

**T. C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**METHYL PARATHION VE DİCHLORVOS'UN İNSAN
ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN VITRO* TOKSİK ETKİSİ
VE VİTAMİN C VE VİTAMİN E'NİN KORUYUCU
ROLÜ**

Sema EROĞLU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Dilek PANDIR

Yozgat 2010

**T. C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**METHYL PARATHION VE DİCHLORVOS'UN İNSAN
ERİTROSİTLER ÜZERİNE *IN VITRO* TOKSİK ETKİSİ
VE VİTAMİN C VE VİTAMİN E'NİN KORUYUCU
ROLÜ**

Sema EROĞLU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Dilek PANDIR

Yozgat 2010

T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 7011030002 numaralı öğrencisi Sema EROĞLU'nun hazırladığı “**Metil Parathion ve Dichlorvos’un İnsan Eritrositleri Üzerine In Vitro Toksik Etkisi ve Vitamin C ve Vitamin E’ nin Koruyucu Rolü**” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 20/08/2010 Cuma günü saat 14:00’te yapılmış, tezin onayına OY ÇOKLUĞU / OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU



Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilek PANDIR (Danışman)




Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun.....tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	1
1.2. Tezin Konusu ve Önemi.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Methyl parathion.....	3
2.2. Dichlorvos.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Kimyasallar.....	9
3.2. İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması.....	9
3.3. Eritrositlere Uygulama Planı.....	9
3.4. Malondialdehid Miktarının Belirlenmesi, Antioksidan Enzimlerin Tayini...10	
3.4.1. Malondialdehid Miktarının Tayini.....	10
3.4.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi.....	10
3.4.3. Katalaz Enzimi.....	11
3.4.4. Glutasyon Peroksidaz Enzimi.....	11
3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metod.u ile Hemoglobin Tayini.....	12
3.6. İstatistik Analizler.....	12
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR	13
4.1. Methyl parathion'un Eritrosit Malondialdehit Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	13
4.1.1. Methyl parathion'un Eritrosit Malondialdehit Miktarına Etkisi.....	13
4.1.2. Methyl parathion'un Eritrosit Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	14
4.1.3. Methyl parathion'un Eritrosit Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	15
4.1.4. Methyl parathion'un Eritrosit Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	16

4.2. Dichlorvos'un Eritrosit Malondialdehit Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi.....	18
4.2.1. Dichlorvos'un Eritrosit Malondialdehit Miktarına etkisi.....	18
4.2.2. Dichlorvos'un Eritrosit Superoksid Dismutaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	19
4.2.3. Dichlorvos'un Eritrosit Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	20
4.2.4. Dichlorvos'un Eritrosit Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	21
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	23
6. KAYNAKLAR.....	27
7. ÖZGEÇMİŞ.....	35

**METHYL PARATHİON VE DİCHLORVOS'UN İNSAN ERİTROSİTLERİ
ÜZERİNE *IN VITRO* TOKSİK ETKİSİ VE VİTAMİN C VE VİTAMİN E'NİN
KORUYUCU ROLÜ**

Sema EROĞLU

**Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
2010; Sayfa: 35**

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Dilek PANDIR

ÖZET

Bu çalışmada, organofosfatlı pestisit olan methyl parathion ve dichlorvos'un eritrositler üzerinde serbest radikal üreterek oksidatif stres meydana getirdiği ve hücrel antioksidan savunma sistemini değiştirdiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında *in vitro* koşullarda farklı dozlarda methyl parathion ve dichlorvos (1,10,100 µM) ve methyl parathion/dichlorvos vitamin C (VC; 10µM)/vitamin E (VE; 30µM) kombinasyonunun insan eritrositlerindeki malondialdehit (MDA) seviyesi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Eritrositler farklı uygulamalarda (sadece methyl parathion, sadece dichlorvos, yalnızca vitaminler, methyl parathion+vitaminler ve dichlorvos+vitaminler) 37 °C'de 60 dk inkübe edilmişlerdir ve MDA seviyesi ile SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Methyl paration ve dichlorvos tek başlarına uygulandıklarında eritrositlerde MDA seviyesini arttırdıkları; SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde ise azalma meydana getirdikleri gözlenmiştir (P<0,05). VC-uygulamalı, VE-uygulamalı ve VC+VE-uygulamalı eritrositler uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Methyl parathion/dichlorvos+VC ve methyl parathion/dichlorvos+VE ile muamele edilen gruplarda methyl parathion ve dichlorvos'un lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerinde meydana getirdikleri değişiklikler engellenmişlerdir. Ancak bu yararlı etki sadece methyl parathion ve dichlorvos'un düşük uygulama dozlarında (1 ve 10µM) görülmüş ve VC+VE kombinasyonunun bu vitaminlerin tek başlarına kullanılmalarından daha fazla koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar vitaminlerin plazmada bulunan konsantrasyonlarının, methyl parathion ve dichlorvos'un genelde pestisit olarak kullanılan yüksek dozlarının (100 µM) eritrositlerde oluşturdukları zararlı etkileri üzerine koruyucu olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: CAT, Dichlorvos, MDA, Methyl parathion, , SOD,.

METHYL PARATHION AND DICHLORVOS-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN HUMAN ERYTHROCYTES AND THE PROTECTIVE EFFECT OF VITAMINS C AND E IN VITRO

Sema EROĞLU

Bozok University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

M. Sc. Thesis

2010; Page: 35

Thesis Supervisor: Asist. Prof. Dr. Dilek PANDIR

ABSTRACT

In this study, methyl parathion and dichlorvos are organophosphate (OP) pesticide that have been shown to induce oxidative stress in erythrocytes through the generation of free radicals and alteration of the cellular antioxidant defense system. We examined the effect of several different doses of methyl parathion and dichlorvos (1,10,100 μ M) or methyl parathion or dichlorvos in combination vitamin C (VC; 10 μ M) or vitamin E (VE; 30 μ M), on the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities in human erythrocytes in vitro. Erythrocytes were incubated under various treatment conditions (methyl parathion alone, dichlorvos alone, vitamins alone, methyl parathion plus vitamins, and Dichlorvos plus vitamins) at 37 °C for 60 min, and the levels of MDA, SOD, CAT and GPx activities, were determined. Treatment with methyl parathion or dichlorvos alone increased the levels of MDA, and decreased SOD, CAT and GPx activities in erythrocytes ($P < 0,05$). There were no statistical difference among VC-treated, VE-treated, or VC+VE-treated erythrocytes, as compared with nontreated control cells. Treatment of cells with methyl parathion or dichlorvos+VC, methyl parathion or dichlorvos+VE, or a combination of all three agents prevented Methyl parathion or dichlorvos-induced changes in antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation. However, this effect was seen only at low concentrations of methyl parathion or dichlorvos (1 and 10 μ M), and combination of VC+VE had a more protective effect than VC or VE alone. These results indicated that the presence of vitamins at concentrations that are similar to the levels found in plasma have no effect on methyl parathion or dichlorvos-induced toxicity in erythrocytes at a concentration of methyl parathion or dichlorvos (100 μ M) that are typically used in pesticides.

Keywords; CAT, Dichlorvos, MDA, Methyl parathion, SOD.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Dilek PANDIR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalıőmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Araő. Gör. Hatice BAŐ'a çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Enzim Savunma Mekanizması.....	7
Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri.....	14
Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri.....	15
Şekil 4.3: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri.....	16
Şekil 4.4: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri.....	18
Şekil 4.5: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri.....	19
Şekil 4.6: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri.....	21
Şekil 4.7: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri.....	22
Şekil 4.8: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri.....	23

KISALTMALAR LİSTESİ

AChE:	Asetilkolin esteraz
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
MDA:	Malondialdehit
ChE:	Kolin esteraz
DDVP:	Dichlorvos
CAT:	Katalaz
SOD:	Süperoksit Dismutaz
GPx:	Glutatyon peroksidaz
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
PBS:	Fosfat Tamponu
TBA:	Tiyobarbütirik asit
TCA:	Trikloroasetik asit

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı organofosfatlı insektisit olan methyl parathion ve dichlorvos'un insan eritrositleri üzerine *in vitro* olarak toksisitesini spektrofotometrik olarak değerlendirmek ve methyl parathion ve dichlorvos'dan kaynaklanan toksik hasar üzerine vitamin C ve E kombinasyonunun koruyucu etkisini araştırmaktır.

1.2. Tezin Konusu ve Önemi:

Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stresi azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan maddeler uygulanmaktadır. Bu antioksidan maddelerin en önemlileri arasında vitamin C ve vitamin E yer almaktadır. Bu tez, pestisitlerin (dichlorvos ve methyl parathion) uygulanması sonucu insan eritrositlerinde meydana gelen hasarın belirlenmesi, antioksidan enzim sistemlerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi ve vitamin C ve E'nin koruyuculuğunun gözlenmesi ve bu konuda çeşitli çalışmalara katkıda bulunması açısından önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

Hızlı nüfus artışının beraberinde getirmiş olduğu kentleşme ve sanayi toplumu olma yolundaki ilerlemeyle birlikte her geçen gün tarım alanları azalmakta ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarında düşüş olmaktadır. Tarım alanlarından elde edilen ürünün miktarını artırmak için iyi bir tohumla ve iyi bir toprağa gerek olduğu kadar özellikle ürünlere musallat olan ve ürün miktarının ve kalitesinin düşmesine sebep olan zararlılarla bilinçli ve tam bir şekilde mücadele edilmesi gerekmektedir.

Besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan ve besinleri yok eden, zarar veren haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan savaş maddelerine pestisitler denir [3].

Pestisitler hedef zararlılara göre;

- İnsektisitler (böcekleri öldürenler)
- Fungisitler (mantarları öldürenler)
- Herbisitler (yabancı otları öldürenler)
- Akarisitler (akarları öldürenler)
- Rodentisitler (kemiricileri öldürenler)
- Nematositler (nematodları öldürenler)
- Molluskositler (yumuşakçaları öldürenler)

olarak sınıflandırılabilirler [3].

Pestisitlerin kullanımıyla tarımsal üretimde büyük ölçüde yararlar sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra pestisitlerin çevre kirliliğine neden olmaları açısından, özellikle toprakta, suda, meyve ve sebzelerde uzun süre kalarak bitkilere, topraktan süzülerek yeraltı sularına, çevrede bulunan göl, gölet, baraj gölleri ve akarsulara karışarak azımsanmayacak düzeyde zararlar oluşturdukları da bilinmektedir [3].

Kara ekosistemlerinden tatlı su ekosistemlerine ulaşabilen bütün bu toksik maddelerin besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşarak allerjik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkilerinin olduğu da çeşitli canlılarda yapılan araştırmalarla gösterilmiştir [3].

Tarım alanlarında ve doğada en önemli zararlılardan biri olan böceklerle mücadelede kullanılan pestisitlere insektisit (böcekleri öldürenler) adı verilmektedir. İnsektisitler kimyasal yapılarına göre;

- 1) Organofosfatlı (Organik fosforlu / organofosforlu) insektisitler
- 2) Klorlu hidrokarbon yapısındaki insektisitler
- 3) Piretroid grubu insektisitler
- 4) Karbamat grubu insektisitler

olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar arasından organofosfatlı insektisitler, en çok kullanılan pestisit grubu olup, pestisitlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır [3].

Organofosfatlı insektisitler, hedef dokularda etkilerini asetilkolini yıkan asetilkolinesterazı (AChE) inhibe ederek gösterirler ve geri dönüşü olmayan akut ya da kronik zehirlenmeler meydana getirirler [3, 4, 5]. Enzim etkinliğinin engellenmesi sonucu nöro-muskuler kavşak, düz kas, kalp kası vb yerlerdeki ganglion sonrası sinir uçları, tüm otonomik ganglionlar ve MSS' deki sinapslarda asetilkolin birikir. Bunun sonucu tüm muskarinik ve nikotinik reseptörler aşırı şekilde uyarılır. Reseptörlerin uyarılmasını, blokaj takip eder.

2.1. Methyl parathion

Methyl parathionun moleküler formülü $C_8H_{10}NO_5PS$ olup yüksek toksisiteye sahip insektisitlerden biridir ve moleküler ağırlığı 263,21 dir.

Methyl parathion etkisini asetilkolini yıkan AChE'ı inhibe ederek göstermektedir [5, 6, 7].

Yapılan *in vitro* çalışmalarda methyl parathionun insan kan lökositlerinden nötrofillerin kemotaksisini inhibe ettiği bildirilmiştir [8].

Methyl parathionun eritrosit membranlarında ve böbrek mikrozoamlarında (Ca⁺²+Mg⁺²)-ATPase aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [9, 10, 11]. Bu inhibisyon methyl parathionun ATPaz üzerindeki spesifik bir bölgeye bağlanması şeklinde gerçekleşir ve hücre içi Ca⁺² homeostazının bozulmasıyla sonuçlanabilir [9, 11].

Kalender ve ark., methyl parathionun nefrotoksik etkisi ve bu etki üzerine vitamin C ve E kombinasyonunun koruyucu rolünü araştırmışlardır. Ratlara methyl parathion muamelesi sonucu vücut ağırlığı ve böbrek ağırlığı önemli ölçüde azalırken, böbrek dokusunda lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesi artmıştır. Böbrek dokusunda yapılan ışık mikroskopik incelemelerde glomerular atrofi, vasküler genişleme, nekroz, ödem, mononükleer hücre infiltrasyonu ve kalsifikasyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda vitamin C ve E muamelesinin methyl parathion'un sebep olduğu nefrotoksisiteyi azalttığı belirlenmiştir [12].

Guney ve ark., yaptıkları bir çalışmada methyl parathionun lipit peroksidasyonu ve serum ChE aktiviteleri üzerine subkronik etkisini ve vitamin E ve C kombinasyonunun koruyucu rolünü incelemişlerdir [13].

2.2. Dichlorvos

Dichlorvos (2,2 dichlorovinyl dimethyl phosphate, DDVP), molekül formülü C₄-H₇-Cl₂-O₄-P olan bir insektisittir ve molekül ağırlığı 220,98 'dir.

Dichlorvos tüm dünya üzerinde yaygın olarak kullanılan organofosfatlı bir insektisit ve antihelmintik bir ajandır [14].

Dichlorvosa akut veya kronik maruz kalmayı takiben ortaya çıkan başlıca toksik etkisi kolinerjik iletim için can alıcı bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibisyonudur. Dichlorvos AChE enzimini inhibe etmesi nedeni ile hücre membranları boyunca iyon akışını ve hücre membranlarındaki geçirgenliği hasara

uđratmaktadır [15, 16].

Dichlorvos organizma içinde hızlı bir Şekilde ayrıŐtırılmasına rağmen tek dozda ve kronik olarak uygulanması sonucu ChE aktivitesini inhibe etmeye çalıştığı tespit edilmiştir [17, 18].

Yarsan ve akır, dichlorvosu subakut ve subkronik periyotlarda 10, 20, 40 mg/kg olmak üzere u doz seviyesinde albino erkek farelere vermiŐlerdir. Dichlorvos ile muameleli farelerde subakut ve subkronik periyotlarda plazma MDA seviyesinde artıŐ, eritrositlerdeki CAT aktivitesinde subakut ve subkronik periyotlarda dūŐuŐ ve eritrositlerdeki SOD aktivitesinde subakut periyotta artıŐ olduđunu bildirmiŐlerdir [19].

Akut dichlorvos uygulaması sonucu *Clarias batrachus*'ta eritrosit profilinde değişiklikler gōzlenmiŐtir [20].

Dichlorvosa oral yoldan maruz kalan sıçanların net vūcut ađırlıđı kazanımlarında azalma meydana geldiđi aynı zamanda, plazma MDA seviyesinde artıŐ gōzlenirken serum ChE seviyesinde ise dūŐuŐ olduđu tespit edilmiŐtir. Dichlorvos muamelesi ile sıçanların endometrium epitelinde dūzensizlik ve epitel hūcrelerinde piknoz meydana geldiđi ortaya konmuŐtur. Aynı çalıŐmada sıçanlara uygulanan vitamin E ve C kombinasyonu dichlorvosun sebep olduđu endometrial hasarı azaltmıŐtır [21].

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluŐumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmıŐlardır [22]. Antioksidan savunma sistemi hūcre içi ve hūcre dıŐı olarak ikiye ayrılır.

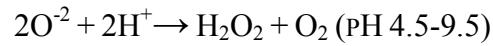
Hūcre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir (Őekil 2.1). Enzimatik olmayan hūcre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bađlanabilen α -tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir [23, 24, 25, 26].

Hūcre dıŐı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yokedicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluŐur [27].

Antioksidan enzimlerden en önemlisi olan SOD, eritrositlerde hepatositlerin, ve beyin hücrelerinin mitokondri matriksinde bulunur. Kararlı bir yapıya sahiptir. O²⁻ i H₂O₂'ye dönüştüren reaksiyonu katalizler [27, 28].

SOD

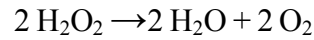
↓



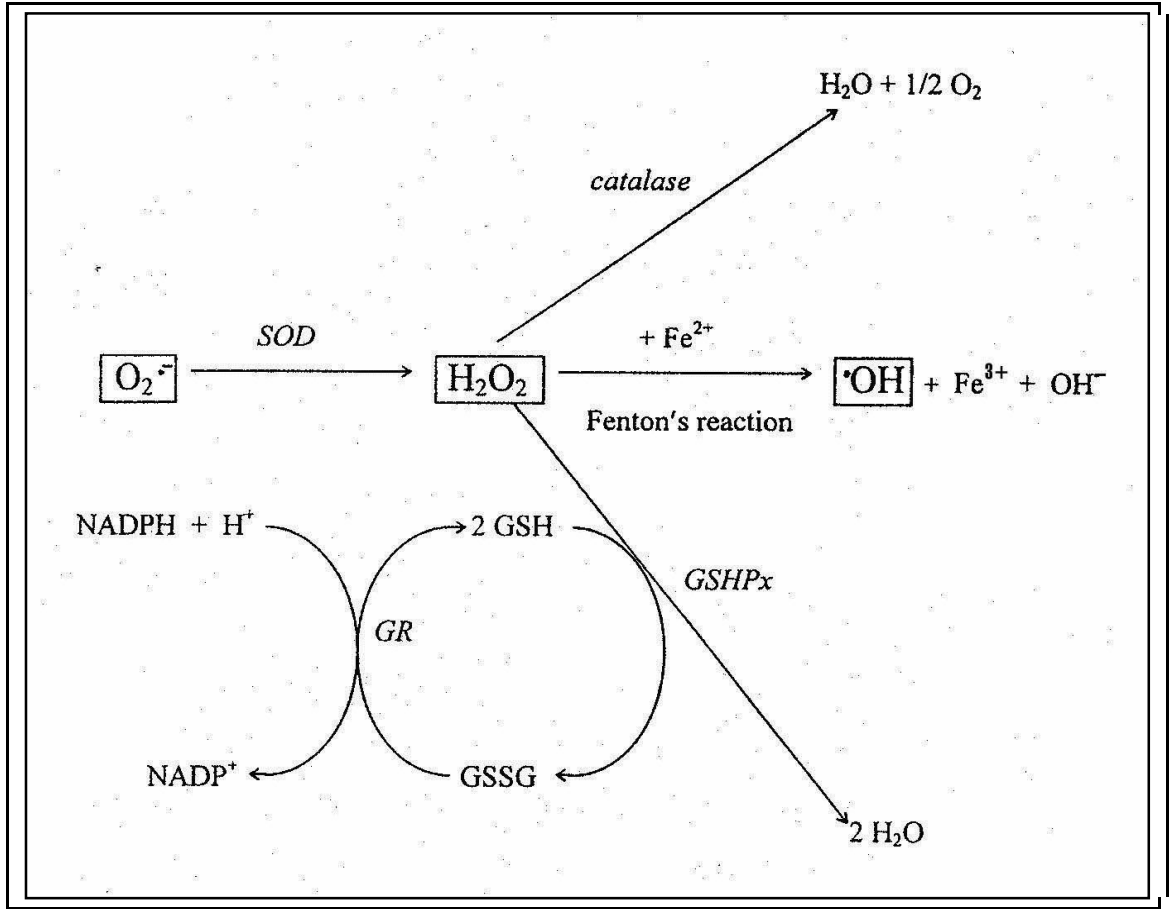
CAT enzimi ise, hepatositlerin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında bulunurken, diğer hücrelerin peroksisomlarında yer alır [27] ve H₂O₂' i su ve oksijene çevirerek etkisiz hale getirir [28, 29, 30].

CAT

↓



GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur [27] H₂O₂'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller [31] ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx, ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyum yapılarında bulundurulur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir [32, 33].



Şekil 2.1: Enzim Savunma Mekanizması [27]

Vitamin C ve Vitamin E kombinasyonu uygulamalarının çeşitli oksidanların neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olduğuna ilişkin birçok çalışma mevcuttur [34, 35].

Altuntaş ve ark. organofosfatlı phosalone'nun insan eritrositlerinde lipid peroksidasyonunu artırdığını antioksidan enzim aktivitesini azalttığını *in vitro* olarak göstermişlerdir [36].

Lukaszewicz-Hussain ve Moniuszko-Jakoniuk'un organofosfatlı bir insektisit olan chlorfenvinphos'un rat eritrositlerinin antioksidan ve antioksidan olmayan enzim sistemleri üzerine yaptıkları bir çalışmada chlorfenvinphos'un antioksidan olmayan

enzim sistemlerinin etkisini azalttığı antioksidan enzim sistemlerinin etkisini ise arttığını tesbit etmişlerdir [37].

Durak ve ark., organofosfatlı malathion'un insan eritrositlerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığını antioksidan enzim aktivitesini azalttığını ancak vitamin C-vitamin E kombinasyonlarının malathion'un *in vitro* toksik etkisini azalttığını bildirmişlerdir [38].

Bu çalışmanın amacı organofosfatlı insektisit olan methyl parathion ve dichlorvos'un insan eritrositleri üzerine *in vitro* olarak toksisitesini spektrofotometrik olarak değerlendirmek ve methyl parathion ve dichlorvos'dan kaynaklanan toksik hasar üzerine vitamin C ve E kombinasyonunun koruyucu etkisini araştırmaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

İnsektisit olarak organofosfatlı bir insektisit olan % 99 saflıkta methyl parathion (1, 10 ve 100 μ M)ve % 98 saflıkta dichlorvos (1, 10 ve 100 μ M) kullanılmış ve bu maddeler Ankara Zirai Mücadele Merkezi'nden temin edilmiştir.

Vitamin E (DL-a-tokoferol) (30 μ M)Merck, vitamin C (L-askorbik asit) (10 μ M) Carlo Erba marka kullanılmış ve bu maddeler Dizdarer' den temin edilmiştir.

Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'ten temin edildi.

3.2. İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması

Bu çalışma için sigara-alkol kullanmayan, çalıştığı ortamda herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmayan sağlıklı 6 erkek bireyden 20 ml kan örneği heparinli tüplere alınmıştır.

Heparinleşmiş tam kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Plazma ve lökositler uzaklaştırılmış ve eritrositler fizyolojik tuz çözeltisi (% 0,9'luk NaCl) ile üç kez yıkandıktan sonra aynı çözeltiyle %50 (v/v) oranlı hücre süspansiyonları PBS ile hazırlanmıştır.

3.3. Eritrositlere Uygulama Planı

Eritrositler kontrol grubu (n=6) ve muamele grubu (n=6) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Muamele grubu da kendi içinde üç gruba ayrılmıştır. Bunlar;

1. *Grup*: Organofosfatlı insektisit (methyl parathion ya da dichlorvos) muameleli grup (n=6),

2. *Grup*: Vitamin C +vitamin E muameleli grup (n=6),

3. *Grup*: Vitamin C+vitamin E+ Organofosfatlı insektisit (methyl

parathion ya da dichlorvos) muameleli grup (n=6).

Maddeler eritrositlere eklenerek 1 saat 37° C’de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma saatine kadar -20 °C’de bekleyen eritrositler soğuk deiyonize su ile 4 kat sulandırılarak hemolizati elde edilmiştir. Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak spektroskopik (Shimadzu 1700, UV/VIS Spektrofotometre, Kyoto, Japan) yöntem ile belirlendi.

3.4. Malondialdehid Miktarının Belirlenmesi, Antioksidan Enzimlerin Tayinleri

3.4.1. Malondialdehit (MDA) miktarının tayini

MDA, aerobik şartlarda TBA ile 90°C’de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur. Analizler ve analize ait hesaplamalar, Ohkawa ve ark., 1979’a [39] göre yapıldı. Her deney tüpüne % 15’lik TCA içinde % 0.375’lik hazırlanmış olan TBA dan 2 ml alınarak 1 ml homojenat (300µL+700µL distile su) üzerine konulur. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpün ağzı kapatılıp 95°C’ deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan tüpler, buz içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi ve spektrofotometrede 532 nm’de kör tüpüne karşı absorbansları okundu. Sabit sayı, $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, kullanılarak lipid peroksidasyon ürünü olan Malondialdehit (MDA) miktarı nmol/mgHb olarak verilmiştir.

3.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi

Toplam SOD (EC 1.15.1.1) tayininde Marklund ve Marklund (1974) [40] metodu kullanılarak pyrogallol’un 3 dakikada 440 nm’de alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbans ölçüldü. Bu enzim aktivitesinin ölçülmesinde 3 ml’lik 7 adet plastik küvete 2,80 ml Tris-EDTA tamponu (50mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,2) ve 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 µl’lik değişen hacimlerde süpernatant konularak enzim

kaynağı ilave edildi. Her küvetin son hacmi Tris-EDTA tamponu ile 2,90 ml'ye tamamlandı. Bu karışımların üzerlerine 100 µl 15 mM pyrogallol ilave edilerek pyrogallol'un otooksidasyonu başlatıldı. Her bir karışımın % inhibisyon miktarları hesaplanarak bir grafik elde edildi bu grafik kullanılarak bir ünite toplam SOD aktivitesi pyrogallol'un otooksidasyonunun % 50 inhibisyonuna sebep olan protein miktarı olarak hesaplandı. Daha sonra homojenattaki 1 mg protein başına toplam SOD aktivitesini bulmak için $1/(\text{mg prot. pyrogallolun otooksidasyonun \% 50 inhibisyonu})$ eşitliği kullanılarak enzim aktivitesi U/mgHb olarak verilmiştir.

3.4.3. Katalaz (CAT) enzimi

Katalaz (EC 1.11.1.6) enziminin aktivite tayini Aebi (1984) [41] tarafından belirtilen metod ile yapılmıştır. Spektrofotometrede absorbans okumadan önce elde edilen süpernantanta peroksizomlardaki katalazı açığa çıkarmak için %1'lik Triton X-100 (h/h) ilave edildi, daha sonra 50 mM fosfat tamponu (pH 7) eklenerek seyreltme yapıldı. Daha sonra spektrofotometrede (UV dalga boyunda) kullanacağımız cam küvete en son sulandırılmış örnekten 2 ml konarak üzerine 1 ml % 30'luk hidrojen peroksit eklendi ve enzimatik reaksiyon başlatıldı. Üç dakika boyunca 240 nm'de H₂O₂'in parçalanmasını gösteren azalan absorbans ölçüldü. Sabit sayı, ϵ_{240} : 0,0394 mM/cm) kullanılarak birim zaman başına absorbansdaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alındı. Enzim aktivitesi U/mgHb birimiyle verildi.

3.4.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi

Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.9) tayini Paglia ve Valentine (1967) [42] tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Bu metod okside glutasyon (GS-SG) ve NADPH'ı substrat olarak kullanan glutasyon redüktazın 340 nm'de Nikotinamid-adenin-dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH)'ı okside etmesi ile meydana gelen azalan absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Okside glutasyon, glutasyon peroksidaz tarafından oluşturulduğu için NADPH'in azalması GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır. NADPH'in Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına sebep olur, böylece dolaylı olarak GPx'in aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Bu enzimin spesifik aktivitesini ölçmek için 3 ml'lik cam küvetlere 2,525 ml 0,1 M'lük Tris-HCl

tamponu, 75 µl 80 mM redükte glutasyon, 100 µl seyreltilmiş süpernatant, 100 µl 2 mM NADPH, 100 µl 0,24 ünite glutasyon redüktaz ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu karışımın üzerine 100 µl 1,5 mM hidrojen peroksit eklenerek enzimatik reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika boyunca 340 nm’de azalan absorbanslar okundu. GPx aktivitesi (ϵ_{340} : 6220 M/cm) 1 dakikada 1 mg protein tarafından harcanan NADPH miktarı olarak hesaplandı ve enziminin spesifik aktivitesi U/mgHb olarak verildi.

3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu ile Hemoglobin Tayini

Hemoglobindeki Fe²⁺, ferrisiyanür ile Fe³⁺e okside edilir ve potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanomethemoglobine dönüşür. Siyanomethemoglobinin 540 nm’de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılıdır [43]. Drapkin çözeltisi için 0.198 g K₃Fe(CN)₆, 0.052 g KCN, 1 g NaHCO ayrı ayrı hassas terazide tartıldıktan sonra 1 litrelik balon jöje içine konuldu. Bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı. Örnek tüpüne 5 ml Drapkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklenip iyice karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra Drapkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm’de okundu.

Hesaplama işlemi ise;

Hb Konsantrasyonu (g Hb/100 ml kan) = A (Okunan Absorbans Degeri) × 36.8
(Sabit Katsayı)

3.6. İstatistikî Analizler

Tezde kullanılan istatistiksel veriler Windows SPSS 11.0 bilgisayar programında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

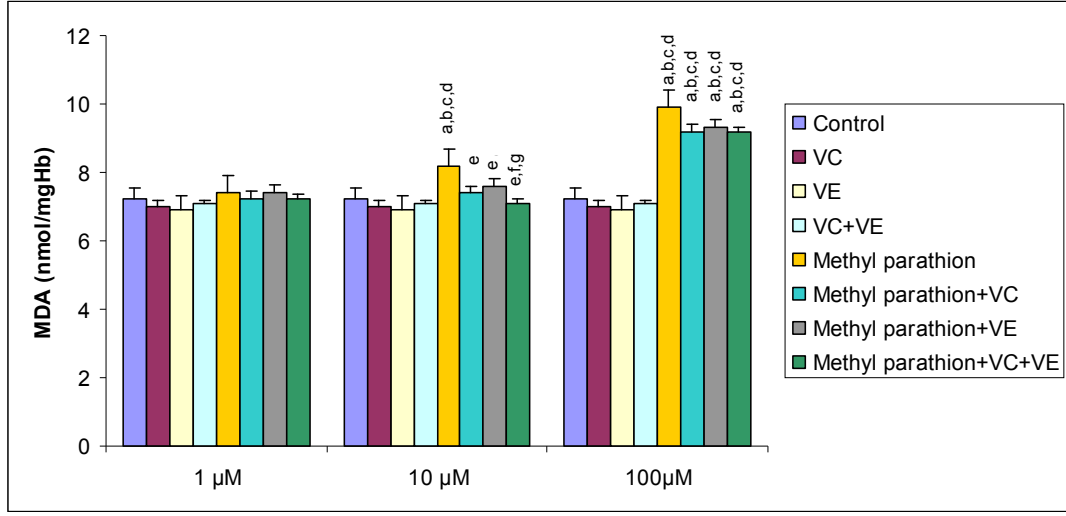
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1. Methyl parathion'un Eritrosit Malondialdehit (MDA) Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi

Kontrol grubu ile vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

4.1.1. Methyl parathion'un Eritrosit Malondialdehit (MDA) Miktarına Etkisi

Methyl parathion'un 10, 100 µM uygulanan gruplarında MDA değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Methyl parathion'un düşük dozunun (1 µM) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında MDA miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 µM methyl parathion ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer gruplar karşılaştırıldığında MDA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat methyl parathion'un yüksek konsantrasyonunda (100 µM) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Methyl parathion'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin MDA seviyesine etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 µM) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki methyl parathiona karşı koruma gösterememiştir.

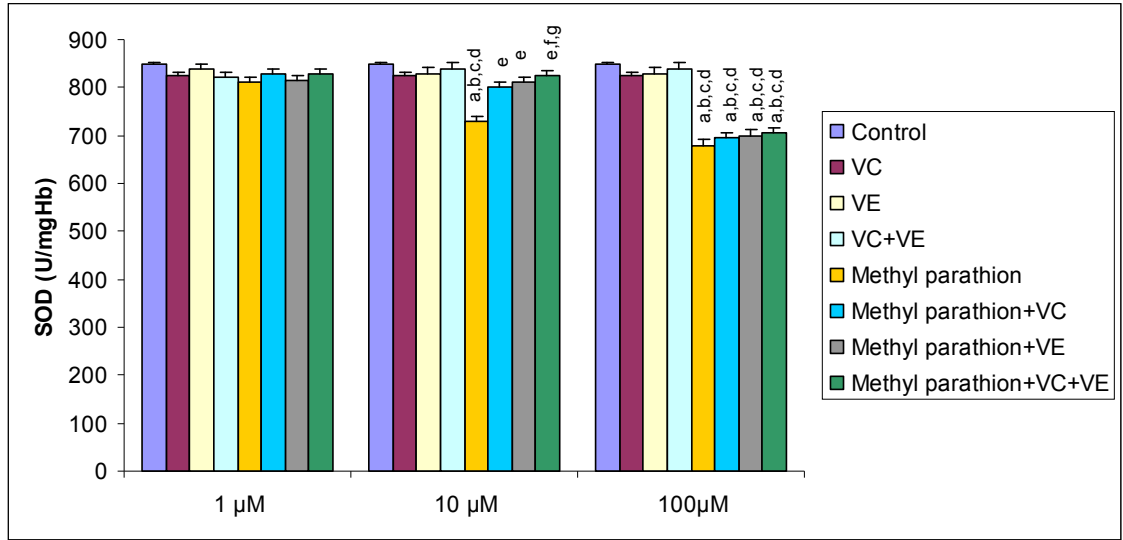


Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri, ^a Kontrol ve diğer grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^b VC uygulanan grupla VE, VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^c VE uygulanan grupla VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^d VC+VE uygulanan grupla Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^e Methyl parathion uygulanan grupla, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^f Methyl parathion+VC uygulanan grupla, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^g Methyl parathion+VE uygulanan grupla, Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.1.2. Methyl parathion'un Eritrosit Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkisi

Methyl parathion'un 10, 100 µM uygulanan gruplarda SOD miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (P<0.05). Methyl parathion'un düşük dozunda (1 µM) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında SOD miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 µM methyl parathion ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında SOD miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (P<0.05). Fakat methyl parathion'un yüksek konsantrasyonunda

(100 μ M) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.2). Methyl parathion'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin SOD miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μ M) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki methyl parathiona karşı koruma gösterememiştir.

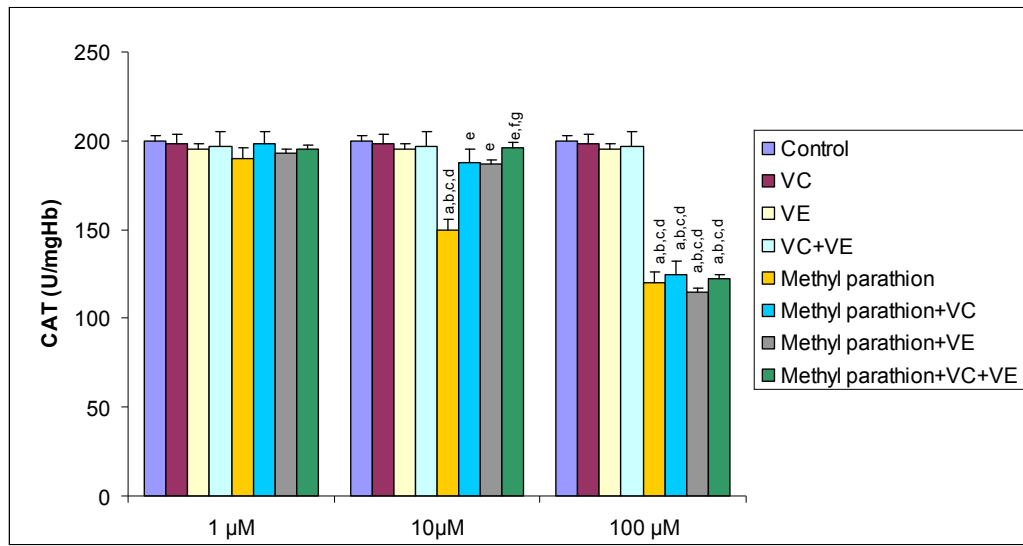


Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^bVC uygulanan grupla VE, VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^dVC+VE uygulanan grupla, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^eMethyl parathion uygulanan grupla, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^fMethyl parathion+VC uygulanan grupla, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^gMethyl parathion+VE uygulanan grupla, Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.1.3. Methyl parathion'un Eritrosit Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine Etkisi

Methyl parathion'un 10, 100 μ M uygulanan gruplarda CAT miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (P<0.05). Methyl parathion'un düşük dozunun (1 μ M) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup

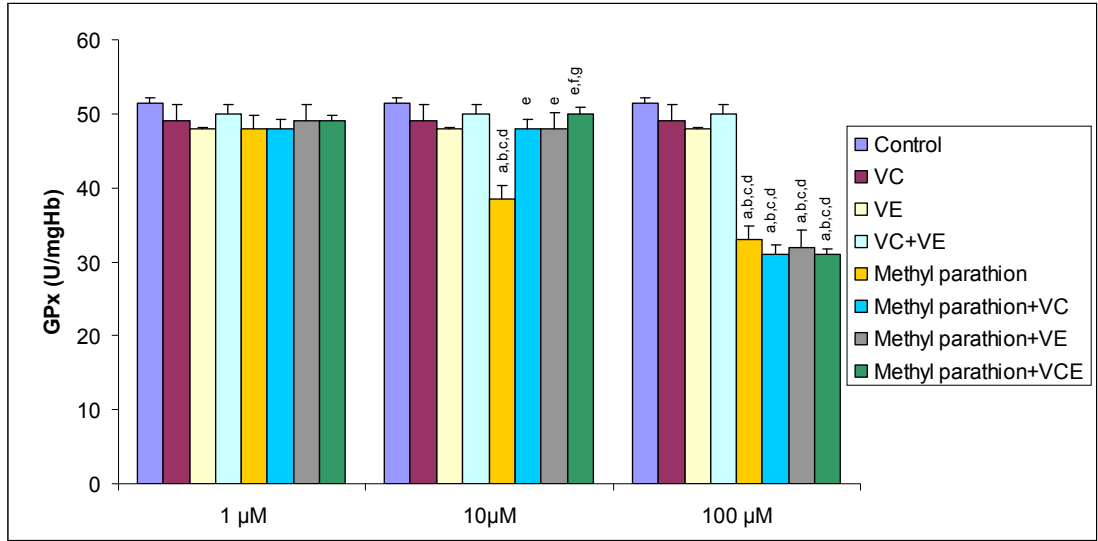
karşılaştırıldığında CAT miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μM methyl parathion ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında CAT miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat methyl parathion'un yüksek konsantrasyonunda (100 μM) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Methyl parathion'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin CAT miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μM) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki methyl parathiona karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.3: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bVC uygulanan grupla VE, VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^dVC+VE uygulanan grupla, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^eMethyl parathion uygulanan grupla, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^fMethyl parathion+VC uygulanan grupla, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^gMethyl parathion+VE uygulanan grupla, Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.1.4. Methyl parathion'un Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkisi

Methyl parathion'un 10, 100 μ M uygulanan gruplarda GPx miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Methyl parathion'un düşük dozunun (1 μ M) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında GPx miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μ M methyl parathion ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında GPx miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat methyl parathion'un yüksek konsantrasyonunda (100 μ M) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.4). Methyl parathion'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin GPx miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μ M) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki methyl parathiona karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.4: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^bVC uygulanan grupla VE, VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^dVC+VE uygulanan grupla, Methyl parathion, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^eMethyl parathion uygulanan grupla, Methyl parathion+VC, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^fMethyl parathion+VC uygulanan grupla, Methyl parathion+VE ve Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması (P<0,05), ^gMethyl parathion+VE uygulanan grupla, Methyl parathion+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

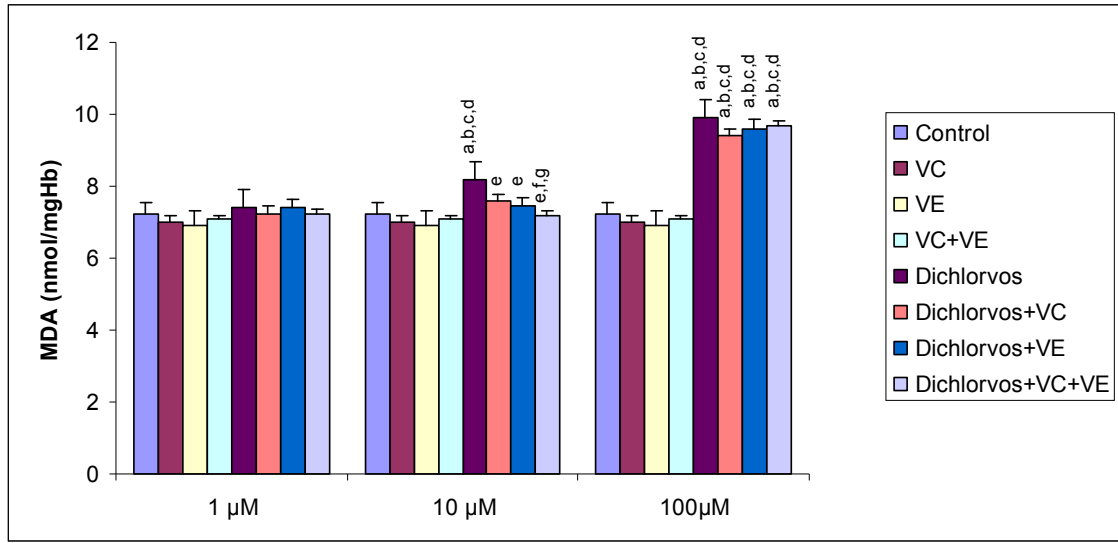
4.2. Dichlorvos'un Eritrosit Malondialdehit (MDA) Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi

Kontrol grubu ile vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

4.2.1. Dichlorvos'un Eritrosit Malondialdehit (MDA) Miktarına Etkisi

Dichlorvos'un 10, 100 µM uygulanan gruplarda MDA değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (P<0.05). Dichlorvos'un düşük dozunun (1 µM) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında

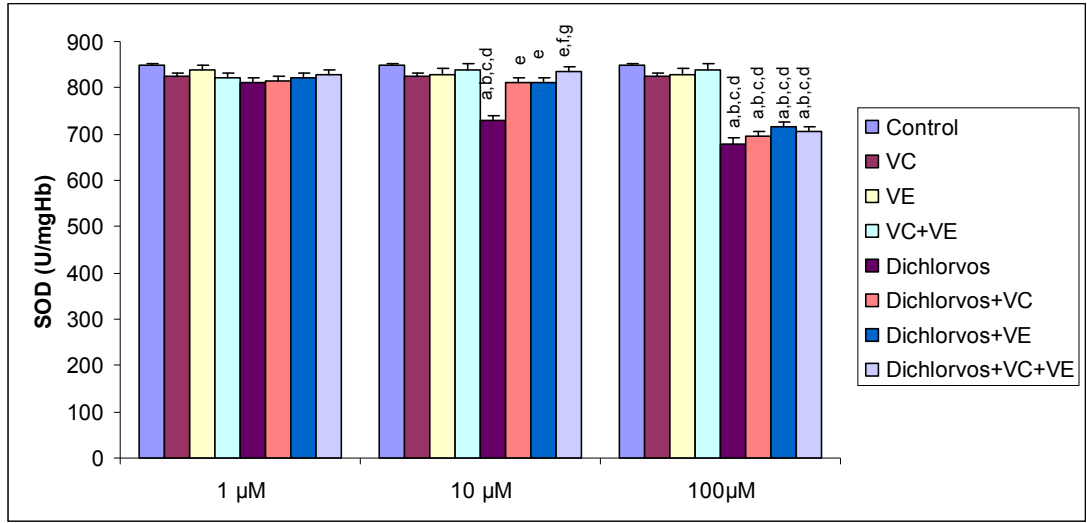
MDA miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μ M dichlorvos ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında MDA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat dichlorvos'un yüksek konsantrasyonunda (100 μ M) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.5). Dichlorvos'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin MDA seviyesine etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μ M) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki dichlorvosa karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.5: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bVC uygulanan grupla VE, VE+VC, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^dVC+VE uygulanan grupla, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^eDichlorvos uygulanan grupla, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^fDichlorvos+VC uygulanan grupla, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^gDichlorvos+VE uygulanan grupla, Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.2.2. Dichlorvos'un Eritrosit Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkisi

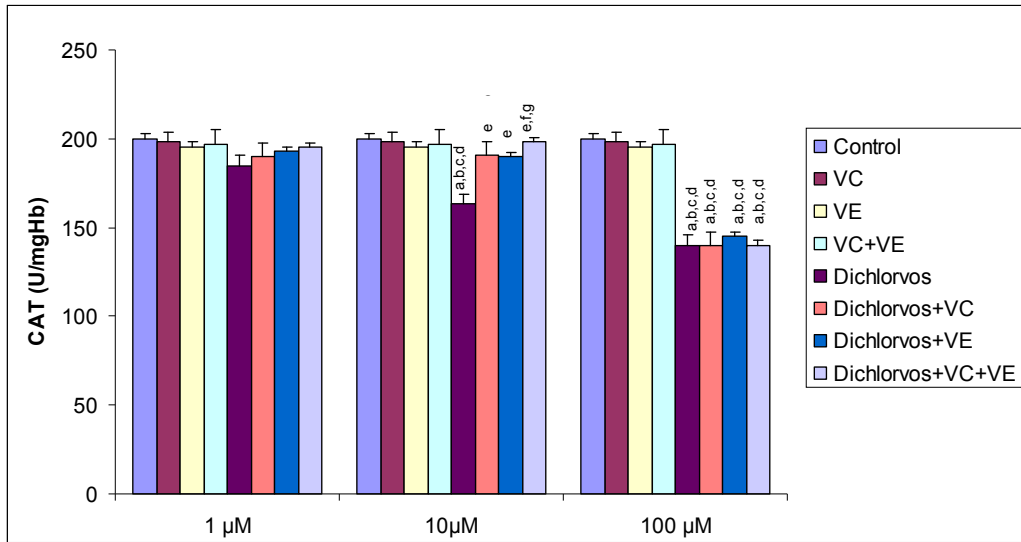
Dichlorvos'un 10, 100 μ M uygulanan gruplarda SOD miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Dichlorvos'un düşük dozunun (1 μ M) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında SOD miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μ M dichlorvos ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında SOD miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat dichlorvos'un yüksek konsantrasyonunda (100 μ M) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.6). Dichlorvos'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin SOD miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μ M) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki dichlorvosa karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.6: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bVC uygulanan grupla VE, VE+VC, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^dVC+VE uygulanan grupla, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^eDichlorvos uygulanan grupla, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^fDichlorvos+VC uygulanan grupla, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^gDichlorvos+VE uygulanan grupla, Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.2.2. Dichlorvos'un Eritrosit Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine Etkisi

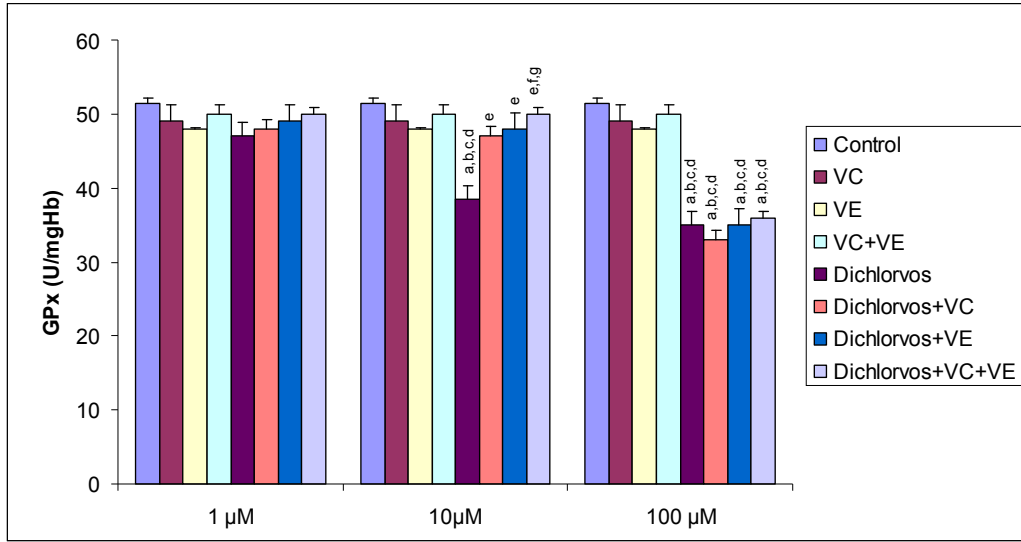
Dichlorvos'un 10, 100 μM uygulanan gruplarda CAT miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Dichlorvos'un düşük dozunun (1 μM) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında CAT miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μM dichlorvos ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında CAT miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat dichlorvos'un yüksek konsantrasyonunda (100 μM) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.7). Dichlorvos'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin CAT miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μM) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki dichlorvosa karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.7: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bVC uygulanan grupla VE, VE+VC, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^dVC+VE uygulanan grupla, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^eDichlorvos uygulanan grupla, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^fDichlorvos+VC uygulanan grupla, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^gDichlorvos+VE uygulanan grupla, Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

4.2.3. Dichlorvos'un Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkisi

Dichlorvos uygulanan gruplarda GPx miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Dichlorvos'un düşük dozlarının (1 ve 10 μM) vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu, vitamin C, vitamin E ve vitamin C+E uygulanan grup karşılaştırıldığında GPx miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 10 μM dichlorvos ve vitamin C+E birlikte uygulandığı grupla diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında GPx miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Fakat dichlorvos'un yüksek konsantrasyonunda (100 μM) aynı etki gözlenmemiştir (Şekil 4.8). dichlorvos'un düşük konsantrasyonlarının insan eritrositlerinin GPx miktarına etkisi plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μM) ile korunurken yüksek konsantrasyondaki dichlorvosa karşı koruma gösterememiştir.



Şekil 4.8: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri, ^aKontrol ve diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bVC uygulanan grupla VE, VE+VC, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^cVE uygulanan grupla VC+VE, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VE+VC uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^dVC+VE uygulanan grupla, Dichlorvos, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^eDichlorvos uygulanan grupla, Dichlorvos+VC, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^fDichlorvos+VC uygulanan grupla, Dichlorvos+VE ve Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^gDichlorvos+VE uygulanan grupla, Dichlorvos+VC+VE uygulanan grupların karşılaştırılması.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Büyük ölçüde çevresel kirliliğe neden olan pestisitler bilinçsiz olarak rastgele kullanılmaktadır ve bu nedenle de çeşitli problemlere sebep olmaktadır. Organofosfatlı pestisitlerin kalıntıları toprakta, su canlılarında, sebzelerde, tohumlarda ve çeşitli besin ürünlerinde tespit edilmiştir [44, 45]. Pestisitlerin içinde yer alan organofosfatlı insektisitler, en çok kullanılan pestisit grubudur [3]. Bu çalışmada insan eritrositleri üzerine organofosfatlı insektisit olan methyl parathion ve dichlorvosun farklı dozları (1, 10, 100 μ M) plazma konsantrasyonundaki vitamin C+E (10+30 μ M) [38, 46, 47] ile birlikte in vitro olarak uygulanmıştır.

Organofosfatlı insektisitlerin biyolojik sistemlerde serbest radikal üretme potansiyelleri tanımlanmıştır [48, 49]. Ayrıca organofosfatlı insektisitler protein ve lipid metabolizmasının bozulmasına sebep olmaktadır. Bazı organofosfatlı insektisitler protein metabolizmasının azalmasına sebep olurken [50, 51, 53, 54], bazı organofosfatlı insektisitler protein metabolizmasının artmasına sebep olmaktadır [45, 50, 52]. Bu çalışmada kullanılan methyl parathion ve dichlorvos enzimatik antioksidanlardan glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD)'ın aktivitesini uygulanan dozlarda azaltma etkisi göstermiştir. Bu antioksidan enzimler eritrositlerde ve diğer dokularda meydana gelen oksidatif stresi nötralize etmektedirler.

Çeşitli konsantrasyonlarda insektisitlerin sebep olduğu reaktif oksijen türlerinin, dokulara yönelik meydana getirecekleri oksidatif hasarın en önemli sonuçlarından biri, hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde en sık kullanılan yol, peroksidasyon olayının yan ürünlerinden olan MDA'nın TBA ile tepkimesinin ölçülmesidir [55, 56]. Bu çalışmada; organik fosfatlı gruplardaki eritrositlerde ölçülen MDA düzeyinin, kontrol ve vitaminli gruplardaki düzeylere göre artmış olması, uygulanan pestisitlerin eritrositlerin hücre zarlarının lipid peroksidasyonunu arttırdığını göstermektedir. Vitaminlerin insan eritrositlerinin lipid peroksidasyonunu azaltarak yapmış olduğu antioksidan etki, bu grupta ölçülen MDA düzeyleri ile kontrol grubunda ölçülen veriler arasında anlamlı bir fark olmamasıyla kendini göstermektedir. İnsan eritrositlerinde; Vitamin C ve E

uygulamasının, lipid peroksidasyonunu azalttığını bildiren bir çalışmadaki MDA verileri [38], bulgularımızı destekleyecek niteliktedir. Yine Durak ve ark tarafından yapılan bir başka çalışmada $HgCl_2$ 'nin zararlı etkilerine karşı Vitamin C ve Vitamin E'nin koruyucu etkileri araştırılmış, bu maddenin neden olduğu MDA artışına karşı Vitamin C ve E'nin koruyucu etkilerinin olduğu saptanmıştır [47]. Eritrositlerde artan MDA miktarı uygulanan insektisit miktarına bağlı olarak reaktif oksijen radikallerinin üretiminin artması ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflamasından ileri gelebilir. Yüksek insektisit konsantrasyonlarında eritrositlerde MDA miktarında artış görülmesi bu görüşü desteklemektedir.

SOD, süperoksid radikallerini hidrojen perokside katalizleyen bir enzimdir. CAT, hidrojen peroksiti suya dönüştürmekle görevli olan bir enzimdir [57]. CAT bütün hücrelerde bulunur ve hidrojen peroksiti suya dönüştürerek hücre içi hidrojen peroksit seviyesini belirli bir düzeyde tutar. GPx, glutasyonu substrat olarak kullanır ve temel görevi hidrojen peroksit ve alkil peroksitlerinin çözünürlüğünü azaltmaktır [58]. Organofosfatlı insektisitler SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de değişikliklere neden olmaktadır [59, 60, 61]. SOD ve CAT'ın antioksidan aktivitelerinin birbirleri ile denge halinde olması gerektiği [28] ve GPx aktivitesinin de SOD miktarıyla pozitif ilişkili olduğu [62] bildirilmektedir. Yapılan çalışmada, SOD, GPx ve CAT'ın insektisit uygulanan eritrositlerdeki düzeyleri, kontrol grubunda ölçülen enzim düzeylerine göre daha az bulunmuştur. Bu antioksidan enzimlerin, artan insektisit konsantrasyonlarında azaldığını bildiren ve bu nedenle çalışmamızdaki verilerle paralellik gösteren araştırmalarda bulunmaktadır [63, 64, 65, 66, 67]. Bu azalışın, artan konsantrasyonlardaki insektisit nedeniyle artan oksidatif stres sonucu meydana geldiği ifade edilmektedir [68].

SOD, CAT ve GPx enzimleri reaktif oksijen türlerine karşı savunmada birlikte önemli rol oynayan bir antioksidan enzim grubudur ve bu enzim grubu insan eritrositlerinde lipid hidroperoksitleri ve diğer reaktif oksijen türevlerini (ROT) uzaklaştırabilir. Hücresel antioksidan savunma sistemi artan lipid peroksitleri ve ROT'ları uzaklaştıramayacak şekilde zayıfladığında hücresel hasar ortaya çıkmaktadır. Yani artan lipid peroksidasyon düzeyine bağlı olarak sitozolik bileşenlerin dağılması ve sonuçta hücre ölümüne sebep olacak

düzyeyde hücre zarı lipidlerinde bozulma görülebılır.

Çeşitli kimyasal maddelerin ve insektisitlerin memeli hayvanlar üzerinde sebep olduğu hasar üzerinde vitamin E, vitamin C ve vitamin E-vitamin C kombinasyonunun koruyucu etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır [69]. Vitamin E çok önemli lipofilik antioksidan bir maddedir. En yüksek vitamin E konsantrasyonu mitokondri ve mikrozomlar gibi membranlardan zengin hücre kısımlarında bulunmaktadır ve böylece membran kararlılığını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Vitamin E, süperoksit, hidroksil radikalleri tekli (singlet) oksijen, lipid peroksil radikalleri ve diğere radikal örneklerini indirger [70, 71]. Vitamin E lipid peroksidasyonunun erken aşamalarında biembrandaki serbest radikal toplayıcı aktivitesi sonucu hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur böylece lipid peroksidasyonunu inhiye eder. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir [72]. Vitamin C güçlü indirgeyici aktivitesiyle güçlü bir antioksidandır. Vitamin C hidrofilik özelliktedir. Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Aynı zamanda vitamin C membrandaki tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini sağlar, böylece vitamin E'yi rejenere etmeye hizmet eder [72]. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girer. Vitamin C tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini sağlar [73, 74]. Vitamin E ve vitamin C sinerjistik etki gösteren antioksidanlardır [75, 76, 77, 78]. Yapılan çalışmalarda vitamin E ve vitamin C kombinasyonunun toksik maddeler tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunu azaltabileceği ifade edilmiştir [79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88]. Durak ve ark., yapmış oldukları çalışmada insan eritrositlerinde bir insektisit olan malathion'un lipid peroksidasyonu meydana getirdiğini, lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan olarak uygulanan Vitamin E ve C'nin bu hasarı azalttığını tespit etmişlerdir [38, 47]. Bu tez çalışmasında Vitamin C ve E ayrı ayrı ve beraber uygulandıklarında eritrositlerdeki MDA seviyesi, SOD, CAT ve GPx aktiviteleri üzerine herhangi bir etkileri olmamıştır. Ayrıca 1 µM dozlarında uygulanan methyl parathion ve dichlorvos da incelenen parametreler üzerine herhangi bir zararlı etki göstermemiştir.

Bu çalışmada birer organofosfatlı pestisit olan methyl parathion ve dichlorvos ayrı ayrı 10 µM dozlarında uygulandıklarında bu iki insektisit oluşturdukları hasara karşı Vitamin C ve Vitamin E'nin koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Methyl parathion ve dichlorvos MDA düzeyinde artışa; SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Uygulanan vitaminler araştırılan bu parametreler üzerinde koruyucu etkiye neden olarak artan MDA düzeyinde azalma; azalmış olan antioksidan enzim aktivitelerinde ise artma meydana getirmişlerdir.

Uygulanan methyl parathion ve dichlorvos ayrı ayrı 100 µM dozlarında eritrositlere uygulandığında MDA seviyesinde artış; SOD, CAT, GPx aktivitelerinde ise anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bu pestisitler aynı dozda Vitamin C ve Vitamin E ile birlikte uygulandığında ise MDA seviyesi ve antioksidan enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu dozlarda uygulanan methyl parathion ve dichlorvos'un araştırılan parametreler üzerine oluşturduğu zararlı etki üzerine Vitamin C ve Vitamin E'nin herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında birer organofosfatlı insektisit olan methyl parathion ve dichlorvosun insan eritrositleri üzerine olan toksik etkisi ve oluşan bu toksik etki üzerine plazma seviyesindeki vitamin C ve E'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda görülmüştür ki plazma seviyesindeki Vitamin C ve Vitamin E uygulaması, methyl parathionun ve dichlorvosun eritrositler üzerine neden olduğu toksik etkiyi kısmen azaltmış fakat tam olarak önleyememiştir. Bu nedenle methyl parathion'un ve dichlorvos'un insektisit olarak kullanılması son derece tehlike yaratmaktadır. Dolayısıyla dichlorvos ve methyl parathion'un zirai mücadelede kullanılması kontrol altına alınmalı, bilinçli olarak kullanılması sağlanmalı, kullanımı asgari seviyeye indirilmeli ve zirai mücadelede kimyasal pestisitlerin yerini alabilecek organik ve biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi teşvik edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Karalliadde, L. ve Senanayake, N., Organophosphorus Insecticide Poisoning, *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, 11: 1-9, 1999.
2. Zendzian, R. P., Pesticide Residue on/in the Washed Skin and Its Potential Contribution to Dermal Toxicity, *J. Appl. Toxicol.*, 23: 121-136, 2003.
3. Vural, N., Toksikoloji, *J. Fac. Pharm. Ankara*, No:73, Ankara, 1996.
4. Kappers, W. A., Edwards, R. J., Murray, S. ve Boobis, A. R., Diazinon is Activated by CYP2C19 in Human Liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 177: 68-76, 2001.
5. Abu-Qare, A.W. ve Abou-Donia, M.B., Inhibition and Recovery of Maternal and Fetal Cholinesterase Enzyme Activity Following a Single Cutaneous Dose of Methyl Parathion and Diazinon, Alone and in Combination, in Pregnant Rats, *J. Appl. Toxicol.*, 21: 307-316, 2001.
6. Abou-Donia, M.B., Chang, L.W., Dyer, R.S., (Eds.), Organophosphorous pesticides, *Handbook of Neurotoxicity*, Marcel Dekker, New York, 419-473, 1994.
7. Abu-Qare, A.W., Abdel-Rahman, A.A., Ahmad, H., Kishk, A.M. ve Abou-Donia, M.B., Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Daily Oral Doses of [¹⁴C] Methyl parathion in Hens, *Toxicol Lett*, 125 (1-3): 1-10, 2001.
8. Lee, T. P., Moscati, R. ve Park B. H., Effects of Pesticides on Human Leukocyte Functions, *Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol*, 23 (3): 597-609, 1979.
9. Blasiak, J., Inhibition of (Na⁺+K⁺)-ATPase by Organophosphorus Insecticides, *Pol. J. Environ. Stud.*, 4: 23-26, 1995a.
10. Blasiak, J., Inhibition of Erythrocyte Membrane (Ca²⁺+Mg²⁺) ATPase by Organophosphorus Insecticides Parathion and Methyl Parathion, *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 110C: 199-125, 1995b.
11. Reddy, M. S. ve Rao, K. V. R., In Vitro Inhibition of Ca²⁺ ATPase by Methyl parathion in Prawn: A Kinetic Approach, *Biochem. Int.*, 22: 1053-1058, 1990.
12. Kalender, S., Kalender, Y., Durak, D., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Cevrimli, B. S., ve Yildirim, M., Methyl parathion Induced Nephrotoxicity in Male Rats and Protective Role of Vitamins C and E, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88: 213-218, 2007.
13. Guney, M., Oral, B., Demirin, H., Ozguner, M., Take, G., Mungan, T., Altuntaş, I., Evaluation of Caspase-dependent Apoptosis During Methyl Parathion-induced Endometrial Damage in Rats:Ameliorating Effect of Vitamins E and C, *Eur. J. Pharmacol*, 23: 221-227, 2007.
14. Lazarini, C. A., Lima, R. Y., Guedes, A. P., ve Bernardi, M. M., Prenatal Exposure to Dichlorvos: Physical and Behavioral Effects on Rat Offspring, *Neurotoxicol Teratol.*, 26: 607-614, 2004.
15. Gallichio, V. S., Casale, G. P., ve Watts, T., Inhibition of Human Bone Marrow Derived Stem Cell Colony Formation (CFU-E, BFU-E and CFU-GM) Following in Vitro Exposure to Organophosphates, *Exp. Hematol.*, 15: 1099, 1987.
16. Potas, G. M., ve D'Angelo, A. M., Perturbation Effects of Organophosphate Insecticides on Human Erythrocyte, *Bull. Environ.*

- Contam. Toxicol., 39: 802, 1987.
17. Desi, I., ve Nagymajtenyi, L., Nuerotoxicologic Investigations of the Pesticide Dichlorvos (DDVP), Effects on the Central and Peripheral Nervous System, Toxicology, 49: 141-148, 1988.
 18. Kobayashi, H., Sato, I., Akatsu, Y., Fujii, S., Suzuki, T., Matsusaka, N., ve Yuyama, A., Effects of Single or Repeated Administration of a Carbamate Propoxur and Organophosphate, DDVP, on Jejunal Cholinergic Activities and Contractile Responses in Rats, J. Appl. Toxicol., 14: 185-190, 1994.
 19. Yarsan, E., ve Cakir, O., Effects of Dichlorvos on Lipit Peroxidation in Mice on Subacute and Subchronic Periods, Pestic. Biochem. Physiol., 86 (2): 106-109, 2006.
 20. Benarji, G., ve Rajendranath, T., Hematological Changes Induced by an Organophosphorus Insecticide in a Freshwater Fish *Clarias batrachus* (Linnaeus), Tropical Freshwater Biology, 2: 197-202, 1990.
 21. Oral, B., Güney, M., Demirin, H., Ozguner, M., Giray, S. G., Take, G., Mungan, T., ve Altuntaş, I., Endometrial Damage and Apoptosis in Rats Induced by Dichlorvos and Ameliorating Effect of Antioxidant Vitamins E and C, Reprod. Toxicol., 22,783-790, 2006.
 22. Powell, S. R., The Antioxidant Properties of Zinc, J. Nutr., 130, 1447-1454, 2000.
 23. Brezezinska – Slebodzinska, E., Erythrocyte Osmotic fragility Test as the Measure of Defence Against Free Radicals in Rabbits of Different age, Acta Vet. Hung., 49(4), 413 – 419, 2001.
 24. Koçyigit, A., Erel, Ö. ve Gür, S., Effects of Tobacco Smoking on Plasma Selenium, Zinc, Copper and Iron Concentrations and Related Antioxidative Enzyme Activities. Clin. Biochem., 34, 629 – 633, 2002.
 25. Woods, J. R., Cavanaugh, J. L., Narkus, E. P., Plessinger, M. A. ve Miller, R. K., The Effect of Labor on Maternal and Fetal Vitamins C and E, Am. J. Obstet. Gynecol., 187(5), 1179 – 1185, 2002.
 26. Kleczkowski, M., Klucinski, W., Sikora, J., Zdanowicz, M. ve Dziekan, P., Role of the Antioxidants in the Protection Against Oxidative Stress in Cattle—Nonenzymatic Mechanisms (Part 2), Pol. J. Vet. Sci., 6(4), 301-308, 2003.
 27. Armstrong, D. A., Aragno, M., Tamagno, E., Gato, V., Brignardello, E., Parola, S., ve Danni, O., Methods in Molecular Biology. Volume 108, Toronto, Humana Pres, 1998.
 28. McIntyre, M., Bohr, D. F. ve Dominiczak, A. F., Endothelial Function in Hypertension: The Role of Superoxide Anion, Hypertension, 34, 539-545, 1999.
 29. Draper, H. H., Nutritional Modulation of Oxygen Radical Pathology. Kitap: Draper H. H., Ed., Advances in Nutritional Research, Vol 8, Newyork, Plenum Pres, 1990.
 30. Chan, A. C., Chow, C. K. ve Chiu, D., Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 222(3); 274-282, 1999.
 31. Kalaycıoglu, L., Serpek, B., Nizamlıoglu, M., Baspınar, N. ve Tiftik, A. M., 1. baskı, Konya, Konya Selçuk Üniv. Vet. Fak. Yay. Ünit., Biyokimya Kitabı, 1998.
 32. Brigelius-Flohe, R., Tissue-Specific Functions of Individual

- Glutathione Peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.*, 27(9–10), 951–965, 1999.
33. Karagül, H., Fidancı, U. R., Altıntaş, A. ve Sel, T., *Klinik Biyokimya*. 1. baskı, Ankara, Meteksan, 2000.
 34. Biri, H., Öztürk, H. S., Büyükkoçak, S., Kaçmaz, M., Çimen, M. Y., Unal, D., Birey, M., Bozkırlı, I. ve Durak, I., Antioxidant Defense Potential of Rabbit Renal Tissues After ESWL: Protective Effects of Antioxidant Vitamins, *Nephron*, 79 (2): 181-185, 1998.
 35. Campisi, A., Di Giacomo, C., Russo, A., Sorrenti, V., Vanella, G., Acquaviva, R., Li Volti, G. ve Vanella, A., Antioxidant System in Rat Lens as a Function of Age: Effect of Chronic Administration of Vitamin E and Ascorbate, *Aging (Milano)*, 11 (1): 39-43, 1999.
 36. Altıntaş, İ., Delibaş, N., Doguc, D. K., Ozmen, S. Ve Gultekin, F., Role of Reactive Oxygen Species in Organophosphate Insecticide Phosalone Toxicity in Erythrocytes in Vitro, *Toxicology in Vitro*, 17:153-157, 2003.
 37. Lucaszewicz-Hussain, A. ve Moniuszko-Jakoniuk, J., Organophosphate Insecticide Chlorfenvinphos Affects Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants in Erythrocytes and Serum of Rats, *Pol. J. Environ. St.*, 4:417-423, 2003.
 38. Durak, D., Uzun, F. G., Kalender, S., Ögütçü, A., Uzunhisarcıklı, M. ve Kalender, Y., Malathion-Induced Oxidative Stres in Human Erythrocytes and the Protective Effect of Vitamins C and E in Vitro, *Environ. Toxicol.*, 24: 235-242, 2009.
 39. Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Tagi, K., Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Chim.*, 95:351-362, 1979.
 40. Marklund, S. ve Marklund, G., Involvement of Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47:469-474, 1974.
 41. Aebi, H., Catalase in Vitro, *Meth. Enzymol*, 105:121-126, 1984.
 42. Paglia, D. E. ve Valentine, W. N., Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70:158-169, 1967.
 43. Fairbanks, V. F. ve Klee, G. G., *Biochemical Aspects of Hematology*. Kitap: Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Eds., Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company, 1999.
 44. IARC, Methyl Parathion, In: *Miscellaneous Pesticides*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 30: 131-152, 1983.
 45. John, S., Kale, M., Rathore, N. ve Bhatnagar, D., Protective Effect of Vitamin E in Dimethoate and Malathion Induced Oxidative Stress in Rat Erythrocytes, *J. Nutr. Biochem.*, 12: 500–504, 2001.
 46. Blasiak, J. ve Stankowska, D., Genotoxicity of Malaoxon: Induction of Oxidized and Methylated Bases and Protective Effect of a -Tocopherol. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 88-96, 2001.
 47. Durak, D., Kalender, S., Uzun, F.G., Demir, F., Kalender, Y., Mercury chloride Induced Oxidative Stress and the Protective Effect of Vitamins C and E in human erythrocytes in vitro, *African J. of Biotech.*, 9(4): 488–495, 2010.
 48. Hazarika, A., Sarkar, S. N., Hajare, S., Kataria, M, ve Malik, J.K., Influence of Malathion Pretreatment on the Toxicity of

- Anilofos in Male Rats: A Biochemical Interaction Study, *Toxicology*, 185: 1-8, 2003.
49. Vidyasagar, J., Karunakar, N., Reddy, M.S., Rajnarayana, K., Surender, T., ve Krishna, D. R., Oxidative Stres and Antioxidant Status in Acute Organophosphorus Insecticide Poisoning, *Indian J. Pharmacol.*, 36: 76-79, 2004.
 50. Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S. T. ve Chakraborty, A. K., Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-radical Scavengers, *Toxicol. Lett.*, 107: 33-47, 1999.
 51. Gomes, J., Dawodu, A. H., Lloyd, O., Revitt, D. M. ve Anilal, S. V., Hepatic Injury and Disturbed Amino Acid Metabolism in Mice Following Prolonged Exposure to Organophosphorus Pesticides, *Hum. Exp. Toxicol.*, 18: 33-37, 1999.
 52. Ahmed, R. S., Seth, V., Pasha, T. ve Banerjee, B. D., Influence of Dietary Ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on Oxidatie Stress Induced by Malathion in Rats, *Food Chem. Toxicol.*, 38: 443-450, 2000.
 53. Patil, J. A., Patil, A. J. ve Govindwar, S. P., Biochemical Effects of Various Pesticides on Sprayers of Grape Gardens, *Indian J. Clin. Biochem.*, 18(2): 16-22, 2003.
 54. Kalender, S., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Acikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y. ve Kalender, Y., Diazinon-induced Hepatotoxicity and Protective Effect of Vitamin E on some Biochemical Indices and Ultrastructural Changes, *Toxicology*, 211: 197-206, 2005.
 55. Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., Bai, D., Apoptotic Effect of Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos on Mouse Retina in vivo via Oxidative Stress and Protection of Combination of Vitamins C and E, *Exp. and Toxicol. Pathol.*, 59: 415-423, 2008.
 56. Celik, I. ve Suzek, H., Effects of Subacute Exposure of Dichlorvos at Sublethal Dosages on Erythrocyte and Tissue Antioxidant Defense Systems and Lipid Peroxidation in Rats, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 72: 905–908, 2009.
 57. Mansour, S.A. ve Mossa, A.H., Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Rat Erythrocytes Induced by Chlorpyrifos and the Protective Effect of Zinc, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 93: 34-39, 2009.
 58. Bebe, F.N., Panemangalore, M., Exposure to Low Doses of Endosulfan and Chlorpyrifos Modifies Endogenous Antioxidants in Tissues of Rats, *J. Environ. Sci. Health B*, 38: 349–363, 2003.
 59. Khan, S.M., Sobti, R.C., ve Kataria, L., Pesticide-induced Alteration in Mice Hepato-oxidative Status and Protective Effects of Black Tea Extract, *Clin. Chim. Acta*, 358: 131-138, 2005.
 60. Mahaboob Khan, S. ve Kour, G., Subacute Oral Toxicity of Chlorpyriphos and Protective Effect of Green Tea Extract, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89: 118-123, 2007.
 61. Celik, I., Suzek, H., Subacute Effects of Methyl Parathion on Antioxidant Defense Systems and Lipid Peroxidation in Rats, *Food and Chem. Toxicol.*, 46: 2796-2801, 2008.
 62. Aragno, M., Tamagno, E., Gato, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O. ve Boccuzzi, G., Dehydroepiandrosterone Protects Tissues of Streptozotocin-Treated Rats Against Oxidative Stres, *Free*

- Radic. Biol. Med., 26(11/12), 1467-1474, 1999.
63. Atalay, M., Laaksonen, D. E., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O. ve Sen, C. K., Altered Antioxidant Enzyme Defences in Insulin Dependent Diabetic Men with Increased Resting and Exercise-induced Oxidative Stress, *Acta Physiol. Scand.*, 161(2), 195-201, 1997.
 64. El-Missiry, M. A. ve El-Gindy, A. M., Amelioration of Alloxan Induced Diabetes Mellitus and Oxidative Stress in Rats by Oil Eruca Sativa Seeds, *Ann. Nutr. Metab.*, 44, 97-100, 2000.
 65. Anderson, R. A., Roussel, A. M., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheu, J. M. ve Kekreni, A., Potential Antioxidant Effect of Zinc and Chromium Supplementation in People with Type II Diabetes Mellitus, *J. Am. Coll. Nutr.*, 20(3), 212-218, 2001.
 66. Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T. ve Mert, N., Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Antioxidant Defence System and Liver Damage in Experimentally-induced Diabetic Rabbits, *J. Vet. Med.*, 48, 593-599, 2001.
 67. Sindhu, R. K., Koo, J. R., Roberts, C. K. ve Vaziri, N. D., Dysregulation of Hepatic SOD, CAT and GPx in Diabetes: Response to Insulin and Antioxidant Therapy, *Clin. Exp. Hypertens.*, 26(1), 43-53, 2004.
 68. Bonnefont Rousselot, D., Bastard, J. P., Jaudon, M. C., ve Delattre, J., Consequences of The Diabetic Status on The Oxidant, Antioxidant Balance. *Diabetes Metab.*, 26, 163-176, 2000.
 69. Giray, B., Gürbay, A., ve Hincal, F., Cypermethrin-induced Oxidative Stress in Rat Brain and Liver is Prevented by Vitamin E or Allopurinol, *Toxicol. Lett.*, 118: 139-146, 2001.
 70. Mayes, P.A., Structure and Function of the Water-soluble Vitamins, In: Murray R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harper's Biochemistry. 23. ed. Lange Medical Publication, London, 573-587, 1993.
 71. Gey, K. F., Prospects for the Prevention of Radical Disease, Regarding Cancer and Cardiovascular Disease, *Br. Med. Bull.*, 49 (3): 679-699, 1993.
 72. Senthil Kumar, J., Banudevi, S., Sharmila, M., Murugesan, P., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M., ve Arunakaran, J., Effects of Vitamin C and Vitamin E on PCB (Aroclor 1254) Induced Oxidative Stress, Androgen Binding Protein and Lactate in Rat Sertoli cells, *Reproduct. Toxicol.*, 19: 201-208, 2004.
 73. Lunec, J. ve Blake, D., Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes, In: Cohen, R. D., Lewis, B., Albert, K. G. M. M., The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease, Bailliere Tindall, London, 189-212, 1990.
 74. Jialal, I. ve Fuller C. J., Oxidized LDL and Antioxidants, *Clin. Cardiol.*, 16: 1-9, 1993.
 75. Bendich Machlin, L. J. ve Scandurra, B., The Antioxidant Role of Vitamin C, *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, 2: 419-444, 1987.
 76. Ingers, H. ve Sies, H., The Production by Ascorbate and Glutathione Against Microsomal Lipid Peroxidation is in Depended on Vitamin, *Eur. J. Biochem.*, 174: 353-357, 1988.
 77. Chatterjee, I. B. ve Anuradaha, N., Ascorbic acid: A Scavenger of Oxy Radical, *Indian J. Biochem. Biophys*, 28: 233-226, 1991.

78. Prakasam, A., Sethupathy, S. ve Lalitha, S., Plasma and RBCs Antioksidant Status in Occupational Male Pesticide Sprayers, *Clin. Chim. Acta*, 20: 107-112, 2001.
79. Durak, İ., Karabacak, H. İ., Büyükkoçak, S., Burak Çimen, M. Y., Kaçmaz, M., Ömeroğlu, E., ve Öztürk, H. S., Impaired Antioxidant Defence System in the Kidney Tissue from Rabbits Treated with Cyclosporine, Protective Effects of Vitamins E and C, *Nephron*, 78 (2): 207-211, 1998.
80. Gultekin, F., Delibas, N., Yasar, S., ve 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.*, 75: 88-96, 2001.
81. Karaöz, E., Gültekin, F., Akdoğan, M., Öncü, M., ve Gökçimen, A., Protective Role of Melatonin and a Combination of Vitamin C and Vitamin E on Lung Toxicity Induced by Chlorpyrifos-ethyl in Rats, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54: 97-108, 2002.
82. Altuntaş, İ. ve Delibaş, N., The Effects of Fenthion on Lipit Peroxidation and some Liver Enzymes: The Possible Protective Role of Vitamins E and C, *Turk. J. Med. Sci.*, 32: 293-297, 2002.
83. Altuntaş, I, Delibaş, N, ve Sutcu, R, The Effects of Organophosphate Insecticide Methidathion on Lipit Peroxidation and Anti-oxidant Enzymes in Rat Erythrocytes: Role of Vitamins E and C, *Hum. Exp. Toxicol.*, 21 (12): 681-685, 2002.
84. Kılınç, I., Altuntaş, I., Kaptanağası, M., Doğuç D., Mollaoğlu, H. ve Kaleli, S., Chlorpyrifos-ethyl'in Rat Plazmasında in Vivo Lipoperoksidatif Etkisi ile Melatonin ve Vitamin C+Vitamin E'nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, *SDÜ Tıp. Fak. Derg.*, 10 (2): 24-28, 2003.
85. Yavuz, T., Delibaş, N., Yıldırım, B., Altuntaş, İ., Candır, Ö., Cora, A., Karahan, N., İbrişim, E., ve Kutsal, A., Vascular Wall Damage in Rats Induced by Methidathion and Ameliorating Effect of Vitamins E and C, *Arch. Toxicol.*, 78: 655-659, 2004.
86. Mishra, M., ve Acharya, U. R., Protective Action of Vitamins on the Spermatogenesis in Lead-treated Swiss Mice, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18: 173-178, 2004.
87. De la Asuncion, J. C., Del Olmo, M. L., Gomez-Cambronero, L. G., Sastre, J., Pallardo, F. V., ve Vina, J., AZT Induces Oxidative Damage to Cardiac Mitochondria: Protective Effect of Vitamins C and E, *Life Sci.*, 76: 47-56, 2004.
88. Murugesan, P., Muthusamy, T., Balasubramanian, K., ve Arunakaran, J., Studies on the Protective Role of Vitamin C and E Against Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254)-Induced Oxidative Damage in Leyding Cell, *Free Radic. Res.*, 39 (11): 1259-1272, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı Yozgat doğumlu olan Sema EROĞLU 2004 yılında 75. Yıl Serpil Akdağ Lisesi (YADAL) mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne yerleştirildi. 2008 yılında Lisanstan mezun olduğu Bozok Üniversitesi' nin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Lisanüstü eğitimine başladı. Halen bu okulda öğrenim görmektedir.

Tez konusuyla ilişkisi münasebeti ile Sağlık Bakanlığı Onaylı Halk Sağlığı Alanında Haşere İlaçlama Mesul Müdürlüğü eğitimi aldı.

İletişim Bilgileri:

Adres: Karatepe Mah. M. Akif Apt. 9\40

E-Posta: semabiyo@hotmail.com

Tel: 05065949937/ 0(354)2170407

YOZGAT\MERKEZ