



**PYRACLOSTROBİN İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRESE KARŞI TAURİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN SIÇANLARDA
ARAŞTIRILMASI**

İbrahim SERİM

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sinan İNCE

Tez No: 2022-017

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PYRACLOSTROBİN İLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF STRESE
KARŞI TAURİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN SIÇANLARDA
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
İbrahim SERİM**

**Danışman
Prof. Dr. Sinan İNCE**

Tez No: 2022-017

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “20.SAĞ.BİL.29”**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda İbrahim SERİM** tarafından hazırlanan “Pyraclostrobin ile indüklenen oksidatif strese karşı taurinin koruyucu etkisinin sıçanlarda araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 18/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Selim SEKKİN

İmza

Üye

Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE

İmza

Üye

Prof. Dr. Sinan İNCE

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... / /tarih;.....saat ve

.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esma KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../2022

İmza

İbrahim SERİM

ÖZET

PYRACLOSTROBİN İLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF STRESE KARŞI TAURİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI

Pyraclostrobin yaygın olarak kullanılan strobilurin türevi bir mantar ilacı olup organizmada oksidatif stres ve DNA hasarı ile birlikte üreme performansını ve embriyonal gelişimi bozmaktadır. Sistein aminoasitinden elde edilen taurin ise antioksidan, sitoprotektif ve ozmoregülasyon gibi metabolik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada pyraclostrobin verilen erkek sıçanlarda oluşan oksidatif strese karşı taurinin olası koruyucu etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada Sprague Dawley cinsi sıçanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Çalışmada sıçanlara 0.5 ml mısır yağı, 30 mg/kg pyraclostrobin ve 30 mg/kg pyraclostrobin ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg taurin gastrik gavaj ile 28 gün süresince verildi. Pyraclostrobin uygulamasının bazı biyokimyasal parametreler (aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, alkalen fosfataz, kan üre azotu ve kreatinin) ile malondialdehid düzeylerini artırdığı, aksine glutatyon ve antioksidan enzim aktivitelerinden süperoksid dismutaz ve katalaz düzeylerinde ise azalma meydana getirdiği belirlendi. Bununla beraber, pyraclostrobin uygulaması ile karaciğer dokusunda apoptotik (*Bax*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* ve *p53*) ve proinflatuvar (*TNF- α* ve *NF κ B*) genler ile *CYP2E1*'in mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı ve antiapoptotik gen olan *Bcl-2*'nin mRNA ekspresyonunun düzeyinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca, pyraclostrobin uygulamasının DNA hasarını artırdığı ve dokularda ise histopatolojik değişiklikler oluşturduğu gözlemlendi. Pyraclostrobin ile birlikte verilen 50, 100 ve 200 mg/kg dozda taurin uygulamalarının ise pyraclostrobin ile oluşan değişiklikleri tersine çevirdiği tespit edildi. Sonuçta taurinin pyraclostrobin ile indüklenen oksidatif hasara karşı antioksidan, antiinflatuvar ve antiapoptotik etkisi ile birlikte sitoprotektif etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Pyraclostrobin, taurin, oksidatif stres, sıçan,

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF TAURINE ON OXIDATIVE STRESS INDUCED BY PYRACLOSTROBIN IN RATS

Pyraclostrobin is a widely used strobilurin derivative fungicide and impairs reproductive performance and embryonal development, together with oxidative stress and DNA damage in the organism. Taurine, obtained from the amino acid cysteine, plays an important role in metabolic processes such as antioxidant, cytoprotective, and osmoregulation. In this study, it was aimed to determine the possible protective efficacy of taurine against oxidative stress in male rats given pyraclostrobin. In the study, Sprague Dawley rats were divided into 6 groups with 8 animals in each group. In the study, rats were given 0.5 ml corn oil, 30 mg/kg pyraclostrobin, and 30 mg/kg pyraclostrobin with 50, 100, and 200 mg/kg taurine by gastric gavage for 28 days. It was determined that pyraclostrobin application increased some biochemical parameters (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, and creatinine) and malondialdehyde levels, while on the contrary, it caused a decrease in glutathione and antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase and catalase levels. Nonetheless, apoptotic (*Bax*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* and *p53*) and pro-inflammatory (*TNF- α* and *NF κ B*) genes and *CYP2E1* mRNA expression levels increased and the antiapoptotic gene *Bcl-2* mRNA expression levels decreased by pyraclostrobin treatment in liver tissue. Also, it was observed that pyraclostrobin application increased DNA damage and caused histopathological changes in tissues. It was determined that 50, 100, and 200 mg/kg doses of taurine administered together with pyraclostrobin reversed the changes caused by pyraclostrobin. As a result, it was determined that taurine had a cytoprotective effect together with its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects against the oxidative damage induced by pyraclostrobin.

Keywords: Pyraclostrobin, taurine, rat, oxidative stress

ÖNSÖZ

Mantar ilaçları tarımın iyileştirilmesi ve ekonomik açıdan fayda getirmesi amaçlarıyla yetiştiriciler tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Fungusidlerin kontrolsüz ve bilinçsiz uygulamaları sonucu insanlar ve hayvanlar tarafından alınmalarıyla ciddi sağlık problemleri görülmektedir. Bu kimyasallara karşı olarak kullanılan antioksidan maddeler ise bunların olumsuz etkilerini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Yapılan bu çalışmada pyraclostrobin verilen erkek sıçanlarda oluşan oksidatif strese karşı taurinin olası koruyucu etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla bazı biyokimyasal parametreler (AST, ALT, ALP, kan üre azotu, kreatinin), malondialdehid ve glutatyon düzeyleri ile süperoksid dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivite tayini ve DNA hasarı belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusunda apoptotik (*Caspase-3*, *Caspae-8*, *Caspase-9*, *Bax*, *p53* ve *Bcl-2*) ve yangısal sitokinler (*NFκB* ve *TNF-α*) ile *CYP2E1*'in mRNA ekspresyonları ile dokuların histopatolojik incelemeleri gerçekleştirildi.

Tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesi esnasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sinan İNCE, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE, değerli hocalarım Prof Dr. Hidayet YAVUZ ve Doç Dr. Ruhi TÜRKMEN'e ayrıca Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL, Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ, Arş. Gör. Orkun ATİK, Biyolog Ezgi Nur DEMİRKAPI'ya, bu çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 20.SAĞ.BİL.29) teşekkür ederim. Bunun yanında sevgili eşim ve aileme de teşekkürü borç bilirim.

İbrahim SERİM

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

SAYFA

KABUL VE ONAY

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

ÖZET

SUMMARY

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ŞEKİLLER

ÇİZELGELER

RESİMLER

1. GİRİŞ

1.1. Strobilurinler

1.1.1. Strobilurinlerin Genel Özellikleri

1.1.2. Doğal strobilurinlerin sentezi

1.1.3. Doğal strobilurinlerin sentetik analogları

1.1.4. Strobilurinlerin aksiyon modu

1.1.5. Tarımsal uygulamada strobilurinlerin kullanımları

1.1.6. Strobilurinlerin biyotik ve abiyotik yıkımı

1.1.7. Pyraclostrobin

1.2. Taurin

1.2.1. Taurinin sentezi

1.2.2. Taurinin etkileri

1.2.3. Taurinin oksidatif strese karşı rolü ve altında yatan moleküler mekanizmalar

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araç ve Gereçler

2.1.2. Hayvan Materyali

2.2. Metot

2.2.1. Deneysel Aşama

2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması

i

ii

iii

iv

vi

vii

ix

x

1

1

1

2

3

4

5

5

6

14

14

14

17

20

20

20

20

20

20

20

2.2.1.2.	Deneysel Aşamanın Sonlandırılması	21
2.2.2.	Histopatolojik Değerlendirme	22
2.2.3.	Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	22
2.2.3.1.	Doku Homojenizasyonu	22
2.2.3.2.	Hemolizat Hazırlanması	23
2.2.3.3.	Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	23
2.2.3.4.	Katalaz Aktivite Tayini	24
2.2.3.5.	Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini	25
2.2.3.6.	Glutasyon (GSH) Tayini	26
2.2.3.7.	Protein Ölçümü	27
2.2.3.8.	Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi	28
2.2.4.	Biyokimyasal Parametreler	28
2.2.5.	Moleküler Analizler	29
2.2.5.1.	RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi	29
2.2.5.2.	Primer Tasarımı	29
2.2.5.3.	Real-time PCR	29
2.2.6.	İstatistiksel Analiz	31
3.	BULGULAR	32
3.1.	Biyokimyasal Parametre Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi	32
3.2.	MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi	35
3.3.	SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi	35
3.4.	Antinflamatuvar ve Apoptotik Gen Ekspresyonları ile DNA Kırılımı Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi	40
3.5.	Dokulardaki Histopatolojik Değişiklikler	46
4.	TARTIŞMA	49
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	53
6.	KAYNAKLAR	54
7.	EKLER	63
7.1.	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	63
ÖZGEÇMİŞ		64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	santigrad derece
μ	mikron
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
Ang II	anjiyotensin II
ANOVA	Analysis of variance
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenosin trifosfat
BUN	Kan üre azotu
CAT	Katalaz
cm ²	Santimetrekare
dk	Dakika
ER	Endoplazmik retikulum
g	Gram
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksiti
H&E	Hematoksilen-Eozin
LC ₅₀	Letal konsantrasyon 50
LD ₅₀	Letal doz 50
LOAEL	Advers etki gözlenen en düşük düzey.
LPO	Lipid peroksidasyon
MDA	Malondialdehid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NOAEL	Olumsuz etki tespit edilmeyen doz
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Statistical package for the social sciences
TSK	Tubulus seminoforus kontortus

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1. Strobilurinler, sentetik analogları ve oudemansinlerin kimyasal formülleri.	2
Şekil 1.2. Strobilurin-A'nın sentezi	3
Şekil 1.3. Pyraclostrobin ve temel alt bileşenleri	6
Şekil 3.1. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri üzerine etkisi.	32
Şekil 3.2. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerine etkisi.	33
Şekil 3.3. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri üzerine etkisi.	33
Şekil 3.4. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma kan üre azotu (BUN) düzeyleri üzerine etkisi.	34
Şekil 3.5. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma kreatinin düzeyleri üzerine etkisi.	34
Şekil 3.6. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda Bax'ın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	41
Şekil 3.7. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda Caspase-3'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	41
Şekil 3.8. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer	42

dokusunda Caspase-8'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.

Şekil 3.9. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda Caspase-9'un mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 42

Şekil 3.10. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda p53'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 43

Şekil 3.11. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda Bcl-2'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 43

Şekil 3.12. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda TNF- α 'nın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 44

Şekil 3.13. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda NFkB'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 44

Şekil 3.14. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda CYP2E1'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. 45

Şekil 3.15. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda ssDNA düzeyleri üzerine etkisi. 45

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1. Pyraclostrobinin risk değerlendirmesiyle ilgili düzeyleri	9
Çizelge 1.2. Pyraclostrobin ile ilgili toksikolojik veriler	11
Çizelge 1.3. Taurinin sitoprotektif etkilerinin altında yatan mekanizmalar	15
Çizelge 2.1. Moleküler analizler için kullanılan genler, oligonükleotid dizilimleri, boyutları ve gen bankası numaraları	30
Çizelge 3.1. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında malondialdehid (MDA) düzeyleri üzerine etkisi	36
Çizelge 3.2. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisi	37
Çizelge 3.3. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri üzerine etkisi	38
Çizelge 3.4. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında katalaz (CAT) aktiviteleri üzerine etkisi	39
Çizelge 3.5. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T50), 100 (T100) ve 200 (T200) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokularındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi	48

RESİMLER

SAYFA

Resim 3.1. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) ratların beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokuları üzerine etkisinin histopatolojik değerlendirmesi

47



1. GİRİŞ

Her geçen gün azalan ekilebilir alanla birlikte gıda üretimine olan talebin artması göz önüne alındığında verimlilik karşısında büyümeyi ve gelişmeyi artıran zirai kimyasallara yönelmek gerekmektedir. Pyraclostrobin gibi strobilurinler mantar ilaçları olup dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Strobilurinler mantarın enerji döngüsünü bozan sitokrom-bc1 kompleksindeki kinol oksidasyon bölgesinde elektron transferini durdurarak mitokondriyal solunumu engeller. Ülkemizde yaygın olarak kullanılan fungusitlerden biri olan pyraclostrobinin organizmada oksidatif stres ve DNA hasarı meydana getirdiği, ayrıca birçok organizmadaki üreme performansını ve embriyonal gelişimi bozduğu ifade edilmiştir. Bu istenmeyen zararların önüne geçilmesinde, antioksidan özellik gösteren farklı maddelerin tercihi söz konusu olabilmektedir.

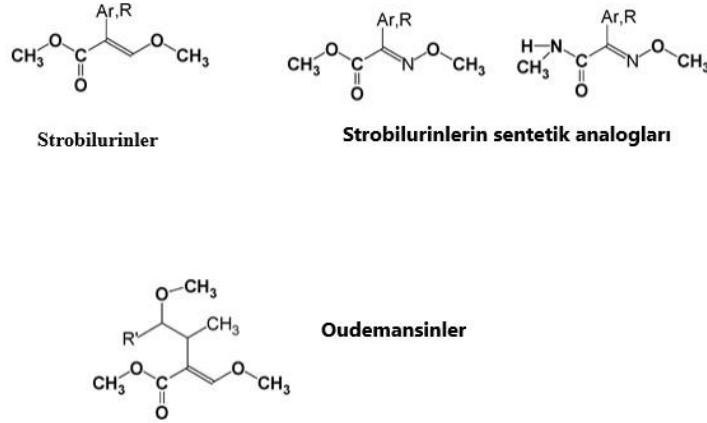
1.1. Strobilurinler

1.1.1. Strobilurinlerin Genel Özellikleri

Strobilurinler, esas olarak mantarlardan (*Basidiomycetes*) izole edilen doğal maddelerdir. Bu ürünler, mantarda şikimik asit döngüsü yoluyla fenilalaninden sentezlenir. İsimleri *Strobilurus* cinsi mantardan türetilmiştir. Örneğin Strobilurin-A *Strobilurus tenacellus*'un sıvı kültürlerinden izole edilmiştir. (Anke vd., 1977; Schramm vd., 1978)

Mantarlarda strobilurinler gibi güçlü doğal mantar öldürücülerin üretildiğini belirtmek ilginçtir. Bu maddelerin çoğu, içinde oluştukları organizmanın hayatta kalması için önemli olan işlevleri yerine getirir. Strobilurin A ve B'nin mayalara ve filamentli mantarlara karşı oldukça aktif olduğu, ancak bakterilere karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir. Bu bileşikler fotolabil ve nispeten zayıf mantar öldürücülerdir (Anke vd., 1977).

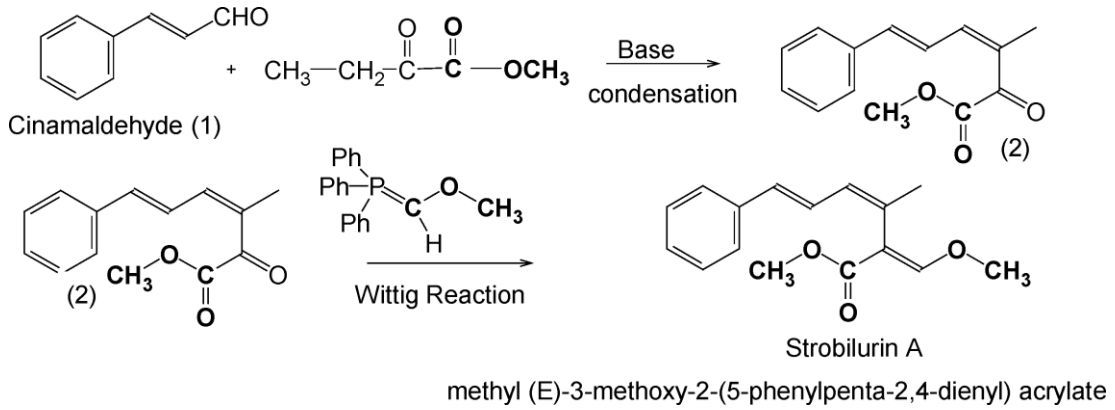
Yapısal olarak bu ürün ailesindeki temel ortak özellik (E)- β -metoksiakrilat grubunun varlığıdır. Bu gruplar, bu yapılarda toksiforik grup olarak kabul edilir. Strobilurinler ve oudemansinler (Şekil 1.1) hem doğal ürünlerdir hem de yapıları birbirine çok yakındır (Balba, 2007).



Şekil 1.1. Strobilurinler, sentetik analogları ve oudemansinlerin kimyasal formülleri (Balba, 2007).

1.1.2. Doğal strobilurinlerin sentezi

Doğal strobilurinleri (A veya B) hazırlamak için standart sentetik yol, bileşik 2'yi elde etmek için halka ikameli sinamaldehitin uygun yan zincirin α -keto asit metil esterini ile yoğunlaştırılmasını içerir (Şekil 1.2). Ürün daha sonra keto grubunu metoksi olefin ile değiştirmek için Wittig reaksiyonuna tabi tutulur. Şekil 1.2'de verilen reaksiyonlar Anke vd. (1977) tarafından tarif edildiği gibi strobilurin (A) (E)- β -metoksiakrilatının ikame edilmiş metil esterinin ortak yapısını verir (Anke vd., 1984, Sauter vd., 1999).



Şekil 1.2. Strobilurin-A'nın sentezi (Sauter vd., 1999)

1.1.3. Doğal strobilurinlerin sentetik analogları

Günümüzde dünya pazarında kayıtlı az sayıda mantar ilacı vardır ve birçoğu hala üretim aşamasındadır. Ticari strobilurin fungisitleri, dünya çapında en çok satan fungisitler arasındadır ve bitki patojenlerinin çoğuna karşı bitki koruyucu olarak kullanılır. Bu ürünler doğal olarak elde edildiğinden ve çevrede hızlı bozulmaları nedeniyle çevre açısından güvenlidir (Balba, 2007).

Azoxystrobin Syngenta (eski adıyla Zeneca Agrochemicals) tarafından keşfedilmiştir ve EP 382375 patenti kapsamındadır. Syngenta tarafından ticari bir mantar ilacı olarak 1992 Briton Mahsul Koruma Konferansında duyurulan ilk sentetik strobilurin ürünüdür. Yapısal açıdan (E)-p-metoksiakrilat içermektedir. Kresoxim-metil, Badische Anilin- & Soda-Fabrik (BASF) tarafından azoxystrobin ile aynı zamanda bağımsız olarak keşfedilmiştir. ABD ve AB'de (EP 253213 ve US 4829085) patentlidir ve BASF tarafından 1992'deki aynı Briton konferansında duyurulmuştur. Yapı ilk kez metoksiiminoasetat kullanılarak (E)-p-metoksiakrilat modifikasyonunu içermektedir. Trifloxystrobin, Novartis Crop Protection (şimdi Syngenta) tarafından EP 00460575 patenti altında keşfedilmiş ve Novartis tarafından 1998 Briton konferansında açıklanmıştır. Ancak ürün 2000 yılında Bayer Crop Science'a satılmış ve o zamandan beri ürün Bayer Crop Science adı altında pazarlanmaktadır. Ayrıca yapısal açıdan (E)-β-metoksiakrilatın metoksiiminoasetat ile değiştirilmesini içermektedir. Metominstrobin, Shienogi bilim insanları tarafından keşfedilmiş ve 1998'de Japonya'da tescil edilmiştir. Patenti hakkında fazla bilgi mevcut değildir. Bu

ürünün yapısında önemli olan nokta, yapısının metoksiiminoasetamid ile değiştirilen (E)- β -metoksiakrilattan daha uzak olmasıdır. Fluoksastrobin, Bayer Crop Science tarafından DE 19602095 numaralı patent altında keşfedilmiş ve Bayer tarafından 1999 ve 2002’de Briton konferanslarında duyurulmuştur. Yapısal açıdan ikame grubu azoksistrobininkine benzer olmasına rağmen, bunun toxiforik grubu (E)- β -metoksiakrilat, metoksiiminoaktatın dioksazin türevine yüksek oranda modifiye edilmiştir. Pyraclostrobin-karbamat, 2000 yılında BASF bilim insanları tarafından keşfedilmiştir. Bu ürünün yapısı, toksiforik grup olarak karbamatın bir türevi olarak karakterize edilir. Picoxystrobin, 2000 yılındaki Briton toplantısında Zeneca zirai kimyasalları (şimdi Syngenta-AG) bilim adamları tarafından duyurulmuş ve 2001’de tescil edilmiştir. Dimoxystrobin, BASF tarafından bir mantar ilacı olarak halen geliştirilmektedir (Ypema ve Gold, 1998; Grossmann ve Retzlaff, 1997; Balba, 2007).

1.1.4. Strobilurinlerin aksiyon modu

Strobilurinler mitokondrideki belirli bir bölgeye, sitokrom b’nin kinol oksidasyon (Qo) bölgesine (veya ubikinol bölgesine) bağlanır ve böylece sitokrom b ve sitokrom c arasındaki elektron transferini durdurur, bu da indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) oksidasyonunu ve adenosin trifosfat (ATP) sentezini durdurur. Bu, enerji üretiminin durmasına yol açar ve mantar sonunda ölür. Bu nedenle, etki şekilleri hedefe özeldir. Bu mekanizmanın, siyanür ürünleri ve CO’nun iyi bilinen mekanizması olan sitokrom c’nin inhibisyonundan farklı olduğunu belirtmek önemlidir. Bunlara daha doğru bir şekilde QoI fungusitleri denir. Bu kimyasal sınıfının mantar öldürücü etkisindeki önemli bir özellik, bunların hızlı aktivitesidir. Bu etki, mantarların yaşam döngüsünün ilk döneminde yani spor aşamasında yoğunlaşır. Bu, çevrede ve bitkinin metabolizmasında hızlı bozunmaları nedeniyle önemli bir özelliktir. Strobilurinlerin uygulanması bitkiye daha sağlıklı yeşil renk katarak bitkiye ek bir faydalı etki sağlar. Bu fenomen "yeşillendirme etkisi" olarak bilinir ve hem hacim hem de kalite açısından önemli ölçüde yüksek mahsul hasadı ile eşleştirilmiştir (Brandt vd., 1999, Von Jagow ve Becker, 1982, Leroux, 1996)

1.1.5. Tarımsal uygulamada strobilurinlerin kullanımları

Strobilurinler birincil olarak mahsül hastalıklarını kontrol etmek için tarım alanında kullanılırlar. Strobilurinler, külleme, kahverengi pas ve diğer birçok bitki hastalığına karşı ekinlerin korunması için tercih edilen ürünlerdir (Balba, 2007).

Strobilurinler tarafından sergilenen geniş biyosidal aktivite aralığına rağmen, beşeri ve veteriner antifungal gibi tarım alanı dışında topikal bir formülasyonda kullanımları çok sınırlı olmuştur. İnsan ve veteriner antifungal olarak uygulamalarından biri Mucidermin Spofa adlı bir üründür (Zakharychev ve Kovalenko, 1998). Ayrıca birçok strobilurin, anti-kanser ajanları olarak araştırılmıştır. Radyoaktif lösin, üridin ve timidin'in hücrelerin asitte çözünmeyen fraksiyonuna (protein, RNA ve DNA) dahil edilmesini güçlü bir şekilde engellediği bulunan strobilurinler, antitümör aktivitesi için test edilmiştir. *In vitro* antitümör aktivitesi, Ehrlich karsinomunun asitli formunun hücreleri kullanılarak test edilmiştir (Balba, 2007).

Stribilurin ürünleri kağıt hamurunda ve üretiminde, soğutma kulelerinde ve ısı eşanjörlerinde küf ve küfü kontrol etmek için kullanılır. Bu kullanımlar için, strobilurinler, Cash ve Cronan tarafından patenti alınıp sulu sistemlerde kullanılmak üzere formüle edilmiştir (Cash ve Cronan, 2001).

1.1.6. Strobilurinlerin biyotik ve abiyotik yıkımı

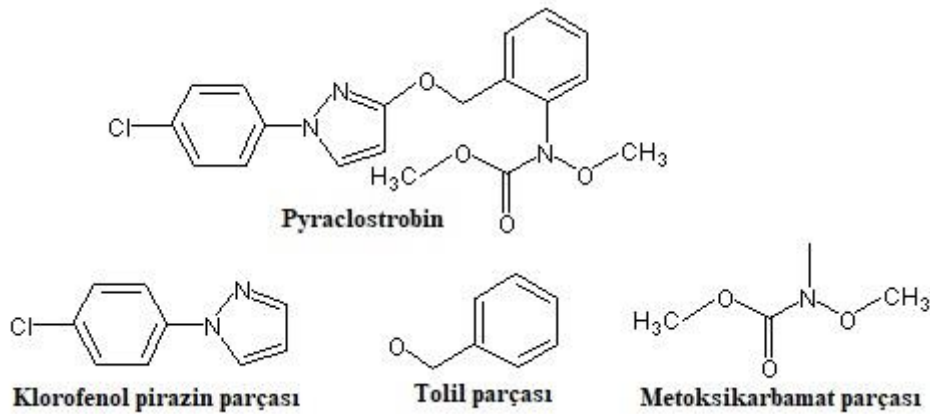
Bu fungusit sınıfının biyotik ve abiyotik bozunması hakkında sınırlı yayınlanmış literatür bulunmaktadır. Bu bileşikler, çoklu metabolik yollara yol açabilecek metabolik reaksiyonlar için birkaç bölgeye yol açacak nispeten karmaşık yapılara sahiptir. Genel olarak strobilurinler bitki, hayvan, toprak ve suda kolayca parçalanabilen bileşiklerdir (Jewess vd., 1999)

Metil ester hidrolizi, bu fungusit grubunda önemli bir metabolik yoldur. Biyolojik aktivitesi olmayan serbest akrilik asit verir. Bu reaksiyonun önemi, bu ürünlerin

seçici toksisitesi ile olan ilişkisidir. Aromatik halka hidroksilasyonu, glutatyon veya diğer biyolojik gruplarla konjugasyona yol açar, ancak bu reaksiyon polihidroksi aromatik ürünler vermek üzere aynı halka üzerinde tekrarlanırsa, halka bölünmeye ve ardından CO₂'ye eğilimli hale gelir. Akrilik kısımdaki çift bağ, birçok parçalayıcı mekanizmaya karşı savunmasızdır. Çift bağlar kolayca epoksidasyona uğrar ve ardından ketonlara bölünür. α karbon üzerinde bir keto grubunun oluşumu sonunda bir karboksilik grup verebilir (ürün benzoik asit türevi olur). Ayrıca, çift bağlar, üçüncül bir alkol verecek şekilde indirgeyici ortamlarda hidrojen veya su ile ilaveye tabi tutulur. Çift bağ içeren bileşiklerin fotolizi genellikle birden fazla ürün verir ve bu grubun tamamen bozulmasına yol açar (Jewess vd., 1999, Balba, 2007).

1.1.7. Pyraclostrobin

Pyraclostrobin, [2-({[1-(4-klorofenil)-1H-pirazol-3-il]oksi}metil)fenil]metoksikarbamik asidin metil ester i olan bir karbamat esterdir (Mercader vd., 2008)(Şekil 1.3). Pyraclostrobin, sitokrom b ve c1 arasındaki elektron geçişini bloke ederek mitokondriyal solunumu engeller ve bu da hedef mantarın ölümüne yol açar (Fulcher vd., 2014).



Şekil 1.3. Pyraclostrobin ve temel alt bileşenleri (Mercader vd., 2008)

In vivo çalışmalar ve *in vitro* inkübasyonlar ile pyraclostrobinin yan zincirin desmetoksilasyonu, klorofenil pirazol halka sisteminin hidroksilasyonu, tolil halka

sisteminin hidroksilasyonu, klorofenil pirazol veya antranilik asit türevleri ile sonuçlanan eter bağının bölünmesi, yan zincirin demetilasyonu ve yan zincirdeki amid bağının bölünmesi şeklinde 6 biyotransformasyon reaksiyonu belirlenmiştir (Birk vd., 2014).

Pyraclostrobinin metabolizmasının sıçanlar, tavşanlar, köpekler ve insanlar arasındaki metabolik profillerin araştırılmasında tüm türlerde aynı temel bozunma adımlarını gösterdiği ve 500M04, 500M73, 500M108, 500M103, 500M104 ve 500M88 metabolitlerinin oluştuğu belirtilmiştir. Ayrıca, insanlarda metabolit olarak tanımlanan 500M02, 500M106 ve 500M107 toksikolojik testler için kullanılan diğer türlerde de tanımlanmıştır (Funk vd., 2014; Fabian ve Landsiedel, 2013; Funk ve Bellwon, 2016a,b).

Sıçanlara radyoaktif işaretli pyraclostrobinin oral yoldan verilmesi sonrasında uygulanan dozun yaklaşık %50'sinin emildiği ve kanda 30 dk sonra zirve yaptığı, ardından 8 veya 24 saatte de ikincil bir zirve yaptığı belirlenmiştir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş dozun büyük kısmı dışkı ile geri kalanı idrarla atılmaktadır. Sıçanlarda pyraclostrobin metabolizması üç ana yoldan ilerler. Tolilmetoksikarbamat parçası üzerindeki metoksi grubu, bu grubu tutan birkaç ana metabolit ile kolayca kaybolur. Benzen ve/veya pirazol halkalarının hidroksilasyonunu, glukuronid ve daha az ölçüde sülfat ile konjugasyon takip eder. Pekçok metabolit, bu iki grup arasındaki eter bağlantısının bölünmesinden sonra pyraclostrobinin klorofenol-pirazol veya tolilmetoksikarbamat parçalarından türetilir, ardından halka hidroksilasyonu ve glukuronid veya sülfat konjugasyonu gerçekleşir. Metabolitler her iki cinsiyette ve tüm dozlarda benzerdir. Safrada veya idrarda değişmemiş ana bileşik bulunmazken, dışkıda sadece küçük miktarlar bulunmaktadır (Leibold vd., 1998).

Pyraclostrobin sıçanlara ağızdan veya deri yoluyla LD₅₀'leri sırasıyla >5000 ve >2000 mg/kg olup düşük akut toksisiteye sahiptir ve her iki durumda da ölüm görülmemektedir. Bileşik, inhalasyon yoluyla uygulandığında orta derecede toksisiteye sahiptir, LC₅₀'si çözücü olarak aseton kullanıldığında 0.31-1.07 mg/l ve çözücü olarak Solvesso kullanıldığında 4.07-7.3 mg/l'dir. Pyraclostrobin hafif bir

dermal ve oküler tahriş edici özellik gösterir. Oral uygulamadan sonra 6. günde tüm hayvanlarda dispne, piloereksiyon ve diyareden oluşan klinik belirtiler gösterir (Wiemann ve Hellwig, 1998a,b, Gamer ve Hoffmann, 1997, Gamer vd., 2001)

Fare, sıçan ve köpeklerde yapılan kısa süreli çalışmalarda, tekrarlanan pyraclostrobin dozlarından sonraki ana toksikolojik bulgular arasında duodenal mukoza hipertrofisi ve kemirgenlerde yapılan bazı çalışmalarda da mide mukozasında erozyon/ülserasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte, pyraclostrobin tavşanlarda tahriş biraz uzamış olsa da ciddi bir dermal tahriş edici özellik göstermemiştir (Mellert vd., 1999a)

Strobilurin türevi maddelerin genel olarak (özellikle balık türleri için) toksisite sırasının pyraoxystrobin > pyraclostrobin $\approx$ trifloxystrobin > picoxystrobin > kresoxim-methyl > fluoxastrobin > azoxystrobin şeklinde olduğu, ayrıca genotoksisite, immünotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve endokrin bozulma durumlarına yol açtığı rapor edilmiştir (Wang vd., 2021).

Tekrarlayan dozlarda pyraclostrobin ile yapılan kısa süreli çalışmalarda, azalan vücut ağırlığı kazanımlarına klinik biyokimyasal parametrelerde (toplam protein, globulin, glukoz, trigliseritler ve kreatinin konsantrasyonları) ve karaciğerde yağ depolanmasında azalma eşlik etmiştir. Ayrıca pyraclostrobinin nörotoksik, genotoksik, teratojenik ve karsinojenik aktivite göstermediği de belirtilmiştir. Pyraclostrobinin türler üzerindeki risk değerlendirmelerine ait bilgiler ile toksikolojik verilerine ait bilgiler sırasıyla Çizelge 1.1 ve 1.2’de ifade edilmiştir (Mellert vd., 1999b).

Çizelge 1.1. Pyraclostrobinin risk değerlendirmesiyle ilgili düzeyleri

Türler	Çalışma	Etki	NOAEL	LOAEL	KAYNAK
Fare	18 aylık toksisite ve karsinojenite çalışması ^a	Toksisite	30 mg/kg (=4.1 mg/kg/gün)	120 mg/kg (=17 mg/kg/gün)	Mellert 2002a
		Karsinojenite	120 mg/kg (=17 mg/kg/gün) ^b	—	
Sıçan	2 yıllık toksisite ve karsinojenite çalışması ^a	Toksisite	75 mg/kg (=3.4 mg/kg/gün)	200 mg/kg (=9 mg/kg/gün)	Mellert 2002b
		Karsinojenite	200 mg/kg (=9 mg/kg/gün)	—	
	3 aylık nörotoksisite çalışması ^a	Nörotoksisite	750 mg/kg, (=50 mg/kg/gün) ^b	—	Mellert vd., 1999c
		Toksisite	250 mg/kg (=17 mg/kg/gün)	750 mg/kg (=50 mg/kg/gün)	
	İki jenerasyon reproduktif toksisite çalışması ^a	Parenteral ve gebe toksisitesi	75 mg/kg (=8.2 mg/kg/gün)	300 mg/kg (=33 mg/kg/gün)	Schilling vd., 1999a
	Gelişimsel toksisite çalışması ^c	Maternal toksisite embryo ve fetal toksisite	10 mg/kg/gün 25 mg/kg/gün	25 mg/kg/gün 50 mg/kg/gün	Schilling vd., 1999b

Tavşan	Gelişimsel toksisite çalışması ^c	Maternal toksisite	3 mg/kg/gün	5 mg/kg/gün ^d	Schilling vd., 1999c
		Embryo ve fetal toksisite	5 mg/kg/gün	10 mg/kg/gün	
Köpek	Bir yıllık toksisite çalışması ^a	Toksisite	200 mg/kg (=5.4 mg/kg/gün)	400 mg/kg (=11 mg/kg/gün)	Menges vd., 1999

^a Diyet; ^b Yüksek doz testi, ^c Gavaj, ^d Maternal gıda alımında belirgin fakat geçici bir azalma daha yüksek konsantrasyonlarda doz uygulamasının başlatılmasından hemen sonra meydana gelmiştir.

Çizelge 1.2. Pyraclostrobin ile ilgili toksikolojik veriler (Bartholomaeus, 2003)

<i>Türler üzerinde pyraclostrobinin emilme, dağılma, atılma ve metabolizması</i>	
Oral absorpsiyonun hızı ve kapsamı	Hızlı, yaklaşık %50
Dermal absorpsiyon	Sıçanlarda <i>in vivo</i> %1.6-2.6, <i>in vitro</i> insan derisinde %3-8 (belirtilmemiş bir formülasyondan)
Dağılma	Gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbreklerde en yüksek konsantrasyonlarla hızlı ve geniş bir alana dağılır.
Atılımın hızı ve derecesi	Büyük ölçüde 48 saat içinde tamamlanır; idrarda yaklaşık %15 ve dışkıda %85; dozun %35-40'ı safra ile atılır.
Birikme potansiyeli	Önemli birikim kanıtı yok
Memelilerde metabolizma	Glukuronid ve sülfat konjugasyonu ile geniş ölçüde metabolize edilir; metabolitlerin toksikolojik olarak önemli olması muhtemel değildir
	Safrada veya idrarda değişmemiş ana bileşik yoktur ve feçeste sadece küçük miktarlarda bulunur.
Toksikolojik açıdan önemli bileşikler	Ana bileşik
Akut toksisite	
Sıçan, LD₅₀, ağızdan	>5000 mg/kg (ölüm yok)
Sıçan, LD₅₀, deri	>2000 mg/kg (ölüm yok)
Sıçan, LC₅₀ inhalasyon	0.310–1.070 mg/l (4 saat maruziyet, sadece baş ve burun) aseton içinde

	4.07–7.3 mg/l 4 saat maruziyet, sadece baş ve burun) Solvesso içinde
Tavşan, dermal iritasyon	Hafif ama uzun
Tavşan, ocular iritasyon	Hafif
Cilt hassasiyeti	Hassaslaştırıcı değil
<i>Kısa süreli toksisite çalışmaları</i>	
Hedef/kritik etki	Farelerde glandüler mide ülseri, fare, sıçan ve köpeklerde duodenal mukoza hipertrofisi, köpeklerde kusma ve ishal, fare ve sıçanlarda anemi, farelerde, sıçanlarda ve köpeklerde vücut ağırlığı artışında azalma, sıçanlarda hepatoselüler hipertrofi
En düşük ilgili oral NOAEL	4 mg/kg/gün (fare)
En düşük ilgili dermal NOAEL	100 mg/kg/gün (sıçan)
En düşük ilgili inhalasyon NOAEC	Bilgi yok
Genotoksisite	Genotoksik etkili değil
<i>Uzun süreli toksisite ve kanserojenlik</i>	
Hedef/kritik etki	Sıçanlarda ve farelerde vücut ağırlığı artışlarında azalma, farelerde karaciğer ağırlıklarında artış, sıçanlarda karaciğer ve mide histolojisinde değişiklik
En düşük ilgili NOAEL	3.4 mg/kg/gün (sıçan 2 yıllık çalışma)

Kanserojenlik	Sıçanlarda veya farelerde kanserojen değil
Üreme toksisitesi	
Üreme hedefi/kritik etki	Hiçbiri
En düşük ilgili üreme NOAEL'i	>33 mg/kg/gün (sıçanlarda 2 jenerasyon çalışması)
Gelişimsel hedef/kritik etki	İmplantasyon sonrası kayıpların artması ve fetal ağırlığının azalması
En düşük ilgili gelişimsel NOAEL	5 mg/kg/gün (tavşan)
Nörotoksisite/gecikmiş nörotoksisite	Sıçanlarda günde 50 mg/kg vücut ağırlığına kadar dozlarda yapılan 3 aylık bir çalışmada nörotoksisite kanıtı yok
Tıbbi veriler	Herhangi bir yan etki bildirilmemiştir, ancak piraclostrobin yeni bir madde olduğu için veriler sınırlıdır.

1.2. Taurin

Taurin, 2-aminoetansülfonik asittir. Kimyasal formülü $C_2H_7NO_3S$ 'dir. Moleküler kütlesi 125.14 g/mol'dür. Yoğunluğu 1.734 g/cm³'tür. Taurin, 305.11 °C (581.20 °F; 578.26 K) erime noktasına sahiptir. İlk defa 1827'de Alman profesörler Friedrich Tiedemann ve Leopold Gmelin, günümüzde bilinen taurini öküz safrasından elde eden araştırmacılar olup buna Gallen-Asparagin adını vermişlerdir (Tiedemann ve Gmelin, 1827). Daha sonra, Latince Öküz anlamına gelen *Bos taurus*'tan sonra taurus adını almıştır. Ancak günümüzde kullanılan taurin ismi literatüre ilk kez 1838 yılında von H. Demarcay tarafından girmiştir (Kim vd., 2008)

1.2.1. Taurinin sentezi

Sistein aminoasitinden elde edilen taurinin sentezi memelilerde pankreasta sistein sülfonik asit yoluyla meydana gelir. Burada sistein dioksijenaz enzimi tarafından sistein sülfonik aside oksitlenir ve sonrasında sülfinoalanin dekarboksilaz tarafından hipotaurine dönüştürülür. Hipotaurin hipotaurin dehidrojenaz enzimi tarafından taurin oluşması için oksitlenir. Ayrıca taurin transsülfürasyon yolu ile homosisteinin sistatyonine dönüştürülmesi ile de üretilir. Sistatyonin sırasıyla sistatyonin gama-liyaz, sistein dioksijenaz ve sistein sülfonik asit dekarboksilazın etkisiyle hipotaurine dönüştürülür. Hipotaurin daha sonra taurine oksitlenir (Jong vd., 2012)

1.2.2. Taurinin etkileri

Taurinin fizyokimyasal özellikleri, potansiyel olarak onu ozmoregülasyon, protein fosforilasyonunun modülasyonu, kalsiyum iyonu regülasyonu, antioksidan tepkisi, membran stabilizasyonu, safra asidi konjugasyonu, lipid metabolizması, glukoz regülasyonu dahil olmak üzere çeşitli temel süreçlerin ideal bir modülatörü yapmaktadır (Huxtable 1992; Sarsour vd., 2009). Taurinin safra asidi atılımına katkısına ilişkin hakim görüş, taurinin kolesterole konjuge olduğu, safra tuzu oluşumu ve yağ sindirimi yoluyla kolesterol atılımını desteklediği fikri ile

desteklenmektedir (Chiang, 2013). Ayrıca taurin, lipid peroksidasyon (LPO) ürünlerini azaltmada önemli bir rol oynar, böylece hücreleri doku hasarından korur (Goodman vd., 1985). Özellikle, taurinin, esas olarak beyinde ve böbrek medullasında hücre içi bir ozmolit olarak işlev görmesi nedeniyle, homeostazın korunmasında temel olduğu düşünülmektedir (Sturman, 1995). Taurinin hipertonic ve daha düşük ozmolariteli solüsyonlara geçtiği bildirilmiştir (Lien vd., 1990). Bu şekilde, taurinin ozmoregülatör özellikleri ile dokulardaki hücre hacmini etkileyebilir. Örneğin, Jurkat T lenfositlerinde Fas reseptörünün aktivasyonuna, yüksek taurin akışı eşlik eder ve böylece hücre büzülmesine katkıda bulunur (Lang vd., 1998). Taurinin hücre hacmini düzenleme potansiyelinin yanı sıra (Schaffer vd., 2000), ozmolitik aktivitesi de endoplazmik retikulumda (ER) protein katlanmasına katkıda bulunabilir (Yancey, 2005). Örneğin, taurin, ER'de mutant kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici proteininin (delta508 CFTR) uygun protein katlanmasını ve membran trafiğini uyarır (Howard vd., 2005). Ayrıca, çeşitli araştırmalarda taurinin enfeksiyon, oksidatif stres, inflamasyon üzerindeki baskılayıcı etkisinin yanı sıra antimikrobiyal, antidiyabetik ve antitümör aktivitesi de belirtilmiştir (Marcinkiewicz ve Kontny, 2014).

Çizelge 1.3. Taurinin sitoprotektif etkilerinin altında yatan mekanizmalar

	Taurin kloramin üretmek için hipokloröz nötralizasyon yoluyla anti-inflamasyon (Kim ve Cha, 2014; Marcinkiewicz ve Kontny, 2014)
	Mitokondride tRNA ^{Leu(UUR)} 'nin üridini ile konjuge ederek süperoksiti azaltır (Jong vd, 2012; Schaffer vd, 2014)
Taurinin hücre koruyucu etkisi	Mitokondriyal ND6 proteinini kodlayarak ATP üretir (Jong vd., 2012; Schaffer vd., 2016; Shetewy vd, 2016)
	Mitokondriyal membran geçirgenliğini ve apoptozu önler (Ricci vd., 2008; Shetewy vd., 2016)
	Taurin konjugasyonu için substrat sağlayarak mitokondriyal hastalığa fayda sağlar (Rikimaru vd., 2012; Schaffer vd., 2014)
Enerji	Glikoliz sırasında NADH/NAD ⁺ oranını azaltarak

metabolizması	kompleks I ve NADH'ye duyarlı enzimleri aktive eder (Schaffer vd., 2016) PPARalpha seviyelerini artırarak yağ asidi oksidasyonunu geri yükler (Schaffer vd., 2016) Bağırsaklar tarafından lipid emilimini kolaylaştırmak için safra asitlerini konjuge eder (Schaffer vd., 2016)
Gen ekspresyonları	Metabolizma ile ilgili genlerin transkripsiyon profilini değiştirir (Park vd., 2006) Uzun ömürlülüğü sağlamak için genleri modüle eder (Ito vd., 2014) Transkripsiyon faktörlerini değiştirir (Schaffer vd., 2016) Protein fosforilasyonunu ve hücre sinyalleşmesini modüle eder (Lombardini, 1996; Ramila vd., 2015)
Endoplazmik Retikulum (ER) stresi	Protein katlanmasını iyileştirerek ER stresini azaltır (Ito vd., 2015) ER stresini engelleyerek felç beyin hasarını iyileştirir (Gharibani vd., 2015) İnme ve Alzheimer hastalığında nöronları korur (Prentice vd., 2015)
Nöromodülasyon	GABA_A, glisin ve N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinde agonistlik aktivite ile MSS'yi korur (El Idrissi ve L'Amoreaux, 2008; Chan vd., 2013) GABA_A reseptörüne bağlanarak nöbetleri azaltır (L'Amoreaux vd., 2010) Glutamik asit dekarboksilazı yükselterek nöbetlere karşı korur (El Idrissi ve L'Amoreaux, 2008)
Otofaji	Ubiquitin-proteasome sistemini ve otofajiyi aktive ederek kardiyomiyositleri korur (Jong vd., 2015) Toksin aracılı otofajiyi hafifletir (Li vd., 2012; Bai vd., 2016)
Ca²⁺ homeostazı	Ca²⁺ aşırı yüklenmesini azaltarak miyokard enfarktüsü ve felç sırasında kalbi ve beyni korur (Li vd., 2012; Bai vd.,

2016)

İskemi-reperfüzyon sırasında taurin kaybı, hipoksiye bağlı Ca^{2+} aşırı yüklenmesini azaltarak kalbi korur (Schaffer vd., 2002)

Taurin tükenmesi, Ca^{2+} ATPaz aktivitesinin azalması nedeniyle kardiyomiyopatiye yol açar (Ramila vd., 2015)

Ca^{2+} bağlayıcı proteinleri indükleyerek epilepsi sırasında beyin nöronlarını korur (Junyent vd., 2010)

Ca^{2+} 'nin glutamat kaynaklı yükselmeyi azaltarak nöronları glutamat eksitotoksitesine karşı korur (Wu vd., 2005)

Osmoregülasyon

Organik bir ozmolit görevi görür (Schaffer vd., 2002)

1.2.3. Taurinin oksidatif strese karşı rolü ve altında yatan moleküler mekanizmalar

Altta yatan çok sayıda moleküler mekanizmanın, taurinin oksidatif stresle ilişkili hasarlarda yararlı etkisini açıklamaktadır. Her şeyden önce, taurin, tRNA'ya konjuge olduğu için antioksidan savunmada yer alır. Normal mitokondride, mitokondriyal mRNA'ların UUG kodonlarının kodu, tRNA'nın AAU antikodonlarında taurinin bir üridin ile konjugasyonu nedeniyle çözülür. 5-taurinometilüridin-tRNA oluşturulduğunda, mRNA'nın UUG kodonları, tRNA'nın AAU antikodonları ile etkileşime girebilir (Jong vd., 2012). Bu şekilde, taurin ile tedaviyi takiben, UUG kodonları içeren proteinlerin kodunun çözülmesi güçlendirilir, böylece hücreler mitokondriyal oksidatif stresten ve mitokondriye bağımlı apoptozdan korunur (Ricci vd., 2008; Jong vd., 2011; Shetewy vd., 2016). Buna karşılık, taurin substratı kaybolduğunda, konjuge taurin (5 taurinometilüridin-tRNA) formu azalır ve NADH-ubikinon oksidoredüktaz zincir 6 gibi çoklu UUG kodonları içeren spesifik mitokondri kodlu proteinlerde önemli bir düşüşe neden olur (Schaffer vd., 2014). Özellikle, solunum zinciri kompleksi I alt birim biyosentezinde bir azalma vardır, bu nedenle normal ATP üretimi için gerekli alt birimlerin uygun birleşimini engeller (Schaffer vd., 2014; Jong vd., 2012).

Mitokondri içinde temel bir rol oynamanın yanı sıra, taurinin antioksidan aktiviteleri mitokondri dışında gerçekleşebilir (Schuller-Levis ve Park, 2006). Taurinin sitoprotektif etkisi aynı zamanda klasik reaktif oksijen temizleyicisi olarak hidrojen peroksiti (H_2O_2), hidroksil radikallerini ($\cdot OH$) ve nitrik oksidi (NO) detoksifiye etme potansiyeli ile kanıtlanmıştır (Cozzi vd., 1995; Aruoma vd., 1988) . Bununla birlikte, taurin ile tedavinin elektron taşıma zinciri aktivitesini artırarak oksidatif stresi tersine çevirdiği ve böylece mitokondriyi aşırı O_2^- üretimine karşı koruduğu görülmüştür (Jong vd., 2012).

Taurin ayrıca LPO (Goodman vd., 2009) veya aşırı kalsiyum yüklenmesini (Timbrell vd., 1995) azaltarak oksidatif stres koşullarına karşı sitoprotektif bir molekül görevi görebilir. Örneğin, tamoksifen alan sıçanlarla yapılan deneylerde, taurinin anti-oksidan özellikleri, mitokondriyal LPO'nu zayıflatması yoluyla kendini göstermiş, böylece hayvanları hasardan korumuştur (Parvez vd., 2008). Benzer şekilde, taurinin sıçanlarda nikotin uygulamasını takiben glutatyon (GSH) depolarının normalleşmesi yoluyla oksidatif strese karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Sener vd., 2005). Başka bir durumda, taurinin, NMDA ile retina hasarı oluşturulan Sprague-Dawley sıçanlarda yararlı olduğu bildirilmiştir (Jafri vd., 2019). Diğer taraftan, taurin biyolojik membranı stabilize etme ve oksidatif stres faktörlerinin neden olduğu membran geçirgenliğindeki değişiklikleri baskılama yoluyla da dolaylı bir antioksidan görevi görür (Gordon vd., 1992). Aynı bağlamda, taurinin dolaylı antioksidan kapasitesi, taurinin hipobromöz asit veya hipokloröz asit ile reaksiyonundan üretilen taurin türevlerinin (N-bromotaurin veya N-klorotaurin) oluşumuyla kendini gösterir (Marcinkiewicz ve Kontny, 2014).

Ek olarak, taurin, oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması olarak renin-anjiyotensin sistemini modüle eder. Taurinin nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz üzerindeki etkisi aracılığıyla anjiyotensin II (Ang II) sinyalini modüle etmesi antioksidan rolünü desteklemektedir. Özellikle, NADPH oksidaz, Ang II sinyali ile protein kinaz C'nin indüklenmesinin ardından aktive olur ve O_2^- üretimine katkıda bulunur (Ricci vd., 2008). Başka bir durumda, yüksek glukoz (25 mM) uygulamasının ardından renal proksimal tübüler hücrelerde artmış serbest

radikal üretimi ve p38 mitojenle aktive olan protein kinaz fosforilasyonunu taurin uygulaması azaltmıştır. (Hsieh vd., 2002).

Taurin, serbest radikal birikimini inhibe etmekle sıkı bir şekilde ilişkilendirilmemiş olsa da, etkisini antioksidan enzimlerin modülasyonu yoluyla gösterdiğine inanılmaktadır (Kettle vd., 1997). Yapılan bazı çalışmalar taurinin antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz) aktivitesini artırarak (Vohra ve Hui, 2001; Nonaka vd., 2001; Anand vd., 2011), redoks seviyelerini ve GSH depolarını koruyarak (Oudit vd., 2004) etkidiğini göstermektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, ilk kez *in vivo* olarak pyraclostrobin verilen erkek sıçanlarda oluşan oksidatif strese karşı taurinin olası koruyucu etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla bazı biyokimyasal parametreler (aspartat aminotransferaz-AST, alanin aminotransferaz-ALT, alkalen fosfataz-ALP, kan üre azotu-BUN, kreatinin), lipid peroksidasyon (malondialdehid-MDA) ve GSH düzeyleri ile antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivite tayini ve DNA hasarı (ssDNA) belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusunda apoptotik (*Caspase-3*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, *Bax*, *p53* ve *Bcl-2*), yangısal sitokinler (*NFκB* ve *TNF-α*) ve *CYP2E1*'in mRNA ekspresyon düzeyleri ile dokuların Hemotoksilen-Eosin boyaması ile histopatolojik olarak incelemeleri gerçekleştirildi.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araç ve Gereçler

Cam malzemeler [Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), mezür, tüp]

Cerrahi malzemeler (pens, makas)

Distile su cihazı

Hassas terazi (Precisa 205 ASCS)

Otomatik pipetler (Socorex-Acura 825; 10–100 µl; 100–1000 µl)

Real Time PCR (Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System)

Santrifüj (Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio)

Spekrofotometre (Shimadzu 1601 Uv-Visible)

2.1.2. Hayvan Materyali

Çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen toplamda 48 adet 200-300 g ağırlığında erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar gruplara ayrıldı ve deney sürecine alınmadan önce ortama alışması için 7 gün süreyle, uygun nemde (%50-55) ve oda sıcaklığında (25°C) barındırıldı. Sıçanlara deneysel aşama süresince ad libitum sıçan yemi ve içme suyu verildi. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (AKUHADYEK) 49533702/195 sayı ile onay alındı (EK-1).

2.2. Metot

2.2.1. Deneysel Aşama

2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması

Deneyisel aşamada kullanılan pyraclostrobin BASF (Seltima®, BASF, İstanbul, Türkiye) ve taurin Sigma-Aldrich (MO, ABD) firmalarından temin edildi. Pyraclostrobin (Tuttle vd., 2019) ve taurinin (Ince vd., 2017) dozları daha önceden yapılmış çalışmalar incelenerek belirlendi. Çalışmada kullanılan ticari müstahzardaki pyraclostrobin miktarı yüksek performans sıvı kromatografisi ile CIPAC 657 metoduna göre incelendi ve içeriğinde 110.04 g/l pyraclostrobin tespit edildi. Hayvanlar rastgele her grupta 8'li olacak şekilde 6 gruba ayrıldı ve gruplara aşağıdaki şekilde uygulama 28 gün süresince her gün tekrarlanarak yapıldı.

Grup I- Kontrol grubu- standart yem ve içme suyu verildi.

Grup II- Mısır Yağı grubu- 0,5 ml gastrik gavaj ile verildi.

Grup III- Pyraclostrobin grubu- Pyraclostrobin 30 mg/kg 0,5 ml mısır yağı içerisinde çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup IV- Pyraclostrobin 30 mg/kg + Taurin 50 mg/kg grubu- Pyraclostrobin 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve taurin ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup V- Pyraclostrobin 30 mg/kg + Taurin 100 mg/kg grubu- Pyraclostrobin 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve taurin ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup VI- Pyraclostrobin 30 mg/kg + Taurin 200 mg/kg grubu- Pyraclostrobin 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve taurin ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

2.2.1.2. Deneyisel Aşamanın Sonlandırılması

Sıçanlar deney aşaması olan 28 günlük sürenin tamamlanmasından sonra ksilazin (87 mg/kg i.m.) ve ketamin (13 mg/kg i.m.) uygulanarak tam anesteziye alındı. Sonrasında göğüs kafesinin açılması ile intrakardiyak olarak enjektörle 3-5 cc kan alındı. Kan alımı sonrasında hayvanlara servikal dislokasyon yapıldı ve gerekli olan doku örnekleri alındı. Kanların 10 dk 3000 devirde santrifüjü yapılarak plazmaları ayrıldı ve analizleri yapılmaya bütün örnekler -80 °C de saklandı. Sıçanların sakrifikasyonundan sonra cerrahi yöntemlerle karaciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin

dokuları biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik incelemeler için alındı. Daha sonra kalan atıklar, temin edilen özel ambalajlara konularak usulüne uygun yok edilmesi için tıbbi atık ünitesine teslim edildi.

2.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan karaciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokuları yaklaşık 0,5-1 cm² kadar büyüklüklerde farklı bölgelerden 3-5 adet olacak şekilde alındı ve doku takip kasetlerine kondu. Hazırlanan bu örnekler %10 nötral formalin içine kondu ve 5 gün süreyle bekletilen doku örnekleri sonrasında klasik doku takibine alındı. Akan suda 30 dk bekletilmek suretiyle üzerindeki fazla formaldehitten arındırıldı ve artan konsantrasyonlarda alkol serilerinden (bিরer saatlik) geçirilerek dehidre olmaları sağlandı. Sonrasında şeffaflaştırma için ksilen içerisine alındı. Dokular 1,5 saat ksilende tutulduktan sonra her saat değişmeli olarak 3 saat yumuşak parafinde ve sonra 2 saat sert parafinde tutuldu. Bu işlem sonrasında dokular yine parafin ile bloklandı. Bloklanan örneklerden mikrotom aracılığıyla 5 µ kalınlığında alınan kesitler değerlendirmeleri için normal lamlara alındı ve boyanmak üzere gruplandırıldı. Histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması ile dokular boyandı. Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında değerlendirilerek dokularda gruplar arasında görülen farklılıklar değerlendirildi.

2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler

2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu

Alınan dokular (0,5 g) üzerine 50mM olarak hazırlanan 5 ml soğuk KH₂PO₄ (PH=7) eklendi. Sonrasında mekanik ve ultrasonik homojenizatör (20k Hz) ile homojenizasyonları yapıldı. Bu işlem sonrasında solüsyon içerisindeki dokuların 5000 devirde 15 dk santifruju yapıldı ve elde edilen doku süpernatantları biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Plazmaları alınan kan örnekleri üzerine eşit miktarda KH_2PO_4 tampon solüsyonu konuldu ve 5 dk 3000 devirde (3 defa) santrifüj edildi. Sonra üsteki kısım atıldı ve 0,5 ml KH_2PO_4 tamponu üzerine 0,5 ml eritrositlerden çekilerek ependorflara aktarımı yapıldı. Analizler yapılmaya kadar örnekler -80°C de saklandı. Hemolizat hazırlanması için eritrosit paketinden 0,8 ml alındı ve üzerine soğuk distile su eklendi. Bu hemolizatlar SOD ve CAT enzim aktivite tayininde kullanıldı (Winterbourn vd., 1975).

2.2.3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD aktivite tayini, ortamdaki nitroblue tetrazolium (NBT) indirgemesinin örnekte bulunan SOD ile engellenmesi prensibine dayanır. Süperoksid grupları ksantin oksidaz enzimi ile reaksiyona girerek maddeyi indirger ve sonuçta 560 nm’de absorbans veren formazon oluşur. Ortama ilave edilen enzim süperoksid gruplarını dismutasyona uğratar ve NBT indirgeme tepkimesi yavaşlar. Sonuçta spektrofotometredeki absorbans değerleri düşer (Sun vd., 1988). Bu aktivitenin ölçümü için aşağıdaki metot uygulandı.

* Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PSB): 8,06 g NaCl, 0,201 g KCl, 12,636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 bir litre tridistile suda çözdürüldü ve pH’sı 7,4 e ayarlandı.
2. Ksantin stok çözeltisi (3 milimol/l): 23 mg ksantin 50 ml’lik bir balon joje içinde 5 ml 0,1 N NaOH ile hafifçe ısıtılarak çözdürüldü. Distile su ile 50 ml’ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman 10 kez sulandırıldı.
3. EDTA çözeltisi (0,6 milimol/l) : 0,249 g EDTA (dihidrat) bir litrelik balon joje içinde distile su ile çözdürüldü ve hacim litreye tamamlandı.
4. Nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi (150 milimol/l) : 12,3 mg NBT 100 ml’lik bir balon jojede distile su ile çözdürüldü ve hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

5. Na_2CO_3 çözeltisi (400 $\mu\text{mol/l}$) : 4,2 g Na_2CO_3 100 ml'lik bir balon jojede distile su ile çözdürüldü ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
6. Sığır albümini çözeltisi (1g/l) : 100 mg sığır albümini 100 ml'lik balon jojede çözdürüldü ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
7. CuCl_2 (0,8 mmol/l) : 10,7 mg CuCl_2 100 ml'lik balon jojede çözdürüldü ve hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.
8. Ksantin oksidaz enzim çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 20 μmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırıldı.
9. Reaktif Karışımı: 20 tüplük bir seri analiz için 100 ml'lik bir erlen içerisinde 20 ml 10 kez sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi konuldu ve iyice karıştırıldı.

* Uygulanan metot: Test ve kör tüplerine aşağıda gösterildiği sırayla çözeltiler ilave edildi.

1. Kör ve test işaretli tüplere 2,45 ml reaktif karışımı konuldu.
2. Kör tüpüne 0,5 ml bidistile su, test tüpüne 0,5 ml numune konuldu.
3. Bütün tüplere 50 μl ksantin oksidaz konur ve karıştırıldı.
4. 20 dk 20 °C de su banyosunda inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 1 ml CuCl_2 eklenerek reaksiyon durduruldu ve oluşan rengin absorbansı 560 nm'de okundu. Reaksiyon ortamında bulunan enzim aktiviteleri ünite cinsinden hesaplandı.

2.2.3.4. Katalaz Aktivite Tayini

Tampon çözelti içinde bulunan H_2O_2 örnekte bulunan CAT etkisi ile yıkımlanır ve bunun spektrofotometredeki (570 nm) absorbansında azalma meydana gelir. Bu azalma hızı CAT aktivitesi ile orantılıdır (Sinha, 1972). Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki metot uygulandı.

* Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat tamponu; 0,3 g Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) tartıldı ve litreye tamamlandı.

Hidrojen peroksit (H_2O_2 ; %30); 1 ml H_2O_2 alındı ve üzerine 49 ml su eklendi

Potasyum bikromat ($K_2Cr_2O_7$); %5'lik $K_2Cr_2O_7$ den 5 g alındı ve 100 ml'de çözdürüldü.

Glasiyel asetik asit

Dikromat solüsyon: 1ml %5 lik $K_2Cr_2O_7$ ve 3 ml glasiyel asetik asit 1:3 oranında karıştırıldı

* Uygulanan metot:

1. 0,1 ml hazırlanan dilüe numune ependorf tüpe konuldu. Kör için numune yerine distile su konuldu
2. Üzerine 0,1 ml Fosfat Tamponu (0,01 M) eklendi
3. Üzerine 0,5 ml H_2O_2 eklendi
4. Üzerine 0,1 ml dikromat solüsyonu eklendi
5. 10 dk kaynar su banyosunda bekletildi
6. 570 nm de distile suyla sıfırlanarak okundu.

2.2.3.5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA miktarı tam kanda Draper ve Hardley (1990)'in çift kaynatma yöntemi kullanılarak belirlendi. Metot MDA'nın TBA ile reaksiyona girmesi ve 532 nm dalga boyunda absorbands vermesi prensibine dayanmaktadır. MDA tayini için aşağıdaki metot uygulandı.

* Kullanılan Çözeltiler:

%10'luk Triklorasetik asit (TCA): 10 g TCA 100 ml distile suda çözdürüldü.

% 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): TBA önce 1 g NaOH 500 ml distile suda çözdürüldü. 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözdürüldü.

* Deneyin Yapılışı:

0,5 ml erirosit paketi üzerine 2,5 ml %10'luk TCA eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 10 dk kaynatıldı. Hemen soğutuldu ve 10 dk 4000 rpmde santrifüj edildi. Elde edilen berrak homojenizattan 2 ml temiz bir deney tüpüne alınarak üzerine %0,8'lik TBA eklendi. 10 dk kaynatılarak tekrar buzlu su içinde soğutuldu. Pembe renkli kısmın 532 nm de adsorbansı distile suya karşı ölçüldü.

Dokulardaki MDA miktarı Ohkawa vd. (1979)'nin metoduna göre belirlendi.

*** Kullanılan Çözeltiler:**

1. 50 mM KH_2PO_4 : 3,4 g KH_2PO_4 tartılarak 500 ml'ye tamamlandı.
2. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 2,02 g SDS 250 ml distile suda çözündürüldü.
3. Glasiyel asetik asit: %20'lik glasiyel asetik asit hazırlandı.
4. % 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): TBA 1 g NaOH içeren 500 ml distile suda çözündürüldü.
5. N butanol-pirin karışımı: 750 ml n- butanol 50 ml piridinle karıştırıldı

*** Uygulanan metot:**

0,2 ml süpernatant bir tüpe kondu. Üzerine sırasıyla; 0,2 ml % 8,1 lik SDS, 1,5 ml % 20 lik glasiyel asetik asit, 1,5 ml % 0,8 lik TBA kondu ve 0,6 ml distile suyla karıştırıldı. 1 saat 95°C de kaynatıldı. Hemen soğutuldu. Üzerine 1 ml distile su + 5 ml butonal-piridin karıştırılıp çalkalandı. 4000 rpm'de 10 dk santifuj edildi ve pembe renkli kısmın 532 nm'de adsorbansı ölçüldü.

2.2.3.6. Glutasyon (GSH) Tayini

Yöntemde 5-5-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girer ve disülfid bileşiği sarı renkli bir kompleks yapı oluşturur. Bu bileşiğin absorbansı spektrofotometrede (412 nm) okunarak GSH miktarı saptanır (Beutler vd., 1963). Dokularda ve eritrosit paketinde GSH tayini aşağıdaki metotla yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: 5 g metafosforik asit + 1 g EDTA + 90 g NaCl 300 ml distile suda çözündürüldü.

Fosfat çözeltisi (0,3 M): 40,02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 ml distile suda çözündürüldü.

DTNB: 40 mg DTNB 100 ml'lik sodyum sitrat çözeltisiyle çözündürüldü.

GSH standardı: 10 mg GSH 25 ml distile suda çözündürüldü.

Uygulanan metot:

1. 0,2 ml doku homojenizatı ya da tam kan alındı.
2. Üzerine 3 ml çöktürücü konularak karıştırıldı, 5 dk beklendi ve daha sonra adi süzgeç kâğıdından süzdürüldü.
3. 1 ml filtrat başka bir tüpe alındı. Üzerine 4 ml fosfat pamponu ve 0,5 ml DTNB ayırıcı katılarak, iyice karıştırıldı.
4. Daha sonra 412 nm de 10 dk içerisinde spektrofotometrede okundu.
5. Standart tüpünde doku homojenizatı yerine 0,2 ml GSH standardı kullanıldı.
6. Kör tüpüne 2 ml distile su ve 3 ml çöktürücü konuldu. Adi süzgeç kâğıdından filtre edildi.

2.2.3.7. Protein Ölçümü

Proteinlerdeki peptid bağları ile bakır iyonu (Cu^{+2}) alkali ortamda bir kompleks oluşturur ve Cu^{+} indirgenir. İndirgenmiş kompleksin yan zincirinde yer alan aminoasitler (Tyr, Trp ve Cys) Folin-Fenol reaktifini indirger ve renk oluşumuna neden olur. Bu rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik olarak 660 nm’de ölçülmesi ile miktar belirlenir (Lowry vd., 1951).

Uygulanan yöntem:

1. Örnek ve standart tüplerine 1 ml homojenizat çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 ml saf su koyuldu.
2. Tüm tüplere 3 ml C reaktifi eklendi (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşturuldu. A reaktifi %2 Na_2CO_3 , %1 NaOH, %0.16 Na-tartarat; B reaktifi ise %4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
3. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
4. Tüm tüplere 300 ml Folin-Fenol reaktifi vortekslenerek eklendi.
5. Oda sıcaklığında 45 dk bekletildi.
6. Absorbanslar 660 nm’de köre karşı okundu.
7. Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

2.2.3.8. Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi

Hemoglobindeki demirin yükseltgenmesi (Fe^{+2} ferrisiyanür tarafından Fe^{+3} 'e yükseltgenir) ile hemoglobin methemoglobine dönüşür. KCN eklenmesiyle methemoglobin siyanomethemoglobine ve bunun absorbansı 540 nm'de ölçülerek miktar belirlenir (Drabkin ve Austin, 1935).

Reaktifler:

Drabkin çözeltisi: Sırasıyla 0,2 g potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$), 0,05 g KCN ve 1 g NaHCO_3 distile suda çözündürüldü ve 1 litreye tamamlandı.

Siyanomethemoglobin standardı (Std): Bilinen konsantrasyonda hemoglobin çözeltisi (g/dl) kullanılır.

Uygulanan yöntem:

Spektrofotometre 540 nm'ye ayarlandı. Tüpler; kör, standart ve numune olarak işaretlendi. Tüm tüplere 6 ml Drabkin çözeltisi koyuldu. Standart tüpüne 0,02 ml standart çözeltisi, kör tüpüne 0.02 ml distile su koyuldu. Kan numunesinden 0,02 ml numune tüpüne koyuldu. Tüpler hücre lizisinin (hücre membranının bütünlüğünün bozularak hücrenin parçalanması) oluşması ve hemoglobinin siyanomethemoglobine dönüşmesini sağlamak için karıştırıldı ve 5 dk bekletildi. Daha sonra numunelerin ölçümü yapıldı.

2.2.4. Biyokimyasal Parametreler

Alınan plazma örneklerinde AST, ALT, ALP, BUN ve kreatinin miktarları temin edilen ticari kitlerle (Human, Max-Planck-Ring, Wiesbaden, Germany) spektrofotometrik olarak belirlendi. DNA hasarının belirlenmesi ise ticari olarak temin edilen ELISA kiti (ABP/N014-iQuant™ ssDNA Assay KiT) ile gerçekleştirildi.

2.2.5. Moleküler Analizler

2.2.5.1. RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi

Uygulama sonrasında sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri RNA later solüsyonu içerisine (ThermoFisher Scientific) alınarak -80°C'de uygulama yapılana kadar saklandı. Dokuların GeneJet RNA Purifikasyon Kiti (ThermoFisher Scientific) ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA'ların kalitesi ve miktarı Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek belirlendi. İzole edilen RNA'lar cDNA eldesi için toplamda 1 µg olacak şekilde hesaplanarak kullanıldı. RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak için DNaz I (Thermo Scientific) eklenip ve DEPC (dietil pirokarbonat) ile toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı. Sonrasında sırasıyla 30 (37°C) ve 10 dk (65°C) inkübasyona bırakıldı. DNaz I uygulanmış RNA'dan cDNA Sentez Kit (RevertAid H Minus Single Strand, Thermo Scientific) ile cDNA elde edildi.

2.2.5.2. Primer Tasarımı

Deneyde kullanılan primerler *Rattus norvegicus*'a özgü (NCBI) β -aktin, p53, Bcl-2, Caspase-3, Caspase -8, Caspase -9, NF κ B, TNF- α , Bax ve CYP2E1 genlerine ait mRNA dizileri kullanılarak ve FastPCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar paket programından yararlanılarak belirlendi. Primer dizileri, toplam baz uzunlukları ve gen bankası numaraları Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

2.2.5.3. Real-time PCR

Sıçanların karaciğer dokularından alınan örneklerde housekeeping gen (β -Aktin) ve belirlenen genlerin mRNA ekspresyonları real-time PCR cihazı ile belirlendi. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{hedef gen}}} - C_{t_{\text{beta aktin}}})_{\text{denek grubu}} - (C_{t_{\text{hedef gen}}} - C_{t_{\text{beta aktin}}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülünden yararlanıldı. Hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak β -aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait β -aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

Çizelge 2.1. Moleküler analizler için kullanılan genler, oligonükleotid dizilimleri, boyutları ve gen bankası numaraları

Genler		Oligonükleotid dizilimi	Ürün boyutu (bp)	Gen Bankası Numarası
β -Aktin	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	452	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA		
p53	F	TGCAGAGTTGTTAGAAGGCCCA	397	NM_030989.3
	R	GTCACCATCAGAGCAACGCTC		
Caspase-3	F	ACCCTGAAATGGGCTTGTGTA	427	NM_012922.2
	R	GCCATATCATCGTCAGTTCCAC		
Bcl-2	F	GGGTATGATAACCGGGAGATCG	508	NM_016993.1
	R	ACTCAGTCATCCACAGAGCGA		
NF κ B	F	TCCCCAAGCCAGCACCCAGC	334	NM_199267.2
	R	GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC		
Caspase-8	F	TTGCTGAACGTCTGGGCAACG	502	NM_022277.1
	R	TCGTCGATCCTTCCCAGCAAGC		
Caspase-9	F	AGAAACACCCAGGCCGGTGGA	327	NM_031632.1
	R	ACCACGAAGCAGTCCAGGGCAC		
TNF- α	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	368	NM_012675.3
	R	GGATGAACACGCCAGTCGCC		
Bax	F	AGGACGCATCCACCAAGAAGC	363	NM_017059.2
	R	CAGTGAGGACTCCAGCCACAA		
CYP2E1	F	TGAGATATGGGCTCCTGATCC	293	AF061442.1
	R	ATCTGGAAACTCATGGCTGTC		

2.2.6. İstatistiksel Analiz

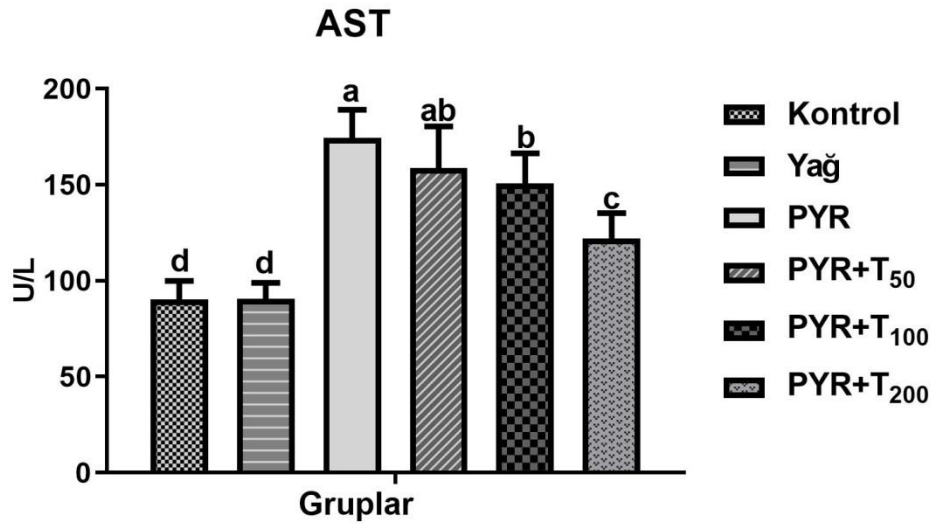
İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences ver. 22.0 SPSS Inc, Chicago Illinois, USA) programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. İstatistiksel analiz öncesinde verilerin normal dağılım kalıbına uygunluk testi yapıldı ve verilerin normal dağılım içerisinde olduğu belirlendi. İstatistiksel analiz için gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ve önemliliklerin belirlenmesinde post-hoc Duncan testi kullanıldı. $P < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



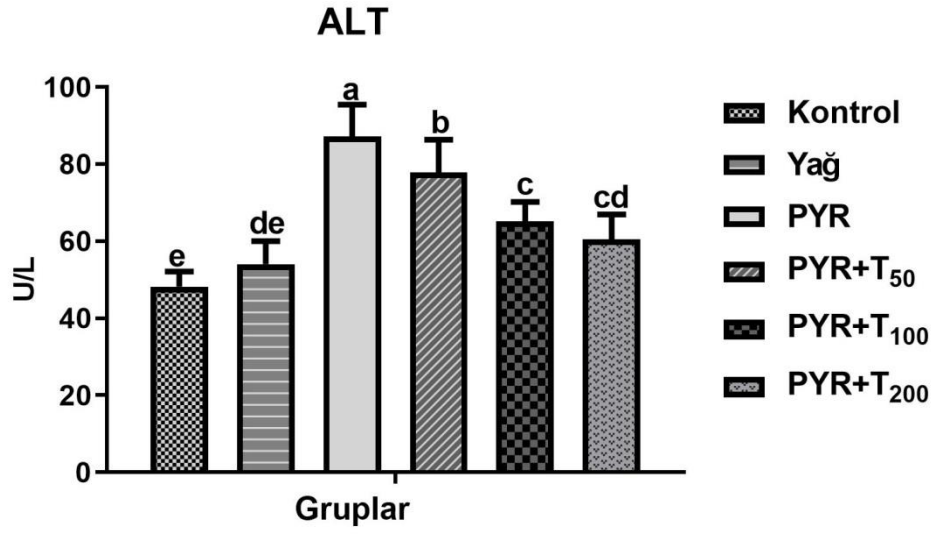
3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Parametre Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi

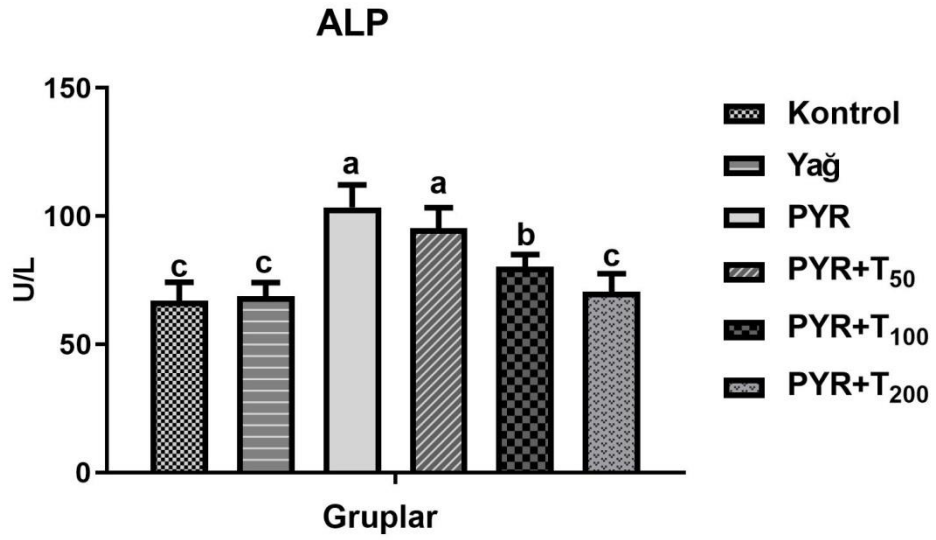
Sıçanların plazmalarından ölçülen AST (Şekil 3.1), ALT (Şekil 3.2), ALP (Şekil 3.3), BUN (Şekil 3.4) ve kreatinin (Şekil 3.5) değerlerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pyraclostrobin grubunda en yüksek seviyede olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Buna karşın pyraclostrobin ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg taurin verilen gruplarda artan dozlara bağlı olarak bu yüksek değerlerin azaldığı belirlendi ($p<0.001$). Ayrıca, bu değerlerin yağ grubunda önemli bir değişiklik meydana getirmediği gözlemlendi ($p>0.05$).



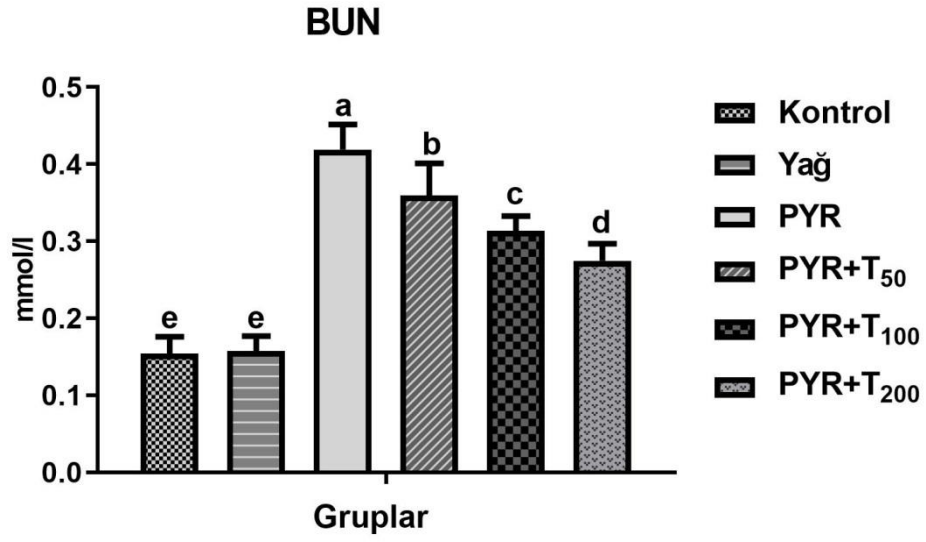
Şekil 3.1. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d:} farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



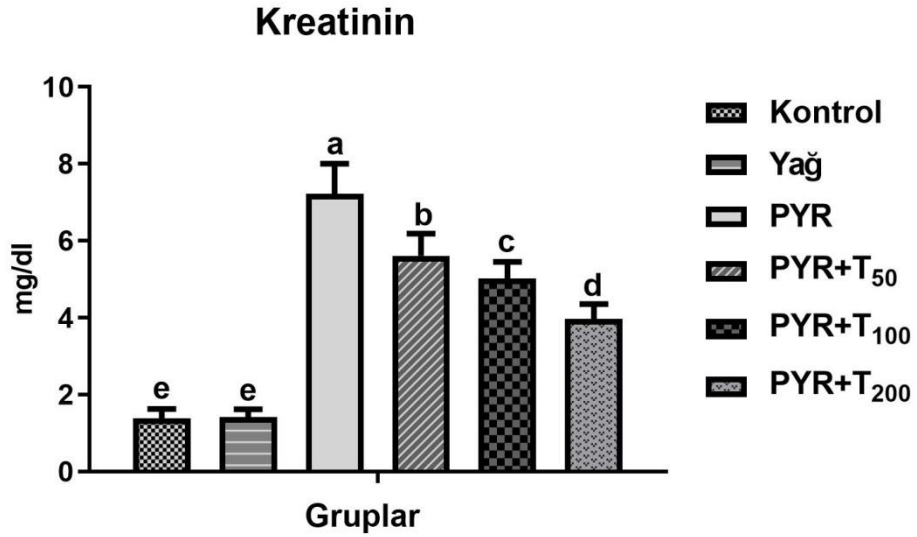
Şekil 3.2. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerine etkisi. ^{a,b,c,d,e} farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.001)



Şekil 3.3. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma alkalin fosfataz (ALP) düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c} farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.001)



Şekil 3.4. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma kan üre azotu (BUN) düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d,e} farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.001)



Şekil 3.5. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların plazma kreatinin düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d,e} farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.001)

3.2. MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi

Ratların tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında ölçülen MDA değerlerinin (Çizelge 3.1.) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pyraclostrobin grubunda yüksek seviyede olduğu belirlendi ($p<0.001$). Pyraclostrobin ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg taurin verilen gruplarda artan dozlara bağlı olarak (özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarda) bu yüksek değerlerin azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). Ayrıca, bu değerlerin kontrol grubu ile kıyaslandığında yağ grubunda önemli bir fark meydana getirmediği belirlendi ($p>0.05$). Diğer taraftan pyraclostrobin uygulaması sonucu GSH değerlerinin (Çizelge 3.2.) azaldığı gözlenirken ($p<0.001$), pyraclostrobin ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg taurin uygulamalarının artan dozlarda (özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarda) azalan GSH düzeylerini artırdığı belirlendi. Yağ grubunda ise bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

3.3. SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi

Eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında ölçülen SOD (Çizelge 3.3) ve CAT (Çizelge 3.4.) enzim aktivite değerlerinin kontrolle kıyaslandığında pyraclostrobin verilen gruplarda en düşük düzeyde olduğu ($p<0.001$), pyraclostrobin ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg taurin verilen gruplarda artan dozlara bağlı olarak (özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarda) bu azalan SOD ve CAT değerlerinin artış gösterdiği belirlendi ($p<0.001$). Ayrıca, yağ grubunda ise SOD ve CAT değerlerinin kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Çizelge 3.1. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında malondialdehid (MDA) düzeyleri üzerine etkisi

Gruplar	Tam kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/g doku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	6,93 ± 0,51 ^c	10,67 ± 0,91 ^d	8,54 ± 1,09 ^d	4,38 ± 0,84 ^d	4,78 ± 1,25 ^e	5,33 ± 1,35 ^d
Yağ	7,42 ± 0,30 ^c	10,92 ± 0,58 ^d	9,09 ± 1,00 ^d	4,43 ± 0,53 ^d	6,41 ± 1,04 ^e	6,62 ± 0,90 ^d
PYR	19,59 ± 4,17 ^a	35,08 ± 5,67 ^a	31,37 ± 6,63 ^a	28,46 ± 4,45 ^a	19,70 ± 3,69 ^a	21,40 ± 3,42 ^a
PYR + T₅₀	19,44 ± 3,01 ^a	29,80 ± 4,10 ^b	24,23 ± 6,17 ^b	26,38 ± 3,27 ^a	16,57 ± 3,18 ^b	19,66 ± 3,82 ^{ab}
PYR + T₁₀₀	12,77 ± 1,92 ^b	25,23 ± 3,20 ^c	18,27 ± 2,60 ^c	22,84 ± 2,81 ^c	13,00 ± 2,18 ^c	17,27 ± 3,35 ^{bc}
PYR + T₂₀₀	9,23 ± 1,21 ^c	23,04 ± 2,38 ^c	16,50 ± 2,75 ^c	18,76 ± 3,08 ^b	9,19 ± 1,24 ^d	14,21 ± 3,01 ^c

Ortalama ± standart sapma; n=8

a,b,c,d,e: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$).

Çizelge 3. 2. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisi

Gruplar	Tam kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/g doku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	81,40 ± 7,45 ^a	46,90 ± 5,11 ^a	25,63 ± 2,22 ^a	16,34 ± 2,06 ^a	27,79 ± 2,08 ^a	19,66 ± 2,95 ^a
Yağ	78,71 ± 9,32 ^a	46,71 ± 6,19 ^a	24,96 ± 2,39 ^a	15,98 ± 2,26 ^a	26,69 ± 2,60 ^a	19,64 ± 2,42 ^a
PYR	24,96 ± 2,69 ^e	17,24 ± 0,99 ^e	11,59 ± 1,36 ^d	6,13 ± 0,52 ^d	11,28 ± 1,33 ^d	6,86 ± 0,71 ^d
PYR + T₅₀	33,96 ± 3,45 ^d	25,22 ± 2,09 ^d	12,64 ± 1,50 ^d	6,74 ± 0,87 ^d	15,43 ± 1,35 ^c	8,14 ± 0,72 ^d
PYR + T₁₀₀	53,07 ± 5,97 ^c	30,98 ± 2,47 ^c	16,01 ± 1,65 ^c	10,09 ± 1,21 ^c	17,51 ± 1,98 ^c	12,54 ± 2,69 ^c
PYR + T₂₀₀	67,65 ± 7,68 ^b	37,40 ± 3,70 ^b	19,76 ± 1,08 ^b	13,35 ± 1,78 ^b	21,19 ± 2,79 ^b	15,87 ± 2,36 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=8

^{a,b,c,d,e}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$).

Çizelge 3.3. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/μg protein)	Böbrek (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Testis (U/μg protein)
Kontrol	17,96 ± 3,20 ^a	4,10 ± 0,56 ^a	3,37 ± 0,73 ^a	1,96 ± 0,64 ^a	2,66 ± 0,49 ^a	2,54 ± 0,20 ^a
Yağ	16,60 ± 3,73 ^a	3,85 ± 0,57 ^a	3,14 ± 0,57 ^{ab}	1,90 ± 0,55 ^a	2,66 ± 0,43 ^a	2,56 ± 0,12 ^a
PYR	6,97 ± 0,83 ^d	0,44 ± 0,06 ^d	1,52 ± 0,24 ^c	0,40 ± 0,11 ^d	0,50 ± 0,08 ^d	0,35 ± 0,05 ^e
PYR + T₅₀	10,30 ± 1,36 ^c	1,39 ± 0,58 ^c	1,61 ± 0,23 ^c	0,93 ± 0,27 ^c	0,84 ± 0,08 ^d	0,80 ± 0,09 ^d
PYR + T₁₀₀	13,19 ± 2,03 ^{bc}	1,97 ± 0,63 ^c	1,94 ± 0,53 ^c	1,14 ± 0,42 ^{bc}	1,46 ± 0,29 ^c	1,29 ± 0,13 ^c
PYR + T₂₀₀	15,48 ± 2,61 ^{ab}	2,83 ± 0,38 ^b	2,67 ± 0,75 ^b	1,63 ± 0,47 ^{ab}	2,10 ± 0,46 ^b	1,55 ± 0,29 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=8

^{a,b,c,d,e}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.001$).

Çizelge 3.4. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve pyraclostrobin ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) tam kan, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokularında katalaz (CAT) aktiviteleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/μg protein)	Böbrek (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Testis (U/μg protein)
Kontrol	20,32 ± 3,82 ^a	6,14 ± 0,71 ^a	5,23 ± 0,84 ^a	1,41 ± 0,40 ^a	2,29 ± 1,07 ^a	1,38 ± 0,30 ^a
Yağ	19,95 ± 3,97 ^a	5,91 ± 0,43 ^a	5,20 ± 0,81 ^a	1,38 ± 0,25 ^a	2,29 ± 1,14 ^a	1,28 ± 0,14 ^a
PYR	4,87 ± 0,94 ^c	0,76 ± 0,11 ^d	0,77 ± 0,11 ^e	0,30 ± 0,05 ^d	0,41 ± 0,02 ^c	0,32 ± 0,07 ^e
PYR + T₅₀	7,73 ± 1,64 ^c	1,09 ± 0,14 ^d	1,06 ± 0,39 ^{de}	0,65 ± 0,06 ^c	1,07 ± 0,19 ^{bc}	0,50 ± 0,05 ^d
PYR + T₁₀₀	12,7 ± 2,62 ^b	1,66 ± 0,37 ^c	1,51 ± 0,41 ^c	0,81 ± 0,04 ^c	1,27 ± 0,19 ^b	0,82 ± 0,08 ^c
PYR + T₂₀₀	14,81 ± 3,69 ^b	3,14 ± 0,50 ^b	2,51 ± 0,33 ^b	1,00 ± 0,17 ^b	1,36 ± 0,20 ^b	1,05 ± 0,09 ^b

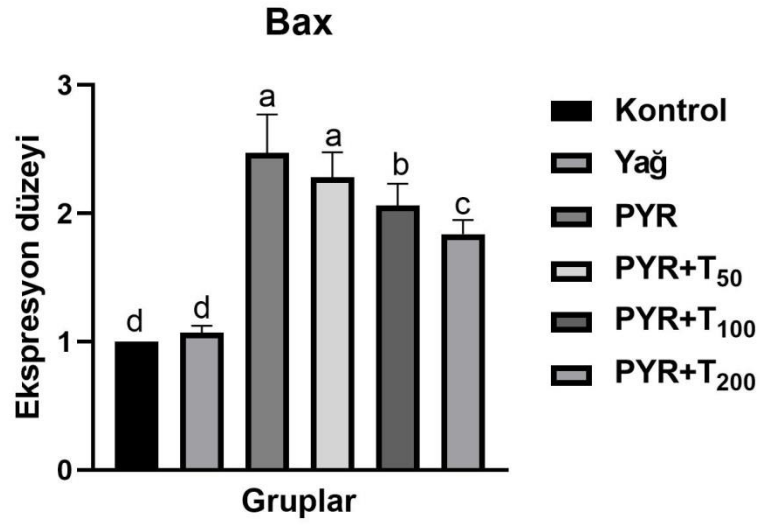
Ortalama ± standart sapma; n=8

a,b,c,d,e: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$).

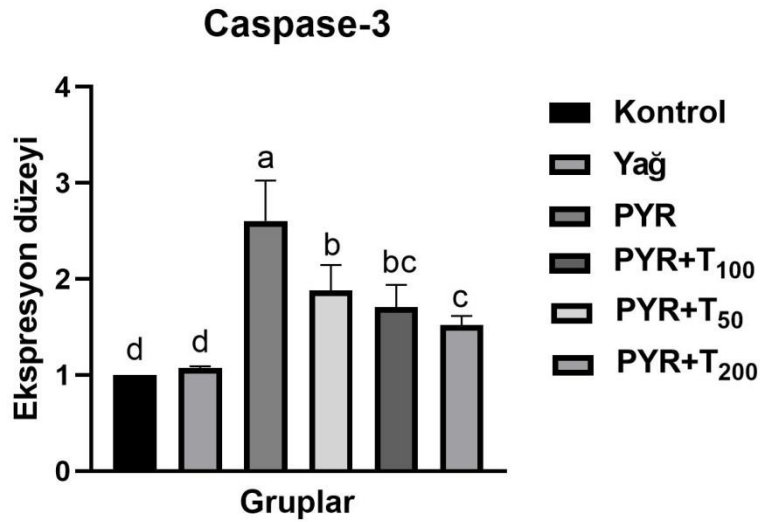
3.4. Antinflatuvar ve Apoptotik Gen Ekspresyonları ile DNA Kırılımı Üzerine Pyraclostrobin ve Taurinin Etkisi

Pyraclostrobin uygulaması sonucunda sıçanların karaciğer dokusunda apoptotik gen ekspresyonlarından *Bax* (Şekil 3.6), *Caspase 3* (Şekil 3.7), *Caspase 8* (Şekil 3.8), *Caspase 9* (Şekil 3.9) ve *p53* (Şekil 3.10) mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı ve buna karşın antiapoptotik gen olan *Bcl-2*'nin (Şekil 3.11) mRNA ekspresyonun azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). İnflamatuvar süreçte etkili genler olan *TNF- α* (Şekil 3.12) ve *NF κ B* (Şekil 3.13) ile birlikte biyotransformasyonda önemli role sahip *CYP2E1* (Şekil 3.14) mRNA ekspresyon düzeylerinin pyraclostrobin uygulaması ile arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Buna karşın pyraclostrobin uygulaması ile birlikte 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda taurin uygulamalarının pyraclostrobin ile uyarılan bu gen ekspresyonlarını düzenlediği tespit edildi. Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yağ grubundaki hayvanların karaciğer dokusunda bu genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde bir değişikliğin olmadığı da belirlendi.

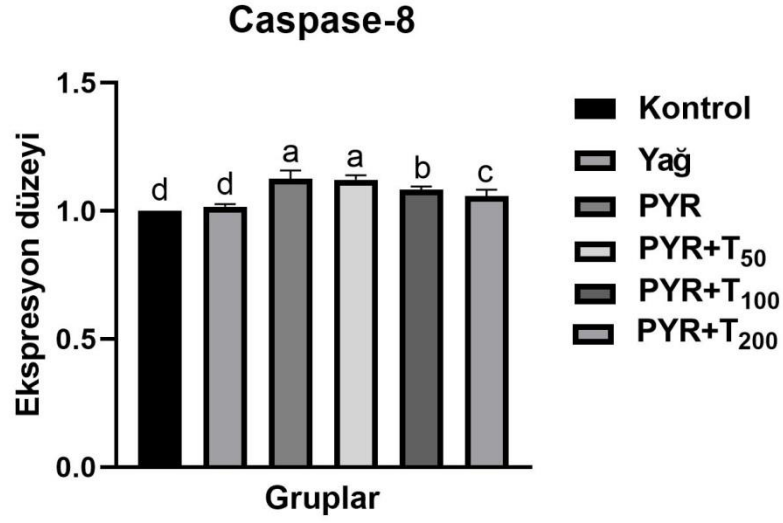
Çalışma sonunda hayvanlardan alınan kanlardan ssDNA düzeyi ng/ μ l olarak ölçüldü ve % olarak değerlendirildi (Şekil.3.15). Gruplar arasındaki en yüksek DNA kırılım hasarının pyraclostrobin uygulanan grupta olduğu, buna karşın 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarda uygulanan taurinin artan dozuna bağlı olarak (özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarında) pyraclostrobin ile gözlenen DNA kırılımını azalttığı gözlemlendi ($p<0.05$).



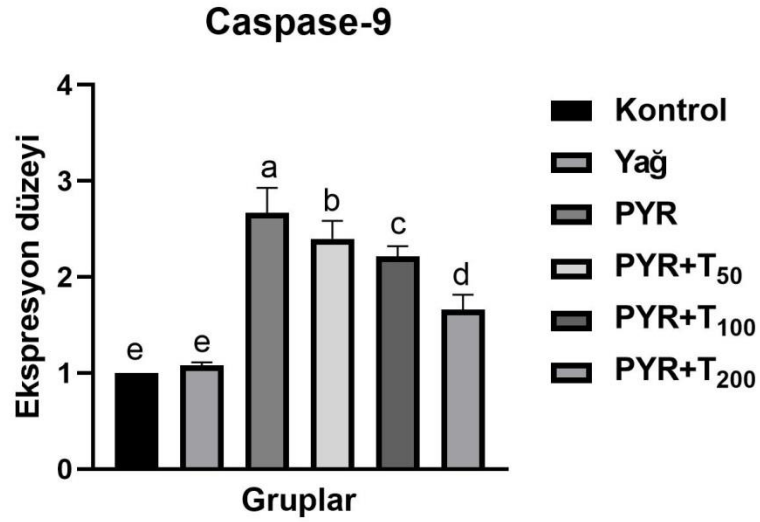
Şekil 3.6. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *Bax*'ın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



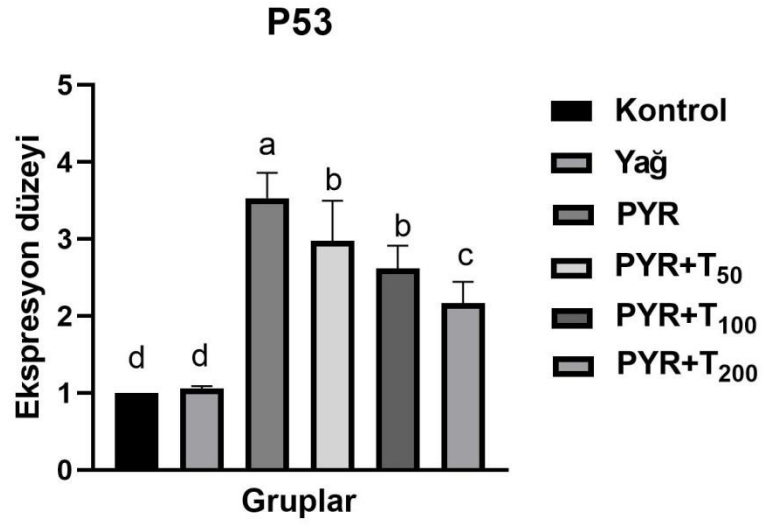
Şekil 3.7. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *Caspase-3*'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



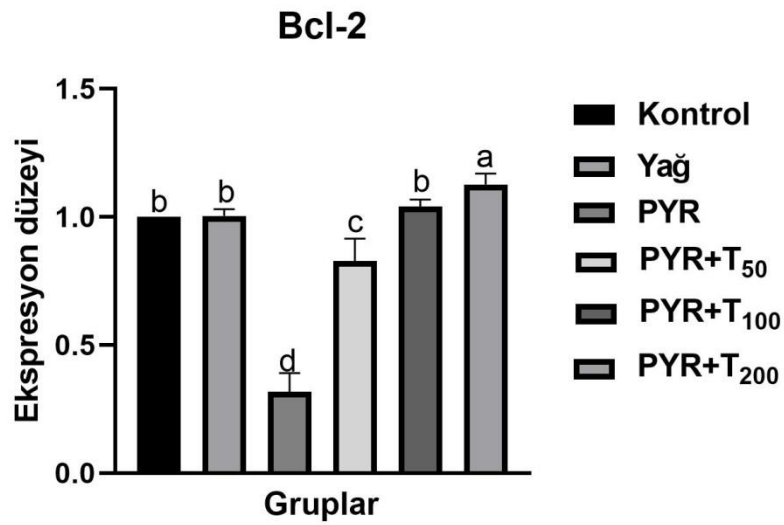
Şekil 3.8. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *Caspase-8*'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



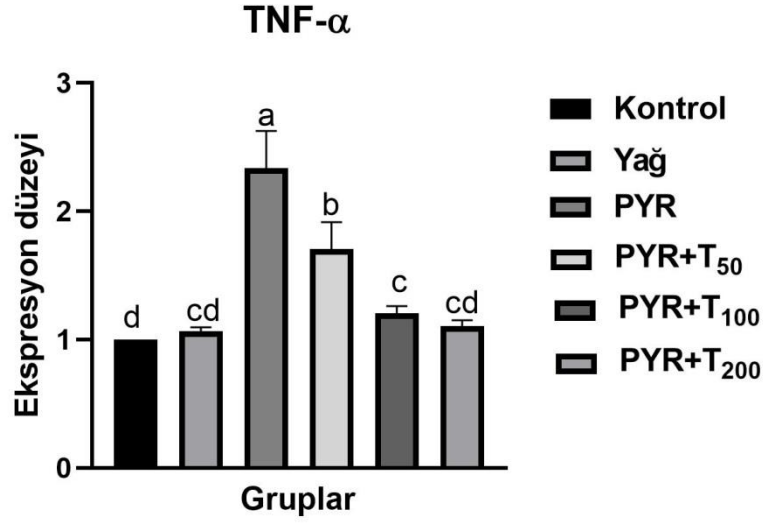
Şekil 3.9. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *Caspase-9*'un mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d,e}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



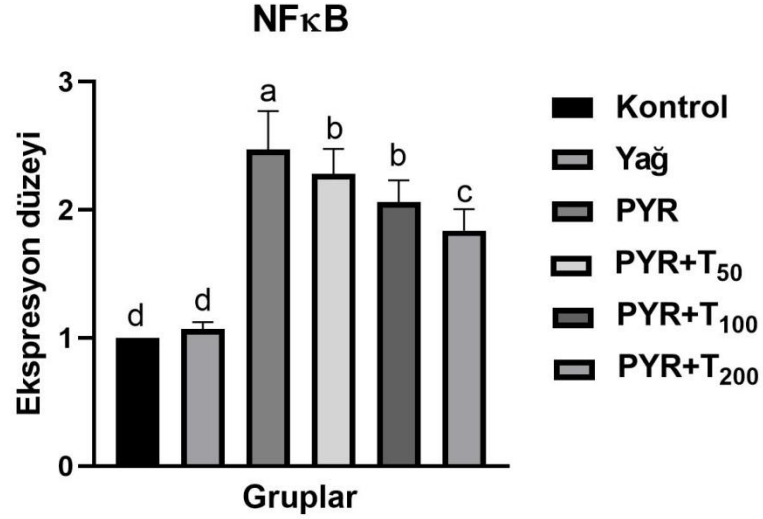
Şekil 3.10. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *p53*'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



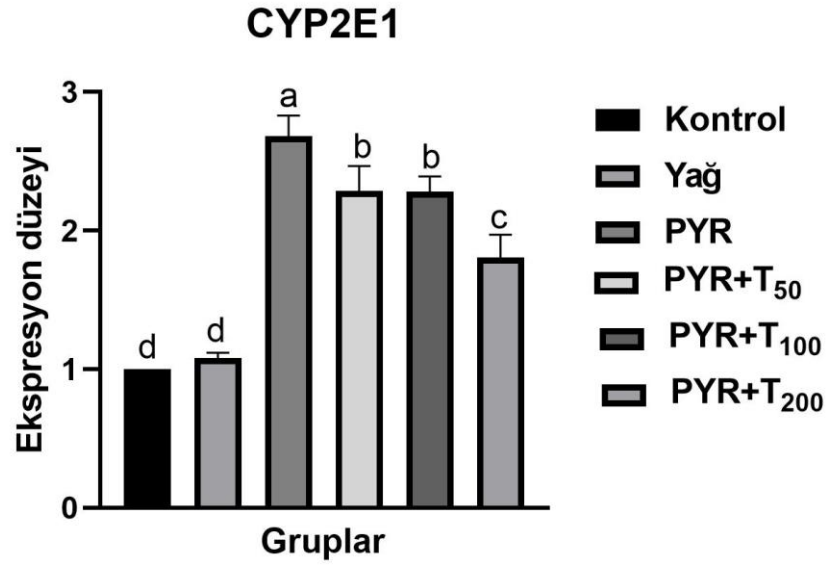
Şekil 3.11. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda Bcl-2'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



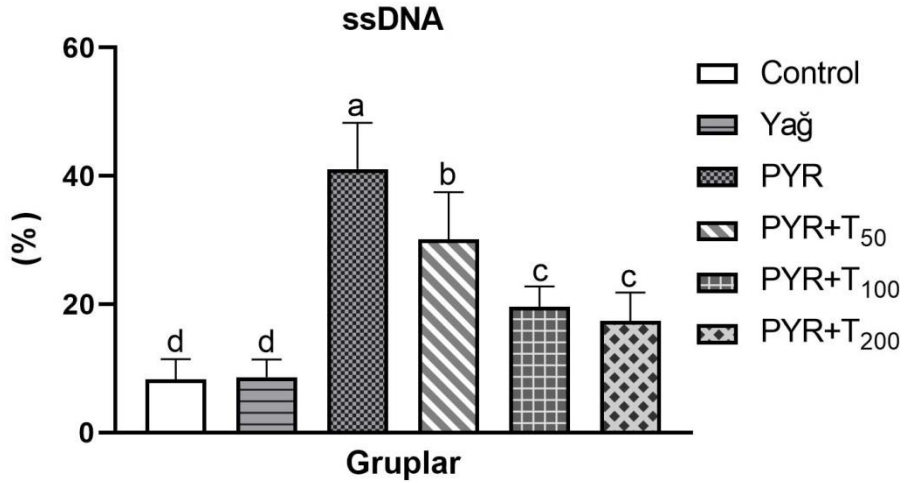
Şekil 3.12. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *TNF- α* 'nın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.001$).



Şekil 3.13. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *NF κ B*'ın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.001$).



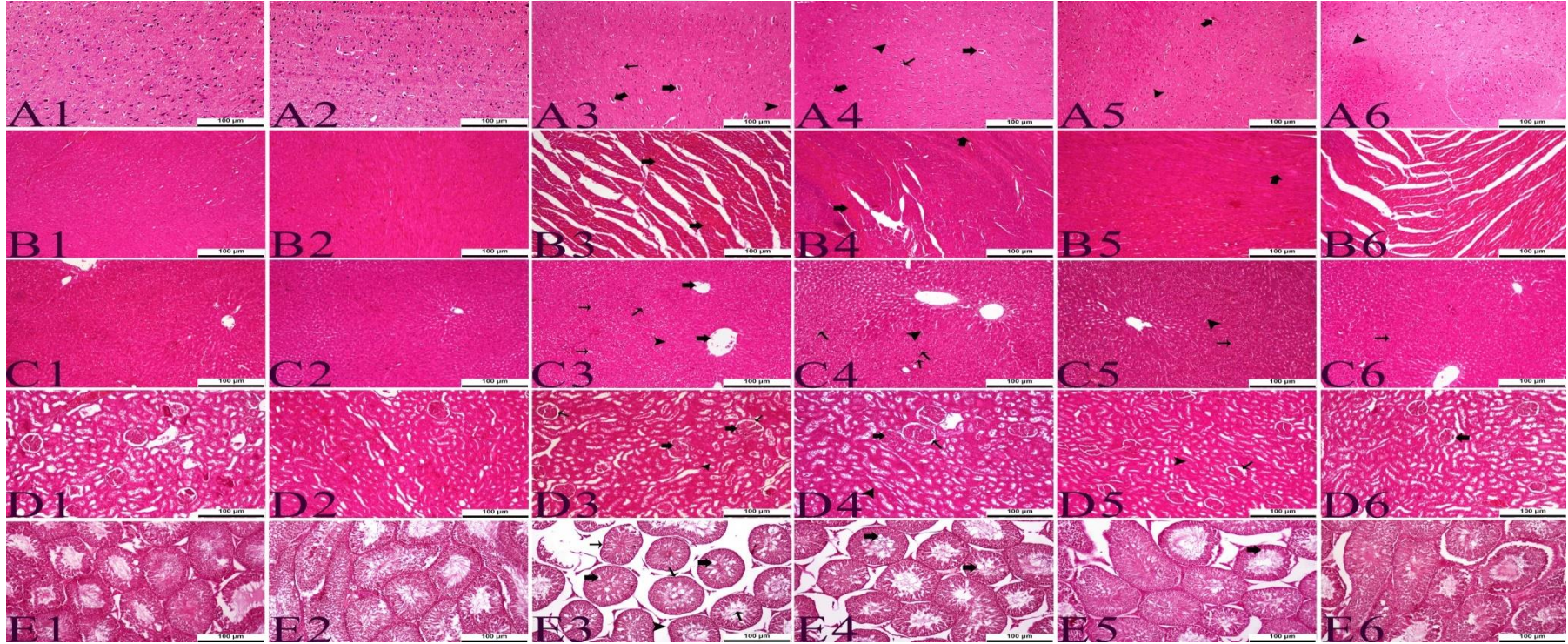
Şekil 3.14. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda *CYP2E1*'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.001$).



Şekil 3.15. Pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) sıçanların karaciğer dokusunda ssDNA düzeyleri üzerine etkisi. ^{a,b,c,d}: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.05$).

3.5. Dokulardaki Histopatolojik Değişiklikler

Sıçanların karaciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi Resim 3.1’te gösterildi. Pyraclostrobin verilen sıçanların dokularının histopatolojik incelemesinde, beyin dokusunda damarlarda hiperemi, nöronlarda vakuolizasyon oluşumları ve fokal glia hücre infiltrasyonu alanları, kalp dokusunda myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu alanları ve myokardda hafif hyalin dejenerasyonu, karaciğer dokusunda vena centralislerde hiperemi, perisentral bölgedeki hepatositlerde dejeneratif değişiklikler ve sinuzoidal dilatasyon, böbrek dokusunda glomeruluslarda vakuolizasyon oluşumları, tubuluslarda dejeneratif değişiklikler ve glomeruluslarda bowman boşluğunda genişleme, testis dokusunda tubulus seminoforus kontortus (TSK) lumeninde vakuolizasyon oluşumları, intersitisyel alanda spermatozoit yoğunluğunda azalma ve bazal membranında düzensiz görünümeler gözlemlendi. Pyraclostrobin ile birlikte, 50, 100 ve 200 mg/kg taurin uygulamalarının yapıldığı gruplarda ise bu değişimlerin artan taurin uygulamalarına bağlı olarak azaldığı belirlendi. Ayrıca yağ verilen gruptaki hayvanların dokularında herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmadı. Ayrıca Çizelge 3.5’te dokulardaki histopatolojik incelemenin istatistiksel değerlendirmesi gösterildi.



Resim 3.1.Pyraclastrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) ratların beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokuları üzerine etkisinin histopatolojik değerlendirmesi. A1. Kontrol, A2. Yağ, A3. PYR, A4. PYR+ T₅₀ mg/kg, A5. PYR+ T₁₀₀ mg/kg, A6. PYR+ T₂₀₀ mg/kg. Beyin dokusunda kalın ok: Damarlarda hiperemi, ince ok: nöronlarda vakuolizasyon oluşumları; ok başı: fokal glia hücre infiltrasyonu alanları; kalp dokusunda ok: myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu alanları; karaciğer dokusunda kalın ok: vena centralislerde hiperemi, ince ok: perisentral bölgedeki hepatositlerde dejeneratif değişiklikler, ok başı: sinuzoidal dilatasyon; böbrek dokusunda kalın ok: glomeruluslarda vakuolizasyon oluşumları, ince ok: glomeruluslarda bowman boşluğunda genişleme, ok başı: tubuluslarda dejeneratif değişiklikler; testis dokusunda kalın ok: tubulus seminoforus kontortus (TSK) lumeninde vakuolizasyon oluşumları, ince ok: intersitisyel alanda spermatozoit yoğunluğunda azalma, ok başı: bazal membranda düzensiz görünüm oluşumlarını göstermektedir.

Çizelge 3.5. Erkek sıçanlara pyraclostrobin (PYR) ve PYR ile beraber 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokularındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi

Organ	Histopatolojik Bulgu	Kontrol	Yağ	PYR	PYR+T ₅₀	PYR+T ₁₀₀	PYR+T ₂₀₀	P değeri
Beyin	Damarlarda hiperemi	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	3,40±0,89 ^a	2,00±0,97 ^{ab}	1,13±0,76 ^b	0,93±0,49 ^b	0,002
	Fokal glia hücre infiltrasyonları	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	2,90±0,83 ^a	2,66±0,73 ^a	1,53±0,83 ^{ab}	0,76±0,32 ^b	0,001
	Nöronlarda vakuolizasyon oluşumları	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	2,56±0,40 ^a	2,00±0,27 ^a	1,13±0,41 ^b	0,80±0,36 ^b	0,000
Kalp	Hiyalin dejenerasyonu	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,90±0,54 ^a	2,60±0,86 ^{ab}	1,86±0,77 ^{bc}	0,70±0,36 ^c	0,001
Karaciğer	Sinuzoidal dilatasyon	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	4,06±0,51 ^a	2,66±0,92 ^b	1,86±0,83 ^{bc}	0,46±0,12 ^c	0,000
	Vena sentralislerde hiperemi	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,56±0,98 ^a	2,00±0,27 ^b	1,86±0,97 ^b	0,46±0,12 ^c	0,000
	Hepatositlerde dejenerasyon	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,56±0,75 ^a	2,16±0,83 ^b	1,53±0,53 ^b	0,49±0,13 ^c	0,000
Böbrek	Glomeruluslarda bowman boşluğunda genişleme	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	2,90±0,54 ^a	2,00±0,47 ^{ab}	1,30±0,31 ^b	0,36±0,12 ^c	0,000
	Glomeruluslarda vakuolizasyon	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,40±0,69 ^a	1,60±0,43 ^b	1,03±0,28 ^b	0,56±0,18 ^c	0,000
	Tubuluslarda dejeneratif değişiklikler	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,06±1,03 ^a	2,06±0,53 ^a	0,96±0,43 ^b	0,56±0,18 ^c	0,001
Testis	TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	2,73±0,51 ^a	2,11±0,95 ^{ab}	1,20±0,61 ^{bc}	0,63±0,31 ^c	0,000
	TSK Bazal membranında düzensiz görünüm	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	2,73±0,81 ^a	2,00±0,82 ^{ab}	1,15±0,51 ^{bc}	0,46±0,22 ^c	0,000
	TSK lumeninde spermatozit yoğunluğunda azalma	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	3,23±0,98 ^a	2,00±0,97 ^{ab}	1,46±0,27 ^b	0,70±0,36 ^c	0,002

Ortalama ± standart sapma (n=8). ^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir.

4. TARTIŞMA

Strobilurin fungusitler karaciğer üzerinde toksik etki göstermekte ve karaciğer fonksiyonlarını gösteren AST, ALT, ve ALP parametreleri ile böbrek fonksiyonlarını gösteren BUN ve kreatinin düzeylerinde artış meydana getirmektedir (Ziada vd, 2020; Zemheri vd., 2021). Yapılan bir çalışmada 117.25 mg/kg azoksisitrobulinin 14 gün boyunca sıçanlara verilmesi sonucu serum ALT, AST, ALP, BUN ve kreatinin değerlerinin yükseldiği, buna karşın aynı süre içerisinde susam yağı (5 ml/kg) verilmesinin bu değerleri azalttığı bildirilmiştir (Ziada vd., 2020). Zemheri vd (2021) ise sıçanlara 30 gün süresince 30 mg/kg pyraclostrobin uygulamaları sonucu serum AST, ALT ve ALP değerlerinin yükseldiğini ve koruyucu amaçla verdikleri 10 ve 20 mg/kg dozlarda resveratrol ile bu değerlerin azaldığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada pyraclostrobin uygulamasının AST, ALT, ALP, BUN ve kreatinin değerlerini artırdığı buna karşın artan dozlarına bağlı taurin uygulamalarının ise bu değerleri azalttığı belirlendi. Bu durum pyraclostrobinin karaciğerdeki normal metabolik süreçleri ve böbrek fonksiyonlarını bozmaları sonucu bu parametrelerin artmasına neden olduğunu, taurininde antioksidan ve hücre koruyucu etkisinden dolayı (Goodman vd., 1985; Ince vd., 2017) karaciğer ve böbrek üzerinde koruyucu etki yaparak pyraclostrobinin olumsuz etkisini azalttığını göstermiştir.

Hücrelerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$ veya $\cdot\text{OH}$ radikalleri tarafından oksidasyonu, lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar ve bunların enzimatik veya kimyasal bozunması MDA oluşumuna neden olur (Cheng vd, 2011). GSH ve ilgili enzimatik sistemler (SOD ve CAT gibi) ise lipid peroksitlerin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli fayda sağlarlar. Pyraclostrobinin 30 mg/kg dozda 30 gün süresince sıçanlara uygulanması sonucu kan, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinin yükseldiği, GSH düzeylerinin azaldığı, buna ilaveten SOD ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca pyraclostrobin uygulaması ile birlikte verilen resveratrol uygulamalarının (10 ve 20 mg/kg) ise bu değerleri tersine çevirdiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda bu durumun resveratrolün antioksidan etkisine bağlı olarak lipid peroksidasyonu engellediği ve antioksidan

sistem üzerinde etkin rol oynadığı ifade edilmiştir (Zemheri vd., 2021). Yapılan bir diğer çalışmada sitrobulin bir fungusid olan azoksisitrobulinin (117,25 mg/kg) 14 gün boyunca 5 ml/kg dozda susam yağı ile birlikte verilmesiyle, plazma MDA değerlerinin arttığı ve plazma GSH değerlerinin ise azaldığı buna karşın verilen susam yağının ise bu değerleri azalttığı vurgulanmıştır. Çalışmada fungusitlerin ksantin oksidazın aktivitesinin zayıflamasına ve lipid peroksidasyonundaki ana serbest radikaller olan süperoksit anyonu ve hidroksil radikalının üretilmesine neden olduğu ve susam yağının ise antioksidan etkisi ile koruyucu etki sergilediği belirtilmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra sitrobulin fungusidlerden olan trifloksisitrobinin soluncanlarda MDA düzeyini artırdığı, GSH düzeyi ile SOD ve CAT aktivitelerini azalttığı (Wu vd., 2021), azoksisitrobulin uygulanan çivil balıklarında lipid peroksidasyonun arttığı ve SOD aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Crupkin vd., 2021). Bu çalışmalara uyumlu olarak, yapılan çalışmada pyraclostrobinin sıçanların dokularında MDA düzeylerini artırdığı, GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktivitelerini azalttığı, taurin uygulamaları (özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarda) ile bu düzeylerin normale doğru yaklaştığı belirlendi. Bu durum taurinin antioksidan etkisine bağlı olarak (Goodman vd., 2009; Ince vd., 2017) pyraclostrobin ile indüklenen lipid peroksidasyonu azalttığını ve antioksidan enzim aktivitelerini iyileştirdiğini göstermektedir.

En yaygın kullanılan fungusitlerden olan strobilurinlerin canlılar üzerinde özellikle bazı suda yaşayan organizmalar için oldukça toksik olduğu bildirilmektedir (Liu vd., 2013). Zebra balığı embriyoları üzerinde strobilurinlerin toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, döllenmeden 96 saat sonra embriyoların çeşitli konsantrasyonlarda üç strobiline (pyraclostrobin, trifloxystrobin ve picoxystrobin) maruz bırakılmaları ile antioksidan sistemle (*SOD*, *CAT*, *Nrf2*, *Ucp2* ve *Bcl-2*) ve bağışıklık sistemi ile ilgili (*TNF-α*, *IL-1b*, *IL-8* ve *C1C*'in) genlerin mRNA seviyelerinin farklı değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir (Li vd., 2018). Benzer şekilde zebra balık larvaları üzerinde strobilurinlerin toksik etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, pyraclostrobin (0,1, 10 ve 100 µg/l) uygulamalarının *Bax*, *Caspase-9* ve *p53*'ün nispi ifadesinde önemli bir artış meydana getirdiği ifade edilmiştir (Kumar vd., 2020). Bununla birlikte strobilurinlerin toksisitesinin ve potansiyel

mekanizmalarının karşılaştırılması üzerine yapılan *in vivo* çalışmaların çok sınırlı kaldığı görülmektedir. Yapılan bir *in vivo* çalışmada 30 gün süreyle 30 mg/kg pyraclostrobin verilen sıçanların karaciğer *Bax*, *CYP2E1*, *Caspase-3*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, *p53*, *NFκB* ve *TNF-α* mRNA ekspresyonlarının yukarı regüle olduğu *Bcl-2* mRNA ekspresyonunun ise aşağı regüle olduğu bildirilmiştir. Ancak, pyraclostrobin ile birlikte 10 ve 20 mg/kg resveratrol uygulamalarının ise bu genlerin ifade düzeylerini tersine çevirdiği rapor edilmiştir (Zemheri vd., 2021). Benzer şekilde yapılan bu *in vivo* çalışmada da artan dozlarda verilen taurin uygulamalarının pyraclostrobin ile indüklenen karaciğer *Bax*, *CYP2E1*, *Caspase-3*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, *p53*, *NFκB* ve *TNF-α* mRNA ekspresyonlarını aşağı regüle ettiği, *Bcl-2* mRNA ekspresyonunu ise yukarı regüle ettiği belirlendi. Bu durum taurinin karaciğer üzerinde mitokondriyal sinyal yolu indüklenen hepatositlerin aşırı apoptozunu engelleyerek (antiapoptotik etki), indüklenen yangısal süreci azaltarak (antiinflamatuvar) ve artan *CYP2E1* aktivitesini azaltarak oksidan stresi engellediğini göstermiştir.

Yapılan bir *in vitro* çalışmada, RAW264.7 makrofajlarda pyraclostrobin uygulamasının (10, 20, 40 ve 80 µmol/l, 6 saat süreyle) alkali koşullar altında doza bağlı bir şekilde kuyruklu yıldızların başlarından serbest kalan geniş DNA iplikçik kırılmalarına neden olarak makrofaj hücrelerinde DNA hasarını şekillendirdiği belirtilmiştir (Han vd., 2021). Yapılan bir *in vivo* çalışmada da pyraclostrobin (30 mg/kg, 30 gün) uygulaması sonucu ssDNA kırıklarının oluştuğu ve DNA hasarının şekillendiği ifade edilmiştir (Zemheri vd., 2021). Tavşanlarda yüksek diyetle alınan taurinin sol ana koroner arterde apoptoz ve ateroskleroz üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, arterojenik diyetle beslenen tavşanlarda diyet sonucu oluşan ssDNA kırıklarının taurin verilmesiyle azaldığı ve koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Zulli vd., 2011). Yapılan çalışmada da pyraclostrobinin DNA kırıklarının oluşumuna neden olarak ssDNA miktarında artış yaptığı, buna karşın taurin uygulaması ile DNA kırıklarının azaldığı belirlendi. Bu durum taurinin pyraclostrobin ile indüklenen DNA hasarını azaltıcı etki yaptığını göstermektedir.

Sitrobilirin fungusid olan pyraoxystrobinin sıçanlarda doku dağılımının araştırıldığı bir çalışmada, 500 ve 1000 mg/kg dozlarında pyraoxystrobin tek oral uygulamasıyla çoğu dokuda doruk konsantrasyon süresinin karaciğer, dalak ve akciğer hariç 28 saatte ortaya çıktığı bildirilmiştir. Pyraoxystrobin konsantrasyonunda gözlemlenen dağılım sonucunun kalp> karaciğer> böbrek> beyin> dalak> akciğer> kas> testis olarak şekillendiği ve esas olarak kalp, karaciğer ve böbrek gibi bol miktarda kan sağlayan dokularda dağıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, beyinde pyraoxystrobinin de tespit edildiği ve böylelikle kan-beyin bariyerini geçebileceği belirtilmiştir. Yine pyraoxystrobinin tek oral uygulaması ile de testiste bulunduğu ve bu durumunda bileşiğin lipidde çözünür özellikleri ve küçük moleküler kütlesi nedeniyle testis bariyerinden geçtiği öne sürülmüştür (Lin vd., 2015). Pyraclostrobinin dokularda yaptığı histopatolojik değişimlere ait az sayıda çalışma bulunmaktadır. Zemheri vd. (2021) yaptıkları çalışmada, pyraclostrobin uygulanan ratlarda karaciğer dokusunda perisentral bölgelerdeki hepatositlerde dejeneratif değişiklikler ve binükleer hepatosit oluşumlarının arttığını, böbreklerde glomerüllerde vakuolizasyon oluşumlarının, tübüler epitel hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin oluştuğunu, koruyucu amaçla verilen 10 ve 20 mg/kg resveratrol uygulanan gruplarda ise doz artışına bağlı olarak bu değişikliklerin azaldığını rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra pyraclostrobinin özellikle balıklarda (Huang vd., 2021), ve arılarda da (da Costa Domingues vd., 2020) organ toksisitelerine neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada pyraclostrobinin ratların beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokularında organ fonksiyonlarını etkileyebilecek histopatolojik değişiklikler yaptığı, buna karşın artan dozlarına bağlı olarak taurinin antioksidan ve hücre koruyucu etkileri (Goodman vd., 2009; Ince vd., 2017) ile bu değişimleri azalttığı belirlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada pyraclostrobin verilen sıçanlarda bazı biyokimyasal parametre düzeylerinin (AST, ALT, ALP, BUN ve kreatinin), lipid peroksidasyonun, DNA kırıklarının ve proinflamatuvar, apoptotik ve CYP2E1 gen ekspresyon seviyelerinin arttığı, GSH ile antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve karaciğer, beyin, böbrek, testis ve kalp dokusunda hasara ilişkin histopatolojik değişikliklerin olduğu belirlendi. Buna karşın, 50, 100 ve 200 mg/kg dozda taurin uygulamalarının ise pyraclostrobin ile görülen olumsuz değişiklikleri azalttığı tespit edildi. Sonuçta taurinin pyraclostrobin ile indüklenen oksidatif hasara karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi ile birlikte sitoprotektif etki gösterdiği ortaya çıkarıldı. Bu açıdan bakıldığında, özellikle taurin takviyesinin insan ve hayvan sağlığı açısından strobilurinler başta olmak üzere oksidatif hasara neden olan fungusid maruziyetine karşı potansiyel koruyucu etkisinin olabileceği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada pyraclostrobin ve diğer strobilurinlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı taurinin koruyucu etkisinin belirlenmesi literatüre ilave bilgilerin girmesine olanak sağlamış ve ayrıca bunlardan kaynaklı oluşabilecek olumsuz etkilerin azaltılmasında taurinin kullanılabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Anand, P., Rajakumar, D., Jeraud, M., Felix, A.J., Balasubram, T. (2011). Effects of taurine on glutathione peroxidase, glutathione reductase and reduced glutathione levels in rats. *Pak J Biol Sci*, 14: 219-225.
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., Schramm, G. (1977). The strobilurins new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *J Antibiotics*, 30 (10): 806–810.
- Anke, T., Schramm, G., Schwalge, B., Steffan, B., Steglich, W. (1984). Antibiotics from basidiomycetes, XX. Synthesis of strobilurin A and revision of the stereochemistry of natural strobilurins. *Liebigs Annalen Der Chemie*, 9: 1616–1625.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J*, 256: 251-255.
- Bai, J., Yao, X., Jiang, L., Zhang, Q., Guan, H., Liu, S., Wu, W., Qiu, T., Gao, N., Yang, L., Yang, G. and Sun, X. (2016). Taurine protects against As₂O₃-induced autophagy in livers of rat offsprings through PPAR γ pathway. *Sci Rep*, 6: 27733.
- Balba, H. (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals, *J Environ Sci Health B*, 42:4, 441-451.
- Bartholomaeus, A. (2003). Pyraclostrobin pesticide residues in food. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Eriřim: <https://inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2003pr10.htm#bio>. Eriřim tarihi: 13.01.2022
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61: 882–888.
- Birk, B., Lutz, T., Doebbe, A. (2014). Further investigations of metabolites in rat plasma samples after dosing with ¹⁴C-pyraclostrobin. *Unpublished report*. BASF SE, Limburgerhof, Germany. BASF document ID 2014/1315930. Submitted to WHO by BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Brandt, U., Haase, U., Schaegger, H., von Jagow, G. (1993). Species specificity and mechanism of action of strobilurins. *Dechema Monog*, 129: 27–38.
- Cash, H., Cronan Jr., J. M. (2001). Strobilurin fungicides for aqueous systems. *US Patent Appl.* WO2001-US964920010323.
- Chan, C. Y., Sun, H. S., Shah, S. M., Agovic, M. S., Ho, I., Friedman, E. and Banerjee, S. P. (2013). Direct interaction of taurine with the NMDA glutamate receptor subtype via multiple mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 775: 45-52.
- Cheng, J., Wang, F., Yu, D. F., Wu, P. F., and Chen, J. G. (2011). The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial

- dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *Eur J Pharmacol*, 650(1): 184-194.
- Chiang, JY. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol*, 3: 1191-212.
- Cozzi, R., Ricordy, R., Bartolini, F., Ramadori, L., Perticone, P. and De Salvia, R. (1995) Taurine and ellagic acid: Two differently-acting natural antioxidants. *Environ Mol Mutagen*, 26: 248-254.
- Crupkin, A. C., Fulvi, A. B., Iturburu, F. G., Medici, S., Mendieta, J., Panzeri, A. M. and Menone, M. L. (2021). Evaluation of hematological parameters, oxidative stress and DNA damage in the cichlid *Australoheros facetus* exposed to the fungicide azoxystrobin. *Ecotoxicol Environ Saf*, 207: 111286.
- Da Costa Domingues, C. E., Inoue, L. V. B., da Silva-Zacarin, E. C. M. and Malaspina, O. (2020). Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 206: 111395.
- Drabkin, D.L., Austin, J.H. (1935). Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed 112, blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem*, 51–65.
- Draper, H.H., Hardley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186:421–431.
- El Idrissi, A., L'Amoreaux, W. J. (2008). Selective resistance of taurine- fed mice to isoniazide-potentiated seizures: in vivo functional test for the activity of glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience*, 156: 693-699.
- Fabian, E., Landsiedel, R. (2013). 14C-Reg. No. 298327 (metabolite of BAS 500 F, pyraclostrobin) – study on the kinetics in mice. Unpublished report. BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany. BASF document ID 2012/1278425. Submitted to WHO by BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Funk, D., Bellwon, P. (2016a). Influence of WWL229 on the in-vitro metabolism of 14C-BAS 500 F with human hepatocytes and human liver cytosol. Unpublished report. BASF SE, Limburgerhof, Germany. BASF document ID 2016/1225031. Submitted to WHO by BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Funk, D., Bellwon, P. (2016b). Metabolisation of 14C-BAS 500 F in rat serum. Unpublished report. BASF SE, Limburgerhof, Germany. BASF document ID 2016/1225032. Submitted to WHO by BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Funk, D., Glaessgen, W.E., Kalyon, B. (2014). Comparative in-vitro metabolism with 14C-BAS 500 F. Unpublished report. BASF SE, Limburgerhof, Germany. BASF document ID 2014/1001562. Submitted to WHO by BASF AG, Ludwigshafen/Rhein, Germany.

- Gamer, A.O., Hoffmann, H.D. (1997). BAS 500 F—Acute inhalation toxicity study in Wistar rats 4 hour liquid aerosol exposure (Project No. 13I0308/967028). Unpublished report No. 97/11472 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Gamer, A.O., Leibold, E., Hoffmann, H.D. (2001). BAS 500 F 40% in Solvesso (technical active ingredient) acute inhalation toxicity study in Wistar rats 4 hour liquid aerosol exposure (Project No. 13/0283/01702). Unpublished report No. 2001/1010625 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, D-67056 Ludwigshafen, Germany.
- Gharibani, P., Modi, J., Menzie, J., Alexandrescu, A., Ma, Z., Tao, R., Prentice, H. and Wu, J. Y. (2015). Comparison between single and combined post-treatment with S-Methyl-N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide and taurine following transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Neuroscience*, 300: 460-473.
- Goodman, C.A., Horvath, D., Stathis, C., Mori, T., Croft, K., Murphy, R.M., Hayes, A. (1985). Taurine supplementation increases skeletal muscle force production and protects muscle function during and after high-frequency in vitro stimulation. *J Appl Physiol*, 107: 144-154.
- Gordon, R.E., Heller, R.F. Heller, R.F. (1992). Taurine protection of lungs in hamster models of oxidant injury: A morphologic time study of paraquat and bleomycin treatment. In: Taurine. Advances in Experimental Medicine and Biology. *Lombardini JB, Schaffer SW and Azuma J* (eds), 315: 319-328.
- Grossmann, N., Retzlaff, G. (1997). Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin Kreoxim-methyl on wheat (*Triticum aestivum*). *Pest Sci*, 50 (1): 11–20.
- Han, S., Lu, J., Gao, J., Cheng, J., Xu, W., Tao, L., Zhang, Y. (2021). Pyraclostrobin induced AMPK/mTOR pathways mediated autophagy in RAW264. 7 macrophages. *J Environ Sci Health B*, 56(9): 793-800.
- Howard, M., Fischer, H., Roux, J., Santos, B.C., Gullans, S.R., Yancey, P.H., Welch, W.J. (2003). Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem*, 278: 35159-35167.
- Hsieh, T.J., Zhang, S.L., Filep, J.G., Tang, S.S., Ingelfinger, J.R., Chan, J.S. (2002). High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*, 143: 2975-2985.
- Huang, X., Yang, S., Li, B., Wang, A., Li, H., Li, X., Mu, W. (2021). Comparative toxicity of multiple exposure routes of pyraclostrobin in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ*, 777: 145957.
- Huxtable, R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*, 72: 101-163.

- Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H. H., Varol, N., Ozyurek, H. A., Zemheri, F., Kucukkurt, I. (2017). Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomed Pharmacother*, 96: 263-268.
- Ito, T., Miyazaki, N., Schaffer, S., Azuma, J. (2015). Potential antiaging role of taurine via proper protein folding: a study from taurine transporter knockout mouse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 803: 481-487.
- Ito, T., Yoshikawa, N., Inui, T., Miyazaki, N., Schaffer, S. W. and Azuma, J. (2014). Tissue depletion of taurine accelerates skeletal muscle senescence and leads to early death in mice. *PLoS ONE*, 9: e107409.
- Fulcher, J.M., Wayment, D.G., White Jr, P.M., Webber, C.L. (2014). III Pyraclostrobin wash-off from sugarcane leaves and aerobic dissipation in agricultural soil. *J Agric Food Chem*, 62: 2141-2146.
- Mercader, J.V., Suárez-Pantaleón, C., Agulló, C., A. Abad-Somovilla, A. (2008). Abad-Fuentes Production and characterization of monoclonal antibodies specific to the strobilurin pesticide pyraclostrobin. *J Agric Food Chem*, 56: 7682-7690.
- Jafri A.J.A., Agarwal, R., Iezhitsa, I., Agarwal, P., Ismail, N.M. (2019). Taurine protects against NMDA-induced retinal damage by reducing retinal oxidative stress. *Amino Acids*, 51: 641-646.
- Jewess, P., Lee, P., Nicholls, P., Plimmer, J. (1999). Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides. Roberts, T., Hutson, D., Eds., *Royal Soc of Chem*, Cambridge, UK.
- Jong, C.J., Azuma, J., Schaffer, S.W. (2011). Role of mitochondrial permeability transition in taurine deficiency-induced apoptosis. *Exp Clin Cardiol*, 16: 125-128.
- Jong C.J., Azuma, J., Schaffer, S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42(6): 2223-2232.
- Jong, C.J., Ito, T. and Schaffer, S. W. (2015). The ubiquitin-proteasome system and autophagy are defective in the taurine-deficient heart. *Amino Acids*, 47: 2609-2622.
- Junyent, F., Romero, R., De Lemos, L., Ultrera, J., Camins, A., Pallas, M. and Auladell, C. (2010). Taurine treatment inhibits CaMKII activity and modulates the presence of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin in the brain. *J Neurosci Res*, 88: 136-142.
- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics*, 3(1): 1-14.
- Kettle, A.J., van Dalen, C.J., Winterbourn, C.C. (1997). Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. *Redox Rep*, 3: 257-258.

- Kim, S.J., Lee, H.W., Gupta, R.C. (2008). Taurine, Bone growth and bone development. *Curr Nutr Food Sci*, 4: 135-144.
- Kim, C., Cha, Y. N. (2014). Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids*, 46: 89-100.
- Kumar, N., Willis, A., Satbhai, K., Ramalingam, L., Schmitt, C., Moustaid-Moussa, N. and Crago, J. (2020). Developmental toxicity in embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to strobilurin fungicides (azoxystrobin and pyraclostrobin). *Chemosphere*, 241, 124980.
- L'Amoreaux, W. J., Marsillo, A. and El Idrissi, A. (2010). Pharmacological characterization of GABAA receptors in taurine-fed mice. *J Biomed Sci*, 17, S14.
- Lang, F., Madlung, J., Uhlemann, A.C., Risler, T. and Gulbins, E. (1998) Cellular taurine release triggered by stimulation of the Fas(CD95) receptor in Jurkat lymphocytes. *Pflugers Arch*, 436: 377-383.
- Leibold, E., Hoffmann, H.D. and Hildebrand, B. (1998). 14C-BAS 500 F—study of the biokinetics in rats (Project No. 02B0364/966007). *Unpublished report* No. 98/10997 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany, 1 October 1998.
- Leroux, P. (1996). Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Sci*, 47 (2), 191–197.
- Li, H., Cao, F., Zhao, F., Yang, Y., Teng, M., Wang, C. and Qiu, L. (2018). Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 207, 781-790.
- Li, Y., Hu, Z., Chen, B., Bu, Q., Lu, W., Deng, Y., Zhu, R., Shao, X., Hou, J., Zaho, J., Li, H., Zhang, B., Huang, Y., Lv, L., Zhao, Y. And Cen, X. (2012). Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicol Lett*, 215: 1-7.
- Lien, Y.H., Shapiro, J.I. and Chan, L. (1990). Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest*, 85: 1427-1435.
- Lin, L. H., Duan, M. Y., Chen, G., You, X. H., Liu, C. L. and Guo, X. J. (2015). An LC-MS/MS method for determination of novel fungicide pyraoxystrobin in rat plasma and tissues: Toxicokinetics and tissue distribution study. *Talanta*, 136, 183-189.
- Liu, L., Jiang, C., Wu, Z. Q., Gong, Y. X. and Wang, G. X. (2013). Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Ecotoxicol Environ Saf*, 98: 297-302.

- Lombardini, J. B. (1996). Taurine depletion in the intact animal stimulates in vitro phosphorylation of an approximately 44-kDa protein present in the mitochondrial fraction of the rat heart. *J. Mol Cell Cardiol.*, 28: 1957-1961.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265–275.
- Marcinkiewicz, J., Kontny, E. (2014). Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*, 46: 7-20.
- Mellert, W. (2002a). BAS 500 F mechanistic study to determine the "acute reference dose" in B6C3F1 mice. Administration in the diet and by gavage. *Unpublished report* No. 2002/1011459 from BASF Anktiengesellschaft, *Experiment Toxicol Ecol*, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Mellert, W. (2002b). BAS 500 F Mechanistic study to determine the "acute reference dose" in Wistar rats. Administration in the diet and by gavage. *Unpublished report* No. 2002/1011458 from BASF Anktiengesellschaft, *Experiment Toxicol Ecol*, Ludwigshafen/Rhein, Germany.
- Mellert, W., Deckardt, K., Gembardt, C. and Hildebrand, B. (1999b). BAS 500 F—repeated dose oral toxicity study in Wistar rats, administration in the diet for 4 weeks (Project No. 30C0376/95083). *Unpublished report* No. 1999/11870 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany, 2 December 1999.
- Mellert, W., Deckardt, K., Gembardt, C., Pappritz, G., Hildebrand, B. (1999a). BAS 500 F—carcinogenicity study in Wistar rats, administration in the diet for 24 months (Project No. 82S0494/96086). *Unpublished report* No. 99/11868 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, D-67056 Ludwigshafen, Germany.
- Mellert, W., Kaufmann, W., Hildebrand, B. (1999c). BAS 500 F—subchronic oral neurotoxicity study in Wistar rats, administration in the diet for 3 months (Project No. 50C0494/96174). *Unpublished report* No. 1999/11329 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Menges, S., Schilling, K., Deckardt, K., Gembardt, C., Hildebrand, B. (1999) .BAS 500 F-subchronic oral toxicity study in beagle dogs, administration in the diet for 3 months (Project No. 31D0494/96089). *Unpublished report* No. 1999/11678 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Nonaka, H., Tsujino, T., Watari, Y., Emoto, N., Yokoyama, M. (2001). Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: Amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*, 104: 1165-1170.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95: 351–358.

- Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G.J., Liu, P., Sole, M.J., Backx, P.H. (2004). Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation*, 109: 1877-1885.
- Park, S.H., Lee, H., Park, K.K., Kim, H.W., Lee, D.H., Park, T. (2006). Taurine-induced changes in transcription profiling of metabolism- related genes in human hepatoma cells HepG2. *Adv Exp Med Biol*, 583: 119-128.
- Parvez, S., Tabassum, H., Banerjee, B.D., Raisuddin, S. (2008). Taurine prevents tamoxifen-induced mitochondrial oxidative damage in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102: 382-387.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29: 9.
- Prentice, H., Modi, J.P., Wu, J.Y. (2015). Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 964518.
- Ramila, K.C., Jong, C.J., Pastukh, V., Ito, T., Azuma, J., Schaffer, S. W. (2015). Role of protein phosphorylation in excitation-contraction coupling in taurine deficient hearts. *Am J Physiol*, 308: 232- 239.
- Ricci, C., Pastukh, V., Leonard, J., Turrens, J., Wilson, G., Schaffer, D. Schaffer, S.W. (2008). Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: 413-422.
- Rikimaru, M., Ohsawa, Y., Wolf, A. M., Ichimiya, H., Kamimura, N., Nishimatsu, S., Ohta, S. Sunada, Y. (2012). Taurine ameliorates impaired mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med*, 51: 3351-3357.
- Sarsour, E.H., Kumar, M.G., Chaudhuri, L., Kalen, A.L. Goswami, P.C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 11: 2985-3011.
- Sauter, H., Steglich, W., Anke, T. (1999). Strobilurins: Evolution of A New Class of Active Substances. *Angewandte Chemie, International Edition, Wiley*, 38 (10): 1329–1349.
- Schaffer, S., Takahashi, K., Azuma, J. (2000). Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*, 19: 527-546.
- Schaffer, S. W., Jong, C. J., Ito, T. and Azuma, J. (2014). Effect of taurine on ischemia-reperfusion injury. *Amino Acids*, 46, 21-30.
- Schaffer, S. W., Shimada-Takaura, K., Jong, C. J., Ito, T. and Takahashi, K. (2016). Impaired energy metabolism of the taurine-deficient heart. *Amino Acids*, 48: 549-558.
- Schaffer, S. W., Solodushko, V. and Kakhniashvili, D. (2002). Beneficial effect of taurine depletion on osmotic sodium and calcium loading during chemical hypoxia. *Am J Physiol*, 282: C1113-C1120.

- Schilling, K., Gembardt, C. and Hildebrand, B. (1999a). BAS 500 F—two-generation reproduction toxicity study in Wistar rats, continuous dietary administration (Project No. 70R0494/96172). *Unpublished report* No. 1999/11869 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, D-67056 Ludwigshafen, Germany.
- Schilling, K., Hellwig, J. and Hildebrand, B. (1999b). BAS 500 F—prenatal developmental toxicity study in Wistar rats, oral administration (gavage) (Project No. 30R0494/96168). *Unpublished report* No. 1999/11511 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany, 25 October 1999.
- Schilling, K., Hellwig, J. and Hildebrand, B. (1999c). BAS 500 F—prenatal developmental toxicity study in Himalayan rabbits, oral administration (gavage) (Project No. 40R0494/96159). *Unpublished report* No. 1999/11512 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Schramm, G., Steglich, W., Anke, T., Oberwinkler, F. (1978). Antibiotics from basidiomycetes, III. Strobilurin A and B, antifungal metabolites from *Strobilurus tenacellus*. *Chem Ber*, 111 (8): 2779–2784.
- Schuller-Levis, G. and Park, E. (2006). Is taurine a biomarker? *Adv Clin Chem*, 41: 1-21.
- Sener, G., Ozer Sehirli, A., Ipçi, Y., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N. and Alican, I. (2005). Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam Clin Pharmacol*, 155-164.
- Shetewy, A., Shimada-Takaura, K., Warner, D., Jong, C.J., Mehdi, A.B., Alexeyev, M., Takahashi, K. and Schaffer, S.W. (2016). Mitochondrial defects associated with β -alanine toxicity: Relevance to hyper-beta-alaninemia. *Mol Cell Biochem*, 416: 11-22.
- Sinha, A.K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem*, 47(2): 389-394.
- Sturman, J.A. and Chesney, R.W. (1995). Taurine in pediatric nutrition. *Pediatr Clin North Am*, 42: 879-897.
- Sun, Y., Oberley L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxidase dismutase. *Clin Chem*, 34: 497–500.
- Tiedemann, F. and Gmelin, L. (1827). Einige neue bestandtheile der galle des ochsen. *Ann Phys*, 85: 326-337.
- Timbrell, J.A., Seabra, V. and Waterfield, C.J. (1995). The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen Pharmacol*, 26: 453-462.
- Tuttle, A.H., Salazar, G., Cooper, E.M., Stapleton, H.M., Zylka, M.J. (2019). Choice of vehicle affects pyraclostrobin toxicity in mice. *Chemosphere*, 218: 501e506
- Vohra, B.P. and Hui, X. (2001). Taurine protects against carbon tetrachloride toxicity in the cultured neurons and in vivo. *Arch Physiol Biochem*, 109: 90-94.

- Von Jagow, G., Becker, W. F. (1982). Novel inhibitors of cytochrome b as a valuable tool for a closer study of oxidative phosphorylation. *Bull Mol Biol Med*, 7 (1-2): 1–16.
- Wang, X., Li, X., Wang, Y., Qin, Y., Yan, B. and Martyniuk, C. J. (2021). A comprehensive review of strobilurin fungicide toxicity in aquatic species: Emphasis on mode of action from the zebrafish model. *Environ Pol*, 116671.
- Wiemann, C. and Hellwig, J. (1998a). Study on the acute oral toxicity of BAS 500 F in rats (Project No. 10A0183/961058). *Unpublished report* No. 98/10965 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Wiemann, C. and Hellwig, J. (1998b). Study on the acute dermal toxicity of BAS 500 F in rats (Project No. 11A0308/961120). *Unpublished report* No. 98/10966 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M., Carrell, R.W. (1975). The estimation of red cell superoxide activity. *J Lab Clin Med*, 55: 337–341.
- Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D. and Wu, J. Y. (2005). Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res*, 1038: 123-131.
- Wu, R., Zhou, T., Wang, J., Wang, J., Du, Z., Li, B. and Zhu, L. (2021). Oxidative stress and DNA damage induced by trifloxystrobin on earthworms (*Eisenia fetida*) in two soils. *Sci Total Environ*, 797: 149004.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*, 208: 2819-2830.
- Ypema, H.L., Gold, R.E. (1998). Kresoxim-methyl: Modification of natural occurring compound to a new fungicide. *Plant Dis*, 83 (1): 4–17.
- Zakharychev, V.V., Kovalenko, L.V. (1998). Natural compounds of the strobilurin series and their synthetic analogs as cell respiration inhibitors. *Uspekhi Khimii (Russian)*, 67 (6): 595–605
- Zemheri Navruz, F., Ince, S., Arslan-Acaröz, D., Acaröz, U., Demirel, H.H., & Demırkapı, E.N. (2021). Resveratrol Alleviates Pyraclostrobin Induced Lipid Peroxidation, Oxidative Stress, and DNA Damage in Rats. *Research Square*, DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-920465/v1>.
- Ziada, R.M., Abdulrhman, S.M., Nahas, A.A. (2020). Hepato-nephro-toxicity Induced by Premium Fungicide and Protective Effect of Sesame Oil. *Egypt J Hos Med*, 81(7): 2445-2450.
- Zulli, A., Lau, E., Wijaya, B. P., Jin, X., Sutarga, K., Schwartz, G. D., ... Hare, D. L. (2009). High dietary taurine reduces apoptosis and atherosclerosis in the left main coronary artery: association with reduced CCAAT/enhancer binding protein homologous protein and total plasma homocysteine but not lipidemia. *Hypertension*, 53(6): 1017-1022

