 60, 65-66).

2.6.1.Aldehidlerin Ölçümü

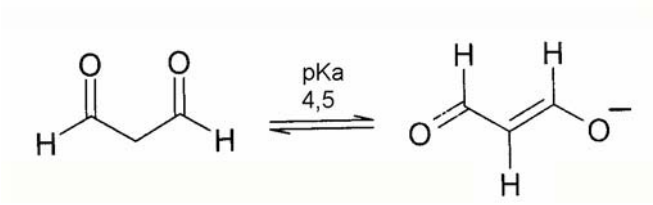
Aldehidler, biyolojik sistemlerde lipid hidroperoksidlerin yıkımı sonucunda oluşurlar. Bunlardan en önemli olanları 4-hidroksi-2-*trans*-nonenal (HNE) ve malondialdehid (MDA)'dir (67). 1960'larda Schauenstein ve Esterbauer bu aldehidlerin önemini vurgulamışlardır.



Şekil 2.9-Lipid peroksidasyonu ürünlerinin tayini (65)

2.6.1.1.Malondialdehid (MDA)

MDA, uçucu, düşük molekül ağırlığına sahip (MA=72,07 g/mol), zayıf asid karakterde (pK_a=4,46), kısa zincirli bir 1,3-dikarbonil bileşiğidir. Nötral ve alkali koşullarda enolat iyon formunda bulunur (Şekil 2.10). MDA asidik (λ_{max}: 245 nm) ve alkali yada nötral çözeltilerde (λ_{max}: 267 nm) ışığı UV alanda absorbe eder. MDA, 2 yada daha fazla çifte bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin (linolenik asid, araşidonik asid, dokosaheksaenoik asid) oksidatif peroksidasyonu sonucu oluşur.



Şekil 2.10-MDA'nın kimyasal yapısı (68)

Fizyolojik koşullar altında orta derecede reaktiftir ve hem elektrofilik hem de nükleofilik olarak etki gösterebilir. Primer amin grubu içeren protein, nükleik asid, aminofosfolipidler gibi fizyolojik moleküller ile reaksiyona girer. Memeli dokularında MDA hızlıca metabolize olur. Aldehid dehidrojenazlar tarafından

malonik aside okside olur. Malonik asid, mitokondride süksinat dehidrojenaz enziminin yarışmalı inhibitörüdür (4, 68).

Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA tayini yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. MDA, biyolojik materyallerde serbest ve bağlı şekillerde bulunur. Serbest MDA normalde çok azdır. Bağlı MDA ise sıcak asid veya alkali ile serbestleşebilir (65, 66, 68).

2.6.1.1.1.Tiyobarbitürik Asid ile Reaksiyon Veren Maddelerin (TBARS) Ölçümü

1944 yılında Kohn ve Liversedge tarafından bulunan yöntemin esası, malondialdehidin asid ortamda ve yüksek sıcaklıkta tiyobarbitürik asid (TBA) ile reaksiyonuna dayanır. Asidik koşullar altında ısıtıldığında; bir molekül MDA, iki molekül TBA ile reaksiyona girer ve sonucunda 532 nm'de (fluoresans: 553 nm) maksimum absorbans gösteren pembe renkli bir kompleks oluşur. Fakat, TBA testi spesifik değildir. Çünkü MDA'dan başka diğer birçok aldehidler de TBA ile reaksiyona girerek kompleks oluşturabilir ve ayrıca, analizde inkübasyon esnasında lipid peroksidlerin parçalanması sonucu oluşan ürünler de TBA ile reaksiyona girebilir. İnkübasyon ortamında metal iyonlarının bulunması da MDA oluşumunu arttırır (67, 69-73).

Analiz esnasında oluşabilecek lipid oksidasyonları önlemek için örneğe önceden antioksidan olarak butilhidroksitoluen (BHT) yada etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) eklenebilir (67, 73). Ayrıca doku homojenatları ile yapılan çalışmalarda ise, proteinler ve okside lipidler trikloroasetik asid (TCA) ile çöktürülerek uzaklaştırılabilir. Ve böylece TBA ile reaksiyon verebilen bileşiklerin oluşturdukları girişim en aza indirilmiş olur (67). Bu yöntemin spesifikliği, oluşan MDA-TBA kompleksini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile de tayin ederek geliştirilebilir. Uygun temizleme işlemlerinin ardından ters faz-HPLC ile yapılan çalışmalarda girişimlerin minimum olduğu belirtilmektedir (74-85) ve ayrıca fluoresans dedektör de kullanılarak hassasiyet arttırılabilir (86-92).

Kolay ve hızlı uygulanabilir olması en önemli avantajı olan bu yöntemin, lipid peroksidasyon ölçen diğer yöntemlerle korelasyonunun da iyi olduğu

gösterilmiştir. Yöntem, çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan bazı modifikasyonlarla in vivo/in vitro çeşitli deney sistemlerine uygulanmış ve halen lipid peroksidasyon tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır (93-103).

2.6.1.1.2.Dinitrofenilhidrazon Metodu

Aldehidlerin dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyonu sonucu DNPH türevleri oluşur. Oluşan hidrazon türevleri stabildir ve 370 nm'de maksimum absorpsiyon gösterirler. Türevin UV dedektör donanımlı HPLC kullanılarak yapılan analizi ile aldehidleri oldukça düşük düzeyde tayin etmek mümkün olmaktadır (104-108).

2.6.1.1.3.Sikloheksandion Metodu

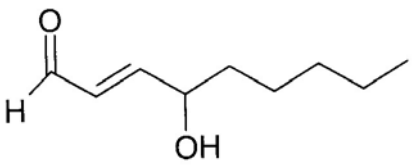
Aldehidlerin, 3-sikloheksandion ile verdikleri türevler fluoresans dedektör donanımlı HPLC kullanılarak tayin edilmektedir (109).

2.6.1.1.4.Fluoresans Gösteren Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçümü

MDA reaksiyonu sırasında fluoresans gösteren kompleksler oluşabilir. Lipidde çözünen ve fluoresans gösteren bu maddeler 420-430 nm emisyon ve 360 nm eksitasyonda ölçülebilirler (110).

2.6.1.2.Hidroksinonenal (HNE)

Molekül ağırlığı 156,2 g/mol olan 4-hidroksi-2-*trans*-nonenal'in kimyasal formülü Şekil 2.11'de gösterilmiştir. HNE ışığı UV alanda absorbe eder (λ_{max}: 221 nm). HNE, ω6 çoklu doymamış yağ asitlerinin (linolenik asid, araşidonik asid) oksidatif peroksidasyonu sonucu oluşan ana üründür. Fizyolojik pH seviyelerinde HNE tiyol ve amino grupları ile hızlıca reaksiyona girer. Bu özelliğinden dolayı HNE'nin, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en toksik ürün olduğu belirtilmiştir. Ayrıca sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve genotoksik özelliklere de sahiptir (67, 111).



Şekil 2.11-HNE'nin kimyasal yapısı (4)

HNE tayininde birçok yöntem geliştirilmiştir. Doğal molekül UV dedektör donanımlı likid kromatografisi (LC-UV) kullanılarak yüksek seviyelerde tayin edilebilir. Düşük seviyelerde tayin edebilmek için ise türevlendirme gereklidir ve sonrasında LC-UV, kütle spektrometri donanımlı gaz kromatografisi (GC-MS) ve elektrokimyasal dedektör donanımlı LC (LC-ECD) kullanılarak HNE'nin tayini gerçekleştirilir. Biyolojik moleküllere bağlı HNE'nin tayini ise GC-MS, LC-MS ve immunolojik teknikler kullanılarak yapılabilir (112-117).

2.6.2.Kısa Zincirli Hidrokarbonların Ölçümü

Lipid peroksidasyon esnasında; etan ω3 çoklu doymamış yağ asitlerinin, pentan ise ω6 çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif peroksidasyonu sonucu oluşan kısa zincirli hidrokarbon gazlarıdır. Lipid peroksidasyonun minör ürünleri olan etan ve pentanın, lipid hidroperoksidlerin ısı veya metal iyonlarının varlığında bozunması sonucu oluştuğu belirtilmiştir. Tayinleri ise solunum havasında alev iyonizasyon dedektör donanımlı GC kullanılarak yapılmaktadır (90, 118).

2.6.3.Lipid Hidroperoksidlerin Ölçümü

Lipid hidroperoksidler, lipid peroksidasyonunun başlıca ürünlerinden biridir. Çok çabuk parçalanan bu ürünlerin tayini, fluoresans dedektör donanımlı HPLC, kemiluminesans dedektör donanımlı HPLC, GC-MS ve iyodometrik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (119-126). Ayrıca asidik ortamda Fe^{2+} nin hidroperoksidler tarafından Fe^{3+} e oksidasyonuna dayanan demirin ksilenoloranjda oksidasyonu (FOX) yöntemi de kullanılmaktadır (95, 96). Lipid hidroperoksidlerin enzimatik tayini ise glutatyon peroksidaz ve siklooksijenaz enzimleri kullanılarak yapılır (127-130).

2.6.4.Konjuge Dienlerin Ölçümü

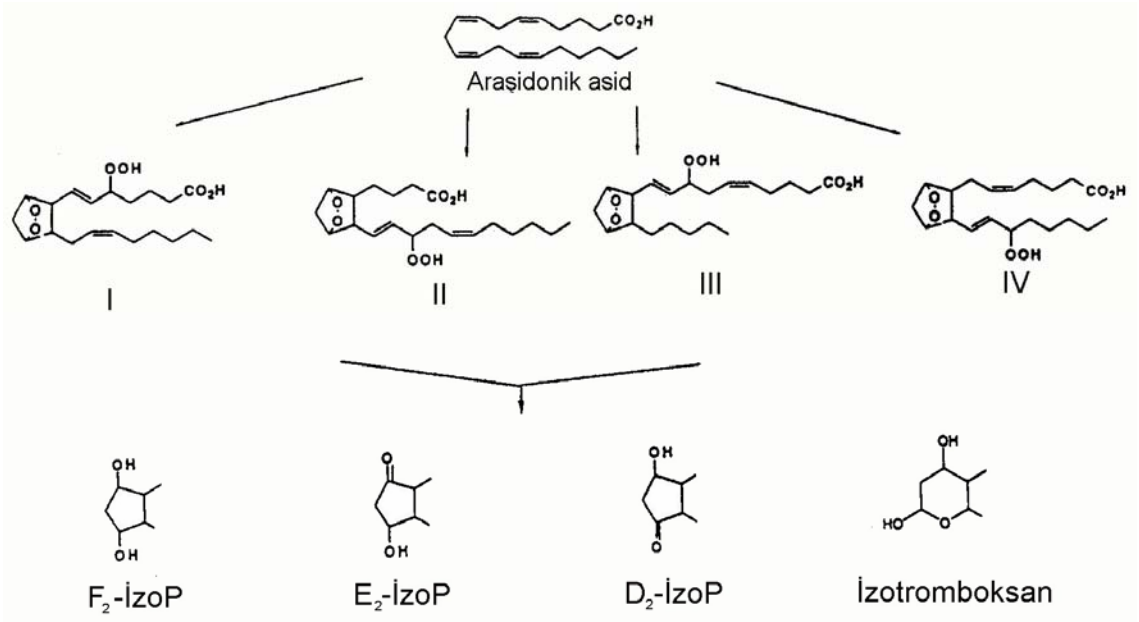
Konjuge dienler, lipid peroksidasyonun başlangıç safhasında; çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif peroksidasyonu sonucu tek bağ-çifte bağın molekül içi düzenlenmesi sırasında oluşur. 234 nm'de güçlü absorpsiyon gösteren konjuge dienler spektroskopik olarak tayin edilebilirler. Fakat, çoğu biyolojik materyalin de bu dalga boyunda belirgin bir şekilde absorbans

göstermesi nedeniyle ortaya çıkan sorunlar, ikincil türev spektroskopisi kullanılarak giderilebilir (70, 131).

2.6.5.F_2 İzoprostanların Ölçümü

İn vivo oluşumları ilk kez 1990 yılında Morrow ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olan izoprostanlar, serbest radikallerin indüklediği lipid peroksidasyonun spesifik göstergesi olarak ortaya çıkmıştır (132-134).

İzoprostanlar, serbest radikaller tarafından indüklenen araşidonik asidin nonenzimatik peroksidasyonu sonucu oluşan prostaglandine (PG) benzeyen ürünlerdir. PG'lerden farklı olarak, biyosentezleri için siklooksijenaz enzimine gerek duymazlar ve araşidonik asid membran fosfolipidlerine bağlı iken de oluşabilirler. PGG_2 endoperoksid ara ürünlerinin indirgenmesi sonucu kimyasal olarak 4 farklı stabil F_2 izoprostan regioizomerleri oluşur. Bunlar, hidroksil grubunun konumuna bağlı olarak 5-, 12-, 8-, 15- (I-IV) seri izoprostanlardır. Her bir regioizomer 8 tane diastereomer içerir ve böylece 64 farklı izoprostan oluşur. Siklopentan halkasının yapısına bağlı olarak da D_2, E_2, A_2, J_2 yada izotromboksanlar gibi izoprostan tipleri oluşabilir (135-139).



Şekil 2.12-PGG_2 endoperoksid ara ürünlerinin indirgenmesi (I-IV) ve F_2-izoprostan izomerleri (139)

Oluşan F_2-izoprostan izomerleri içerisinde en önemlisi, 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PG $F_{2\alpha}$)'dır. Vazokonstrüksiyon ve bronkokonstrüksiyon gibi biyolojik etkilere sahip 8-iso-PG $F_{2\alpha}$, lipid peroksidasyonunun ve oksidatif hasarın en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çeşitli vücut sıvıları ve dokularındaki seviyesinin tayininin, lipid peroksidasyon tayininde en güvenilir yaklaşım olduğu bildirilmektedir (140-142). 8-iso-PG $F_{2\alpha}$ oluşumunun, serbest radikallerin indüklediği oksidatif hasarın bağlı bulunduğu sigara içme, diyabet, hiperkolesterol, ateroskleroz, alzheimer, alkolizm ve siroz gibi çeşitli patolojik durumlarda insan vücut sıvılarında arttığı belirtilmiştir (143-147).

Serbest ve total (serbest ve bağlı) 8-iso-PG $F_{2\alpha}$, GC-MS, LC-MS, enzim immunoassay, radio immunoassay gibi farklı teknikler kullanılarak tayin edilebilir (148-159).

2.7.Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonunu sağlamak için normal fizyolojik şartlarda çeşitli "antioksidan savunma sistemleri" gelişmiştir. Kısaca "antioksidanlar" olarak da adlandırılan bu sistemdeki moleküller, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında ve dolayısıyla oksidatif hasarın önlenmesinde önemlidirler (4, 160-162).

Antioksidanlar,

- oksijeni uzaklaştırarak,
- geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak,
- reaktif oksijen türlerini baskılayarak veya temizleyerek,
- başlamış olan zincir reaksiyonunu kırarak etkili olurlar (163).

Çeşitli özellikteki serbest radikaller için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç vardır. Hidrofilik özellikteki antioksidanlar sitozol ve ekstraselüler sıvılarda, lipofilik özelliktekiler ise membranlarda ve lipoproteinlerde bulunurlar (164).

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılmaktadır. Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında SOD, CAT, GSH-Px ve glutatyon-S-

transferaz (GST) bulunur. Bu birincil enzimlerden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan GSH-Rd ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimleri de vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Non-enzimatik antioksidanlar ise, indirgenmiş glutatyon (GSH), N-asetilsistein ve tiyoller gibi protein olmayan sülfhidriller, A, C ve E vitaminleri ve daha başka moleküllerdir (4, 165). Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları Tablo 2.3'de topluca verilmiştir.

2.7.1.Enzimatik Antioksidanlar

2.7.1.1.Süperoksid Dismutaz

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD enzimi $O_2^{\cdot -}$ radikalini katalitik olarak uzaklaştıran ve lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzimdir. $O_2^{\cdot -}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalize eder (166).

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$

Normal metabolizma esnasında hücreler tarafından yüksek oranda $O_2^{\cdot -}$ radikali üretilmesine rağmen intraselüler düzeyi SOD sayesinde düşük tutulur. Yukarıdaki denklemde görüldüğü gibi bu reaksiyon sonucunda membranları geçemeyen $O_2^{\cdot -}$ radikali, membranları kolayca geçebilen H_2O_2 e dönüşmektedir. H_2O_2 ise geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile son derece aktif olan $OH^{\cdot}$ radikaline dönüşmektedir (17). Bu nedenle SOD aktivitesindeki artışın oluşturabileceği aşırı H_2O_2 birikmesinin ancak CAT ve GSH-Px enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol altında tutulabileceği ileri sürülmektedir (4).

SOD'ın aktif merkezindeki metale bağlı olarak 3 farklı çeşidi mevcuttur (4, 25).

Tablo 2.3-Biyolojik sistemlerdeki antioksidanlar (2)

SİSTEM	ÖZELLİKLER
Nonenzimatik	
α-Tokoferol	Membrana bağlı kromanoksil radikalina dönüşüp rejenere olur
Askorbik asid	Suda çözünür
Glutatyon	Glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz için kofaktördür
Flavonoidler	Bitki antioksidanları (rutin, kersetin)
Kimyasallar	Butil hidroksianisol (BHA), BHT gibi gıda katkı maddeleri
β-Karoten	Singlet oksijen baskılayıcı
Ürik asid	Singlet oksijen baskılayıcı, radikal temizleyici
Plazma proteinleri	Seruloplazmin
Enzimatik	
Süperoksid dismutazlar	CuZn-SOD enzimi, Mn-SOD enzimi
Glutatyon peroksidazlar	Selenoenzim; non-Se enzim: Bazı glutatyon-S-transferazlar
Katalaz	Hem enzimi; peroksizomal matrikste yoğun
Yardımcı Enzimler	
NADPH-kinon oksidoredüktaz	İki elektron redüksiyonu, dikumarole duyarlı
Epoksid hidrolaz konjugasyon enzimleri	UDP-glukuroniltransferaz, sülfoniltransferaz, glutatyon-S-transferazlar
Glutatyon redüktaz	
NADPH	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, 6-fosfo-glukonat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz, enerji-bağımlı transhidrojenaz
Transport sistemleri	GSSG taşınması, konjugat taşınması

CuZn-SOD

1939 yılında Mann ve Keilin, sığır kanından bakır içeren mavi-yeşil renkte hemokuprein olarak adlandırılan bir protein izole etmiştir. 1953'de benzer bir protein at karaciğerinden izole edilmiş ve hepatokuprein adı verilmiştir. 1970'de eritrositteki bu proteinin bakır yanında çinko da içerdiği tespit edilmiştir. Başlangıçta bu proteinin hiçbir enzimatik etkinliği tespit edilmemiş ve sadece bir metal deposu olduğu ileri sürülmüştür. 1969'da McCord ve Fridovich adlı araştırmacılar bu proteinin eritrositte $O_2^{\cdot -}$ i katalitik olarak yıktığı ve bir SOD aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuşlardır (4, 166).

CuZn-SOD'lar oldukça stabildirler. Eritrositlerden saflaştırmada hücreler hemoliz edilir ve kloroform-etanol uygulamasının ardından santrifüjle hemoglobin uzaklaştırılır. Enzim organik faza geçer, soğuk aseton eklenmesiyle çöktürülür ve iyon değiştirme kromatografisiyle tam olarak saflaştırılır (167). Birçok enzim bu prosedürlere dayanıklı değildir. Ayrıca CuZn-SOD'lar ısıya, proteazların saldırısına ve guanidin klorür, sodyum dodesil sülfat ve üre tarafından denatürasyona dirençlidirler (168). Hayvan hücrelerinde CuZn-SOD'lar daha çok sitozolde yerleşmiştir aynı zamanda lizozomlarda, çekirdekte ve iç ve dış mitokondriyel membran arasındaki boşlukta bulunurlar. Siyanür iyonları, CuZn-SOD'ların güçlü inhibitörleridir. Ayrıca dietilditiyokarbamatlar, enzimin aktif bölgesindeki bakırı bağlayarak aktif bölgeden uzaklaştırmak suretiyle enzimi etkisiz hale geçirirler (169).

Bugüne kadar ökaryotik hücrelerden izole edilen tüm CuZn-SOD enzimlerinin moleküler kütlesi 32.000 civarındadır ve iki protein alt ünitesi içerir. Bu iki alt üniteden birisi bir Cu^{2+} ve bir Zn^{2+} iyonu içeren aktif kısmı oluşturmaktadır.

CuZn-SOD enziminde bulunan bakır iyonları, oksidasyon ve redüksiyona uğrayarak dismutasyon reaksiyonunda fonksiyon görür. Çinkonun ise katalitik olarak bir rolü yoktur, sadece enzimi stabilize ettiği bildirilmektedir.

$$\mathbf{SOD - Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow SOD - Cu^{+} + O_2}$$

$$\mathbf{SOD - Cu^{+} + O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \rightarrow SOD - Cu^{2+} + H_2O_2}$$

Net reaksiyon:

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$

$O_2^{\cdot -}$ anyonu, enzimdeki Cu^{2+} ve guanido grubuna bağlanır ve bu esnada $O_2^{\cdot -}$ den bir elektron Cu^{2+} ye transfer olurken Cu^{+} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir $O_2^{\cdot -}$ anyonu Cu^{+} dan bir elektron ve iki proton alarak H_2O_2 oluştururken, enzim tekrar Cu^{2+} formuna döner (167).

Mn-SOD

İlk kez *Escherichia coli*'den izole edilen, Mn-SOD'ın CuZn-SOD'dan tamamen farklı olduğu ortaya konulmuştur. Bu enzimin mavi-yeşil yerine pembe renkli olduğu, siyanür veya dietilditiyokarbamat ile inhibe olmadığı, moleküler kütlesinin 32.000 yerine 40.000 olduğu, kloroform-etanole karşı dayanıksız olduğu ve aktif bölgesinde Mn^{3+} içerdiği ortaya konulmuştur. Bu farklılıklara karşın, Mn-SOD'lar da CuZn-SOD'lar gibi aynı reaksiyonu katalizle ederler (4,167).

$$\mathbf{Mn^{3+} + O_2^{\cdot -} \leftrightarrow [Mn^{3+} - O_2^{\cdot -}] \rightarrow Mn^{2+} + O_2}$$

$$\mathbf{Mn^{2+} + O_2^{\cdot -} \leftrightarrow [Mn^{2+} - O_2^{\cdot -}] + 2\,H^{+} \rightarrow Mn^{3+} + H_2O_2}$$

pH 7.0'de Mn-SOD'ların, $O_2^{\cdot -}$ dismutasyon oranı CuZn-SOD ile aynıdır, fakat, CuZn-SOD'lardan farklı olarak yüksek pH'larda, Mn-SOD'ların dismutasyon oranı azalır. Ayrıca Mn-SOD'lar, ısıya ve kimyasallara daha az dirençlidir (167).

Mn-SOD'lar; bakteri, bitki ve hayvan dokularında da bulunur. Çoğunlukla hayvan dokusu ve mayalarda mitokondride yerleşmişlerdir. Mn-SOD aktivitesi doku ve türe bağlı olarak değişmektedir. Memeli eritrositleri Mn-SOD içermemektedir. Sıçan karaciğerinde total SOD'ın %10'u, insan karaciğerinde ise daha fazlası Mn-SOD'dır. Bakır alımı kısıtlanan durumlarda Mn-SOD sentezi artmakta, tam tersi olarak mangan alımı kısıtlanan durumlarda da CuZn-SOD aktivitesi artmaktadır (165).

Fe-SOD

E. Coli bakterisinden 4 tip SOD izole edilmiştir. Periplazmik CuZn-SOD, hücreiçi Mn SOD, hücre matriksinde bulunan Fe-SOD ve dördüncüsü ise, aynı dimerik molekülde Mn-SOD ve Fe-SOD alt ünitelerini içeren hibrid bir SOD'dır (4,165).

Fe-SOD genelde iki protein alt ünitesi içerir, her proteinde bir veya iki demir iyonu bulunur. Enzim normal halde iken demir iyonu +3 değerliklidir, katalitik döngüde Fe^{3+} ve Fe^{2+} arasında dönüşüm gerçekleşir. Diğer SOD tiplerine göre Fe-SOD'ın $O_2^{\cdot -}$ dismutasyon oranı düşüktür. Fe-SOD'ın da Mn-SOD gibi yüksek pH'da aktivitesi düşüktür. Bu enzim de siyanür ile inhibe edilemez (170).

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \leftrightarrow [Fe^{3+}\text{-}\ O_2^{\cdot -}] \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + O_2^{\cdot -} \leftrightarrow [Fe^{2+}\text{-}\ O_2^{\cdot -}] + 2\ H^{+} \rightarrow Fe^{3+} + H_2O_2$$

Henüz hiçbir hayvan dokusunda Fe-SOD olduğu bulunmamışsa da ginkgo biloba, domates ve hardal yaprağı gibi bazı bitkilerde tespit edilmiştir.

SOD'ın vücut sıvıları ve organlardaki aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. SOD enziminin aktivitesini, substrat tüketimi yada ürün oluşumunu enzimatik ortamda ölçerek tayin etmek zordur. Çünkü substratı olan $O_2^{\cdot -}$ radikali ve reaksiyon sonunda oluşan ürünler stabil değildir. Bu nedenle, SOD aktivitesinde kullanılan rutin yöntemler, test ortamında enzimatik veya nonenzimatik olarak oluşturulan $O_2^{\cdot -}$ radikalinin indikatör bir madde ile reaksiyonuna dayanan indirekt yöntemlerdir. Örnekteki SOD aktivitesi, indikatör ile $O_2^{\cdot -}$ radikali arasındaki reaksiyonun SOD tarafından inhibisyon oranına göre hesaplanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerde en sık kullanılan $O_2^{\cdot -}$ radikal kaynağı ksantin-ksantin oksidaz sistemidir ve $O_2^{\cdot -}$ indikatörleri olarak ise nitroblu tetrazolyum (NBT), tetranitrometan, hidroksilamin ve sitokrom c'nin redüksiyonundan yaralanılmaktadır (171-181). Ayrıca $O_2^{\cdot -}$ radikali oluşturucu diğer kaynaklar olarak da epinefrin, pirogallol, 6-hidroksidopamin kullanılmaktadır (182-187).

$O_2^{\cdot -}$ radikalinin doğrudan izlenmesine dayalı SOD ölçüm yöntemleri ise pulse radyoliz tekniği, polarografik teknikler ve hızlı dondurma EPR tekniğidir, ancak bu yöntemler yüksek örnek saflığı ve özel laboratuvar donanımı gerektirmektedir. Ayrıca enzimatik metodlara göre daha spesifik olduğu belirtilen immünokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır (188-190).

2.7.1.2.Katalaz

CAT, 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden elde edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 240.000 civarındadır. CAT'lar, aktif kısmına hem grubu (Fe^{3+}- protoporfirin) bağlı dört protein alt ünitesinden oluşur. Her alt ünite aynı zamanda enzimi kendi substratı H_2O_2 e karşı koruyan bir molekül indirgenmiş NADPH içerir (4, 165, 191). Depolama, dondurarak kurutma, asit ve alkaliye maruziyet alt ünitelerin ayrılmasına ve enzim aktivitesinin kaybolmasına yol açar.

CAT, hayvanlarda tüm organlarda bulunur, ancak özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğunlaşmıştır. Hücre içinde ise başlıca peroksizomlarda yerleşmişlerdir ve mitokondri, kloroplastlar ve endoplazmik retikulumda da az miktarda bulunurlar (192).

CAT aktivitesi azid veya siyanürle inhibe edilmektedir, fakat bu inhibitör etki spesifik olmayıp diğer birçok enzimi de inhibe eder. En çok kullanılan inhibitör aminotriazoldür (4, 165).

CAT, SOD'a benzer bir dismütasyon reaksiyon mekanizmasıyla, H_2O_2 i O_2 ve H_2O ya parçalayarak biyolojik sistemler için zararlı olan H_2O_2 e karşı koruma sağlar (4, 193, 194).

$$\textbf{CAT- } Fe^{+3} + H_2O_2 \rightarrow \textbf{Bileşik I}$$

$$\textbf{Bileşik I } + H_2O_2 \rightarrow \textbf{CAT- } Fe^{+3} + 2\,H_2O + O_2$$

CAT enzimi, H_2O_2 varlığında bazı peroksidaz tipi reaksiyonları da yürütür. Böylece bileşik I, metanol ve etanol gibi alkolleri, aldehidleri olan formaldehid ve asetaldehide oksitler (165).

$$AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$$

Ayrıca CAT, in vitro koşullar altında nitriti (NO_2^-), nitrata (NO_3^-) dönüştürebileceği gibi, vücuda absorbe olan elementel civayı (Hg) da civa II (Hg^{2+}) ye okside edebileceği ileri sürülmüştür (192).

CAT aktivitesinin tayininde en çok kullanılan yöntem H_2O_2 yıkımının spektrofotometrik yöntemle 240 nm'de izlenmesidir. Birim zamanda absorpsiyondaki fark CAT aktivitesinin bir ölçütüdür. Analiz esnasında enzimin

inaktivasyonunu önlemek için düşük konsantrasyonda substrat kullanmak gerekmektedir. Diğer yöntemler ise reaksiyon sonunda oluşan O_2 miktarının ölçümüne dayalı oksijen elektrodu veya polarografi ile yapılan tayinlerdir (195-198).

2.7.1.3.Glutatyon Peroksidaz

GSH-Px enzimi, ilk kez 1957 yılında Mills tarafından hayvan dokusunda keşfedilmiştir. Genellikle yüksek bitkilerde ve bakterilerde bulunmamasına rağmen, bazı alg ve mantarlarda bulunduğu bildirilmiştir (4, 199).

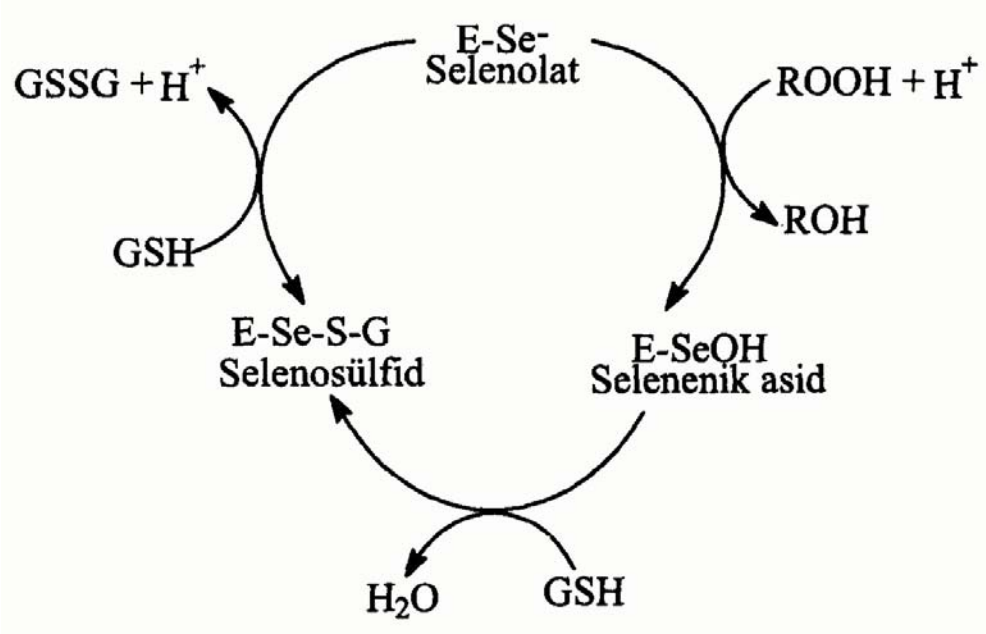
Bu enzimin iki ana tipi tanımlanmıştır. Bu tiplerden biri aktif bölgesinde selenosistein formunda kovalent bağlı selenyum içeren "selenyuma bağımlı GSH-Px (Se-GSH-Px)" dır. Se-GSH-Px, organik hidroperoksidler ve H_2O_2 e karşı aktiftir. H_2O_2 dahil çeşitli hidroperoksidlerin yıkımını, GSH'un oksidasyonu yoluyla katalizler. Okside glutatyon (GSSG) ise GSH-Rd enzimi aracılığıyla ile tekrar GSH a indirgenir (4, 200-201).

$$\mathbf{H_2O_2\ (ROOH) + 2\ GSH \rightarrow\ GSSG + 2\ H_2O\ (ROH)}$$

$$\mathbf{GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH\text{-}Rd} 2\ GSH + NADP^+}$$

Enzimin diğer tipi ise, katalizleme işlemleri için selenyuma bağlı olmayan proteinlerden oluşur ve H_2O_2 e karşı ihmal edilebilir bir aktivite gösterir. Bu grup enzimler GST olarak adlandırılır ve elektrofilik bileşikler ile GSH'un konjugasyonunu katalize eden proteinler olarak tanımlanırlar (4).

Se-GSH-Px, her ünite aktif bölgesinde bir atom Se elementi içeren dört protein alt ünitesinden oluşur. Molekül ağırlığı yaklaşık 85.000'dir. Sitosol ve mitokondrilerde bulunur. Se elementi selenosistein şeklinde olup, normal sisteindeki sülfür yerinde Se bulunur (R-SH yerine R-SeH). GSH, enzim içerisindeki Se u indirger ve indirgenmiş enzim H_2O_2 ile reaksiyon verir. Se-GSH-Px enziminin katalitik döngüsü Şekil 2.13'de görülmektedir. Se-GSH-Px'ın selenolat formu ($E\text{-}Se^-$) peroksid substratını (ROOH) alkole indirgerken, kendisi okside aside dönüşür (E-Se-OH). GSH bu devrede reaksiyona katılarak selenosülfidi oluşturur (E-Se-S-G). İkinci bir GSH'un selenosülfide bağlanması ile enzim aktif formu olan selenolat formuna dönerken GSH da GSSG'a okside olur (4).



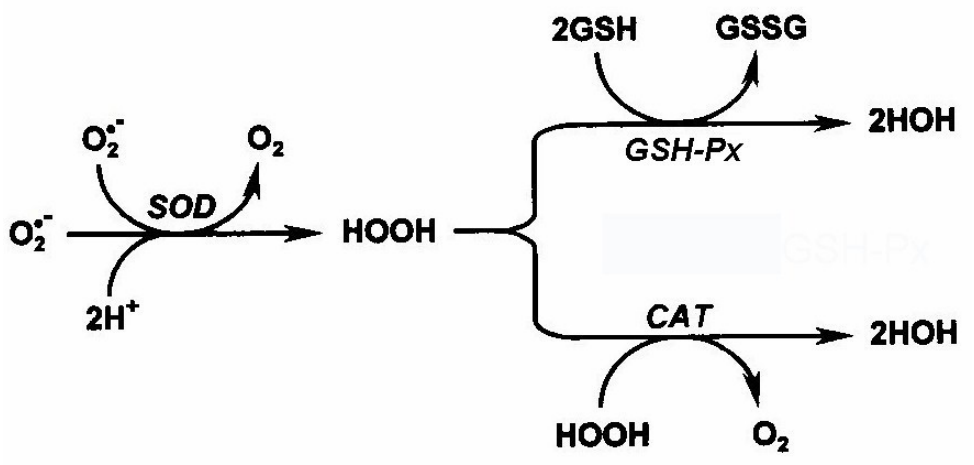
Şekil 2.13-Se-GSH-Px enziminin katalitik döngüsü (165)

Se-GSH-Px enzimi, karaciğerde yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta ve kasta düşük aktivitede bulunur. Karaciğerde ise sitosolde ve mitokondride yerleşmiş olarak bulunurlar (165).

Se-GSH-Px'dan başka, fosfolipid hidroperoksid GSH-Px enzimi (PL-GSH-Px) vardır ve molekül ağırlığı 20.000'dir. Bir selenyum atomu ihtiva eden sitosolik bir enzim olup membran fosfolipid hidroperoksidlerini alkollere indirger. Membranlara bağımlı en önemli antioksidan olan E vitamini yetersiz olduğu zaman membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (4, 15) .

GSH-Px enzim aktivitesinin tayini için en çok kullanılan yöntemler, substrat olarak H_2O_2, kümen hidroperoksid ve tersiyer butil hidroperoksidin kullanıldığı ortamda GSH'un oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'un GSH-Rd ve NADPH ın varlığında indirgenmiş forma dönüşmesi esasına dayanır. Bu dönüşüm esnasında NADPH'ın oksidasyonunun spektrofotometrik veya fluorimetrik olarak izlenmesi ile GSH-Px aktivitesi tayin edilir. Enzim aktivitesi, dakikada okside olan μmol NADPH üzerinden hesaplanmaktadır (201-203). Ayrıca reaksiyon esnasında hidroperoksidlerin ve GSH'un tüketimini esas alarak yapılan tayinler de mevcuttur (204).

Serbest radikallerin detoksikasyonunda rol oynayan antioksidan etkili üç enzimin $O_2^{\cdot -}$ radikalinin detoksikasyonundaki rolleri Şekil 2.14'de özetlenmiştir.



Şekil 2.14-$O_2^{\cdot -}$ radikalinin detoksikasyonu (4)

2.7.1.4.Glutatyon Redüktaz

Se-GSH-Px tarafından H_2O_2 veya diğer lipid peroksidlerin indirgenmesi sırasında GSH'un GSSG'a dönüştüğünden 2.7.1.3'de bahsedilmiştir. Bu okside formun tekrar redükte forma dönüşerek reaksiyonlarda kullanılması gereklidir. Çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. İşte GSH-Rd enzimi NADPH varlığında bu indirgenme olayını yürütmektedir (4, 165, 205-207).

$$\mathbf{GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH\text{-}Rd} 2\ GSH + NADP^+}$$

Burada gerekli olan NADPH hayvan veya bitki dokularında çeşitli enzim sistemleri tarafından sağlanabilir fakat en çok bilinen sistem oksidatif pentoz fosfat yolağıdır. Bu yolaktaki ilk enzim glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimidir.

$$\mathbf{G6PD + NADP^+ \rightarrow 6\text{-}Fosfoglukonat + NADPH + H^+}$$

Oluşan 6-fosfoglukonat ise 6-fosfoglukonat dehidrojenaz enzimi aracılığıyla yine NADPH'a dönüştürülür.

$$\mathbf{6\text{-}Fosfoglukonat + NADP^+ \rightarrow CO_2 + NADPH + H^+ + Ribuloz\text{-}5\text{-}fosfat}$$

Molekül ağırlığı 120.000 olan GSH-Rd enzimi iki protein alt ünitesi içerir ve her bir alt ünite aktif bölgesinde FAD bulundurur. Muhtemelen NADPH, FAD'i

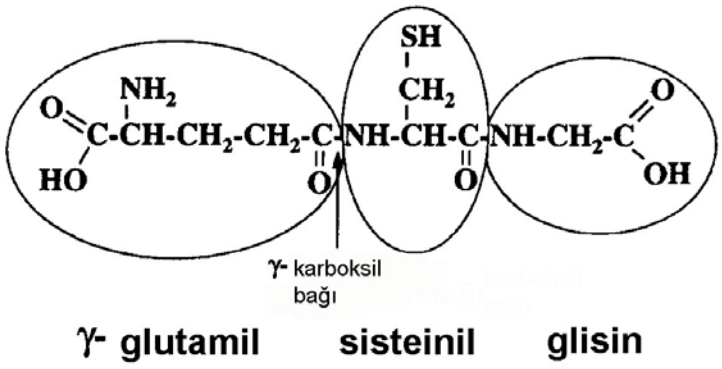
indirgemekte ve bu FAD'deki elektronlar da GSSG'daki disülfür (-S-S-) köprüsüne aktarılarak disülfür bağı kırılmakta ve molekül GSH haline dönüştürülmektedir (165).

GSH-Rd enzim aktivitesinin tayini için substrat olarak H_2O_2 in kullanıldığı ortamda GSH'un oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'un, GSH-Rd ve NADPH'ın varlığında indirgenmiş forma dönüşmesi esasına dayanır. Bu dönüşüm esnasında NADPH'ın oksidasyonunun spektrofotometrik olarak izlenmesi ile GSH-Rd aktivitesi tayin edilir. Enzim aktivitesi, dakikada okside olan μmol NADPH üzerinden hesaplanmaktadır (208-209).

2.7.2.Non-enzimatik Antioksidanlar

2.7.2.1.Glutatyon

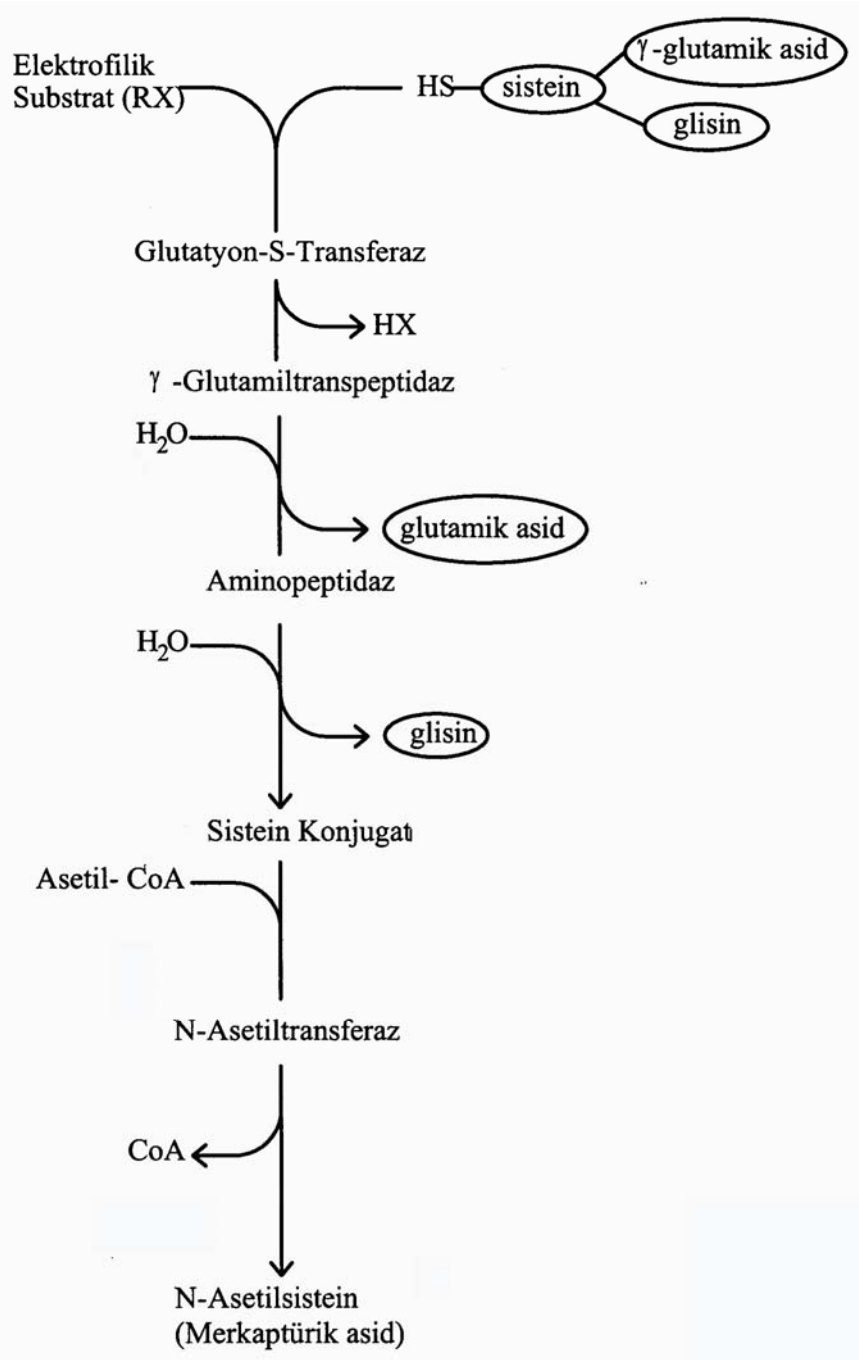
GSH, L-glutamik asid, L-sistein ve glisinden iki basamaklı reaksiyonla oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir. Bu reaksiyonlarda, δ-glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz aracılık yapar. Her basamakta bir mol ATP görev alır. Organizmada en yüksek seviyede bulunduğu organ karaciğerdir. Hücrede ise en fazla sitozol, mitokondriler ve nükleusta bulunur. Hücre içi glutatyonun büyük bölümü tiyol (indirgenmiş glutatyon, GSH) formunda, daha az oranda ise disülfür (okside glutatyon, GSSG) formunda bulunur (4, 210-215). Sekil 2.15 de GSH'un formülü görülmektedir.



Şekil 2.15-GSH'un yapısı (213)

Kuvvetli nükleofilik özellikte olan GSH, elektrofilik özellikteki bileşiklerle konjugasyona girerek onların detoksifikasyonunu sağlar. Bu reaksiyon tiyoeter

(merkaptürik asid ve N-asetil-sistein türevleri) oluşumu ile sonlanır ve oluşan ürünler idrar ile atılır. GSH'un elektrofilik madde ile konjugasyonu GST enzimi katalizörlüğü ile başlar (Şekil 2.16) (4, 215).

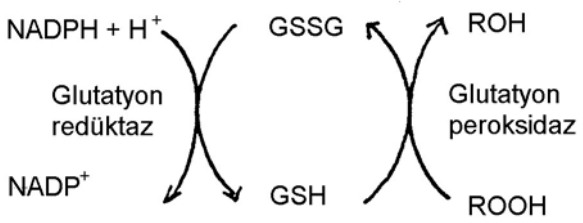


Şekil 2.16-GSH konjugasyonu ve merkaptürik asid biyosentezi (216)

GSH, Se-GSH-Px ve dehidroaskorbat redüktaz enzimlerinin substratı olmasının yanında $OH^{\cdot}$ ve singlet O_2 temizleyicisidir. GSH, aynı zamanda çeşitli peroksidler ve serbest radikaller için indirgeyici özelliktedir. Serbest radikallerin indirgenmesi non-enzimatik olarak yürümekte iken, peroksidler GSH-Px'lar tarafından indirgenmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi hidroperoksidler ve H_2O_2 lerin GSH-Px ile metabolizması GSH'un oksidasyonu ile ilgilidir. GSSG, GSH-Rd tarafından indirgenir ve NADPH varlığında GSH yeniden oluşur (4, 165).

$$\mathbf{H_2O_2\ (ROOH) + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O\ (ROH)}$$

Karaciğer ve diğer organlarda GSH ve GSSG arasındaki denge GSH-Rd ve GSH-Px enzimleri tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.17) (4).



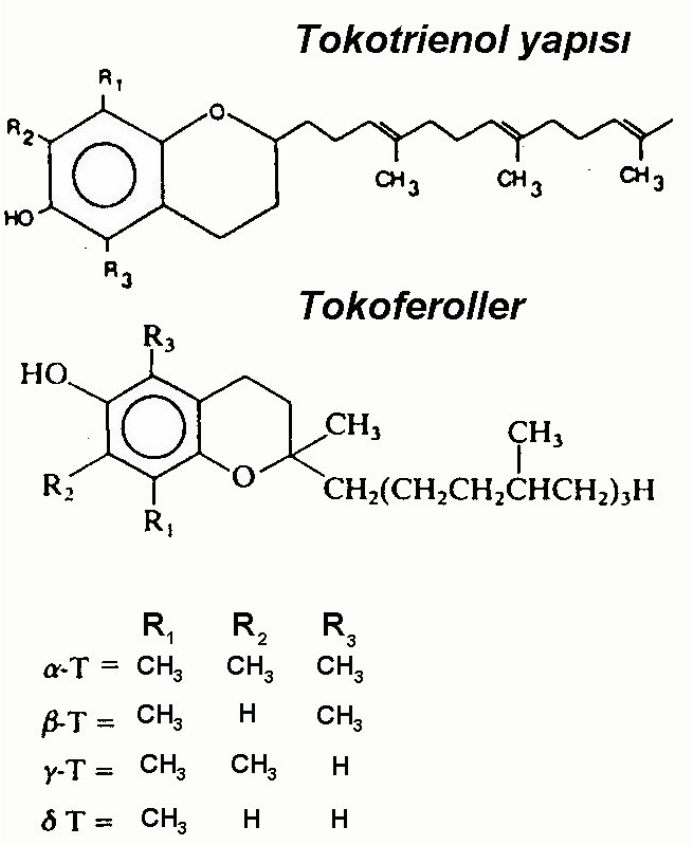
Şekil 2.17-GSH ve GSSG döngüsü (216)

Ayrıca GSH, membran geçirgenliğinin sağlanması, DNA sentezi, protein konformasyonu ve enzim aktivitesinin ayarlanması gibi görevlerde de yer almaktadır (216).

Dokularda ve kanda glutatyon tayininde Ellman tarafından geliştirilmiş olan yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Değişik modifikasyonlarla geliştirilen bu yöntemin esası, GSH'un 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asid (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürünün 412 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanır (217-220). Bunun dışında, GSH'un tayini farklı türevlendirici ajanlar kullanılarak fluorometrik olarak ve ayrıca HPLC kullanılarak da yapılmaktadır (221-225).

2.7.2.2.E Vitamini

İlk olarak 1922 yılında izole edilen E Vitamini, α-, β-, γ-, δ- tokoferol ve α-, β-, γ-, δ- tokotrienol olarak adrandırılan bileşiklere verilen genel bir isimdir. Şekil 2.18'de tokoferollerin genel kimyasal yapıları gösterilmektedir. α-Tokoferol, bu bileşikler içerisinde doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en yüksek olanıdır. Ayrıca α-tokoferol, en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubu içeren aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur. α-Tokoferol, dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. Mitokondri ve mikrozomlar gibi membranca zengin hücre kısımlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Bitkisel yağlar ve tohumlar da zengin E vitamini kaynaklarıdır (4, 164, 226-227).



Şekil 2.18-Tokoferollerin kimyasal yapıları (4)

α-Tokoferol, $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$, singlet O_2, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri temizler (164, 226).

Yağda çözünen tek antioksidan olan α-tokoferol hücre membranlarının fosfolipid tabakasında ve plazma lipoproteinlerinde (LDL) yer alır (228). α-Tokoferolün OH grubundaki H atomu çok kolay uzaklaştırılabilir. Bu nedenle lipid peroksidasyonu esnasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri komşu bir yağ asidi ile birleşmek yerine tercihen α-tokoferol ile birleşir (Şekil 2.19).

$ROO^{\cdot}$ + Tokoferol- OH → ROOH + Tokoferol- $O^{\cdot}$

Bu olay zincir reaksiyonunu sonlandırır ve böylece α-tokoferol zincir kırıcı antioksidan olarak etki göstermiş olur. Bu reaksiyon ile α-tokoferolün kendisi de yeni bir radikal olan tokoferol-$O^{\cdot}$ (kromanoksil) radikaline dönüşür. Bu radikalin reaktivitesi zayıftır, komşu yağ asidi zincirlerine saldıramaz ve bu nedenle de zincir reaksiyonu durur (4, 164, 229-233). Kromanoksil radikalinin, membran yüzeyinde hücrenin sulu fazındaki C vitamini ile reaksiyona girerek α-tokoferole dönüştüğü bildirilmiştir. Ayrıca GSH da E vitamininin rejenerasyonunda rol oynar (226, 234-235).

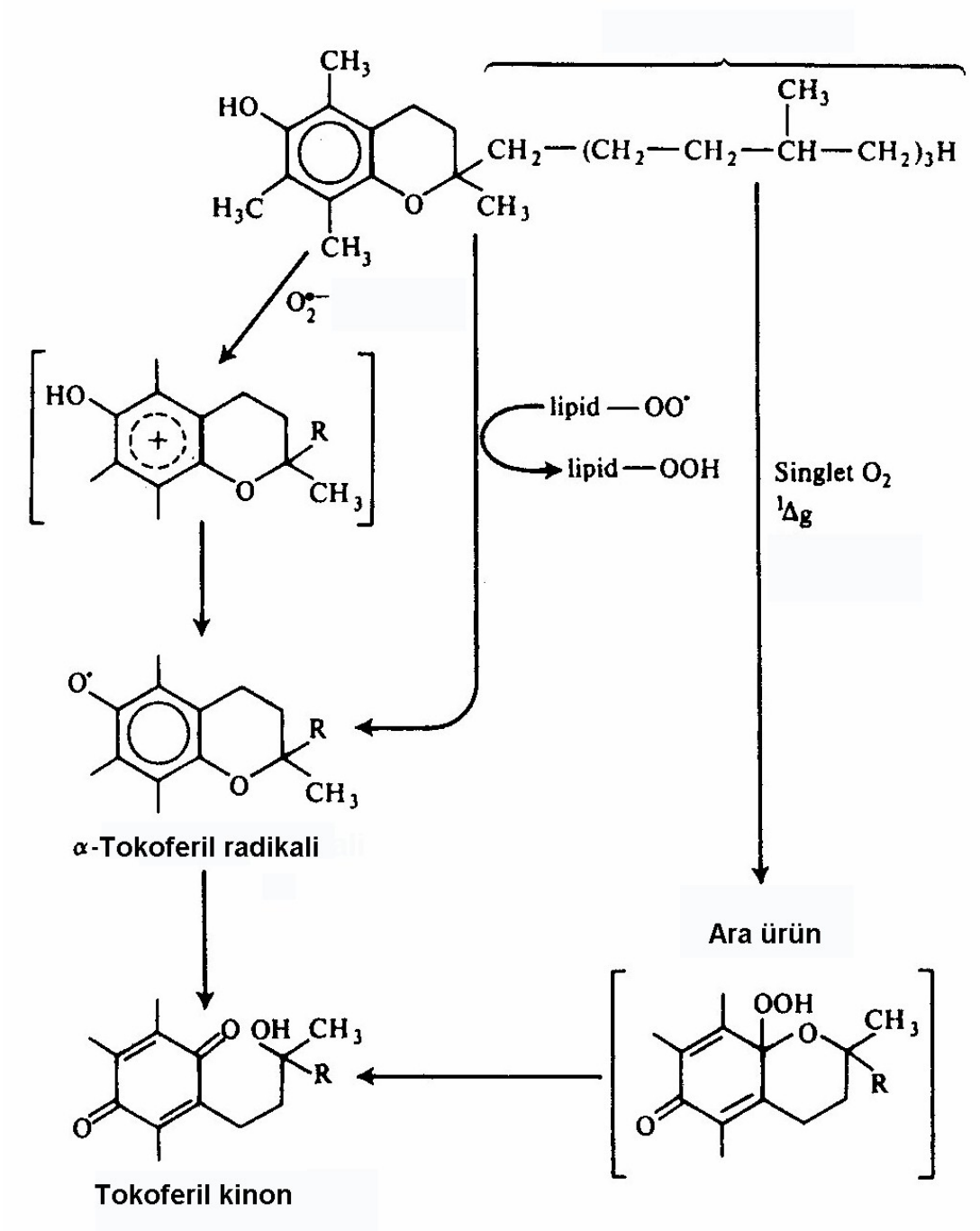
Tokoferol-$O^{\cdot}$ + Askorbik asid → Tokoferol-OH + Dehidroaskorbik asid

2 Tokoferol - $O^{\cdot}$ + 2 GSH → 2 Tokoferol - OH + GSSG

GSH-Px ile α-tokoferol birbirlerini tamamlayıcı bir antioksidan etki gösterirler. GSH-Px, oluşmuş olan peroksidleri ortadan kaldırırken, α-tokoferol ise peroksidlerin sentezini engeller (165).

α-Tokoferol, Se^{2+} metabolizmasında da önemli rol oynar. Se^{2+}, α-Tokoferol ve lipidlerin emilimi için gereklidir. α-Tokoferolün lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. α-tokoferol ise Se^{2+} un organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif halde tutarak Se^{2+} ihtiyacını azaltır (165).

α-Tokoferol, tüm bu özellikleri nedeniyle hücre membranlarının lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında, membran akışkanlığının sağlanmasında ve membran enzimlerinin modülasyonunda önemli bir rol alır (162, 164, 236).



Şekil 2.19-Tokoferolün bazı oksidasyon ürünleri (4)

2.7.2.3.Askorbik Asit (C Vitamini)

Beyaz renkli kristalize bir madde olan C vitamininin moleküler formülü $C_6H_8O_6$'dır. C vitamini suda çözünen en önemli antioksidandır. C vitamini kornea, lens, aköz hümör, adrenal, hipofiz, beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreasta yüksek miktarda bulunur. Yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgiller önemli C vitamini kaynaklarıdır (4).

C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Çok kuvvetli bir indirgeyici ajan olan C vitamini, semihidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside (DHA) okside olur (237-238). Güçlü indirgeyici özelliğinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. $O_2^{\cdot -}$ ve $OH^{\cdot}$ ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitamininin, bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin ve süt gibi yağ içeren yiyecekleri oksidatif bozunmaya karşı koruduğu bilinmektedir.

$$\textbf{Vit C} + 2\,H^+ + 2\,O_2^{\cdot -} \rightarrow 2\,H_2O_2 + \textbf{DHA}$$

C vitamininin diğer bir özelliği antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini Fe^{3+} ü Fe^{2+} ye indirgeyen $O_2^{\cdot -}$ dışındaki tek hücresel ajandır. Bu yol ile askorbat ya proteine bağlı Fe^{3+} ü uzaklaştırarak ya da doğrudan Fe^{3+} ü indirgeyerek Fe^{2+} ye dönüştürür.

$$Fe^{3+} + \textbf{Vit C} \rightarrow Fe^{2+} + \textbf{Vit C}^{\cdot} + 2H^+$$

Fe^{2+} de sonra Fenton reaksiyonu içinde rol alır ve H_2O_2 ile etkileşmeye girer. Yani $OH^{\cdot}$ üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir (239-242).

C vitaminin Fe^{3+} ile doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali (DHA radikal anyonu, Vit $C^{\cdot}$) meydana gelir. Bu şekilde oluşan C vitamini radikali çok reaktif değildir. Ya NADH redüktaz tarafından indirgenir ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur (238).

$$2\,\textbf{Vit C}^{\cdot} + 2H^+ \rightarrow \textbf{Vit C} + \textbf{DHA}$$

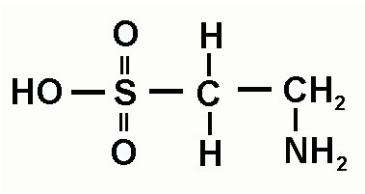
Ayrıca C vitaminin oksidasyonu sırasında H_2O_2 de oluşabilir (241).

$$\textbf{Vit C} + O_2 \rightarrow \textbf{DHA} + H_2O_2$$

C vitamini hem H_2O_2 oluşumuna hem de Fenton reaksiyonu için Fe^{2+} oluşumuna katkıda bulunarak radikal üretimine sebep olur. Ancak bu tip etki için optimum bir Fe^{3+}/Fe^{2+} oranına ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle C vitaminin prooksidan yada antioksidan gibi davranmasını tayin eden faktör demirin redüksiyonudur (4, 243).

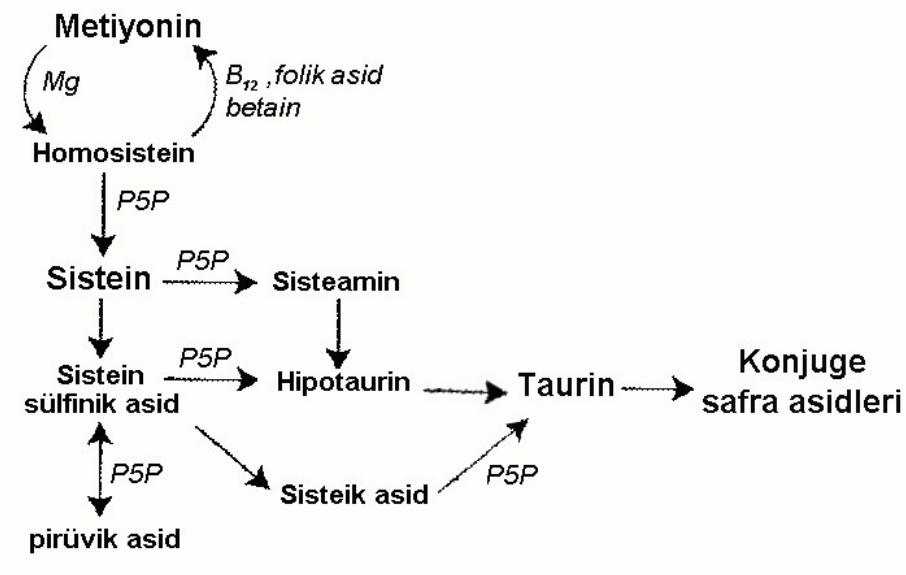
2.7.2.4.Taurin

Beyaz renkli kristalize bir madde olan taurinin (2-aminoetan sülfonik asid), moleküler formülü $C_2H_7NO_3S$'dir. İlk olarak 1827 yılında sığır safrasının bir komponenti olarak keşfedilmiş ve 1975 yılına kadar insan beslenmesindeki önemi tanımlanamamıştır. Organizmada sistein ve metiyoninden sentez edilen taurin protein yapısına katılmaz ve çoğu dokuda serbest halde bulunur. Taurin, et ve balık gibi hayvansal kökenli besinlerle de alınmaktadır. Taurinin diğer aminoasidlerden farkı, karboksilli asid yerine sülfonik asid grubu içermesi ve proteinlere bağlı halde bulunmamasıdır. Bu yüzden taurini tam bir aminoasid olarak nitelendirmek doğru değildir (244-246).



Şekil 2.20-Taurinin kimyasal yapısı (245)

Vücutta taurin, esansiyel aminoasit olan metiyonin ve non-esansiyel aminoasit olan sisteinden sentez edilir. Taurinin sisteinden sentezinde bilinen üç aşama vardır. Bu üç aşamada da kofaktör olarak, B6 vitamininin aktif koenzim formu olan piridoksal-5'fosfat (P5P) a ihtiyaç vardır. B6 vitamini eksikliğinde taurin sentezinin bozulduğu gösterilmiştir. Sistein sülfinik asid dekarboksilaz (CSAD) enzimi, sistein sülfinik asidin hipotaurine ve sisteik asidin de taurine dönüşmesini katalize eder. Bu enzimin taurin sentezini etkilediği belirtilmiştir. Diğer memeliler ile kıyaslandığında insanlar, nispeten düşük CSAD aktivitesine sahiptir ve bundan dolayı taurin sentezi daha az olmaktadır (245,246).



Şekil 2.21-Taurinin sentezi (245)

Çeşitli türlerde yapılan in vivo çalışmalarda taurinin memelilerin gelişiminde esansiyel olduğu belirtilmiş olup, düşük seviyelerdeki taurinin özellikle gelişme sürecinde yetersiz olmasının kardiyomiyopati, retinal rejenerasyon, büyümeyi geciktirici gibi etkiler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (246-247).

Taurinin organizmada safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol atılımı, osmoregülasyon, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre membranı stabilizasyonu ve hücresel kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi önemli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarda rolü bulunmaktadır (244-246, 248).

Son yıllarda taurinin serum lipidlerini azaltıcı (249), hiperglisemiyi (246, 250) ve aterosklerozu önleyici (251-252); kalbi koruyucu (253-254); görme bozukluklarını (255), böbrek bozukluklarını (256-257), alkole bağlı karaciğer hasarını önleyici (258-259) etkilerini bildiren çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Taurin bir antioksidan olarak sınıflandırılır ve bu özelliği fizyolojik etkileri ile ilişkilidir. Hipoksi oluşturularak indüklenenen hücre hasarını önler (260), serbest oksijen radikallerinin oluşumunu inhibe ederek hücre ölümünü (apoptosis) engeller (250), oksidan maddelerin oluşturduğu hasara karşı koruyucu ve antioksidan gibi davranır (261-266). Reaktif ve oksidatif bir bileşik olan hipokloröz asidi N-klorotaurine dönüştürerek intraselüler hasar

oluşturmasına engel olur (246, 267). Aminoasidler üzerinde yapılan bir çalışmada, taurinin yüksek intraselüler konsantrasyonlarda olması ve amino grubunun karbonil gruplarına olan yüksek aktivitesinden dolayı, taurinin dikarbonil ara ürünler ile reaksiyona girerek reaktif karbonil bileşiklerini süpürücü etkide olabileceği belirtilmiştir (268). Antioksidan etkileri üzerinde yapılan çalışmalarda, taurinin serbest radikalleri süpürücü etkisinin güçlü ancak spesifik olmadığı belirtilmiştir (264, 269-271). Ayrıca membran akışkanlığı ve iyon transportu değişikliklerini engelleyerek, Fe^{2+} ile kelat oluşturarak indirekt antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (272).

2.7.2.5.Diğerleri

Karotenoidler

A vitaminin metabolik ön maddesi olan β-karoten, bitkilerde kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü singlet O_2 temizleyicisi olup ayrıca $OH^{\cdot}$, peroksi ve alkoksi radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir. α-Tokoferolden daha düşük konsantrasyonda bulunur, tokoferollerin çözünürlükleri nedeniyle etki edemediği hidrofobik kısımlara karşı koruma sağlarlar. Singlet O_2 uzaklaştırıcı olarak bilinen en etkili karotenoid likopendir (4, 273).

Melatonin

$OH^{\cdot}$ radikalini ortadan kaldıran lipofilik özellikte çok güçlü bir antioksidandır. Hücrenin tüm organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşarak ve kan-beyin engelini geçerek geniş bir dağılımla antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin diğer bazı antioksidanlar gibi prooksidan etkisi yoktur (15, 274).

Ürik asid

İnsan dokuları ürat oksidaz içermez, bu yüzden purin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asid birikir. Ürik asid, singlet O_2, peroksil radikalleri, $OH^{\cdot}$, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve in vivo antioksidan olarak kabul edilmektedir (275).

Ürik asidin $OH^{\cdot}$ ile reaksiyonunda karbon merkezli radikaller ve bunların da oksijen ile reaksiyonu ile ürat peroksil radikalleri meydana gelmektedir. Ürik

asidden türeyen bu radikaller, $OH^{\cdot}$ dan daha az reaktif olsalar bile tam olarak zararsız kabul edilemezler (4).

Deferoksamin

Deferoksamin, demir için spesifik kelat yapıcı bir ajandır. Deferoksamin, Fe^{3+} ü bağlar ve oluşan bu kompleksteki demiri indirgemek son derece zordur. $O_2^{\cdot -}$ veya peroksidler ile yavaş reaksiyon verir. Bir çok sistemde lipid peroksidasyonu önlemektedir. Demir bağımlı olan H_2O_2 den $OH^{\cdot}$ oluşumunu inhibe eder. Fe^{2+} çözeltilerinin oksidasyonunu arttırır ve sonuçta oluşan Fe^{3+} ile birleşir. Peroksil radikalleri için de iyi bir temizleyicidir (165).

Ubiquinol (Koenzim Q, QH_2)

Ubiquinol, mitokondriyel elektron taşıma zincirinde, iç mitokondriyel membranın iki tarafı arasında proton alışverişi oluşturmada rol oynar. İki basamaklı oksidasyon olayında ubiquinol hem $O_2^{\cdot -}$ oluşturur hem de özellikle lipid fazdaki serbest radikalleri yok eder (276).

Lipoik asid

Lipoik asid, dihidrolipoik asidin indirgenmesi ile oluşur. Her ikisi de metal kelat yapıcıları ve reaktif oksijen türlerini yok edicidir. Dihidrolipoik asid, ayrıca C ve E vitaminlerinin rejenerasyonunda da rol oynar (277).

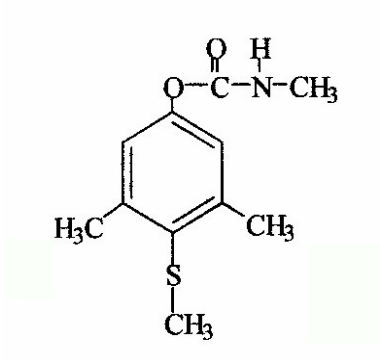
Metallotioneinler

Metallotioneinler, geçiş metal iyonlarına bağlanan sisteine bağlı küçük proteinlerdir. Bunlar metalleri toksifiye ederken aynı zamanda metallerin, $OH^{\cdot}$ radikali oluşumuna neden olan Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarını katalizlemelerine de engel olurlar (278).

Ayrıca yukarıda bahsedilenlerin haricinde melanin, albumin, sistein ve bilirubinin de antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (4).

2.8.Methiocarb

2.8.1.Kimyasal Yapısı ve Özellikleri



Şekil 2.22-Methiocarbın kimyasal yapısı

Methiocarb yada merkaptodimetur (4-metiltiyo-3,5-ksilil metil karbamat), karbamat grubu bir insektisiddir. İnsektisid özelliği ilk kez G. Unterstenhöfer tarafından 1962 yılında rapor edilmiş ve Bayer AG tarafından üretilmiştir (279).

Hafif kokulu, renksiz kristalize bir madde olan methiocarbın moleküler formülü $C_{11}H_{15}NO_2S$ (Şekil 2.22) ve molekül ağırlığı 225,3'tür. Methiocarbın erime derecesi 119°C ve sudaki çözünürlüğü 20°C'de 27 mg/l'dir. Organik çözücülerin çoğunda çözünür. Oda sıcaklığında dayanıklı olup, yarılanma ömrü pH 5'de 763 gün, pH 7'de 28 gün, pH 9'da 2,2 gündür. Kuvvetli alkali ortamda dayanıklı değildir (280).

Teknik şekli ise, %97'den fazla saf madde içerir. Teknik şeklinin dayanıklılığı ise oda temparatüründe 24 aydır.

2.8.2.Kullanım Alanları

Methiocarb, değme ve mide etkili akarisid, nörotoksik etkili mollusisid ve tohum korunmasında kullanıldığında ise kuşları uzaklaştırıcı etkidedir. Fındık, badem, hububat, meyve ve şeker pancarı gibi ürünlerin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de Mesurol DP (%2) ve Mesurol WP 50 (%50) olarak iki formülasyon şekli bulunmaktadır (281).

İstanbul Tarım İl Müdürlüğü'nden alınan bilgiye göre methiocarb Türkiye' de yaygın olarak kullanılan bir pestisid olup, 2000 yılı İstanbul ziraii mücadele raporlarında, fındıkta 30.000 kg methiocarb kullanıldığı belirtilmiştir (282).

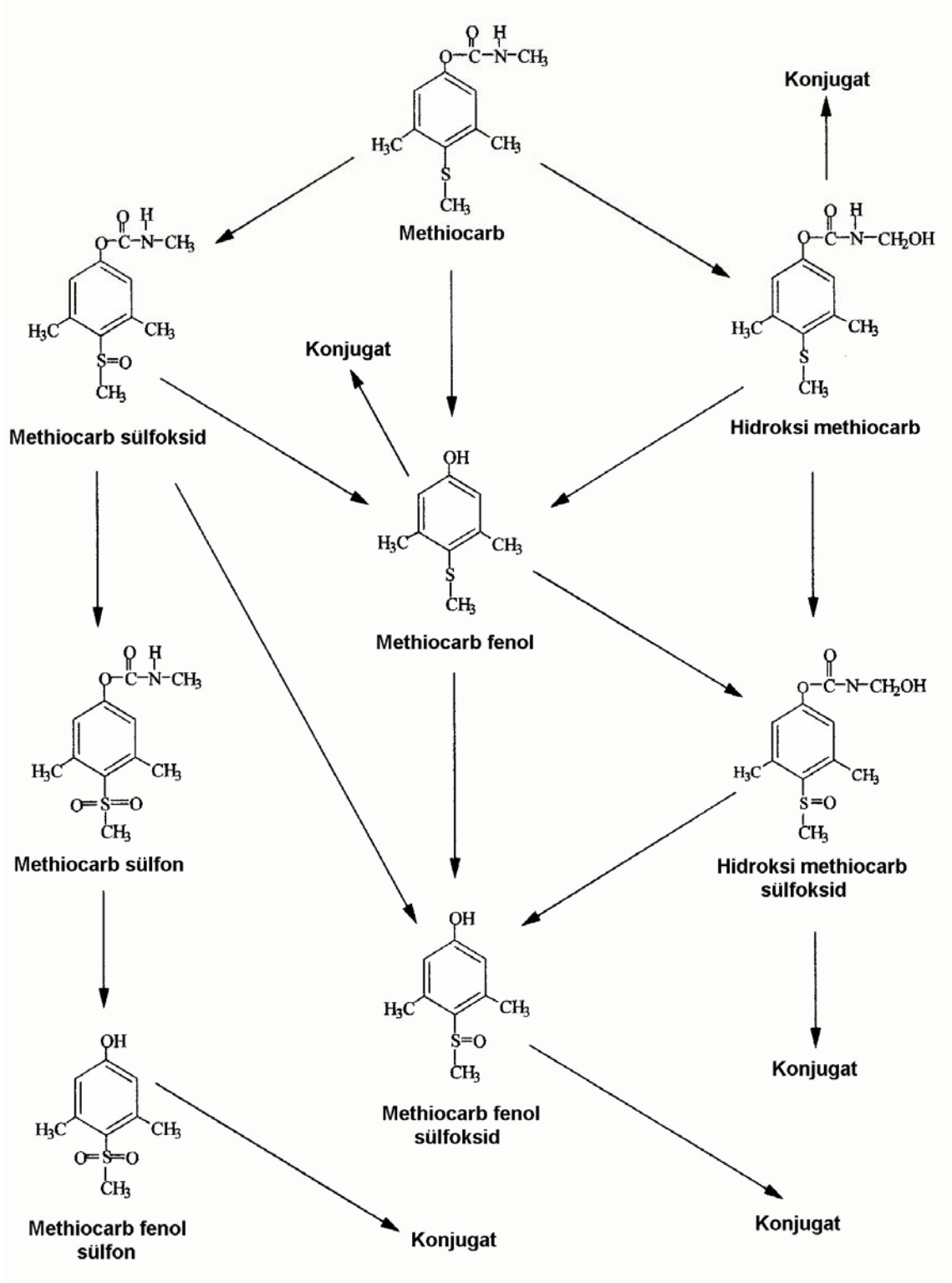
2.8.3.Biyotransformasyonu

Methiocarb oral yol ile alındığında oldukça iyi absorbe olur. Sıçanlarda oral yol ile alınan methiocarbın doza bağlı olarak %75-90'ı 48 saat içinde metabolitleri halinde idrar ile atılır. İn vivo koşullar altında methiocarbın metabolizması ile oluşan ana metabolitler, methiocarb fenol, methiocarb sülfoksid fenol, N-hidroksi metil methiocarb sülfoksid, methiocarb sülfoksid ve methiocarb sülfon fenoldür (283).

Gerek insan gerek sıçan karaciğer homojenatları ile yapılan in vitro çalışmalarda ise ana metabolitin methiocarb sülfoksid olduğu, methiocarb sülfon ve N-hidroksi metil methiocarb sülfoksidin de oluştuğu saptanmışır. İn vitro koşullar altında methiocarb metabolizmasının ana yolağı, genel olarak kükürt atomunda sülfoksidasyon ve N-metil oksidasyon şeklinde gösterilmiştir (Şekil 2.23) (279).

Methiocarbın oksidasyonunda hangi enzimlerin rol oynadığı konusunda değişik görüşler vardır. P-450'ler ve flavin monooksijenaz (FMO)'ların, tiyoeter yapısındaki organofosfatlar ve karbamatların aktivasyon ve detoksifikasyon reaksiyonlarında rol oynadığı bilinmektedir. Önemli birinci faz enzimlerinden olan FMO'lar, lipofilik ksenebiyotiklere NADPH'e bağımlı biçimde oksijen katarak çok daha hidrofilik metabolitlerine dönüştürür. FMO'ların substratları azot, kükürt, selenyum ve fosforlu bileşiklerdir. FMO'ların ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki rolünü araştıran şimdiye kadar yapılmış çalışmalar sülfür içeren pestisidlere karşı aktivitelerinin anlamlı olduğunu bildirmektedir (284-288).

Tiyoeter yapısındaki methiocarbın sıçan karaciğerindeki bir dizi oksidasyonlarının (methiocarb sülfoksid oluşumu ve diğer bileşikler), P-450 ve FMO'lar yoluyla meydana geldiği belirlenmiştir. Ancak P-450 ve FMO izoformlarının, methiocarbın insandaki metabolizmasında nasıl rol oynadıkları tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.23-Methiocarbın memelilerde biyotransformasyonu

FMO enzim sistemi, P-450 sistemine oranla daha az çeşitlilik göstermektedir. FMO'ların insanda bugüne kadar sadece 6 fonksiyonel geni

(FMO 1-6) kanıtlanmıştır (289). Ancak bunlardan sadece FMO 1-3 ve 5 proteinlerinde ekspresyon teşhis edilebilmiştir. FMO 3 esas olarak karaciğerinde, FMO 1 ise böbrek ve ince barsakta bulunmaktadır. Yürütülen deneyler, FMO 1'in insanlarda ekstrahepatik metabolizmada ve özellikle de organofosfatların ve karbamatların böbrek ve ince barsakta cereyan eden metabolizmasında rol oynadığını işaret etmektedir (290). Henüz bu maddelerin ekstrahepatik metabolizmaları ile ilgili bilgiler sınırlıdır.

Methiocarb bu özelliği dolayısıyla ekstrahepatik metabolizma için model substrat olarak kullanılmıştır. Deney sonuçları, karaciğer dışında özellikle böbreklerde de FMO 1 tarafından yürütülen bir metabolizmanın söz konusu olduğunu göstermiştir. Insan karaciğerinde methiocarb sülfoksid oluşumunda P450 sisteminin sorumlu olduğu, bir P450 inhibitörü olan 1-amino benzotriazol (1-ABT) ile yapılan deneyde doğrulanmış, buna karşılık böbrekte sulfoksid formasyonu inhibisyondan etkilenmemiştir. Bu bulgular, methiocarb gibi karaciğerde büyük ölçüde P450 sistemi tarafından metabolize olan maddelerin diğer dokulardaki biyotransformasyonlarının FMO'ların kontrolünde olduğunu göstermektedir (291).

Buronfosse ve arkadaşları methiocarbın sıçan karaciğer mikrozomları ile sülfoksidasyonununda P-450 ve FMO'ların rollerinin yaklaşık %50 olduğunu bildirmektedir. Ancak insan karaciğer mikrozomları ile yapılan çalışmalar bu oranın sırasıyla %85-90 ve %10-15 olduğunu göstermektedir. Bu metabolik farklılık ise sıçandaki FMO1 ekspresyonunun insan karaciğerine göre daha fazla olduğunu göstermektedir (292).

Diğer taraftan Blee ve Durs (293), aromatik-alkil sülfid yapısındaki methiocarbın sülfoksidasyonunun hidroperoksidler tarafından önemli ölçüde etkilendiğini, bu S-oksidasyonun hidroperoksid bağımlı olduğunu ve NADPH gibi kofaktörlere gerek olmadığını, sülfoksid oluşturan oksijenin moleküler oksijenden olmayıp hidroperoksid orijinli olduğunu ileri sürmektedirler. Bu sonuç P-450 ve FMO'ların bu oksidasyonda rolü olmadığını göstermektedir.

2.8.4.Toksik Özellikleri ve Etki Mekanizması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün pestisid sınıflandırmasına göre methiocarb, IB sınıfı yüksek derecede toksik bir pestisiddir (294).

Methiocarbın akut toksisitesi memelilerde oral yol ile alındığında yüksek olup LD_{50} değeri sıçanlarda 9-135 mg/kg, farelerde 52,3 mg/kg'dır. Akut inhalasyon toksisitesi sıçanlarda orta derecede olup, LC_{50} değeri 4 saat maruziyette 433-1208 mg/m^3 tür. Akut dermal toksisitesi, sıçan ve tavşanlarda düşük olup, tavşanlarda LD_{50} değeri 2000 mg/kg'dan büyük, sıçanlarda ise LD_{50} değeri 350-400 mg/kg'dır. Akut intraperitonal LD_{50} değeri ise sıçanlarda 25-100 mg/kg'dır (283, 295). İnsanlar için muhtemel oral LD_{50} değeri 50-500 mg/kg olarak verilmektedir (296).

Methiocarbın metabolitleri arasında toksikolojik olarak önemi olan methiocarb sülfoksidin, sıçanlarda oral LD_{50} değeri 6-9 mg/kg'dır. Sıçanlarda, methiocarb sülfoksidin klinik belirtilerinin methiocarbın akut toksisite belirtilerine benzer olduğu gösterilmiştir (283). Methiocarb, methiocarb sülfon ve methiocarb sülfoksidin N-hidroksimetil türevlerinin sıçanlarda oral LD_{50} değerleri 112 mg/kg iken, methiocarb fenol, methiocarb sülfon, methiocarb fenol sülfoksid, methiocarb fenol sülfonun sıçanlarda oral LD_{50} değerleri ise 1000 mg/kg üzerindedir (283, 295).

Methiocarbın akut toksisite belirtileri diğer karbamat insektisidlerine benzerlik gösterir. Asetilkolin esteraz enzimi inhibisyonuna neden olur ve asetilkolin birikmesine bağlı toksik etkiler görülür. Zehirlenme belirtileri olarak; diyare, bulantı, kusma, abdominal ağrı, lakrimasyon, salivasyon ve bulanık görme gibi muskarinik etkiler, dispne, titreme, kas seyirmesi, ekstremitelerde geçici felçler gibi nikotinik etkiler ve hareketsiz kalamama, ataksi, baş ağrısı, konvülsiyonlar gibi santral sinir sistemi etkileri gözlemlenir. Bu belirtiler bir iki saatten uzun sürmez ve organofosfat zehirlenmelerinde görülenden daha iyidir. Bununla birlikte ciddi zehirlenmelerde, solunum depresyonu ve akciğer ödemi oluşabilir (283). Methiocarb zehirlenmesine karşı piridinyum oksimler pek uygun değil iken atropin en etkili antidottur.(283, 295).

Sıçanlarda methiocarb ve metabolitlerinin dermal olarak eritrosit kolin esteraz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması için yapılan bir çalışmada, methiocarb ve methiocarb sülfoksidin biyolojik olarak belirgin bir şekilde eritrositlerde kolin esteraz inhibisyonu yaptığı gösterilmiş olup, methiocarb sülfonun ise bir aktivite göstermediği görülmüştür (279). Methiocarbın sıçan ve tavşanlarda göz ve deride iritan olmadığı gösterilmiştir (283, 295). Karanfil yetiştiren bir kişide alerjik kontakt dermatid olduğu gözlenmiştir. Kişinin elinde ciddi akut egzema gelişmiş ve %0,5 methiocarba pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar çeşitli pestisidlerin endokrin sistemler üzerine olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir. Andersen ve arkadaşları tarafından insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) yürütülen bir çalışmada aralarında methiocarbın da bulunduğu kimyasal yapıları farklı bazı pestisidlerin östrojenik ve antiandrojenik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (297). Kojima ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Çin hamster over (CHO) hücre kültürleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da aynı sonuç elde edilmiştir (298). Hofmeister ve Bonefeld-Jorgensen'e göre ise, methiocarbın β-östrojen reseptörlerindeki mRNA düzeyinde meydana getirdiği artış bu etkiye neden olmaktadır (299). Diğer bir çalışmada ise, aralarında methiocarbın da bulunduğu yaygın olarak kullanılan pestisidlerin androjenik reseptör üzerine olan etkilerinin additif olduğu gösterilmiştir (300).

Yapılan çalışmalarda methiocarbın karsinojenik ve teratojenik etkilerinin olmadığı gösterilmiş olup nörotoksik özellik olarak da organofosfatlarınkine benzer ertelenmiş polinöropati belirtilerine ise rastlanmamıştır (279, 295).

Methiocarbın genotoksik etkisi ise in vitro ve in vivo çalışmalar yapılarak araştırılmıştır. İn vitro gen mutasyonu, DNA hasarı ve tamiri, mikronukleus oluşumu, üzerine yapılan testler methiocarbın genotoksik olduğu hakkında negatif sonuç vermiş olup sadece CHO hücre kültürleri kullanarak yapılan bir in vitro çalışmada methiocarbın kromozom kırılmaları oluşturduğu gösterilmiştir (279, 295).

2.9.Pestisidler ve Oksidatif Stres

Pestisidlerin organizmada serbest radikal oluşumuna, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan sistemlerde değişikliğe yol açtığı çeşitli araştırmaların sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmalardan sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

6 Hafta boyunca 2 mg/kg dozda endosulfan uygulanan sıçanların, kalp dokusunda MDA düzeyi ve SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı belirtilmiş olup (301), diğer bir çalışmada da 30 mg/kg tek dozda ve 10 ve 15 mg/kg dozda 5 gün boyunca endosulfan uygulanan sıçanların karaciğer ve beyin dokularında tüm dozlarda lipid peroksidasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve glutatyon redoks döngüsünde de anlamlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir (302).

Tek doz 45, 75, 90 mg/kg dimethoate uygulanan sıçanların karaciğer ve beyin dokularında 75, 90 mg/kg dozlarda MDA düzeyi ve SOD, GSH-Px, CAT, GSH-Rd aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, karaciğerde tüm dozlarda GSH ve GST aktivitelerinde değişiklik görülmezken, beyinde 90 mg/kg dozda GSH düzeyi ve GST aktivitelerinin de arttığı belirtilmiştir (303). Subkronik diğer bir çalışmada ise 0,6; 6, 30 mg/kg dozlarda 30 gün boyunca dimethoate uygulanan sıçanların karaciğer ve beyninde 6, 30 mg/kg dozlarda MDA düzeyleri ve SOD, GSH-Px, CAT, GSH-Rd aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, karaciğerde ve beyinde 6, 30 mg/kg dozlarda GSH düzeylerinde azalma gözlenirken, GST aktivitelerinin ise karaciğerde 6, 30 mg/kg dozlarda ve beyinde 30 mg/kg dozda arttığı gösterilmiştir (304).

4 Hafta boyunca 20 ppm dozda malathion uygulanan sıçanların, serum MDA düzeyi, GSH-Rd ve GST aktivitelerinin ve eritrositlerde SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve tüm kanda GSH düzeyinin ise azaldığı belirtilmiştir (305).

Tek doz 0,03 mg/kg dimethoate (0,01% LD50) ve 0,13 mg/kg malathion (0,01% LD50) uygulanan sıçanların eritrosit MDA düzeyi, SOD, CAT aktiviteleri

ve total-SH düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve GST aktivitesinin ise azaldığı gösterilmiştir (306).

Tek doz 1/4 LD_{50} (54 mg/kg) fenthion uygulanan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, karaciğerde MDA düzeyi, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (307).

60 Gün boyunca 0,52, 1,04 mg/kg dozlarda quinalphos uygulanan sıçanların karaciğerinde lipid peroksid ve GSH düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişiklik olmadığı ancak SOD, GSH-Px, CAT, GSH-Rd aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, beyninde ise sadece CAT aktivitesinin arttığı ve GSH-Rd aktivitesinin de azaldığı gösterilmiştir (308).

3, 8 ve 15 gün boyunca 250 ve 500 μg/kg dozlarda quinalphos uygulanan sıçanların testislerinde tüm dozlarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ise yüksek dozda arttığı gösterilmiştir (309).

Tek doz 1/4 LD_{50} endrin, chlordane, alachlor, chlorpyriphos ve fenthion uygulanan sıçanların karaciğer ve beyin homojenatlarında lipid peroksidasyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (310).

4 Hafta boyunca 25 mg/kg dozda hexachlorobenzene uygulanan sıçanların karaciğerinde MDA düzeyi ve GSH-Rd aktivitesi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artarken SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığı, CAT aktivitesinde ise bir değişiklik olmadığı ve plazmada MDA düzeyinin arttığı, eritrositlerde ise SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (311).

Tek doz 20, 40, 60, 80 mg /kg i.p. lindane uygulanan sıçanların karaciğerinde doza bağlı olarak tüm dozlarda MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, G-6PDH, GSH-Px ve GSH-Rd aktivitelerinde bir değişiklik olmadığı ve 40, 60, 80 mg/kg dozlarda ise SOD ve CAT, aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (312).

45 Gün boyunca 1, 10 ve 100 mg/kg dozlarda metoxychlor uygulanan sıçanların mitokondriyel ve mikrozomal testis fraksiyonlarında, doza bağlı olarak lipid peroksidasyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve

SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-Rd aktivitelerinin de azaldığı gösterilmiştir (313). Metoxychlor ile yapılan kısa süreli diğer bir çalışmada ise; 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda 1, 4 ve 7 gün boyunca metoxychlor uygulanan sıçanların testis homojenatlarında, 4 ve 7 günlük çalışmalarda tüm dozlarda lipid peroksidasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-Rd aktivitelerinin de azaldığı gösterilmiştir (314).

5 Gun boyunca 50 mg/kg (1/4 LD50) i.g. dozda cypermethrin uygulanan sıçanların plazma hariç karaciğer, beyin ve böbreklerinde MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, GSH-Px aktivitesinin eritrosit ve karaciğerde arttığı, böbrek ve beyinde ise azaldığı, CAT aktivitesinin, eritrosit dısında karaciğer, beyin ve bobrekte azaldığı gösterilmişitir. (315).

Tek doz 170 mg/kg ve 5 gün boyunca 75 mg/kg dozda cypermethrin uygulanan sıçanların karaciğer ve beyin dokularında tüm dozlarda lipid peroksidasyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve total glutatyon düzeylerinin de azaldığı gösterilmiştir (316).

28 Gün boyunca 250, 500, 1000 ppm dozlarda fenvalerate uygulanan sıçanların karaciğer, eritrosit, dalak ve timuslarında MDA düzeylerinin doza bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve karaciğer GSH düzeyi, SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin ise doza bağlı olarak (özellikle 500 ve 1000 ppm) azalırken, GSH-Px aktivitesinin ise arttığı gösterilmiştir (317).

Tek doz 50 mg/kg paraquat uygulanan sıçanların serum, karaciğer ve akciğerlerinde MDA+4-HDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve karaciğer ve akciğerde GSH azalırken GSSG'nin de arttığı gösterilmiştir (318).

7 Gün boyunca 200 mg/kg dozda benomyl uygulanan sıçanların serum lipid hidropeoksid düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttarken, GSH düzeyinin de azaldığı gösterilmektedir (319).

28 Gün boyunca 1 mg/kg dozda carbofuran uygulanan sıçanların beyninde, MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, GSH düzeyi ve SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-Rd aktivitelerinin de azaldığı ve GST aktivitesinde ise bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (320).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sülfat	Riedel 11225
Bakır klorür	Merck 2731
Bakır sülfat	Merck 2787
n-Butanol	Merck 1.00988
Disodyum etilendiamintetraasetik asid dihidrat	Sigma E5134
Disodyum hidrojen fosfat 12 hidrat	Merck 6573
5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asid	Sigma D8130
Etanol	
E vitamini (300 mg dl-α tokoferol asetat)	Evigen ampul
Folin Fenol Reaktifi	Merck 1.09001
Glutatyon peroksidaz	Sigma G6137
Glutatyon redüktaz	Fluka 49755
Hidrojen peroksid (%30)	Riedel 18312
Hidroklorik asid	Merck 1.00317
İndirgenmiş glutatyon	Sigma G4251
İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	Sigma N1630
Ksantin	Sigma X7375
Ksantin oksidaz	Sigma X4376
Kloroform	Merck 2431
Metafosforik asid	Merck 1.00546
Metanol (HPLC)	Merck 1.06007
Methiocarb (%99.8)	Bayer
Nitroblu tetrazolyum klorür	Sigma N6876
Okside glutatyon	Sigma G-4376

Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel 33110
Potasyum hidroksit	Riedel 06009
Sığır serum albumini	Fluka 05470
Sodyum azid	Riedel 35088
Sodyum hidroksid	Merck 6462
Sodyum karbonat	Merck 6398
Sodyum klorür	Merck 1.06400
Sodyum potasyum tartarat	Merck 1.08085
Superoksid dismutaz	Sigma S2515
Taurin	Sigma T0625
1,1,3,3, Tetraetoksipropan	Sigma T9889
Trikloroasetik asid	Merck 1.00807
Trisodyum sitrat dihidrat	Merck 1.06448
Tris tamponu	Sigma T6066
2-Tiyobarbitürik asid	Sigma T5500

3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler

Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	
Beher (25, 50, 100 ml)	
Eppendorf tüp (1,5 ml)	
Erlen (25, 50, 100, 250 ml)	
Enjektör (100 μl)	Hamilton
Etüv	Nüve FN_{500}
Girdap karıştırıcı	Vm20 Vortex, Biobac
Hassas terazi	Mettler H_{20}
Hesap makinesi	Texas Instruments TI-60
Homojenizatör	T18 Basic Ultra-Turrax
Kapaklı polipropilen tüp (16x100mm)	
Laboratuvar Şişeleri (250, 500, 1000 ml)	
Mavi ve sarı pipet ucu	
Membran filtre (0,2 μm, 47 mm)	Phenomenex

Mikro pipet (10-100, 100-1000 µl)	Biohit proline
Milli Q su cihazı	Millipore
Mobil faz filtrasyon sistemi	Phenomenex
pH metre	pH 211, Hanna
Soğutmalı santrifüj	Universal 32R, Hettich
-80°C soğutucu	Nuaire ultralow freezer
-20°C soğutucu	Bosch economic frozer
Spektrofotometre	Shimadsu UV-1210
Spektrofotometre küveti (polistren ve kuvarz)	
C_{18} SPE kartuş (1 mg/ml)	Alltech
Su banyosu	Memmert
Terazi	Precisa XB 220 A
Ultrasonik banyo	Ultrasonik LC 30H
Vakum pompası	Speedivac ES 35
Vida kapaklı cam tüp (16x100 mm)	

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Thermo Separation Products Liquid Chromatograph with Model Spectra System (TSP-USA)

HPLC pompa (Spectra Series Pump P4000; TSP)

Likid kromatografisi için vakum degazer (Solvent degaser SCM 1000; TSP)

Rheodyne enjektör (Berkley, CA, USA; Enjeksiyon hacmi: 50µl)

Photo-Diode Array Dedektor (UV 6000LP; TSP)

Sistem kontrolörü (SN 4000; TSP)

Bilgisayar Programı (PC 1000 System Software, TSP)

Kolon (LiChrospher RP-18e C_{18} kolon 5 µm, 4,6x250 mm; Phenomenex)

Koruyucu kolon (C_{18}, 4 mm L x 3 mm ID; Phenomenex)

C_{18} Koruyucu kolon kiti (Phenomenex)

3.3.Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

3.3.1.Sodyum Klorür Çözeltisi (%0,9)

9 g NaCl bidistile suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlandı.

3.3.2.Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Protein Standart Çözeltileri: 10 mg Sığır serum albumini (BSA) bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/ml olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 M): 4 g NaOH bidistile suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlandı.

A Reaktifi (Sodyum Karbonat Çözeltisi %2): 2 g Na_2CO_3 0,1 M NaOH çözeltisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Potasyum Tartarat Çözeltisi (%1): 1 g Na-K tartarat bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

B Reaktifi (Bakır Sülfat Çözeltisi, %0,5): 0,05 g $CuSO_4$ %1'lik Na-K tartarat çözeltisinde çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Her deney günü taze olara hazırlandı.

C Reaktifi (Alkali Bakır Sülfat Çözeltisi): 50 ml A reaktifi ve 1 ml B reaktifi karıştırılarak hazırlandı ve bu çözelti 30 dakika içinde bozunduğundan, her kullanışta taze olarak hazırlandı.

E Reaktifi (Folin Fenol Reaktifi, 1/1): Folin fenol reaktifi 1/1 oranında seyreltilerek hazırlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

3.3.3.Malondialdehid Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

1,1,3,3, Tetraetoksipropan (TEP) Standart Çözeltileri: TEP ana stok çözeltisi 100 nmol/ml konsantrasyonunda bidistile suda çözülerek hazırlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 1,25; 2,5; 5; 10; 20 nmol/ml olacak şekilde TEP standart çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler malondialdehid tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. HPLC analizi için ise; TEP standart çözeltileri 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 nmol/ml olacak şekilde hazırlandı.

Hidroklorik Asid Çözeltisi (0,25 M): 7,5 ml %37'lik HCl bidistile suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlandı.

2-Tiyobarbitürik Asid (TBA) Çözeltisi (%0,37): 0,037 g TBA 0,25 M HCl çözeltisinde çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

Trikloroasetik Asid (TCA) Çözeltisi (%15): 15 g TCA 0,25 M HCl çözeltisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Potasyum Hidroksid Çözeltisi (5 M): 28,01 g KOH bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM pH 6,8): 3,402 g KH_2PO_4 bidistile suda çözülerek, 5 M KOH ile pH ı 6,8'e ayarlandı ve bidistile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

HPLC Analizi için Mobil Faz: HPLC kalite metanol ve Mili-Q su 0,2 μm membran filtrelerden süzüldükten ve ultrasonik su banyosunda degaze edildikten sonra kullanıldı.

3.3.4.İndirgenmiş Glutatyon Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

GSH Standart Çözeltileri: 25 mg GSH bidistile suda çözülerek 25 ml'ye tamamlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 90; 125 µg/ml olacak şekilde GSH standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler indirgenmiş glutatyon tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

Çöktürme Çözeltisi: 1,67 g metafosforik asid, 0,2 g $Na_2EDTA.2H_2O$ ve 30 g NaCl bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C 'de 3 hafta dayanıklıdır.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (%1): 1 g sodyum sitrat bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti belirtme reaktifi hazırlanırken kullanıldı.

Belirtme Reaktifi (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit, DTNB): 40 mg DTNB %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek, bu çözelti ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan reaktif +4 °C'de 13 hafta dayanıklıdır.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (0,3 M): 107,44 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ bidistile suda çözülerek 1000 ml ye tamamlandı.

3.3.5.Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

SOD Standart Çözeltileri: 0,5 mg eritrosit CuZn-SOD, bidistile suda çözülerek 5 ml'ye tamamlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 60, 120, 240, 300, 420, 540, 720, 900 ng/ml olacak şekilde SOD standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler SOD tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 ml 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C'de bir hafta dayanıklıdır.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 ml alınarak bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg $Na_2EDTA.2H_2O$ bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na_2CO_3 bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı.

Nitroblu Tetrazolyum Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 ml ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 ml 0,3 mM ksantin, 5 ml 0,6 mM Na_2EDTA, 3 ml 400 mM Na_2CO_3, 1,5 ml 1 g/L BSA, 5 ml 0.15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g $(NH_4)_2SO_4$ bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisinde çözülerek 1 ml'ye tamamlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg $CuCl_2.2H_2O$ bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.3.6.Katalaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0.681 g KH_2PO_4 bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2.77 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ bidistile suda çözülerek 155 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,0): A/B oranı 1/1.55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksid Çözeltisi (30 mM): 34 µl %30 luk H_2O_2 10 ml'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

3.3.7.Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

GSH-Px Standart Çözeltileri: 20 U GSH-Px bidistile suda çözülerek 1 ml'ye tamamlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 0,1; 0,2; 0,3; 1; 2; 3 U/ml olacak şekilde GSH-Px standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler GSH-Px enzimi tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

Hidroklorik Asid Çözeltisi (0,1 M): 0,3 ml %37'lik HCl bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Tris Tamponu (50 mM, pH 7,6): 0.305 g tris tamponu bidistile suda çözülerek, 0,1 M HCl ile pH'ı 7,6 ya ayarlandı ve bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Reaksiyon Karışımı: Hazırlanan 50 ml tris tamponuna 18,61 mg $Na_2EDTA.2H_2O$, 30,73 mg GSH, 8,335 mg indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), 13 mg sodyum azid ve 27,86 µl glutatyon redüktaz (1000 U/L olacak şekilde) eklenerek GSH-Px reaksiyon karışımı hazırlandı.

3.3.8.Glutatyon Redüktaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

GSH-Rd Standart Çözeltileri: 5 U GSH-Rd bidistile suda çözülerek 5 ml ye tamamlandı. Bu ana stoktan konsantrasyonları 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; mU/ml olacak şekilde GR standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler GR enzimi tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

Potasyum Hidroksid Çözeltisi (%30): 30 g KOH bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu (0,1 M, pH 7,6 ve 30 mM EDTA içeren): 13,61 g KH_2PO_4 ve 11,166 g $Na_2EDTA.2H_2O$ 930 ml bidistile suda çözülerek, %30'luk KOH ile pH ı 7,6 ya ayarlandı ve bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

NADPH (1 mM): 8.33 mg NADPH fosfat tamponunda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

Okside glutatyon (GSSG) (100 mM): 613 mg GSSG bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

3.3.9.İntragastrik (i.g.) Methiocarb Uygulama Çözeltileri

Methiocarbın sıçanlara uygulanacak çözeltileri; 2, 10 ve 25 mg/kg dozlarda olacak şekilde mısırözü yağı içinde hazırlandı. Sıçanlara 0,5 ml hacim içinde i.g. olarak uygulandı.

3.3.10.İntraperitonal (i.p.) E Vitamini Uygulama Çözeltisi

E vitamini sıçanlara 100 mg/kg dozda olacak şekilde 0,1 ml hacim içinde i.p. olarak uygulandı.

3.3.11.İntraperitonal Taurin Uygulama Çözeltisi

Taurin 50 mg/kg dozda olacak şekilde %0,9'luk NaCl içinde hazırlandı. Sıçanlara 0,5 ml hacim içinde i.p. olarak uygulandı.

3.4. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.4.1.Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan 144 adet 160-200 g ağırlığında (90 günlük) erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların 1 hafta önceden

laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmış olup yem ve su tüketimleri sınırlanmamıştır.

Sıçanlara ilaç yada çözücü uygulaması, sabah 09.00-10.00 arasında yapılmıştır. Sakrifikasyondan önceki 12 saat boyunca sıçanlara yem verilmemiştir.

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 14.06.2005 tarih ve 15559 sayılı kararı ile etik kurul onayı verilmiştir.

3.4.2.Deney Grupları

Sıçanlar, 9 deney gruplarına ayrılmıştır.

3.4.2.1.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara 25 mg/kg (1/4 LD_{50}) dozda methiocarb, i.g. olarak uygulandı ve sıçanlar 24 saat sonra sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da çözücü uygulaması yapılarak kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.2.Tek Doz Methiocarb + E Vitamini Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara E vitamini 20 gün süre ile 100 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 20. günün sonunda 25 mg/kg (1/4 LD_{50}) dozda methiocarb, i.g. olarak uygulandı ve sıçanlar 24 saat sonra sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da E vitamini uygulaması yapılarak E vitamini kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.3.Tek Doz Methiocarb + Taurin Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara taurin 20 gün süre ile 50 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 20. günün sonunda 25 mg/kg (1/4 LD_{50}) dozda methiocarb, i.g. olarak uygulandı ve sıçanlar 24 saat sonra sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da taurin uygulaması yapılarak taurin kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.4.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara, 5 gün süreyle 10 mg/kg (1/10 LD_{50}) dozda methiocarb, i.g. olarak uygulandı. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da çözücü uygulaması yapılarak kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.5. Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb + E Vitamini Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara E vitamini 20 gün süre ile 100 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 20. günün sonunda 10 mg/kg (1/10 LD_{50}) dozda methiocarb, verilmeye başlandı ve 5 gün boyunca methiocarb ve E vitamini uygulamasına devam edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da E vitamini uygulaması yapılarak E vitamini kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.6. Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb + Taurin Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara taurin 20 gün süre ile 50 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 20. günün sonunda 10 mg/kg (1/10 LD_{50}) dozda methiocarb, verilmeye başlandı ve 5 gün boyunca methiocarb ve taurin uygulamasına devam edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da taurin uygulaması yapılarak taurin kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.7.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara, 28 gün süreyle, 2 mg/kg (1/50 LD_{50}) dozda methiocarb, i.g. olarak uygulandı. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da çözücü uygulaması yapılarak kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.8.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb + E Vitamini Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara E vitamini 3 gün süre ile 100 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 3. günün sonunda 2 mg/kg (1/50 LD_{50}) dozda methiocarb verilmeye başlandı ve 28 gün boyunca methiocarb ve E vitamini uygulamasına devam edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da E vitamini uygulaması yapılarak E vitamini kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.2.9.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb + Taurin Uygulanan Grup

Bu gruptaki sıçanlara taurin 3 gün süre ile 50 mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 3. günün sonunda 2 mg/kg (1/50 LD_{50}) dozda methiocarb verilmeye başlandı ve 28 gün boyunca methiocarb ve taurin uygulamasına devam edildi. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Aynı hacim ve yola uygun olarak da taurin uygulaması yapılarak taurin kontrol grupları oluşturuldu.

3.4.3.Doku Örneklerinin Hazırlanması

Servikal dislokasyonu takiben 2-3 dakika içinde çıkarılan karaciğer ve böbrek çalışma süresince buz içinde tutuldu.

%0,9'luk NaCl ile yıkanan dokular deney gününe kadar %0,9'luk NaCl içinde -80 °C'de saklandılar. Deneyin yapılacağı günden 1 gece önce dokular +4 °C'ye alınarak çözülmeleri sağlandı. Ağırlıkları saptanan doku örnekleri, 1 g dokuya 10 ml %0,9'luk NaCl eklenerek homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. %10'luk homojenatlar MDA, GSH ve protein tayinlerinde kullanıldı.

CAT, GSH-Px, GSH-Rd ve protein tayinleri için ise %10'luk homojenatlardan 10.000 g fraksiyonu elde edildi. %10'luk doku homojenatı, 10.000 g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. 10.000 g'de çöken organ fraksiyonunda başlıca mitokondri ve hücre çekirdeği bulunur. Sıvı kısımda ise, endoplamik retikulum parçaları ile çözünür halde bulunan sitoplazma bulunur. Bu kısım 10.000 g süpernatant fraksiyonu olarak alındı.

3.4.4.Protein Tayini

Protein tayini Lowry (321) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Yöntemin esası, protein yapısındaki aromatik halka içeren aminoasitler ile alkali bakır ve folin reaktifinin verdiği mavi renkli kompleksin renk şiddetinin 500 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

3.4.4.1.Protein Tayini için Doku Homojenatının Hazırlanması

10 µl %10'luk doku homojenatı ve 10 µl 10.000 g süpernatant fraksiyonunun üzerine 490 µl %0,9'luk NaCl eklenerek 1/50 oranında seyreltildi.

3.4.4.2.Yöntemin Uygulanışı

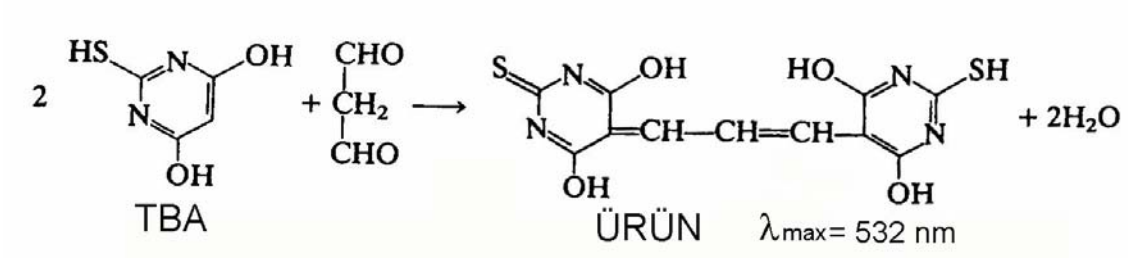
0,5 ml BSA standart çözeltisine, 0,5 ml seyreltik doku homojenatı veya 10.000 g süpernatant fraksiyonunun üzerine 2,5 ml C Reaktifi ilave edildi, vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Üzerine 0,25 ml E Reaktifi ilave edildi, vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra çözeltinin absorbansı 500 nm'de köre karşı ölçüldü.

3.4.4.3.Protein Miktarının Hesaplanması

Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı mg olarak hesaplandı.

3.4.5.Lipid peroksidasyonun Ölçümü

Lipid peroksidasyonun ölçümünde TBARS yöntemi kullanıldı. Yöntemin esası, lipid peroksidasyon sonucu oluşan MDA'in TBA ile reaksiyonu ile meydana gelen pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik tayinine dayanmaktadır (Şekil 3.1). Oluşan MDA-TBA kompleksinin tayininde iki ayrı yönteme göre çalışıldı.



Şekil 3.1-MDA'in TBA ile reaksiyonu (4)

3.4.5.1.Spektrofotometrik Yöntem

Malondialdehid tayini, Buege ve Aust (70) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı.

0,8 ml TEP standart çözeltisine veya %10'luk doku homojenatına 0,8 ml %15'lik TCA çözeltisi ilave edildi, vorteksle karıştırıldı, 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 1,2 ml alınarak üzerine 0,6 ml %0,37'lik TBA çözeltisi eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Soğutulduktan sonra 1,8 ml n-butanol ilave edildi ve 1 dakika kuvvetlice vortekslenerek ekstraksiyon yapıldı. 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak absorbansı 532 nm'de n-butanol körüne karşı ölçüldü.

3.4.5.2.HPLC Yöntemi

MDA-TBA materyalinin tayini UV-diode array dedektör (UV-DAD) donanımlı ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak LiChrospher RP-18e C_{18} kolonda gerçekleştirildi. Mobil faz olarak metanol-fosfat tamponu (60:40) kullanıldı. 1 ml/dak Akış hızı ile ve 532 nm dalga boyunda tayin gerçekleştirildi.

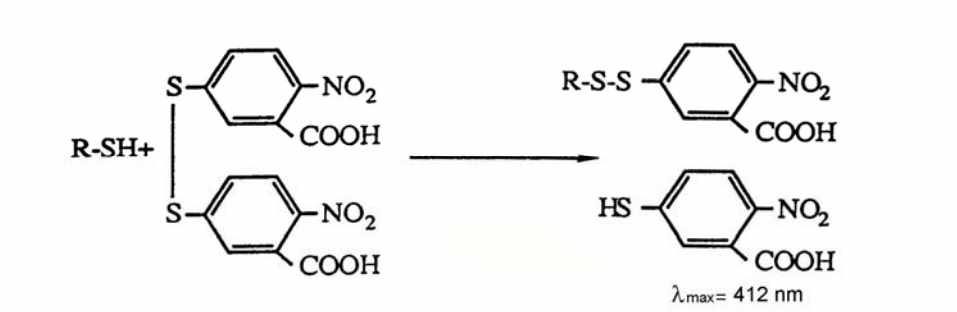
3.4.5.1'de yapılan yöntem ile elde edilen MDA-TBA kompleksi HPLC'ye iki farklı yöntem uygulanarak verildi. İlk olarak n-butanol ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstreden 50 μl HPLC kolona enjekte edildi. İkinci olarak da oluşan sulu kısımdaki MDA-TBA kompleksi C_{18} katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşundan geçirildikten sonra HPLC ye uygulandı (73). Kartuş, 2 ml metanol ve 2 ml milli-Q su ile kondüsyone edildi, kurutulmadan 1 ml sulu MDA-TBA kompleksi vakum altında kartuştan geçirildi ve kartuş 10 dakika vakum altında kurutuldu. MDA-TBA kompleksi, 1 ml metanol ile elüe edilerek cam kapaklı tüpe aktarıldı ve 40°C'de, zayıf azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu, 1 ml metanol-fosfat tamponu (60:40) nunda çözüldü ve 50 μl HPLC kolona enjekte edildi. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar kıyaslandığında bir fark olmadığı gözlendi ve bütün örnekler n-butanol ile ekstraksiyonu sonucu HPLC'ye uygulandı.

3.4.5.3.MDA Miktarının Hesaplanması

Her bir örnek için, lipid peroksidasyon ölçütü olan MDA miktarı, TEP standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrilerine göre hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak sonuçlar nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.4.6.İndirgenmiş Glutatyon Tayini

GSH tayini, Sedlak ve Ellman (220) tarafından tarif edilen yöntemin Beutler tarafından yapılan modifikasyonuna göre yapıldı. Yöntemin esası, reaksiyon ortamında kullanılan DTNB'nin dokulardaki serbest sülfidril grupları ile indirgenerek bir mol -SH grubuna karşılık bir mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asid vermesine ve bu nitrobenzoik asidin oluşturduğu sarı rengin şiddetinin spektrofotometrede 412 nm'de ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2-GSH'un DTNB İle reaksiyonu (4)

3.4.6.1.Yöntemin Uygulanışı

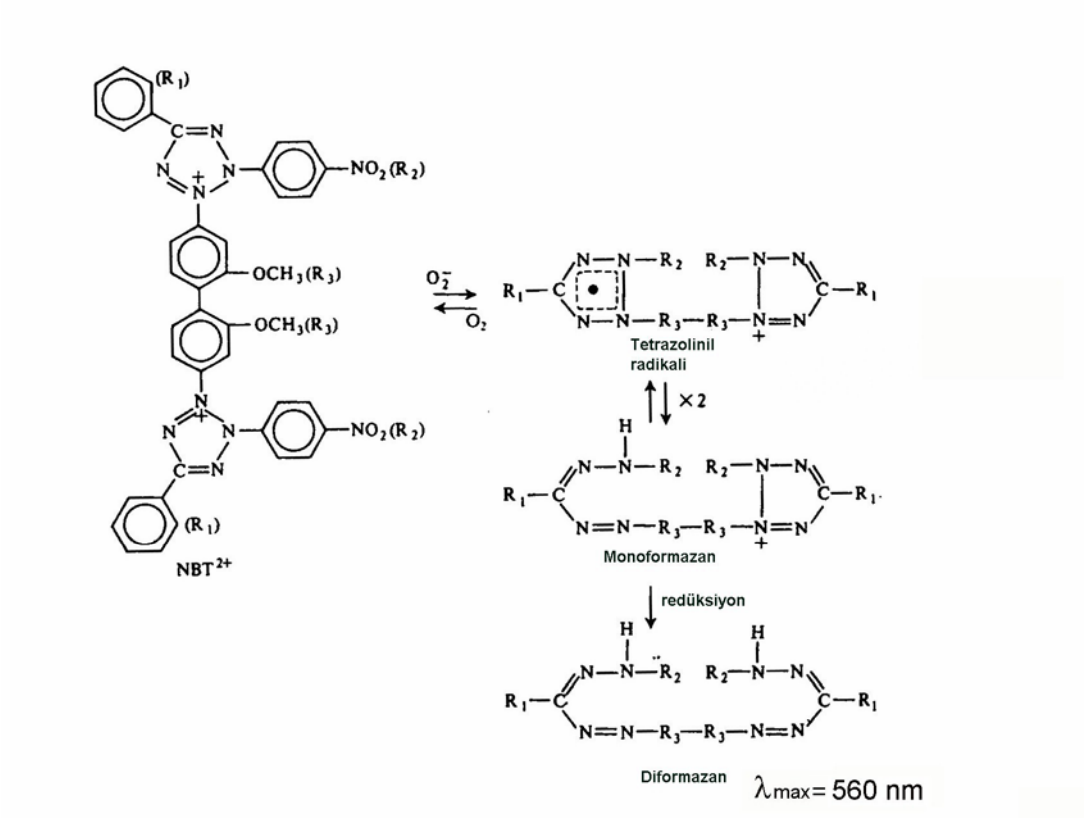
1.2 ml %10'luk doku homojenatına 1,8 ml çöktürme çözeltisi eklendi, vorteksle karıştırıldı, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 0,6 ml GSH standart çözeltisine veya santrifüjden sonra alınan süpernatantın 0.6 ml'sine 2.4 ml sekonder sodyum fosfat çözeltisi ve 0.3 ml DTNB çözeltisi eklendi, vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra çözeltinin absorbansı 412 nm'de köre karşı ölçüldü.

3.4.6.2.GSH Miktarının Hesaplanması

Her bir örnek için GSH miktarı, GSH standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Ölçü eğrisi üzerinden yapılan hesaplamalarda µg olarak alınan sonuçlar µmol e çevrildi. %10'luk doku homojenatlarında protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak sonuçlar µmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.4.7.Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini

SOD aktivitesi tayini, Sun (178) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Yöntemin esası, ksantin-ksantin oksidaz tarafından oluşturulan süperoksid radikalinin NBT'yi, NBT formazan bileşiğine indirgeme reaksiyonunun, SOD aktivitesi ile inhibisyonu sonucu, ortamdaki formazan bileşiğinin 560 nm'deki absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3-NBT'un süperoksid radikali tarafından redüksiyonu (4)

3.4.7.1.SOD Aktivitesi Tayini için Doku Homojenatının Hazırlanması

Mn-SOD ve Fe-SOD'ları uzaklaştırmak için; 0,5 ml %10'luk doku homojenatına 0,8 ml kloroform/etanol (3/5) eklendi ve 1 dakika kuvvetlice vortekslenerek ekstraksiyon yapıldı. Ardından 10.000 g de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alınan süpernatantta SOD aktivite tayini yapıldı.

3.4.7.2.Yöntemin Uygulanışı

125 µl SOD standart çözeltisine veya 125 µl süpernatanta, 600 µl SOD çalışma reaktifi ilave edildi. 25 µl ksantin oksidaz çözeltisi 30 sn aralıklar ile ilave edildikten sonra karışım 25 °C'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, yine 30 sn aralıklar ile 250 µl $CuCl_2$ ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Çözeltinin absorbansı 560 nm'de köre karşı ölçüldü.

3.4.7.3.SOD Aktivitesinin Hesaplanması

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan SOD standart çözeltilerinin her biri için aşağıdaki formül kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplandı (3.1) ve SOD standart eğrisi çizildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{kör} - A_{örnek})}{A_{kör}} \times 100 \qquad (3.1)$$

Hazırlanan SOD standart eğrisi kullanılarak, ve NBT'nin NBT formazan bileşiğine indirgenmesi reaksiyonunda %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı 1 ünite kabul edilerek, örneklerin SOD aktiviteleri hesaplandı. 10.000 g süpernatant fraksiyonunun protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.4.8.Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

CAT aktivitesi tayini Aebi (193) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Yöntemin esası, H_2O_2 substratının CAT ile enzimatik yıkımlanmasının 240 nm de izlenmesidir.

$$\mathbf{H_2O_2} \xrightarrow{\text{CAT}} \mathbf{2\,H_2O + O_2}$$

3.4.8.1.Yöntemin Uygulanışı

Kuvarz spektrofotometre küvetlerine 10 μl 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 μl fosfat tamponu ilave edildi. Örnek küvetine 1 ml 30 mM H_2O_2, kör küvetine de 1 ml fosfat tamponu ilave edilidi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 3 dakika boyunca 10 saniye aralıklar ile 240 nm'de izlendi.

3.4.8.2.CAT Aktivitesinin Hesaplanması

H_2O_2 in enzimatik yıkımlanması mevcut peroksid oranı konsantrasyonu ile orantılı bir hızda, birinci derece reaksiyonla yürütülmektedir. Birinci derece reaksiyon hız sabitesi (k), katalaz konsantrasyonunun direkt ölçütü olarak kullanılmaktadır (3.2) (193). Bu esasa dayanarak ve aşağıdaki formül kullanılarak CAT spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. 10.000 g süpernatant

fraksiyonunun protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak spesifik aktivite k/mg protein cinsinden ifade edildi.

k = 2,3/∆t x (lnS1-S2) (3.2)

∆t = ilk ölçüm ve son ölçüm arasındaki zaman farkı (dak)

S1 = ilk ölçümdeki absorbans değeri

S2 = son ölçümdeki absorbans değeri

3.4.9.Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

GSH-Px aktivitesi tayini Paglia ve Valentine tarafından tarif edilen yöntemin Pleban (204) tarafından yapılan modifikasyonuna göre yapıldı. Yöntemin esası, substrat olan H_2O_2 ile reaksiyona giren glutatyonun, GSH-Px'in katalizörlüğünde oksidasyonu ve oluşan okside glutatyonun, NADPH ve GSH-Rd varlığında tekrar indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ortamdaki NADPH ın $NADP^+$'e dönüşmesi, 340 nm'deki absorpsiyonda meydana gelen azalma ile izlenmektedir.

$$2\,GSH + H_2O_2\,(ROOH) \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + ROH\,(H_2O) + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH\text{-}Rd} 2GSH + NADP^+$$

3.4.9.1.Yöntemin Uygulanışı

Kuvarz spektrofotometre küvetine 20 µl 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerine 980 µl reaksiyon karışımı ilave edilidi. Karışım, 37°C'de su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. 10 µl 8,8 mM H_2O_2 eklenerek reaksiyon başlatıldı ve hemen karıştırılarak NADPH absorbansındaki azalma, suya karşı 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklar ile 340 nm'de izlendi. Körün non-enzimatik reaksiyon oranını saptamak için ise küvete 10.000 g süpernatant fraksiyonu yerine su konuldu ve NADPH absorbansındaki azalma suya karşı 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklar ile 340 nm'de izlendi.

3.4.9.2.GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması

Her bir örnek için GSH-Px aktivitesi tayini, GSH-Px standart çözeltiler ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Kör için de aynı şekilde hesaplanan aktivite değeri örneğe ait aktivite değerinden çıkarıldı. 10.000 g süpernatant

fraksiyonunun protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.4.10.Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesi Tayini

GSH-Rd aktivitesi tayini Beutler (209) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Yöntemin esası, GSSG'un, NADPH ve GSH-Rd varlığında indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ortamdaki NADPH'ın $NADP^+$ e dönüşmesi, 340 nm'deki absorpsiyonda meydana gelen azalma ile izlenmektedir.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSSG\text{-}Rd} 2GSH + NADP^+$$

3.4.10.1.Yöntemin Uygulanışı

Kuvarz spektrofotometre küvetine 50 μl 10.000 g süpernatant fraksiyonu, 820 µl fosfat tamponu ve 100 µl NADPH ilave edildi ve daha sonra 30 µl GSSG eklenerek reaksiyon başlatıldı ve hemen karıştırılarak NADPH absorbansındaki azalma, suya karşı 5 dakika boyunca 30 saniye aralıklar ile 340 nm'de izlendi. Körün non-enzimatik reaksiyon oranını saptamak için ise küvete 10.000 g süpernatant fraksiyonu yerine su konuldu ve NADPH absorbansındaki azalma suya karşı 5 dakika boyunca 30 saniye aralıklar ile 340 nm'de izlendi.

3.4.10.2.GSH-Rd Aktivitesinin Hesaplanması

Her bir örnek için GSH-Rd aktivitesi tayini, GSH-Rd standart çözeltiler ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Kör için de aynı şekilde hesaplanan aktivite değeri örneğe ait aktivite değerinden çıkarıldı. 10.000 g süpernatant fraksiyonunun protein tayini yapılarak ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak spesifik aktivite mU/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.5.İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde "SPSS 13.0 for Windows" paket programı kullanılarak Tek Yönlü Varyans (ANOVA) analizi: Post Hoc-Scheffe testi uygulandı. $p<0,001$ ve $p<0,05$ Değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

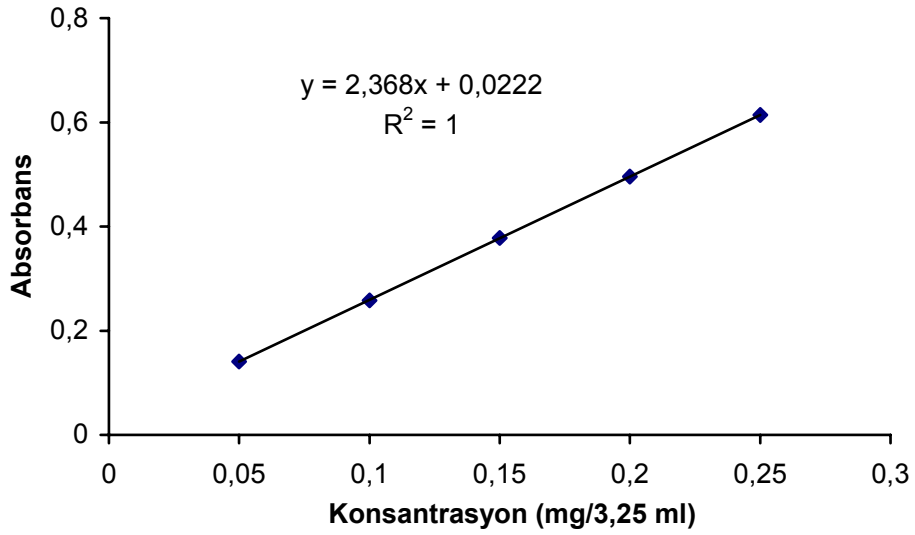
Standart eğriler "Doğrusal Regresyon Analizi" yapılarak saptandı.

4. BULGULAR

4.1.Protein Tayini

4.1.1.Protein Standart Ölçü Eğrisi

Dokuda protein tayini, standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. 3.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları, 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mg/3,25 ml olan BSA standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4.1'de verilmiştir.

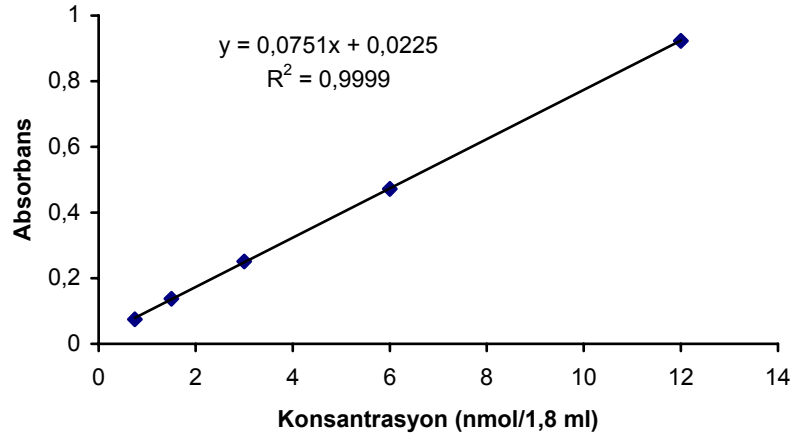


Şekil 4.1-Protein standart ölçü eğrisi

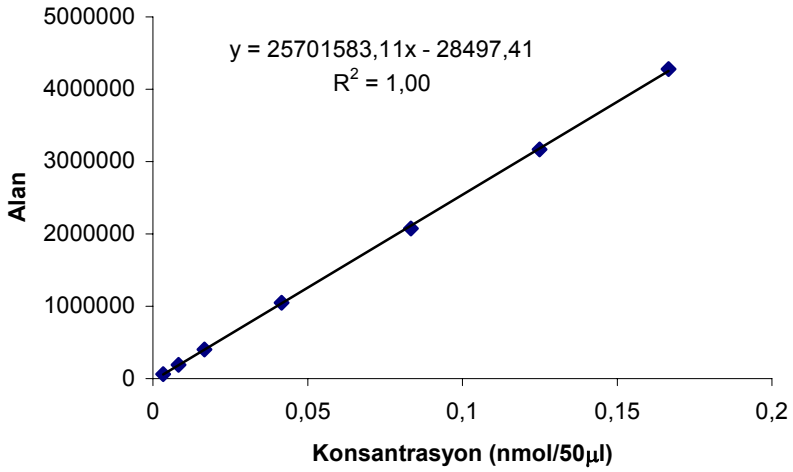
4.2.Lipid peroksidasyon Düzeylerine İlişkin Bulgular

4.2.1.MDA Ölçü Eğrileri

Dokuda MDA düzeyi, standart olarak TEP kullanılarak hazırlanan ölçü eğrileri üzerinden hesaplandı. 3.3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları spektrofotometrik yöntem için, 0,75; 1,5; 3; 6; 12 nmol/1,8ml ve HPLC yöntemi için 0,0033; 0,0083; 0,0166; 0,0416; 0,0833; 0,1249; 0,1666 nmol/50μl olan TEP standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrileri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2-Spektrofotometrik yönteme göre hazırlanan MDA ölçü eğrisi



Şekil 4.3- HPLC yöntemine göre hazırlanan MDA ölçü eğrisi

4.2.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen MDA Düzeyleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.1-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein) *

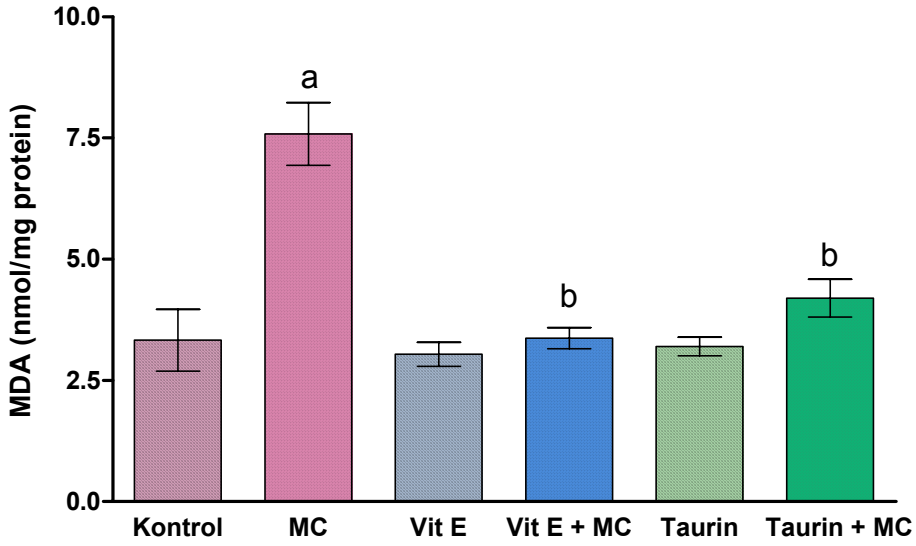
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	3,33±0,64	7,59±0,65 [a]	3,04±0,25	3,37±0,22 [b]	3,20±0,19	4,20±0,39 [b]
Böbrek	5,75±0,54	8,88±0,76 [a]	5,61±0,6	6,33±0,3 [b]	5,72±0,29	7,12±0,25 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

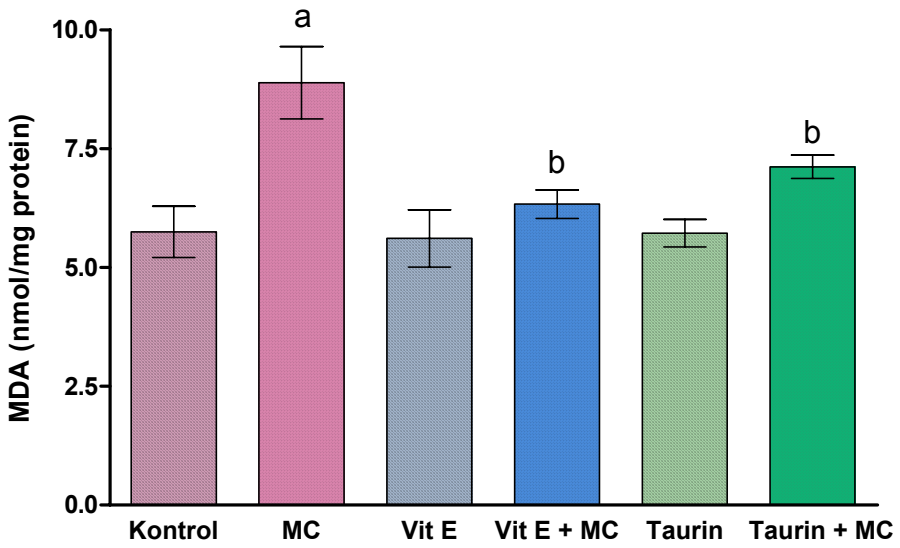
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.4-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.5-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

4.2.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen MDA Düzeyleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.6).

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup ve taurin uygulaması da methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Tablo 4.2-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	3,80±0,47	5,20±0,69 [a]	3,70±0,26	3,94±0,67 [b]	3,83±0,44	4,15±0,1 [b]
Böbrek	5,26±0,9	7,89±0,94 [c]	5,26±0,49	5,69±0,61 [d]	5,36±0,24	6,07±0,36 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

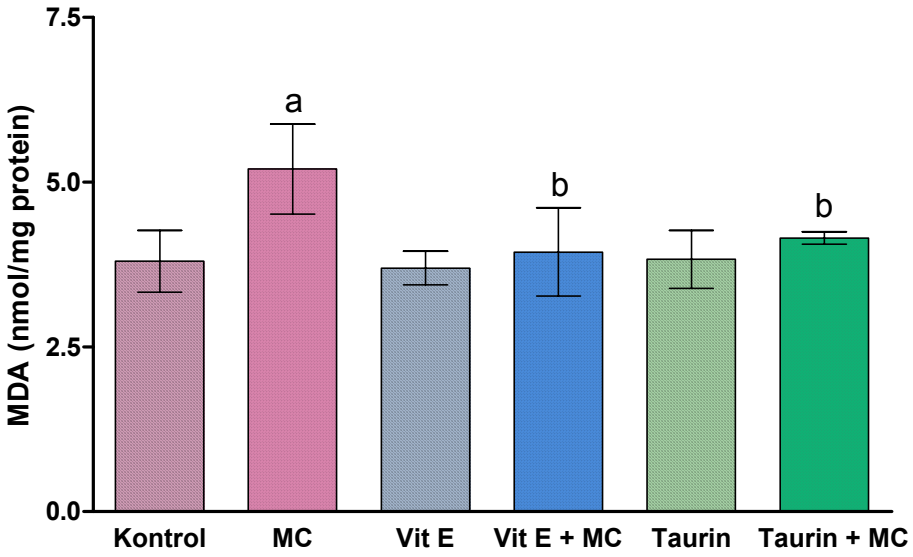
ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

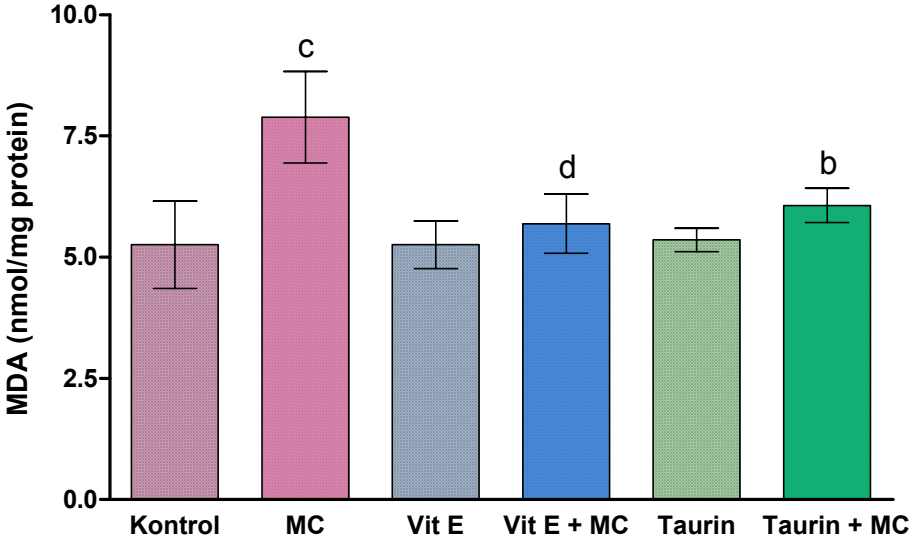
[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.6-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.7-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

4.2.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen MDA Düzeyleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir..

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.8).

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup ve taurin uygulaması da methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Tablo 4.3-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	2,53±0,29	5,09±0,8 [a]	2,57±0,32	2,73±0,39 [b]	2,59±0,5	3,38±0,28 [b]
Böbrek	5,41±0,94	8,39±0,73 [a]	5,36±0,38	5,98±0,99 [b]	5,47±0,64	6,70±0,43 [c]

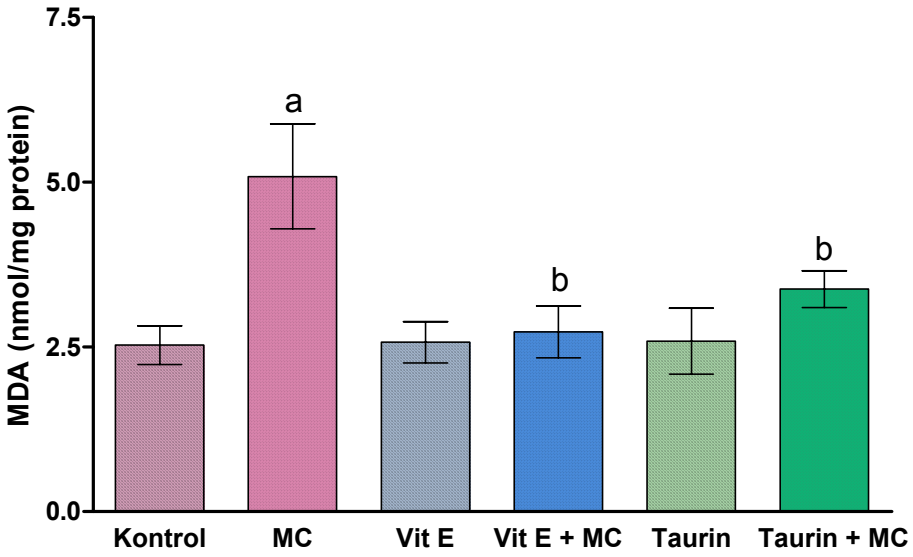
* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

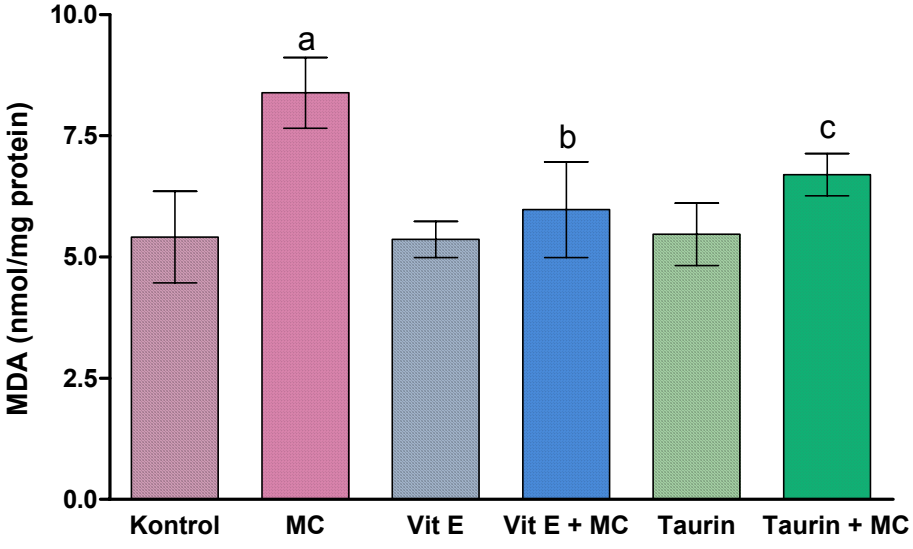
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[c] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.8-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[c] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.9-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

4.2.5.Tek Doz, Tekrarlanan Doz (5gün ve 28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda HPLC ile Ölçülen Karaciğer MDA Düzeyleri

Tek doz ve 28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda HPLC ile ölçülen MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Tablo 4.4).

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.12). Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan MDA düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4-Tek doz, tekrarlanan doz (5 gün ve 28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein) * (HPLC)

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=8)	E Vitamini + Methiocarb (n=10)	Taurin (n=8)	Taurin + Methiocarb (n=10)
Tek Doz	3,36±0,30	7,70±0,73 [a]	3,16±0,21	3,31±0,28 [b]	3,21±0,22	4,16±0,43 [b]
5 gün	3,86±0,58	5,23±0,66 [c]	3,73±0,46	4,08±0,42 [d]	3,80±0,44	4,16±0,19 [d]
28 gün	2,61±0,23	5,09±0,42 [a]	2,64±0,36	2,82±0,21 [b]	2,75±0,44	3,41±0,55 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

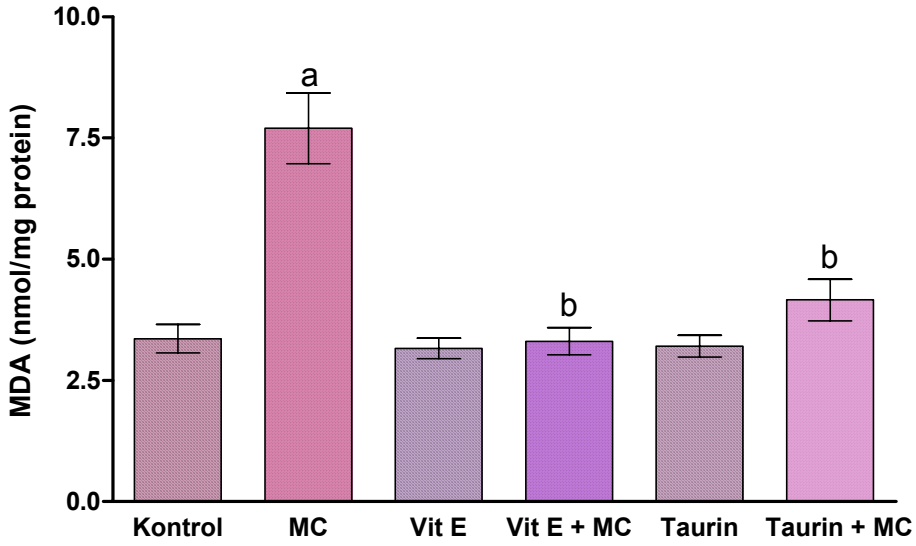
ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

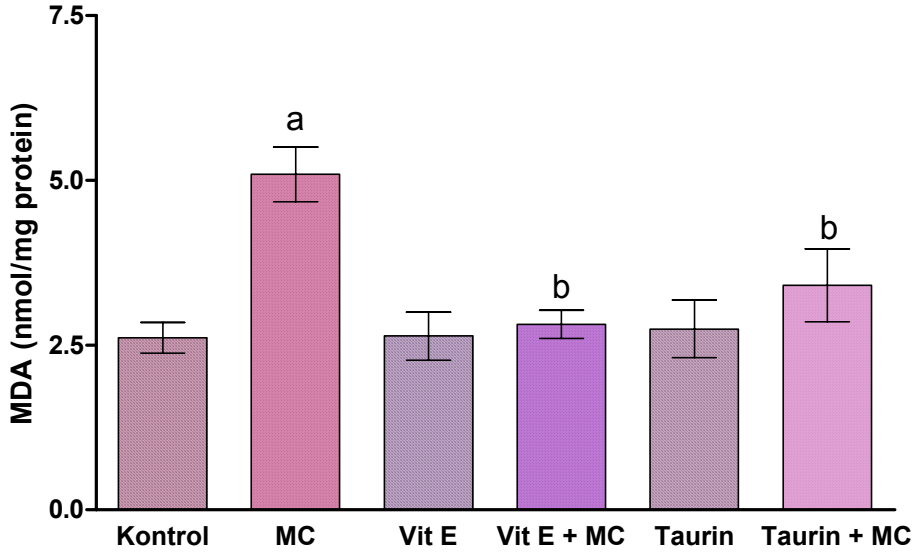
[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



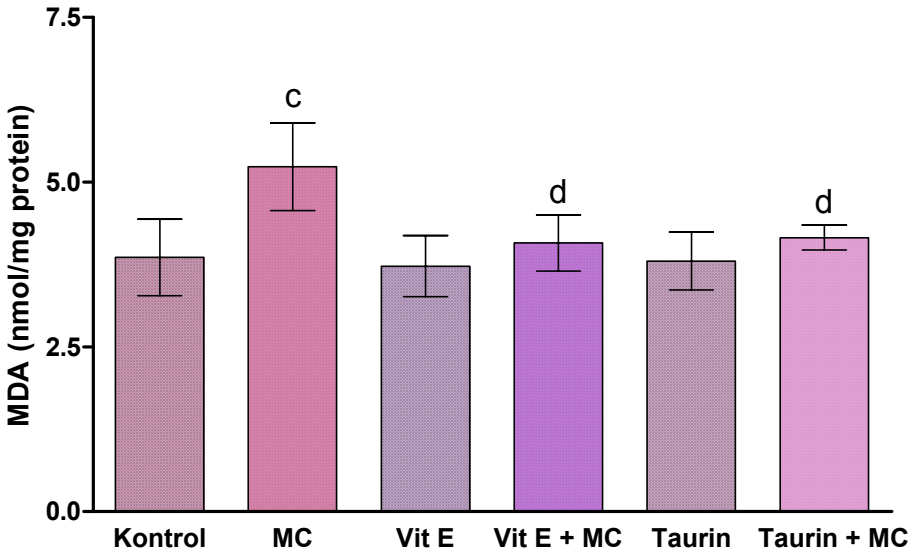
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.10-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein) (HPLC)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.11-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein) (HPLC)



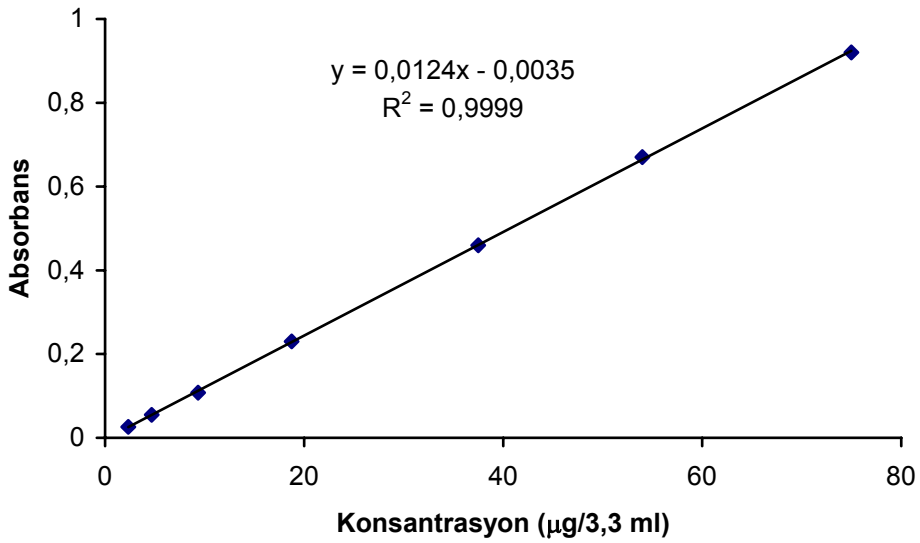
[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.12-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer MDA düzeyleri (nmol/mg protein) (HPLC)

4.3.İndirgenmiş Glutatyon Düzeylerine İlişkin Bulgular

4.3.1.GSH Standart Ölçü Eğrisi

Dokuda GSH tayini, standart olarak GSH kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. 3.3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları, 2,34; 4,68; 9,36; 18,75; 37,5; 54; 75 µg/3,3 ml olan GSH standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13-GSH standart ölçü eğrisi

4.3.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH Düzeyleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH düzeyleri Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla artmış olan GSH düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

Tablo 4.5-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein) *

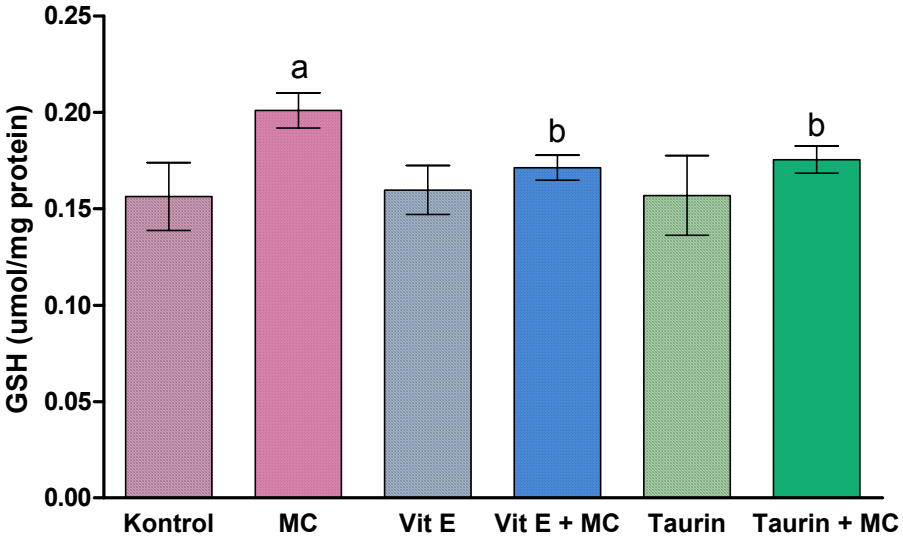
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	0,16±0,02	0,20±0,01 [a]	0,16±0,01	0,17±0,01 [b]	0,16±0,02	0,18±0,01 [b]
Böbrek	0,09±0,01	0,12±0,01 [a]	0,09±0,004	0,09±0,01 [b]	0,09±0,01	0,01±0,01 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

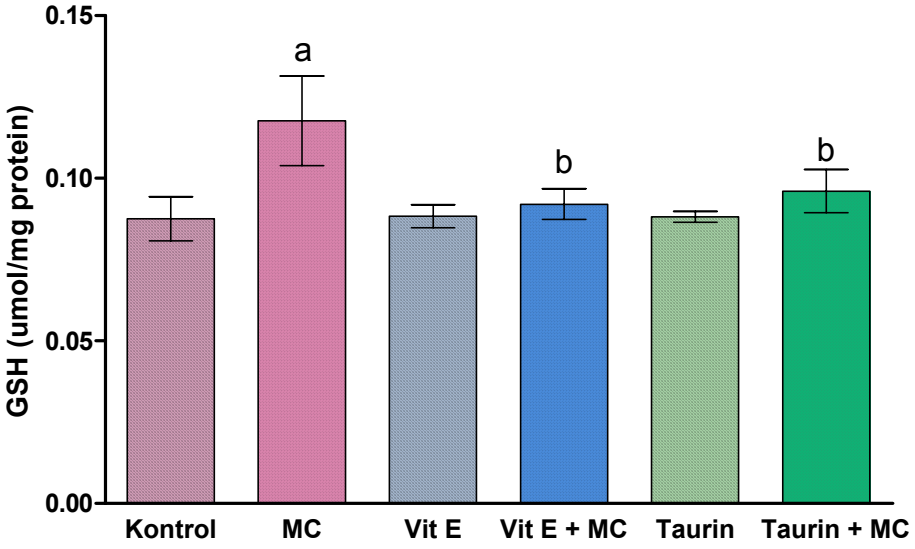
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.14-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH düzeyleri (µmol/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.15-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein)

4.3.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH Düzeyleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH düzeyleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir..

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan GSH düzeyini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

Tablo 4.6-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein) *

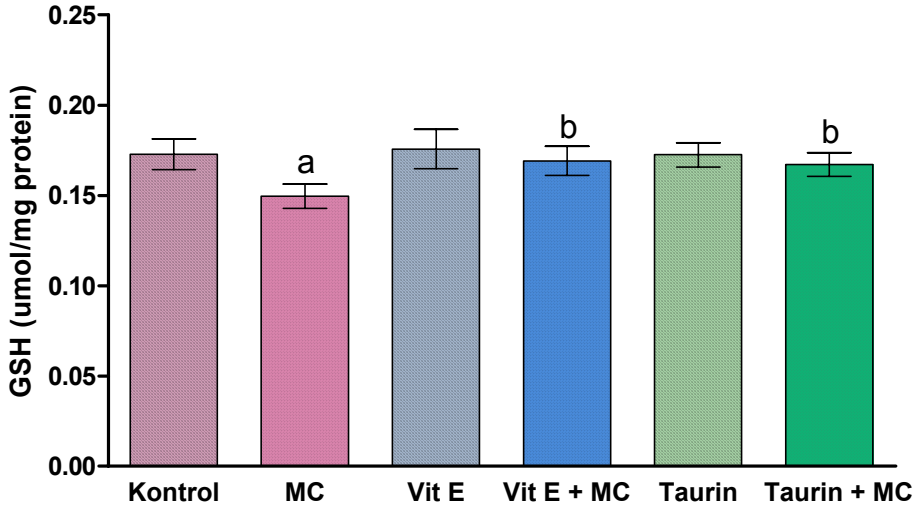
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	0,17±0,01	0,15±0,01 [a]	0,18±0,01	0,17±0,01 [b]	0,17±0,01	0,17±0,01 [b]
Böbrek	0,1±0,014	0,08±0,01 [a]	0,1±0,003	0,1±0,003 [b]	0,1±0,003	0,1±0,01 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

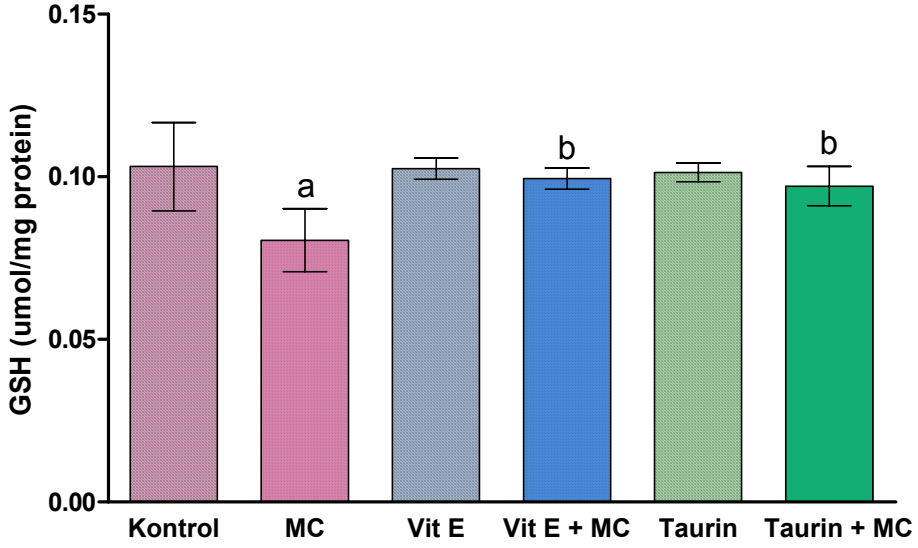
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.16-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH düzeyleri (µmol/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.17-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein)

4.3.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH Düzeyleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen MDA düzeyleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir..

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan GSH düzeyini önemli ölçüde ($p<0,001$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

Tablo 4.7-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein) *

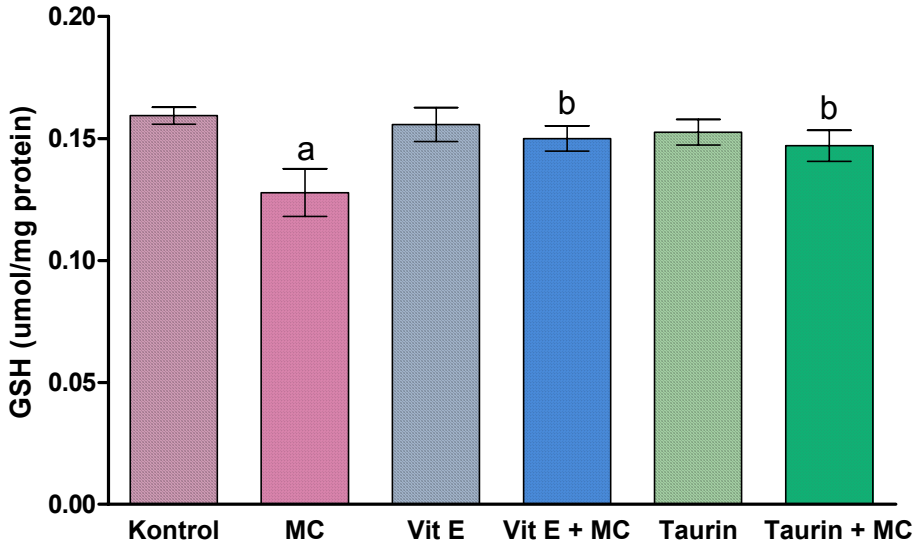
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	0,16±0,01	0,13±0,01 [a]	0,16±0,007	0,15±0,01 [b]	0,15±0,01	0,15±0,01 [b]
Böbrek	0,1±0,02	0,07±0,01 [a]	0,1±0,014	0,09±0,01 [b]	0,09±0,01	0,09±0,01 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

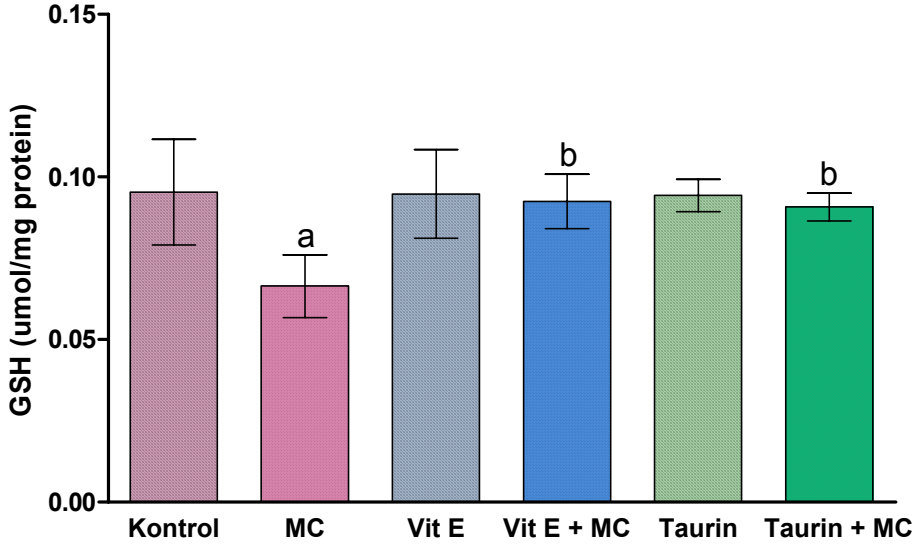
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.18-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH düzeyleri (µmol/mg protein)



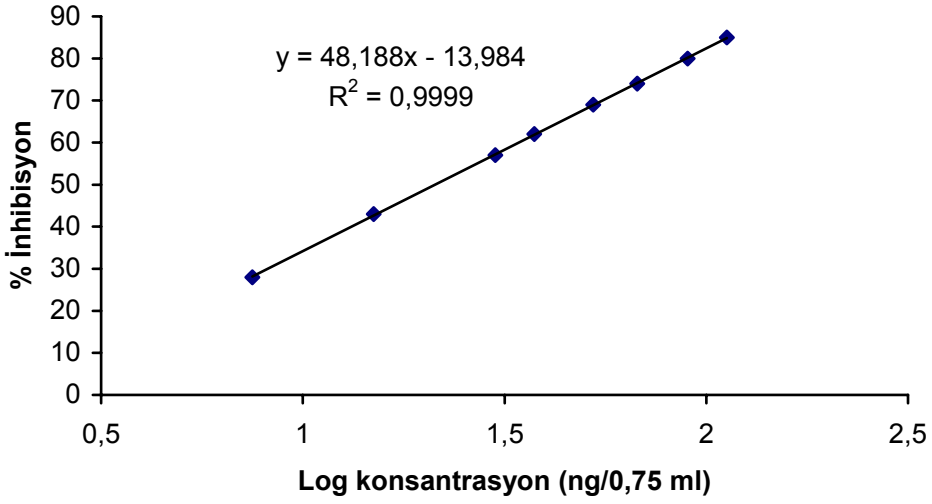
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.19-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH düzeyleri (µmol/mg protein)

4.4.Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

4.4.1.SOD Standart Ölçü Eğrisi

Dokuda SOD aktivitesi tayini, standart olarak SOD kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. 3.3.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları, 7,5; 15; 30; 37,5; 52,5; 67,5; 90; 112,5 ng/0,75 ml olan SOD standart çözeltilerinin % inhibisyon değerleri hesaplandı. Küvetteki standart konsantrasyonlarının hesaplanan logaritma değerlerine karşılık % inhibisyon değerleri ile çizilen SOD standart ölçü eğrisi ise Şekil 4.20'de verilmiştir. %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı 1 ünite kabul edilerek, örneklerin SOD aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 4.20-SOD standart ölçü eğrisi (logaritmik)

4.4.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen SOD Aktiviteleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen SOD aktiviteleri Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda SOD aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan SOD aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.21).

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda SOD aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan SOD aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.22).

Tablo 4.8-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	113±11	142±11 [a]	112±7,7	117±8,2 [b]	115±4,6	124±5,5 [b]
Böbrek	164±16	196±14 [c]	165±1,1	168±8,8 [b]	167±1,6	172±5,8 [b]

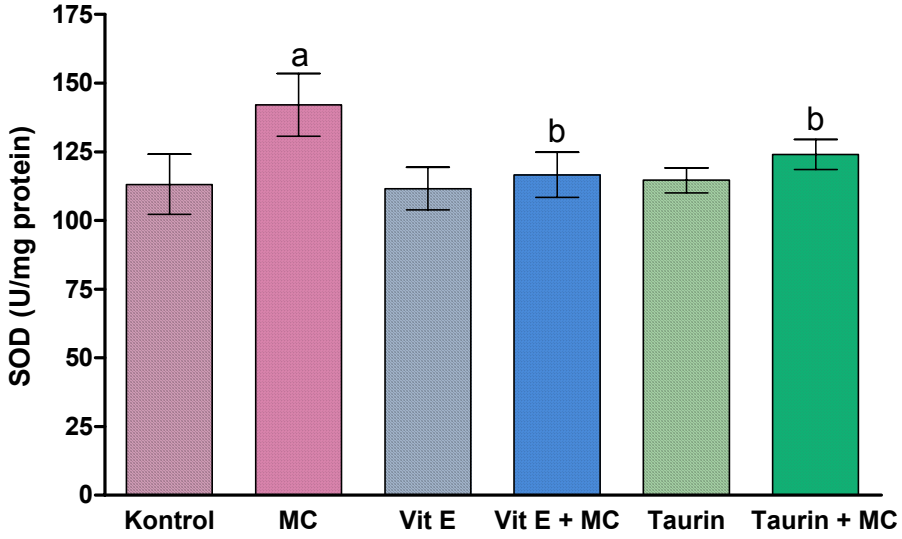
* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

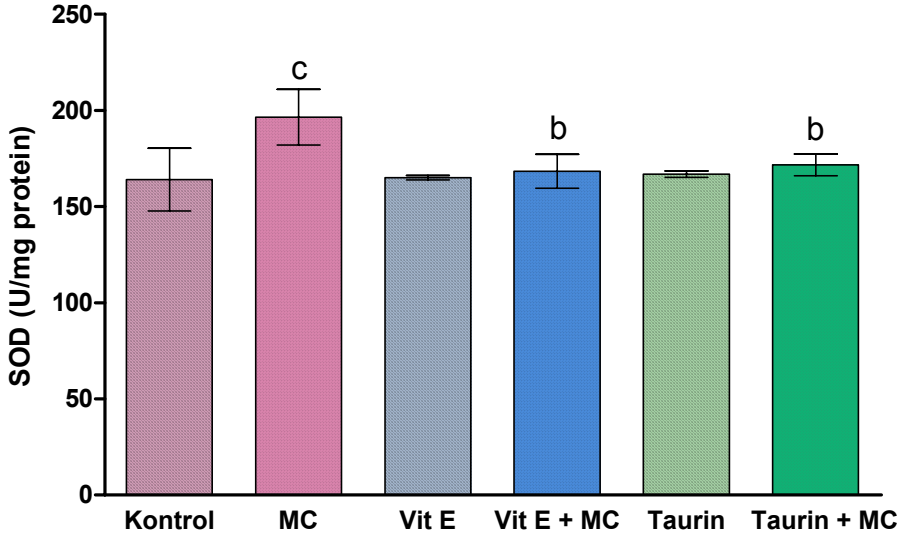
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.21-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer SOD aktiviteleri (U/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.22-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein)

4.4.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen SOD Aktiviteleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen SOD aktiviteleri Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında SOD aktivitelerinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan SOD aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Tablo 4.9-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein) *

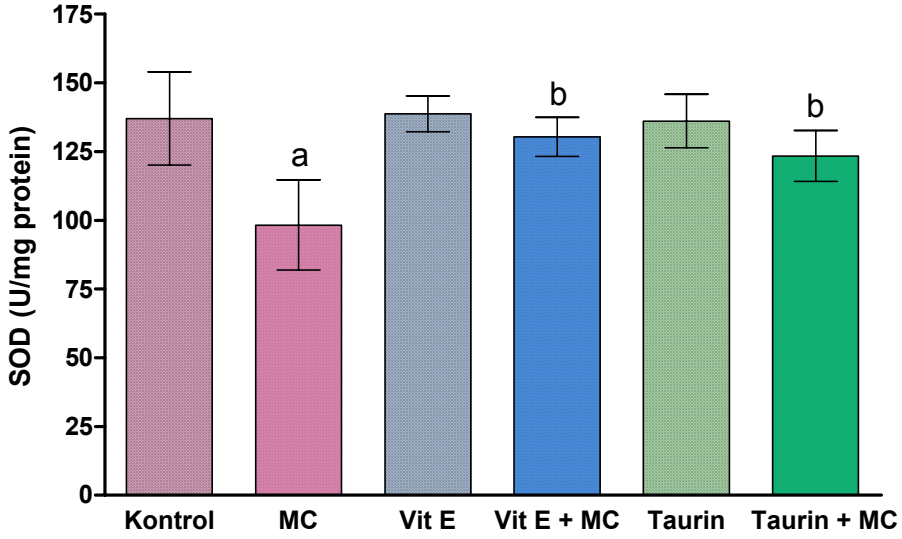
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	137,1±16	98,31±16 [a]	138,7±6,57	130,3±7,1 [b]	136,1±9,8	123,4±9,3 [b]
Böbrek	204,9±19	166,1±7,8 [a]	199,6±6,59	196,3±9,7 [b]	198,4±7,7	189,7±6,7 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

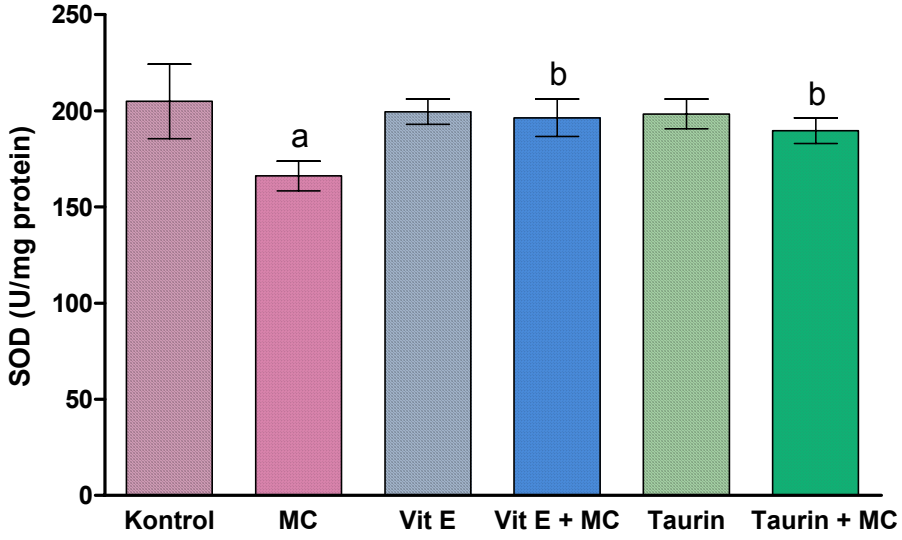
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.23-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer SOD aktiviteleri (U/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.24-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein)

4.4.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen SOD Aktiviteleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen SOD aktiviteleri Tablo 4.10'da gösterilmiştir..

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında SOD aktivitelerinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan SOD aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

Tablo 4.10-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein) *

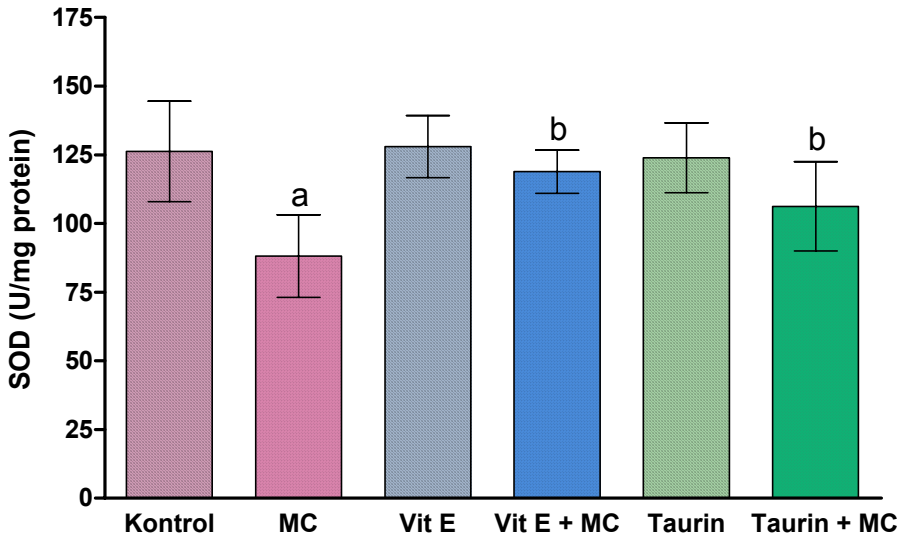
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	126,2±18	88,16±15 [a]	128,0±11,3	118,8±7,8 [b]	123,9±12,	106,3±16 [b]
Böbrek	158,8±20	110,4±18 [a]	162,0±21,8	150,3±13 [b]	159,9±19	144,2±5,7 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

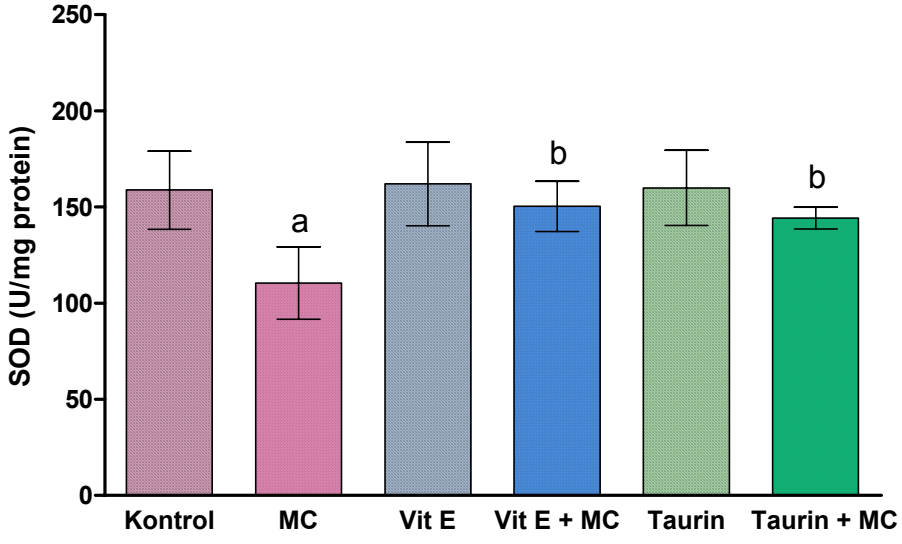
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.25-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer SOD aktiviteleri (U/mg protein)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.26-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek SOD aktiviteleri (U/mg protein)

4.5.Katalaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

4.5.1.CAT Aktivitesi

Dokuda CAT aktivitesi tayini, 3.3.6'da anlatıldığı şekilde formül kullanılarak hesaplandı.

4.5.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen CAT Aktiviteleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen CAT aktiviteleri Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

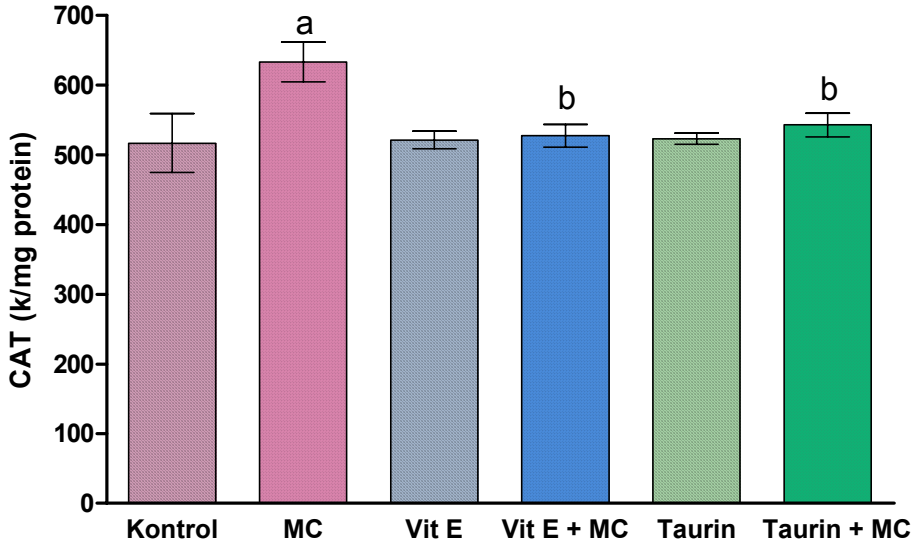
Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.27).

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.28).

Tablo 4.11-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein) *

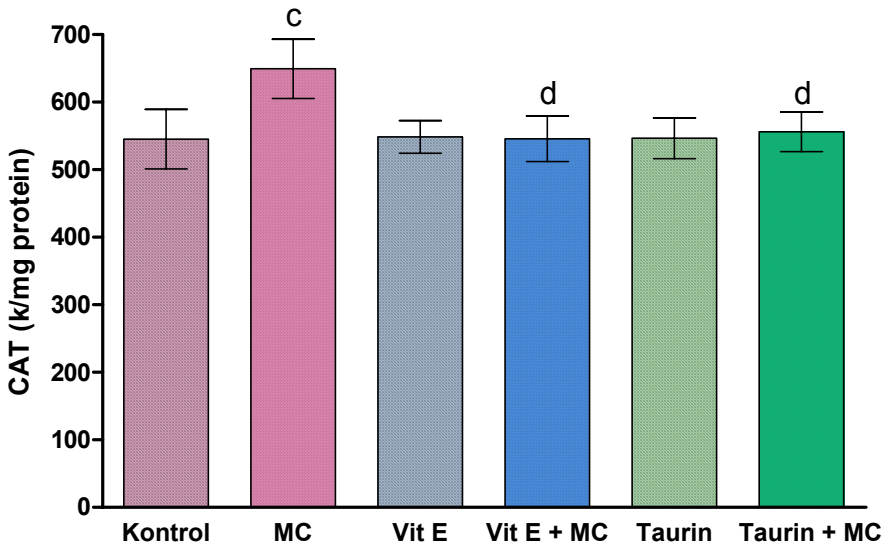
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	517±42,5	633±28,2 [a]	521±12,8	527±16,3 [b]	523±7,81	543±17,0 [b]
Böbrek	545±44,0	649±44,0 [c]	548±24,1	546±33,7 [d]	547±29,9	556±29,3 [d]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)
[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)
[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.27-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer CAT aktiviteleri (k/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.28-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein)

4.5.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen CAT Aktiviteleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen CAT aktiviteleri Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.29).

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.30).

Tablo 4.12-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	555±39,2	467±53,3 [a]	559±18,7	549±19,8 [b]	556±7,73	533±11,0 [b]
Böbrek	548±94,8	431±42,1 [c]	552±10,3	539±13,8 [b]	545±12,8	527±31,4 [b]

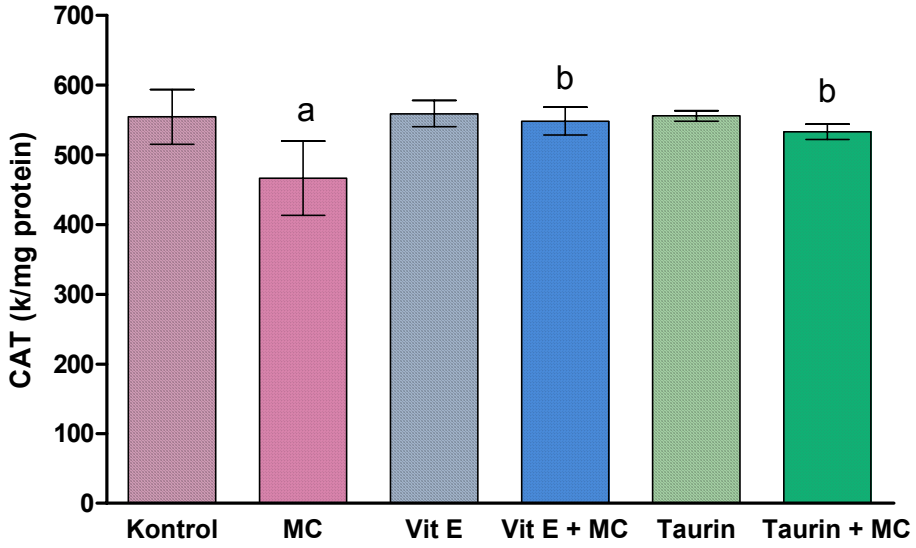
*Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

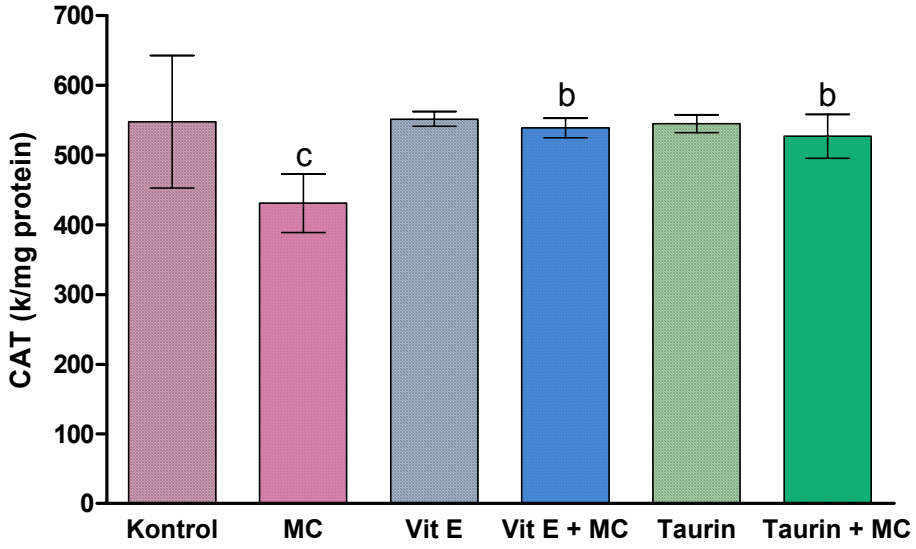
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.29-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer CAT aktiviteleri (k/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.30-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein)

4.5.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen CAT Aktiviteleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen CAT aktiviteleri Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.31).

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda CAT aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini uygulaması methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,001$) arttırmış olup, taurin uygulaması da methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.32).

Tablo 4.13-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	519±34,4	401±60,4 [a]	509±10,2	493±37,5 [b]	508±24,1	475±39,0 [b]
Böbrek	409±20,5	335±32,7 [a]	407±15,4	403±22,2 [c]	402±15,6	396±6,88 [b]

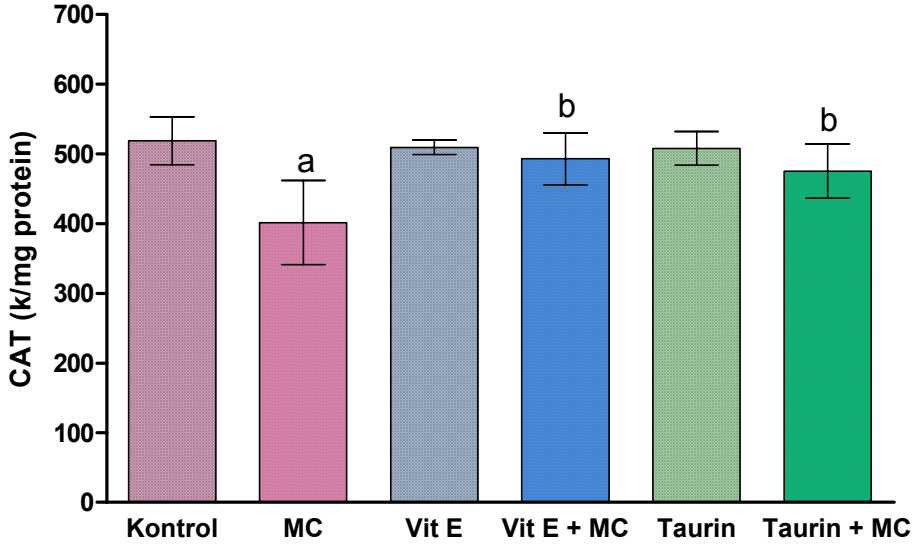
* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

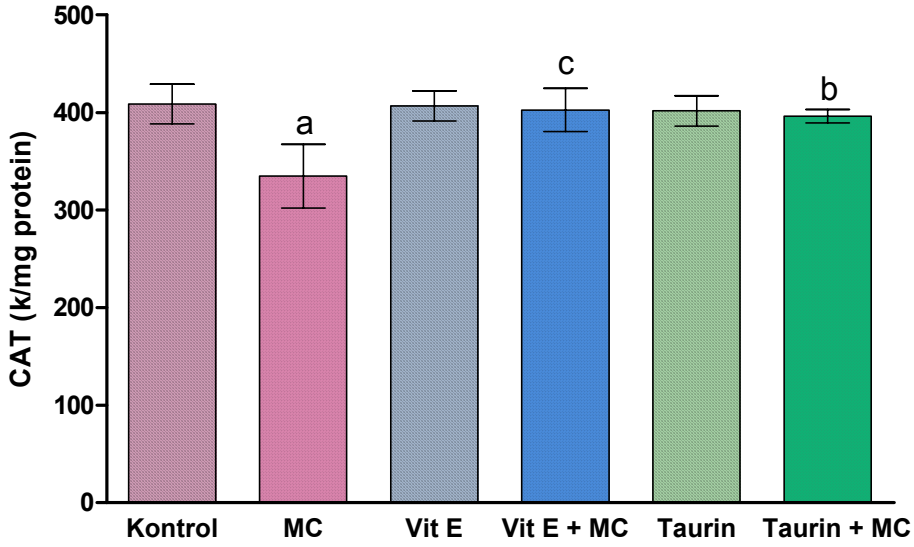
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[c] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.31-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer CAT aktiviteleri (k/mg protein)



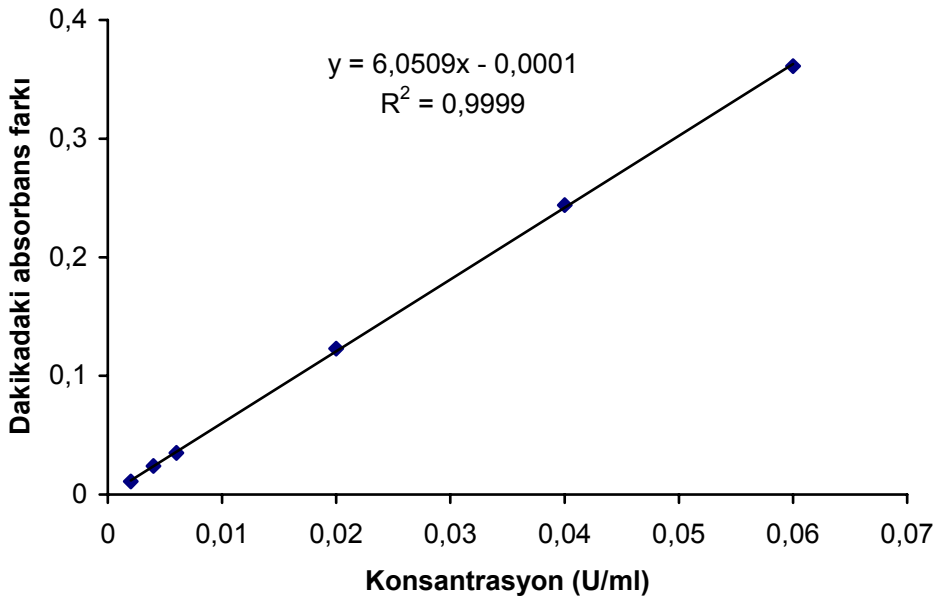
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[c] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.32-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek CAT aktiviteleri (k/mg protein)

4.6.Glutayon Peroksidaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

4.6.1.GSH-Px Standart Ölçü Eğrisi

Dokuda GSH-Px aktivitesi tayini, standart olarak GSH-Px kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. 3.3.7'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları, 0,002; 0,004; 0,006; 0,02; 0,04; 0,06 U/ml olan GSH-Px standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4.33'de verilmiştir.



Şekil 4.33-GSH-Px standart ölçü eğrisi

4.6.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Px Aktiviteleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Px aktiviteleri Tablo 4.14'de gösterilmiştir.

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,001$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.34).

Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda GSH-Px aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.35).

Tablo 4.14-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	13,65±0,5	17,84±0,9 [a]	13,86±0,29	14,11±0,7 [b]	13,52±0,5	14,57±1,1 [b]
Böbrek	17,73±2,2	22,98±1,3 [c]	17,63±1,97	17,83±1,8 [d]	17,48±0,1	18,45±1,3 [d]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

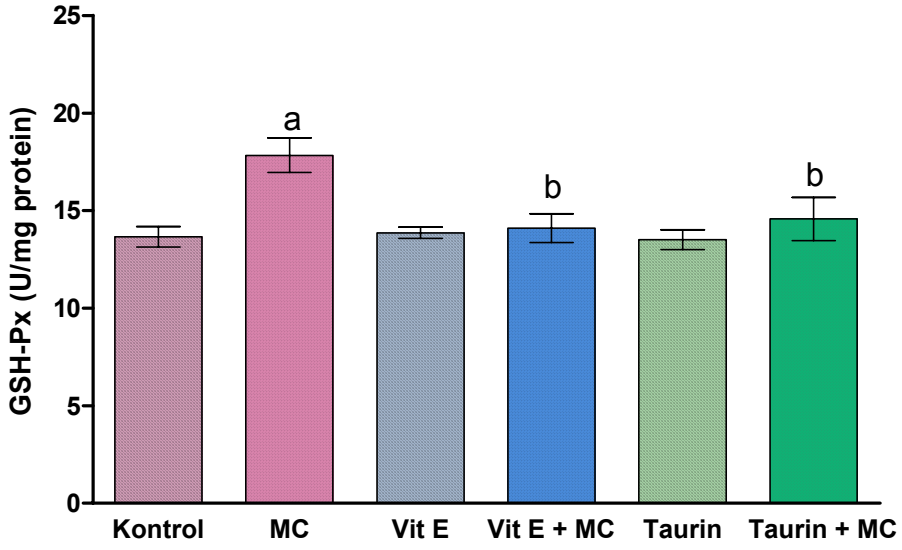
ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

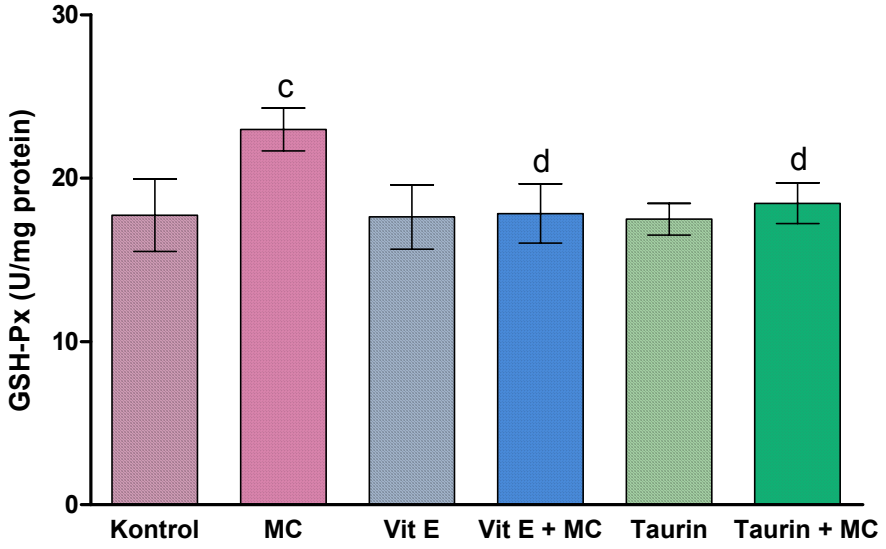
[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)

Şekil 4.34-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[d] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.35-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)

4.6.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Px Aktiviteleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Px aktiviteleri Tablo 4.15'de gösterilmiştir.

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.36).

5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek dokusunda GSH-Px aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı gözlenmiştir. Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması methiocarb grubuna kıyasla artmış olan GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.37).

Tablo 4.15-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	15,36±2,4	20,89±3,7 [a]	15,11±0,64	15,66±0,8 [b]	14,62±1,1	16,12±2,2 [b]
Böbrek	19,53±1,9	25,15±3,3 [c]	19,64±±1,7	20,19±0,9 [b]	19,78±0,6	20,98±1,1 [b]

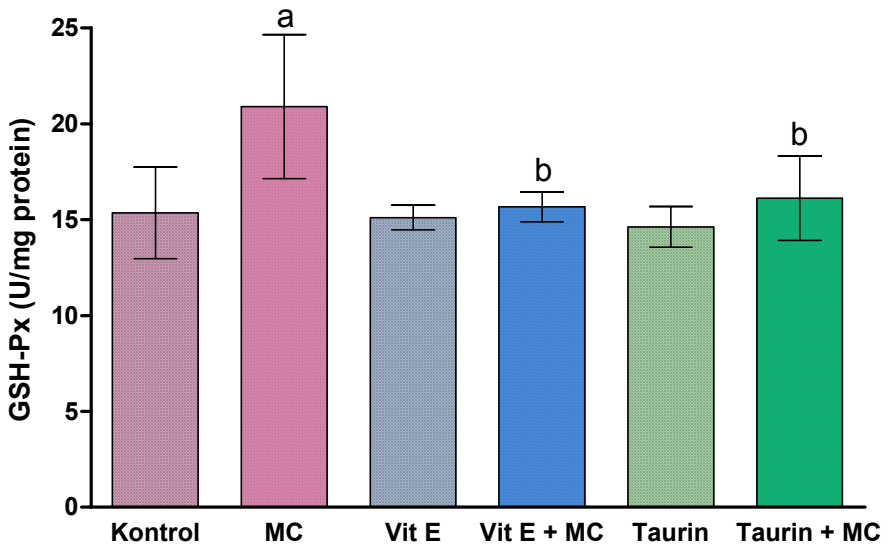
* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

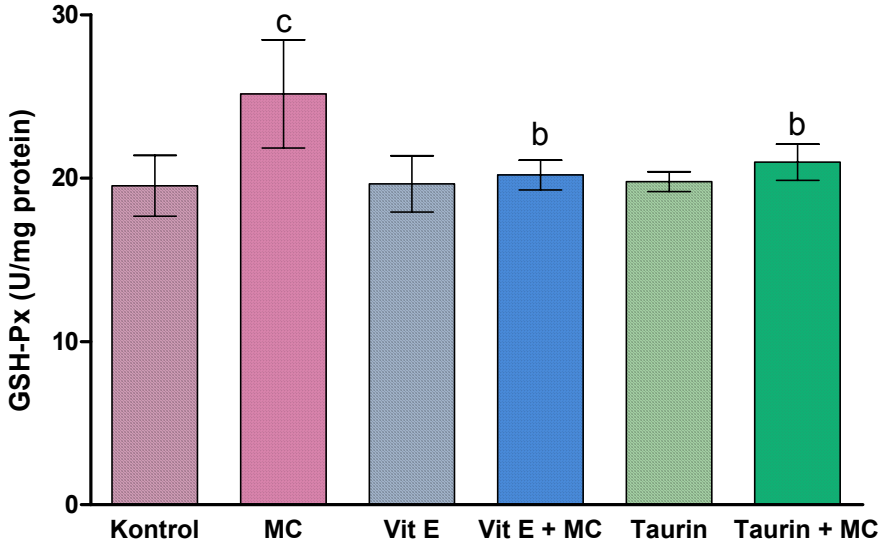
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.36-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)



[c] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.37-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)

4.6.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Px Aktiviteleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Px aktiviteleri Tablo 4.16'da gösterilmiştir..

28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Px aktivitelerinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,001$) azalttığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla azalmış olan GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) arttırmış olup, kontrol düzeyi civarına getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39).

Tablo 4.16-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein) *

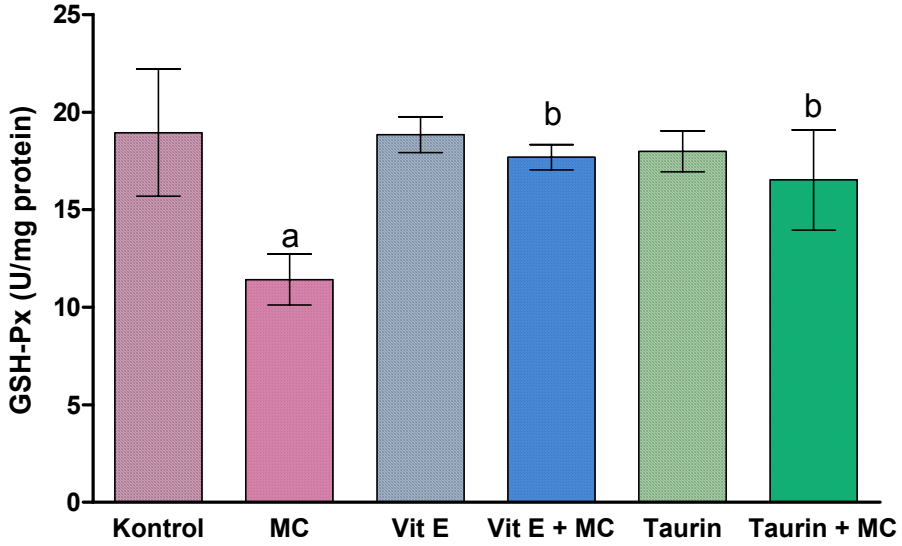
Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	18,95±3,3	11,42±1,3 [a]	18,85±0,92	17,69±0,7 [b]	17,99±1,1	16,52±2,6 [b]
Böbrek	21,60±2,7	14,59±2,4 [a]	21,60±2,54	20,15±1,1 [b]	20,44±1,7	19,57±0,7 [b]

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

ANOVA-Post Hoc Scheffe Testi sonuçlarına göre:

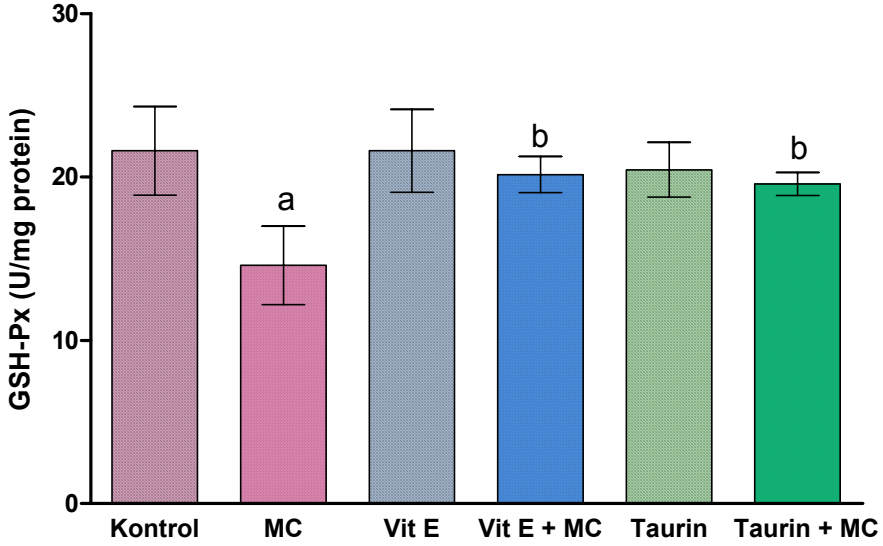
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,001$)

[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.38-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)



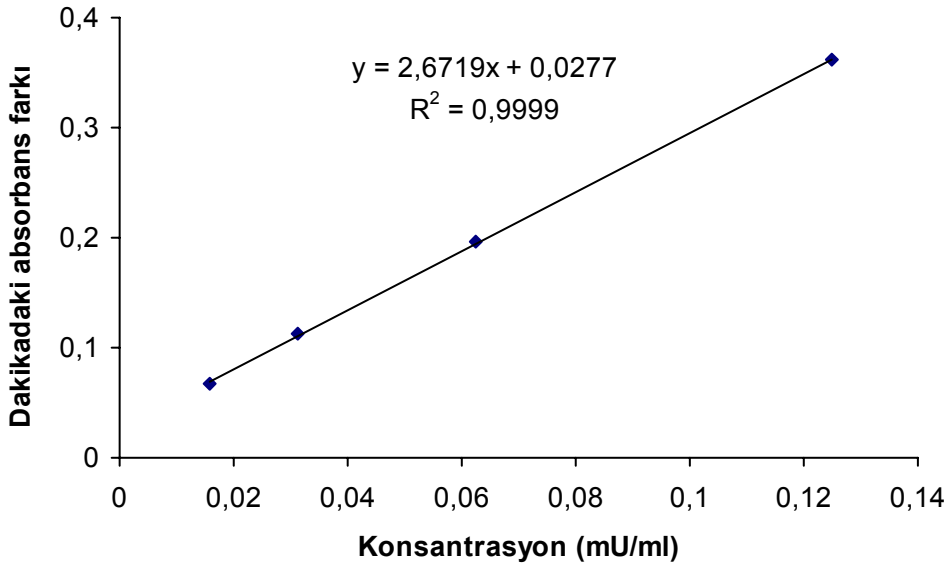
[a] Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,001)
[b] Methiocarb grubundan önemli ölçüde farklı (p<0,05)

Şekil 4.39-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Px aktiviteleri (U/mg protein)

4.7.Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

4.7.1.GSH-Rd Standart Ölçü Eğrisi

Dokuda GSH-Rd aktivitesi tayini, standart olarak GSH-Rd kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. 3.3.8'de anlatıldığı şekilde hazırlanan, reaksiyon ortamında son konsantrasyonları, 0,0156; 0,03125; 0,0625; 0,125 mU/ml olan GSH-Rd standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4.40'da verilmiştir.



Şekil 4.40-GSH-Rd standart ölçü eğrisi

4.7.2.Tek Doz Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Rd Aktiviteleri

3.4.2.1-3.4.2.3'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan tek doz (25 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Rd aktiviteleri Tablo 4.17'de gösterilmiştir.

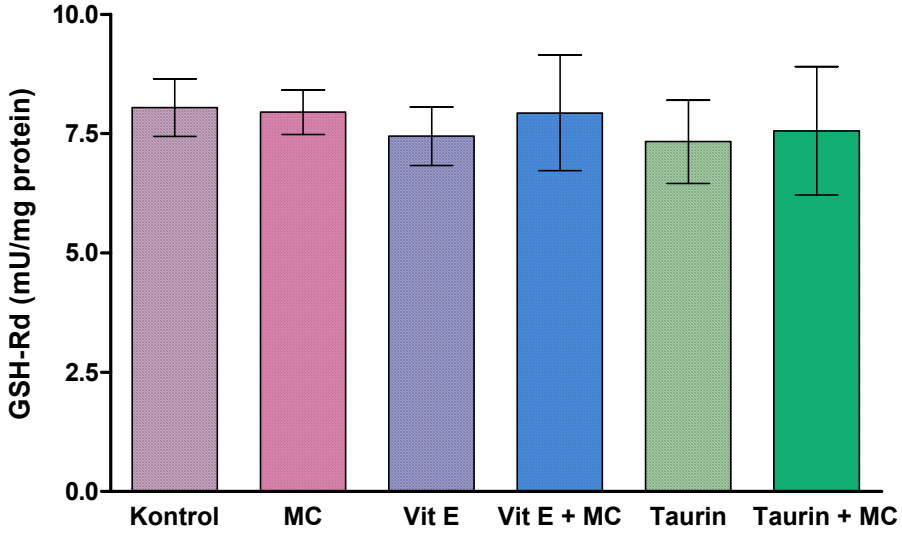
Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Rd aktivitelerinde, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla GSH-Rd aktivitelerinde önemli ölçüde değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.41 ve Şekil 4.42).

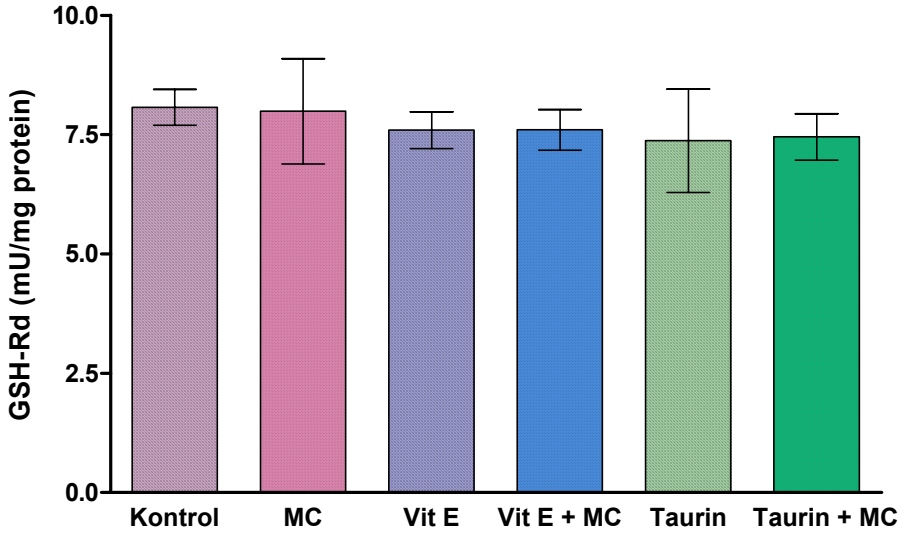
Tablo 4.17-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	8,05±0,6	7,95±0,47	7,45±0,61	7,93±1,21	7,33±0,87	7,56±1,35
Böbrek	8,07±0,38	7,99±1,11	7,59±0,39	7,60±0,43	7,37±1,08	7,46±0,49

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.41-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)



Şekil 4.42-Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)

4.7.3.Tekrarlanan Doz (5 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Rd Aktiviteleri

3.4.2.4-3.4.2.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 5 günlük tekrarlanan doz (10 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Rd aktiviteleri Tablo 4.18'de gösterilmiştir.

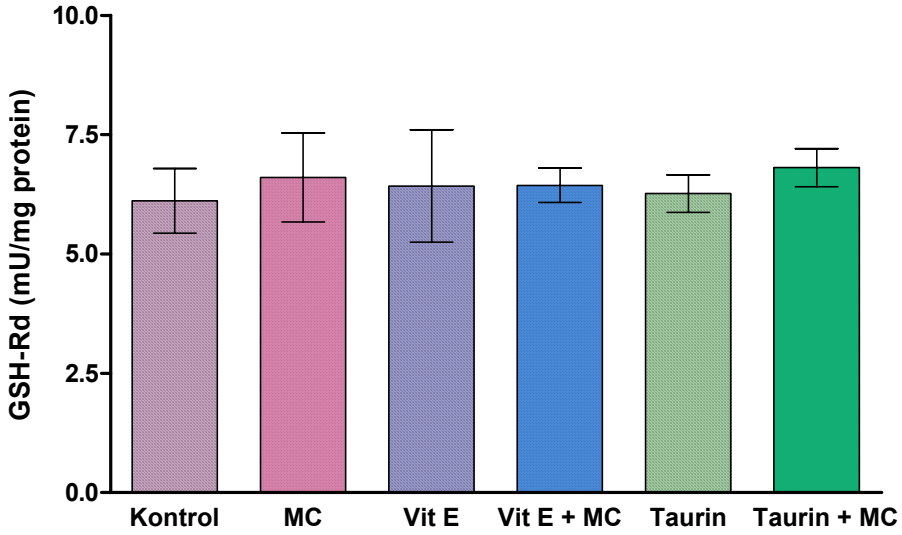
5 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Rd aktivitelerinde, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla GSH-Rd aktivitelerinde önemli ölçüde ($p<0,05$) değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44).

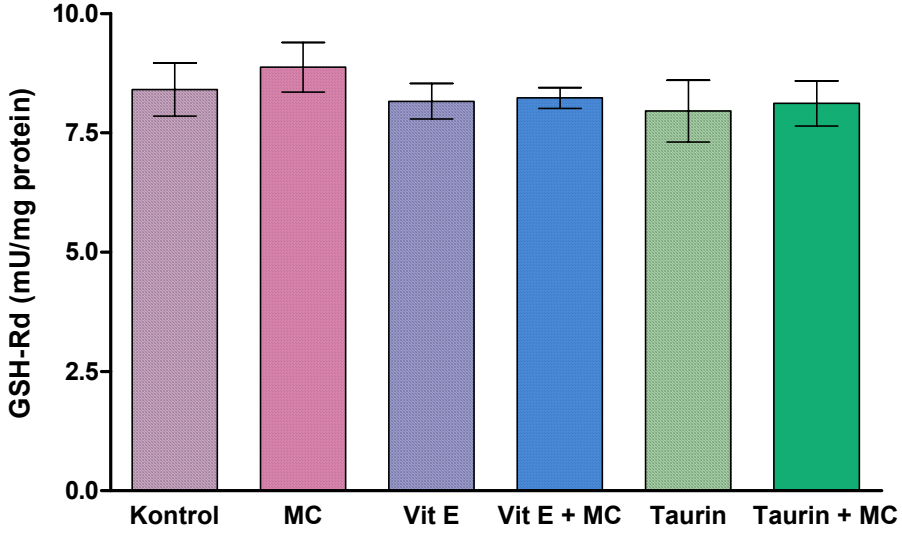
Tablo 4.18-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	6,11±0,68	6,60±0,93	6,42±1,2	6,44±0,36	6,27±0,39	6,81±0,40
Böbrek	8,41±0,56	8,88±0,52	8,16±0,37	8,23±0,22	7,96±0,65	8,11±0,47

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.43-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)



Şekil 4.44-Tekrarlanan doz (5 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)

4.7.4.Tekrarlanan Doz (28 gün) Methiocarb Uygulanan Sıçanlarda Ölçülen GSH-Rd Aktiviteleri

3.4.2.7-3.4.2.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan 28 günlük tekrarlanan doz (2 mg/kg) uygulamasının ardından ölçülen GSH-Rd aktiviteleri Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

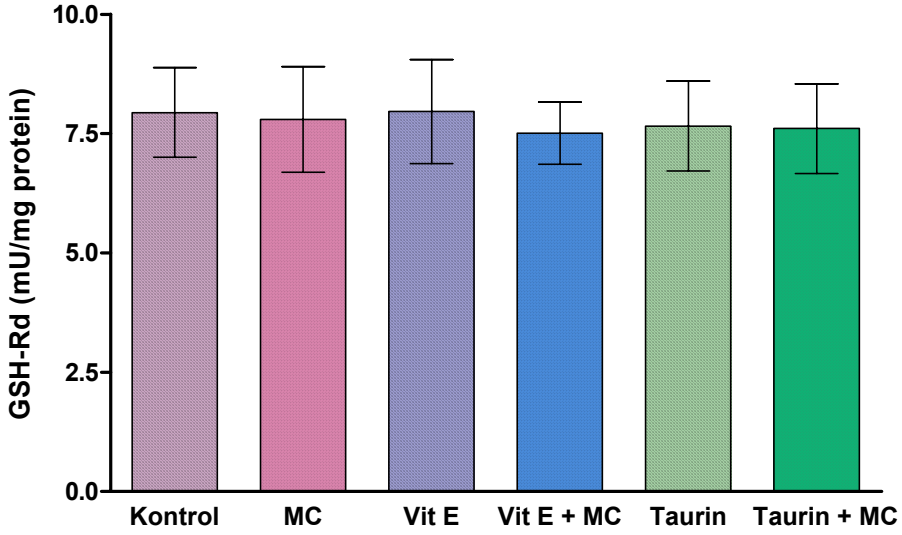
28 günlük tekrarlanan doz methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Rd aktivitelerinde, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Sıçanlara E vitamini ve taurin uygulaması, gerek karaciğerde gerekse böbrekte methiocarb grubuna kıyasla GSH-Rd aktivitelerinde önemli ölçüde ($p<0,05$) değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46).

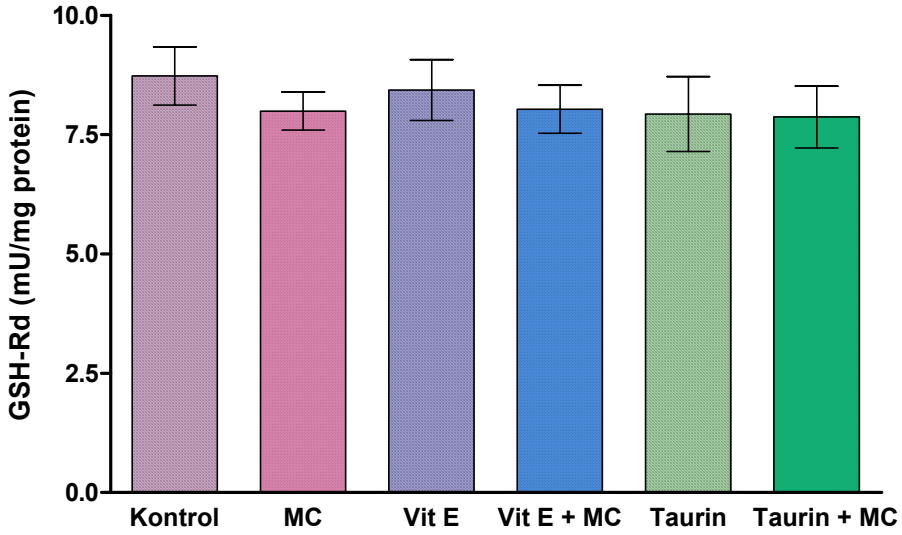
Tablo 4.19-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein) *

Doku	Kontrol (n=10)	Methiocarb (n=10)	E Vitamini (n=6)	E Vitamini + Methiocarb (n=8)	Taurin (n=6)	Taurin + Methiocarb (n=8)
Karaciğer	7,94±0,94	7,80±1,10	7,97±1,09	7,51±0,65	7,66±0,94	7,60±0,94
Böbrek	8,73±0,61	7,99±0,40	8,43±0,64	8,03±0,50	7,93±0,79	7,87±0,65

* Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.45-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)



Şekil 4.46-Tekrarlanan doz (28 gün) methiocarb uygulanan sıçanlarda böbrek GSH-Rd aktiviteleri (mU/mg protein)

5. TARTIŞMA

Normal metabolizma koşullarında reaktif oksijen türlerinin ve diğer serbest radikallerin sürekli oluşması normal fizyolojik fonksiyonlar ve hücresel redoks olayları için önemlidir. Oluşan radikaller vücuttaki antioksidan savunma sistemleri tarafından uzaklaştırılır. Organizmada serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Çeşitli endojen ve eksojen faktörlerin etkisi ile serbest radikallerin aşırı düzeyde oluşması ve antioksidan savunmanın yetersiz kalması vücutta oksidatif hasara yol açar; nükleik asidler, proteinler ve çoklu doymamış yağ asidleri ile etkileşim sonucu hücrenin yapısı ve fonksiyonları zarar görür. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların en önemli mekanizmalarından biri, hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asidleri ile etkileşim sonucu başlayan lipid peroksidasyonudur. Membranlarda ve lipoproteinlerde bulunan çoklu doymamış yağ asidleri radikal saldırılarına son derece açık moleküllerdir. Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türleri oluşumunun ana kaynakları ksenobiyotikler ve ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Birçok maddenin serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Örneğin paraquat ve diquat hücrelerde süperoksid radikali ve hidrojen peroksid oluşumuna yol açmaktadır. Asetaminofenin biyoaktivasyon ürünü moleküler oksijeni süperoksid radikaline indirger. Kinon yapısında maddelerin (adriyamisin ve aflatoksin B_1) moleküler oksijene bir elektron taşıma kapasiteleri vardır ve süperoksid oluşumu ile sonlanır. Ksenobiyotikler içerisinde önemli bir grubu oluşturan pestisidlerin neden olduğu toksik etkilerin ortaya çıkmasında da serbest radikal oluşumunun önemli rol oynadığı çeşitli araştırmaların sonucunda ortaya çıkarılmıştır (301-320).

Pestisidler içerisinde toksisiteleri yönünden en fazla araştırılan madde grubu organofosfatlardır. Organofosfatlar tarafından indüklenen toksikolojik olayların artan reaktif oksijen türleri ve antioksidan dengenin bozulması ile ilişkili olduğu birçok çalışma sonucunda ortaya konmuştur. 1/4 LD_{50} tek dozda, i.g., chlorpyrifos-ethyl uygulanan sıçanlarda yapılan çalışmada, eritrositte ve böbrek

dokusunda MDA düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı, eritrositlerde SOD ve CAT aktiviteleri değişmezken GSH-Px aktivitesinde önemli ölçüde azalma olduğu ve böbreklerde ise GSH-Px aktivitesi değişmezken SOD ve CAT aktivitelerinde önemli ölçüde azalma olduğu belirtilmiştir (322-323). Chlorpyrifos-ethyl ile yapılan diğer bir çalışmada 8 hafta boyunca 13,5 mg/kg dozda madde uygulanan sıçanlarda, karaciğer dokusunda MDA düzeyi ve SOD, GSH-Px, GSH-Rd aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve aksine GSH düzeyi, CAT ve GST aktivitelerinin ise önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (324). Bir başka organofosfosforlu insektisid olan methidathion ile yapılan tek doz ve tekrarlanan doz çalışmalarda da, eritrositlerde ve kalp dokusunda MDA düzeyi, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmış, eritrositlerde SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ise kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (325-326). Çeşitli in vivo çalışmalarda oksidatif stresi ve buna bağlı olarak da MDA oluşumunu indüklediği bildirilen diğer pestisidler endosulfan (301, 302), heksaklorobenzen (311), lindan (312), paraquat (318), quinalphos (308), dimethoate (327, 306, 303-304), malathion (305-306), benomyl (319), permethrin (327), cypermethrin (315, 316) ve fenvalerate (317)'dir.

N-metilkarbamat grubu pestisidler çeşitli alanlarda organofosfatlara alternatif olarak çok yoğun bir şekilde kullanılan maddelerdir. Kolay parçalanmaları nedeniyle tercih edilen bu maddelerin yaygın kullanımları maruziyet risklerini de arttırmaktadır. Asetilkolinesteraz enziminin reversibl inhibitörleri olan bu maddelerin toksik etkileri ile oksidatif hasar ilişkisinin araştırılmasına yönelik literatürde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu grup içerisinde akut toksisitesi yüksek bir madde olan carbofuranın nörotoksik etkisinde, beyindeki oksidatif stresin rolü olduğu sıçanlarda yapılan tek doz çalışma sonucu görülmüştür (320). Üç farklı dozda subakut, subkronik ve kronik aldicarb uygulanan farelerde eritrosit SOD düzeylerinde her üç denemede, GSH-Px düzeylerinde ise sadece subkronik ve kronik denemelerde anlamlı düşüş gözlenmiştir. CAT aktivitesinde ise her üç denemede de anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık plazma MDA aktivitesi her üç denemede yüksek düzeyde bulunmuştur (328). Oksidatif hasara en yatkın hücrelerden olan eritrositler aynı zamanda birçok koruyucu sistem ile

donanmıştır. Bu nedenle gerek in vivo gerekse in vitro çalışmalarda tercih edilmektedir. Sıçanlara 30 gün boyunca üç ayrı dozda (1/2; 1/6 ve 1/20 LD_{50}) propoxur uygulanmasının ardından serumda MDA, eritrositlerde de antioksidan enzimler ve GSH düzeylerine bakılmıştır. Çalışılan tüm dozlarda MDA, SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Rd ve GST aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla doza bağlı anlamlı artışlar gözlenmiş, GSH düzeyi ise azalmıştır (329). Gelişmekte olan ülkelerde pestiside bağlı zehirlenmelere ve ölümlere sıkça rastlanmaktadır. Zehirlenme olaylarından elde edilen verilerin toksik etki mekanizmalarının açıklanmasında önemi büyüktür. Propoxur zehirlenmesinin ardından asetilkolinesteraz inhibisyonu belirtileri ile hastaneye başvuran hastaların serum MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğu ve bu düzeyin serum propoxur düzeyi ile orantılı olduğu görülmüştür. Kan glutatyon düzeyi ise MDA'nın aksine propoxur düzeyi ile orantılı olarak anlamlı ölçüde düşmüştür. Buna karşılık antioksidan enzimlerin tümünün aktiviteleri artmıştır (330).

Bu sonuçlardan hareketle N-metilkarbamat grubu pestisidler içerisinde toksisitesi yönünden en az araştırılan bir madde olan methiocarbın, oksidatif stres oluşturma potansiyeli yönünden araştırılması uygun görüldü. Literatür taramalarında methiocarbın sinir sistemine olan etkisi dışında belirgin başka bir toksik etkisi ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır. Yaptığımız in vivo çalışmada; tek doz, 5 gün ve 28 günlük denemeler için seçilen uygulama dozları sırasıyla 1/4 LD_{50}, 1/10 LD_{50} ve 1/50 LD_{50}'dir. Her bir deneme üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde methiocarb tarafından oluşturulan oksidatif hasarın derecesi; ikinci bölümde maddenin antioksidan enzimler (SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-Rd) ve glutatyon sistemi üzerine etkisi incelenmiştir. Üçüncü bölümde ise; taurinin, diğer iki bölümde ölçülen parametreler üzerine etkisi standart bir antioksidan olan E vitamini ile kıyaslanmak suretiyle araştırılmıştır.

Oksidatif hasara neden olan en önemli mekanizmalardan bir tanesi lipid peroksidasyonudur. Bu nedenle lipid peroksidasyonun ölçülmesi hücresel yıkımın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmada methiocarbın neden olduğu oksidatif hasarın derecesi, bu parametrenin ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bu amaçla seçilen yöntem, lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü olan MDA

miktarının ölçülmesine dayanan yöntemdir. MDA miktarının tayininde, birçok araştırıcının en fazla tercih ettiği ve bazı modifikasyonlarla uyguladığı TBA testi kullanılmıştır. Testte TBA-MDA kompleksinin spektrofotometrik ölçümü yanında, TBA'in MDA dışında başka bileşiklerle de reaksiyon vermesi nedeniyle, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile de ayırım ve tayin yapılarak sonuçlar doğrulanmıştır.

1/4 LD_{50}; 1/10 LD_{50} ve 1/50 LD_{50} dozlarında methiocarb uygulanan sıçanlarda gerek karaciğer gerekse böbrek dokularında MDA düzeyleri kontrol grubu değerlerinden önemli ölçüde yüksektir. Bu durum methiocarbın karaciğerde ve böbrekte serbest oksijen radikalleri ile diğer radikallerin oluşmasına neden olduğunu göstermektedir. Karaciğerde MDA düzeyindeki artış, yüksek doz (1/4 LD_{50}) uygulamasında kontrolden yaklaşık 2.2 kat daha yüksektir. Bu farkın maddenin ilk geçiş etkisinden ileri geldiği düşünülebilir. Böbrekte, her üç denemede MDA düzeyi aynı oranda artmaktadır. Böbreklerde MDA düzeyinin yüksek bulunması bu organlarda ekstrahepatik bir biyoaktivasyonun gerçekleştiğini akla getirmektedir.

Bilindiği gibi araşidonik asidden prostaglandinlerin sentezi sırasında, PGG_2 nin hidroperoksi grubunun prostaglandin sentetazın hidroperoksidaz aktivitesi ile ilgili alkolü PGG_2 ye redüklenmesi esnasında kimyasal yapıları farklı ksenobiyotikler de ko-oksidasyona uğramaktadır. Aromatik sülfid yapısında maddelerin de hidroperoksidazlar tarafından ko-oksidasyonla sülfoksidlerine okside oldukları belirtilmektedir. Böbrekler ve ince barsak ko-oksidasyonun gerçekleştiği organlardır. Böbreklerde methiocarbın ko-oksidasyona uğraması sonucu oluşan radikallerin bu dokudaki MDA düzeyini artırdığı düşünülebilir. Nitekim Blee ve Durs (293), çalışmalarında aromatik-alkil sülfid yapısındaki methiocarbın sülfoksidasyonunun NADPH gibi kofaktörlere bağımlı olmayıp hidroperoksid bağımlı olduğunu ve sülfoksid oluşturan oksijenin hidroperoksid orijinli olduğunu ileri sürmektedirler. Bu sonuç P-450 ve FMO'ların bu oksidasyonda rolü olmadığını göstermektedir. Benzer bir ekstrahepatik aktivasyonun, aldicarbın toksisitesinde de etkili olduğu belirtilmektedir (288).

Methiocarb ile ilgili ileri sürülen diğer bir biyoaktivasyon yolağı ise lipoksijenazların aktivitesiyle gerçekleşen S-demetilasyon, bunun sonucu oluşan kükürt merkezli bir katyon radikali ve sonrasında glutatyon ile konjugasyondur. (331-332). Bu durumda ise meydana gelen katyon radikalinin lipid peroksidasyonunu indüleyerek MDA artışına neden olduğu düşünülebilir.

Hücrelerde DNA'yı, hücre zarındaki lipoproteinleri ve enzimleri reaktif oksijen türlerine ve diğer elektrofilik bileşiklere karşı koruyan mekanizmaların başında GSH gelmektedir. Genel olarak artan lipid peroksidasyonu ile GSH düzeyi arasında ters bir orantının varlığı söz konusudur. Yaptığımız çalışmada tek doz methiocarb uygulanan sıçanlar dışındaki diğer sıçanların karaciğer ve böbrek dokularındaki lipid peroksidasyonunun GSH'u tükettiği anlaşılmaktadır. Tek doz methiocarb uygulanan sıçanlarda her iki dokuda da görülen anlamlı artışın nedeni tam olarak anlaşılamamaktadır. Bu artışın nedeninin, ortamda oluşan H_2O_2 in yıkımını sağlayan GSH-Px enzimine GSH sağlamak olduğu düşünülebilir. Benzer bir bulguya Sharma ve arkadaşlarının çalışmasında rastlanmaktadır. 6, 30 mg/kg dozlarda 30 gün boyunca dimethoate uygulanan sıçanlarda, karaciğer ve beyinde MDA ve GSH düzeyleri ile antioksidan enzim aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artış görülmektedir (304).

Reaktif oksijen türlerine ve diğer radikallere karşı savunmada antioksidan enzimlerin rolü önemlidir. Methiocarb, karaciğer ve böbrekte tek dozda SOD, CAT enzim aktivitelerini arttırırken, 5 ve 28 günlük tekrarlanan dozlarda azaltmaktadır. GSH-Px aktivitesi ise tek doz ve 5 günlük dozlarda artarken, 28 günlük tekrarlanan dozda anlamlı ölçüde azalmaktadır. GSH-Rd aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. Tek dozda GSH-Rd dışındaki diğer enzimlerde görülen anlamlı artışın, methiocarbın antioksidan enzimleri indüklemesi sonucu meydana geldiği düşünülebilir. 5 ve 28 günlük tekrarlanan dozlarda methiocarb muhtemelen CAT aktivitesini inhibe etmekte, bunun sonucunda artan hidrojen peroksidin de SOD'u inhibe etmesi sonucunda süperoksid radikalleri artmaktadır. Artan süperoksid radikalleri tekrar CAT ve GSH-Px'i inhibe etmektedir. Her üç dozda karaciğer ve böbrek GSH-Rd aktivitelerinde anlamlı bir farklılık görülmemesinin GSSG/GSH dengesinde önemli bir değişiklik olmamasının bir sonucu olduğu düşünülebilir.

Çeşitli pestisidlerin neden olduğu oksidatif hasarlarda MDA düzeyleri ile antioksidan enzimlerin aktiviteleri arasında bir korelasyon görülmemektedir (312-317). Bunun, oksidatif hasara neden olan mekanizmalardaki farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir.

Organizma, serbest radikallerin meydana getirdiği hasarlardan kendisini doğal antioksidan savunma sistemleri ile korumaktadır. Tedavide yeni yaklaşımlar bu sistemlerin dışarıdan verilecek antioksidanlarla desteklenmesinin çok daha etkili olduğu yolundadır. Bu görüşten hareketle oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren özellikte yeni maddelerin arayışı son yılların en ilgi gören çalışma alanlarındandır (333-334). Bu çalışmalarda antioksidan özelliği dolayısıyla ön plana çıkan maddelerden biri de taurindir. Mekanizması henüz tam olarak açıklanmasa da, taurinin serbest radikalleri süpürücü direkt etkisi yanında, Fe^{2+} iyonları ile kelat oluşturarak serbest radikal oluşturan reaksiyonları inhibe etme, hücre membranının stabilizasyonu ve hücresel kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi endirekt etkileri olduğu bildirilmektedir (244-248, 264, 268-272). Çalışmamızda taurinin, methiocarb tarafından oluşturulan oksidatif hasarı ne ölçüde önleyebileceği güçlü bir antioksidan olan E vitamini ile kıyaslanmak suretiyle araştırılmıştır. Tek doz ve tekrarlanan doz denemelerinin tümünde taurinin MDA ve GSH düzeyleri ile antioksidan enzim aktivitelerini E vitaminine yakın kapasitede kontrol düzeyine getirmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, methiocarbın, lipid peroksidasyonuna neden olduğunu, glutatyon düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerini değiştirerek oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir. Methiocarbın olası bioaktivasyon ürünlerinin bu indüksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Bulgularımızın methiocarbın toksisitesinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalara katkısı olacaktır. Diğer taraftan endojen bir madde olan taurinin antioksidan etkisi ile ilgili bulgular, devam eden çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Sies H, editor. Oxidative Stress: Introductury Remarks In Oxidative Stress. London: Academic Press;1985. pp.1-8.
2. Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am J Med 1991; **91:** 31-38.
3. Sies H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Exp Phys 1997; **82:** 291-295.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford, 1999.
5. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. C R Biologies 2004; **327:** 649-662.
6. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Annu Rev Physiol 1986; **48:** 657-667.
7. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med 1987; **107:** 526-545.
8. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene 1999; **18:** 7719-7730.
9. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta 2001; **306:** 1-17.
10. Şenses SV, Özyazgan S, Akkan AG. Serbest oksijen radikalleri-I: Vücuttaki Antioksidan Sistemler. Türk Aile Hek. Derg 1999; **3:** 5-11.
11. Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. Nutr Rev 1994; **52:** 253-265.
12. Buechter DD. Free radicals and oxygen toxicity. Pharm Res 1988; **5:** 253-260.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. Am J Med 1991; **91:** 14-22.

14. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 1984; **219:** 1-14.
15. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. S.Ü. Tıp Fakültesi, 1995.
16. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 1986; **246:** 501-514.
17. Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. FEBS Lett 1977; **80:** 130-132.
18. McCord JM, Day ED. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett 1978; **86:**139-142.
19. Willson RL. Slater TF, editor. Biochemical mechanisms of liver injury London: Academic Press; 1978. pp. 123-224.
20. Fridovich I. Superoxide dismutases. Adv Enzymol 1974; **14:** 36-97.
21. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; **201:** 875-880.
22. McCord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. Ann Intern Med 1978; **89:**122-127.
23. McCord JM. Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science 1974; **185:** 529-531.
24. Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO_2/O_2 with unsaturated fatty acids. J Biol Chem 1983; **258:** 4759-4761.
25. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem 1989; **264:** 7761-7764.
26. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. Toxicol Lett 1995; **82-83:** 969-974.
27. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. Febs Lett 2000; **486:** 10-13.
28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Method Enzymol 1990; **186:** 1-85.
29. Freeman BA, Crapo JD. Biology of Disease, free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; **47:** 412-426.

30. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 1993; **23:** 21-48.
31. Egan RW, Paxton J, Kuehl FA. Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. J Biol Chem 1976; **251:**7329-7335.
32. Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest 1982; **47:** 5-18.
33. Goeptar AR. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. Crit Rev Toxicol 1995; **25:** 25-65.
34. Balagopalakrishna C. Production of $O_2^{\cdot -}$ from hemoglobin-bound O_2 under hypoxic conditions. Biochemistry-US 1996; **35:** 6393-6398.
35. Brantley RE. The mechanism of autoxidation of myoglobin. J Biol Chem 1993; **268:** 6995-7010.
36. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep 1997; **17:** 3-8.
37. Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. Biochem Biophys Res Commun 1992; **189:** 979-985.
38. Shigenaga MK. Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. Proc Natl Acad Sci 1994; **91:** 10771-10778.
39. Imlay JA. A metabolic enzyme that rapidly produces $O_2^{\cdot -}$, fumarate reductase of E. Coli. J Biol Chem 1995; **270:** 19767-19777.
40. Masters C, Holmes R. Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. Physiol Rev 1977; **57:** 816-882.
41. Noshiro M, Narada N, Omura T. Immunochemical study on the route of electron transfer from NADH and NADPH to cytochrome P450 of liver microsomes. J Biochem 1980; **88:** 1521-1535.
42. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Methods Enzymol 1990; **280:** 1-85.
43. Kappus H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. Chem Phys Lipids 1987; **45:** 105-115.

44. Marks DB, Marks AD, Smith CM, Oxygen metabolism and toxicity, Basic Medical biochemistry: A Clinical Approach, Williams & Wilkins Yüksek Lisans tezi
45. Mohammad A, Akram R, Shahin S, Shekoufeh N, Ali R. Pesticides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit 2004; **10:** 141-147.
46. Gate L, Paul J, Ba Nguyen G, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed Pharmacother 1999; **53:** 169-180.
47. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int 1999; **49:** 91-102.
48. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002; **30:** 620-650.
49. Oxidative Stress/ DNA Damage and DNA Repair, Erişim 21.01.2006. http://www.cstl.nist.gov/div831/DNATechologies/DNA_Damage_Repair.htm
50. 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 U S A 1990; **87:** 4533-4537.
51. Domigan NM, Charlton MW, Duncan CC, Winterbourn CC, Kettle AJ. Chlorination of tyrosil residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. J Biol Chem 1995; **270:** 16542-16548.
52. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992; **257:** 1220-1224.
53. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic Biol Med 1996; **20:** 707-727.
54. Thornalley PJ. Monosaccharide Autoxidation in health and disease. Environ Health Persp 1985; **64:** 297-309.
55. Bohnstedt KC. Determination of Biomarkers for Lipid Peroxidation and oxidative stres: Development of analytical techniques and methods. Stockholm:Doctoral thesis; 2005
56. Kappus HA. Survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. Chem Phys Lipids 1987; **45:** 105-115.

57. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. Chem Phys Lipids 1987; **45:** 251-268.
58. Vaca CE. On Lipid Peroxidation Processes in Biological Membranes, and Their Significance in Oxidative Cellular Damage, Department of Radiobiology, Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, University of Stockholm, Stockholm, 1988.
59. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990; **15:** 129-135.
60. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993; **57:** 715-724; discussion 724-725.
61. Sodergren E. Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and Application of Methods for Measurements. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2000.
62. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; **41:** 1819-1828.
63. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interactions of lipid peroxidation products with DNA. A review. Mutat Res 1987; **195:** 137-149.
64. Halliwell B. Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol 1990; **186:** 1-85.
65. Moore K, Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. Free Rad Res 1998; **28:** 659-671.
66. De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 1999; **26:** 202-226.
67. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Method Enzymol 1990; **186:** 407-421.
68. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 1990; **9:** 515-540.
69. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Brit J Haematol 1971; **20:** 95-111.
70. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid peroxidation. Method Enzymol 1976; **52:** 302-310.

71. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; **95:** 351-358.
72. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Method Enzymol 1984; **105:** 328-331.
73. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Method Enzymol 1990; **186:** 421-431.
74. Bird RP, Hung SS, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. Anal Biochem 1983; **128:** 240-244.
75. Csallany AS, Der Guan M, Manwaring JD, Addis PB. Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1984; **142:** 277-283.
76. Gilbert HS, Stump DD, Roth EF. A method to correct for errors caused by generation of interfering compounds during erythrocyte lipid peroxidation. Anal Biochem 1984; **137:** 282-286.
77. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. Clin Chem 1987; **33:** 214-220.
78. Largilliere C, Melancon SB. Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1988; **170:** 123-126.
79. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med 1993; **15:** 353-363.
80. Guichardant M, Valette-Talbi L, Cavadini C, Crozier G, Berger M. Malondialdehyde measurement in urine. J Chromatogr B Biomed Appl 1994; **655:** 112-116.
81. Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. Method Enzymol 1994; **233:** 314-318.

82. Wilson DW, Metz HN, Graver LM, Rao PS. Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. Clin Chem 1997; **43:** 1982-1984.
83. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. Clin Chem 2001; **47:** 1725-1727.
84. Soares ME, Carvalho M, Remiao F, Carvalho F, Bastos ML. Implementation of HPLC Methodology for the quantification of malondialdehyde in cell suspensions and liver. J Liq Chromatogr R T 2004; **27:** 2357-2369.
85. Glod BK, Kowalski C. Analysis of malondialdehyde using ion exclusion chromatography. J Liq Chromatogr R T 2004; **27:** 2733-2742.
86. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Ann Clin Biochem 1991; **28:** 504-508.
87. Fukunaga K, Suzuki T, Takama K. Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. J of Chrom 1993; **621:** 77-81.
88. Yang CS, Tsai PJ, Wu JP, Lin NN, Chou ST, Kuo JS. Evaluation of extracellular lipid peroxidation in brain cortex of anesthetized rats by microdialysis perfusion and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; **693:** 257-263.
89. Suttnar J, Cermak J, Dyr JE. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. Anal Biochem 1997; **249:** 20-23.
90. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci; **775:** 121-126.
91. Volpi N, Tarugi P. Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. J Chromatogr B 1998; **713:** 433-437.

92. Larstad M, Ljungkvist G, Olin A-C, Toren K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; **766:** 107-114.
93. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1991; **197:** 277-283.
94. Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. Clin Chem 1992; **38:** 704-709.
95. Cordis GA, Maulik N, Bagchi D, Engelman RM, Das DK. Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1993; **632:** 97-103.
96. Cordis GA, Bagchi D, Maulik N, Das DK. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart.J Chromatogr A 1994; **661:** 181-191.
97. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance-liquid chromatography-based method. Clin Biochem 2000; **33:** 619-625.
98. Anoopkumar-Dukie S, Walker RB, Daya S. A sensitive and reliable method for the detection of lipid peroxidation in biological tissues. J Pharm Pharmacol 2001; **53:** 263-266.
99. Suttnar J, Masova L, Dyr JE. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; **751:** 193-197.
100. Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 2002; **311:** 76-79.

101. Marcıncak S, Sokol J, Turek P, Rozanska H, Dicakova Z, Mate D, Popelka P, Korim P. Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. Bull Vet Inst Pulawy 2003; **47:** 491-496.
102. Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003; **785:** 337-344.
103. Li K, Shang X, Chen Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. Clin Chim Acta 2004; **346:**199-203.
104. Kawai S, Kasashima K, Tomita M. High-performance liquid chromatographic determination of malonaldehyde in serum. J Chromatogr 1989; **495:** 235-238.
105. Tomita M, Okuyama T. Deteremination of malonaldehyde in oxidized biological materials by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1990; **515:** 391-397.
106. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. J Chromatogr 2000; **742:** 315-325.
107. Korchazhkina O, Exley C, Spencer SA. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. J Chromatogr B 2003; **794:** 353-362.
108. Mateos R, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative: a marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; **805:** 33-39.
109. Esterbauer H, Zollner H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation product. Free Radical Bio Med 1989; **7:** 197-203.
110. Shimasaki H. Assay of fluorescent lipid peroxidation product. Method Enzymol 1994; **233:** 338-370.

111. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Bio Med 1991; **11:** 81-128.
112. Lang J, Celotto C, Esterbauer H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1985; **150:** 369-378.
113. Des Rosiers C, Rivest MJ, Boily MJ, Jette M, Carrobe-Cohen A, Kumar A. Gas chromatographic-mass spectrometric assay of tissue malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, other aldehydes alter their reduction to stable alcohols. Anal Biochem 1993; **208:** 161-170.
114. Uchida K, Stadtman ER. Quantitation of 4-hydroxynonenal protein adducts. Method Enzymol 1994; **233:** 371-380.
115. Van Kuijk FJGM, Siakotos AN, Fong LG, Stephens RJ, Thomas DW. Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low density lipoprotein by gas chromatography-mass spectrometry. Anal Biochem 1995; **224:** 420-424.
116. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci USA 1996; **93:**2696-2701.
117. Volkel W, Alvarez-Sanchez R, Weick I, Mally A, Dekant W, Pahler A. Glutathione conjugates of 4-hydroxy-2(E)-nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats. Free Radical Bio Med 2005; **38:**1526-1536.
118. Daugherty MS, Ludden TM, Burk RF. Metabolism of ethane and oenthane to carbon dioxide by the rat. Drug Metab Dispos 1988; **16:** 666-671.
119. Marshall PJ, Warso MA, Lands WE. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. Anal Biochem 1985; **145:** 192-199.
120. Yamamoto Y, Brodsky H, Baker JC, Ames BN. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1987; **160:** 7-13.
121. Gebicki JM, Guille J. Spectrophotometric high-performance chromatographic assays of hydroperoxides by the iodometric tecnique. Anal Biochem 1989; **176:** 360-364.

122. El-Saadani M, Esterbauer H, el-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. J Lipid Res 1989; **30:** 627-630.
123. Miyazawa T. Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. Free Radical Bio Med 1989; **7:** 209-217.
124. Cramer GL, Miller JF, Junior JR, Pendleton RB, Lands WEM. Iodometric measurement of lipid hydroperoxides in human plasma. Anal Biochem 1991; **193:** 204-211.
125. Yamamoto Y. Chemiluminescence-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. Method Enzymol 1994; **233:** 319-323.
126. Mawatari S, Murakami K. Analysis of membrane phospholipid peroxidation by isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Anal Biochem 1998; **264:** 118-123.
127. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. Method Enzymol 1994; **233:** 182-288.
128. Nourooz-zadeh J, Tajaddini-sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Anal Biochem 1994; **220:** 403-409.
129. Sodergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L, Vessby B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. J Biochem Biophys Methods 1998; **37:** 137-146.
130. Mawatari S, Murakami K. Effects of ascorbic acid on peroxidation of human erythrocyte membranes by lipoxygenase. J Nutr Sci Vitaminol 1999; **45:** 687-699.
131. Corongiu FP, Banni S. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophtometry. Method Enzymol 1994; **233:** 303-313.

132. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 1990; **87:** 9383-9387.
133. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ 2nd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. Proc Natl Acad Sci USA 1992; **89:**10721-10725.
134. Waugh RJ, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Murphy RC. Identification and relative quantitation of F2-isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. Free Radical Bio Med 1997; **23:** 943-954.
135. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA, Roberts LJ 2nd. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. J Biol Chem 1994; **269:** 4317-4326.
136. Roberts LJ 2nd, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. Biochim Biophys Acta 1997; **1345:** 121-135.
137. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. J Biomed Sci 1999; **6:** 226-235.
138. Yin H, Havrilla CM, Gao L, Morrow JD, Porter NA. Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid. "Dioxetane" intermediate versus beta-fragmentation of peroxyl radicals. J Biol Chem 2003; **278:**16720-16725.
139. Roberts LJ 2nd, Fessel JP, Davies SS. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. Brain Pathol 2005; **15:** 143-148.
140. Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F2 alpha. J Biol Chem 1995; **270:** 9800-9808.
141. Roberts LJ 2nd, Moore KP, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2alpha in humans. J Biol Chem 1996; **271:** 20617-20620.

142. Morrow JD, Scruggs J, Chen Y, Zackert WE, Roberts LJ 2nd. Evidence that the E2-isoprostane, 15-E2t-isoprostane (8-iso-prostaglandin E2) is formed in vivo. J Lipid Res 1998; **39:**1589-1593.
143. Lynch SM, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B. Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. J Clin Invest 1994; **93:** 998-1004.
144. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. FEBS Lett 1995; **368:** 225-229.
145. Hill DB, Awad JA. Increased urinary F2-isoprostane excretion in alcoholic liver disease. Free Radical Bio Med 1999; **26:** 656-660.
146. Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular biology of the isoprostanes. J Vasc Res 2001; **38:** 93-103.
147. Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Takano H, Katsuki T, Ikeda U, Shimada K. Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. Heart 2003; **89:** 871-874.
148. Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ 2nd, Burk RF. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. J Clin Invest 1992; **90:** 2502-2507.
149. Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ 2nd.Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. J Biol Chem 1993; **268:** 4161-4169.
150. Nourooz-zadeh J, Gopaul NK, Barrow S, Mallet AI, Anggard EE. Analysis of F2- isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas chromatography-mass spectrometric development of a solid-phase extraction procedure. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; **667:** 199-208.
151. Bagchi A, Zuccato E, Baraldi M, Fanelli R, Chiabrando C. Measurement of urinary 8-epi-prostaglandin $F^{2\alpha}$, a novel index of lipid peroxidation in vivo, by immuno affinity extraction / gas chromatography-mass spectrometry.

Basal levels in smokers and nonsmokers. Free Radical Bio Med 1996; **20:** 619-624.

152. Hoffman SW, Roof RL, Stein DG. A reliable and sensitive enzim immunoassay method for measuring 8-isoprostaglandin F2 alpha: A marker for lipid peroxidation after experimental brain injury. J Neurosci Methods 1996; **68:** 133-136.
153. Liu TZ, Stern A, Morrow JD. The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. J Biomed Sci 1998; **5:** 415-420.
154. Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. J Biol Chem 1999; **274:** 24441-24444.
155. Sodergren E, Cederberg J, Basu S, Vessby B. Vitamin E supplementation decreases basal levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in rats. J Nutr 2000; **130:** 10-14.
156. Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F_2-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues. Prostag, Leukotr Ess 2000; **63:** 149-152.
157. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radical Bioo Med 2000; **28:** 505-513.
158. Tong V, Teng XW, Karagiozov S, Chang TK, Abbott FS. Valproic acid glucuronidation is associated with increases in 15-F2t-isoprostane in rats. Free Radical Bio Med 2005; **38:** 1471-1483.
159. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 1996; **16:** 33-50.
160. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci 2000; **899:** 136-147.
161. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000; **153:** 83-104.
162. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003; **189:** 41-54.
163. Halliwell B. Antioxidants and human disease: A general introduction. Nutr Rev 1997; **55:** 44-49.

164. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Ann Botany 2003; **91:** 179-194.
165. Aydın A, Sayal A, Işımer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı, 2001.
166. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erithrocuprein (hemocuprein). The J Biol Chem 1969; **244:** 6049-6055.
167. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 1995; **64:** 97-112.
168. Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. Lab Invest 1986; **55:** 363-371.
169. Heikkila RE, Cabbat FS, Cohen G. In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. J Biol Chem 1976; **251:** 2182-2185.
170. Yost FJ, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from Escherichia coli. J Biol Chem 1973; **248:** 4905-4908.
171. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 1971; **44:** 276-287.
172. Aust SD, Roerig DL, Pederson TC. Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. Biochem Biophys Res Commun 1972; **47:**1133-1137.
173. DeChatelet LR, McCall CE, McPhail LC, Johnston RB Jr. Superoxide dismutase activity in leukocytes. J Clin Invest 1974; **53:** 1197-1201.
174. Peeters-Joris C, Vandevoorde AM, Baudhuin P. Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver. Biochem J 1975; **150:** 31-39.
175. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. Arch Biochem Biophys 1978; **186:** 189-195.
176. Geller BL, Winge DR. Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes. J Biol Chem 1982; **257:** 8945-8952.
177. Kuthan H, Haussmann HJ, Werringloer J. A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. Biochem J 1986; **237:** 175-180.

178. Sun Y, Oberley LW, Ying L, A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; **34:** 497-500.
179. Sun Y, Peterson TE, McCormick ML, Oberley LW, Osborne JW. Improved superoxide dismutase assay for clinical use. Clin Chem 1989; 35: 1265-1266.
180. Chen CN, Pan SM. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. Bot Bull Acad Sin 1996; **37:** 107-117.
181. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. Anal Biochem 1997; **251:** 206-209.
182. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972; **247:** 3170-3175.
183. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974; **47:** 469-474.
184. Henry LEA, Halliwell B, Hall DO. The superoxide disutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. FEBS Lett 1976; **66:** 303-306
185. Heikkila RE, Cabbat F. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. Anal Biochem 1976; **75:** 356-362.
186. Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase:"Positive spectrophotometric assays. Anal Biochem 1977; **79:** 553-560.
187. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. Anal Biochem 1978; **90:** 81-89.
188. Marklund S. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1976; **251:** 7504-7507.

189. Bolann BJ, Ulvik RJ. Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of superoxide dismutase activity. Clin Chem 1991; **37:** 1993-1999.
190. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J Biol Chem 2001; **276:** 38388-38393.
191. Reid TJ, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossman MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 A resolution. Proc Natl Acad Sci 1981; **78:** 4767-4771.
192. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; **59:** 527-605.
193. Aebi H. Catalase in vitro. Method Enzymol 1984; **105:** 121-126.
194. Lardinnois OM. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. Free Radic Res 1995; **22:** 251-274.
195. Sinha AK. Colorimetric assay of catalase. Anal Biochem 1972; **47:** 389-394.
196. Austin L, Arthur H, de Niese M, Gurusinghe A, Baker MS. Micromethods in single muscle fibers. Determination of catalase and superoxide dismutase. Anal Biochem 1988; **174:** 568-574.
197. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Anal Biochem 1988; **174:** 331-336.
198. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. Anal Biochem 1990; **184:** 193-199.
199. Mills GC. Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem 1957; **229:** 189.
200. Mannervik B. Glutathione peroxidase. Method Enzymol 1985; **113:** 490-495.
201. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases.Method Enzymol 1995; **252:** 8-53.

202. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; **70:** 158 -169.
203. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Co 1976; **71:** 1 - 7.
204. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. Clin Chem 1982; **28:** 311 - 316.
205. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Method Enzymol 1984; **105:** 114 -121.
206. Racker E. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. J Biol Chem 1955; **217:** 855-865.
207. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J Biol Chem 1975; **250:** 5475 - 5480.
208. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Method Enzymol 1985; **113:** 484 - 490.
209. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. J Clin Invest 1969; **48:** 1957-1966.
210. Carlberg I, Mannervik B. Purification by affinity chromatography of yeast glutathione reductase, the enzyme responsible for the NADPH-dependent reduction of the mixed disulfide of coenzyme A and glutathione. Biochim Biophys Acta 1977; **484:** 268-274.
211. Munday R, Winterbourn CC. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. Biochem Pharmacol 1989; **38:** 4349-4352.
212. Ketterer B, Mulder GJ. Glutathione conjugation. Conjugation Reactions in Drug Metabolism. London: Taylor and Francis: 1990. pp. 308-364.
213. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. FASEB J 1999; **13:** 1169-1183.
214. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem Pharmacol 2002; **64:** 1019-1026.

215. Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. Glutathione depletion and oxidative stress. Parkinsonism Relat D 2002; **8:** 385-387.
216. Klaassen CD, Watkins JB. Casarett & Doull's. Essentials of Toxicology, USA; 2003.
217. Moldeus P, Jiang QG. Importance of the glutathione cycle in drug metabolism. Pharmacol Ther 1987; **33:** 37-40.
218. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; **25:** 192-205.
219. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem 1969; **27:** 502-522.
220. Beutler E. Red cell metabolism. A Manual of Bichemical Methods. 2nd ed. New York: Grune & Stratton: 1975. pp. 71-73.
221. Ellman G, Lysko H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. Anal Biochem 1979; **93:** 98 -102.
222. Ayers FC, Warner GL, Smith KL, Lawrence LA. Fluorometric quantitation of cellular and nonprotein thiols. Anal Biochem 1986; **154:** 186 -193.
223. DeMaster EG, Redfern B. High-performance liquid chromatography of hepatic thiols with electrochemical detection. Method Enzymol 1987; **143:** 110-114.
224. Debowska B, Samochocka K, Przasnyski M, Sybilska D. Simultaneous determination of thiols and corresponding disulphides in mixtures by high-performance liquid chromatography with polarographic detection using a Dual-Tast Analyser. J Chromatogr 1988; **455:** 336 - 343.
225. Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. Anal Biochem 1989; **179:** 236 - 241.
226. Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. Free Radical Bio Med 1991; **11:** 215-232.
227. Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. J Nutr 2001; **131:** 369 -373.

228. Şenses SV, Özyazgan S, Akkan AG. Serbest oksijen radikalleri-II: Antioksidan vitaminler, doğal antioksidanlar ve radikallerin rol oynadığı durumlar. Türk Aile Hek Derg 1999; **3:** 53-61.
229. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? Arch Biochem Biophys 1983; **221:** 281-290.
230. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant.
Ann N Y Acad Sci 1989; **570:** 7-22.
231. Buettner GR.The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys 1993; **300:** 535-543.
232. Serbinova EA, Packer L. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Method Enzymol 1994; **234:** 354-366.
233. Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 1996; **31:** 671-701.
234. Wefers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against
microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. Eur J Biochem 1988; **174:** 353-357.
235. McCay PB. Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbat. Ann Rev Nutr 1985; **5:** 323-340.
236. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in protection of biological systems against oxidative damage. J Photochem Photobiol B 1991; **8:** 211-224.
237. Levine M. New concepts in biology and biochemistry of ascorbic acid. N Engl J Med 1986; **314:** 892.
238. Bates CJ, Counsell JN, Hornig DH, editor. The function and metabolism of vitamin C in man. “Vitamin C (Ascorbic Acid)”. Essex: Applied Science Publishers: 1981. pp. 1-22.
239. Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. Ann N Y Acad Sci 1975; **258:** 231-237.
240. Nienhuis AW. Vitamin C and iron. N Engl J Med 1981; **304:** 170-171.
241. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. Adv Free Radical Bio 1986; **2:** 419-444.

242. Morgan AR, Cone RL, Elgert TM. The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. Nucleic Acid Res 1976; **3:** 1139-1149.
243. Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. J Biol Chem 1987; **262:** 1098-1104.
244. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. Physiol Rev 1992; **72:** 101-163.
245. Timothy C, Birdsall ND. Therapeutic applications of taurine. Altern Med Rev 1998; **3:** 128-136.
246. Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. Diabetes-Metab Res 2001; **17:** 330-346.
247. Sturman JA. Taurine in development. Physiol Rev 1993; **73:** 119-147.
248. Kendler BS. Taurine: an overview of its role in preventive medicine. Prev Med 1989; **18:** 79-100.
249. Murakami S, Yamagishi I, Asami Y, Ohta Y, Toda Y, Nara Y, Yamori Y. Hypolipidemic effect of taurine in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Pharmacology 1996; **52:** 303-313.
250. Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. Am J Physiol 1999; **277:** 1229-1238.
251. Murakami S, Kondo Y, Tomisawa K, Nagate T. Prevention of atherosclerotic lesion development in mice by taurine. Drugs Exp Clin Res 1999; **25:** 227-234.
252. Balkan J, Oztezcan S, Hatipoglu A, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. Effect of a taurine treatment on the regression of existing atherosclerotic lesions in rabbits fed on a high-cholesterol diet. Biosci Biotech Bioch 2004; **68:**1035-1039.
253. Raschke P, Massoudy P, Becker BF. Taurine protects the heart from neutrophil-induced reperfusion injury. Free Radical Bio Med 1995; **19:** 461-471.
254. Satoh H, Sperelakis N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. Gen Pharmacol 1998; **30:** 451-463

255. Devamanoharan PS, Ali AH, Varma SD. Oxidative stress to rat lens in vitro: protection by taurine. Free Radic Res 1998; **29:** 189-195.
256. Erdem A, Gundogan NU, Usubutun A, Kilinc K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. Nephrol Dial Transpl 2000; **15:** 1175-1182.
257. Saad SY, Al-Rikabi AC. Protection effects of Taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Chemotherapy 2002; **48:** 42-48.
258. Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA. Taurine: protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. Amino Acids. 1998; **15:** 53-76.
259. Balkan J, Kanbagli O, Aykac-Toker G, Uysal M. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. Biol Pharm Bull 2002; **25:** 1231-1233
260. Michalk DV, Wingenfeld P, Licht C, Ugur T, Siar LF. The mechanisms of taurine mediated protection against cell damage induced by hypoxia and reoxygenation. Adv Exp Med Biol 1996; **403:** 223-232.
261. Hwang DF, Wang LC, Cheng HM. Effect of taurine on toxicity of copper in rats. Food Chem Toxicol 1998; **36:** 239-244.
262. Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Kay E, Bouchier-Hayes D. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. Am J Physiol-Gastr L 2001; **280:** 1274-1279.
263. Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. Hum Exp Toxicol 2001; **20:** 251-254.
264. Hanna J, Chahine R, Aftimos G, Nader M, Mounayar A, Esseily F, Chamat S. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium. Exp Toxicol Pathol 2004; **56:** 189-194.
265. Bosgelmez I, Guvendik G. Effects of taurine on oxidative stress parameters and chromium levels altered by acute hexavalent chromium exposure in mice kidney tissue. Biol Trace Elem Res 2004; **102:** 209-225.

266. Hagar HH, El Etter E, Arafa M. Taurine attenuates hypertension and renal dysfunction induced by cyclosporine A in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006; **33:** 189-196.
267. Marquez LA, Dunford HB. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. J Biol Chem 1994 ; **269:** 7950-7956.
268. Ogasawara M, Nakamura T, Koyama I, Nemoto M, Yoshida T. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. Adv Exp Med Biol 1994; **359:** 71-78.
269. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. Biochem J 1988; **256:** 251-255.
270. Tadolini B, Pintus G, Pinna GG, Bennardini F, Franconi F. Effects of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. Biochem Biophys Res Commun 1995; **213:** 820-826.
271. Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. Gen Pharmacol 1995; **26:** 453-462.
272. Hayes KC, Sturman JA. Taurine in metabolism. Annu Rev Nutr 1981; **1:** 401-425.
273. Dimascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch Biochem Biophys 1989; **274:** 532-538.
274. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. Adv Pharmacol 1997; **38:** 103-110.
275. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA 1981; **78:** 6858-6862.
276. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochim Biophys Acta 1995; **1271:** 195-210.
277. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen Pharmacol 1997; **29:** 315-331.
278. Dunn MA. Metallothionein. Proc Soc Exp Biol Med 1987; **185:** 107-115.

279. The reconsideration of methiocarb, registrations of products containing methiocarb and their associated labels Vol:2 preliminary review findings Technical report part A-D april 2005.
280. Methiocarb (Mesurol) Chemical Profile 6/86 [web page on the internet],. Erişim 31.03.2005,pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/ fenitrothion-methylpara/**methiocarb**/index.html-4k
281. Yücer MM. Tarım İlaçları. Hasad yayıncılık; 2002.
282. Tarım İl Müdürlüğü, Bitki Koruma Müdürlüğü, Erenköy, İstanbul. Kişisel görüşme.
283. Marrs TC. Methiocarb [web page on the internet],. Erişim 19.12.2005, 1998, http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr11.htm.
284. Hajjar NP, Hodgson E. Flavin adenine dinucleotide--dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals. Science 1980; **209:** 1134-1136.
285. Hajjar NP, Hodgson E. Sulfoxidation of thioether-containing pesticides by the flavin-adenine dinucleotide- dependent monooxygenase of pig liver microsomes. Biochem Pharmacol 1982; **31:** 745-752.
286. Hodgson E, Cherrington N, Coleman SC, Liu S, Falls JG, Cao Y, Goldstein JE, Rose RL. Flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 mediated metabolism of pesticides: from mouse to human. Rev Toxicol 1998; **2:** 231-243.
287. Usmani KA, Karoly ED, Hodgson E, Rose RL.In vitro sulfoxidation of thioether compounds by human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase isoforms with particular reference to the CYP2C subfamily. Drug Metab Dispos 2004; **32:** 333-339.
288. Schlenk D, Cashman JR, Yeung C, Zhang X, Rettie AE. Role of human flavin-containing monooxygenases in the sulfoxidation of [^{14}C] aldicarb. Pestic Biochem Phys 2000; **73:** 67–73
289. Lawton MP, Cashman JR, Cresteil T, Dolphin CT, Elfarra AA, Hines RN, Hodgson E, Kimura T, Ozols J, Phillips IR, et al.A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. Arch Biochem Biophys 1994; **308:** 254-257.

290. Furnes B, Schlenk D. Evaluation of Xenobiotic N- and S-Oxidation by Variant Flavin-Containing Monooxygenase 1 (FMO1) Enzymes. Toxicol Sci 2004; **78**:196-203.
291. Furnes B, Schlenk D. Extrahepatic metabolism of carbamate and organophosphate thioether compounds by the flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 systems. Drug Metab Dispos 2005; **33:** 214-218.
292. Buronfosse T, Moroni P, Benoit E, Riviere JL. Stereoselective sulfoxidation of the pesticide methiocarb by flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450-dependent monooxygenases of rat liver microsomes. Anticholinesterase activity of the two sulfoxide enantiomers. J Biochem Toxicol 1995; **10:** 179-189.
293. Blee E, Durst A. Hydroperoxide-dependent sulfoxidation catalyzed by soybean microsomes. Arch Biochem Biophys 1987; **254:** 43-52.
294. Methiocarb [web page on the internet],. Erişim 03.06.2005, http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_PCS_99.18_(methiocarb).pdf
295. The reconsideration of methiocarb, registrations of products containing methiocarb and their associated labels. preliminary review findings, 2005; 1.
296. Chemical Emergency Preparedness and Prevention [web page on the internet],. Erişim 30.01.2006, http://yosemite.epa.gov/oswer/ceppoehs.nsf/Profiles/2032-65-7
297. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermandsen IM, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 2002; **179:** 1-12.
298. Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. Environ Health Perspect 2004; **112:** 524-531.
299. Hofmeister MV, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor alpha and beta

mRNA levels analyzed by on-line RT-PCR. Toxicol In Vitro 2004; **18:** 427-433.

300. Birkhoj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Dalgaard M, Vinggaard AM. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. Toxicol Appl Pharmacol 2004; **201:** 10-20.
301. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F.Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology 2004; **202:** 227-235.
302. Hincal F, Gurbay A, Giray B. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. Biol Trace Elem Res 1995; **47:** 321-326.
303. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Gupta SD, Dogra TD. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. Toxicology 2005; **206:** 49-57.
304. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. Toxicology 2005; **215:** 173-181.
305. Ahmed RS, Seth V, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (Zingiber officinales Rosc) on antioxidant defense system in rat: comparison with ascorbic acid. Indian J Exp Biol 2000; **38:** 604-606.
306. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. J Nutr Biochem 2001; **12:** 500-504.
307. Altuntas I, Delibas N. The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: The possible protective role of vitamins E and C. Turk J Med Sci 2002; **32:** 293-297.
308. Dwivedi PD, Das M, Khanna SK. Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. Food Chem Toxicol1998; **36:** 437-444.
309. Debnath D, Mandal TK. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague-Dawley albino rats. J Appl Toxicol 2000; **20:** 197-204.

310. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology 1995; **104:** 129-140.
311. Almeida MG, Fanini F, Davino SC, Aznar AE, Koch OR, Barros SB. Pro- and anti-oxidant parameters in rat liver after short-term exposure to hexachlorobenzene. Hum Exp Toxicol 1997; **16:** 257-261.
312. Junqueira VB, Simizu K, Videla LA, Barros SB.Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. Toxicology 1986; **41:** 193-204.
313. Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of methoxychlor on the antioxidant system in mitochondrial and microsome-rich fractions of rat testis. Toxicology 2002; **176:** 67-75.
314. Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress in the rat testis after short-term exposure to the organochlorine pesticide methoxychlor. Arch Toxicol 2002; **76:** 692-698.
315. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Pirincci I, Tasdemir B. The Effects of Vitamin E and Selenium on Cypermethrin-Induced Oxidative Stress in Rats Turk. J Vet Anim Sci 2005; **29:** 385-391.
316. Giray B, Gurbay A, Hincal F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. Toxicol Lett 2001; **118:** 139-146.
317. Prasamthi K, Muralidhara, Rajini PS. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. Food Chem Toxicol. 2005; **43:** 299-306.
318. Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. Biochem Pharmacol 1996; **51:** 1095-1099.
319. Banks D, Soliman MR. Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. Toxicology 1997; **116:** 177-181.

320. Kamboj A, Kiran R, Sandhir R. Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. Exp Brain Res 2006; **170:** 567-575.
321. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; **193:** 265-275.
322. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch Toxicol 2001; **75:** 88-96.
323. Oncu M, Gultekin F, Karaoz E, Altuntas I, Delibas N. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpryfos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. Hum Exp Toxicol 2002; **21:** 223-230.
324. Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. Chem Biol Interact 2005; **156:** 131-140.
325. Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. Hum Exp Toxicol 2002; **21:** 681-685.
326. Yavuz T, Altuntas I, Delibas N, Yildirim B, Candir O, Cora A, Karahan N, Ibrisim E, Kutsal A. Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. Hum Exp Toxicol 2004; **23:** 323-329.
327. El-Sharkawy AM, Abdel-Rahman SZ, Hassan AA, Gabr MH, el-Zoghby SM, el-Sewedy SM. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. Bull Environ Contam Toxicol 1994; **52:** 505-510.
328. Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S, Aydin A. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. Bull Environ Contam Toxicol 1999; **63:** 575-581.
329. Seth V, Banerjee BD, Chakravorty AK. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. Pestis Biochem Phys 2001; **71:** 133-139.

330. Seth V, Banerjee BD, Bhattacharya A, Chakravorty AK. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and glutathione redox system in blood of human poisoning with propoxur. Clin Biochem 2000; **33:** 683-685.
331. Hover CG, Kulkarni AP. Lipoxygenase-mediated hydrogen peroxide-dependent N-demethylation of N,N-dimethylaniline and related compounds. Chem Biol Interact 2000; **124:** 191-203.
332. Hu J, Kulkarni AP. Lipoxygenase-Mediated demethylation of pesticides. Pestis Biochem Phys 1998; **61:** 145-153.
333. Omurtag GZ, Guranlioglu FD, Sehirli O, Arbak S, Uslu B, Gedik N, Sener G. Protective effect of aqueous garlic extract against naphthalene-induced oxidative stress in mice. J Pharm Pharmacol 2005; **57:** 623-630.
334. Sener G, Omurtag GZ, Sehirli O, Tozan A, Yuksel M, Ercan F, Gedik N.Protective effects of ginkgo biloba against acetaminophen-induced toxicity in mice. Mol Cell Biochem 2006; **283:** 39-45.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI

Sayı : 15559

Konu :

İstanbul, ... / ..... / .....
23 Haziran 2005

İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü
Personel Daire Başkanlığına

İLGİ: 30.05.2005 tarihli, 25709 sayılı yazınıza:

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında **Arşt. Gör. SİBEL ÖZDEN'nin Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA** danışmanlığında " Bazı Pestisidlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması" başlıklı projesi hakkındaki ilgi yazınız ve ekleri. **14 Haziran 2005** tarihinde toplanan Fakültemiz Deney Hayvanları Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi,durumun adı geçen fakülte dekanlığına bildirilmesini saygılarımla arz ederim.

EKİ:
1 dosya

Prof.Dr. Tuncay ALTUĞ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı	Sibel	**Soyadı**	Özden
Doğ.Yeri	Trabzon	**Doğ.Tar.**	04/03/1977
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	36797169446
Email	stopuz@istanbul.edu.tr	**Tel**	0212 440 00 00/13566

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji A.B.D.	2001
Lisans	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi,	1998
Lise	Kemal Hasoğlu Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre(Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji A.B.D.	1998-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	İyi	65	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı (2000 mayıs)	55.455	51.581	47.707
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Word, Excel, Power point	iyi
GraphPad Prism	iyi
SPSS 11 İstatistik programı	iyi

Yayınları

1.G., Özhan, S., Özden, B., Alpertunga, Determination of Herbicides in Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Dual-Column HPLC-DAD. Journal of Environmental Science And Health, Part B Vol.B 40, No.6 (2005).

2.S., Topuz, G., Özhan, B., Alpertunga, Simultaneous Determination of Various Pesticides in Fruit Juices by HPLC-DAD. Food Control, 16, 87-92 (2005).

3.S., Topuz, B., Alpertunga, Determination of Triazines and N-Methylcarbamate Pesticides in Water by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 83 (9), 787-785 (2003).

4.G., Özhan, S. Topuz, B., Alpertunga, A Simple Method for the Determination of Carbaryl and 1-Naphthol in Fruit Juices by HPLC-DAD. Journal of Food Protection, 66 (8), 1510-1513 (2003).

5.G., Özhan, S., Topuz, B., Alpertunga, Determination of Cyclonite (RDX) in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. IL Farmaco, 58, 445-448 (2003).

Sertifikaları

- ✓ "Makale Yazma ve Uygulama Kursu" Şubat 2006, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahpaşa, İstanbul.
- ✓ "Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu" 11-12 Nisan 2005, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
- ✓ "Uygulamalı HPLC'ye Giriş ve Ayırım Teknikleri" Mayıs 2000, Dolunay, İstanbul.

Ödülleri

- ✓ Prof. Dr. Buket Alpertunga BYP-717/24062005 sayılı ve "Farklı Yöntemlerle Ölçülen Malondialdehit Değerlerinin Karşılaştırılması"
- ✓ Yard. Doç. Dr. Gül özhan BYP-570/21122004 sayılı ve "Akrilamid toksisitesinde oksidatif stresin rolü"
- ✓ Prof. Dr. Buket Alpertunga BYP-569/21122004 sayılı ve "Ditiyokarbamat grubu pestisidlerin ve parçalanma ürünlerinin lipid peroksidasyon oluşturma potansiyellerinin in vitro araştırılması"

- ✓ Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı International (12/05/2006) (TÜBITAK)

  Determination of Herbicides in Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Dual-Column HPLC-DAD.

- ✓ Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı International (21/03/2005) (TÜBITAK)

  Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD

- ✓ Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı International (02/09/2003) (TUBITAK)

  Determination of Triazines and N-Methylcarbamate Pesticides in Water by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection

  A Simple Method for the Determination of Carbaryl and 1-Naphthol in Fruit Juices by HPLC-DAD

  Determination of Cyclonite (RDX) in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography