

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Petek PİNER**

**FENTHİON İÇEREN ORTAMDA BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da  
BEYİN DOKUSUNDA GLUTATYON METABOLİZMASI, LİPİD  
PEROKSİDASYONU ve ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİNE  
ETKİLERİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2005**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENTHİON İÇEREN ORTAMDA BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da  
BEYİN DOKUSUNDA GLUTATYON METABOLİZMASI, LİPİD  
PEROKSİDASYONU ve ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİNE  
ETKİLERİ**

**Petek PİNER**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu Tez 05 / 08 / 2005 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği /  
~~Oy Çekliği~~ ile Kabul Edilmiştir.**

|                      |                       |                      |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| İmza .....           | İmza .....            | İmza.....            |
| Prof. Dr. Nevin ÜNER | Prof. Dr. Cahit ERDEM | Doç. Dr. Bedii CİCİK |
| DANIŞMAN             | ÜYE                   | ÜYE                  |

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod no:**

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ**  
**Enstitü Müdürü**  
**İmza ve Mühür**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından  
desteklenmiştir.**

**Proje No: FEF2004YL6**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların  
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FENTHİON İÇEREN ORTAMDA BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da  
BEYİN DOKUSUNDA GLUTATYON METABOLİZMASI, LİPİD  
PEROKSİDASYONU ve ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİNE  
ETKİLERİ**

**Petek PİNER**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman:** Prof. Dr. Nevin ÜNER

**Yıl** : 2005, **Sayfa:** 112

**Jüri** : Prof. Dr. Nevin ÜNER

: Prof. Dr. Cahit ERDEM

: Doç. Dr. Bedii CİCİK

Bu çalışmanın amacı juvenil *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda organofosforlu insektisid fenthion içeren ortamda GSH sentezi inhibitörü bütiyonin sülfoksimin (BSO) (50 mg/kg) ve antioksidant ve GSH öncüsü N-asetilsisteinin (NAC) (100 mg/kg) intraperitoneal dozlarının tek başına ve birlikte uygulanmalarının GSH ve GSH ile ilişkili enzimlere, lipid peroksidasyonuna ve AChE enzim aktivitesine etkilerini belirlemektir. Bu amaçla 24, 48 ve 96 saat süreyle bu bileşiklerin GSH sistemine etkilerini belirlemek üzere GSH ve GSSG miktarları ile GSH/GSSG oranı, GPx, GR, GST,  $\gamma$ -GT ve  $\gamma$ -GCS enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonuna etkilerini belirlemek üzere MDA miktarı ve nörotoksik etkilerini belirlemek üzere AChE enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemlerle araştırılmıştır. Uygulanan %20 LC<sub>50</sub> fenthion derişimi (0.45 ppm) APHA protokolüne göre yürütülen LC<sub>50</sub> çalışması ile belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan parametrelerdeki değişimler 24, 48 ve 96 saat süreli depurasyon uygulamaları ile incelenmiştir.

Fenthion etki sürecinde GSSG miktarında, GSH/GSSG oranında ve GPx aktivitesinde artışa neden olmuştur. BSO etkisinde fenthion GSH miktarını, GSH/GSSG oranını ve GR aktivitesini azaltmış, GSSG miktarı ile GPx ve  $\gamma$ -GT aktivitelerini arttırmıştır. Yüksek dozda NAC, fenthion etkisinde GSH miktarının ve GPx aktivitesinin azalmasına, GSH/GSSG oranı ile GST aktivitesinin ise artmasına neden olmuştur. Lipid peroksidasyonunda kontrole göre bir değişim hiç bir grupta gözlenmemiştir. Tüm fenthion uygulamaları AChE aktivitesini azaltmıştır. BSO ve NAC uygulaması AChE aktivitesinde artışa neden olmuştur.

Bu çalışmada, fenthionun toksik etkisinde GSH ve GSH ile ilişkili enzimlerin rol aldığı belirlenmiştir. Fenthionun BSO ile birlikte uygulanmasında toksik etkide artış belirlenmiştir. NAC'nin yüksek dozda beyinde oksidatif strese neden olduğu saptanmıştır. *O. niloticus*'da beyin dokusunda  $\gamma$ -GCS aktivitesi belirlenememiştir. BSO ve NAC'nin AChE aktivitesini arttırdığı ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Belirlenen etkilerin dört günlük depurasyon süresinde giderilemediği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Balık, Fenthion, N-asetilsistein, Bütiyonin sülfoksimin, Glutatyon

## ABSTRACT

### MSc THESIS

#### **EFFECTS of BSO and NAC on GLUTATHIONE METABOLISM, LIPID PEROXIDATION, and ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY in the BRAIN of FENTHION EXPOSED *Oreochromis niloticus***

**Petek PİNER**

**UNIVERSITY of ÇUKUROVA**

**INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT of BIOLOGY**

**Supervisor:** Prof. Dr. Nevin ÜNER

**Year** : 2005, **Page:** 112

**Jury** : Prof. Dr. Nevin ÜNER  
: Prof. Dr. Cahit ERDEM  
: Assoc. Prof. Dr. Bedii CİCİK

The aim of this study was to investigate the effects of buthionine sulfoximine (BSO) (50 mg/kg), a GSH synthesis inhibitor, and N-acetylcysteine (NAC) (100 mg/kg), an antioxidant and GSH precursor, on GSH and GSH-related enzymes, lipid peroxidation and on AChE enzyme activities in the brain of organophosphate fenthion exposed juvenile *Oreochromis niloticus*. Animals were left in fenthion solutions over 24, 48 and 96 h periods and at end of each period GSH and GSSG levels, GSH/GSSG ratio, GPx, GR, GST,  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -GCS enzyme activities were determined to evaluate the effects of BSO and NAC on GSH system, MDA contents were determined to find out their effects on lipid peroxidation and AChE enzyme activity was determined to study their neurotoxic effects. All measurements were carried out using spectrophotometric methods. The applied 20% LC<sub>50</sub> fenthion concentration (0.45 ppm) was determined through a LC<sub>50</sub> study carried out according to APHA norms. The same procedure was repeated after 24, 48 and 96 h depuration periods.

Fenthion increased the GSH/GSSG ratio, GSSG level and GPx activity in exposure periods. Treatment with BSO decreased the GSH/GSSG ratio, GSH levels and GR activity, while increasing GSSG levels, GPx and  $\gamma$ -GT activities in the brain of fenthion exposed fish. NAC, which was applied at a higher dose, decreased GSH levels and GPx activity, however elevated GSH/GSSG ratio and GST activity. No lipid peroxidation was observed in any experimental group compared with the controls. AChE activities showed a decrease in all fenthion treated fish. BSO and NAC were elevated AChE activity.

Glutathione and GSH-related enzymes had a role in fenthion toxicity. Fenthion with BSO application increased the toxic effects. NAC caused oxidative stress in its present concentration.  $\gamma$ -GCS activity could not be determined in the brain of *O. niloticus*. It was first shown by the present study that BSO and NAC increase the AChE activity in brain. Four depuration days were not found sufficient for the elimination of determined effects in brain.

**Key Words:** Fish, Fenthion, N-acetylcysteine, Buthionine sulfoximine, Glutathione

## **TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım süresince her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nevin ÜNER'e, Arş. Gör. Yusuf SEVGİLER'e ve Uzman Biyolog Hülya DURMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZ .....                                                         | I   |
| ABSTRACT .....                                                   | II  |
| TEŞEKKÜR .....                                                   | III |
| İÇİNDEKİLER .....                                                | IV  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                          | VII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                            | IX  |
| 1. GİRİŞ .....                                                   | 1   |
| 1.1. Glutasyon .....                                             | 2   |
| 1.1.1. Metabolizmada Glutasyonun Görevleri .....                 | 4   |
| 1.2. Glutasyon Redoks Döngüsü .....                              | 6   |
| 1.2.1. Glutasyon Peroksidaz .....                                | 7   |
| 1.2.1.1. Selenyum Taşımayan Glutasyon Peroksidazlar.....         | 9   |
| 1.2.2. Glutasyon Redüktaz .....                                  | 9   |
| 1.3. Ksenobiyotiklerin Detoksifikasyonu .....                    | 10  |
| 1.3.1. Glutasyon S-Transferaz .....                              | 11  |
| 1.4. Glutasyonun Biyosentezi ve Yıkımı .....                     | 14  |
| 1.4.1. $\gamma$ -Glutamilsisteinil Sentetaz .....                | 15  |
| 1.4.2. $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz .....                    | 17  |
| 1.5. Hücrel Glutasyon Düzeyinin Azalması .....                   | 19  |
| 1.6. Hücrel Glutasyon Düzeyinin Arttırılması .....               | 22  |
| 1.7. Test Organizması .....                                      | 23  |
| 1.8. Pestisidler .....                                           | 24  |
| 1.8.1. Organofosforlu Pestisidler .....                          | 24  |
| 1.8.1.1. Fenthion .....                                          | 26  |
| 1.9. Kolinesterazlar .....                                       | 28  |
| 1.10. Lipid Peroksidasyonu .....                                 | 31  |
| 1.11. Oksidatif Stres Çalışmalarında Beyin Dokusunun Önemi ..... | 34  |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                                       | 35 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM .....                                                                      | 44 |
| 3.1. Materyal .....                                                                              | 44 |
| 3.1.1. Kimyasal Maddeler .....                                                                   | 44 |
| 3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler .....                                                          | 46 |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                | 46 |
| 3.2.1. <i>Oreochromis niloticus</i> 'da Fenthionun LC <sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi ..... | 46 |
| 3.2.2. Toksisite Denemeleri .....                                                                | 47 |
| 3.2.3. Analiz Yöntemleri .....                                                                   | 48 |
| 3.2.3.1. Total Glutasyon Yöntemi .....                                                           | 48 |
| 3.2.3.2. Okside Glutasyon Yöntemi .....                                                          | 50 |
| 3.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi .....                                                      | 51 |
| 3.2.3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi .....                                                        | 53 |
| 3.2.3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi .....                                                    | 54 |
| 3.2.3.6. $\gamma$ - Glutamil Transpeptidaz Yöntemi .....                                         | 55 |
| 3.2.3.7. $\gamma$ - Glutamilsisteinil Sentetaz Yöntemi .....                                     | 56 |
| 3.2.3.8. Malondialdehid Yöntemi .....                                                            | 58 |
| 3.2.3.9. Asetilkolinesteraz Yöntemi .....                                                        | 60 |
| 3.2.3.10. Protein Yöntemi .....                                                                  | 62 |
| 3.2.4. İstatistiksel Analiz .....                                                                | 63 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....                                                                    | 64 |
| 4.1. Bulgular .....                                                                              | 64 |
| 4.1.1. <i>Oreochromis niloticus</i> 'da Fenthionun LC <sub>50</sub> Değeri .....                 | 64 |
| 4.1.2. Glutasyonla İlgili Parametrelerdeki Değişimler .....                                      | 65 |
| 4.1.2.1. GSH Miktarındaki Değişimler .....                                                       | 65 |
| 4.1.2.2. GSSG Miktarındaki Değişimler .....                                                      | 68 |
| 4.1.2.3. GSH/GSSG Oranındaki Değişimler .....                                                    | 71 |
| 4.1.2.4. GPx Aktivitesindeki Değişimler .....                                                    | 73 |
| 4.1.2.5. GR Aktivitesindeki Değişimler .....                                                     | 76 |
| 4.1.2.6. GST Aktivitesindeki Değişimler .....                                                    | 78 |

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2.7. $\gamma$ -GT Aktivitesindeki Değişimler .....  | 81  |
| 4.1.2.8. $\gamma$ -GCS Aktivitesindeki Değişimler ..... | 83  |
| 4.1.3. MDA Miktarındaki Değişimler .....                | 83  |
| 4.1.4. AChE Aktivitesindeki Değişimler .....            | 86  |
| 4.2. Tartışma .....                                     | 89  |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....                           | 98  |
| KAYNAKLAR .....                                         | 99  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                          | 112 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi .....                                                                                                                                          | 49 |
| Çizelge 3.2. Okside Glutasyon Yöntemi .....                                                                                                                                         | 50 |
| Çizelge 3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi .....                                                                                                                                     | 52 |
| Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi .....                                                                                                                                       | 53 |
| Çizelge 3.5. Glutasyon S- Transferaz Yöntemi .....                                                                                                                                  | 54 |
| Çizelge 3.6. $\gamma$ - Glutamil Transpeptidaz Yöntemi .....                                                                                                                        | 56 |
| Çizelge 3.7. $\gamma$ - Glutamilsisteinil Sentetaz Yöntemi .....                                                                                                                    | 57 |
| Çizelge 3.8. Malondialdehid Standart Grafiğinin Hazırlanması .....                                                                                                                  | 59 |
| Çizelge 3.9. Malondialdehid Yöntemi .....                                                                                                                                           | 59 |
| Çizelge 3.10. Asetilkolinesteraz Yöntemi .....                                                                                                                                      | 61 |
| Çizelge 4.1. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSH miktarına ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....      | 66 |
| Çizelge 4.2. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSSG miktarına ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....     | 69 |
| Çizelge 4.3. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranına etkileri .....                         | 72 |
| Çizelge 4.4. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri ..... | 74 |
| Çizelge 4.5. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GR spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri .....  | 77 |
| Çizelge 4.6. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GST spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri ..... | 79 |

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.7. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde $\gamma$ -GT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri ..... | 82 |
| Çizelge 4.8. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri .....                   | 85 |
| Çizelge 4.9. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının <i>O. niloticus</i> 'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri .....         | 88 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|            |                                                                                                                                                                |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. | Redükte ve okside glutatyonun yapısı .....                                                                                                                     | 3  |
| Şekil 1.2. | Oksidatif strese korunmada GSH'ın antioksidant fonksiyonlarının şematik gösterimi .....                                                                        | 7  |
| Şekil 1.3. | Genel GSH metabolizmasının şematik gösterimi .....                                                                                                             | 14 |
| Şekil 1.4. | $\gamma$ -GCS'ye substrat ve inhibitörlerin bağlanması .....                                                                                                   | 21 |
| Şekil 1.5. | Organofosforlu pestisidlerin ana gruplarının genel yapısal formülleri .....                                                                                    | 25 |
| Şekil 1.6. | Fenthionun N-bromosüksinimid ile oksidasyonu sonrası oluşan degradasyon ürünlerinin şematik gösterimi .....                                                    | 28 |
| Şekil 1.7. | AChE'nin organofosforlu bileşiklerle inhibisyon mekanizması                                                                                                    | 30 |
| Şekil 3.1. | GSH Standart Grafiği .....                                                                                                                                     | 49 |
| Şekil 3.2. | MDA Standart Grafiği .....                                                                                                                                     | 60 |
| Şekil 3.3. | Protein Standart Grafiği .....                                                                                                                                 | 63 |
| Şekil 4.1. | Uygulanan derişimlerde gözlenen yüzde ölüm oranı .....                                                                                                         | 64 |
| Şekil 4.2. | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSH miktarının yüzde değişimi .....             | 67 |
| Şekil 4.3. | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSH miktarının yüzde değişimi ..... | 67 |
| Şekil 4.4. | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSSG miktarının yüzde değişimi .....            | 70 |
| Şekil 4.5. | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSSG miktarının yüzde değişimi..... | 70 |
| Şekil 4.6. | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranının yüzde değişimi .....          | 71 |

|                    |                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.7.</b>  | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranının yüzde değişimi .....          | 73 |
| <b>Şekil 4.8.</b>  | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GPx aktivitesinin yüzde değişimi .....                      | 75 |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GPx aktivitesinin yüzde değişimi .....          | 75 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GR aktivitesinin yüzde değişimi .....                       | 76 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GR aktivitesinin yüzde değişimi .....           | 78 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GST aktivitesinin yüzde değişimi .....                      | 80 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GST aktivitesinin yüzde değişimi .....          | 80 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde $\gamma$ -GT aktivitesinin yüzde değişimi .....             | 81 |
| <b>Şekil 4.15.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde $\gamma$ -GT aktivitesinin yüzde değişimi ..... | 83 |
| <b>Şekil 4.16.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde MDA miktarının yüzde değişimi .....                         | 84 |

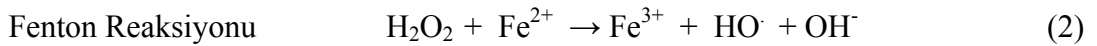
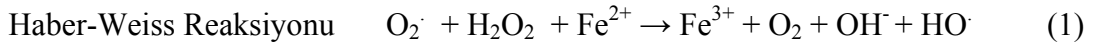
|                    |                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.17.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde MDA miktarının yüzde değişimi .....     | 84 |
| <b>Şekil 4.18.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde AChE aktivitesinin yüzde değişimi .....             | 87 |
| <b>Şekil 4.19.</b> | <i>O. niloticus</i> 'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde AChE aktivitesinin yüzde değişimi ..... | 87 |

## 1. GİRİŞ

Canlı organizmaların çoğu mitokondriyal ATP üretimi için oksijene bağımlı yaşarlar. Bunlarda mitokondriyal ATP üretimi, hücrede moleküler oksijenin ( $O_2$ ) suya indirgenmesini içeren birincil enerji üretim yoludur. Memelilerde vücuda alınan  $O_2$ 'nin %90'ı, su oluşturmak üzere bir  $O_2$ 'ye sitokrom oksidazlar tarafından 4 elektronun aktarılması için kullanılır (Storey, 1996).

Mitokondriyal  $O_2$ 'nin yaklaşık %4'ü solunum zinciri reaksiyonlarındaki elektron akışı ile süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ) gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturarak eksik redüksiyona uğramaktadır. Normal metabolizma sırasında sıçan karaciğer mitokondrisinde günde  $3 \times 10^7$   $O_2^{\cdot-}$ 'nin üretildiği belirlenmiştir.  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin steady-state derişimlerinin sırasıyla pikomolar ve nanomolar düzeyde olduğu tahmin edilmektedir. Ancak  $H_2O_2$ 'nin hepatosit steady-state derişiminin  $25 \mu M$ 'dan daha yüksek olduğu hesaplanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Endojen kaynaklı  $H_2O_2$ , suya detoksifiye edilemezse metallerin katalizlediği Haber-Weiss veya Fenton reaksiyonları ile  $HO^{\cdot}$  oluşur (Reaksiyon 1, 2):



Hidroksil radikali en reaktif ve en kısa ömürlü biyolojik radikallerden birisi olup peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ) radikalini de içeren diğer radikaller kadar etkili olmasa da biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatma potansiyeline sahiptir. Böylece endojen kaynaklı  $H_2O_2$ 'nin detoksifikasyonu hücrel homeostasis kadar mitokondriyal redoks durumunun korunması için de önemlidir.

Biyolojik öneme sahip diğer ROS  $^1O_2$  ve hipokloröz asit ( $HOCl$ )'dir. Birçok ROS  $O_2$ 'nin tek elektron redüksiyonu ve oksidant peroksinitritin oluşumunu içeren nitrik oksit ( $NO$ ) ile spontan gerçekleşen reaksiyonlarla oluşabilmektedir (Reed, 2000).

Hidrojen peroksit,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  gibi ROS biyolojik makromoleküller ile reaksiyona girebilir ve enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA zararını oluşturan oksidatif strese neden olurlar (Pena-Llopis ve ark., 2003a).

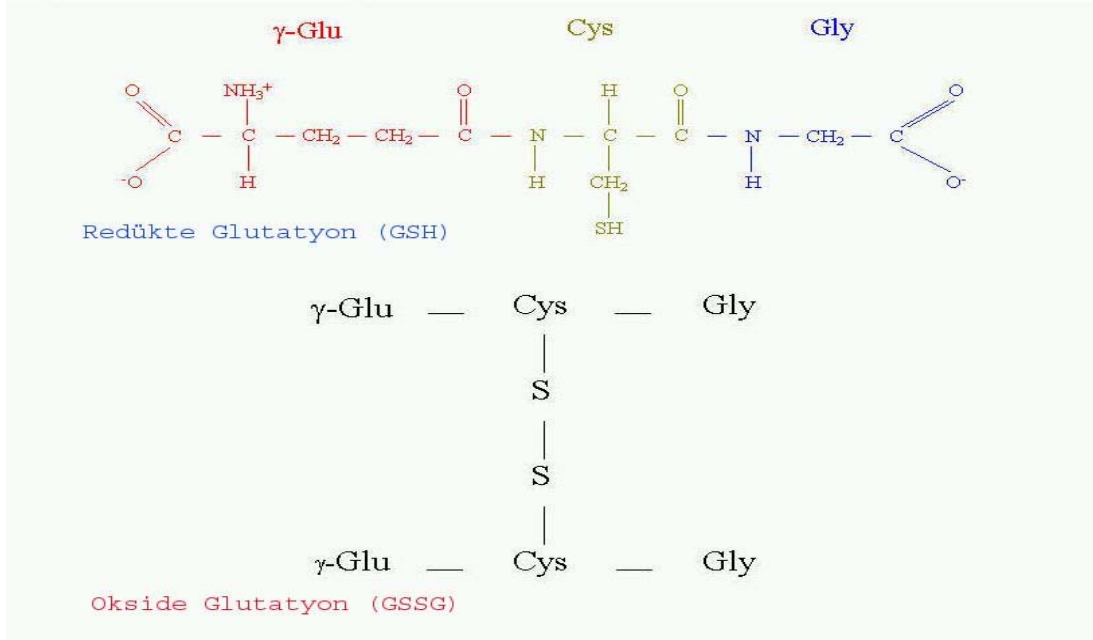
Oksidatif stres ROS üretimi ile bunların detoksifikasyonu arasında bir dengesizlik meydana geldiği durumlarda ortaya çıkmaktadır (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Bütün dokular ve hücreler biyolojik reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonu ve oksidatif stresten kaynaklanan hücresel hasarı önlemek veya azaltmak için çeşitli sistemler içermektedirler (Reed, 2000). Biyolojik antioksidantlar hücreyi serbest radikallerin ve ROS'un kontrolsüz oluşumundan koruyan ya da biyolojik yapılarla reaksiyona girmelerini engelleyen doğal moleküllerdir (Chaudiere ve Ferrai-Iliou, 1999).

Hücreler enzimatik olarak veya E, C vitaminleri, glutatyon (GSH) ve bir GSH öncüsü ve antioksidant olan N-asetilsistein (NAC), askorbik asit ve ürik asit gibi non-enzimatik antioksidantlar ile hem oksidatif zararı onararak hem de oksijen radikallerini uzaklaştırarak ROS'un zararlı etkilerinden korunurlar (Storey, 1996). Antioksidant savunmanın enzimatik basamağını süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), peroksidazlar olmak üzere üç önemli enzim grubu oluşturur. Peroksidazlardan en önemlisi GSH'ı elektron donörü olarak kullanan glutatyon peroksidazdır (GPx; EC 1.11.1.9) (Dorval ve Hontela, 2003). Hücrelerdeki bu antioksidantlardan en önemlisi GSH'dır (Storey, 1996).

### 1.1. Glutatyon

GSH elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve ROS'un hücrelerden uzaklaştırılması gibi çok sayıda hücresel fonksiyona sahip non-protein bir tripeptiddir (Meister ve Anderson, 1983). Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunan GSH, aynı zamanda en bol bulunan intrasellüler tiyoldür (Kidd, 1997). Glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisinden (Gly) meydana gelen GSH, Glu ile Cys arasında bir  $\gamma$ -peptid bağı içermektedir. Bu bağ GSH'ı birçok peptidazın hidrolitik etkisinden korur. GSH, Cys ve  $\gamma$ -glutamilsistein gibi GSH öncüsü bileşiklerden daha kolay yükseltgenir (Anderson, 1998). Hücrelerde iki

formda bulunur, bunlardan aktif formu olan indirgenmiş glutatyon hücrelerde baskındır. Okside koşullar altında iki molekül GSH arasında disülfid bağı kurularak okside glutatyon (GSSG) oluşur (Pena Llopis ve ark., 2002). Redükte ve okside glutatyonun yapısı Şekil 1.1.'de görülmektedir.



**Şekil 1.1.** Redükte ve okside glutatyonun yapısı (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Tiyoredoksin ve GSH gibi düşük moleküler ağırlıklı, sülfür içeren bileşikler, yani tiyoller kolaylıkla okside edilebilir ve hızlı bir şekilde rejenere edilebilirler. Bu özellikleri bu bileşiklerin birçok biyokimyasal ve farmakolojik reaksiyonda önemli bir rol oynamalarını sağlar. Hücre tipine bağlı olarak GSH'nın hücre içi derişimi yaklaşık 0.5-10 mM düzeyindedir. Karaciğer derişimi 4-8 mM'dır. Hücrede total GSH'nın %5'inden daha azı okside formda bulunur (Reed, 2000). GSSG hayvansal hücrede protein sentezini inhibe edebilmektedir. GSSG'nin bu etkisi hücrede intrasellüler GSSG düzeylerinin neden normalden çok düşük olduğunu ve eritrositlerden, karaciğer ve kalp gibi organlardan plazmaya neden GSSG salındığını açıklamaktadır. GSH metabolik çevrimde sabit bir oranda korunur. İnsan eritrositlerinde yarı ömrü 4 gün, sıçan karaciğerinde ise 3 saattir. Eritrositlerdeki döngüsü safraya GSSG veren karaciğere benzer olarak ATP-bağımlı bir transport

sistemi ile plazmaya hücrelerden GSSG'nin taşınmasını içerir. Karaciğer de sürekli olarak plazmaya GSH vermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Çeşitli organ ve dokulardaki GSH içeriği düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve total non-proteinlerin en az %90'ını oluşturmaktadır. Karaciğerin GSH içeriği böbrek ve testislerden yaklaşık iki kat, akciğerden yaklaşık üç kat daha fazladır (Reed, 2000). Beyindeki GSH derişimi 1-3 mM'dır. Bu organdaki GSH homeostasisi baskın olarak GSH yapıtaşlarının beyin içerisindeki sirkülasyonu ile sağlanmaktadır. Bununla birlikte beyinde GSH sentezi için gereken yapıtaşları kan-beyin engelini geçerek beyne ulaşmaktadırlar (Dringen, 2000). GSH derişiminin beyin astrositlerinde nöronlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Bharath ve ark., 2002).

Hücrede, sitoplazma ve mitokondride olmak üzere iki GSH havuz bulunmaktadır. Sitosolik GSH havuzu hücresel korumadaki görevi ile karakterize edilir. Nukleusda da bir GSH havuzu bulunabileceği düşünülmektedir. İki GSH havuzuna sahip karaciğerdeki gözlemler ile uyumlu olacak şekilde mitokondriyal GSH ayrı bir fizyolojik havuzdur. Yeni izole edilmiş sıçan karaciğer hepatositlerinde total hücresel havuzun yaklaşık %10'unu oluşturan mitokondriyal GSH havuzu 30 saatlik yarı ömüre sahipken, sitoplazmik havuzun yarı ömrü 2 saattir ve bu bulgu mitokondriyal havuzun daha stabil olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Mitokondriyal GSH sitosolik GSH'dan farklı bir havuz olarak fonksiyon yapar ve buradaki GSH derişimi yaklaşık 10 mM olup, derişimi yaklaşık 7 mM olan sitosolik GSH'dan daha yüksektir. Mitokondriyal GSH havuzunun bu özelliği mitokondriyal fonksiyonların korunmasında çok önemlidir (Reed, 2000).

### 1.1.1. Metabolizmada Glutatyonun Görevleri

Glutatyon, peroksidaz enzim ailesinin bir kofaktörü olmasının yanı sıra, askorbik asit metabolizmasını, hücreler arası iletişimin sürdürülmesini sağlayan ve genel olarak proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının okside olmasını ve çapraz bağlanmasını engelleyen diğer birçok metabolik süreçte yer almaktadır. Ayrıca hücre içi bakır transportunda da işlev görür, GSH bakır iyonları ile şelatlar oluşturur ve bunların serbest radikal oluşturma kapasitelerini azaltır. GSH koruyucu bir ajan

olarak lökoeritrin sentezinde yer alan enzimler ve glioksilazları da içeren farklı metabolik yollarda çalışan bazı enzimler için kofaktör olarak rol oynar. GSH protein katlanmasında ve insülin gibi disülfid bağları taşıyan proteinlerin yıkılmasında da rol alır(Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Redoks sistemi tarafından düzenlenen sinyal iletimi, sisteinin depolanması ve transportu, hücre bölünmesinin düzenlenmesi, immün yanıtın düzenlenmesi gibi görevlerinin yanında GSH prostaglandin metabolizmasının düzenlenmesinde de rol almaktadır. GSH'ın bütün bu metabolik ve hücresel düzenleyici fonksiyonlarındaki anahtar mekanizma tiyol-disülfid değişimi dengesidir. Enzimleri ve sinyal moleküllerini de içeren bir takım fizyolojik proteinlerin fonksiyonu protein tiyoller ve düşük moleküler ağırlıklı disülfidler arasındaki tiyol-disülfid değişimi tarafından düzenlenmektedir. Bu şekilde GSH'ın sistein rezidüsündeki -SH yan zinciri onun fizyolojik özelliklerinin bir kısmını yerine getirir. Disülfid oluşumu iki elektron oksidasyonunu içeren geri dönüşümlü bir süreçtir. Biyolojide bu süreçte yer alan elektron donör ve akseptörleri  $O_2$ , nikotinamid ve flavin kofaktörler ile diğer tiyoller ve disülfidlerdir. Reversibl tiyol-disülfid değişim reaksiyonları bir disülfidin ( $S=S$ ) iki sülfür atomundan birine bir tiyolün nükleofilik saldırısı ile meydana gelir (Sen, 1997).

Oksidatif stres koşulları altında ROS GSH tarafından indirgenirken, GSH GSSG'ye yükseltgenmektedir. Spontane oksidasyona karşı nispeten dirençli olmasına karşın, GSH  $HO^\cdot$  ile çok hızlı ve non-enzimatik olarak reaksiyon vermektedir. Aynı zamanda azot trioksit ( $N_2O_3$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^\cdot$ ) ile de reaksiyona girmektedir (Griffith, 1999). Bir kimyasal antioksidant olmasının yanında GSH, peroksidlerin GPx aracılığıyla enzimatik olarak indirgenmesini sağlar ve bu reaksiyon sonunda GSSG meydana gelir. Normal fizyolojik koşullar altında GSSG, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.2.4) tarafından GSH'a indirgenir ve bu şekilde bir redoks döngüsü meydana gelir. Hücresel indirgeme kapasitesi yetersiz kaldığında GSH/GSSG oranında azalmalar meydana gelir. İntrasellüler GSSG miktarı bir oksidatif stres indikatörü olarak değerlendirilirken, GSH/GSSG oranı hücresel redoks durumu hakkında bilgi sağlamaktadır (Cnubben ve ark., 2001).

Tüm bu görevlerinin yanı sıra GSH, GSH konjugatları oluşturmak üzere toksik bileşiklerle non-enzimatik veya glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) ailesi ile enzimatik olarak reaksiyona girer (Anderson, 1998).

## 1.2. Glutatyon Redoks Döngüsü

Hücrelerdeki redoks sistemi oksidasyon ile redüksiyon arasındaki dengeyi gösterir. GSH tampon sistemi hücrel redoks değişimini düzenler. GSH redoks sistemi transkripsiyonel aktivasyon içeren hücrel metabolik süreçlerin çoğunun düzenlenmesinde önemlidir. Hücreler aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak ROS'u üretildiği için hücrel redoks durumu hücre yaşamının korunmasında önemlidir (Jefferies ve ark., 2003).

Glutatyonun birçok pro-oksidant madde ile verdiği reaksiyonlar antioksidant savunma meydana getirmesi bakımından önemlidir (Şekil 1.2.). GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile non-enzimatik olarak reaksiyon vermezken HO<sup>•</sup> gibi karbon merkezli radikal türleri ile GSH'ın reaksiyonu bir thiyl radikali oluşmasını sağlar (Reaksiyon 3):



Bu thiyl radikalinin bir GSH ile reaksiyonu glutatyon disülfid radikali (GSSG<sup>•-</sup>) meydana gelmesini sağlarken (Reaksiyon 4), oluşan bu radikalde O<sub>2</sub> ile O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girebilir (Reaksiyon 5):

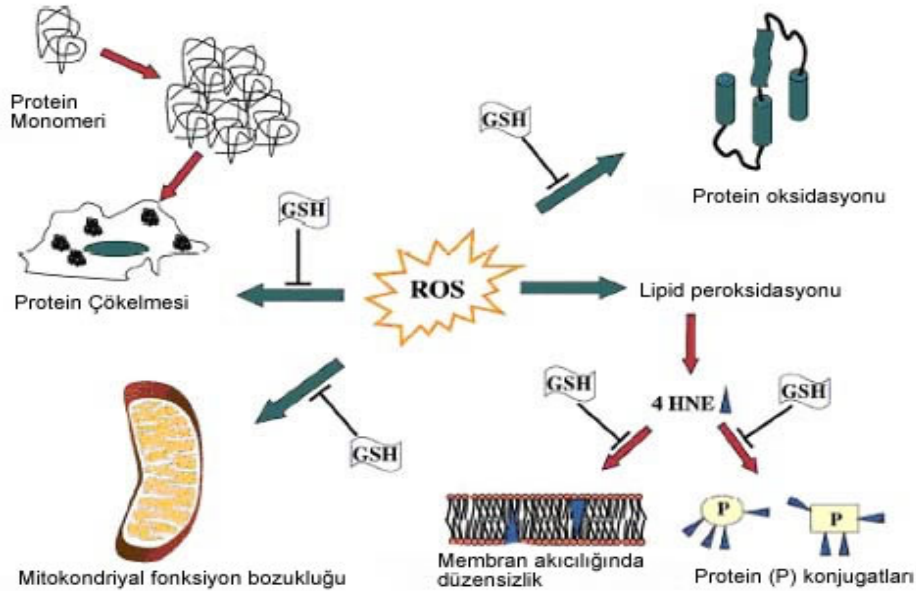


Oluşan O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'i SOD enzimi tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. Gözlenen bu dört reaksiyonun net sonucu reaktif radikal türlerinin indirgenmesi ve hücreler tarafından kolayca metabolize edilecek ürünlere dönüştürülmesidir.

Oksidatif strese karşı GSH'ın görevi sadece pro-oksidantlar ile doğrudan verdiği reaksiyonlarla sınırlı değildir.

GSH hücre içinde milimolar derişimlerde bulunduğu için ROS'un temizlenmesinde *in vivo* olarak uygundur. GSH'ın  $\text{ONOO}^-$  ile reaksiyonu nitrik oksitin tekrar oluşması için bazı nitrosotiyollerin (GSNO) oluşumuna öncülük ediyor gibi görünmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonundan başka, GSH, protein agregatlarının oluşumuna karşı, kompleks I aktivitesinin inhibisyonu ile mitokondriyal düzensizliklerden, protein oksidasyonu ve 4-hidroksinonenal yan ürünli lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri korumaktadır (Şekil 1.2.) (Bharath ve ark., 2002).



**Şekil 1.2.** Oksidatif strese karşı GSH'nin koruyucu fonksiyonlarının şematik gösterimi (Bharath ve ark., 2002).

### 1.2.1. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidazlar oksidatif strese karşı savunmada kritik rol oynarlar. GPx'ler selenyum-bağımlı GPx'ler ve selenyum-bağımsız GPx'ler olarak iki gruba ayrılabilir. Selenyum-bağımlı GPx'ler  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve organik hidroperoksitleri indirgeyebilir. Selenyum-bağımsız olanlar  $\text{H}_2\text{O}_2$  için inaktif olup sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizlerler (Cnubben ve ark, 2001).

Sitosolik selenyum-bağımlı GPx sitotoksik hidroperoksitlerin detoksifiye edilmesi için önemli bir enzim olup, hücrelerde mitokondri matriksinde ve sitosolde bulunmaktadır. GPx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi iki molekül H<sub>2</sub>O (Reaksiyon 6) ve bir molekül membran peroksitlerini (ROOH/LOOH) bir molekül H<sub>2</sub>O ve alkole (ROH/LOH) indirger (Reaksiyon 7):



Aynı inkübasyon koşulları altında GPx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etil hidroperoksit, tert-bütillidroperoksit, kumen hidroperoksit, linoleik asit hidroperoksit, nükleotid ve steroid türevi hidroperoksitleri yaklaşık aynı oranda katalizler (Ahmad, 1995).

Aktif merkezinde selenosistein taşıdığı bilinen dört tip GPx bulunmaktadır. Bununla birlikte selenosistein taşımadığı halde sitosolik GPx ile %40'dan fazla dizi homolojisi gösteren en az iki protein daha vardır. Memelilerde sistein içeren ve GPx'lere benzer bir yapı gösteren proteinler ve selenyum-bağımlı GPx'lere ek olarak selenyum-bağımsız GPx aktivitesi de gözlenmektedir. Bu dört tip GPx'den ilk keşfedileni ve sitosolik veya hücrel GPx'de denen GPx1'dir. GPx1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i, kolesterol ve uzun zincirli yağ asiti peroksitlerini de içeren bir grup organik peroksidi metabolize edebilmektedir. Bununla birlikte yağ asitleri vermek üzere fosfolipaz A2 aktivitesi olmadan GPx1 fosfolipidlerdeki yağ asiti hidroperoksitlerini metabolize edememektedir. Geniş bir peroksit grubunu substrat olarak kullanmasına karşın indirgeyici substrat olarak GSH için spesifiktir.

Bütün türlerde GPx1 her biri bir selenosistein rezidüsü taşıyan ve molekül ağırlığı 22–23 kD olan ve birbirine benzer dört alt üniteden oluşmuş tetramerik bir proteindir. Her bir selenosistein rezidüsünün komşu alt üniteye olan yakınlığı enzimin aktif merkezinin tüm alt ünitelere yayıldığını göstermektedir.

Glutasyon peroksidazın ikinci bir formu (GPx2) tetramerik olan ve sitosolde bulunan gastrointestinal veya GPxG1'de denen formudur. Bu form GPx1 ile %65 amino asit dizi homolojisi göstermektedir. Her iki formda benzer substrat spesifikliğine sahiptir.

GPx1'in keşfinden sonra uzun yıllar boyunca plazmadaki GPx aktivitesinin karaciğer ve diğer organlardan enzimin sızması nedeni ile olduğu düşünülmekteydi. Üstelik plazma GPx aktivitesi GPx1 ile aynı substrat spesifikliğine sahiptir. Fakat plazma GPx'i (GPx3) alyuvarları presipite eden GPx1 antikorları ile reaksiyon vermemektedir. GPx3 ekstrasellüler fonksiyon yapan bir glikoproteindir. GPx3 alt ünitelerinin moleküler ağırlığı 23–25 kD'dur ve GPx1 ile %40–50 dizi homoloji göstermektedir. GPx3'ü kodlayan mRNA böbrekte özellikle proksimal tübüllerin epitelyal hücrelerinde baskın olarak bulunmaktadır.

GPx4 veya fosfolipid hidroperoksit GPx dördüncü grup selenyum içeren GPx olarak tanımlanmıştır. 20–22 kD ağırlığında, diğer GPx'lerin aksine monomerik yapıda olan ve fosfolipid hidroperoksidi substrat olarak kullanılan bir enzimdir. GPx4 fosfolipid hidroperoksitlerin yanında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ve oldukça geniş diğer hidroperoksitleri substrat olarak kullanabilir. GPx4 GSH'la birlikte GPx1 ve GPx2'de bulunmayan geniş bir indirgeyici substrat spesifikliğine sahiptir (Arthur, 2000).

#### 1.2.1.1. Selenyum Taşımayan Glutasyon Peroksidazlar

Glutasyon S-transferaz ailesinin birçok üyesi GPx aktivitesine de sahiptir. Bu aktivite organik hidroperoksitlere karşıdır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat olarak kullanıldığında ölçülememektedir. Glutasyon S-transferazların hidroperoksit substratlar için K<sub>m</sub> değeri GPx'lerinkinden daha yüksektir ve transferazlar aldehitler ve diğer potansiyel oksidatif bileşiklerin konjugasyonunu içeren mekanizmalar ile oksidatif strese karşı önemli rol oynamaktadırlar (Arthur, 2000).

#### 1.2.2. Glutasyon Redüktaz

HücreSEL GSH düzeyleri GSH'ın sentezi ve kaybı arasındaki bir steady-state dengesini yansıtmaktadır. GSH'ın sentezi *de novo* sentez yoluyla yapıldığı gibi GR enziminin katalizlediği GSSG'den GSH rejenerasyonu yoluyla da olmaktadır. Bu reaksiyon *de novo* sentezine göre kantitatif olarak daha çok ön plana çıkmaktadır.

GR normal koşullarda total GSH havuzunu baskın olarak redükte formda tuttuğu için GSSG ve GSH arasındaki redoks döngüsü hücrel GSH düzeyleri üzerine genelde önemli bir etki yapmamaktadır. Diğer taraftan yüksek düzeydeki oksidatif ve nitrosatif stres durumunda özellikle GR aktivitesinin genetik bozukluklarla veya kanser ilacı olan 1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozoüre (BCNU) gibi bir inhibitörün verilmesi ile azalması sonucunda GSH dengesi GSSG düzeyleri lehine hızlı bir şekilde değişmektedir (Griffith, 1999).

Normal hücrelerde GSH'ın GSSG'ye oranı (GSH/GSSG) oldukça yüksektir, bu nedenle hücrede oluşan GSSG'nin yeniden GSH'a indirgenmesi zorunluluğu vardır. Bu indirgenme olayı GR enziminin aktivitesi ile sağlanmaktadır (Reaksiyon 8):



Glutasyon redüktaz her biri aktif merkezinde FAD içeren iki protein alt ünitesinden oluşmaktadır. Enzimin katalizlediği reaksiyon sırasında FAD NADPH tarafından indirgenir. Bundan gelen elektronlarda enzimin aktif merkezinde GSSG'nin iki sistein rezidüsü arasındaki disülfid bağına (-S-S) taşınır. Bu şekilde iki -SH grubu oluşurken GSSG iki GSH'a indirgenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### 1.3. Ksenobiyotiklerin Detoksifikasyonu

Glutasyon genellikle hayvan ve bitki dokularında pestisidler ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında da rol oynar. Organizmalarda birçok ksenobiyotik GST tarafından GSH ile konjugat oluşturularak metabolize edilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### 1.3.1. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon S-transferazlar bazı aktivasyon reaksiyonları dışında çok geniş bir alandaki kimyasal gruplarının detoksifikasyonunda yer alan bir multigen enzim ailesidir. GST'ler elektrofilik substratlar üzerine GSH'nın nükleofilik atağını katalizleyerek bunların hücrel makromoleküller üzerine olan reaktivliklerini azaltmaktadırlar. Bu enzimler bitki, hayvan ve bakterileri kapsayan hemen tüm canlı türlerinde bulunmaktadır. Küçük bir mikrozomal GST ailesi ve GST kappa olarak tanımlanan mitokondriyal bir GST dışında GST'lerin büyük kısmı çözünabilir enzimlerdir. İnsanda ve rodentlerde karaciğer total çözünabilir proteinlerinin yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadırlar. Kesin fizyolojik rollerinin tanımlanmamış olmasına karşın  $\alpha\beta$ -ansatüre ketoprostaglandinler ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi endojen yağ asiti oksidasyonu ürünleri belirli GST'ler için substrat olmaktadır. Son zamanlarda keşfedilen bir insan GST enzimi reaktif kinonlar ve endojen katekolaminlere karşı yüksek bir katalitik aktiviteye sahiptir ve bu nedenle beyindeki oksidatif doku hasarına karşı koruyucu bir rol oynamaktadır.

Çözünabilir formları her bir alt ünitesi yaklaşık 25 kD ağırlığında olan dimerik proteinler halinde bulunmaktadır. Dimerik enzimin her bir alt ünitesi iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif bölgeye sahiptir. Fizyolojik substrat GSH'nın bağlandığı bir hidrofilik G bölgesi ve yapısal olarak farklı elektrofilik substratların bağlanması için hidrofobik bir ortam sağlayan komşu bir H bölgesi. G bölgesi yüksek GSH spesifikliğı nedeni ile bütün GST'lerde oldukça benzerdir; fakat H bölgesi farklı GST'ler arasında tamamen farklı olabilir ve oldukça geniş bir substrat bağlanma spesifikliğıne sahiptir (Eaton ve Bammler, 1999).

GST'ler;



şeklindeki genel bir reaksiyonu katalizlemektedirler. Enzimin fonksiyonu:

1. Proteinin aktif merkezinde hem GSH hem de elektrofilik substratın bağlanması ile GSH ile substratın yaklaşmasını sağlamak,
2. GSH üzerindeki sülfidril grubunu aktive ederek elektrofilik substrat üzerine GSH'ın nükleofilik atağını sağlamak (Eaton ve Bammler, 1999).

Glutasyon S-transferazlar merkaptürik asit biyosentezinin başlangıç reaksiyonlarına aracılık etmektedirler. Merkaptürik asit biyosentezi başlangıçta GSH konjugatı ile başlayan ve sonra  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz ( $\gamma$ -GT; EC 2.3.2.2) tarafından glutamik asitin uzaklaştırılması ile sonuçlanan, sisteinil-glisin konjugatının oluşumu ile devam eden birkaç basamaktan oluşmaktadır. Bu reaksiyonu glisinin uzaklaştırılması ile sisteinil S-konjugatının yani pre-merkaptürik asitin oluşumu izler. N-asetiltransferazlar tarafından sisteinil S-konjugatının asetilasyonu -merkaptürik asit oluşumu ile sonuçlanır (Leblanc ve Dauterman, 2000).

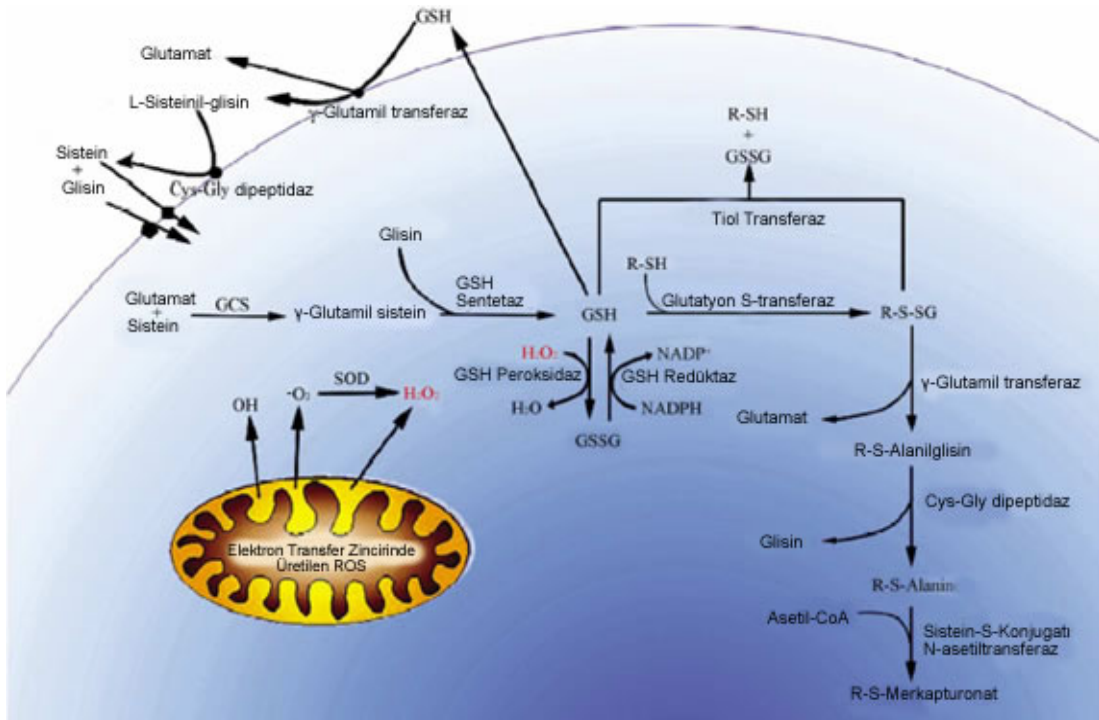
Çok sayıda kimyasal GST'ler için substrat olabilmektedirler. Bir çok epoksit karsinojen GST'ler tarafından detoksifiye edilir ve spesifik izoformların tanımlanmalarındaki farklılıklar hedef organ ve türlerin duyarlılıklarının belirlenmesinde önemli olabilmektedir. Klorlanmış nitrobenzenler (1-kloro-2,4-dinitrobenzen, CDNB; 1,2-dikloro-4-nitrobenzen, DCNB) hemen tüm GST'ler için uzun yıllardır standart substratlar olarak kullanılmaktadırlar.

Substratların elektrofilik fonksiyonel merkezleri karbon, nitrogen veya sülfür olabilmektedir. Elektrofilik bileşik ve GSH'ın sistein rezidüsü arasında GST tarafından katalizlenen tiyoeter bağının oluşumu genellikle suda daha çok çözünebilen ve daha az reaktif olan ürünler oluşturur. Bu nedenle GST reaksiyonları genellikle detoksifikasyon reaksiyonlarıdır. Bununla beraber, etilen dibromid ve metilen klorid gibi belirli haloalka(e)nler için GST aracılıklı GSH konjugasyonu oldukça reaktif ara bileşiklerin oluşumunu sağlayabilir, bu nedenle bu reaksiyonlar aktivasyon reaksiyonları olarak rol oynayabilirler (Eaton ve Bammler, 1999).

Glutasyon S-transferazlar herhangi bir ön metabolik transformasyona gerek duymadan organofosforlu (OP) bileşiklerle doğrudan reaksiyon vermektedir. GST'nin OP bileşiklerle verdiği reaksiyonları genel olarak beş gruba ayırmak mümkündür. Reaksiyon I fosforoditiyoat ve fosforotiyolat'ların O-alkil konjugasyonlarını içerir, azinphos-metil ve malathionun demetilasyonu ile

metabolik detoksifikasyonu sırasında meydana gelir. Reaksiyon II fosforotiyonat ve fosfatların O-alkil konjugasyonunu içerir, metil parathion, metil paraokson, etil parathion, etil paraokson, fenitrothion, diazinon, dichlorvos, bromophos, chlorfenvinphos, mevinphos gibi birçok OP bileşiğin detoksifikasyonu sırasında gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonda GST metoksi grubu içeren OP bileşiklere karşı belirgin bir affinite gösterirken, etoksi grubu içeren OP bileşikler için bu metabolik süreç hemen hemen önemsizdir. Aynı zamanda fosforotiyonatların fosfatlara göre GST için daha iyi substratlar oldukları da belirlenmiştir. Metil parathion ve parathion gibi bazı fosforotiyonatların ve fosfatların katıldığı Reaksiyon III O-aril konjugasyonunu içerir ve bir p-nitrofenil grubunun ayrılarak S-p-nitrofenil glutatyon oluşturmak üzere GSH ile birleşme reaksiyonudur. Reaksiyon IV ve V fosforotiyoatların ve fosfonatların O-aril konjugasyonunu içerir, insektisid EPN ve bunun okson formlarında gösterildiği gibi ayrılan bir aril radikaline veya fosforil rezidüsüne GSH'ın bağlanmasını sağlamaktadır.

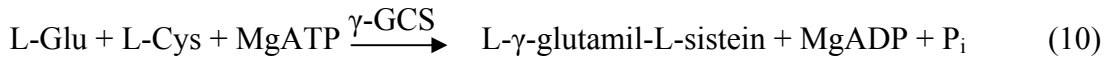
Glutatyon S-transferazlar ile OP bileşiklerinin detoksifikasyonunda bazı önemli noktalar bulunmaktadır. GST reaksiyonu için iyi substratlar olan O-metil fosforotiyonatlar O-etil grubu içerenlere göre memelilere daha az toksiktir; fakat böceklere toksisiteyi hemen hemen aynıdır. Memelilerde böceklere göre GST aktivitesinin yüksek olması nedeniyle OP bileşiklerin toksisitesindeki farklılıklar bu bileşiklerin GST ile detoksifikasyonundaki farklılıklara bağlanmaktadır (Jokanovic, 2001).



Şekil 1.3. Genel GSH metabolizmasının şematik gösterimi (Bharath ve ark., 2002).

#### 1.4. Glutasyonun Biyosentezi ve Yıkımı

Glutasyon hücre içinde  $\gamma$ -glutamilsisteinil sentetaz ( $\gamma$ -GCS; EC 6.3.2.2) ve glutasyon sentetaz'ın (GS; EC 6.3.2.3) görev aldığı ardışık iki reaksiyonla sentezlenir (Reaksiyon 10 ve 11):



Sistein GSH sentezini sınırlandıran substrattır. Hücre içi GSH hücre dışına taşınabilir; fakat normal koşullarda hücre içine önemli düzeyde alınmaz. GSH hücre dışına çıktığı zaman yapısındaki  $\gamma$ -peptid bağı membran-bağımlı ve aktif bölgesi bazı hücre ve organların dış yüzeyinde bulunan  $\gamma$ -GT enzimi tarafından parçalanır. Bu enzim böbrek, koroid pleksus, lenfositler, safra kanalı, silli yapılar, barsak ve pankreasta bulunmaktadır. Bu reaksiyonun ürünü bir  $\gamma$ -glutamil amino asitidir.

Taşınmadan sonra  $\gamma$ -glutamil siklotransferaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla  $\gamma$ -glutamil amino asiti glutamatın halkasal formu olan 5-oksopiroline dönüştürülür. 5-oksopirolinin halkasal yapısı 5-oksopirolinaz tarafından açılarak glutamat oluşturulur. Sıralanan son üç enzimle birlikte bu biyosentetik yolda bulunan diğer enzimler  $\gamma$ -glutamil döngüsünü oluştururlar. Transpeptidaz için en iyi amino asit akseptörlerinden biri sisteindir ve bu enzimin ürünü de  $\gamma$ -glutamilsistein'dir. Bu ürün böbrek hücreleri gibi belirli hücrelere taşınarak sistein ve  $\gamma$ -glutamata indirgenebilir. Sistein GSH sentezi ya da diğer hücresel gereksinimler için kullanılır.  $\gamma$ -Glutamilsistein GS tarafından GSH sentezi için kullanılabilir. Bu reaksiyon serisi GSH biyosentezi için alternatif yol ya da kurtarıcı yol olarak kullanılmaktadır (Anderson, 1998).

#### 1.4.1. $\gamma$ -Glutamilsisteinil Sentetaz

$\gamma$ -Glutamilsisteinil sentetaz çeşitli kaynaklardan saflaştırılmıştır. *Escherichia coli*'de bulunan enzim klonlanmış ve tek polipeptid zincirinden oluştuğu anlaşılmıştır. Memelilerden ilk olarak klonlanan enzim sıçan böbreğinden elde edilmiş ve heterodimer yapıda olduğu belirlenmiştir. Memelilerde heterodimerik olan bu enzim moleküler ağırlığı yaklaşık 73 kD ve bütün substratların bağlanma merkezi olan katalitik olarak aktif bir ağır alt ünite ve ağır alt ünitenin substratlar ve inhibitörlere olan affinitesini düzenleyen yaklaşık 31 kD molekül ağırlığında bir hafif alt ünitelerden oluşmaktadır. Her iki kaynaktan elde edilen enzim aynı reaksiyonu katalizlemektedir ve benzer  $K_m$  değeri, turnover sayısı ve substrat spesifikliğine sahiptir, aynı oranda feedback inhibisyona uğrar. İnsan, sıçan ve *E. coli*'de ağır alt ünite büyük oranda homologdur.

*E. coli* ve sıçanda bulunan enzimler GSH tarafından feedback inhibisyona uğrar; fakat her ikisi de GSH'ın tiyol olmayan analogu optalmik asit ( $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -aminobütirilglisin) tarafından inhibe olmaz. Sıçan böbreğinde bulunan enzim için  $K_i$  değeri yaklaşık 1.5 mM'dır. Bu inhibisyon glutamat ile non-allosterik ve kompetitifdir. Fare böbreğinde hücre içi GSH düzeyi yaklaşık 4 mM gibi yüksek bir değere sahipken, bu değer glutamat için yaklaşık 3 mM'dır. Bu bulgular  $\gamma$ -GCS'nin

*in vivo* maksimal oranda çalışmadığını göstermektedir. *E. coli* ve sıçan böbreğindeki enzimler L-protiyonin-SR-sülfoksimin ve L-bütiyonin-SR-sülfoksimin (BSO) gibi amino asit sülfoksiminlerin trans analogu olan maddeler tarafından inhibe edilir. Sıçan böbreğinde bulunan enzimler sistamin, D- $\gamma$ -metilen glutamat, S-sülfosistein ve S-sülfohomosistein, L- $\alpha$ -amino-4-okso-5-kloropentonat, D ve L-3-amino-1-kloro-2-pentanon tarafından da inhibe edilirken, *E. coli* enzimleri bu bileşiklerle inhibe olmamaktadır. Bu çalışmalar enzimin aktif bölgesinde ya da aktif bölgesine yakın yerde bir tiyol grubunun bulunduğunu göstermektedir.

Sıçan böbrek enzimlerinin ağır alt ünitesi katalitik olarak aktiftir ve glutamat için  $K_m$  değeri holoenzim'e göre yaklaşık 13 kat daha yüksektir. Hafif alt ünite katalitik aktiviteye sahip değildir, fakat ayrı olarak çoğaltıldığında ve ağır alt ünite ile karıştırıldığında glutamat için  $K_m$  değeri hemen hemen normal düzeye ulaşmaktadır. Ağır alt ünite ve holoenzim, GSH tarafından inhibisyona uğrar ve ağır alt ünite GSH inhibisyonuna karşı daha duyarlıdır. Aynı zamanda ağır alt ünite optalmik asit tarafından da inhibe edilir. Holoenzim ditiyotreitol ile muamele edildiğinde optalmik asit tarafından inhibe olabilmekte, bu durum bir indirgenme basamağının inhibisyon için gerekli olduğunu ve hafif alt ünitenin düzenleyici fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Anderson,1998).

Sıçan veya insan  $\gamma$ -GCS enzimi bir alt üniteler arası disülfid bağı ile stabilize edilmektedir. GSH ve ditiyotreitol varlığında  $\gamma$ -GCS dimerlerinin ayrılmaması dimer stabilitesinde non-kovalent güçlerin etkin olduğunu göstermektedir. Disülfid bağının varlığı veya yokluğunun substrat veya inhibitörlere karşı affiniteyi düzenlediği düşünülmektedir (Griffith, 1999).

$\gamma$ -Glutamilsisteinil sentetaz enzimindeki alt ünitelerin hidrofobik etkileşimlerle bir arada tutulduğu belirlenmiştir (Anderson,1998).

Steady state kinetiği, reaksiyonun herhangi bir ürün oluşmadan önce bütün substratların bağlandığı kuaterner bir kompleks içerisinde ilerlediğini göstermektedir. Bununla beraber, kimyasal mekanizma, L- glutamat ve ATP'nin  $\gamma$ -glutamil fosfat oluşturmak üzere sıkıca bağlandığı, ilk basamak ve son ürünü oluşturmak üzere oluşan ara bileşiğin L-sistein ile yaptığı ikinci basamak şeklinde iki farklı basamağı

içermektedir. Her iki basamakda kinetik kuaterner kompleks içerisinde gerçekleşmektedir (Griffith,1999).

$\gamma$ -Glutamilsisteinil sentetaz glutamil bağı için spesifiktir ve ağır üitedeki Lys-38 rezidüsü glutamatın bağlanmasında görev almaktadır.  $\gamma$ -GCS aktivitesi sıçanlar ve insanda fizyolojik olarak şu şekilde düzenlenmektedir.

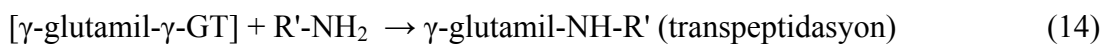
1) GSH'nin feedback kompetitif inhibisyonu: GSH'nin inhibisyonu non-allosteriktir, glutamat merkezine ve enzim üzerindeki bir başka bölgeye bağlanması ile gerçekleşir. İkinci bağlanma bir metil grubu ile değil GSH'nin tiyol halkası ile etkileşimi şeklindedir.

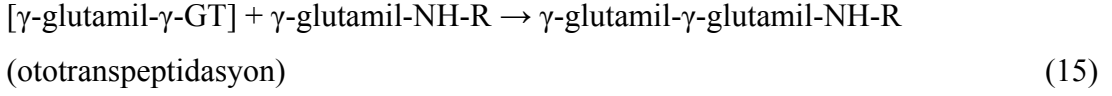
2) Yapıtaşı L-sistein amino asitinin kullanılabilirliği: İnsan ve sıçanlarda  $\gamma$ -GCS'nin glutamat ve sistein için  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.1-0.3 mM'dır. İntrasellüler glutamat derişimi  $\gamma$ -GCS'nin glutamat için verdiği  $K_m$  değerinden birkaç kat daha yüksektir; fakat intrasellüler sistein derişimi enzimin sistein için olan  $K_m$  değerine yakındır. Bu nedenle  $\gamma$ -GCS aktivitesi ve intrasellüler sisteinin kullanılabilirliği GSH sentez oranını etkileyen en önemli faktörlerdir (Lu, 1999).

#### 1.4.2. $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz

Glutasyon birçok hücre tarafından doğrudan alınamaz. Bu nedenle ilk olarak GSH'nin yapıtaşı olan amino asitlere hidrolize edilmesi gerekmektedir. Oluşan amino asitler hücre membranındaki amino asit taşıyıcı proteinler tarafından hücrelere taşınabilir.  $\gamma$ -Peptid bağı GSH'nin proteazlara karşı dayanıklılığını sağlamaktadır. GSH'ı parçalayabilen tek enzim  $\gamma$ -GT'dir. (Hanigan, 1998).

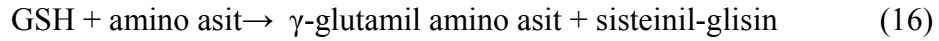
Aktivatör veya inhibitörlerin varlığı, pH gibi reaksiyon koşullarına, donör ve akseptör çeşidine bağlı olarak,  $\gamma$ -GT  $\gamma$ -glutamil halkasının suya (hidroliz), bir akseptöre (transpeptidasyon) veya bir donöre (ototranspeptidasyon) transferini katalizlemektedir (Reaksiyon 12-15) (Bluvshtein ve ark., 1999).





$\gamma$ -Glutamil transpeptidaz tek polipeptid zinciri olarak ribozomlarda sentezlenir. Post translasyonel modifikasyon ile iki alt üniteye ayrılır ve bunlar glikolizlenir ve siyalik asit rezidüleri eklenir. Protein hücre yüzeyinde lokalize olur ve büyük alt ünitenin amino ucundaki bir transmembran segmenti ile membranda çatallanmış olarak bulunur. Enzimin bütün katalitik aktivitesi ekstrasellüler kısımda gelişir (Hanigan, 1998).

Ekstrasellüler GSH'a etki ederek glutamat rezidüsünü sistein, metiyonin, glisin gibi diğer amino asitlere transfer eder (Reaksiyon 16):



Sisteinil-glisin dipeptidi hücreler tarafından alınarak hidroliz edilir.  $\gamma$ -glutamil amino asiti 5-oksoproline dönüştürülür ve daha sonra glutamat amino asiti veya glutamil-sistein dipeptidini oluşturur.

Bu enzim GSH-ksenobiyotik konjugatları, GSH ve GSSG üzerine etkilidir. GSH ve GSSG için transpeptidazın  $K_m$  değeri mikromolar düzeydedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). GSH ve GSH konjugatları bu enzim için hücrelerde bol bulunan fizyolojik substratlardır. Birçok elektrofilik bileşiğin GSH ile konjugasyonu bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GSH konjugatları aktif olarak hücre dışına atılır. Bu bileşikler  $\gamma$ -GT'nin bulunduğu proksimal tübüllere geçerek böbreklerde metabolize olurlar.  $\gamma$ -GT ilk olarak GSH'daki  $\gamma$ -glutamil grubunu kopartır. Bu grubun koparılması GSH konjugatlarının merkaptürik asitlere dönüşümünün ilk reaksiyonudur. Merkaptürik asitler genellikle detoksifikasyon reaksiyonları sırasında oluşmaktadırlar.

İnsan ve hayvanlarda  $\gamma$ -GT vücuttaki bez ve kanalların lüminal yüzeylerinde sentezlenmektedir. Böbrek proksimal tübüllerinin lüminal yüzeylerinde maksimum derişimlerine ulaşmaktadır. GSH glomerüller tarafından alınmaz ve bu nedenle renal tübüllerden geçerken absorbe edilmesi gerekir.  $\gamma$ -GT'nin inhibe olması idrarla

yüksek oranlarda GSH atılmasına neden olmaktadır.  $\gamma$ -GT aynı zamanda testis tübülleri, intestinal kriptler, pankreatik acini, safra kanalları, prostat ve ter bezlerinde de bulunmaktadır. Bütün bu dokularda  $\gamma$ -GT vücuttaki GSH'ın yapıtaşı olan amino asitlerin geri kazanım mekanizmasının bir parçası olarak görev almaktadır (Hanigan, 1998).

### 1.5. Hücresel Glutasyon Düzeyinin Azalması

Hücresel GSH düzeylerinin azalması asetaminofen ve bromobenzen gibi birçok kimyasal ile yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalar açıkça göstermektedir ki; GSH-ksenobiyotik konjugatlarının oluşması sitosolik GSH düzeylerini azaltmakta ve membran bütünlüğünün kaybı, lipid peroksidasyonu ve artan GSSG düzeyleri ile belirlenen oksidatif strese artışlara neden olmaktadır (Reed, 2000).

Dokularda GSH düzeylerini azaltan faktörleri 3 grupta toplamak mümkündür:

- 1) Sınırlı GSH sentezi
- 2) GSH kullanımındaki artış
- 3) İntrasellüler GSSG redüksiyonundaki azalma

Hücresel GSH düzeyleri oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle ROS ve nitrojen türlerinin etkisinde hücresel GSH düzeyleri hızla azalmaktadır. GSH'ın GSSG'ye oksidasyonu bu nedenle oksidatif stresin erken bir markırı olarak değerlendirilmektedir.

Glutasyon kullanımındaki diğer önemli bir yol ilaçların ve çevresel kirlleticiler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasıdır. Bu nedenle deney hayvanlarına S-transferaz reaksiyonunun bir substratı olan dimetilmalat enjeksiyonu ile GSH eksikliği olan hayvanlar hazırlanabilmektedir. Hayvan çalışmaları kan plazması, akciğer sınır sıvısı ve ince barsak lümenindeki GSH havuzlarının kimyasal toksisitesine karşı korunmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu havuzlardaki GSH ekstrasellüler olarak kimyasalların detoksifikasyonunu sağlar, hücrelere GSH ve yapıtaşlarını sağlar ve hasara karşı plazma membranını korur.

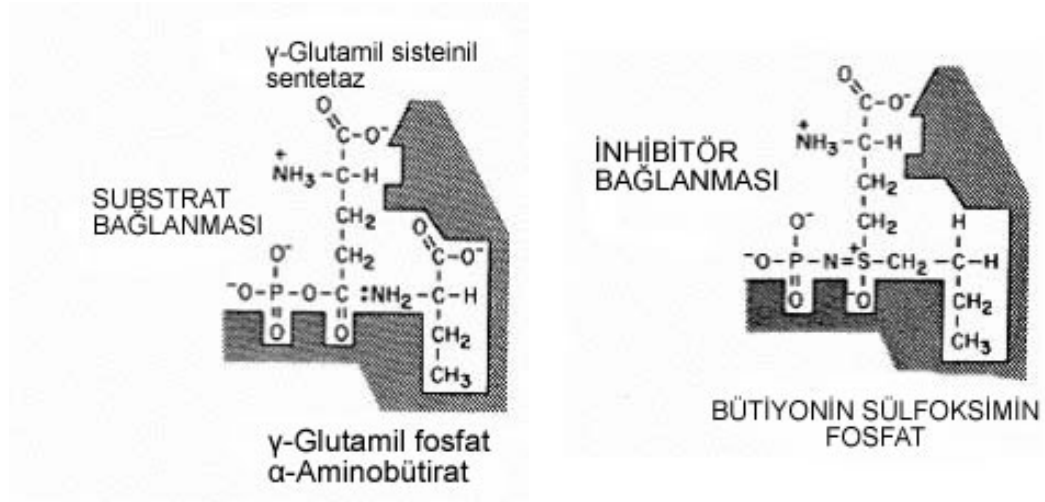
Daha öncede belirtildiği gibi GSSG'nin GSH'a indirgenmesi hücre içinde GR tarafından katalizlenmektedir. GR mitokondriyal matrikste ve sitosolde yer

almaktadır. GR aktivitesi kofaktör olarak eşdeğer miktarda NADPH'ye gereksinim duymaktadır. Hücrede NADPH üretimini sınırlayan faktörler GSSG'nin GSH'a indirgenmesinde düzensizlikler yaratır ve GSSG akümülyasyonuna neden olur. Akümüle olan GSSG hücrelerden dışarı atılır. GSSG'nin hücre dışına atılmasının bir sonucu olarak hücrede GSH rejenerasyonu için gereken substratların oranı belirgin bir şekilde azalır. Hücrede NADPH stoklarını azaltan koşullar glukoz metabolizmasındaki düzensizlikler ve oksidatif stres gibi olaylardır. Oksidatif stres durumunda NADPH'nin hızla okside olduğu bilinmektedir. Dokularda oksidatif stres açık bir şekilde intrasellüler GSH/GSSG oranını azaltmaktadır.

Hücre içindeki GSH sentezi GSH düzeyinin kendisi tarafından düzenlemektir. Bu nedenle intrasellüler GSH düzeyleri GSH oranı için bir sınır faktörü olarak tanımlanmaktadır. İntrasellüler GSH düzeyini sınırlayan en genel faktör  $\gamma$ -GCS'nin aktivitesini sınırlayan substrat olan sistein kullanılabiliirliğidir. Sistein indirgenmiş formunda stabil değildir. Bu nedenle insanda dolaşımda ve hücre kültürlerinde büyük oranda sistin formunda bulunmaktadır (Sen, 1997).

Glutasyon biyosentezinde genetik hastalığı bulunan kişilerin hücrelerinin kullanılabilmesine ve bunun bazı çalışmalarda yararlı olmasına karşın, GSH eksikliğinin doğası henüz anlaşılamamıştır. Birçok dokuda GSH metabolizması dinamikdir ve bu nedenle GSH eksikliğinin etkileri üzerine yapılan *in vivo* çalışmalar son zamanlarda ilgi çekmektedir. Diamid, phorone, dietilmalat, t-bütilhidroperoksit gibi non-spesifik bileşikler GSH düzeyini azaltmak üzere kullanılmışlardır, fakat böyle bileşikler hücrelerde non-spesifik oksidasyona ve diğer etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle hücrede GSH'ın azaltılması için spesifik yöntemler tercih edilmektedir (Anderson, 1998).

Hücrede GSH düzeyleri  $\gamma$ -GCS'nin inhibe edilmesi ve bununla birlikte GSH kullanımını arttıran reaksiyonların birlikte kullanılması ile azaltılabilir. Bu modelde GSH'ın azalma oranı GSH'ın kullanımına bağlı olarak ve dokudan dokuya farklılık göstermektedir. En yaygın olarak kullanılan inhibitör sistein analogu bir bileşik olan BSO'dur (Şekil 1.4.). İki diastereoizomer olarak ticari formlarda bulunmaktadır.



**Şekil 1.4.**  $\gamma$ -GCS'ye substrat ve inhibitörlerin bağlanması (Griffith, 1999).

Hem L,S hem de L,R-diastereoizomerleri bağlanma merkezi analoğu olarak  $\gamma$ -GCS'ye bağlanmalarına karşın, sadece L-bütiyonin-S-sülfoksimin mekanizma temelli bir inhibitördür. L-bütiyonin-S-sülfoksimin, L-bütiyonin-S-sülfoksimin fosfat oluşturmak üzere sülfoksiminin azot atomunun fosforilasyonu ile ATP'ye bağlanır. Mg-ATP varlığında bu ürün çok sıkı bağlıdır, fakat  $\gamma$ -GCS'nin aktif merkezinde bağ non-kovalenttir. Hücrelerin Mg-ATP içermeleri nedeniyle BSO, *in vivo* veya *in vitro* kullanıldığında irreversibl bir inhibitör olarak değerlendirilmektedir (Griffith, 1999).

Hücrelere BSO uygulanması radyasyon, mefelan, siklofosamid, civa iyonları, kadmiyum iyonları, cisplastin etkisinde hasara neden olmaktadır. İnsan lenfositleri ve T hücreleri BSO etkisinde daha uzun süre aktive olamamaktadır. Neonatal kemiricilerde BSO etkisinde katarakt oluşmaktadır. Farelerde uzun süre BSO etkisi ile GSH eksikliği meydana gelmektedir. Mitokondri kendi GSH'nı sentezleyemediği için intrasellüler GSH'ı kullanır. Burada elektron transport sistemi yoğun bir şekilde faaliyet gösterir ve bu sırada bazı ROS sistemden sızmaktadır. Mitokondri katalaz içermediği için ROS toksisitesine karşı GSH ile non-enzimatik olarak ya da GPx ile korunmaktadır. Uzun süren BSO etkisinde GSH düzeyi azaldığı zaman mitokondri ve hücreler vakuol içermekte ve endojen oksidatif stres modelini oluşturmaktadır. Bu tür mitokondri hasarı iskelet kası, jüjenum, kolon, akciğer tip 2 lameler hücrelerinde görülmektedir. Bu tür oksidatif hasar GSH esterleri ve askorbat gibi maddelerin

kullanılması ile önlenabilir. GSH eksikliğine model olarak BSO'nun kullanılması bazı GSH fonksiyonlarının açıklanmasında ilginç çalışmalar üretmekte ve intrasellüler GSH düzeyini artırmak için hazırlanan test terapileri için model olabilmektedir (Anderson, 1998).

### 1.6. Hücresel Glutasyon Düzeyinin Arttırılması

Hücresel GSH düzeylerinin arttırılması GSH düzeylerinin azaldığı koşullarda yararlı olabilmektedir. Hücre GSH düzeylerinin arttırılması iki şekilde başarılabilmektedir:

- a) Hücrelere eksojen olarak sentezlenen GSH'ın doğrudan ulaştırılması ile
- b) GSH sentezinin arttırılması ile.

Glutasyon hücrelere ince barsak hücreleri dışında etkili bir şekilde taşınamaz ve çoğunlukla hücre dışında parçalanır. Bu parçalanma ürünleri GSH'ı oluşturan amino asitler olup hücre içinde GSH'ın *de novo* sentezi için substrat olarak kullanılabilirler. GSH verilmesi karaciğer, iskelet kası, akciğer, böbrek, kalp gibi organların dokuları için kullanışlı değildir.

Hücresel GSH depolarının direkt olarak arttırılması GSH esterleri uygulanarak da başarılabılır. GSH monoglisil ester ve GSH dietil ester gibi GSH esterleri bu amaçla kullanılmaktadır. GSH hidrofiliktir ve membranlardan geçemez. Fakat GSH esterleri lipofiliktir ve membranlardan geçebilirler. Ancak dokularda GSH havuzunu arttırmak için bu tür esterlerin kullanılması da bazı sınırlamalar vardır. GSH monoesterlerinin metal iyonu kontaminasyonu bu bileşiklerin GSH sağlayıcı ajanlar olarak görev yapma kapasitesini önemli düzeyde azaltır. GSH dimetil ester gibi GSH esterlerinin bilinen formları fareler için toksik olabilmektedir. Metil, etil, izopropil ve *n*-propil gibi GSH monoesterleri de hazırlanmaktadır. Hidrolizleri sonucu oluşan alkollerin düşük toksisiteye sahip olması nedeniyle GSH monoesterler ve GSH monoisopropilesterler daha çok tercih edilmektedir. Bazı GSH esterleri plazmada esteraz aktivitesi ile ester formu bozularak hücre membranlarından geçme yeteneklerini kaybetmektedirler.

N-asetil-L-sistein (NAC; 2-merkaptopropionil glisin) GSH öncüsü olarak araştırılmıştır. NAC'nin ROS'u detoksifiye edebilme özelliğine ilaveten sistein sağlayıcı bir ajandır. Hücre içine girdikten sonra sistein oluşturmak üzere hızlı bir şekilde hidrolize olur. Ancak N-asetil-D-sistein ve NAC'nin okside disülfid formu birçok dokuda deasetile edilemez. Okside NAC, sistein oluşturmak üzere hidrolize uğramadan önce disülfid bağı koparılmalıdır. NAC klinikte mukolitik ajan olarak kullanıldığı için insandaki kullanımı diğerlerine göre daha güvenli görünmektedir. NAC'nin intestinal mukoza ve intestinal lümendeki deasetilasyonu oral kullanılabilirliğinin belirlenmesinde önemlidir. NAC ile ilgili farmakokinetik ve metabolik çalışmalar oral kullanılabilirliğinin %10 civarında olduğunu göstermektedir (Sen,1997).

### 1.7. Test Organizması

Bu çalışmada materyal olarak bir balık türü olan *Oreochromis niloticus* seçilmiştir. *O. niloticus* nehir, göl, atık su ve sulama kanalları gibi tatlı su habitatlarında yaşayan tropikal bir türdür. Sıcaklık ve pH toleransı geniştir, omnivor olarak beslenir. İnsanlar tarafından besin olarak tüketildiği için ticari öneme sahiptir (<http://www.fishbase.org>).

Su, yaşam ortamlarını oluşturduğu için balıklar kontaminantların doğrudan etkisinde kalmaktadır ve bu maddeler hakkında erken uyarı sağlamaları bakımından önemlidir. Balıklarla yapılan çalışmalar, kontaminantların biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon yoluyla insan besin zincirine girerek yapacakları zararlar hakkında bilgi sağlamaktadır (Fabacher ve Little, 2000).

Balıkların kontaminantlara vermiş olduğu fizyolojik yanıtlar yüksek omurgalıların bu bileşiklere verecekleri yanıtlar hakkında bilgi verici olmaktadır (Fabacher ve Little, 2000). Balıklarla ilgili araştırmalar, balıklarla memelilerin oksidatif strese karşı benzer toksikolojik ve adaptif yanıtlar verdiğini göstermiştir, balıklar oksidatif toksisite mekanizmasının anlaşılmasında model organizmalardır (Kelly ve ark., 1998). Çalışmalar balıklardaki bazı enzimlerin ve antioksidant

bileşiklerin kirleticilerin biyomarkırları olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Intorre ve ark., 2004).

Pestisidler akuatik organizmalarda oksidatif strese neden olan başlıca kontaminantlar arasında yer alır.

### 1.8. Pestisidler

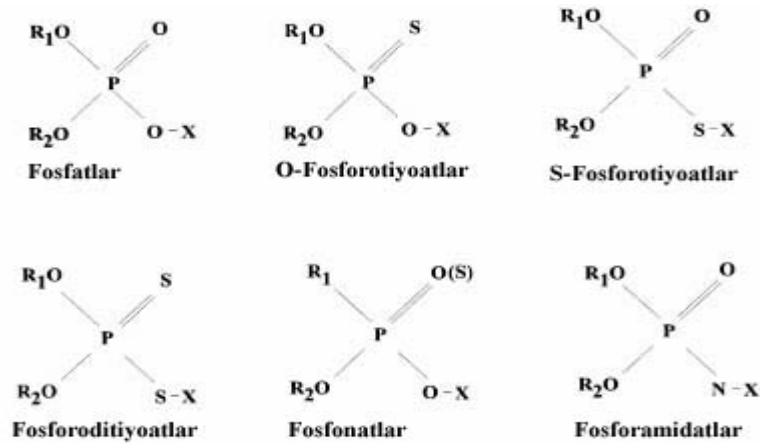
Pestisidlerin çoğu akuatik yaşam için oldukça tehlikelidir. Akuatik ortamlardaki pestisid kirliliği yağmur sularının bu bileşikleri tarımsal alanlardan akuatik ortamlara taşınması ile olduğu kadar, pestisid spreyelerinin hava koşullarına bağlı olarak bu ortamlara taşınması ile de olmaktadır. Aynı zamanda evsel ve endüstriyel uygulamalardan sonra yüzey akıntıları ve drenaj kanalları aracılığı ile de nehirlerle veya göllere ulaşmaktadır (Birgham, 2005).

Günümüzde kullanılan pestisidlerin büyük bir kısmı OP, karbamatlı ve sentetik piretroid bileşiklerdir. OP pestisidler 1930'lu yıllarda Almanya'da kimyasal savaş ajanları olarak üretilmiştir. Çevrede hızlı degradasyon özellikleri nedeniyle dünya çapında en yaygın olarak kullanılan insektisid grubu olmuştur. Bu özelliğin önemli bir avantaj sağlamasına karşın, genellikle hedef organizma spesifiklikleri çok düşüktür ve hedef olmayan birçok omurgalı ve omurgasız türüne karşı yüksek akut toksisiteye sahiptir. Bu nedenle birçok karasal ve akuatik organizma çevredeki bu bileşiklerin etkisi ile zehirlenme riski altındadır (Fulton ve Key, 2001). OP pestisidler çok düşük derişimlerde (ng) akuatik omurgalı ve omurgasızlarda toksik etkiler oluşturabilirler. Özellikle balıklar OP toksikantlara karşı çok duyarlıdırlar (Hai ve ark., 1997).

#### 1.8.1 Organofosforlu Pestisidler

Organofosforlu pestisidler genellikle insektisid olarak kullanılmakla birlikte bir kısmı herbisid olarak kullanım bulmaktadır. Fosfor içeren bu pestisidlerin büyük bir kısmı fosforik veya tiyofosforik asitlerin ester, amid veya tiyol türevleridirler.

Oksijen veya sülfür atomlarının konfigürasyonlarına bağlı olarak OP bileşikleri 6 ana gruba ayırmak mümkündür (Maroni ve ark., 2000) (Şekil 1.5.).



**Şekil 1.5.** Organofosforlu pestisidlerin ana gruplarının genel yapısal formülleri (Maroni ve ark., 2000).

Organofosforlu pestisidler solunum, gastrointestinal, oküler ve dermal olmak üzere çeşitli yollar ile vücuda girebilirler (Kwong, 2002). OP bileşiklerin absorpsiyon hızları temas süresine, bileşiğin lipofilitesine ve bileşiği taşıyan çözücü tipine bağlı olarak değişmektedir. Fenthion, diazinon, parathion ve bromophos gibi fosforotiyoatlar dichlorvos gibi fosfatlardan daha lipofilik olup yağ dokusunda fazlaca birikirler. Bunlar vücuda girdikten sonra yağ dokusu, karaciğer ve böbrekte hızla dağılır ve birikebilirler. OP bileşikler genelde lipofilik olduklarından kan-beyin engelini de rahatlıkla geçebilmektedirler (Vale, 1998). Toksik metabolitleri ya da orjinal formlarında depolanabilen OP bileşiklerin yağ dokusunda depolanmaları bu bileşiklerin yağda çözünürlük oranlarına bağlıdır (Jokanovic, 2001). Moleküllerin lipofilitesi karbon zinciri uzunluğunun ve suda çözünürlüklerinin belirlenmesi ile ölçülebilir. Eğer molekül suyu tercih ediyorsa hücre lipidlerinde birikme olasılığı yoktur, eğer organik solventleri tercih ediyorsa lipidlere bağlanma eğilimindedir. Oktanol su partiyon katsayısı ( $K_{ow}$ ) bileşiklerin lipofilikliklerinin ifadesi olup, toprak ve sediment partiküllerine nasıl bağlandıklarının anlaşılmasında kullanılan bir parametredir; ancak bundan daha da önemlisi kimyasalların bitki ve hayvan dokularında membranlardan geçebilirliklerinin belirlenmesinde kullanılmasıdır. Bu

katsayı 3'den büyük ise kimyasal özellikle yağ gibi organik maddelere bağlanma eğilimindedir ve besin zinciri yoluyla artarak birikebilir (Shaw ve Chadwick, 1998).

Organofosforlu bileşikler vücuda absorbe olduktan sonra biyotransformasyon reaksiyonlarına uğrarlar. Biyotransformasyon reaksiyonları ilk olarak bunların daha polar konjugantlara dönüştürülmesini içerir. OP bileşiklerin aktivasyonu inaktif OP bileşiklerin aktif bileşiklere ya da aktif OP bileşiklerin diğer aktif bileşiklere dönüşümünü içeren metabolik transformasyon olarak tanımlanabilir. Detoksifikasyon ise OP bileşiklerin toksik olmayan metabolitlere dönüşümünü içerir. Detoksifikasyon ve degradasyon vücutta OP bileşiklerin metabolizmasında en önemli reaksiyonlardır ve bu bileşiklerin aktivasyonu detoksifikasyonla sonuçlanır. OP bileşiklerin metabolik detoksifikasyonları genellikle negatif yüklü fosfor gruplarından birinin koparılması ile gerçekleşir. Fosfor gruplarındaki bu negatif yük OP bileşiklerin antikolinerjik ajan aktivitesine izin vermez. Detoksifikasyon sonucu oluşan metabolitlerin antikolinerjik etkileri daha düşüktür ve bu metabolitler aynı zamanda idrar yoluyla uzaklaştırılabilen suda çözünür bileşiklerdir (Jokanovic, 2001).

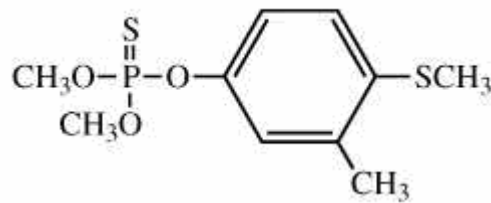
#### 1.8.1.1. Fenthion

Fenthion 1960 yılında Bayer firması tarafından geliştirilmiş (www.abcbirds.org) O-fosforotiyoat grubu (Pehkonen ve Zhang, 2002) OP bir insektisid ve avisiddir (Mullie ve ark., 1999). Fenthionun log K<sub>ow</sub> değeri 4.02'dir ve oldukça lipofilik bir bileşiktir (Pehkonen ve Zhang, 2002).

Moleküler ağırlığı: 278.3

Kimyasal Formülü: O, O-Dimethyl-O-(4-methylthio-m-tolyl) phosphorothioate

Kapalı Formülü:



Sinonimleri: Baytex, Lebaycid, Queletox, Tignvon, OMS-2

Fiziksel özellikleri: Saf madde renksiz ve hemen hemen kokusuzdur. Teknik materyal %95-98 saflıktadır, hafif sarımsak kokulu, kahverengi ve yağlı bir sıvıdır.

Kaynama noktası: 0.01 mmHg'da 87°C

Çözünürlüğü: 20°C suda 54-56 ppm, gliserid yağları ve birçok organik çözücüde çözünebilmektedir.

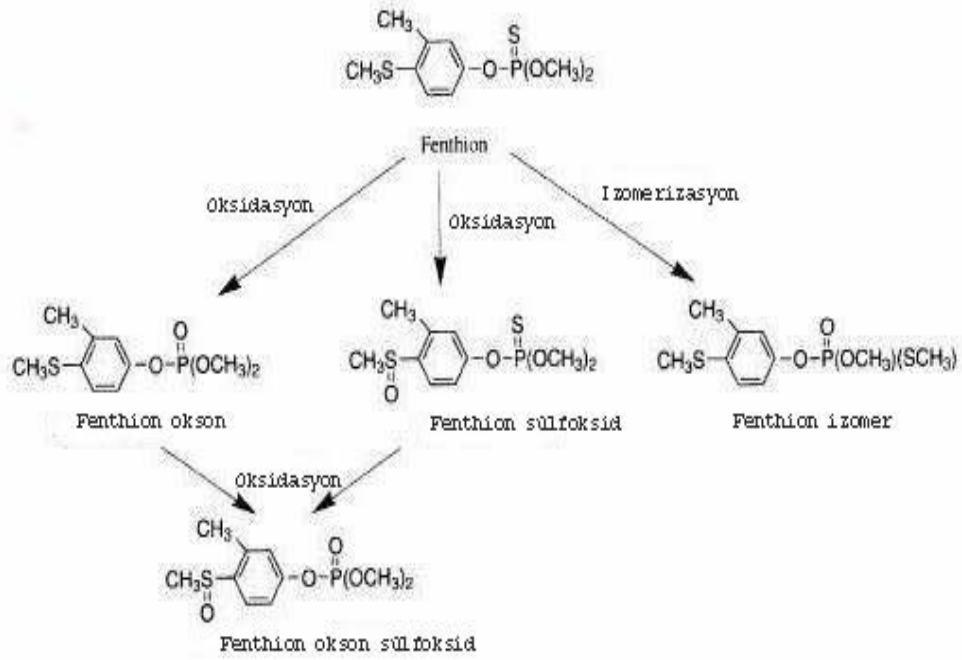
Stabilitesi: 160°C'ye kadar stabil, ışığa ve alkaline hidrolizine karşı dirençlidir.

Buhar basıncı (Uçuculuğu): 20°C'de  $4 \times 10^{-5}$  mmHg, düşük buhar basıncına sahip olmasına karşın az miktarda uçucudur (WHO, 1976).

Endokrin disrupter bileşikler balık populasyonlarında büyüme ve üreme bozuklukları, gelişmenin değişmesi ve anormal davranışlar ortaya çıkmasına neden olan kimyasallardır. Balıklarda bu bileşiklerin bazı spesifik etkileri hormon biyosentezi, metabolizması, biyokullanılabilirliği veya transportunda değişimler meydana getirmeleridir (Van Der Kraak ve Lister, 2002). Fenthion antiandrojenik etkiye sahip bir endokrin disrupter bileşiktir. Fenthion dihidrotestosteronun androjenik aktivitesinin bir antagonisti olarak rol oynamaktadır ve aktivitesi flutamide etkisi ile aynı düzeydedir. Fenthionun bu etkisi en önemli metaboliti olan fenthion sülfoksida dönüşmesi ile sona ermemektedir (Kitamura ve ark., 2003).

Fenthionun N-bromosüksinimid ile oksidasyonunda dört farklı oksidatif metabolit meydana gelmektedir. Bunlar fenthion izomer, fenthion okson, fenthion sülfoksid ve fenthion okson sülfoksiddir (Şekil 1.6.) (Lacorte ve ark., 1997). Fenthionun bitki ve hayvanlarda biyotransformasyonu ile beş önemli metabolit oluşur. Bunlar; fenthion sülfoksid, fenthion sülfon, fenthion okson, fenthion okson sülfoksid ve fenthion okson sülfondur (Cabras ve ark, 1991). Fenthionun *Carassius auratus*'da fenthion sülfoksida yükseltgendiği ve bu sülfoksidin tekrar ana fenthiona indirgendiği, ancak fenthion ve fenthion sülfoksiden fenthion sülfonun balıklarda oluşmadığı, fenthion sülfoksidin, fenthiondan daha kolay atıldığı ve fenthionun fenthion sülfoksida dönüşümünün bu pestisidin balık dokularındaki akümülyasyonun da önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Kitamura ve ark., 2000). OP bileşiklerin oksidasyon ürünleri toksisitesi yüksek antikolinesteraz bileşiklerdir (Jokanovic, 2001). Fenthion balıklarda fenthion oksona desülfüre edilebilmektedir

ve fenthion okson kuvvetli asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) inhibitörü olarak etki gösterir (Kitamura ve ark., 2000).



**Şekil 1.6.** Fenthionun N-bromosüksinimid ile oksidasyonu sonrası oluşan degradasyon ürünlerinin şematik gösterimi (Lacorte ve ark., 1997).

### 1.9. Kolinesterazlar

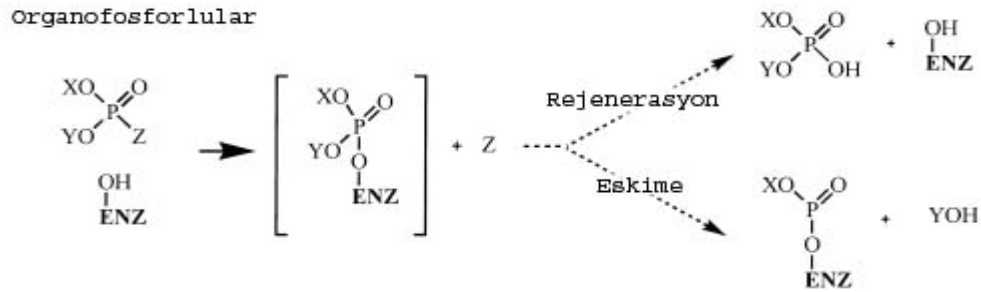
Organofosforlu pestisidler AChE ve butirikolinesteraz'ı da (BChE; EC 3.1.1.8) içeren karboksilik ester hidrolazların kuvvetli inhibitörleridirler (Kwong, 2002). Bu enzimler nörotransmitter asetilkolinin (ACh) sinaptik yarıklardan hidroliz yolu ile uzaklaştırılmasını sağlayan enzimlerdir. ACh simpatik sinir sisteminin bir preganglionik transmitteri olarak ve parasimpatik sinir sisteminde bir preganglionik ve postganglionik transmitter olarak da işlev yapmaktadır. Merkezi sinir sisteminin kritik bölgelerinde bir uyarıcı transmitter olarak fonksiyon gösterir. OP bileşiklerin bağlanması ile sinir sinapslarında ACh birikimi meydana gelir ve normal sinir sistemi fonksiyonu engellenir. Bu durum paralizi takiben istemli kaslarda kasılmalara neden olmakta ve yüksek doz etkisinde canlının ölümü ile sonuçlanmaktadır.

Kolinesterazlar iki büyük gruba ayrılırlar, bunlar AChE ve BChE'dir. Balıklarda beyin ve kas dokusu büyük oranda AChE içerirken karaciğer ve plazma daha çok BChE içermektedir. Bununla beraber bazı balık türlerinde kas dokusunda önemli düzeyde BChE aktivitesinin olduğu belirlenmiştir (Fulton ve Key, 2001). AChE'nin asıl fizyolojik fonksiyonu sinir impulslarının iletimi sırasında kolinerjik sinapslarda aracılık eden ACh'nin yıkılmasıdır. BChE'nin rolü henüz tam olarak belirlenememiştir, bununla birlikte görevinin dokularda AChE tarafından temizlenemeyen ACh'i uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir. Fazla miktarda ACh, AChE'nin inhibisyonuna neden olmakta ve BChE aktivitesini arttırmaktadır. Bu nedenle doku ACh düzeyi yüksek olduğunda BChE aktivitesi ACh'nin yıkılmasında daha etkili olmaktadır. Balıklarda her iki ChE aktivitesi arasında bir ilişki bulunmakta, beyin ve plazmada BChE aktivitesi sadece AChE aktivitesi yüksek düzeyde olan türlerde ölçülebilmektedir (Chuiko ve ark., 2003).

Asetilkolinesteraz diğer kolin esterlerine göre ACh'yi oldukça hızlı bir şekilde hidrolize ederken butirilkolin üzerine etkili değildir. BChE ise substrat olarak butirilkolini kullanmasına karşın ACh ve diğer kolin esterlerini de iyi bir şekilde hidrolize etmektedir. Her iki enzimde selektif inhibitörlere sahiplerdir. BW284c51 ve GD-42 AChE için, iso-OMPA, diisopropil fosforofloridat (DFP), GT-106 ve etopropazin BChE için spesifik inhibitörlerdir (Chuiko, 2000).

Asetilkolinesteraz nörotransmitter ACh'nin oldukça hızlı bir şekilde hidrolizini sağlayan en etkili enzimlerden biridir. ACh bir enzim ara bileşiği oluşturmak üzere AChE'nin aktif merkezindeki 203 no'lu serin rezidüsünün hidroksil grubuna bağlanır. Bu ara bileşiğin yıkılması aktif enzimin rejenere olmasını sağlar ve bu sırada ACh hidrolize edilmiş olur. OP bileşiklerin toksik etkilerinin moleküler mekanizması, enzimin aynı rezidüsünün fosforilasyonuna ve AChE-OP ara bileşiğinin oluşmasına dayanmaktadır (Şekil 1.7.). Fosforile olan enzim çok daha stabildir ve aktif enzimin rejenerasyonu ve hidroliz reaksiyonu çok daha yavaştır. Bazı fosforile enzimlerin rejenerasyon oranları o kadar yavaştır ki enzim neredeyse inaktif durumdadır. Bununla beraber, fosforile enzimlerden bazıları aktif enzime rejenere olmadan önce ilk 24-48 saat içinde bir alkil grubu kaybedebilirler. Bu süreç enzimin "eskimesi" (aging) denir. Eskimiş bir enzim kalıcı olarak fosforile halde

kalır. Spontan hidroliz ile veya bir oksim bileşiğinin verilmesi ile de rejenere edilemez.



**Şekil 1.7.** AChE'nin organofosforlu bileşiklerle inhibisyon mekanizması (Kwong, 2002).

Genelde OP bileşiklerin AChE enzime affinitelerini, hidroliz zamanını ve enzimin rejenerasyonunu yan gruplarının kimyasal yapıları belirlemektedir (Kwong, 2002).

Organofosforlu bileşikler AChE'nin direkt ve indirekt inhibitörleri olarak gruplandırılabilir. Bu sınıflamada direkt inhibitörlerde semptomlar kısa zamanda gözlenirken, indirekt inhibitörlerde daha yavaş ve daha uzun sürelidir. Direkt inhibitörler vücuda alınmalarından sonra herhangi bir metabolik aktivasyona gerek olmadan etkinliklerini gösterir. İndirekt inhibitörler ise etkinliklerini göstermek için canlıda dönüşüme uğramak zorundadır. Fosforotiyoatlar gibi tiyono OP (P=S) bileşikleri AChE'nin direkt inhibitörleri olarak işlev göremezler, oksijen analoglarına dönüşmeleri, yani P=S grubunun P=O'ya oksidasyonu ile aktivasyonları gerekmektedir. Reaksiyon mikrozomların NADPH-bağımlı karma fonksiyonlu oksidazlarından bir enzim grubu tarafından katalizlenir. Karaciğerin bu reaksiyonun gerçekleştirildiği en önemli organ olmasına karşın biyoaktivasyon beyin gibi diğer dokularda da meydana gelmektedir (Maroni ve ark., 2000).

Asetilkolinesteraz inhibisyonunu izleme çalışmaları OP insektisid etkisinin bir göstergesi olarak tatlı su ekosistemlerinde yaygın olarak sürdürülmektedir. Birçok OP bileşiğin çevredeki miktarlarının analitik kimya teknikleri kullanılarak belirlenmesine karşın, çevrede AChE'nin izlenmesi analitik kimya çalışmalarına göre belirgin avantajlara sahiptir. Öncelikle AChE inhibisyonu OP bileşiklerinin

toksisitesinde ana mekanizmadır. Bu nedenle biyomarkır etkisi bu bileşiklerin toksik etki mekanizmaları ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Çevrede önemli AChE inhibisyonları ölçüldüğünde bu durum sadece organizmanın etkide kaldığı şeklinde değerlendirilmez, aynı zamanda hedef merkezde fizyolojik etki oluşturmak üzere bileşiğin yeterli derişimlere ulaştığını da anlatmaktadır. Bununla beraber OP bileşiklerin büyük bir kısmı çevrede hızlı bir şekilde yıkıma uğrarlar ve çevresel örneklerdeki derişimleri birkaç saat ile birkaç gün arasında hızla belirlenme düzeylerinin altına düşer. Birçok türde AChE inhibisyonu ise günlerce ve haftalarca kalıcılık gösterir (Fulton ve Key, 2001).

### 1.10. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu çok iyi tanımlanmış bir hücresel hasar mekanizması olup doku ve hücrelerde oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (Dorval ve ark., 2003).

Hücreyi ve mitokondri, lizozom ve peroksizom gibi organelleri saran membranlar yan zincirlerinde fazla miktarda poliansatüre yağ asitleri (PUFA) içeren yapılardır. PUFA iki veya daha fazla karbon-karbon çift bağı içeren yağ asitleridir.

Hayvan hücrelerinin membran lipidlerinin yağ asiti yan zincirleri dallanmamış karbon zincirlerine ve eşit sayıda karbon atomlarına sahiptir. Bu sayı genellikle 14-24 arasında değişmektedir.

Membran akıcılığı ansatüre ve PUFA'nın varlığına bağlıdır ve bu özelliği membranın düzgün işlev görmesi için çok önemlidir. PUFA'nın zarar görmesi membran akıcılığının azalmasına neden olmaktadır, bu da biyolojik membranların işlevlerini bozmaktadır. Lipoproteinler bu süreçte oksidatif hasarın hedef molekülleridirler.

Lipid peroksidasyonun başlamasına lipidlerdeki metilen (-CH<sub>2</sub>) grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması neden olmaktadır. Çifte bağı içermeyen ya da bir çifte bağı içeren yağ asitleri PUFA'dan daha dayanıklıdır, fakat PUFA yan zincirleri birçok membranda ve lipoproteinlerde bulunmaktadır.

Komşu bir çifte bağ, yakınındaki bir karbon atomuna bağlı hidrojen atomlarının (allilik hidrojenler) bağlanma enerjilerinin azalmasına neden olur ki bu durum özellikle -CH<sub>2</sub> grubunun her iki tarafında da çifte bağ varsa (bis-allilik) önemlidir. PUFA/PUFA çiftinin pH 7’de indirgeme potansiyelinin yaklaşık 0.6 V olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle HO·, HO<sub>2</sub>·, RO· ve RO<sub>2</sub>· radikallerinin hiç olmazsa termodinamik olarak PUFA okside etme kapasiteleri bulunmaktadır.

Hidroksil radikalleri hidrokarbon yan zincirleri ile karşılaştıklarında peroksidasyonu başlatabilirler (Reaksiyon 17):



Membranın dışında oluşan OH· hücre yüzeyindeki glikoproteinler gibi ekstrinsik proteinlerin ve fosfolipidlerin baş gruplarına da saldırabilir. O<sub>2</sub><sup>-</sup>’nin protonlanmış formu olan HO<sub>2</sub>·, O<sub>2</sub><sup>-</sup>’ye göre daha reaktiftir ve linoleik, linolenik ve arakidonik asitler gibi bazı yağ asitlerinden H kopartabilmektedir (Reaksiyon 18):



HO<sub>2</sub>· önceden oluşmuş olan lipid hidroperoksitleri ile de reaksiyona girerek peroksidasyonu stimule etmektedir. Bu reaksiyon H· çıkartılmasından öte, gözlenen peroksidasyonun stimülasyonunda en önemli yardımcıdır (Reaksiyon 19):



RO·, RO<sub>2</sub>·, HO· ve HO<sub>2</sub>· kadar bazı demir-oksijen komplekslerinin de H· çıkartarak peroksidasyonun başlamasına neden oldukları bilinmektedir.

Hidrojen atomunun sadece bir elektron taşıması nedeniyle -CH<sub>2</sub>- grubundan bir H’ın çıkarılması karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron (- $\dot{\text{C}}\text{H}$ -) bırakır. Bis-allilik metilen gruplarından H· çıkartılması çok daha kolaydır.

Oluşan karbon radikali bir konjuge dien oluşturmak üzere moleküler düzenleme ile stabilize edilir. Karbon radikalleri değişik reaksiyonlara uğrayabilirler.

Örneğin bir membran içerisinde bunlardan ikisinin çarpışması yağ asiti zincirlerinde çapraz bağlanmaya neden olur (Reaksiyon 20):



Bununla beraber karbon radikallerinin aerobik koşullar altında en sık görülen reaksiyonu  $\text{O}_2$  ile birleşmesidir.  $\text{O}_2$  ile reaksiyonu peroksil radikalini ( $\text{ROO}^\cdot$  veya  $\text{RO}_2^\cdot$ ) meydana getirir (Reaksiyon 21):



Bu durum lipid peroksidasyonunun ilerleme basamağıdır. Oluşan karbon radikali başka bir peroksil radikali oluşturmak üzere  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girebilir ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu devam eder. Peroksil radikali lipid hidroperoksit ( $\text{LOOH}$ ) oluşturmak üzere lipidden  $\text{H}^\cdot$  atomunun çıkarılmasını sağlar.

Tek bir başlangıç olayı zincir reaksiyonunun bir sonucu olarak pek çok peroksit molekülünün oluşmasına neden olur. Oluşan peroksit sayısı yağ asitinin çift bağ sayısına bağlı olarak artmaktadır.

Malondialdehid (MDA) uzun yıllar boyunca lipid peroksidasyonunda dikkat odağı olmuş bir peroksidasyon ürünüdür. Tiobarbiturik asit ile *in vitro* verdiği reaksiyon lipid peroksidasyonunun ölçülmesinde en yaygın olarak kullanılan test yöntemi olmuştur. MDA birçok lipidin peroksidasyonu sırasında az miktarda oluşmaktadır; fakat demir tuzlarının varlığında karaciğer mikrozomlarının peroksidasyonu sırasında yüksek miktarlarda meydana gelir.

Malondialdehid miktarı linolenik asit, arakidonik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi ikiden fazla çift bağ taşıyan serbest yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında büyük ölçüde artmaktadır. MDA pH'a bağlı olarak değişik formlarda bulunabilir. Fizyolojik pH'da MDA birçok amino grubuna karşı düşük reaktivliğe sahip olan enolat anyonu formunda bulunur. Bununla beraber, pH azaldığında reaktivitesi büyük oranda artar. Fizyolojik koşullarda proteinler serbest amino asitlerden daha sık olarak MDA tarafından saldırıya uğrarlar ve intra ve intermoleküler protein çapraz bağlanmaları olduğu gibi özellikle lizin gibi bazı amino asit rezidülerinde

modifikasyonlar da meydana gelir. MDA DNA bazları ile de reaksiyona girer ve mutajenik lezyonlar meydana getirebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### 1.11. Oksidatif Stres Çalışmalarında Beyin Dokusunun Önemi

Hayvanlarda aktivitelerin koordinasyonunu sağlayan sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi olmak üzere iki bölüm halinde incelenir. Beyin, merkezi sinir sisteminin bir parçasıdır (Bullock ve ark., 1998) ve balıklarda toplam vücut ağırlığının %1'ini oluşturmaya karşın, vücuda alınan O<sub>2</sub>'nin %3-7'sini tüketmektedir (Nilsson, 1996). Beyin oksidatif hasara karşı özellikle duyarlı bir organdır. Yüksek düzeyde ROS üretimine, yüksek oranda oksidatif metabolizmaya ve hücre membranlarında yoğun şekilde PUFA bulundurmasına karşın beyin nispeten düşük bir antioksidant savunma sistemine sahiptir. Farklı ROS temizleyicileri arasında GSH-bağımlı sistemler büyük bir öneme sahiptir. Bu sistem sadece peroksit temizleyicisi olarak görev yapmaz, aynı zamanda hücrelerin redoks durumunu da düzenler. ROS nörodejeneratif süreçlerde hasarın oluşmasında anahtar bir rol oynamaktadırlar. Nöral hücreler arasında astrositler oksidatif strese karşı daha dayanıklıdır. Yüksek GSH içeriğinin bu dayanıklılığa önemli bir katkısının olduğu da bilinmektedir. ROS'un temizlenmesi sırasında GSH okside edilir ve GSH-protein karışımı disülfidler meydana gelir. Bu nedenle GSH'ı redükte edebilen veya sentezleyebilen hücreler oksidatif stres olgusunu etkin bir şekilde yönetebilirler. Merkezi sinir sistemindeki lipoproteinler birçok beyin işlevini desteklemeleri açısından çok önemlidirler. Beyin membranlarındaki yüksek PUFA içeriği nispeten düşük bir savunmaya sahip olan bu dokuyu oksidatif hasara karşı özellikle önemli kılmaktadır (Mates, 2000).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Glutasyon redoks döngüsünde meydana gelen düzensizliklerin oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Bu nedenle GSH ve GSH ile ilgili enzimlerin ve lipid peroksidasyonunun kirliliğin boyutunu gösteren parametreler olarak kullanıldıkları çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu parametrelerin incelendiği çalışmaların bir bölümü laboratuvar koşullarında balıkların değişik dokularında pestisidlerin etkilerinin incelendiği araştırmalardır.

2,4-D herbisidinin ön maddesi 2,4-diklorofenolün farklı derişimlerinin etkisinde *C. auratus*'da karaciğerde GSH miktarının önemli düzeyde azaldığı, en yüksek derişim olan 1 ppm'de değişmediği belirlenmiştir. GSSG miktarının ise tüm derişimlerde önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. GR aktivitesinin en düşük iki derişim olan 0.005 ve 0.01 ppm'de azaldığı fakat diğer yüksek dozlarda değişmediği saptanmıştır. GPx aktivitesinin tüm derişimlerde artış gösterdiği, GST aktivitesinin ise düşük derişimlerde arttığı, diğer derişimlerde değişmediği belirlenmiştir. Total GSH miktarının en yüksek derişimde önemli düzeyde arttığı, GSH/GSSG oranının tüm derişimlerde azaldığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2004).

Herbisid sentezinde ön madde olarak kullanılan 3,4-dikloroanilin *C. auratus*'da karaciğerde total GSH miktarını önemli derecede azalttığı, MDA miktarını ise arttırdığı saptanmıştır (Li ve ark., 2003).

Herbisid atrazine etkisinde *Lepomis macrochirus*'da karaciğerde GSH, GSSG miktarı ve lipid peroksidasyonun arttığı saptanmıştır. Solungaçta ise GSH miktarı ve lipid peroksidasyonunun değişmediği, GSSG miktarının arttığı belirlenmiştir. GPx aktivitesinin karaciğerde derişime bağlı olarak azaldığı, solungaçta ise değişmediği bulunmuştur. GR aktivitesinin solungaçta belirlenemediği, karaciğerde derişim göstermediği bildirilmiştir. GST aktivitesinin her iki dokuda da derişime bağlı artış gösterdiği saptanmıştır (Elia ve ark., 2002).

Herbisid atrazinin *Brachydanio rerio* yumurtalarında embriyonik gelişimin her evresinde mikrozomal ve çözünebilir GST enzim aktivitelerinde derişime bağlı derişimler meydana getirdiği bildirilmiştir. Derişime bağlı olarak her embriyonik devrede mikrozomal GST aktivitesinin arttığı, en yüksek derişim olan 10 ppm'de

azaldığı belirlenmiştir. Çözünabilir GST aktivitesi derişime bağı artış göstermiştir (Wiegand ve ark., 2001).

*Onchorhynchus mykiss*'de karaciğerde herbisid paraquatın iki farklı derişiminde GR aktivitesinin tüm sürelerde önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir.  $\gamma$ -GCS ve GPx aktivitelerinin değişmediğı, GST aktivitesinin uzun süreli uygulamada derişime bağı olarak arttığı belirtilmiştir. Total GSH ve GSSG miktarının tüm sürelerde arttığı bulunmuştur (Stephensen ve ark., 2002).

*O. mykiss*'de karaciğer dokusunda paraquat enjeksiyonu ile GR aktivitesinin önemli derecede arttığı, aktivitenin böbrek dokusunda değişmediğı bildirilmiştir (Akerman ve ark., 2003).

Tiokarbamat bir herbisid olan thiobencarba dirençli *Anguilla anguilla*'da karaciğerde total GSH miktarının kontrole göre 4 kat daha fazla olduğu, duyarlı balıklarda karaciğer total GSH miktarının 2.5 kat daha az olduğu bildirilmiştir. Dirençli balıklarda GSH/GSSG oranının azaldığı ve GSSG miktarının duyarlı balıklara göre zamana bağı olarak arttığı saptanmıştır (Pena ve ark., 2000).

Tiokarbamat herbisid molinatın 29 saat etkisi sonunda ölen *A. anguilla*'larda karaciğer ve kas dokularında GSH miktarının azaldığı, GSSG miktarının ise değişmediğı bildirilmiştir. 48 saat sonunda ölen balıklarda karaciğer GSH ve kas GSSG miktarlarının değişmediğı fakat kas GSH miktarlarının azaldığı saptanmıştır. 72 ve 96 saat sonunda ölen balıklarda karaciğer GSH ve GSSG içeriklerinin arttığı, bununla birlikte kas GSH miktarının azaldığı, GSSG düzeylerinin değişmediğı belirlenmiştir. 96 saat sonunda ölmeyen balıklarda karaciğer GSH ve GSSG miktarının arttığı, kas GSH miktarının azaldığı ve GSSG düzeylerinin etkilenmediğı bulunmuştur. GSH/GSSG oranlarının karaciğerde ve kasta önemli derecede azaldığı saptanmıştır. GR aktivitesinin duyarlı balıklarda azaldığı, dirençli olanlarda arttığı belirlenmiştir.  $\gamma$ -GT aktivitesinin karaciğerde değişmediğı, kasta duyarlı olanlarda arttığı bulunmuştur (Pena-Llopis ve ark., 2001).

Organoklorlu fungusid heksaklorobenzen etkisinde *O. mykiss*'de karaciğerde GST aktivitesinin değişmediğı, GPx ve GR aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir (Lindström-Seppa ve ark., 1996).

Fungusid propiconazole ve fenpropimorph etkisinde *Salmo trutta*'da solungaçta iki bileşiğin karışımının GST aktivitesini azalttığı, tek uygulamalarında ise aktivitenin değişmediği belirtilmektedir. Karaciğerde tüm uygulamalarda aktivitenin değişmediği belirlenmiştir (Almli ve ark., 2002).

Fungusid iprodione etkisinde *O. mykiss*'de karaciğer hücre kültüründe GSH miktarının derişime bağlı azaldığı, lipid peroksidasyonun arttığı belirtilmiştir (Radice ve ark., 2001).

Organoklorlu pestisid p,p'-DDE, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo- p-dioksin ve poliklorlu bifenil 2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil etkisinde *O. mykiss*'de karaciğer dokusunda mikrozomal GST aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Sitosolik GR aktivitesinin sadece p,p'-DDE etkisinde arttığı saptanmıştır (Machala ve ark., 1998).

Piretroid insektisid cypermethrin etkisinde *Cyprinus carpio* ve *O. niloticus*'da böbrek dokusunda GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonunda artış meydana geldiği bildirilmektedir *O. niloticus*'da karaciğerde benzer değişimler meydana gelmekle beraber, *C. carpio*'da karaciğerde GPx aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Üner ve ark., 2001).

Organofosforlu dimethoatenin *Clarias lazera*'da karaciğerde GSH miktarını arttırdığı, böbrek ve solungaçlarda ise değiştirmedeği, GST aktivitesinin karaciğer ve böbrekte bu pestisidin LC<sub>25</sub>'i etkisinde azaldığı, solungaçta ise arttığı bulunmuştur. GPx ve GR aktivitelerinin karaciğer ve böbrekte değişmediği, solungaçta azaldığı bildirilmiştir (Hamed ve ark., 1999).

*C. carpio*'da OP dichlorvos etkisinde karaciğer, böbrek, solungaç, kalp, kas ve beyin dokularında lipid peroksidasyonu düzeylerinin derişime bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. GSH miktarı karaciğer, böbrek, solungaç ve kasta azalırken beyin dokusunda derişime bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Kontroller arasında en yüksek GPx aktivitesi beyin dokusunda bulunmuştur. Aktivitenin beyinde en yüksek derişim olan 5 ppm'de arttığı diğer dokularda değişmediği saptanmıştır. Aynı çalışmada *Ictalurus nebulosus*'da lipid peroksidasyonu düzeylerinin karaciğer, solungaç, kas ve kalp dokularına göre sadece beyinde arttığı bildirilmiştir. GSH miktarının tüm dokularda arttığı ve beyin dokusundaki artışın derişime bağlı olduğu saptanmıştır. GPx aktivitesi hiçbir dokuda değişmemiştir (Hai ve ark., 1997).

Organofosforlu herbisid DEF ve metaboliti n-butil merkaptan etkisinde *I. punctatus*'da karaciğer ve solungaçta GPx aktivitesinin, GSH miktarının ve lipid peroksidasyonu düzeyinin değişmediği bildirilmiştir (Matter-Mihaich ve Di Giulio, 1986).

Organofosforlu quinalphos etkisinde sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ile GSH miktarının ve GST aktivitesinin değişmediği, bununla birlikte beyin GST aktivitesinin doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Yüksek dozda (1.04 mg/kg) quinalphosun GR aktivitesini karaciğerde arttırıp, beyinde azalttığı, GPx aktivitesini karaciğerde azaltıp azaldığı, beyinde değiştirmedeği (Dwivedi ve ark., 1998).

Çalışma konusu olan fenthion insektisidinin balıklarda oksidatif stres oluşturma potansiyeli ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer omurgalılarda yapılan çalışmalar ise sıçanlarla sınırlıdır.

Oksidatif stres indikatörü protein kinaz C aktivitesinin fenthion etkisinde sıçan beyin ve karaciğer dokusunda arttığı belirlenmiştir (Bagchi ve ark., 1997).

Dişi Sprague-Dawley sıçanlarında fenthion etkisinde karaciğer ve beyin dokusunda lipid peroksidasyonun arttığı belirlenmiştir (Bagchi ve ark., 1995).

Wistar türü albino sıçanlarda fenthion etkisinde serumda lipid peroksidasyonunun ve  $\gamma$ -GT aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Altuntaş ve Delibaş, 2002).

Laboratuvar koşullarında pestisidlerin ve diğer kirleticilerin GSH ve GSH ilişkili enzimlere etkilerinin incelendiği çalışmalardan bir kısmı GSH düzeylerine dışardan yapılan modifikasyonları içermektedir.

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *A. anguilla*'da karaciğer dokusunda GSH miktarının, GSH/GSSG oranı ile GR, GST,  $\gamma$ -GT ve  $\gamma$ -GCS enzim aktivitelerinin önemli düzeyde azaldığı ve GSSG miktarının değişmediği bildirilmiştir. NAC ve pestisid uygulanan balıkların karaciğer dokusunda gözlenen etkinin NAC uygulanmayanlara göre daha az olduğu belirtilmektedir. NAC uygulanan balıklarda GSH miktarı, GSH/GSSG oranı ile GR, GST ve  $\gamma$ -GCS enzim aktivitelerinin arttığı bulunmuştur. Pestisid etkisinde kas dokusunda GSH miktarı, GSH/GSSG oranı ile GR, GST,  $\gamma$ -GT ve  $\gamma$ -GCS aktivitelerinin azaldığı ve GSSG miktarının arttığı

saptanmıştır. NAC ve pestisid uygulanan balıklarda kas dokusunda etkinin benzer olduğu, sadece GSSG miktarının değişmediği belirtilmiştir. NAC uygulanan balıkların kas dokusunda GSH miktarının ve GST aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Pena-Llopis ve ark., 2003a).

N-asetilsisteinin 0.5 mM derişiminin etkisinde *A. anguilla*'da kas dokusunda GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının arttığı, GSSG miktarının değişmediği belirlemiştir. GR aktivitesinin beyin ve kas dokularında arttığı saptanmıştır. Dichlorvos etkisinde kas GSH miktarı ve GSH/GSSG oranının azaldığı, GSSG miktarının ise arttığı bulunmuştur. Beyinde GR aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Depurasyon sürecinde kas GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının azaldığı, GSSG miktarının artmaya devam ettiği belirlenmiştir. Beyin GR aktivitesindeki inhibisyonun da devam ettiği belirlenmiştir. Dichlorvos etkisinden sonra NAC içeren suya aktarılan balıklarda beyin GR aktivitesinin geri kazanımının temiz suya aktarılan balıklara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Kas dokusunda NAC içeren suya aktarılan balıklarda GSH miktarının zamana bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Pena-Llopis ve ark., 2003b).

*O. mykiss*'de GSH enjeksiyonu ile karaciğer, böbrek, kas, solungaç dokularında ve plazmada total GSH miktarının arttığı bildirilmiştir. GSH uygulaması böbrek  $\gamma$ -GT aktivitesini de arttırmıştır. Total GSH miktarının *A. rostrata*'da karaciğer, solungaç, böbrek ve plazmada GSH enjeksiyonu ile arttığı, kas dokusunda ise değişmediği belirtilmiştir. Karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında  $\gamma$ -GT aktivitesinin değişmediği bulunmuştur. Poliklorlubifenil olan TCB ve TCB-GSH ve TCB-BSO enjekte edilen *O. mykiss*'de karaciğerde lipid peroksidasyonunun arttığı, uzun sürede sadece TCB enjekte edilen grupta lipid peroksidasyonunun değişmediği bildirilmiştir. Kas dokusunda TCB-BSO enjeksiyonu lipid peroksidasyonunu arttırmıştır (Otto ve ark., 1997).

*Pimephales promelas*'da anüs dokusu kültür hücrelerinde BSO etkisinde GSH miktarının derişime bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Dierickx, 1998).

Herbisid paraquat enjeksiyonu ile *C. carpio* retinasında GSH miktarının azaldığı bildirilmektedir. Akut etki sonucu azalan GSH miktarının bu süreden sonra giderek kontrol düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir. BSO ve paraquatın birlikte

etkisinde GSH miktarının paraquata oranla daha fazla azaldığı ve bu uygulamada GSH azalmasının uzun süreler boyunca devam ettiği belirtilmektedir (Zhou ve ark., 2001).

Canlıdaki GSH modifikasyonunun incelendiği çalışmalar değişimlerin verilen kimyasala ve dokuya bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Yeni doğan sıçanların beyin serebral kortekslerinde BSO ve BSO + GSH etkisinde total GSH miktarının azaldığı bildirilmiştir. BSO ve GSH esterlerinin birlikte etkisinde de GSH miktarının azaldığı, fakat azalmanın diğer uygulamalara göre daha az olduğu belirlenmiştir (Jain ve ark., 1991).

*I. punctatus*'da BSO enjeksiyonu ile hepatik GSH miktarının 48 saat sonra değişmediği, 72 saat sonra ise %79 oranında azaldığı saptanmıştır. Dietilmaleimid (DEM) etkisinde hepatik GSH miktarının 2 ve 6 saat sonunda sırasıyla %73 ve %85 oranında azaldığı, fakat 24 saat sonra %40 arttığı belirlenmiştir. DEM etkisinden sonra GSH sentezini baskılamak amacıyla BSO kullanılan balıklarda GSH artışının 6. günden sonra başladığı bildirilmiştir. Solungaç dokusunda DEM ve BSO'nun birlikte etkisinde ilk 24 saat sonunda GSH miktarının %94 azaldığı, 48 saat sonunda ise kaybedilen GSH'nin %60 oranında geri kazanıldığı belirlenmiştir (Gallagher ve ark., 1992).

N-asetilsistein ile yapılan çalışmalar bu bileşiğin canlılardaki etkinliğinin farklılığını ortaya koymaktadır.

Asetik asit ile deneysel kolit oluşturulan sıçanların kolonlarında 100mg/kg NAC etkisinde GSH miktarının azaldığı bildirilmiştir. 20mg/kg NAC uygulamasının koruyucu özellik göstermediği belirlenmiştir (Akgün ve ark., 2005).

Kurşunlu diyetle beslenen sıçanlarda eritrosit GSH miktarının azaldığı ve MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. Diyetlerinde kurşun ve NAC bulunan sıçanlarda kurşunla beslenenlere göre GSH miktarındaki azalma ve MDA miktarındaki artışın daha az olduğu bildirilmektedir (Gürer ve ark., 1998).

Dişi sıçanlarda kadmiyum klorür ( $CdCl_2$ )'ün karaciğer ve renal korteks dokularında GSH miktarı ile lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde arttırdığı saptanmıştır. NAC ve  $CdCl_2$ 'ün birlikte etkisinde GSH miktarında gözlenen artışın

CdCl<sub>2</sub> uygulaması ile aynı olduğu, fakat lipid peroksidasyonunun bu gruba oranla daha az artış gösterdiği belirlenmiştir (Shaikh ve ark., 1999).

Kurşun ile beslenen sıçanlarda beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun önemli düzeyde arttığı, kurşun etkisinde NAC ile beslenen sıçanlarda lipid peroksidasyonunun azaldığı saptanmıştır (Nehru ve Kanwar, 2004).

Balıklarda pestisid etkisinde AChE aktivitesinin değişimine ilişkin çalışmaların bir kısmı aktivitenin derişime bağılı olarak azaldığını bildiren laboratuvar çalışmalarıdır.

*Labeo rohita*'da beyin dokusunda OP quinalphos etkisinde (Das ve Mukherjee, 2000) ve piretroid cypermethrin etkisinde (Das ve Mukherjee, 2003) AChE aktivitesinin azaldığı bulunmuştur.

Organofosforlu diazinon etkisinde *Micropterus salmoides*'de beyin dokusunda AChE aktivitesinin derişime bağılı olarak inhibe olduğu bulunmuş, %90'lara ulaşan inhibisyonun ölüme neden olmadığı bildirilmiştir (Pan ve Dutta, 1998). Organofosforlu parathion etkisinde *Danio rerio*'da AChE inhibisyonunun derişime bağılı olduğu bulunmuştur (Roex ve ark., 2003).

Asetilkolinesteraz aktivitesinin ölçüldüğü çalışmaların bir kısmı pestisid etkisinden sonra aktivitenin geri kazanımı amacıyla, balıkların temiz sulara aktarıldığı depurasyon çalışmalarıdır.

Karbamatlı thiobencarb etkisinde *A. anguilla*'da beyinde total AChE aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Akut etki süresinden sonra AChE aktivitesinin depurasyonun 8. saatinden başlayarak kontrol düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir. Solungaç dokusunda etki ve depurasyon sürecinde aktivitenin düşük olduğu, kas dokusunda depurasyon sürecinde aktivitenin zamana bağılı olarak yeniden kazanıldığı saptanmıştır (Fernandez-Vega ve ark., 2002).

Organofosforlu parathion ve azinphos-metil etkisinde *C. auratus*'da beyin dokusunda AChE'nin sırasıyla %86 ve %50 oranlarında inhibe olduğu bildirilmiştir. Aktivitenin geri kazanımı için 28-35 günlük bir depurasyon sürecinin gerekli olduğu belirtilmektedir (Ferrari ve ark., 2004).

Organofosforlu chlorfenvinphos ve karbamat carbofuran etkisinde *C. carpio*'da beyin dokusunda 96 saat sonunda AChE'nin inhibe olduğu bildirilmiştir. Carbofuran

etkisinden sonra depurasyonun başlangıcından itibaren aktivite geri kazanımının %100'e yakın olduğu, fakat chlorfenvinphos etkisinden sonra aktivite geri kazanımı için 15 günlük bir sürenin gerektiği belirlenmiştir (Dembele ve ark., 1999).

Organofosforlu azamethippos etkisinden sonra temiz suya aktarılan *Dicentrarchus labrax*, *O. mykiss* ve *A. anguilla*'da beyin dokusunda aktivite geri kazanımının 7. günden başlayarak 21 günde kontrol düzeylerine ulaştığı saptanmıştır (Intorre ve ark., 2004).

Organofosforlu profenofosun LC<sub>20</sub> değerinin etkisinde *O. mossambicus*'da beyin ve solungaç dokularında AChE'nin zamana bağlı olarak inhibe olduğu bildirilmiştir. Akut etkiden sonra temiz suya aktarılan balıkların beyin ve solungaç dokularında aktivitenin %50 geri kazanımı için 8 gün, %100 geri kazanım için 23 gün gerektiği belirlenmiştir (Rao ve ark., 2003).

Organofosforlu monocrotophos ve monocrotophosun tiyol analog metil esteri RPR-II ve tiyol analog etil esteri RPR-V'nin 96 saatlik etkisinden sonra temiz suya aktarılan *O. mossambicus*'da beyin solungaç ve kas dokularında AChE aktivitesi değişimleri incelenmiştir. Monocrotophos etkisi sonunda beyin dokusunda aktivite geri kazanımının zamana bağlı olarak arttığı fakat %100 geri kazanımın ancak 21 gün sonunda meydana geldiği saptanmıştır. RPR-II ve RPR-V etkisinde aktivite geri kazanımı için 28 günlük sürenin gerektiği belirtilmiştir. Solungaç dokusunda her üç insektisid etkisinde aktivite geri kazanımının zamana bağlı olduğu ve 28 gün sonunda aktivitenin ancak %87'sinin geri kazanılabildiği gösterilmiştir. Kasta da aktivite geri kazanımının zamana bağlı olarak arttığı, %100 geri kazanım için monocrotophos etkisinde 14 gün, RPR-V etkisinde 21 gün ve RPR-II etkisinde 28 gün gerektiği saptanmıştır (Rao, 2004).

Organofosforlu fenitrothion etkisinde *A. anguilla*'da beyin dokusunda AChE aktivitesinin 2-96 saatlik süreler boyunca derişime ve zamana bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Temiz suya aktarılan balıklarda bir haftalık sürenin aktivite geri kazanımı için yeterli olmadığı saptanmıştır (Sancho ve ark., 1997).

Organofosforlu insektisid fenthion ve balık sistemleri ile ilişkili yayınlar arasında bu bileşiğin antioksidant sistemlere etkileri ve oksidatif stres oluşturma kapasitesi hakkında bir araştırmaya rastlanılmamıştır. EPA tarafından kullanımı

sınırlandırıldığı halde ülkemizde üretimi ve uygulanması devam eden fenthionun *O. niloticus*'da beyin dokusunda oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve nörotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, çevresel risk değerlendirilmesine ilişkin yararlı bilgiler sağlayabilecektir.

Bu amaçla, çalışmamızda fenthionun subletal derişiminin etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH ve GSH ile ilişkili enzimlerdeki değişimleri belirlemek üzere GSH ve GSSG miktarları, GSH/GSSG oranı, GPx, GR, GST,  $\gamma$ -GT ve  $\gamma$ -GCS enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonuna etkilerini belirlemek amacıyla MDA miktarı ve nörotoksik potansiyeli belirlemek üzere AChE enzim aktivitesi incelenmiştir.

Glutasyon metabolizmasını modifiye etmek üzere bir antioksidant ve GSH öncüsü olan NAC'nin ve GSH sentez inhibitörü BSO'nun uygulanmasıyla fenthionun oluşturabileceği toksik etkilerin anlaşılması amaçlanmıştır. Depurasyon çalışması değişen parametrelerin geri dönüşümlerini incelenmek amacıyla yürütülmüştür.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırma materyali olan juvenil *O. niloticus* örnekleri Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak, laboratuvarımızda dinlendirilmiş musluk suyu içeren 160 L'lik cam stok akvaryumlarında 10 ay süreyle laboratuvar koşullarına adapte edilmişlerdir. Akvaryumlarda havalandırma merkezi sistemle sağlanmıştır. Laboratuvarda 12 saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Suyun özellikleri; sıcaklık  $21.22 \pm 0.79^\circ\text{C}$ , pH  $7.83 \pm 0.23$ , çözülmüş oksijen  $7.64 \pm 0.98$  ppm, toplam sertlik 303 ppm  $\text{CaCO}_3$ , alkalinite 305 ppm  $\text{CaCO}_3$ 'tür. Balıklar deneme süresince günde bir kez aynı saatlerde ağırlıklarının %3'ü kadar hazır yavru sazan balık yemi ile beslenmişlerdir (Çamlı Yem, Türkiye). Toksisite denemeleri için  $49.61 \pm 9.56$  g ağırlık ve  $15.14 \pm 2.35$  cm boyundaki balıklar seçilmiştir. Denemeler stok akvaryumlarla aynı laboratuvar koşullarında beş tekrarlı olmak üzere kontrollü olarak yürütülmüştür.

Pestisid olarak fenthion [O, O-Dimethyl O-(3-methyl-4-methylthiophenyl) phosphorothioate, Lebaycid EC 50, Bayer (Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd. Şti.), 525 g/L] uygulanmıştır.

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

|                                       |                                           |               |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|
| 1-kloro-2,4-dinitro-benzen            | CDNB                                      | Sigma         |
| 2-Tiyobarbitürik Asit                 | TBA                                       | Merck         |
| 2-Vinilpiridin                        | 2-VP                                      | Aldrich       |
| 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) | DTNB                                      | Sigma         |
| 5-sülfosalisilik asit                 |                                           | Sigma         |
| Asetik Asit                           | $\text{CH}_3\text{COOH}$                  | Riedel-deHaen |
| Asetilkolintiyoiyodür                 |                                           | Sigma         |
| Bakır Sülfat                          | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Sigma         |
| Bütiyonin sülfoksimin                 | BSO                                       | Sigma         |

|                                               |                         |       |
|-----------------------------------------------|-------------------------|-------|
| di-Potasyum Hidrojen Fosfat                   | $K_2HPO_4$              | Merck |
| di-Sodyum adenzin5'-trifosfat                 | $Na_2ATP$               | Sigma |
| di-Sodyum Hidrojen Fosfat                     | $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ | Merck |
| Etilendiamin Tetraasetik Asit                 | EDTA                    | Sigma |
| Etopropazin                                   |                         | Sigma |
| Folin-Ciocalteu Fenol Ayıracı                 |                         | Sigma |
| Glutasyon Redüktaz                            | GR                      | Sigma |
| Laktat Dehidrojenaz                           | LDH                     | Sigma |
| Lauril Sülfat                                 | SDS                     | Sigma |
| L- $\alpha$ -aminobütirat                     |                         | Sigma |
| L-Glutamat                                    |                         | Sigma |
| L- $\gamma$ -Glutamil p-nitroanilid           |                         | Sigma |
| Magnezyum Klorid                              | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$    | Merck |
| Monosiklo hekzilamonyum fosfoenol piruvat PEP |                         | Sigma |
| N-Asetilsistein                               | NAC                     | Merck |
| n-Butanol                                     |                         | Merck |
| Okside L-Glutasyon                            | GSSG                    | Sigma |
| Piridin                                       |                         | Merck |
| Piruvat Kinaz                                 |                         | Sigma |
| Potasyum Dihidrojen Fosfat                    | $KH_2PO_4$              | Merck |
| Potasyum klorür                               | KCl                     | Merck |
| Redükte L-Glutasyon                           | GSH                     | Sigma |
| Sığır Serum Albumini                          |                         | Sigma |
| Sodyum Dihidrojen Fosfat                      | $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ | Merck |
| Sodyum Dodesil Sülfat                         | SDS                     | Sigma |
| Sodyum Hidroksit                              | NaOH                    | Merck |
| Sodyum Karbonat                               | $Na_2CO_3$              | Merck |
| Sodyum Klorür                                 | NaCl                    | Merck |
| Sodyum Potasyum Tartarat                      |                         | Merck |
| Sükroz                                        |                         | Sigma |
| t-Butil Hidroperoksit                         |                         | Sigma |

|                                                |                |       |
|------------------------------------------------|----------------|-------|
| Tiyobarbiturik asit                            | TBA            | Merck |
| Tris Baz                                       | Tris Baz       | Sigma |
| Tris Hidroklorid                               | Tris HCl       | Sigma |
| $\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat | $\beta$ -NADPH | Sigma |

### 3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

|                                 |                                   |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Analitik Terazî              | Sartorius CP-224S                 |
| 2. Benmari                      | Memmert WB 22                     |
| 3. Buz Makinası                 | Scotsman AF 20                    |
| 4. Distile Su Cihazı            | Şimşek Labortechnik SS-200        |
| 5. Homojenizatör                | Janke&Kunkel Ultra-Turrax T-25    |
| 6. Oksijenmetre                 | Mettler-Toledo MO 128             |
| 7. Otomatik Pipetler            | Gilson, Eppendorf, Labart, Biohit |
| 8. pH metre                     | Hanna Instruments PH 211          |
| 9. Soğutmalı Santrifüj          | Jouan MR 23i                      |
| 10. Santrifüj                   | Hettich EBA 8S                    |
| 11. Terazî                      | Sartorius BP-310S                 |
| 12. UV-Visible Spektrofotometre | Shimadzu UV mini 1240             |
| 13. Vortex                      | Janke&Kunkel VF-2                 |

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *Oreochromis niloticus*'da Fenthionun LC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi

*O. niloticus*'da fenthionun 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla dinlendirilmiş musluk suyu içeren 100 L'lik 6 akvaryumun her birine 6.22±1.27 g ağırlık ve 7.35±1.13 cm boyundaki 11 balık aktarılmıştır. Akvaryumdaki balık yoğunluğu 0.7 g/L olarak ayarlanmıştır (APHA, AWWA, WPCF, 1981). Bir akvaryum kontrol olarak seçilmiş, diğer akvaryumlara 1.204, 1.806, 2.107, 3.225, 3.741 ppm derişimlerde fenthion 96 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma iki tekrarlı

yürütülmüştür. 96 saat sonunda her derişimdeki ölüm miktarları kaydedilerek LC<sub>50</sub> derişimi SPSS 10.0 paket programında probit analiz yöntemiyle belirlenmiştir (Kinnear ve Gray, 1995).

### 3.2.2. Toksisite Denemeleri

Denemeler 140 L dinlendirilmiş musluk suyu ile doldurulmuş 6 cam akvaryumda yürütülmüştür. Her bir akvaryumda 30 balık olacak şekilde balıklar adaptasyona bırakılmıştır. Deney balıkları fenthionun LC<sub>50</sub> değerin %20'si olan 0.45 ppm ortam derişiminde 24, 48, 96 saat sürelerle tutulmuşlardır. BSO ve NAC'nin ön denemelerle belirlenen sırasıyla 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozları balıklara intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. BSO ve NAC çözeltileri serum fizyolojik (%0.59'luk NaCl) ile hazırlanmıştır. Enjeksiyon stresini elimine etmek amacıyla kontrol ve fenthion grubu balıklara da aynı yol ile 50 µL serum fizyolojik verilmiştir. Enjeksiyondan hemen önce balıklar buzda bayıltılmışlardır. Enjeksiyon stresinin giderilmesi için balıklar 3 saat temiz suda bekletilerek deney akvaryumlarına aktarılmıştır. Pestisidli su değışimi her gün balıklar aktararak sağlanmıştır.

Deneme akvaryumları;

1. Akvaryum: Kontrol
2. Akvaryum: Fenthion
3. Akvaryum: BSO
4. Akvaryum: NAC
5. Akvaryum: BSO + Fenthion
6. Akvaryum: NAC + Fenthion grubu olarak düzenlenmiştir.

Etki süreci sonunda tüm deney balıkları temiz su içeren akvaryumlara aktararak 24, 48, 96 saat süreler ile depurasyon uygulanmıştır.

Her süre sonunda balıklar akvaryumlardan çıkarılıp ağırlıkları tartılarak dekapitasyonla öldürülmüştür. Beyin dokuları disekte edilerek, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra tartılmış ve analizlere kadar -75°C'de saklanmıştır.

Dokular 0.25 M süktroz içeren 0.05 M Na-P tamponu (pH 7.4), ile 1/10 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde ultra-turrax homojenizatör ile 10000 rpm'de 3 dakika homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant GPx, GR, GST,  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -GCS, AChE enzim aktiviteleri ile MDA ve protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. tGSH, GSSG miktarlarının belirlenmesi amacıyla, hazırlanan süpernatantlar 1/0.5 oranında %10'luk 5-sülfosalisilik asit ile karıştırılıp 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

### 3.2.3. Analiz Yöntemleri

#### 3.2.3.1. Total Glutatyon Yöntemi

Total GSH miktarı, DTNB, NADPH ve GR varlığında enzimatik döngü prosedürü ile ölçülmektedir. GSH DTNB tarafından okside edilirken, ortamda bulunan GSSG ve diğer çözünür tiyol bileşikleri ile GSH'ın oluşturduğu disülfid bağlanmaları GR enzimi varlığında NADPH'ın indirgenmesi ile GSH'a dönüştürülmektedir. Meydana gelen sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asitin miktarı 412 nm'de ölçülmektedir (Anderson, 1985). Elde edilen absorbans değerleri standart GSH grafiği ile derişim değerlerine dönüştürülmektedir.

#### Ayıracılar

1. Stok Tampon Çözeltisi: 143 mM Na-K Tamponu, 6.3 mM EDTA içeren (pH 7.5)
2. 0.3 mM NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutatyon Redüktaz

#### Yöntem

Total GSH miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi

| Çözeltiler                                    | Kör (µL) | Örnek (µL) |
|-----------------------------------------------|----------|------------|
| NADPH                                         | 700      | 700        |
| DTNB                                          | 100      | 100        |
| Örnek                                         | -        | 25         |
| Saf su                                        | 190      | 165        |
| Çalkalanır ve 30°C’de 3 dakika inkübe edilir. |          |            |
| Glutasyon Redüktaz                            | 10       | 10         |

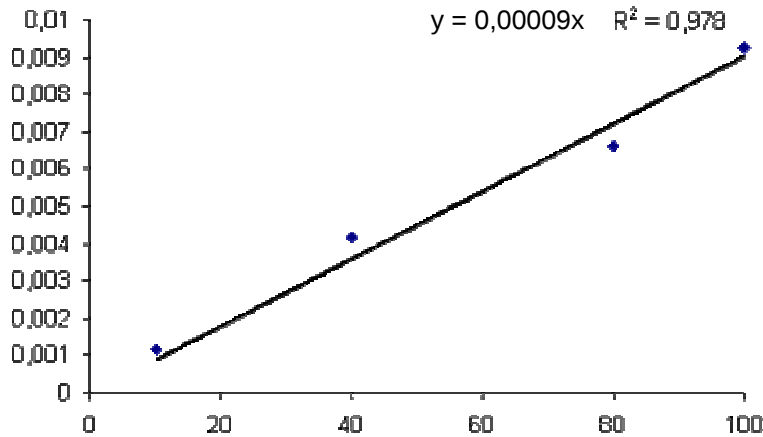
Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C’de, 0. dakika ve 3. dakika absorbansları kaydedilir. Sonuçlar GSH ile hazırlanan standart eğriden değerlendirilir

### Hesaplama

Elde edilen absorbans değerleri standart grafik kullanılarak derişim değerlerine dönüştürülür.

### Standart Grafiğın Hazırlanması

Çalışma tamponu ile 1000 ng/mL’lik GSH stok çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiden 10, 40, 80, 100 ng/mL’lik derişimlerde seyreltmeler yapılır. Bunlar çalışma standartlarının hazırlanmasında kullanılır. Standart grafik için total GSH miktarının ölçülmesinde uygulanan yöntem kullanılır.



Şekil 3.1. GSH Standart Grafiği

### 3.2.3.2.Okside Glutasyon Yöntemi

Okside glutasyon miktarı, total GSH miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile belirlenmektedir. Farklı olarak, 5-sülfosalisilik asit homojenatı kullanımdan önce aşağıdaki gibi 2-vinilpiridin ile türevlendirilmektedir. GSH'ın 2-vinilpiridin ile türevlendirilmesiyle sadece GSSG miktarı ölçülmektedir (Griffith, 1980).

#### Örnek Hazırlanması

100 µL örnek üzerine 2 µL 2-vinilpiridin eklenir ve NaOH ile pH 7.0'ye ayarlanır. Örnekler oda ısısında 1 saat inkübe edilir.

#### Ayırıcılar

1. Stok Tampon Çözeltisi: 143 mM Na-K Tamponu, 6.3 mM EDTA içeren (pH 7.5)
2. 0.3 mM NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutasyon Redüktaz

#### Yöntem

GSSG miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Okside Glutasyon Yöntemi

| Çözeltiler                                    | Kör (µL) | Örnek ( µL) |
|-----------------------------------------------|----------|-------------|
| NADPH                                         | 700      | 700         |
| DTNB                                          | 100      | 100         |
| Örnek                                         | -        | 25          |
| Saf su                                        | 190      | 165         |
| Çalkalanır ve 30°C'de 3 dakika inkübe edilir. |          |             |
| Glutasyon Redüktaz                            | 10       | 10          |

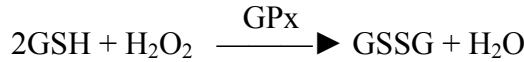
Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C’de, 0. dakika ve 3. dakika absorbansları kaydedilir.

### Hesaplama

Elde edilen absorbans değerleri total GSH için hazırlanan standart grafik kullanılarak derişim değerlerine dönüştürölür.

#### 3.2.3.3. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

Glutatyon peroksidaz, GSH’ın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile GSSG’ye yükseltgenmesini kataliz eder. t-bütöl hidroperoksit bulunan ortamda GPx’in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH’ye indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH’ın NADP<sup>+</sup>’ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçölür (Beutler, 1984).



### Ayıracılar

1. Tris Tamponu (pH 8.0)
2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. 7 mM t-Bütöl Hidroperoksit

### Yöntem

Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

| Çözeltiler                       | Örnek (µL) |
|----------------------------------|------------|
| Saf su                           | 660        |
| Tris Tamponu                     | 100        |
| GSH                              | 25         |
| GR                               | 100        |
| NADPH                            | 100        |
| Örnek                            | 10         |
| 37°C’de 10 dakika inkübe edilir. |            |
| t-Bütil Hidroperoksit            | 10         |

Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan tepkime 37°C’de 1 cm ışık yolu bulunan kuvartz küvetlerde, 340 nm dalga boyunda 0., 2.5., 5. dakikalarda absorbans değerleri ölçülerek izlenir.

### Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_0}$$

$\Delta OD$  = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

$V_t$  = Toplam hacim

$V_0$  = Örnek hacmi

$$\text{GPx spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPx Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

### 3.2.3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Glutasyon redüktaz, NADPH varlığında GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizler. GR aktivitesi, NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'a yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır (Carlberg ve Mannervik, 1975).

#### Ayırıcılar

1. 100 mM Na-P Tamponu (pH 8.0)
2. Günlük Tampon (0.12 mM NADPH ve 1 mM GSSG'nin tampon içerisinde çözülmesi ile hazırlanır.)

#### Yöntem

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

| Çözeltiler    | Kör(μL) | Örnek(μL) |
|---------------|---------|-----------|
| Saf su        | 100     | -         |
| Günlük Tampon | 900     | 900       |
| Örnek         | -       | 100       |

Çalkalanarak inkübe edilmeden 37°C'de, 340 nm dalga boyunda köre karşı 0. ve 5. dakikalardaki absorbanslar okunur.

#### Hesaplama

$$\text{GR aktivitesi(U/mL)} = \frac{\Delta OD}{6.22} \times \frac{V_t}{V_{\text{örnek}}}$$

$\Delta OD$  = Zamana göre absorbans değişimi

$V_t$  = Toplam Hacim

Vö = Örnek Hacmi

6.22 = 1 nmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri.

$$\text{GR spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GRAktivitesi}}{\text{ProteinMiktarı}}$$

### 3.2.3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Glutasyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin GSH'nin -SH grubu ile reaksiyonunu katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GST aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB), GSH ile konjugasyonu sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür (Habig ve ark., 1974).

#### Ayırıcılar

1. 100 mM Tris Tamponu (pH 7.4)
2. 1 mM CDNB
3. Redükte Glutasyon

#### Yöntem

Glutasyon S-transferaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

| Çözeltiler   | Kör    | Örnek   |
|--------------|--------|---------|
| Tris Tamponu | 1.1 mL | 1.05 mL |
| CDNB         | 50 µL  | 50 µL   |
| GSH          | 50 µL  | 50 µL   |
| Örnek        | -      | 50 µL   |

Çalkalanarak 25°C’de, 340 nm dalga boyunda, 2 dakika boyunca absorbansdaki artış şeklinde ölçülür.

$E_{340}$  CDNB-GSH konjugasyonu:  $9.6 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$

Aktivite  $\mu\text{mol}/\text{dakika}/\text{mg}$  protein olarak tanımlanır.

### Hesaplama

$$\text{GST Aktivitesi}(\mu\text{mol}/\text{dakika}/\text{mL}) = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{Vt}{0.0096 \times Vö}$$

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi}(\mu\text{mol}/\text{dakika}/\text{mg protein}) = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

### 3.2.3.6. $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi

$\gamma$ -Glutamil transpeptidaz enzim aktivitesinin ölçümü,  $\gamma$ -glutamil p-nitroanilid’in renksiz p-nitroaniline parçalanması sırasındaki absorbans farkının 410 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır (Orlowski ve Meister, 1965).

### Ayırıcılar

1. 100  $\mu\text{M}$  Tris HCl Tamponu
2. 5  $\mu\text{M}$  L-glutamil-p-nitroanilid
3. 10  $\mu\text{M}$  Magnezyum klorid

### Yöntem

$\gamma$ -Glutamil transpeptidaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6.  $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi

| Çözeltiler               | Kör ( $\mu$ L) | Örnek ( $\mu$ L) |
|--------------------------|----------------|------------------|
| L-glutamil-p-nitroanilid | 100            | 100              |
| MgCl <sub>2</sub>        | 400            | 400              |
| Tris HCl Tamponu         | 500            | 400              |
| İyice çalkalanır         |                |                  |
| Örnek                    | -              | 100              |

Çalkalanarak 37°C’de, 410 nm dalga boyunda, 2 dakika boyunca absorbansdaki artış şeklinde ölçülür.

### Hesaplama

$$\gamma\text{-GT Enzim Aktivitesi} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{V_o} \times 2.2 mM$$

$\Delta OD$  = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

$V_t$  = Toplam Hacim

$V_o$  = Örnek Hacmi

### 3.2.3.7. $\gamma$ -Glutamilsisteinil Sentetaz Yöntemi

$\gamma$ -Glutamilsisteinil sentetaz enzim aktivitesi  $\gamma$ -glutamilsistein sentezi sırasında açığa çıkan ADP miktarı ile ölçülmektedir. Reaksiyonda açığa çıkan bir ADP molekülüne karşılık bir molekül NADH oksidasyona uğramaktadır. NADH’ın oksidasyonunun 340 nm’de ölçülmesiyle enzim aktivitesi hesaplanmaktadır (Seelig ve ark., 1984).

### Ayırıcılar

1. 0.1 M Tris Tamponu (pH 7.75)
2. 150 mM KCl

3. 2 mM Monosiklo hekzilamonyum fosfoenol piruvat (PEP)
4. 10 mM L-glutamat
5. 20 mM  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$
6. 10 mM L- $\alpha$ -aminobütirat
7. 2 mM EDTA
8. 0.2 mM NADH
9. 2 U/mL Laktat Dehidrogenaz
10. 2 U/mL Piruvat Kinaz
11. 5 mM ATP

### Yöntem

$\gamma$ -Glutamil sisteinil sentetaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7.  $\gamma$ -Glutamilsisteinil Sentetaz Yöntemi

| Çözeltiler                      | Kör ( $\mu$ L) | Örnek ( $\mu$ L) |
|---------------------------------|----------------|------------------|
| Tris Tamponu (pH 7.75)          | 200            | 100              |
| KCl                             | 80             | 80               |
| PEP                             | 80             | 80               |
| L-glutamat                      | 80             | 80               |
| $MgCl_2$                        | 80             | 80               |
| L- $\alpha$ -aminobütirat       | 80             | 80               |
| EDTA                            | 80             | 80               |
| NADH                            | 80             | 80               |
| Laktat Dehidrogenaz             | 80             | 80               |
| Piruvat Kinaz                   | 80             | 80               |
| $Na_2ATP$                       | 80             | 80               |
| 25°C'de 3 dakika inkübe edilir. |                |                  |
| Örnek                           | -              | 100              |

Absorbansdaki azalma 340 nm dalga boyunda 5 dakika kinetik olarak okunur.

$$\gamma\text{-GCS Enzim Aktivitesi} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{1}{6.22} \times \frac{V_t}{V_0}$$

$\Delta OD$  = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

$V_t$  = Toplam Hacim

$V_0$  = Örnek Hacmi

6.22: 1 nmol NADH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

### 3.2.3.8. Malondialdehid Yöntemi

MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA, aerobik koşullarda, pH 3.5'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark., 1979).

#### Ayırıcılar

1. %8.1 Sodyum dodesil-sülfat (SDS)
2. %20 Asetik asit (HAc) (pH 3.5)
3. %0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3.5)
4. n-Butanol-piridin (nBu-Pri) çözeltisi (14/1)
5. Stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk 0.99 g/mL)

#### Standart Grafiğin Hazırlanması

Günlük Standart: 400 nmol/mL'lik günlük standarttan hazırlanan 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL'lik çalışma standartları standart eğri çizimi için kör ve örnek olmak üzere farklı tüplere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. Malondialdehid Standart Grafiğinin Hazırlanması

| Çözeltiler        | Kör | 10nmol | 20nmol | 40nmol | 60nmol | 80nmol | 100nmol |
|-------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Standart          | 0.1 | 0.1    | 0.1    | 0.1    | 0.1    | 0.1    | 0.1     |
| %8.1 SDS          | 0.2 | 0.2    | 0.2    | 0.2    | 0.2    | 0.2    | 0.2     |
| %20HAc            | 1.5 | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5     |
| %0.8 TBA          | 1.5 | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5    | 1.5     |
| Saf su            | 0.8 | 0.7    | 0.7    | 0.7    | 0.7    | 0.7    | 0.7     |
| Saf su            | 1.0 | 1.0    | 1.0    | 1.0    | 1.0    | 1.0    | 1.0     |
| n-butanol/piridin | 5.0 | 5.0    | 5.0    | 5.0    | 5.0    | 5.0    | 5.0     |

Kuvvetle vortekslenir ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm dalga boyunda absorbansı okunur.

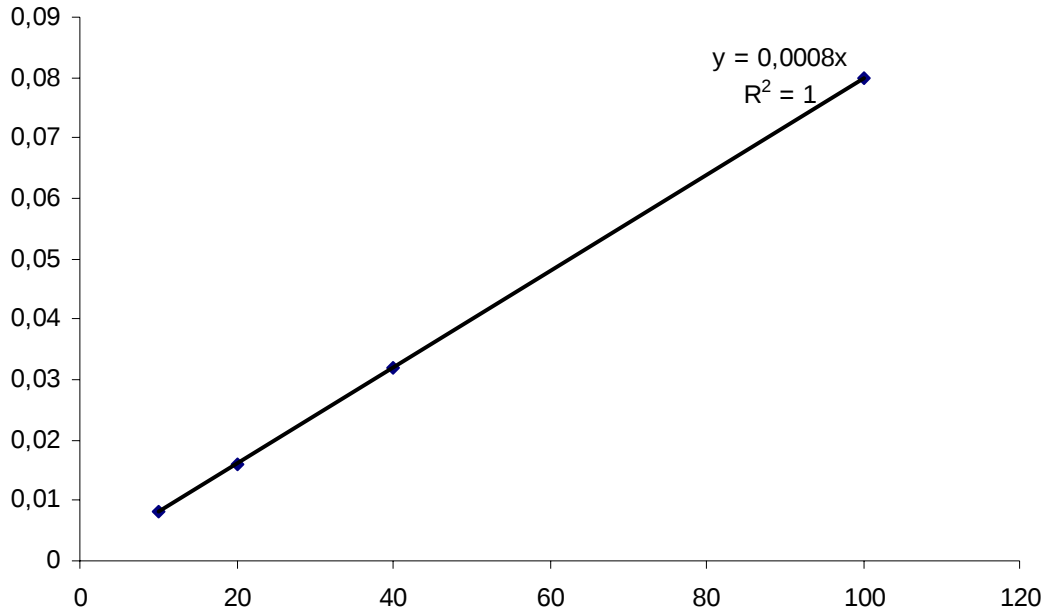
### Yöntem

MDA miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı tüplere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Malondialdehid Yöntemi

| Çözeltiler                                           | Kör (mL) | Standart (mL) | Örnek (mL) |
|------------------------------------------------------|----------|---------------|------------|
| Standart(10 nmol/mL)                                 | -        | 0.1           | -          |
| Örnek                                                | -        | -             | 0.1        |
| %8.1 SDS                                             | 0.2      | 0.2           | 0.2        |
| %20 Hac                                              | 1.5      | 1.5           | 1.5        |
| %0.8 TBA                                             | 1.5      | 1.5           | 1.5        |
| Saf su                                               | 0.8      | 0.7           | 0.7        |
| 95°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur. |          |               |            |
| Saf su                                               | 1.0      | 1.0           | 1.0        |
| n-butanol/piridin                                    | 5.0      | 5.0           | 5.0        |

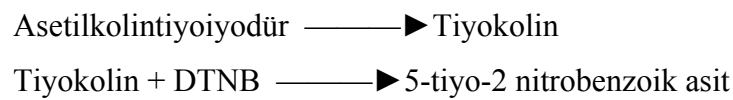
Kuvvetle çalkalanır ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm’de absorbansı okunur. Sonuçlar standart grafikten değerlendirilir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** MDA Standart Grafiği

### 3.2.3.9. Asetilkolinesteraz Yöntemi

Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile DTNB’nin reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm’de ölçülür. (Ellman ve ark., 1961).



#### Ayırıcılar:

1. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH 8.0)
2. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH 7.0)

3. 0.01 M DTNB
4.  $8.52 \times 10^{-3}$  M Etopropazin (BChE İnhibitörü)
5. 0.015 M Asetilkolintiyoiyodür

### Yöntem

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.10. Asetilkolinesteraz Yöntemi

| Çözeltiler                                    | Kör(μL) | Örnek(μL) |
|-----------------------------------------------|---------|-----------|
| Fosfat Tamponu                                | 2700    | 2550      |
| Örnek                                         | 200     | 200       |
| DTNB                                          | 100     | 100       |
| Etopropazin                                   | -       | 50        |
| Çalkalanır ve 30°C’de 5 dakika inkübe edilir. |         |           |
| Asetilkolintiyoiyodür                         | -       | 100       |

Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda, 0. ve 5. dakikada ki absorbansları ölçülür.

### Hesaplama

$$\text{AChE aktivitesi(U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{V_o} \times 13.6$$

$\Delta OD$  = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

$V_t$  = Toplam hacim

$V_o$  = Örnek hacmi

$$\text{AChE Spesifik Aktivitesi(U/mg protein)} = \frac{\text{AChE Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

### 3.2.3.10. Protein Yöntemi

Doku protein miktarları GPx, GR, GST,  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -GCS, AChE spesifik enzim aktiviteleri ile GSH, GSSG, MDA miktarlarını hesaplamak amacıyla çalışılmıştır.

Proteinlerin çoğu tirozin, triptofan veya her iki amino asiti de içerirler. Bu amino asitler serbest veya katlanmamış bir polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungustik asit-molibdik asit ayıracını (Folin-Ciocalteu ayıracı) indirgerler. Bu yöntemde proteinler bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak üzere alkali çözeltide  $\text{Cu}^{2+}$  ile reaksiyona girerler. Ortama Folin-Ciocalteu ayıracı eklendiğinde indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan rezidüleri birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür (Lowry ve ark., 1951).

#### Ayırıcılar

1. Alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi
2. Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi  
%1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
%2 Na-K tartarat

Kullanılacağı zaman bu çözeltiler eşit hacimde karıştırılarak hazırlanır.

3. Alkali çözelti (Günlük olarak hazırlanır.): 50 mL alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi 1 mL bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanır.
4. Folin-Ciocalteu ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu 1.5 mL saf su olacak şekilde hazırlanır.

#### Standart Grafiğin Hazırlanması

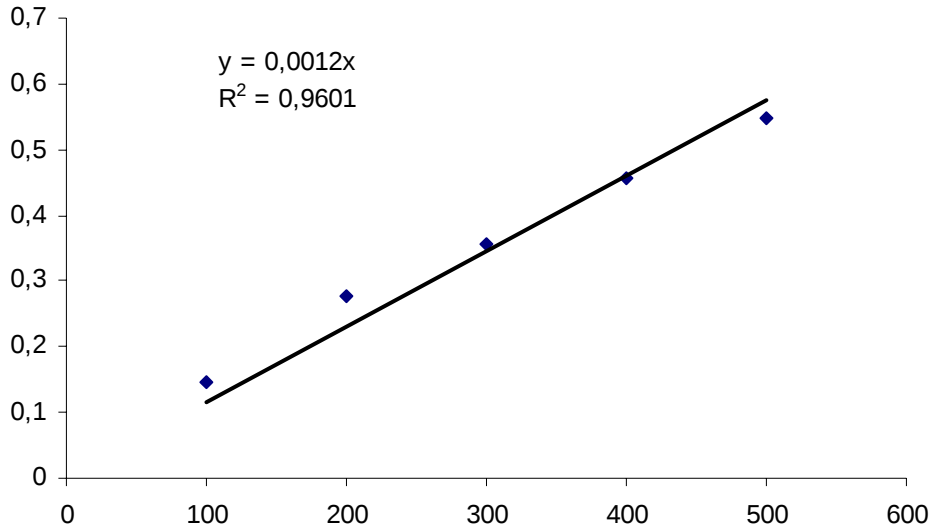
Sığır serum albumini kullanılarak 1000  $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok protein çözeltisi hazırlanır. Çalışma için bu çözelti 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde seyreltilerek eğri çiziminde bu standartların absorbans değerleri kullanılmıştır.

**Yöntem**

Örnek çözeltiden 0.3 mL alınır, üzerine 3 mL alkali çözelti ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 0.3 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve bu süre sonunda 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur. Aynı işlem 0.3 mL saf su kullanılarak kör için uygulanır.

**Hesaplama**

Örneklerin içerdiği protein miktarı yumurta albumini kullanılarak çizilen standart eğriden değerlendirilir (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Protein Standart Grafiği

**3.2.4. İstatistiksel Analiz**

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 10.0 paket programında OneWay Anova-SNK testi kullanılarak  $P < 0.05$  önem derecesinde belirlenmiştir (Kinnear ve Gray, 1995).

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

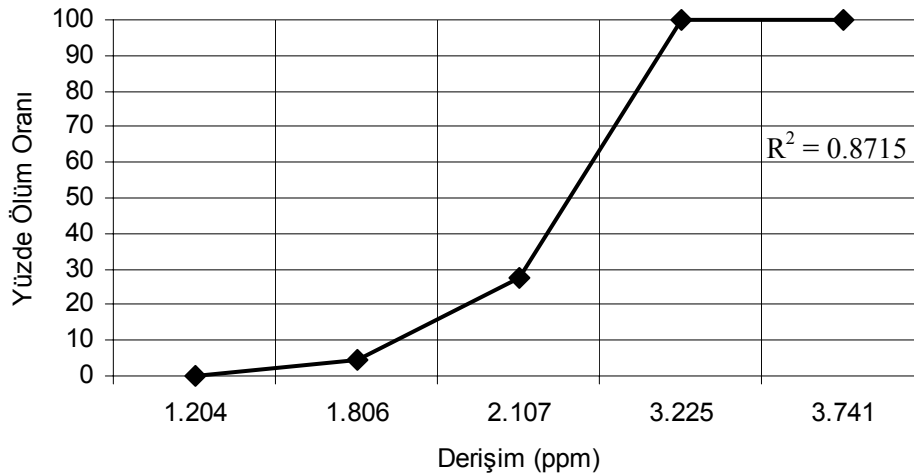
##### 4.1. Bulgular

Bu çalışmada *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu ve AChE enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

##### 4.1.1. *Oreochromis niloticus*'da Fenthionun LC<sub>50</sub> Değeri

Fenthionun LC<sub>50</sub> denemesi süresince 1.204 ve 1.806 ppm derişimlerinin etkisinde balıklarda renk koyulaşması gözlenmiş ve 96. saat sonunda 1.806 ppm fenthion etkisinde 1 balık ölmüştür. 2.107, 3.225 ve 3.741 ppm fenthion etkisinde balıklarda renk koyulaşması, titreme, çırpınma ve denge kaybı gözlenmiş ve 96. saat sonunda sırasıyla 6, 22, 22 balık ölmüştür.

Derişimlere göre ölen balık sayısı kullanılarak probit analizi istatistik yöntemi ile *O. niloticus*'da fenthionun 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 2.27 ppm olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.1.** Uygulanan derişimlerde gözlenen yüzde ölüm oranı

#### 4.1.2. Glutasyonla İlgili Parametrelerdeki Değişimler

##### 4.1.2.1. GSH Miktarındaki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon süreçlerinde GSH miktarına etkileri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Fenthion uygulanan grupta tüm etki süresince kontrole ve süreye göre değişim gözlenmemiştir. 24 saat etkide GSH miktarı kontrole göre BSO etkisinde yaklaşık %31 düzeyinde artmıştır. 48 saat etki süresinde, GSH miktarı kontrole göre BSO etkisinde %39, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %52, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde %49 azalma göstermiştir. Aynı sürede BSO ve fenthion ile, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde gözlenen azalma ayrı etkilerine göre de önemlidir. 96 saat etki süresinde kontrole göre BSO etkisinde %26, NAC etkisinde yaklaşık %42, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %65, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %27 azalma belirlenmiştir (Şekil 4.2.). Bu süreçte NAC'nin tek ve BSO ile fenthionun birlikte uygulandığı gruplarda gözlenen azalma süreye bağlıdır.

Depurasyon sürelerinde ilk 24 saatte kontrole göre BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %48, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde %49 azalma gözlenmiştir. 48 saat depurasyon süresinde kontrole göre BSO ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %54 düzeyinde azalma meydana gelmiştir. 96 saatlik depurasyon süresi sonunda kontrole göre BSO etkisinde yaklaşık %35, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %84 düzeyinde azalma bulunmuştur (Şekil 4.2.). 48 ve 96 saat depurasyon sürelerinde BSO ve fenthionun birlikte etkisinde gözlenen azalma ayrı etkilerine göre önemlidir.

Depurasyon sürelerinde 96 saatlik etkiye göre GSH miktarındaki değişimler şu şekildedir: Fenthion ve BSO gruplarında değişim gözlenmemiştir. NAC etkisinde 48 saatte GSH miktarı %53 artmıştır. BSO ve fenthionun birlikte etkisinde azalma 96 saatte %57 düzeyine ulaşmıştır. NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 24 saatte %47 azalma gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

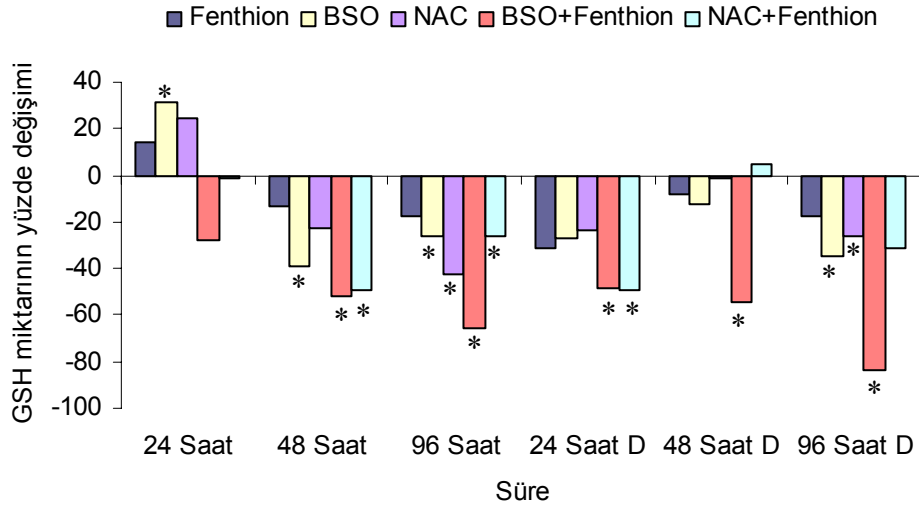
Çizelge 4.1. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSH miktarına ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL                | FENTHİON                | BSO                    | NAC                     | BSO+FENTHİON           | NAC+FENTHİON            |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$       | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$       | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$       | $X \pm S\bar{x}$        |
| 24 saat               | 3.06 $\pm$ 0.08<br>acx | 3.50 $\pm$ 0.16<br>abx  | 4.02 $\pm$ 0.18<br>bx  | 3.81 $\pm$ 0.14<br>abx  | 2.22 $\pm$ 0.14<br>cx  | 3.09 $\pm$ 0.22<br>abcx |
| 48 saat               | 3.81 $\pm$ 0.35<br>ax  | 3.32 $\pm$ 0.22<br>ax   | 2.32 $\pm$ 0.10<br>bcy | 2.95 $\pm$ 0.21<br>abxy | 1.82 $\pm$ 0.15<br>cxy | 1.93 $\pm$ 0.14<br>cy   |
| 96 saat               | 3.97 $\pm$ 0.19<br>axs | 3.26 $\pm$ 0.29<br>abxs | 2.93 $\pm$ 0.31<br>bys | 2.30 $\pm$ 0.20<br>bys  | 1.38 $\pm$ 0.09<br>cys | 2.92 $\pm$ 0.35<br>bxsv |
| 24 saat<br>Depurasyon | 3.02 $\pm$ 0.24<br>as  | 2.07 $\pm$ 0.08<br>abs  | 2.20 $\pm$ 0.12<br>abs | 2.31 $\pm$ 0.22<br>abs  | 1.56 $\pm$ 0.07<br>bs  | 1.54 $\pm$ 0.14<br>bt   |
| 48 saat<br>Depurasyon | 3.55 $\pm$ 0.23<br>as  | 3.26 $\pm$ 0.51<br>as   | 3.12 $\pm$ 0.18<br>as  | 3.52 $\pm$ 0.40<br>at   | 1.64 $\pm$ 0.19<br>bs  | 3.72 $\pm$ 0.47<br>as   |
| 96 saat<br>Depurasyon | 3.66 $\pm$ 0.20<br>as  | 3.02 $\pm$ 0.09<br>abs  | 2.38 $\pm$ 0.18<br>bs  | 2.69 $\pm$ 0.15<br>abst | 0.59 $\pm$ 0.20<br>ct  | 2.53 $\pm$ 0.14<br>abtv |

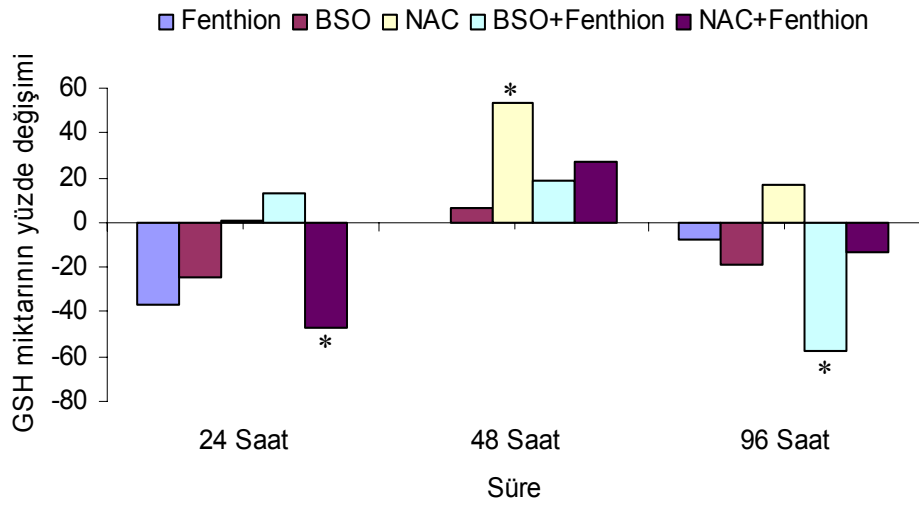
a, b, c ve d harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s, t ve v harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ( $N=5$ ).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata



**Şekil 4.2.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSH miktarının yüzde değişimi



**Şekil 4.3.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSH miktarının yüzde değişimi

#### 4.1.2.2. GSSG Miktarındaki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde GSSG miktarına etkileri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

24 saatlik etki süresinde kontrole göre GSSG miktarında fenthion etkisinde %63, BSO etkisinde %70 azalma meydana gelmiştir. 48 saatlik etki süresinde kontrole göre BSO etkisinde yaklaşık %129, NAC etkisinde %89 ve NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %79 düzeyinde artış bulunmuştur. GSSG miktarı 96 saatlik etki süresinde fenthion etkisinde kontrole göre yaklaşık %61, NAC etkisinde %79 artmıştır (Şekil 4.4.). Fenthion ve NAC gruplarında etki sürelerinde GSSG miktarında gözlenen artış süreye bağlıdır. BSO uygulanan grupta 24 saat etkiye göre 48 ve 96 saat etki sürelerinde artış bulunmuştur.

Depurasyon sürelerinde BSO ve fenthionun birlikte etkisinde GSSG miktarında kontrole göre 48 saatte %118 ve 96 saatte %489 düzeyinde olmak üzere süreye bağlı artış belirlenmiştir (Şekil 4.4.). BSO ve fenthionun birlikte etkisinde gözlenen bu artış ayrı uygulanmalara göre de önemlidir. Diğer gruplarda değişim gözlenmemiştir.

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre GSSG miktarındaki değişimler şu şekildedir: BSO ve fenthionun birlikte etkisinde 48 saatte %142 ve 96 saatte %384 olmak üzere meydana gelen artış süreye bağlıdır. Diğer gruplarda değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.5.).

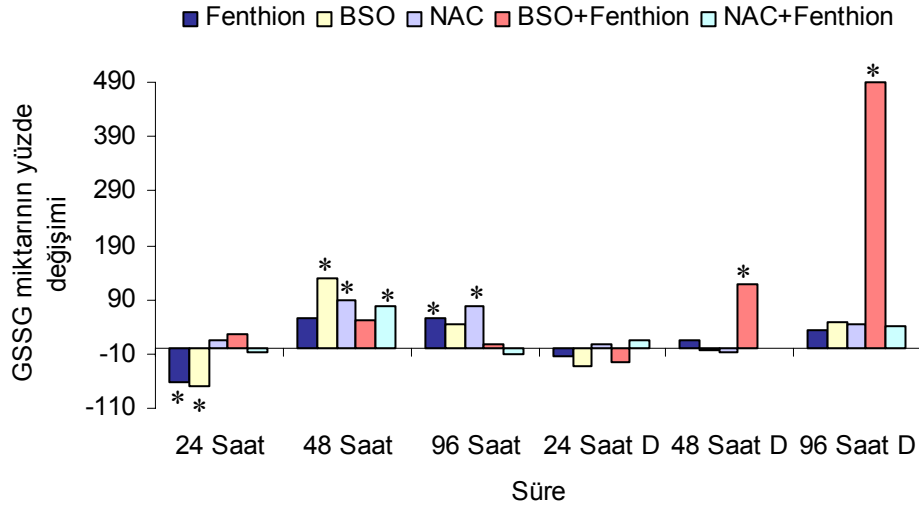
Çizelge 4.2. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSSG miktarına ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL                 | FENTHİON               | BSO                     | NAC                    | BSO+FENTHİON            | NAC+FENTHİON            |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                       |                         | $X \pm S\bar{x}$       | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$       | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$        |
| 24 saat               | 0.30 $\pm$ 0.01<br>ax   | 0.11 $\pm$ 0.02<br>bx  | 0.09 $\pm$ 0.01<br>bx   | 0.35 $\pm$ 0.07<br>ax  | 0.38 $\pm$ 0.04<br>ax   | 0.28 $\pm$ 0.07<br>ax   |
| 48 saat               | 0.28 $\pm$ 0.05<br>ax   | 0.44 $\pm$ 0.01<br>acy | 0.64 $\pm$ 0.07<br>bcy  | 0.53 $\pm$ 0.03<br>cxy | 0.43 $\pm$ 0.03<br>acx  | 0.50 $\pm$ 0.02<br>bcy  |
| 96 saat               | 0.41 $\pm$ 0.02<br>abxs | 0.66 $\pm$ 0.06<br>czs | 0.60 $\pm$ 0.06<br>bcys | 0.75 $\pm$ 0.05<br>cys | 0.45 $\pm$ 0.03<br>abxs | 0.39 $\pm$ 0.06<br>axys |
| 24 saat<br>Depurasyon | 0.51 $\pm$ 0.04<br>as   | 0.44 $\pm$ 0.05<br>as  | 0.35 $\pm$ 0.07<br>as   | 0.55 $\pm$ 0.05<br>as  | 0.39 $\pm$ 0.03<br>as   | 0.58 $\pm$ 0.06<br>as   |
| 48 saat<br>Depurasyon | 0.50 $\pm$ 0.03<br>as   | 0.58 $\pm$ 0.02<br>as  | 0.49 $\pm$ 0.03<br>as   | 0.47 $\pm$ 0.11<br>as  | 1.09 $\pm$ 0.10<br>bt   | 0.50 $\pm$ 0.12<br>as   |
| 96 saat<br>Depurasyon | 0.37 $\pm$ 0.02<br>as   | 0.50 $\pm$ 0.04<br>as  | 0.55 $\pm$ 0.05<br>as   | 0.54 $\pm$ 0.03<br>as  | 2.18 $\pm$ 0.14<br>bv   | 0.52 $\pm$ 0.03<br>as   |

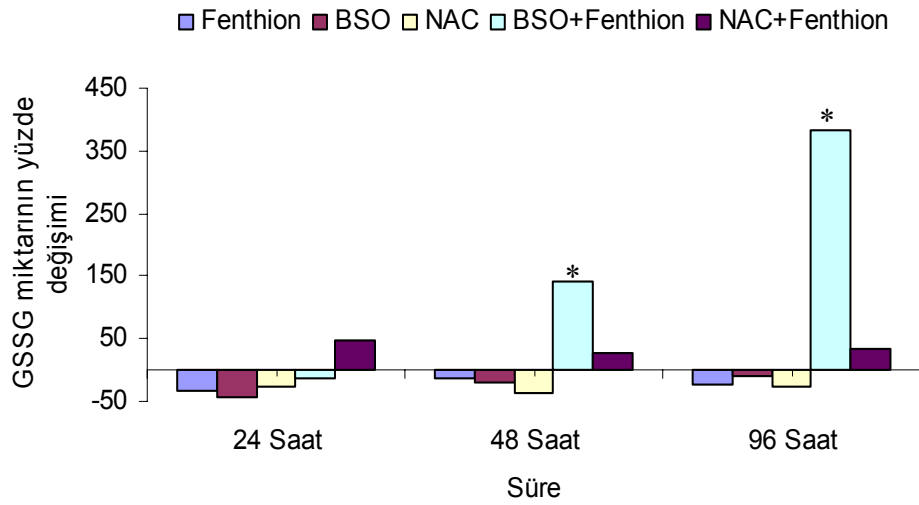
a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y ve z harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s, t ve v harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata



**Şekil 4.4.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSSG miktarının yüzde değişimi



**Şekil 4.5.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSSG miktarının yüzde değişimi

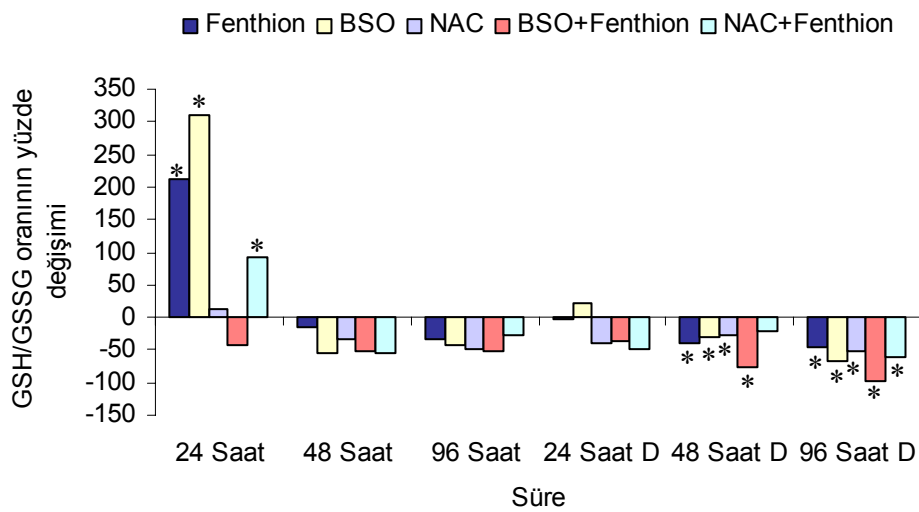
#### 4.1.2.3. GSH/GSSG Oranındaki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranına etkileri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Etki sürelerinin 24. saatinde GSH/GSSG oranı kontrole göre fenthion etkisinde %211, BSO etkisinde yaklaşık %310, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %91 artmıştır (Şekil 4.6.). Bu gruplarda gözlenen artış diğer sürelerle göre de anlamlıdır.

Depurasyon sürelerinde kontrole göre 48 saatte fenthion etkisinde %41, BSO etkisinde yaklaşık %31, NAC etkisinde %27, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %76 azalma meydana gelmiştir. 96 saatte fenthion etkisinde kontrole göre yaklaşık %45, BSO etkisinde yaklaşık %66, NAC etkisinde yaklaşık %53, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %97, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde %60 düzeyinde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.6.). 96 saatte BSO ve fenthionun birlikte etkisinde gözlenen azalma ayrı uygulanmalara göre önemlidir.

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre GSH/GSSG oranındaki değişimler şu şekildedir: BSO etkisinde 24 saatte yaklaşık %66 artış, NAC etkisinde 48 saatte %78, 96 saatte BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %94 azalma belirlenmiştir (Şekil 4.7.).



**Şekil 4.6.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranının yüzde değişimi

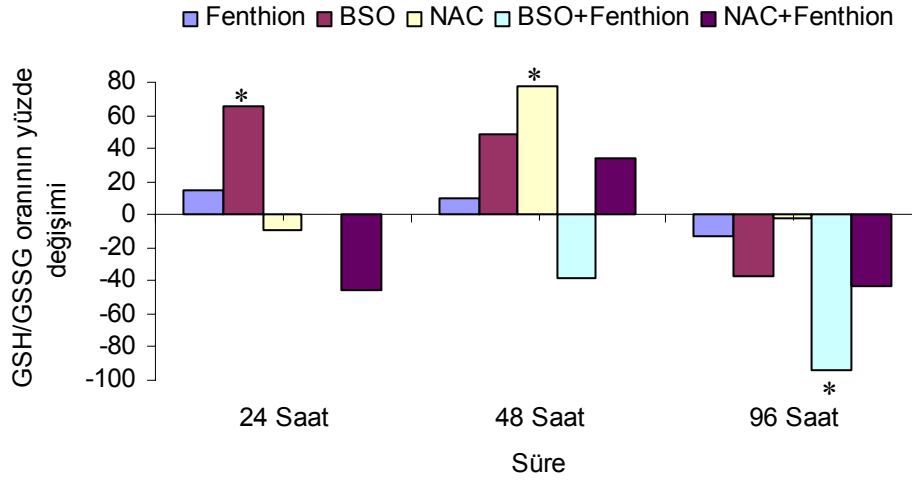
Çizelge 4.3. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranına etkileri

| SÜRE                  | KONTROL            | FENTHİON          | BSO                | NAC              | BSO+FENTHİON     | NAC+FENTHİON       |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$   |
| 24 saat               | 23.04±1.07<br>ax   | 71.71±10.86<br>bx | 94.39±9.67<br>cx   | 26.28±5.46<br>ax | 13.47±1.98<br>ax | 43.99±9.99<br>dx   |
| 48 saat               | 19.33±1.99<br>ax   | 16.19±1.51<br>ay  | 8.73±0.60<br>ay    | 13.14±0.70<br>ax | 9.33±0.42<br>ax  | 8.46±0.28<br>ay    |
| 96 saat               | 19.40±0.93<br>axst | 12.65±0.84<br>ays | 10.98±0.75<br>aysv | 9.69±0.63<br>axs | 9.35±0.34<br>axs | 14.17±0.84<br>ayst |
| 24 saat<br>Depurasyon | 14.88±2.56<br>abs  | 14.49±1.79<br>abs | 18.17±4.07<br>at   | 8.82±1.26<br>bs  | 9.35±0.79<br>bs  | 7.68±0.92<br>bs    |
| 48 saat<br>Depurasyon | 23.68±1.20<br>at   | 13.95±1.78<br>bcs | 16.35±1.75<br>bst  | 17.26±3.04<br>bt | 5.80±0.38<br>cs  | 18.94±1.74<br>abt  |
| 96 saat<br>Depurasyon | 19.98±1.07<br>ast  | 11.04±0.98<br>bs  | 6.86±0.33<br>bv    | 9.43±1.00<br>bs  | 0.56±0.19<br>ct  | 7.97±1.11<br>bs    |

a, b, c ve d harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s, t ve v harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata



**Şekil 4.7.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GSH/GSSG oranının yüzde değişimi

#### 4.1.2.4. GPx Aktivitesindeki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

GPx aktivitesinde kontrole göre 24 saat etki süresinde, fenthion etkisinde yaklaşık %39, BSO etkisinde %23, NAC etkisinde %42, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %42, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %27 oranında artış belirlenmiştir. 48 saat etki süresinde kontrole göre NAC ve fenthionun birlikte etkisinde %32 azalma gözlenmiştir. Diğer grup ve sürelerde değişim bulunmamıştır. Depurasyon sürelerinde tüm gruplarda kontrole göre değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.8.).

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre GPx aktivitesindeki değişimler şu şekildedir: Fenthion etkisinde 96 saatte %36, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 48 saatte yaklaşık %38 artış belirlenmiştir. Diğer gruplarda bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.9.).

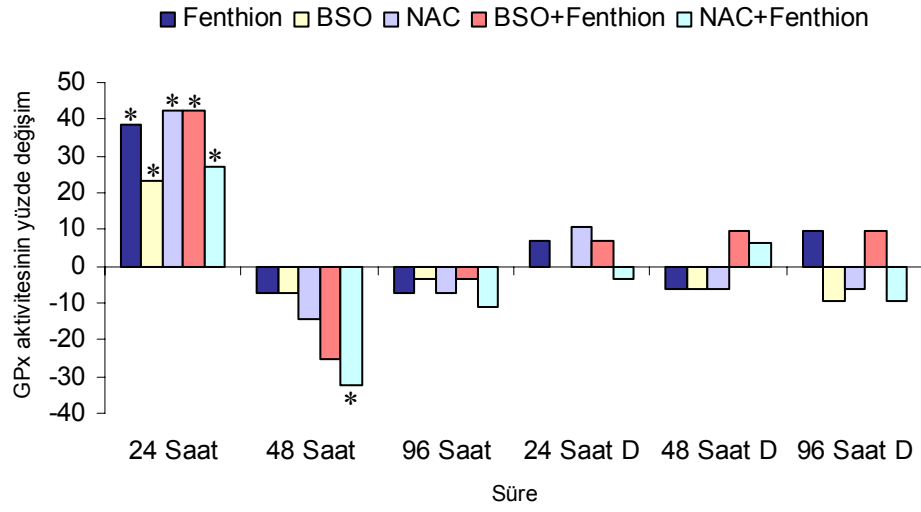
Çizelge 4.4. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL          | FENTHİON         | BSO              | NAC              | BSO+FENTHİON     | NAC+FENTHİON     |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ |
| 24 saat               | 0.26±0.01<br>ax  | 0.36±0.01<br>bx  | 0.32±0.02<br>bx  | 0.37±0.12<br>bx  | 0.37±0.02<br>bx  | 0.33±0.02<br>bx  |
| 48 saat               | 0.28±0.02<br>ax  | 0.26±0.01<br>aby | 0.26±0.02<br>ax  | 0.24±0.02<br>aby | 0.21±0.01<br>aby | 0.19±0.02<br>by  |
| 96 saat               | 0.27±0.00<br>axs | 0.25±0.01<br>ays | 0.26±0.02<br>axs | 0.25±0.01<br>ays | 0.26±0.02<br>ays | 0.24±0.01<br>ays |
| 24 saat<br>Depurasyon | 0.28±0.03<br>as  | 0.30±0.01<br>ast | 0.28±0.02<br>as  | 0.31±0.01<br>as  | 0.30±0.01<br>as  | 0.27±0.02<br>ast |
| 48 saat<br>Depurasyon | 0.31±0.02<br>as  | 0.29±0.01<br>ast | 0.29±0.01<br>as  | 0.29±0.01<br>as  | 0.34±0.01<br>as  | 0.33±0.03<br>at  |
| 96 saat<br>Depurasyon | 0.31±0.01<br>as  | 0.34±0.02<br>at  | 0.28±0.01<br>as  | 0.29±0.02<br>as  | 0.34±0.03<br>as  | 0.28±0.02<br>ast |

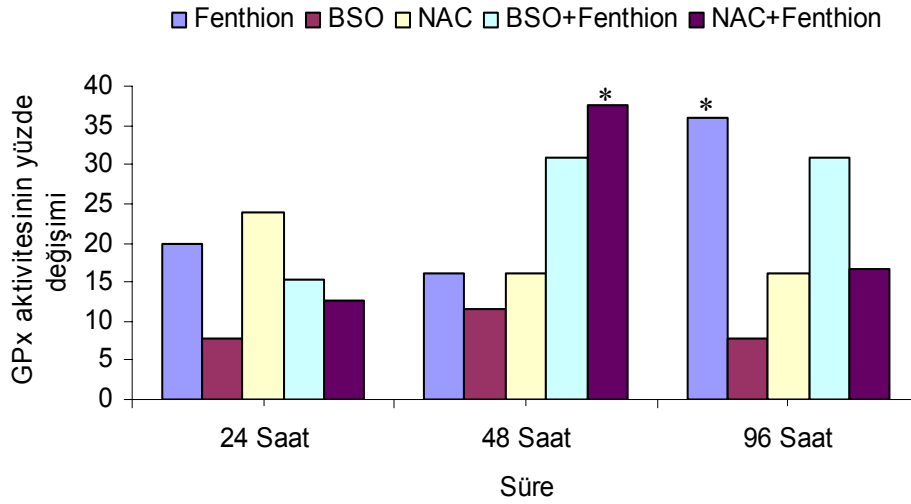
a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s ve t harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata



**Şekil 4.8.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GPx aktivitesinin yüzde değişimi



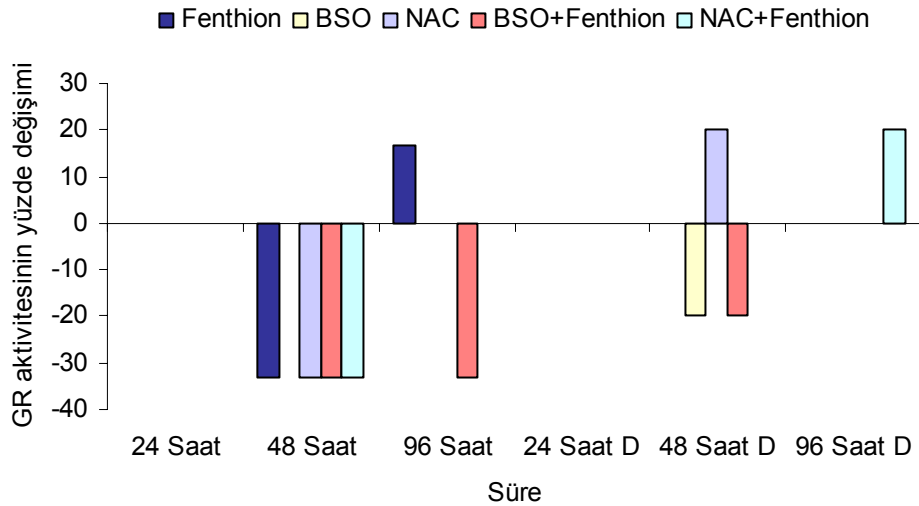
**Şekil 4.9.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 etkiye göre depurasyon sürelerinde GPx aktivitesinin yüzde değişimi

#### 4.1.2.5. GR Aktivitesindeki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde GR spesifik enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Tüm etki ve depurasyon sürelerinde GR aktivitesinde kontrole göre bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.10.). Etki sürelerinde fenthion ve NAC gruplarında 48 saate göre 96 saate gözlenen artış önemlidir.

Depurasyon sürelerinde 96 saatteki etkiye göre GR aktivitesindeki değişimler şu şekildedir: Fenthion etkisinde 24 saatte yaklaşık %43, 48 ve 96 saatte yaklaşık %29 azalma belirlenmiştir. BSO etkisinde 24 ve 48 saate %33, 96 saatte yaklaşık %17 azalma meydana gelmiştir. NAC etkisinde 24 saatte %33, 96 saatte yaklaşık %17 azalma bulunmuştur. NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 24 saatte %33 azalma gözlenmiştir. Diğer grup ve sürelerde değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.11.).



**Şekil 4.10.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GR aktivitesinin yüzde değişimi

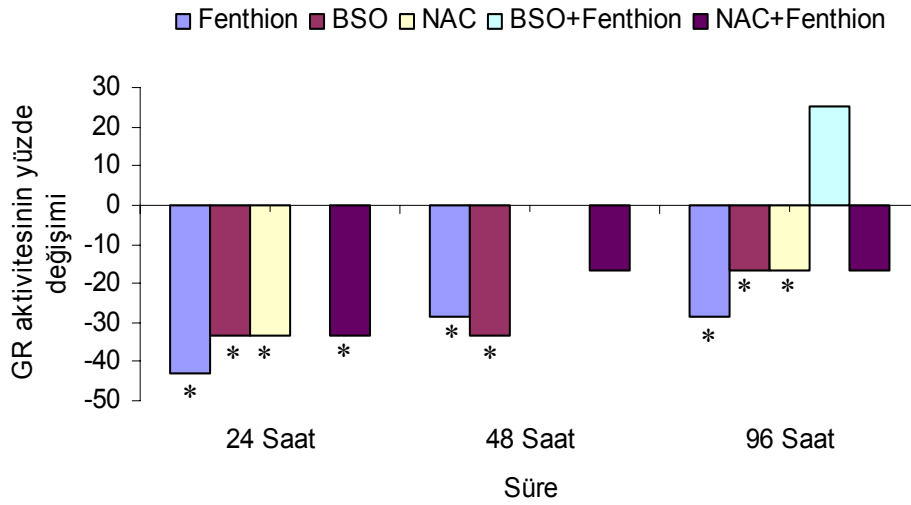
Çizelge 4.5. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GR spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL           | FENTHİON         | BSO              | NAC              | BSO+FENTHİON     | NAC+FENTHİON      |
|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$  |
| 24 saat               | 0.05±0.00<br>ax   | 0.05±0.00<br>axy | 0.05±0.00<br>ax  | 0.05±0.00<br>axy | 0.05±0.00<br>ax  | 0.05±0.00<br>ax   |
| 48 saat               | 0.06±0.00<br>ax   | 0.04±0.00<br>ax  | 0.06±0.01<br>ax  | 0.04±0.00<br>ax  | 0.04±0.00<br>ax  | 0.04±0.00<br>ax   |
| 96 saat               | 0.06±0.00<br>abxs | 0.07±0.00<br>ays | 0.06±0.01<br>axs | 0.06±0.00<br>ays | 0.04±0.00<br>bxs | 0.06±0.00<br>abxs |
| 24 saat<br>Depurasyon | 0.04±0.00<br>as   | 0.04±0.00<br>at  | 0.04±0.00<br>at  | 0.04±0.00<br>at  | 0.04±0.00<br>as  | 0.04±0.00<br>at   |
| 48 saat<br>Depurasyon | 0.05±0.00<br>as   | 0.05±0.00<br>atv | 0.04±0.00<br>at  | 0.06±0.00<br>asv | 0.04±0.00<br>as  | 0.05±0.00<br>ast  |
| 96 saat<br>Depurasyon | 0.05±0.00<br>as   | 0.05±0.00<br>av  | 0.05±0.00<br>at  | 0.05±0.00<br>atv | 0.05±0.00<br>as  | 0.06±0.00<br>as   |

a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s, t ve v harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata



**Şekil 4.11.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GR aktivitesinin yüzde değişimi

#### 4.1.2.6. GST Aktivitesindeki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde GST spesifik enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Fenthion uygulanan tüm gruplarda etki sürelerinde kontrole göre aktivitede değişiklik meydana gelmemiştir. 24 saat etki süresinde kontrole göre NAC etkisinde yaklaşık %74 azalma, 48 saat etki süresinde BSO etkisinde ise yaklaşık %57 artış gözlenmiştir (Şekil 4.12.). NAC grubunda 24 saatte gözlenen azalma diğer etki sürelerinde kontrol düzeylerine ulaşmıştır. BSO etkisinde 24 saate göre diğer etki sürelerinde artış belirlenmiştir.

Depurasyon sürecinde NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 24 saatte kontrole göre yaklaşık %165 artış meydana gelmiştir ve bu artış ayrı uygulanan gruplara göre de önemlidir. Diğer grup ve sürelerde değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.12.).

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre GST aktivitesindeki değişimler şu şekildedir: NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 24 saatte yaklaşık %79 artış meydana gelmiştir (Şekil 4.13.).

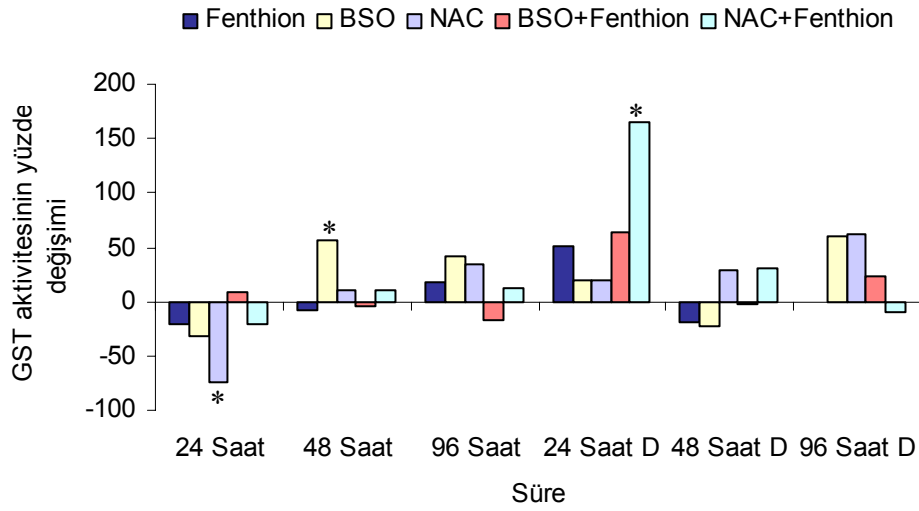
Çizelge 4.6. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde GST spesifik aktivitesine ( $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$ ) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL                  | FENTHİON                 | BSO                     | NAC                       | BSO+FENTHİON            | NAC+FENTHİON              |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$         | $X \pm S\bar{x}$         | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$          | $X \pm S\bar{x}$        | $X \pm S\bar{x}$          |
| 24 saat               | 18.72 $\pm$ 1.82<br>ax   | 14.89 $\pm$ 1.38<br>ax   | 12.89 $\pm$ 1.31<br>ax  | 4.89 $\pm$ 1.00<br>bx     | 20.24 $\pm$ 3.11<br>ax  | 14.94 $\pm$ 1.10<br>ax    |
| 48 saat               | 19.10 $\pm$ 2.44<br>ax   | 17.41 $\pm$ 1.31<br>ax   | 29.90 $\pm$ 2.58<br>by  | 21.09 $\pm$ 2.61<br>aby   | 18.34 $\pm$ 0.97<br>ax  | 21.05 $\pm$ 3.42<br>abx   |
| 96 saat               | 18.41 $\pm$ 2.89<br>abxs | 21.57 $\pm$ 0.88<br>abxs | 25.99 $\pm$ 3.31<br>ays | 24.90 $\pm$ 1.65<br>abyst | 15.24 $\pm$ 2.13<br>bxs | 20.64 $\pm$ 1.85<br>abxsv |
| 24 saat<br>Depurasyon | 13.93 $\pm$ 1.37<br>as   | 21.02 $\pm$ 2.67<br>as   | 16.55 $\pm$ 3.72<br>as  | 16.58 $\pm$ 1.32<br>as    | 22.70 $\pm$ 1.66<br>as  | 36.89 $\pm$ 2.70<br>bt    |
| 48 saat<br>Depurasyon | 24.27 $\pm$ 2.78<br>as   | 19.47 $\pm$ 3.80<br>as   | 18.94 $\pm$ 0.61<br>as  | 31.16 $\pm$ 3.58<br>at    | 23.73 $\pm$ 2.61<br>as  | 31.67 $\pm$ 4.13<br>ast   |
| 96 saat<br>Depurasyon | 13.71 $\pm$ 1.57<br>as   | 13.52 $\pm$ 0.84<br>as   | 21.95 $\pm$ 3.87<br>as  | 22.17 $\pm$ 4.06<br>ast   | 16.87 $\pm$ 2.49<br>as  | 12.28 $\pm$ 1.76<br>av    |

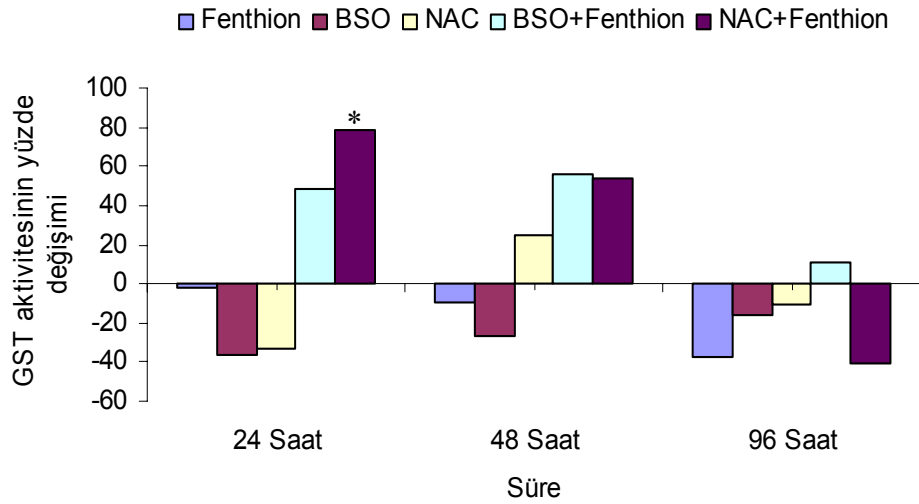
a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s ve t harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata



**Şekil 4.12.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde GST aktivitesinin yüzde değişimi



**Şekil 4.13.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde GST aktivitesinin yüzde değişimi

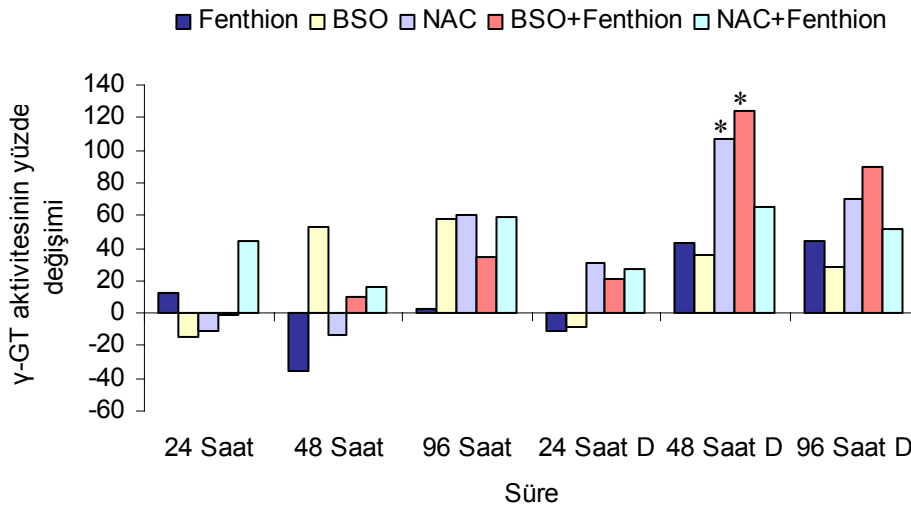
#### 4.1.2.7. $\gamma$ -GT Aktivitesindeki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde  $\gamma$ -GT spesifik enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Etki süresince kontrole göre hiçbir grupta değişim meydana gelmemiştir (Şekil 4.14.). BSO etkisinde 24 saate göre 48 ve 96 saatte, NAC etkisinde 96. saatte diğer etki sürelerine göre artış belirlenmiştir.

24 ve 96 saat depurasyon sürelerinde hiçbir grupta kontrole göre değişim belirlenmemiştir. Depurasyon sürecinde 48 saatte NAC etkisinde kontrole göre yaklaşık %107, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %124 artış gözlenmiştir. Bu sürede BSO ve fenthionun birlikte etkisinde gözlenen artış iki bileşiğin ayrı etkilerine göre de önemlidir (Şekil 4.14.).

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre  $\gamma$ -GT aktivitesindeki değişimler şu şekildedir: NAC ve fenthionun ayrı ve birlikte uygulandığı gruplarda ve BSO ile fenthionun birlikte etkisinde değişim belirlenmemiştir. BSO etkisinde 24 saatte yaklaşık %56, 96 saatte yaklaşık %48 azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.15.).



**Şekil 4.14.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde  $\gamma$ -GT aktivitesinin yüzde değişimi

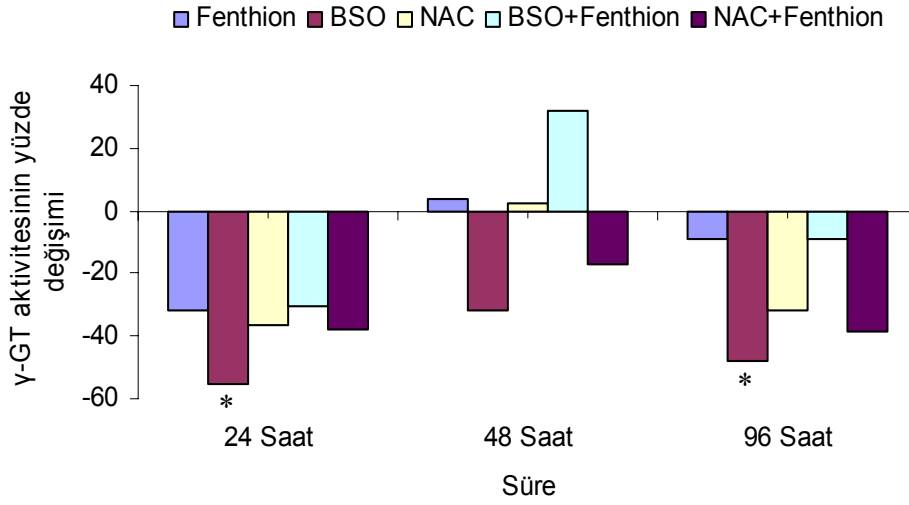
Çizelge 4.7. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde  $\gamma$ -GT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL          | FENTHİON         | BSO               | NAC               | BSO+FENTHİON      | NAC+FENTHİON      |
|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$  |
| 24 saat               | 6.36±0.33<br>ax  | 7.14±0.23<br>ax  | 5.46±0.28<br>ax   | 5.67±0.33<br>ax   | 6.27±0.13<br>ax   | 9.21±1.12<br>ax   |
| 48 saat               | 7.75±0.53<br>abx | 5.04±0.08<br>ax  | 11.87±1.66<br>by  | 6.75±0.90<br>ax   | 8.52±0.58<br>abx  | 8.99±0.27<br>abx  |
| 96 saat               | 7.65±1.18<br>axs | 7.21±0.42<br>axs | 11.19±0.78<br>ays | 11.32±2.51<br>ays | 9.52±0.96<br>axst | 11.22±0.40<br>axs |
| 24 saat<br>Depurasyon | 5.47±0.91<br>as  | 4.90±0.28<br>as  | 4.98±0.26<br>at   | 7.18±0.33<br>as   | 6.65±0.44<br>as   | 6.96±0.59<br>as   |
| 48 saat<br>Depurasyon | 5.60±0.39<br>as  | 7.47±0.49<br>abs | 7.63±0.91<br>abst | 11.57±1.85<br>bcs | 12.53±1.92<br>ct  | 9.28±1.14<br>abcs |
| 96 saat<br>Depurasyon | 4.55±0.41<br>as  | 6.55±0.33<br>as  | 5.84±0.37<br>at   | 7.74±0.64<br>as   | 8.65±1.18<br>ast  | 6.91±0.30<br>as   |

a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s ve t harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata



**Şekil 4.15.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde  $\gamma$ -GT aktivitesinin yüzde değişimi

#### 4.1.2.8. $\gamma$ -GCS Aktivitesindeki Değişimler

*O. niloticus* beyin dokusunda  $\gamma$ -GCS aktivitesi belirlenememiştir.

#### 4.1.3. MDA Miktarındaki Değişimler

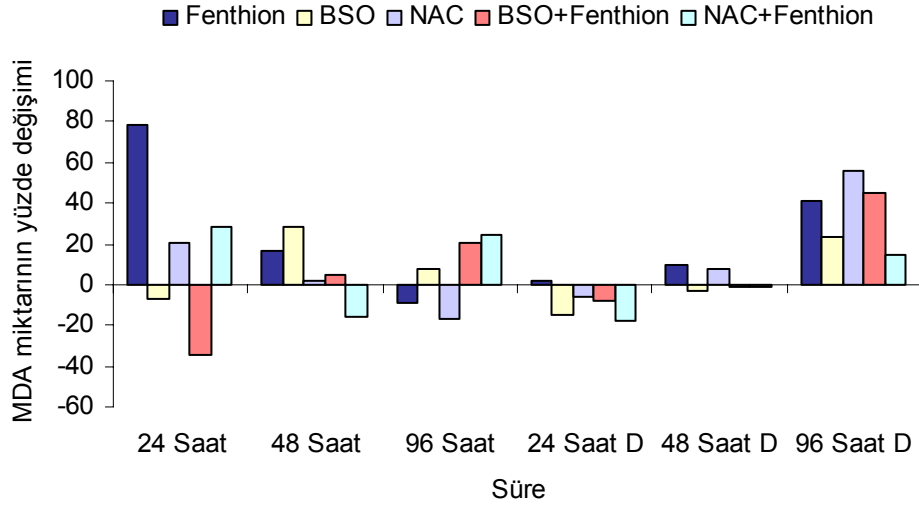
Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde MDA miktarına etkileri Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Etki ve depurasyon süreçlerinde hiçbir grupta kontrole göre değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.16.).

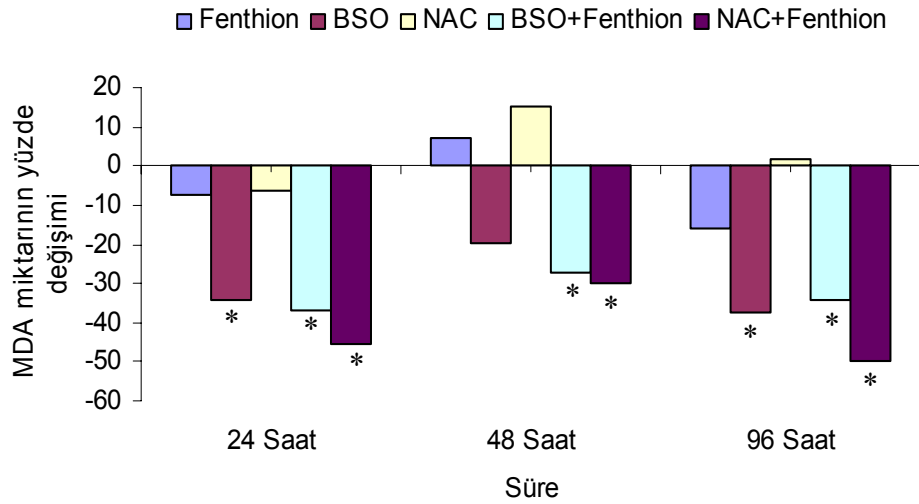
Tüm etki sürelerinde BSO, kontrole göre önemli olmamakla birlikte, süreye bağlı artışlar meydana getirmiştir. Fenthionun BSO ve NAC ile birlikte uygulandığı gruplarda 96 saat etki süresinde diğer etki sürelerine göre artış belirlenmiştir.

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre MDA miktarındaki değişimler şu şekildedir: BSO etkisinde 24 saatte %34, 96 saatte yaklaşık %38 azalma belirlenmiştir. BSO ve fenthionun birlikte etkisinde 24 saatte %37, 48 saatte %27, 96 saatte %34 azalma gözlenmiştir. NAC ve fenthionun birlikte etkisinde 24

saatte %45, 48 saatte yaklaşık %30, 96 saatte yaklaşık %50 azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.17.).



**Şekil 4.16.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde MDA miktarının yüzde değişimi



**Şekil 4.17.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde MDA miktarının yüzde değişimi

Çizelge 4.8. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL            | FENTHİON           | BSO                | NAC               | BSO+FENTHİON       | NAC+FENTHİON       |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$   | $X \pm S\bar{x}$   |
| 24 saat               | 22.46±1.35<br>abx  | 40.04±5.68<br>ax   | 20.96±1.00<br>abx  | 26.96±5.35<br>abx | 14.64±0.84<br>bx   | 28.73±10.28<br>abx |
| 48 saat               | 28.09±1.17<br>axy  | 32.81±1.46<br>ax   | 36.12±4.97<br>axy  | 28.73±1.89<br>ax  | 29.33±2.09<br>ax   | 23.56±1.53<br>ax   |
| 96 saat               | 45.09±3.82<br>abys | 41.03±1.21<br>abxs | 48.44±5.28<br>abys | 37.40±2.98<br>axs | 54.29±5.60<br>abys | 56.10±5.26<br>bys  |
| 24 saat<br>Depurasyon | 37.17±2.00<br>ast  | 37.97±2.86<br>as   | 31.83±1.33<br>at   | 35.01±1.09<br>as  | 34.11±3.18<br>at   | 30.62±3.42<br>at   |
| 48 saat<br>Depurasyon | 39.93±0.58<br>ast  | 43.91±1.58<br>as   | 38.90±0.65<br>ast  | 43.11±1.63<br>as  | 39.58±1.93<br>at   | 39.34±2.33<br>at   |
| 96 saat<br>Depurasyon | 24.52±6.08<br>at   | 34.51±3.09<br>as   | 30.25±1.17<br>at   | 38.09±1.56<br>as  | 35.66±3.65<br>at   | 28.14±2.85<br>at   |

a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s ve t harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata

#### 4.1.4. AChE Aktivitesindeki Değişimler

Beyin dokusunda fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının etki ve depurasyon sürelerinde AChE spesifik enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

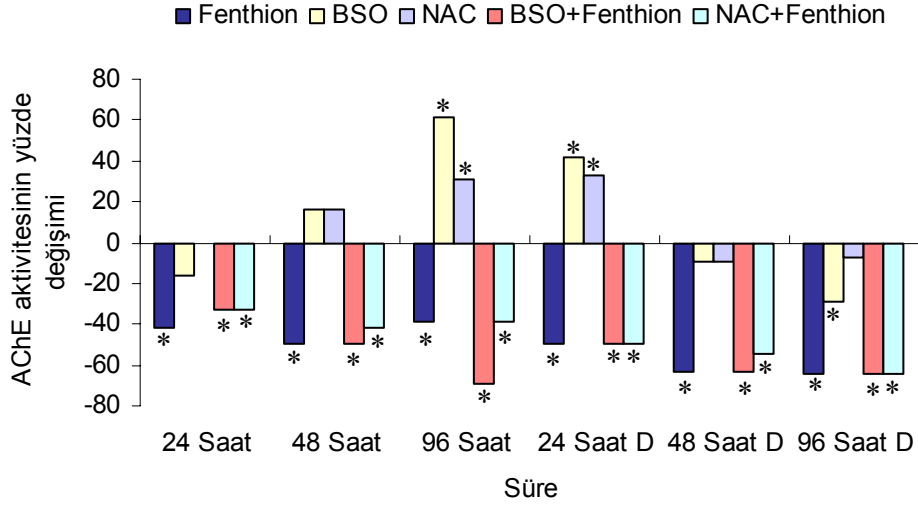
Asetilkolinesteraz aktivitesinde fenthion etkisinde kontrole göre 24 saatlik etkide yaklaşık %42, BSO ve fenthionun birlikte etkisinde %33, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde %33 azalma gözlenirken, NAC ve BSO uygulanan grupta kontrole göre değişim belirlenmemiştir. Fenthionun ayrı ve BSO ile birlikte uygulandığı gruplarda 48 saat etki süresinde kontrole göre %50, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %42 azalma bulunmuştur. Fenthion, 96 saatlik etki süresinde AChE aktivitesinde kontrole göre yaklaşık %39, BSO ve fenthionun birlikte etkisi %69, NAC ve fenthionun birlikte etkisi yaklaşık %36 azalmaya neden olmuştur. NAC etkisinde kontrole göre yaklaşık %31, BSO etkisinde yaklaşık %62 aktivite artışı meydana gelmiştir. BSO ve fenthionun birlikte etkisinde AChE inhibisyonu NAC ve fenthionun birlikte etkisine göre daha fazladır (Şekil 4.18.).

Fenthionun tek ve NAC ile birlikte uygulandığı gruplarda etki süreleri arasında değişim gözlenmemiştir. BSO ve fenthionun birlikte etkisinde inhibisyon süreye bağlı olarak artmaktadır. BSO ve NAC uygulanan gruplarda da aktivite artışı süreye bağlıdır.

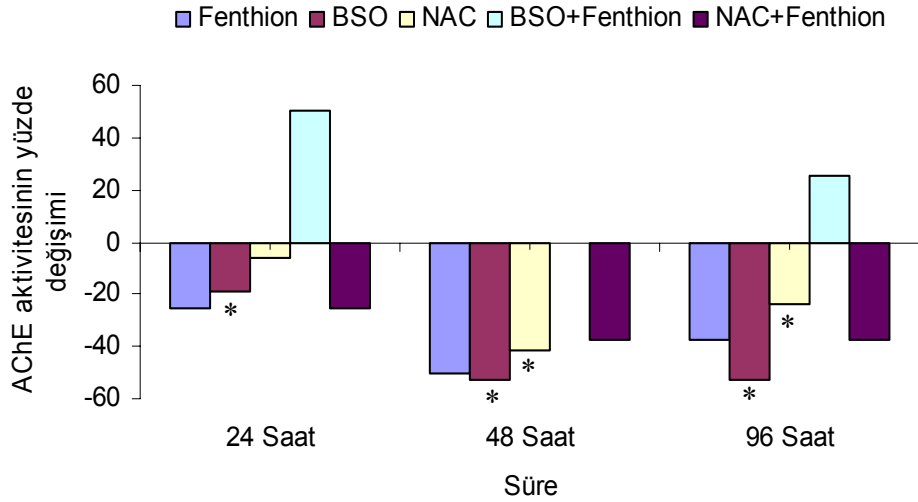
Depurasyon sürelerinde kontrole göre 24 saatte AChE aktivitesindeki azalma fenthion uygulanan tüm gruplarda %50 düzeyinde devam etmektedir. BSO etkisinde kontrole göre yaklaşık %42, NAC etkisinde %33 artış meydana gelmiştir. 48 saatte fenthionun ayrı ve BSO ile birlikte uygulandığı gruplarda kontrole göre yaklaşık %64, NAC ve fenthionun birlikte etkisinde yaklaşık %55 azalma belirlenmiştir. NAC ve BSO uygulanan gruplarda kontrole göre değişim gözlenmemiştir. 96 saat sonunda fenthion uygulanan tüm gruplarda kontrole göre %64, BSO etkisinde yaklaşık %20 azalma belirlenmiştir (Şekil 4.18.).

Depurasyon sürelerinde 96 saat etki süresine göre AChE aktivitesindeki değişimler şu şekildedir: Fenthion uygulanan tüm gruplarda inhibisyon etkinin 96. saati ile aynı düzeydedir. BSO etkisinde 24 saatte %19, 48 ve 96 saatte %52 azalma

belirlenmiştir. NAC etkisinde 48 saatte %41, 96 saatte yaklaşık %24 azalma belirlenmiştir (Şekil 4.19.).



**Şekil 4.18.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında etki ve depurasyon sürelerinde AChE aktivitesinin yüzde değişimi



**Şekil 4.19.** *O. niloticus*'da beyinde fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarında 96 saat etkiye göre depurasyon sürelerinde AChE aktivitesinin yüzde değişimi

Çizelge 4.9. Fenthion, BSO, NAC ve birlikte uygulanmalarının *O. niloticus*'da beyinde etki ve depurasyon sürelerinde AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkileri

| SÜRE                  | KONTROL          | FENTHİON          | BSO              | NAC              | BSO+FENTHİON     | NAC+FENTHİON     |
|-----------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                       | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$  | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ | $X \pm S\bar{x}$ |
| 24 saat               | 0.12±0.00<br>ax  | 0.07±0.01<br>bx   | 0.10±0.01<br>abx | 0.12±0.01<br>ax  | 0.08±0.00<br>bx  | 0.08±0.01<br>bx  |
| 48 saat               | 0.12±0.01<br>ax  | 0.06±0.00<br>bx   | 0.14±0.01<br>ax  | 0.14±0.00<br>ax  | 0.06±0.00<br>bxy | 0.07±0.01<br>bx  |
| 96 saat               | 0.13±0.01<br>axs | 0.08±0.00<br>bexs | 0.21±0.01<br>cys | 0.17±0.02<br>dys | 0.04±0.01<br>bys | 0.08±0.02<br>exs |
| 24 saat<br>Depurasyon | 0.12±0.01<br>as  | 0.06±0.00<br>bs   | 0.17±0.01<br>ct  | 0.16±0.01<br>cs  | 0.06±0.00<br>bs  | 0.06±0.01<br>bs  |
| 48 saat<br>Depurasyon | 0.11±0.01<br>as  | 0.04±0.00<br>bs   | 0.10±0.00<br>av  | 0.10±0.00<br>at  | 0.04±0.00<br>bs  | 0.05±0.00<br>bs  |
| 96 saat<br>Depurasyon | 0.14±0.01<br>as  | 0.05±0.00<br>bs   | 0.10±0.01<br>cv  | 0.13±0.01<br>act | 0.05±0.00<br>bs  | 0.05±0.00<br>bs  |

a, b, c, d ve e harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri etki süreleri arasındaki ayrımı, s, t ve v harfleri ise 96 saat etki süresine göre depurasyon süreleri arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5).

$X \pm S\bar{x}$  : Aritmetik ortalama±Standart Hata

#### 4.2. Tartışma

Glutasyon, pro-oksidant bileşiklerle reaksiyon vererek önemli bir antioksidant savunma meydana getirir (Arteel ve Sies, 2001). OP bileşiklerin balık sistemlerinde GSH ve GSH ile ilişkili antioksidant savunma mekanizmalarını etkilediklerini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Zahn ve ark., 1996; Hai ve ark., 1997; Pena-Llopis ve ark., 2003a). OP insektisid dimethoate etkisinde *C. lazera*'da karaciğer GSH düzeyinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Hamed ve ark., 1999).

Bu çalışmada, fenthionun %20 LC<sub>50</sub> derişimi etkisinde bırakılan *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH miktarında bir değişim bulunmamıştır. Düşük derişimde, fenthionun oksidatif stresi indükleyici etkisinin GSH redoks sistemince giderilebildiğı düşünölmektedir.

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda beyin dokusunda OP anilofosun 850 mg/kg'lık tek ve 700 mg/kg'lık OP malathion ile birlikte uygulanmasının GSH miktarında bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (Hazarika ve ark., 2003). OP pestisid RPR-V 33 µg/kg/gün dozu oral olarak uygulandığında sıçan böbrek ve beyin dokusunda GSH miktarının tüm uygulanma sürelerinde değişmeden kaldığı, 66 ve 99 µg/kg/gün dozlarda ise GSH miktarının uzun süreli etkide azaldığı bildirilmektedir (Mahboob ve ark., 2004).

Bütiyonin sülfoksimin γ-GCS enzimini inhibe ederek GSH sentezini sınırlandıran bir bileşiktir (Dringen, 2000). BSO uygulanması ile doku GSH düzeylerinin azaltılması çalışmaları GSH fonksiyonları hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır (Anderson, 1998).

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *A. anguilla*'da kas dokusunda azalan GSH miktarının yerine konulabilirliğinin büyük ölçüde karaciğerden plazmaya GSH salınması ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Bu çalışmada, BSO etkisinde orta süreli etkiden başlayarak GSH miktarının önemli düzeyde azalmaya devam etmesi, kan yoluyla beyne iletilmesi gereken GSH veya yapıtaşlarının karaciğerde henüz yeterli düzeyde sentezlenmemiş olduğunu düşündürmektedir. Beyindeki GSH homeostasisi baskın olarak yapıtaşlarının kan-beyin bariyerini geçerek bu organa taşınması ile sağlanmaktadır. Bununla birlikte

GSH'nın kan-beyin bariyerini parçalanmadan geçtiği de bilinmektedir (Dringen, 2000).

*O. mykiss*'de TCB (3,3',4,4'-tetraklorobifenil) uygulanmasının karaciğer, böbrek ve kas dokularında GSH miktarını değiştirmedeği, TCB ve BSO'nun birlikte etkisinin GSH miktarını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Azalma etkisinin BSO'nun  $\gamma$ -GCS enzimini inhibe etmesinden kaynaklandığı ve TCB'nin GSH ile ilgili enzimleri aktive etmesi sonucu sadece TCB enjekte edilen grupta, GSH miktarının korunduğu şeklinde açıklanmıştır (Otto ve ark., 1997).

Bütiyonin sülfoksimin ve fenthion birlikte uygulandığında GSH miktarında gözlenen azalma depurasyon süresince de devam etmektedir. Bu azalma BSO'nun tek uygulanmasına göre daha fazladır. Fenthionun GSH azaltıcı etkisi, BSO tarafından GSH sentezinin baskılanmasıyla ortaya çıkmış olabilir.

N-asetilsistein uygun dozlarda, sistein öncüsü olması nedeni ile GSH sentezini arttıran bir ajan olarak kullanılmaktadır (Sen, 1997). NAC, fenthion etkisinden korunmada etkili olup olamayacağını anlamak üzere denenmiş; ancak GSH düzeyini azalttığı gözlenmiştir. Bu etki uygulanan dozun koruyuculuk sınırının üzerinde olduğunu göstermektedir. NAC'nin denenilen dozunda fenthion ile birlikte *O. niloticus*'da toksik etki oluşturduğu ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Sıçan beyin dokusunda intraperitoneal NAC enjeksiyonunun GSH miktarını azalttığı bildirilmektedir (Vina ve ark, 1983). Düşük moleküler ağırlıklı tiyollerin yüksek dozda antioksidant rollerinden çok pro-oksidant gibi davrandıkları ve metal-bağımlı süreçlerle ROS üretimini arttırdıkları bildirilmektedir. Yüksek dozdaki NAC'nin *A. anguilla*'da ölüme yol açtığı bulunmuştur (Pena-Llopis ve ark, 2003b).

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *A. anguilla*'da beyin dokusunda GSSG miktarındaki artış ile GSH/GSSG oranındaki azalmanın hücrel redoks durumu için indikatör olduğu bildirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003b). Bu çalışmada fenthionun kısa süreli etkisinde kontrole göre GSH/GSSG oranında meydana getirdiği artışın aynı sürede GSSG miktarındaki azalmayla ilgili olduğu düşünülmektedir. Fenthion etkisinde orta ve uzun süreli etkide GSH/GSSG oranında gözlenen azalma, GSSG miktarındaki süreye bağlı artışla ilişkilidir.

Kısa süreli etkide kontrole göre BSO'nun GSH/GSSG oranında oluşturduğu artış aynı sürede GSH miktarındaki artış ve GSSG miktarındaki azalmanın sonucudur. Bu durumun ilk etki süresinde BSO'nun toksik etkilerinden korunmak amacıyla adaptif bir yanıt olduğu düşünülmektedir.

Bütiyonin sülfoksiminin orta ve uzun süreli etkide GSSG miktarında meydana getirdiği artış, aynı sürelerde GSH miktarındaki azalmayla paralellik göstermektedir. Bu durum sentezi azaltılan GSH'ın hücresel süreçlerde kullanılması sonucu GSSG miktarının artması şeklinde yorumlanabilir. BSO ve fenthionun birlikte etkisinde depurasyon sürecinde süreye bağlı olarak gözlenen GSSG miktarındaki artış ve GSH/GSSG oranındaki azalma devam eden GSH miktarındaki azalma ile ilişkilidir. Bu grupta gözlenen değişimlerin ayrı uygulanmalara oranla anlamlı olması fenthion toksisitesinde GSH metabolizmasının yer aldığını düşündürmektedir.

Herbisid 2,4-D'nin ön maddesi olan 2,4-diklorofenolün uzun süreli etkide *C. auratus*'da karaciğer dokusunda uygulanan tüm derişimlerde GSH/GSSG oranını azalttığı, yüksek derişimde oranın kontrol değerlerine yakın olduğu belirlenmiştir. Bu durum GSH dengesini sağlayabilmek üzere adaptif bir yanıt olarak açıklanmaktadır (Zhang ve ark, 2004). OP dichlorvosun LC<sub>85</sub> derişimi etkisinde ölmeyen *A. anguilla*'da karaciğerde GSH/GSSG oranının ölenlerdekine oranla arttığı veya normal düzeyde kaldığı saptanmıştır (Pena-Llopis ve ark, 2003a).

N-asetilsisteinin GSSG miktarında kontrole göre meydana getirdiği süreye bağlı artış, GSH miktarında gözlenen süreye bağlı azalma ile orantılıdır. Bu durum yüksek dozlarda bu bileşiğin oksidatif stresi indüklemeye etkisiyle ilişkili olabilir. NAC'nin fenthion ile birlikte uygulanması, kısa süreli etkide GSH/GSSG oranında artışa neden olmaktadır. NAC ve fenthionun birlikte, fenthion uygulanmasına göre GSH/GSSG oranını daha düşük düzeyde arttırmış olması yüksek dozda NAC'nin oksidatif stres oluşturma potansiyeline bağlanmaktadır.

Tüm gruplarda orta ve uzun süreli depurasyon sürecinde GSH/GSSG oranında meydana gelen azalma, 4 günlük depurasyon süresinin bu bileşiklerin pro-oksiant etkilerinin giderilmesinde yeterli olmadığını göstermektedir. *Brachydanio rerio*'da karaciğerde iki hafta bakır etkisinden sonra iki hafta temiz suda bırakılan balıklarda

GSH miktarı ile GST aktivitesinin yüksek olduğu ve oksidatif stresin depurasyon sürecinde de devam ettiği bildirilmektedir (Paris-Palacios ve ark., 2000).

$\gamma$ -Glutamilsisteinil sentetaz hücre içi GSH sentezinin ilk ve sınırlayıcı basamağını katalizleyen enzimdir (Griffith, 1999). *O. niloticus*'da beyin dokusunda  $\gamma$ -GCS aktivitesi ölçülememiştir. Aktivitenin ölçüm sınırlarının altında kalmış olduğu düşünülmektedir. Beyin dokusunda  $\gamma$ -GCS aktivitesinin diğer dokulara oranla düşük olduğu bildirilmektedir (Dringen, 2000).  $\gamma$ -GCS aktivitesi ile ilgili balıklarda yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup (Stephensen ve ark., 2002; Pena-Llopis ve ark., 2003a; Meyer ve ark., 2003), balık beyin dokusu ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. *I. punctatus*'da karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında  $\gamma$ -GCS aktivitesinin ölçülmesi ile bu dokuların bağımsız bir şekilde GSH sentezi yapabildiği bildirilmektedir (Gallagher ve DiGiulio, 1992). Beyin kapillerleri ve endotel hücrelerinde sodyum-bağımlı GSH taşıyıcılarının bulunduğu son çalışmalarla gösterilmiştir (Dringen, 2000). Bu taşıyıcıların kandan beyine GSH aktarılmasındaki ve beyin GSH homeostasisinin korunmasındaki etki düzeyleri henüz açıklanmayı bekleyen bir konudur.

Glutasyon peroksidaz,  $H_2O_2$  ve lipid peroksitlerini indirgerken, GSH'ın GSSG'ye yükseltgenmesini katalizleyen enzimdir ve böylece oksidatif strese karşı önemli bir savunma oluşturmaktadır (Winston ve DiGiulio, 1991).

2,4-diklorofenol etkisinde *C. auratus*'da karaciğerde GPx aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu artışın GPx'in CAT'a oranla  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda daha etkili bir antioksidant enzim olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2005). İnsan eritrositlerinde OP malathion ve karbamatlı propoxur etkisinde GPx aktivitesinde gözlenen artışın oksidatif stresten kaynaklanan lipid hidroperoksitlerini detoksifiye etme amaçlı olduğu ileri sürülmüştür (Banerjee ve ark., 1999). Bu çalışmada kısa süreli etkide tüm gruplarda GPx aktivitesinde kontrole göre artış meydana gelmiştir ve diğer etki sürelerinde aktivite kontrol düzeyine inmiştir. Aktivite artışının ilk etki süresinde bu bileşiklerin pro-oksidant etkilerine karşı adaptif bir yanıt olduğu düşünülmektedir.

Glutasyon peroksidaz substrat olarak GSH'ı kullanan bir enzimdir. Fenthion ve NAC'nin birlikte etkisinde orta süreli etkide GPx aktivitesinde gözlenen azalmanın

GSH miktarındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Beyin dokusunda OP dichlorvos etkisinde *C. carpio*'da GPx aktivitesinde meydana gelen artışın artan GSH miktarına bağlı olduğu bildirilmektedir (Hai ve ark., 1997). Kağıt fabrikası atık sularında yaşayan *C. punctatus*'da solungaç ve böbrek dokularında GPx aktivitesinde gözlenen azalma, bu dokuların peroksitlerin etkisini nötralize etme kapasitelerinin yetersiz olduğu şeklinde yorumlanmıştır. GPx aktivitesindeki azalmaya paralel olarak her iki dokuda da GSH miktarında azalma meydana gelmektedir (Ahmad ve ark., 2000). Endüstriyel kirletici TCB etkisinde *O. mykiss*'de karaciğer, solungaç ve kas dokularında GSH enjeksiyonu ile artan GSH miktarına bağlı olarak GPx aktivitesinin arttığı, BSO enjeksiyonu ile azalan GSH miktarına bağlı olarak da GPx aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Otto ve ark., 1997).

Glutatyon redüktaz NADPH varlığında GSSG'yi GSH'a indirgeyerek hücre içi GSH derişiminin dengelenmesinde rol oynayan bir enzimdir (Pena-Llopis ve ark., 2001). Bu çalışmada GR aktivitesinde etki ve depurasyon sürelerinde kontrole göre değişiklik saptanmamıştır.

Bütiyonin sülfoksimin ve fenthionun birlikte etkisinde GR aktivitesi ayrı uygulanmalarına oranla azalmaktadır. Yeni GSH moleküllerinin sentezi gerçekleşmeden GR aktivitesinde meydana gelen azalmanın GSH azalması ile orantılı olabileceği bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2005). Herbisid molinate etkisine duyarlı *A. anguilla*'da kas dokusunda GSH miktarlarındaki azalmaya paralel olarak GR aktivitesinin de azaldığı saptanmıştır. Dirençli olan balıklarda ise GR aktivitesinin kontrole yakın olduğu ve bu nedenle GR aktivitesinin oksidatif strese direnç ile doğru orantılı olduğu da belirtilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2001). Fungusid thiram etkisinde insan deri fibroblastlarında GSH miktarı ile birlikte GR aktivitesindeki azalmanın oksidatif dengesizliğe yol açarak oksidatif stresi indüklediği belirtilmektedir (Cereser ve ark., 2001).

Glutatyon S-transferaz substrat olarak GSH'ı kullanarak elektrofilik bileşiklerin ve bunların yanında lipid hidroperoksitlerinin detoksifiye edilmesinde rol alan bir enzimdir (Eaton ve Bammler, 1999).

Fenthionun tüm sürelerde GST aktivitesinde değişikliğe neden olmaması uygulanan derişimin etki için yeterli olmamasına bağlanmaktadır. Sıçan beyin

dokusunda OP malathion ve anilofosun ayrı ve birlikte etkilerinde GST aktivitesinin değişmediği bulunmuştur (Hazarika ve ark., 2003). OP insektisid azinphos-methyl ve herbisid 2,4-D'nin ayrı ve birlikte etkilerinde *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda GST aktivitesinin değişmediği saptanmış ve aktivitedeki değişimin ksenobiyotigin tipine, derişimine ve etki süresine bağlı olduğu bildirilmiştir (Oruç ve Üner, 2000).

Bu çalışmada NAC kısa süreli etkide GST aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. GST, GPx ile benzer olarak lipid hidroperoksitlerinin detoksifikasyonunda rol oynayan bir enzimdir. Kısa süreli NAC etkisinde GPx aktivitesinde meydana gelen artışın, iki enzim arasındaki substrat yarışına bağlı olarak GST aktivitesinin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Balıklarda GPx enziminin kolaylıkla indüklenemediği ve GST enziminin organik peroksitleri uzaklaştırmada GPx'e göre önemli olduğu tahmin edilmektedir. Triklorobifenil enjekte edilen *O. mykiss*'de solungaç dokusunda TCB enjeksiyonu ile GST ve GPx aktivitelerinin kontrole göre arttığı belirlenmiştir (Otto ve ark., 1997). Lipid peroksitlerinin detoksifiye edilmesiyle ilgili olarak GST ve GPx üzerine yeni çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (Stephensen ve ark., 2002). Bu çalışmada BSO'nun orta ve uzun süreli etkide GST aktivitesinde meydana getirdiği artışın aynı sürelerde MDA miktarındaki süreye bağlı artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

*O. niloticus*'da NAC ve fenthion birlikte kısa depurasyon sürecinde GST aktivitesinde önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Bu artışın NAC'nin indüklediği oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *A. anguilla*'da kas dokusunda 96 saat etki süresinde NAC ve OP dichlorvosun birlikte ve ayrı uygulanmalarında GST aktivitesinin önemli düzeyde artış gösterdiği bulunmuştur (Pena-Llopis ve ark., 2003a).

Glutasyon birçok hücre tarafından doğrudan alınamaz. Bu nedenle GSH'ın önce yapıtaşı olan amino asitlere hidrolize edilmesi gerekmektedir (Hanigan, 1998).  $\gamma$ -GT GSH içeren bileşiklerdeki veya GSH'daki  $\gamma$ -glutamil halkasının koparılmasını katalizleyen enzimdir. Aktif merkezi hücre dışarısında bulunan membran-bağımlı bu enzimin aktivitesi ile açığa çıkan ürünler hücre içersine alınarak, ileri metabolik olaylarda kullanılmaktadır (Pena-Llopis ve ark., 2001).

Bu çalışmada depurasyon sürecinde, NAC'nin tek ve BSO ile fenthion birlikte uygulanmasında  $\gamma$ -GT aktivitesinde artış meydana getirmiştir.  $\gamma$ -GT aktivitesinde gözlenen artışın enzimin plazmadaki GSH'ın dokuya alınmasını sağlayarak azalan miktarı dengelemek için olduğu düşünülmektedir.

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *A. anguilla*'da kas dokusunda  $\gamma$ -GT aktivitesinde meydana gelen azalmanın karaciğerden plazmaya salınan GSH'daki azalmaya bağlı olabileceği bildirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Organoklorlu pestisid lindan, OP malathion ve karbamatlı propoxur etkisinde insan lenfositlerinde  $\gamma$ -GT aktivitesinin arttığı saptanmıştır.  $\gamma$ -GT aktivitesindeki artışın, enzimin hücre içi GSH homeostasisini sağlamak amacıyla yapıtaşlarının hücre içine alınması ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Banerjee ve ark., 1999).

Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu sırasında GST tarafından oluşturulan GSH konjugatları  $\gamma$ -GT tarafından hücre dışına atılmaktadır (Leblanc ve Dauterman, 2000). BSO etkisinde  $\gamma$ -GT aktivitesindeki artışın GST aktivitesindeki artış nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Poliansatüre yağ asitlerinin ROS'un açık hedefleri olmaları ve hücre membranında yoğun bulunmaları nedeniyle, bu bileşiklerin peroksidasyonları oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (Li ve ark., 2003). GSH miktarının ve diğer antioksidant savunmanın düşük olması ve yüksek poliansatüre yağ asiti içeriği nedeniyle beyin dokusu lipid peroksidasyonuna oldukça açık bir sistemdir (Pena-Llopis ve ark., 2001).

Bu çalışmada lipid peroksidasyonunda kontrole göre önemli bir değişim bulunmamıştır. BSO'nun ayrı ve fenthion ile birlikte uygulandığı gruplarda gözlenen süreye bağlı artışın aynı sürelerde GSH miktarındaki süreye bağlı azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *C. carpio*'da beyin dokusunda lipid peroksidasyonunda meydana gelen azalmanın GSH miktarındaki artışa bağlı olabileceği bildirilmektedir (Hai ve ark., 1997). Sıçan akciğer dokusunda pestisid fosfin ve BSO birlikte GSH miktarını azaltarak lipid peroksidasyonunun artışına neden olmaktadır. Bu durum GSH'ın fosfin kaynaklı oksidatif hasarın giderilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Hsu ve ark., 2002). Fare kortikal nöronal

hücre kültürlerinde BSO ve bakırın birlikte uygulanmasının lipid peroksidasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (White ve Cappai, 2003).

Asetilkolinesteraz, nörotransmitter asetilkolinin asetat ve koline parçalanmasını katalizleyen enzimdir ve balıklarda OP kirlenmesinin başlıca biyomarkırı olarak kullanılmaktadır (Dembele ve ark., 2000; Ferrari ve ark., 2004).

Fenthionun tüm uygulanmalarının *O. niloticus*'da AChE'yi inhibe ettiği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu inhibisyon fenthion etkisinde %39-50 ve NAC ile fenthionun birlikte etkisinde %33-42 olmak üzere tüm sürelerde benzer düzeylerde gerçekleşmiştir. OP azamethiphos etkisinde *A. anguilla*, *D. labrax* ve *O. mykiss*'de beyin dokularında gözlenen AChE inhibisyonunun süreye bağlı olmadığı belirlenmiştir (Intorre ve ark., 2004).

Bütiyonin sülfoksimin ve fenthionun birlikte, AChE aktivitesinde meydana getirdiği inhibisyon (%33-69) GSH miktarındaki azaltıcı etkisi gibi süreye bağlıdır. Bu grupta uzun süreli etkide AChE inhibisyonunun NAC ve fenthionun birlikte etkisine göre fazla olması, uzun süreli etkide GSH miktarındaki azalma ile benzerlik göstermektedir. Bu durumun oksidatif stresin indüklenmesi ile AChE inhibisyonunun artması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *A. anguilla*'da beyin dokusunda NAC içeren suya aktarılan balıklarda aktivite geri kazanımının temiz suya aktarılan balıklara oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. Serbest radikallerin AChE aktivitesi ile ilgili bir amino asitin oksidasyonuna neden olabileceği, bunun da enzimin inhibisyonunu sağlayacağı belirtilmektedir. Bununla birlikte NAC uygulanması ile oksidatif stres azalmasına bağlı olarak aktivite geri kazanımının daha kolay olabileceği bildirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003b).

Bu çalışmada, NAC ve fenthionun birlikte uygulandığı grupta fenthionun ayrı uygulanmasına göre etki ve depurasyon sürelerinde AChE inhibisyonunda fark olmaması NAC'nin uygulanan dozda oksidatif yanıtlar oluşturması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

N-asetilsistein ve BSO uygulanmalarının AChE aktivitesini arttırması ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır ve bu konu aydınlatılması gereken ilginç bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

Geri kazanım antikolinesteraz inhibitörünün etkisinden sonra enzim aktivitesinde meydana gelen artış şeklinde tanımlanmaktadır (Sancho ve ark., 1998). OP pestisid monocrotophos etkisinde *O. mossambicus* beyin dokusunda azalan aktivitenin 21 günlük periyod sonunda %95 oranında geri kazanıldığı bildirilmektedir (Rao, 2004). OP pestisid chlorfenvinphos etkisinde *C. carpio*'da beyin AChE aktivitesinin 8. gün sonunda %81 geri kazanıldığı ve bu geri kazanımın inhibe olan enzimin defosforilasyonuna ve *de novo* sentezi ile yeniden oluşturulmasına bağlı olduğu bildirilmektedir (Dembele ve ark., 1999).

Bu çalışmada fenthion uygulanan tüm gruplarda depurasyon sürecinde AChE aktivitesinde geri kazanım meydana gelmemiştir. Depurasyon sürecinde aktivite geri kazanımında defosforilasyon ve enzimin *de novo* sentezi için daha uzun süreler gerektiği düşünülmektedir.

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

1. Fenthion toksisitesinde GSH metabolizmasının yer aldığı gösterilmiştir.
2. Bütiyonin sülfoksimin ve fenthionun birlikte uygulanmasında toksisitede artış belirlenmiştir.
3. Uygulanan NAC miktarının koruyucu dozun üzerinde olduğu ve GSH metabolizmasını etkileyerek toksik yanıtlar oluşturduğu belirlenmiştir.
4. *O. niloticus*'da beyin dokusunda  $\gamma$ -GCS aktivitesi ölçüm sınırlarının altında kalması nedeniyle belirlenememiştir.
5. Fenthionun düşük derişimlerdeki etkisini gözleyebilmek için AChE'nin önemli bir indikatör enzim olduğu saptanmıştır.
6. MDA miktarında değişiklik saptanmaması uygulanan bileşiklerin indüklediği oksidatif stresin antioksidant savunma mekanizması tarafından giderildiğini göstermektedir.
7. Dört günlük depurasyon süresi belirlenen etkilerin giderilmesi için yeterli olmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular;

1. N-asetilsistein ve BSO uygulamalarında AChE aktivitesinde gözlenen artışın aydınlatılabilmesi için yeni çalışmaların planlanması düşünülmektedir.
2. Fenthion, BSO ve NAC'nin *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu ve AChE enzim aktivitesine etkileri ile ilgili yeni bilgiler sağlaması açısından biyokimyasal toksikoloji alanında yapılan çalışmalara katkı sağlayacaktır.
3. Bulgular ülkemizde ve yurt dışında çevre koruma çalışmalarının kirlilik izleme programlarında ve ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılabilecektir.

## KAYNAKLAR

- AHMAD S., 1995. Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins (S. Ahmad Editor), Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology. Chapman & Hall, America, s 238-265.
- AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S., 2000. Introduction of hepatic antioxidant in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochemica et Biophysica Acta, 1523: 37-48.
- AKERMAN, G., AMCOFF, P., TJARNLUND, U., FOGELBERG, K., TORRISSEN, O., BALK, L., 2003. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. Chemico-Biological Interactions, 142: 269-283.
- AKGÜN, E., ÇALIŞKAN, C., ÇELİK, H.A., ÖZÜTEMİZ, A.O., TUNÇYÜREK, M., AYDIN, H.H., 2005. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. The Journal of International Medical Research 33: 196-206.
- ALMLI, B., EGAAS, E., CHRISTIANSEN, A., EKLO, O.M., LODE, O., KALLQVIST, T., 2002. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). Marine Environmental Research, 54: 237-240.
- ALTUNTAŞ, I., DELİBAŞ, N., 2002. The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: the possible protective role of vitamins E and C. Turkish Journal of Medicine Research, 32: 293-297.
- ANDERSON, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods in Enzymology, 113: 548-555.
- ANDERSON, M.E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions, 111-112: 1-14.

- APHA, AWWA, WPCF, 1981. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, USA, 1134 s.
- ARTEEL, G.E., SIES, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 153-158.
- ARTHUR, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 1825-1835.
- BAGCHI, D., BAGCHI, M., HASSOUN, E.A., STOHS, S.J., 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104: 129-40.
- BAGCHI, D., BAGCHI, M., TANG, L., STOHS, S.J., 1997. Comparative *in vitro* and *in vivo* protein kinase C activation by selected pesticides and transition metal salts. *Toxicology Letters*, 91: 31-37.
- BANERJEE, B.D. SETH, V., BHATTACHARYA, A., PASHA, S.T., CHAKRABORTY, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33-47.
- BEUTLER, E., 1984. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, 2<sup>nd</sup> Ed. Grune and Starton, New York, 160s.
- BHARATH, S., HSU, M., KAUR, D., RAJAGOPALAN, S., ANDERSEN, J.K., 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1037-1048.
- BIRGHAM, S., 2005. Environmental impacts of pesticide pollution. The Environment Agency, UK. [http:// www. environment- agency. gov. uk/ yourenv/ eff/business\\_industry/agri/pests/917483/?version=1&lang=\\_e](http://www.environment-agency.gov.uk/yourenv/eff/business_industry/agri/pests/917483/?version=1&lang=_e)
- BLUVSHTEIN, E., GLASS, G.A., VOLOHONSKY, G., YAAKUBOWITZ, M., HERNESS, E., SMORODINSKY, N.I., SEIDEL, A., FRANK, H., STEINBERG, P., STARK, A.A., 1999. Inhibition of the hydrolytic and transpeptidase activities of rat kidney  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase by specific monoclonal antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 260: 844-854.
- BULLOCK, S., DAVEY, B., EINON, G., ROBINSON, D., STIRLING, V., TAYLOR, A., 1998. Neurobiology (Robinson, D., Editor). Springer- Verlag, New York, 371s.

- CABRAS, P., PLUMITALLO, A., SPANEDDA, L., 1991. High-performance liquid chromatographic separation of fenthion and its metabolites. *Journal of Chromatography*, 540A: 406-410.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 250: 5475-5480.
- CERESER, C., BOGET, S., PARVAZ, P., REVOL, A., 2001. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, 163: 153-162.
- CHAUDIERE, J., FERRAI-ILIOU, R., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949-962.
- CHUIKO, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorous pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127C: 233-242.
- CHUIKO, G.M., PODGORNOYA, V.A., ZHELNIN, Y.Y., 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135B: 55-61.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J., van BLADEREN, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C., 2000. Chronic toxic effects of quinalphos on some biochemical parameters in *Labeo rohita* (Ham.). *Toxicology Letters*, 114: 11-18.
- DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C., 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134C: 109-121.

- DEMBELE, K., HAUBRUGE, E., GASPAR C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 49-54.
- DEMBELE, K., HAUBRUGE, E., GASPAR, C., 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 731-742.
- DIERICKX, P.J., 1998. Increased cytotoxic sensitivity of cultured FHM fish cells by simultaneous treatment with sodium dodecyl sulfate and buthionine sulfoximine. *Chemosphere*, 36: 1263-1274.
- DORVAL, J., HONTELA, A., 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192: 191-200.
- DORVAL, J., LEBLOND, V.S., HONTELA, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*, 63: 229-241.
- DRINGEN, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62: 649-671.
- DWIVEDI, P.D., DAS, M., KHANNA, S.K., 1998. Role of cytochrome p-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 437-444.
- EATON, D.L., BAMMLER, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49: 156-164.
- ELIA, A.C., WALKER, W.T., NORTON, S.J., 2002. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 809-816.

- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- FABACHER, D.L., LITTLE, E.E., 2000. Diversity of Fish, Early Observations and Descriptions, Fish in Experimentation. (Ostrander, G.K. Editör) The Handbook of Experimental Animals. The Laboratory Fish. Academic Press, London, 678s.
- FERENCZY, J., SZEGLETES, T., BALINT, T., ABRAHAM, M., NEMCSOK, J., 1997. Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: 515-529.
- FERNANDEZ-VEGA, C., SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72: 55-63.
- FERRARI, A., VENTURINO, A., PECHEN de D'ANGELO, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 420-425.
- FULTON, M.H., KEY, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorous insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 37-45.
- GALLAGHER, E.P., Di GIULIO, R.T., 1992. A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102C: 543-547.
- GALLAGHER, E.P., HASSPIELER, B.M., Di GIULIO, R.T., 1992. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. *Biochemical Pharmacology*, 43: 2209-2215.
- GRIFFITH, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106: 207-212.

- GRIFFITH, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 922-935.
- GÜRER, H., ÖZGÜNEŞ, H., NEAL, R., SPITZ, D.R., ERÇAL, N., 1998. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology*, 128: 181-189.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- HAI, D.Q., VARGA, Sz.I., MATKOVICS, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C: 83-88.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc. New York, 936s.
- HAMED, R.R., ELAWA, S.E., FARID, N.M., ATAYA, F.S., 1999. Evaluation of detoxification enzyme levels in Egyptian catfish, *Clarias lazera*, exposed to dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 789-796.
- HANIGAN, M.H., 1998.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 333-342.
- HAZARIKA, A., SARKAR, S.N., HAJARE, S., KATARIA, M, MALIK, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185: 1-8.
- HSU, C., CHI, B., LIU, M., LI, J., CHEN, C., CHEN, R., 2002. Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. *Toxicology*, 179: 1-8.
- <http://www.abcbirds.org/pesticides/Profiles/fenthion.htm>
- <http://www.fishbase.org>
- INTORRE, L., SOLDANI, G., COGNETTI-VARRIALE, A.M., MONNI, G., MEUCCI, V., PRETTI, C., 2004. Safety of azamethiphos in eel, sea bass and trout. *Pharmacological Research*, 49: 171-176.

- JAIN, A., MARTENSSON, J., STOLE, E., AULD, P.A.M., MEISTER, A., 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 1913-1917.
- JEFFERIES, H., COSTER, J., KHALIL, A., BOT, J., MCCAULEY, R.D., HALL, J.C., 2003. Glutathione. *ANZ Journal of Surgery*, 73: 517-522.
- JOKANOVIC, M., 2001. Biotransformation of organophosphorous compounds. *Toxicology*, 166: 139-160.
- KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T.C., ABROMA, K.H., LEVIN, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106: 375-384.
- KIDD, P.M., 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews*, 2: 155-176.
- KINNEAR, P.R., GRAY, C.D., 1995. *SPSS for Windows Made Simple*. Lawrence Erlbaum Associates, East Sussex, UK, 275s.
- KITAMURA, S., KADOTA, T., YOSHIDA, M., JINNO, N., OHTA, S., 2000. Whole-body metabolism of the organophosphorus pesticide, fenthion, in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126C: 259-266.
- KITAMURA, S., SUZUKI, T., OHTA, S., FUJIMOTO, N., 2003. Antiandrogenic activity and metabolism of organophosphorus pesticide fenthion and related compounds. *Environmental Health Perspectives*, 111: 503-508.
- KWONG, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24: 144-149.
- LACORTE, S., JEANTY, G., MARTY, J.L., BARCELO, D., 1997. Identification of fenthion and temephos and their transformation products in water by high performance liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, 777A: 99-114.
- LEBLANC, G.A., DAUTERMAN, W.C., 2000. Conjugation and Elimination of Toxicants, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Wiley and Sons Inc., United States of America, s 115-135.

- LI, W., YIN, D., ZHOU, Y., HU, S., WANG, L., 2003. 3,4 dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 251-255.
- LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. L., ROY, S., HUUSKONEN, S., TOSSAVAINEN, K., RITOLA, O., MARIN, E., 1996. Biotransformation and glutathione homeostasis in rainbow trout exposed to chemical and physical stress. *Marine Environmental Research*, 42: 323-327.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-257.
- LU, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB Journal*, 13: 1169-1183.
- MACHALA, M., DRABEK, P., NECA, J., KOLAROVA, J., SVOBODOVA, Z., 1998. Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in trout liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 107-111.
- MAHBOOB, M., KALEEM, M., SIDDIQUI, J., 2004. Effects of a novel organophosphorus pesticide (RPR-V) on extra hepatic detoxifying enzymes after repeated oral doses in rats. *Toxicology*, 202: 159-164.
- MARONI, M., COLOSIO, C., FERIOLI, A., FAIT, A., 2000. Organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 143: 9-37.
- MATES, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- MATHER-MIHAICH, E., Di GIULIO, R. T., 1986. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to DEF and n-butyl mercaptan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85C: 427-432.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760.

- MEYER, J.N., SMITH, J.D., WINSTON, G.W., Di GIULIO, R.T., 2003. Antioxidant defenses in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to contaminated sediments and model pro-oxidants: short-term and heritable responses. *Aquatic Toxicology*, 65: 377-395.
- MULLIE, W.C., DIALLO, A.O., GADJI, B., N'DIAYE, M.D., 1999. Environmental hazards of mobile ground spraying with cyanophos and fenthion for *Quelea* control in Senegal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 1-10.
- NEHRU, B., KANWAR, S.S., 2004. N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. *Biological Trace Element Research* 101: 257-264.
- NILSSON, G.E., 1996. Brain and body oxygen requirements of *Gnathonemus petersii*, a fish with an exceptionally large brain. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 603-607.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., TAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Chemistry*, 95: 351-358.
- ORLOWSKI, M., MEISTER, A., 1965. Isolation of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 338-347.
- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127C: 291-296.
- OTTO, D.M.E., SEN, C.K., HIDIROGLOU, N., MADERE, R., MOON, T.W., 1997. Role of exogenous glutathione in teleost fish and its effects on antioxidant defense responses in rainbow trout exposed to 3,2',4,4-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: 449-457.
- PAN, G., DUTTA, H.M., 1998. The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. *Environmental Research*, 79A: 133-137.
- PARIS-PALACIOS, S., BIAGIANTI-RISBOURG, S., VERNET, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, 50: 109-124.

- PEHKONEN, S.O., ZHANG, Q., 2002. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32: 17-72.
- PENA, S., PENA, J.B., RIOS, C., SANCHO, E., FERNANDEZ, C., FERRANDO, M.D., 2000. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 51-56.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*, 47: 485-497.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2003a. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65: 337-360.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2003b. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with N-acetylcysteine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 237-245.
- PENA-LLOPIS, S., PENA, J.B., SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere*, 45: 671-681.
- RADICE, S., FERRARIS, M., MARABINI, L., GRANDE, S., CHIESARA, E., 2001. Effect of iprodione, a dicarboxiimide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 54: 51-58.
- RAO J.V., 2004. Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activity's inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 217-222.
- RAO, J.V., SHILPANJALI, D., KAVITHA, P., MADHAVENDRA, S.S., 2003. Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Archives of Toxicology*, 77: 227-232.

- REED, D. J., 2000. Mechanisms of Chemically Induced Cell Injury and Cellular Protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). Introduction to Biochemical Toxicology. Wiley and Sons Inc., United States of America, s 221-253.
- ROEX, E.W.M., KEIJZERS, R., van GESTEL, C.A.M., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*, 64: 451-460.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1997. Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 205-209.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1998. *In vivo* inhibition of AChE activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to technical grade fenitrothion. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120C: 389-395.
- SEELIG, G.F., SIMONSEN, R.P., MEISTER, A., 1984. Reversible dissociation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase into two subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 9345-9347.
- SEN, C.K., 1997., Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 8: 660-672.
- SHAIKH, Z.A., VU, T.T., ZAMAN, K., 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154: 256-263.
- SHAW, I.C., CHADWICK, J., 1998. Principles of Environmental Toxicology. Taylor and Francis Ltd, London, 216s.
- STEPHENSON, E., STURVE, J., FORLIN, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C: 435-442.
- STOREY, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1715-1733.

- ÜNER, N., ÖZCAN ORUÇ, E. CANLI, M., SEVGİLER, Y., 2001. Effects of cypermethrin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 67: 657-664.
- VALE, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters, 102-103: 649-652.
- VAN DER KRAAK, G., LISTER, A., 2002. Mechanisms and effects of endocrine disruption in fish: Are they ecologically relevant?, (Vijayan, M., Hontela, A., MacKinlay, D., Editörler). Endocrine disruptors: Mechanisms and Impacts, International Congress on the Biology of Fish. University of British Columbia, Vancouver, Physiology Section, American Fisheries Society, Canada, s 1-4.
- VINA, J., ROMERO, F.J., SAEZ, GT., PALLARDO, F.V., 1983. Effects of cysteine and N-acetylcysteine on GSH content of brain of adult rats. Experientia, 39: 164-165.
- WHITE, A.R., CAPPAL, R., 2003. Neurotoxicity from glutathione depletion is dependent on extracellular trace copper. Journal of Neuroscience Research, 71: 889-897.
- WHO, 1976. World Health Organization, Food and Agriculture Organization, VBC/DS/77.23, Fenthion, Data Sheets on Pesticides, No: 23.
- WIEGAND, C., KRAUSE, E., STEINBERG, C., PFLUGMACHER, S., 2001. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 49: 199-205.
- WINSTON, G. W., Di GIULIO, R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology, 19: 137-161.
- ZAHN, T., ARNOLD, H., BRAUNBECK, T., 1996. Cytological and biochemical response of R1 cells and isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to subacute *in vitro* exposure to disulfoton. Experimental and Toxicologic Pathology, 48: 47-64.
- ZHANG, J., SHEN, H., WANG, X., WU, J., XUE, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere, 55: 167-174.

- ZHANG, J.F., LIU, H., SUN, Y.Y., WANG, X.R., WU, J.C., XUE, Y.Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 185-190.
- ZHOU, Z.Y., SUGAWARA, K., MAWATARI, K., MATSUKAWA, T., LIU, Z.W., DEVADAS, M., KATO, S., 2001. Reactive oxygen species uncouple external horizontal cells in the carp retina and glutathione couples them again. *Neuroscience*, 102: 959-967.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Osmaniye’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 1998–2002 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimimi tamamlayarak Biyolog unvanı ile mezun oldum. Yüksek lisans öğrenimime aynı yıl içerisinde Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladım.