

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Yusuf SEVGİLER**

***Oreochromis niloticus*'da KARACİĞER ve BÖBREK DOKULARINDA  
FENTHİONUN NAC ve BSO MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON  
METABOLİZMASINA OKSİDATİF ETKİLERİ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2007**

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

***Oreochromis niloticus*'da KARACIĞER ve BÖBREK DOKULARINDA  
FENTHİONUN NAC ve BSO MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON  
METABOLİZMASINA OKSİDATİF ETKİLERİ**

**Yusuf SEVGİLER**  
**DOKTORA TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu Tez / / 2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği / Oy  
Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

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

İmza .....	İmza .....
Yard.Doç.Dr. Mehmet SULANÇ	Yard.Doç.Dr. Özcan AY
ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod no:**

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

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

**Proje No: FEF2003D19**

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

## ÖZ

### DOKTORA TEZİ

#### ***Oreochromis niloticus*'da KARACİĞER ve BÖBREK DOKULARINDA FENTHİONUN NAC ve BSO MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON METABOLİZMASINA OKSİDATİF ETKİLERİ**

**Yusuf SEVGİLER**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman:** Prof.Dr. Nevin ÜNER

**Yıl** : 2007, **Sayfa:** 95

**Jüri** : Prof.Dr. Nevin ÜNER

Prof.Dr. Cahit ERDEM

Doç.Dr. Bedii CİCİK

Yard.Doç.Dr. Mehmet SULANÇ

Yard.Doç.Dr. Özcan AY

Bu çalışmada organofosforlu insektisid ve avisid fenthionun *Oreochromis niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında hücrel redoks durumuna etkilerinin ve bu süreçte GSH'nin rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla GSH modülatörleri olan bütinyonin sülfoksimin (BSO) ve *N*-asetilsisteinin (NAC) intraperitoneal uygulamalarında 24, 48 ve 96 saatlik etkilerde tGSH, GSH, GSSG ve MDA miktarları, GSH/GSSG oranı ile GPx, GR, GST ve  $\gamma$ -GT enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. 24, 48 ve 96 saat depurasyon uygulaması ile fenthion toksisitesindeki değişimler de incelenmiştir.

Etki sürecinde fenthion karaciğer dokusunda süreye bağımlı olarak tGSH ve GSSG miktarlarının azalmasına neden olurken GST aktivitesinin artmasına ve GPx aktivitesinin azalmasına yol açmıştır. BSO uygulaması tGSH, GSH ve GSSG miktarlarının azalmasına ve GSH/GSSG oranının ve GST ve  $\gamma$ -GT enzim aktivitelerinin artmasına neden olmuştur. Karaciğer dokusunda fenthion etkisiyle lipid peroksidasyonunda değişim saptanmazken, NAC uygulaması lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. Böbrek dokusunda etki sürecinde fenthion tGSH ve GSH miktarlarının ve GST aktivitesinin düşmesine neden olmuştur. BSO uygulaması karaciğer dokusunun aksine böbrek dokusunda tGSH ve GSH miktarlarının ve GST aktivitesinin yükselmesine yol açmıştır. NAC uygulaması böbrekte fenthionun GST azaltıcı etkisini baskılamıştır. Fenthion başlangıçta lipid peroksidasyonunun artmasına neden olurken NAC bu etkiyi baskılamış, BSO ise etkinin artmasına neden olmuştur. Depurasyon sürecinde karaciğer ve böbrek dokularında etki sürecinde meydana gelen tGSH ve GSH azalmaları devam etmiş ve lipid peroksidasyonunda artışlar meydana gelmiştir.

GST ve GPx enzim aktiviteleri ile tGSH ve GSH miktarları fenthion etkisinde indikatör parametreler olarak belirlenmiştir. BSO uygulaması ile fenthionun ve faz-I metabolitlerinin detoksifikasyonunda karaciğerde GST aracılıklı GSH konjugasyonunun önemli olduğu ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuştur. Kısa sürede toksisiteden korunmaya yardımcı olan NAC uzun sürede toksik etkilerin artışına neden olmaktadır. 96 saatlik depurasyon uygulaması fenthionun toksik etkilerinin giderilmesinde yeterli olmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fenthion, *N*-asetilsistein, Bütinyonin sülfoksimin, Glutatyon, Doku

## ABSTRACT

### Ph.D. THESIS

**OXIDATIVE EFFECTS of FENTHION on NAC and BSO MODULATED  
GLUTATHIONE METABOLISM in the LIVER and KIDNEY TISSUES in  
*Oreochromis niloticus***

**Yusuf SEVGİLER**

**UNIVERSITY of ÇUKUROVA**

**INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT of BIOLOGY**

**Supervisor:** Prof.Dr. Nevin ÜNER

**Year** : 2007, **Page:** 95

**Jury** : Prof.Dr. Nevin ÜNER

Prof.Dr. Cahit ERDEM

Assoc.Prof.Dr. Bedii CİCİK

Assist.Prof.Dr. Mehmet SULANÇ

Assist.Prof.Dr. Özcan AY

This study was designated to understand the effects of organophosphate insecticide and avicide fenthion on cellular redox state and the role of GSH on this process in the liver and kidney of *Oreochromis niloticus*. NAC and BSO, modulators of GSH metabolism, were intraperitoneally injected and tGSH, GSH, GSSG and MDA levels, GSH/GSSG ratio and GPx, GR, GST and  $\gamma$ -GT enzyme activities were measured spectrophotometrically at 24-, 48- and 96-h. Depuration periods of 24-, 48- and 96-h were also maintained to evaluate the changes in fenthion toxicity.

Fenthion increased GST and decreased GPx activities and caused a time-dependent depletion in tGSH and GSSG levels in the liver tissue during treatment periods. Decline in tGSH, GSH and GSSG levels, and elevation in GST and  $\gamma$ -GT enzyme activities by BSO injection were observed. No change was found by fenthion exposure in lipid peroxidation levels in the liver tissue, while NAC injection caused a significant decrease in these levels. A significant decrease was observed tGSH and GSH levels and GST enzyme activities in the kidney tissue during treatment periods. On the contrary to liver tissue, a significant increase was observed in tGSH and GSH levels and GST activity in kidney by BSO. NAC application eliminated the decreasing effects of fenthion on GST activity in this tissue. Increasing effect of fenthion on lipid peroxidation levels was multiplied by BSO and alleviated by NAC. Decline in tGSH and GSH levels which occurred in treatment period were maintained in both tissues during depuration periods; and elevation in lipid peroxidation levels were observed during same periods.

GST and GPx enzyme activities and tGSH and GSH levels were found to be useful indicators to evaluate the effects of fenthion. BSO injection revealed the significance of GST mediated GSH conjugation on the detoxification process of fenthion and its phase I metabolites. NAC application was useful to avoid the toxic effects of fenthion in acute periods, while it caused an increase in the oxidative toxicity of fenthion in prolonged periods. Depuration period for 96-h was not adequate to eliminate the fenthion-induced changes.

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

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ÖZ .....	I
ABSTRACT .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
TEŞEKKÜR .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Oksidatif Stres .....	1
1.1.1. Lipid Peroksidasyonu .....	1
1.2. Glutasyon .....	3
1.2.1. Glutasyon Redoks Döngüsü .....	5
1.2.1.1. Serbest Oksijen Radikallerinin Detoksifikasyonunda GSH'ın Rolü .....	5
1.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz .....	7
1.2.1.3. Glutasyon Redüktaz .....	8
1.2.2. Ksenobiyotik Metabolizmasında Glutasyonun Rolü ....	9
1.2.2.1. Glutasyon S-transferaz .....	10
1.2.3. Glutasyonun Biyosentezi ve Yıkımı .....	11
1.2.4. Doku Glutasyon Düzeylerinin Modifikasyonu .....	13
1.2.4.1. Doku Glutasyon Düzeylerinin Azaltılması .....	13
1.2.4.2. Doku Glutasyon Düzeylerinin Arttırılması .....	14
1.3. Test Bileşiği .....	15
1.4. Test Organizması .....	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	28
3.1. Materyal .....	28
3.1.1. Kimyasal Maddeler .....	28
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler .....	29

3.2. Yöntem .....	30
3.2.1. Toksikoloji Denemeleri .....	30
3.2.2. Biyokimyasal Analizler .....	32
3.2.2.1. Total GSH ve GSSG Yöntemi .....	32
3.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi .....	35
3.2.2.3. Glutasyon Redüktaz Yöntemi .....	37
3.2.2.4. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi .....	38
3.2.2.5. $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi .....	39
3.2.2.6. Malondialdehid Yöntemi .....	40
3.2.2.7. Protein Yöntemi .....	41
3.2.3. İstatistiksel Analiz .....	42
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	43
4.1. Bulgular .....	43
4.1.1. Etki Süreci .....	43
4.1.1.1. Fenthionun GSH Metabolizmasına Etkileri .....	43
4.1.1.2. BSO'nun Fenthion Toksisitesine Etkileri .....	45
4.1.1.3. NAC'nin Fenthion Toksisitesine Etkileri .....	49
4.1.1.4. Lipid Peroksidasyonundaki Değişimler .....	54
4.1.2. Depurasyon Süreci .....	56
4.1.2.1. Fenthion Grubundaki Değişimler .....	56
4.1.2.2. BSO Grubundaki Değişimler .....	59
4.1.2.3. NAC Grubundaki Değişimler .....	63
4.1.2.4. Lipid Peroksidasyonundaki Değişimler .....	67
4.2. Tartışma .....	69
4.2.1. Fenthionun Etkisinin Değerlendirilmesi .....	69
4.2.2. BSO'nun Fenthion Toksisitesine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	73
4.2.3. NAC'nin Fenthion Toksisitesine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	76
4.2.4. Depurasyon Sürecinde Fenthion Grubundaki Değişimlerin Değerlendirilmesi .....	77

4.2.5. Depurasyon Sürecinde BSO Grubundaki Değişimlerin	
Değerlendirilmesi .....	79
4.2.6. Depurasyon Sürecinde NAC Grubundaki Değişimlerin	
Değerlendirilmesi .....	80
5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	82
KAYNAKLAR .....	83
ÖZGEÇMİŞ .....	95

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmalarım süresince her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Prof.Dr. Nevin ÜNER'e, Sayın Prof.Dr. Cahit ERDEM'e ve Sayın Doç.Dr. Bedii CİCİK'e, laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanlığına ve laboratuvar arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.



<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi .....	32
Çizelge 3.2. Okside Glutasyon Yöntemi .....	34
Çizelge 3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi .....	36
Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi .....	37
Çizelge 3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi .....	38
Çizelge 3.6. $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi .....	40
Çizelge 3.7. Malondialdehid Yöntemi .....	41
Çizelge 4.1. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	44
Çizelge 4.2. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri ...	46
Çizelge 4.3. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	48
Çizelge 4.4. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri .....	50
Çizelge 4.5. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	52
Çizelge 4.6. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri .....	54
Çizelge 4.7. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri .....	56
Çizelge 4.8. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	58

Çizelge 4.9. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri .....	59
Çizelge 4.10. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	62
Çizelge 4.11. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri .....	63
Çizelge 4.12. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu$ M/mg protein) etkileri .....	65
Çizelge 4.13. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri .....	66
Çizelge 4.14. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyon uygulamasının MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri .....	67

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Şekil 1.1. GSH'ın moleküler yapısı .....	3
Şekil 1.2. Merkaptürik asit süreci .....	11
Şekil 4.1. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri .....	45
Şekil 4.2. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	47
Şekil 4.3. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri .....	49
Şekil 4.4. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	51
Şekil 4.5. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri .....	53
Şekil 4.6. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	53
Şekil 4.7. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun MDA miktarına etkileri .....	55
Şekil 4.8. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri .....	57
Şekil 4.9. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	58
Şekil 4.10. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri .....	61
Şekil 4.11. BSO enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	61
Şekil 4.12. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri .....	65

Şekil 4.13. NAC enjekte edilen <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri .....	66
Şekil 4.14. <i>O. niloticus</i> 'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyon uygulamasının MDA miktarına etkileri .....	68

## KISALTMALAR DİZİNİ

$\cdot\text{OH}$	: Hidroksil Radikali
$^1\text{O}_2$	: Singlet Oksijen
BSO	: Bütionin Sülfoksimin
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
$\text{CCl}_4$	: Karbon Tetraklorür
CEB	: 1-Cyano-3,4-Epithiobutane
CYP450	: Sitokrom P-450
DEM	: Dietil Maleat
FMO	: Flavin-İçeren Monooksijenazlar
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GS	: Glutasyon Sentetaz
$\text{GS}\cdot$	: Thiyl Radikalleri
GSH	: Redükte Glutasyon
$\text{GSO}\cdot$	: Sülfenil Radikali
$\text{GSO}_2\cdot$	: Sülfonil Radikali
$\text{GSO}_3\text{H}$	: Sülfonik Asit
GSOH	: Sülfenik Asit
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen Peroksit
HOCl	: Hipoklorik Asit
L	: Lipid Radikali
$\log K_{ow}$	: Oktanol-Su Partisyon Katsayısı
$\text{LOO}\cdot$	: Lipid Peroksil Radikali
LOOH	: Lipid Hidroperoksidi
L-S-BSO-P	: L-Bütionin-S-Sülfoksimin Fosfat
MDA	: Malondialdehid
MRP	: Çoklu-İlaç Direnç Proteini

NAC	:	<i>N</i> -Asetil-L-Sistein
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	:	Süperoksit Anyon Radikali
OP	:	Organofosforlu Pestisid
PC-12	:	Pheochromocytoma Hücreleri
PUFA	:	Poliansatüre Yağ Asitleri
RO <sup>•</sup>	:	Alkoksil Radikali
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	:	Peroksil Radikali
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RSO <sub>2</sub> OO <sup>•</sup>	:	Sülfonil Peroksil Radikali
TCB	:	Tetraklorobifenil
tGSH	:	Total Glutasyon
γ-GCS	:	γ-Glutamilsisteinil Sentetaz
γ-GT	:	γ-Glutamil Transpeptidaz

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) eşleşmemiş elektrona sahip oldukça reaktif moleküllerdir, oluşumları ile biyomolekülleri hızla oksitleyerek hücre ölümüne ve doku hasarına neden olmaktadır (De Zwart ve ark., 1999). ROS, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde sürekli üretilmektedir, bu nedenle hücreler bunlara karşı çeşitli korunma sistemleri geliştirmişlerdir (Ceconi ve ark., 2003).

Oksidatif stres ROS gibi oksidant moleküllerin üretiminde artış ve hücrel korunma mekanizmalarında düzensizlik meydana geldiği durumlarda açığa çıkan bir olgudur. Oksidatif stresin etkileri, okside glutatyon (GSSG), lipid peroksidleri gibi peroksidler ve malondialdehid (MDA) gibi yan ürünlerin birikimleri ile belirlenmektedir (Ceconi ve ark., 2003).

Prooksidant ROS oluşumu ile ilgili tepkimeler arasında: İyonlaştırıcı UV gibi elektromagnetik radyasyonun absorpsiyonu, mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon, fagositik hücrelerin aktivasyonu ve fagositik aktiviteleri için myeloperoksidaz aracılıklı ROS oluşturmaları, endoplazmik retikulumda eksojen ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu, oksidazlarla katalizlenen enzimatik tepkimeler, metal aracılıklı oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri yer almaktadır. Oksidatif fosforilasyon en önemli endojen ROS kaynağıdır (Djordjevic, 2004).

Bu prooksidantların birçoğu lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleotidler gibi çok farklı biyolojik moleküllerin yapısını değiştirme yeteneğindedirler. Oksidatif stres ve biyomoleküllerin oksidatif modifikasyonu enflamasyon, karsinogenez ve ilaç toksisitesi gibi fizyolojik ve fizyopatolojik durumlarda görülmektedir (Djordjevic, 2004).

#### 1.1.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu hem ROS aracılıklı tepkimelerle meydana gelen hem de kendisi ROS üretimine neden olan bir olaydır. Lipid peroksidasyonu hakkında çok

iyi bilinen iki olgu vardır. Birincisi, hücre membranı ve hücrenel organellerde fazlaca bulunan poliansatüre yağ asitleri (PUFA) ROS'a oldukça duyarlıdır; ikincisi, lipid peroksidasyonu zincir tepkimelerle yürümektedir. Lipid peroksidasyonunun başlamasına singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi ROS veya karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) gibi kimyasallar neden olmaktadır. ROS PUFA ile etkileştiğinde bu molekülden bir hidrojeni kopartarak bir lipid radikalini (L) oluşumuna neden olur, PUFA bağ düzenlenmesi ile bir dien konjugatına dönüşür, buna bir oksijenin eklenmesiyle de lipid peroksil radikali ( $LOO\cdot$ ) meydana gelir. Oldukça reaktif olan peroksil radikali komşu yağ asidinden bir hidrojen alarak lipid hidroperoksidi ( $LOOH$ ) ve yeni bir lipid radikali meydana getirir. Böylece lipid peroksidasyonu ilerlemeye devam eder. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonunun ilerleme tepkimeleri ile alkanlar, isoprostanlar ve karbonil bileşikleri gibi çok çeşitli yan ürünler açığa çıkmaktadır (Djordjevic, 2004).

Lipid peroksidasyonu membranın akışkanlığını değiştirerek, bir veya iki değerlikli iyonlara geçirgenliği artırır ve membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonuna neden olur. Peroksidasyon tüm membran lipidlerinin yıkımına yol açabilir. Proteolitik enzimler içeren lizozomlarda membran yıkımı ile bu enzimler hücre içine salınır ve aktivasyonları ile hücrenel hasar artar. Bu nedenlerle membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonunun kontrol edilememesi membranların yapı ve işlevlerinde önemli değişimlere ve giderek hücre ölümüne neden olmaktadır (Djordjevic, 2004).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organoklorlu ve organofosforlu (OP) pestisidler, poliklorlu bifeniller ve diğer ksenobiyotikler bu tip oksidatif hasar ile önemli etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun ölçülmesi böyle bileşiklerin oksidatif etkilerinin değerlendirilmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Valavanidis ve ark., 2006). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en basit ve en yaygın yöntem arakidonik asit endoperoksitlerinin dekompozisyon ürünü olan MDA miktarının belirlenmesidir (Spiteller, 2001).

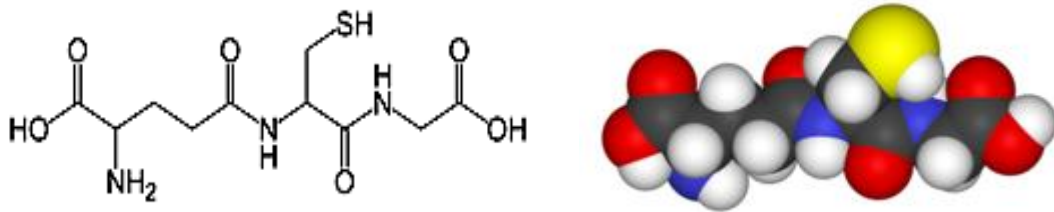
Aerobik hücreler ROS kaynaklı oksidatif hasardan korunmak üzere evrimsel süreçte antioksidant savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu organizmalarda



yer alan antioksidant savunma sistemleri iki kısma ayrılmaktadır. Enzimatik sistem katalaz (EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) ve glutatyon peroksidaz (GPx; EC1.11.1.9) gibi enzimlerden; enzimatik olmayan sistem ise redükte glutatyon (GSH), E vitamini, askorbat,  $\beta$ -karoten ve ürat gibi bileşiklerden meydana gelmektedir (Valavanidis ve ark., 2006). GSH ve GSH-bağımlı enzimler bu antioksidant savunma içerisinde önemli bir yer tutmaktadırlar (Cnubben ve ark., 2001).

## 1.2. Glutatyon

Glutatyon (L- $\gamma$ -glutamil-L-sisteinil-glisin) ökaryotik hücrelerde en bol bulunan, düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptiddir ve bir tiyol grubu taşımaktadır (Şekil 1.1.). Redükleyici ajan ve antioksidant olarak rol oynayan GSH'm, farklı hücrel moleküllerin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında ve ROS'un temizlenmesinde önemli işlevleri vardır. Bunların yanında hücre döngüsünün düzenlenmesi ve mikrotübüler mekanizmalarda rol oynar; sisteinin fizyolojik depo formu olarak iş görür;  $Ca^{2+}$  homeostasisinin, tiyol-disülfid değişim tepkimeleri ile gen ekspresyonunun ve protein işlevlerinin düzenlenmesinde çalışır, mitokondriyal mekanizmalarda yer alır (Estrela ve ark., 2006).

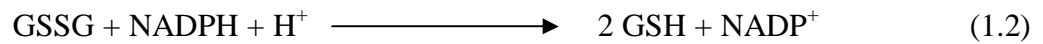
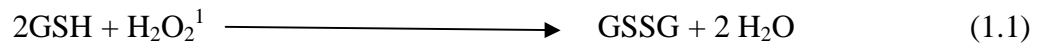


Şekil 1.1. GSH'nin moleküler yapısı

Hücrel GSH sitosolde yüksek oranlarda (%85-90) bulunurken, geriye kalan kısmı mitokondri, nükleer matriks ve peroksisomlarda yer almaktadır. Sistein rezidüsü nedeniyle GSH ROS ve reaktif nitrojen türleri gibi elektrofilik maddeler tarafından non-enzimatik olarak GSSG'ye dönüştürülmektedir. Hücrelerden

GSSG'nin hücre dışına salınması, hücre içinde net bir GSH kaybına neden olmaktadır. Hücredeki total GSH'ın (tGSH) yaklaşık %15'i proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır ve hücreSEL GSH derişimi ksenobiyotik detoksifikasyonunda, protein yetersizliğinde, oksidatif streste ve birçok patolojik durumda azalabilmektedir. HücreSEL redoks durumunun indikatörü olarak değerlendirilen GSH/GSSG oranı hücrelerin antioksidatif kapasitesini belirleyen en önemli redoks çiftidir; fakat bu oran NADPH ve redükte tiyoredoksin/okside tiyoredoksin redoks çiftleri tarafından da etkilenmektedir (Wu ve ark., 2004).

Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu sırasında iki tip tepkime meydana gelmektedir. Birincisi, GSH süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) gibi ROS'la doğrudan tepkime vermektedir. İkincisi GSH, GPx'in katalizlediği, peroksitlerin indirgenmesi tepkimelerinde elektron donörü olarak rol oynamaktadır. Özellikle, GPx tarafından hidroperoksitlerin yıkılması sırasında GSH'ın indirgeme kapasitesi tüketilerek GSSG meydana getirilmektedir. GSSG'de NADPH'ın elektron donörü olarak kullanıldığı tepkimelerde, glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7) enzimi tarafından yeniden GSH'a indirgenmektedir (Camera ve Picardo, 2002).



GSSG miktarındaki artış ve GSH/GSSG oranı oksidatif stres koşullarının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında, GSH'ın GSSG'ye oksidasyonundaki artış protein tiyollerin kaybına neden olan protein S-tiyolasyonunu tetiklemektedir. GR'ye benzer olarak, glutaredoksini de içeren protein disülfid redüktazlar, protein disülfid izomeraz ve GSH-insülin transhidrojenaz GSH ve protein disülfidlerin rejenerasyonunu sağlamaktadırlar.

Glutatyon peroksidaz ve GR enzimlerinin katalizlediği tepkimelerde GSH tüketilmemekte, fakat bir döngüye sokulmaktadır. Bunun aksine, glutatyon S-

<sup>1</sup> Hidrojen peroksit

transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enziminin katalizlediği tepkimelerle GSH S-konjugatlarının oluşumuyla ve bunların hücre dışına atılmasıyla intraselüler tGSH miktarı azalmaktadır. Aslında GSSG meydana geldiğinde hızlıca ve aktif olarak plazma membranından transport edilmektedir. GSSG ve GSH konjugatlarının hücre dışına çıkarılması ROS'a karşı kompleks hücre sel savunma sisteminin bir parçası olarak düşünülmektedir. Tüm bu süreçlerde tüketilen GSH yapıtaşı aminoasitlerden sentez yoluyla yerine konmaktadır. Ekstraselüler GSH ve GSH konjugatları, ektoenzim  $\gamma$ -glutamil transpeptidazın ( $\gamma$ -GT; EC 2.3.2.2) substratlarıdır. Bu enzim GSH ve GSH konjugatlarından  $\gamma$ -glutamil halkasının salınmasını katalizler ve böylece sisteinil-glisin veya sisteinil-glisin konjugatı açığa çıkar. Sisteinil-glisin ektopeptidazlar tarafından sistein ve glisine dönüştürülürken bu aminoasitler hücre içerisine alınarak yeniden GSH'ın sentezlenmesinde kullanılmaktadırlar (Camera ve Picardo, 2002).

### 1.2.1. Glutatyon Redoks Döngüsü

Oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri arasındaki denge hücrenin redoks durumunu yansıtmaktadır. GSH redoks sistemi birçok hücre sel metabolik sürecin düzenlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak ROS oluşması nedeniyle GSH redoks sistemi hücrenin varlığını devam ettirmesi açısından oldukça önemlidir (Jefferies ve ark., 2003). Glutatyon redoks sistemi GSH, GR, GPx ve NADPH'dan oluşmaktadır (Jokanovic, 2001).

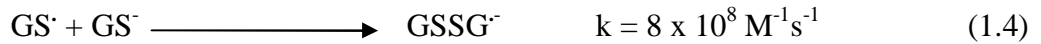
#### 1.2.1.1. Serbest Oksijen Radikallerinin Detoksifikasyonunda GSH'ın Rolü

*In vivo* olarak tiyoller, özellikle de GSH, proteinlerin -SH gruplarını oksidasyona karşı korumaları, ROS, hipoklorik asit (HOCl) ve peroksinitrik asit gibi diğer radikalleri uzaklaştırma etkileri nedeni ile antioksidant ajanlar olarak değerlendirilmektedirler. *In vitro* olarak GSH,  $\cdot$ OH, HOCl, peroksinitrit, alkoksil radikali (RO $\cdot$ ), peroksil radikali (RO $_2\cdot$ ), karbon-merkezli radikaller ve  $^1$ O $_2$  ile tepkime vermektedir. Bu tepkimeler sonunda thiyl radikalleri (GS $\cdot$ ) açığa çıkmaktadır. Oluşan

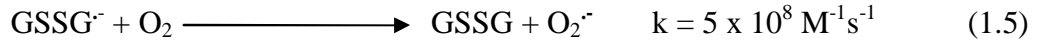
bu radikaller büyük ölçüde inert olarak kabul edilirler ve dimerizasyonla ortadan kalkarlar.



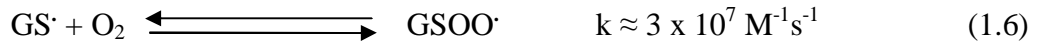
Bunun yanında GS<sup>·</sup>'nin steady-state düzeyinin oldukça düşük olması nedeniyle bu radikallerin birbiriyle karşılaşma olasılığının azlığı bu tepkimenin *in vivo* gerçekleşme oranını azaltmaktadır. Hücrelerdeki GSH miktarı milimolar düzeyindedir. GSH'ın tiyol grubunun GSH ↔ GS<sup>·</sup> + H<sup>+</sup> tepkimesinde pK<sub>a</sub> değeri 9.2'dir ve bu nedenle pH 7.4'de GSH'ın yalnızca %1-2 kadarı iyonize haldedir. GS<sup>·</sup>; GS<sup>·</sup> ile hızla tepkime vermektedir.



Thiyl radikalinin aksine GSSG<sup>·-</sup> çok kuvvetli bir indirgeyicidir ve metal iyonlarını ve hatta O<sub>2</sub><sup>·-</sup> oluşturacak şekilde O<sub>2</sub>'yi de indirgeyebilir.

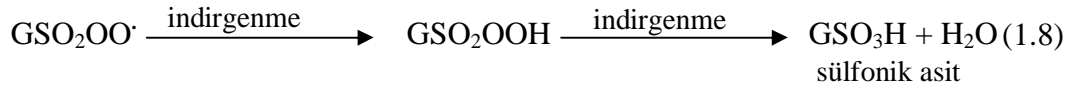
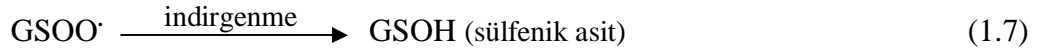


Thiyl radikallerinin O<sub>2</sub> ile verdiği bir başka tepkime türü peroksil radikallerinin oluşturulmasıdır.



Thiyl peroksil radikalleri stabil değildir ve O<sub>2</sub>'nin varlığında hızla diğer radikallerin oluşmasına neden olur. GSOO<sup>·</sup> radikalleri O<sub>2</sub> varlığında daha fazla tiyol grubu ile tepkime veren sülfonil radikali (GSO<sup>·</sup>) oluşturur veya ışık bağımlı tepkimelerle izomerize olarak sülfonil radikallerini (GSO<sub>2</sub><sup>·</sup>) meydana getirir. GSO<sub>2</sub><sup>·</sup> daha sonra yine O<sub>2</sub> varlığında sülfonil peroksil radikallerini (RSO<sub>2</sub>OO<sup>·</sup>) oluşturmaktadır.

Sonuç olarak GSH'nin ROS ile verdiği tepkimeler sonunda GSSG, sülfenik asit (GSOH) ve sülfonik asit (GSO<sub>3</sub>H) meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).



### 1.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz GSH'nin oksidasyonu yoluyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O'ya indirgenmesini katalizleyen enzimdir.



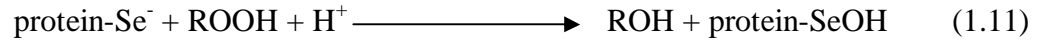
Enzim, hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır ve hidrojen donörü olarak GSH'a spesifiktir. Bununla birlikte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den başka diğer peroksitlere de etki etmektedir. Böylece, linolenik ve linoleik asit peroksidasyon ürünleri gibi yağ asidi hidroperoksitlerinin, düşük oranlarda kolesterol 7β-hidroperoksit ve bunun yanında *in vitro* çalışmalarda enzim aktivitesini ölçmek üzere sıklıkla kullanılan *t*-butil ve kümen hidroperoksitler gibi sentetik hidroperoksitlerin de GSH-bağımlı indirgenmelerini katalizlemektedir. Her durumda peroksit grubu bir alkole indirgenmektedir.



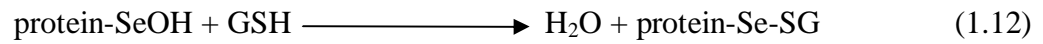
Glutasyon peroksidaz lipoproteinlerdeki veya membranlardaki esterleşmiş yağ asidi peroksitlerine etki edemez; bunların öncelikle lipaz enzimlerinin etkisiyle buldukları yerden uzaklaştırılması gerekir.

Glutasyon peroksidaz dört protein alt biriminden meydana gelmektedir ve her alt birimin aktif merkezlerinde bir atom selenyum elementi bulunmaktadır. Katalitik

aktivite sırasında selenol (protein-Se<sup>-</sup>) peroksit ile bir selenenik asit (protein-SeOH) verecek şekilde tepkimeye girer.



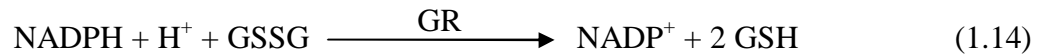
Bu tepkimenin devamında aktif merkezi orijinal formuna getirmek üzere GSH kullanılır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).



### 1.2.1.3. Glutasyon Redüktaz

Hücrelerde GSH/GSSG oranı yüksektir ve bu nedenle kimyasal olarak veya GPx tepkimeleriyle açığa çıkan GSSG'nin yeniden GSH'a indirgenmesi için bir mekanizmanın bulunması koşulu vardır. Bu durum GR enzimi tarafından başarılmaktadır.

Glutasyon redüktaz NADPH-bağımlı olarak GSH'ın GSSG'ye indirgenmesini katalizlemektedir.



Glutasyon redüktaz her biri aktif merkezinde FAD içeren iki protein alt ünitesi taşımaktadır. Tepkime sırasında NADPH FAD'ı indirger ve indirgenmiş FAD aktif merkezde GSSG'nin iki sistein rezidüsü arasındaki disülfid köprüsüne (-S-S-) elektronları aktarır. Böylece tepkime sonunda bir molekül GSSG iki molekül GSH'a indirgenmektedir. Bu tepkimelerde gereksinim duyulan NADPH için en önemli kaynak oksidatif pentoz fosfat döngüsüdür ve GR'nin NADPH'ı kullanarak NADPH/NADP<sup>+</sup> oranını azaltması nedeniyle pentoz fosfat döngüsünün hızla bu oranı koruması gerekmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Oksidatif stres

koşullarında glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin inhibisyonu gibi NADPH miktarını sınırlayan herhangi bir faktör hücre içerisinde GSSG birikimine neden olmaktadır. Bu olay nedeniyle meydana gelebilecek iki durum: Oksidant-yanıt transkripsiyonel elementlerinin aktive edilmesiyle hücrenin tiyol redoks durumunun değiştirilmesi veya en sıklıkla gerçekleşen, GSSG'nin hücre dışına atılarak hücrel GSH'ın kaybedilmesidir (Estrela ve ark., 2006). GSSG'nin bütün halinde hücre içerisine alınamaması nedeniyle ekstraselüler yıkımı gereklidir, oksidatif stres sırasında hücre dışına atılan GSSG, bu şekilde GSH'ın *de novo* sentezi için hücrenin gereksinimlerini arttırmaktadır (Griffith, 1999).

Glutasyon oksidatif streste rolünün yanında pestisidler ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında da önemli görevler yapmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### 1.2.2. Ksenobiyotik Metabolizmasında Glutasyonun Rolü

Doğal ve antropojenik kimyasalların büyük kısmı biyolojik olarak aktiftir ve canlılarda fizyolojik süreçlerde değişimlere neden olurlar. Bunların bir kısmı lipid membranlardan geçme yeteneğinde olan lipofilik bileşiklerdir ve canlılar, bu bileşiklerin vücuttan daha kolay atılmasını sağlamak üzere bunları elektrofilik metabolitlerine dönüştürmektedirler. Lipofilik kimyasalların polar metabolitlerine dönüştürülmesi iki metabolik fazda gerçekleşmektedir. Faz I tepkimelerinde moleküle bir oksijen transfer edilerek veya indirgenme ile -OH ve -COOH gibi işlevsel gruplar oluşturulmaktadır. Ana bileşikten daha hidrofilik olan bu metabolitler faz II tepkimelerinde glukuronik asit, sülfat ve GSH gibi endojen substratlarla konjuge edilerek vücuttan atılımları kolaylaştırılmaktadır.

Hücrelerin ksenobiyotik etkisinden korunmasında en önemli metabolik süreçlerden biri GSH konjugasyonudur. GSH içerdiği nükleofilik tiyol grubu ile elektrofilik bileşiklerin ve metabolitlerin detoksifikasyonunu sağlamaktadır. GSH'ın elektrofilik bileşiklerle tepkimesi kimyasal olarak gerçekleşebileceği gibi GST tarafından da katalizlenmektedir (Ioannides, 2002).

### 1.2.2.1. Glutasyon *S*-transferaz

Glutasyon *S*-transferaz izoenzimleri bakterilerden insana kadar bütün organizmalarda bulunmaktadır. Birbirinden farklı aktivitelere ve tepkime türlerine sahiptirler. Bu enzimlerin büyük bir kısmı substrat bileşiğın elektrofilik merkezi ile GSH'ın sülfür atomu arasında bir tiyoeter bağının oluşmasını katalizler. Bu konjugasyon tepkimelerinin yanında GSH-bağımlı tepkimelerde organik hidroperoksitlere de katalitik aktivite gösterirler, ayrıca bazıları farklı doymamış bileşiklerin izomerizasyonunda yer almaktadır. Bu enzimler karsinojenlerin alınması, birçok hidrofobik ligandın intraselüler transportu ve sinyal iletim süreçlerinin modülasyonu gibi non-katalitik işlevler de yapmaktadırlar.

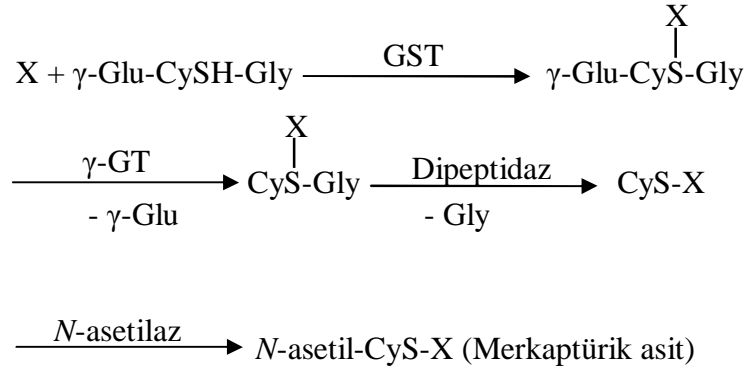
Glutasyon *S*-transferaz faz II ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Genelde GST'nin etkisi, sitokrom P-450'nin (CYP450) katalizlediği tepkimeleri takip etmektedir. Bu enzimlerin ürünü olan elektrofilik merkezli metabolitler nükleofilik GSH ile konjugat oluşturmak üzere GST'nin katalizlediği tepkimelere girmektedirler. Bu tepkimeler sonunda GSH ile moleküler olarak işaretlenen bu ksenobiyotik konjugatları hücreden uzaklaştırılmak üzere çoklu-ilaç direnç proteini (MRP) gibi ilaç taşıyıcı proteinler aracılığıyla faz III metabolizmasına girerler. Hücre dışına atıldıktan sonra GSH-konjugatının  $\gamma$ -glutamil ve glisin rezidüleri  $\gamma$ -GT etkisi ve aminopeptidaz M veya sisteinilglisin dipeptidaz yardımıyla uzaklaştırılır. Açığa çıkan sisteinil konjugatı *N*-asetilasyon tepkimeleri sonunda ksenobiyotiğın idrardan atılma formu olan bir merkaptürik aside dönüştürülür (Şekil 1.2.) (Sherratt ve Hayes, 2002).

Glutasyon *S*-transferazın katalizlediği GSH-konjugasyonu aracılığıyla merkaptürik asit oluşum süreci genellikle detoksifikasyon tepkimeleri olarak tanımlanmaktadır; fakat bazı bileşiklerin GSH-aracılıklı biyoaktivasyonları da bilinmektedir ve bu bileşikler omurgalılarda özellikle böbrek dokusunda ana bileşiğe oranla daha toksik etkiler yapmaktadırlar (Dekant, 2001).

Glutasyon *S*-transferaz enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST



karsinogenik bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. GST, her biri, elektrofilik substrat için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahiptir (Cnubben ve ark., 2001).

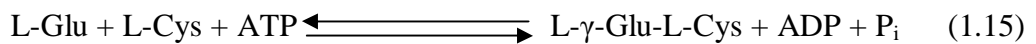


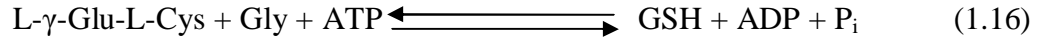
**Şekil 1.2.** Merkaptürük asit süreci. X, GSH ile konjugasyon yapan ksenobiyotiği göstermektedir (Lu, 1999).

Glutasyon *S*-transferaz hidroksialkenaller ve baz propenaller (lipid peroksidasyonu yıkım ürünleri) veya DNA hidroperoksitler gibi endojen bileşikleri detoksifiye ederek oksidatif strese karşı savunmada da rol oynamaktadır (Cnubben ve ark., 2001). GST'nin peroksidaz aktivitesi selenyum-bağımlı değildir, fakat GSH'a gereksinim duymaktadır. Tepkime iki basamak halinde yürümektedir. Birinci basamakta hidroksillenmiş GSH'ın üretimi ile peroksit alkole enzimatik olarak indirgenir. İkinci basamakta spontane tepkimeyle hidroksillenmiş GSH bir molekül GSH ile sonuçta GSSG ve su açığa çıkartır (Sherratt ve Hayes, 2002).

### 1.2.3. Glutasyonun Biyosentezi ve Yıkımı

Glutasyon,  $\gamma$ -glutamilsisteinil sentetaz ( $\gamma$ -GCS; EC 6.3.2.2) ve GSH sentetaz (GS; EC 6.3.2.3) enzimlerinin ardışık etkileri ile yapıtaşı aminoasitlerinden ATP-bağımlı tepkimelerle sentezlenmektedir (Anderson, 1998).





Bu tepkimeler için sistein aminoasidi sınırlayıcı substrattır (Anderson, 1998). Bu nedenle  $\gamma$ -GCS enziminin katalizlediği tepkime sınırlayıcı basamak olarak değerlendirilmektedir (Griffith, 1999).

$\gamma$ -Glutamil bağı GSH'nin intraselüler stabilitesinde oldukça önemlidir. GSH'nin amino-terminal glutamat ve sistein rezidüsü arasındaki peptid bağı, geleneksel  $\alpha$ -karboksil yerine glutamatın  $\gamma$ -karboksil grubu ile kurulmuştur. Bu olağandışı düzenleme GSH'ı peptidazların yıkıcı etkisinden korumaktadır.  $\gamma$ -GT GSH'nin  $\gamma$ -peptid bağını kırabilen tek enzimdir ve membrana bağlıdır. Bunun yanında GSH'nin karboksi-terminal glisin rezidüsü molekülü intraselüler  $\gamma$ -glutamilsiklotransferaz enzimine karşı korumaktadır. Bu nedenlerle GSH intraselüler yıkıma dirençlidir ve yalnızca ekstraselüler olarak metabolize edilebilmektedir (Lu, 1999).

$\gamma$ -Glutamil transpeptidaz 45000 ve 22000 daltonluk iki protein alt biriminden oluşan ekstraselüler bir enzimdir. Büyük alt birimin 6 aminoasit rezidüsü sitoplazmada, 18 aminoasit rezidüsü ise hücre membranında yer almaktadır. Enzim sisteinil-glisin dipeptidi açığa çıkarmak üzere  $\gamma$ -glutamil grubunun ayrılmasını sağlamaktadır. GSH'tan ayrılan  $\gamma$ -glutamil grubu transpeptidasyon adı verilen tepkime sonunda bir akseptör aminoaside transfer edilmektedir. Daha sonra, oluşan sisteinil-glisin dipeptidi membrandaki dipeptidazlar tarafından sistein ve glisine dönüştürülmektedir. Böylece intraselüler GSH sentezini sağlamak üzere yapıtaşları hücre dışından sağlanmaktadır (Hanigan, 1998).  $\gamma$ -GT aynı zamanda GSH S-konjugatlarının merkaptürik asitlere dönüşümünü de başlatmaktadır. Tepkimede  $\gamma$ -glutamil halkası bir akseptör aminoaside transfer edilerek sisteinil-glisin konjugatı açığa çıkarılmaktadır. Akseptör aminoasidin sistein olması durumunda GSH sentezinin birinci basamağı olan  $\gamma$ -GCS tepkimesinin atlanması sağlanmaktadır ve bu durumun hücrelerde GSH miktarının korunmasında önemli olabileceği düşünülmektedir. Bunların yanında  $\gamma$ -GT'nin katalizlediği tepkimeler lökotrien C4, prostaglandinler ve östrojen gibi biyomoleküllerin metabolizmalarında da önemli bir yer tutmaktadır (Zhang ve ark., 2005a).

#### 1.2.4. Doku Glutasyon Düzeylerinin Modifikasyonu

Hücrel GSH düzeyleri GSH'ın üretimi ve tüketilmesi arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. GSH'ın hücrel miktarı *de novo* sentezi yoluyla veya GR aracılıklı tepkimelerde GSSG'nin GSH'a dönüştürülmesi ile sağlanmaktadır. GSSG'den GSH oluşturulması kantitatif olarak *de novo* sentezine göre daha önemli olmakla birlikte, GR genelde tGSH düzeylerinin baskın olarak GSH yönünde tutulmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GR aracılıklı GSSG-GSH arasındaki redoks döngüsü hücrel GSH düzeylerine önemli bir katkı yapmamaktadır (Griffith, 1999). GSH metabolizması birçok doku tipinde oldukça dinamik bir sistemdir, bu nedenle *in vivo* GSH yetersizliğinin etkileri ile ilgili çalışmalar ilgi çekmektedir. Bu tip çalışmalarda diamid, phorone, dietil maleat (DEM) ve *t*-butil hidroperoksit gibi non-spesifik kimyasallar kullanılmıştır. Bunun yanında bu tip bileşikler non-spesifik oksidasyonlara ve hücrede daha başka etkilere de neden olmaktadır. Bu nedenle hücrel GSH düzeylerini azaltmak üzere spesifik yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Anderson, 1998).

##### 1.2.4.1. Doku Glutasyon Düzeylerinin Azaltılması

Glutasyon miktarının azaltılması *in vivo* olarak GSH'ın ve GSH-bağımlı enzimlerin önemlerinin gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). İntraselüler GSH düzeyini etkileyen en önemli faktörün GSH'ın *de novo* sentezi olması (Anderson, 1998) ve sentezin sınırlayıcı basamağının  $\gamma$ -GCS tepkimesi olması (Griffith, 1999) nedeniyle, en genel yöntem  $\gamma$ -GCS enzimi inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Bu amaçla en yaygın kullanılan inhibitör bütinyonin sülfoksimidir (BSO) ve iki diastereomerinin karışımı halinde ticari olarak satılmaktadır (Griffith, 1999). Metabolitlerinin GST aracılıklı tepkimelerde detoksifikasyona uğradığı düşünülen kimyasalların, BSO ile kombine halde verilmesi mekanistik toksisite çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır (Watanabe ve ark., 2003).

Hem L,S- hem de L,R-diastereomerlerinin  $\gamma$ -GCS enzimine bağlanma merkezi analogu olarak bağlanmalarına karşın, yalnızca L,S-bütiyonin sülfoksimin mekanizma temelli inhibitördür ve ATP'ye gereksinim duymaktadır. Enzim katalizörlüğünde sülfoksimin nitrojeni fosforilasyona uğramaktadır ve sonuçta L-bütiyonin-S-sülfoksimin fosfat meydana gelmektedir (L-S-BSO-P). Mg-ATP varlığında bu ürün non-kovalent, fakat oldukça kuvvetli bir şekilde  $\gamma$ -GCS'nin aktif merkezine bağlanmaktadır. Hücrelerin Mg-ATP içermeleri nedeniyle, BSO hücrelerde veya *in vivo* kullanıldığında irreversibl inhibitör olarak değerlendirilmektedir (Griffith, 1999).

L-bütiyonin-S-sülfoksimin fosfat ile inhibe olan  $\gamma$ -GCS'nin disosiasyonu oldukça düşüktür ve bu durumun farmakolojik olarak önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, BSO etkisinden sonra  $\gamma$ -GCS'nin reaktivasyonu veya *de novo* sentezi yoluyla GSH düzeylerinin yerine konması hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Griffith, 1999).

#### 1.2.4.2. Doku Glutatyon Düzeylerinin Arttırılması

Elektrofilik bileşiklerin ve oksidatif stres ajanlarının detoksifikasyonunda GSH'nin kritik roller oynaması nedeniyle, farmakolojik olarak doku GSH düzeylerinin korunması veya arttırılması oldukça ilgi çekmiştir. Bu konuda en yaygın kullanılan yöntem sınırlayıcı aminoasit olan L-sistein yapıtaşının kullanılabilirliğini arttırmak üzere veya GST tepkimeleri ile geri dönüşümsüz kaybedilen bu aminoasidi yerine koymak üzere dokulara ulaştırılmasını sağlamaktır. L-sisteinin kendisini suda çözülme L-sistine oto-okstitlemesi ve kültür hücrelerine ve canlılara toksik olduğunun gösterilmesi nedeniyle, çalışmaların büyük kısmında *N*-asetil-L-sistein (NAC; 2-merkaptopropionil glisin) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Griffith, 1999).

*N*-asetil-L-sistein aminoasit L-sisteinin asetillenmiş formudur ve mükemmel bir sülfidril grubu kaynağı olarak değerlendirilmektedir. NAC vücuda alındıktan sonra metabolitlerine ayrılarak GSH sentezini uyarmaktadır, detoksifikasyonu desteklemektedir ve aynı zamanda antioksidant bir molekül olarak ROS'un

eliminasyonuna katılmaktadır (Suntres, 2002). NAC ve okside formu hücre içerisine alındıktan sonra sistein kazanmak üzere hızla deasetilasyona uğrar, bunun yanında *N*-asetil-D-sistein deasetilasyona uğramamaktadır. Okside NAC'nin ise deasetilasyondan önce disülfid köprüsünün kırılması gerekmektedir. NAC uzun yıllardan bu yana mukolitik ajan olarak klinikte kullanılmaktadır ve insan kullanımı için güvenli sayılmaktadır (Sen, 1997).

Birçok farklı koşul altında hücresel GSH içeriği değişmektedir (Dickinson ve Forman, 2002). Bu koşullar içerisinde çevresel kirleticilerin ve özelde pestisidlerin etkisiyle intraselüler ROS oluşumu artmakta ve balıklarda antioksidant savunma mekanizması zayıflatılarak makromoleküllerde oksidatif hasar tetiklenmektedir (Peixoto ve ark., 2006).

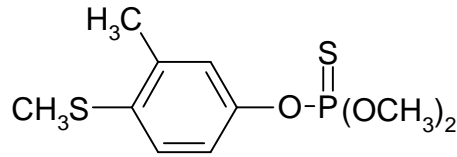
### 1.3. Test Bileşiği

Pestisidler zararlı organizmalara karşı kullanılmaları nedeniyle insan ve çevre sağlığını etkileyen bileşikler arasında önemli bir yer tutmaktadırlar. İdeal olarak pestisidlerin zararlı organizmalara spesifik olup, diğer organizmalara etkisiz olmaları istenir. Fakat pestisid olarak kullanılan bileşiklerin birçoğu yeterli spesifikliğe sahip değildir. Spesifikliklerinin yetersiz olması nedeniyle pestisidlerin insan ve çevre sağlığına etkileri ile ilgili çalışmalar yıllardan beri oldukça ilgi çekmektedir (Maroni ve ark., 2000).

Günümüzde kullanılan pestisidlerin büyük kısmı OP, karbamatlı ve sentetik piretroidlerdir. Çevredeki düşük kalıcılıkları nedeniyle OP bileşikler tüm dünyada en yaygın kullanılan pestisid gruplarından birisi olmuştur. Çevrede hızla bozunmalarına karşın, bu bileşiklerin hedef organizma spesifiklikleri oldukça düşüktür ve hedef dışı omurgalı ve omurgasız türlerde akut toksisiteleri yüksektir (Fulton ve Key, 2001). Oksijen veya sülfür atomunun konfigürasyonuna göre fosfatlar, *O*-fosforotiyoatlar, *S*-fosforotiyoatlar, fosforoditiyoatlar, fosfonatlar ve fosforamidatlar olmak üzere altı gruba ayrılan bu bileşikler fosforik asit veya tiyofosforik asit türevleridirler (Maroni ve ark., 2000).

Organofosforlu bileşikler oküler, dermal, gastrointestinal ve solunum gibi hemen hemen tüm yollarla hızla vücuda alınmaktadır. Absorbsiyon hızları büyük ölçüde lipofiliteleleri ile ilişkilidir ve hızla yağ, karaciğer ve böbrek dokularında birikebilmektedirler. Fosforotiyoat bileşikler (P=S) fosfatlara (P=O) oranla daha lipofildirler ve bu nedenle yağ dokusunda daha fazla birikmektedirler (Kwong, 2002).

Çalışma konusu olan fenthion *O*-fosforotiyoat grubundan (Pehkonen ve Zhang, 2002) OP bir insektisid ve avisiddir (Mullie ve ark., 1999). Ülkemizde Lebaycid ticari adıyla bilinen fenthionun diğer ticari adları Bay 29493, Baycid, Baytex, Dalf, DMTP, Entex, Mercaptophos, Prentox Fenthion 4E, Queletox, S 1752, Spotton, Talodex ve Tiguvon'dur (EXTOXNET, 1996). Oktanol-su partiyon katsayısı (log  $K_{ow}$ ) 4.00'dan büyük olan DDT ve dieldrin gibi bileşikler lipofilik olarak sınıflandırılmaktadır (Noble, 1993). Fenthionun log  $K_{ow}$  katsayısı 4.09'dur ve oldukça lipofilik bir bileşiktir (Pehkonen ve Zhang, 2002).



#### **Fiziksel özellikleri:**

**Görünüm:** Saf bileşik renksiz sıvıdır. Teknik bileşik sarı-kahverengi renklidir.

**Kimyasal Adı:** *O,O*-dimethyl *O*-4-methylthio-*m*-tolyl phosphorothioate

**Moleküler ağırlığı:** 278.33 g

**Suda çözünürlüğü:** 20°C'de 2 mg/L

**Diğer çözücülerde çözünürlüğü:** Alkoller, eterler, esterler, halojenlendirilmiş aromatikler, petrol eteri gibi birçok organik çözücüde çözünmektedir.

**Ergime noktası:** 7.5°C

**Buhar basıncı:** 20°C'de 4 mPa; 30°C'de 10 mPa (EXTOXNET, 1996).

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu (U.S. EPA) Bayer firmasının yaptığı ruhsat iptali başvurusunu dikkate alarak 30 Kasım 2004'den başlayarak fenthion içeren tüm formülasyonların yasaklandığını duyurmuştur (EPA, 2006). Kanada Zararlı Yönetimi Düzenleme Kurumu da (PMRA) fenthionun tüm kullanımlarının 31 Aralık 2006'dan başlayarak yasaklandığını bildirmiştir (PMRA,

2004). Buna karşın, ülkemizde (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti., Gebze, Kocaeli) üretimi devam eden fenthion Çukurova Bölgesi'nde turunçgil ve meyve zararlılarına karşı 2005 yılında 5000 L kullanılmıştır (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Bitki Koruma Müdürlüğü, Adana Şubesi, 2005).

#### 1.4. Test Organizması

Kimyasal toksik kirleticiler biyolojik sistemlerde önemli ROS kaynaklarından bir tanesidir. Sürekli artan sayıda tarımsal ve endüstriyel kimyasallar akuatik çevrelere katılmakta ve akuatik organizmaların dokularına ulaşmaktadırlar. Akuatik organizmalarla yapılan çalışmalar bu canlıların ksenobiyotiklerin indüklediği oksidatif hasardan hücresel sistemleri korumak üzere etkin bir antioksidant sisteme sahip olduklarını göstermiştir. Bu antioksidant sistemlerin rolleri ve duyarlılıkları çevresel toksikoloji çalışmalarında çok önemli bir yere sahiptir. Akuatik organizmalar ROS'un hücresel komponentlere nasıl hasar verdiğini, hücrelerin bu hasara yanıtlarını, hasarı düzelteren tamir mekanizmalarını ve oksidatif stresin ne şekilde hastalıklara yol açtığını anlamak üzere model organizmalar olarak kullanılabilirler. Akuatik canlılar memelileri de içeren karasal organizmalara oranla çevresel kirleticilerin etkilerine daha duyarlıdır ve bu nedenle oluşan oksidatif stresin ayrıntılı çalışılması ile deneysel veriler sağlamaktadırlar (Valavanidis ve ark., 2006).

Sitosolik GSH sıçan karaciğerinde 2-3 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve karaciğer GSH içeriği en yüksek olan organdır. Bunun iki nedeni vardır. Birincisi, transsülfürasyon tepkimesi ile metiyoninden sistein üretebilen tek organdır, ikincisi, hepatositlerdeki GSH sentez oranı GSH taşıyıcıları aracılığıyla plazma ve safraya GSH verme oranı ile dengelenmiştir (Lu, 1999). Fizyolojik olarak balık karaciğeri besinlerin işlenmesi ve depolanması, enzimlerin ve bazı kofaktörlerin sentezi, safra oluşumu ve atılımı ve ksenobiyotik metabolizması gibi memeli karaciğeri ile benzer temel metabolik işlevlere sahiptir. Balıklar memelilerdeki birçok mikrozomal ve sitosolik enzimlere sahiptirler ve ksenobiyotiklerin işlenmesinde faz I ve faz II tepkimelerinin her ikisini de kullanırlar. Memelilerde olduğu gibi metabolizmanın amacı vücuttan atılımı kolaylaştırmak üzere ana bileşiğe oranla suda çözünür

metabolitler açığa çıkartmaktır. Memelilerle karşılaştırıldığında balıklardaki ksenobiyotik metabolizma kapasitesi daha düşüktür, bunun nedeninin ksenobiyotiğin bir kısmının solungaçlardan değişmeden atılması olduğu düşünülmektedir. Balık karaciğerinin memeli karaciğerine oranla diğer bir farklılığı balık karaciğerinde ksenobiyotik metabolizması enzimlerinin nispeten daha homojen bir dağılım göstermesidir. Bir diğer önemli farklılık ise balıklardaki CYP1A gibi monooksijenazların fenobarbital gibi sitokrom indükleyicilerine daha dirençli olabileceğidir. Toksikantın tipine bağlı olarak CYP1A induksiyonundaki direnç toksisitenin büyük oranda artmasına veya azalmasına neden olabilmektedir (Wolf ve Wolfe, 2005).

Böbrek çevresel kirleticileri de içeren birçok ksenobiyotik için hedef organlardan birisidir. Anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri nedeniyle böbrek çevresel kirleticilere karşı özellikle duyarlıdır. Böbreğin bu özelliğini arttıran faktörlerden bazıları: böbrekteki kan akışının fazla olması, değişik ksenobiyotik taşıyıcılarının ve bunları metabolize eden enzimlerin varlığı ve idrar üretimi sırasında ksenobiyotik metabolitlerinin yoğunlaştırılmasıdır (Van Vleet ve Schnellmann, 2003). Karaciğerde ve diğer organlarda açığa çıkan metabolitler selektif transport sistemleri ile böbreğe yönlendirilebilmekte ve bazı bileşiklerin GSH-konjugasyonu metabolitleri böbrekte selektif olarak biriktirebilmektedir (Dekant, 2001).

Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan *Oreochromis niloticus* Perciformes ordosunun Cichlidae familyasından olup nehir, göl, drenaj ve sulama kanalları gibi geniş bir tatlı su habitatında yaşayabilen bir balık türüdür. 8 - 42°C'de yaşayabilmekle birlikte, doğal sıcaklık aralığı 13.5 - 33°C arasındadır. Ovipar, diurnal ve omnivordur (<http://www.fishbase.org>). Kültürleri besin olarak tüketilmektedir. Biyokimyasal parametreleri yaşam ortamlarındaki kontaminasyona oldukça duyarlıdır (Almeida ve ark., 2002).



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Balıklarda çevresel kontaminantların oksidatif etkilerinin değerlendirilmesinde GSH redoks döngüsündeki ve lipid peroksidasyonundaki değişimlerin indikatör parametreler olarak kullanıldığı bir çok çalışma bulunmaktadır.

Linear alkilbenzen sülfonatların 120 saat etkisinde *Solea senegalensis*'de solungaç dokusunda GR aktivitesinin azaldığı, 72 saat depurasyon süreci sonunda ise GST aktivitesinin arttığı, GPx aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Alvarez-Munoz ve ark., 2007). Depurasyon periyodunda artan GST aktivitesinin, linear alkilbenzen sülfonatların yıkım ara ürünleri olan sülfofenil karboksilik asitlerin sudaki derişiminin artışı ile ilgili olduğu belirtilmiştir.

Yoğun balık ölümlerinin meydana geldiği krom, bakır, endosulfan, DDT ve benzen heksaklorür ile kirlenmiş nehirden ölümler sırasında ve ölümlerin durmasından iki ay sonra toplanan *Wallago attu*'da karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında GSH miktarı ve lipid peroksidasyonu düzeyi ölçülmüştür (Parvez ve ark., 2006). İki ay sonra toplanan balıklarda, suda azalan kirletici derişimleriyle birlikte, tüm dokularda GSH miktarının artış gösterdiği, lipid peroksidasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Balık ölümleri sırasında azalan GSH derişimi nedeniyle lipid peroksidasyonunun arttığı ve bu parametrelerin akuatik organizmalarda oksidant etkisini belirlemek üzere kullanılabileceği önerilmektedir.

Petrol rafinerisi atıklarının döküldüğü yerlere yakın yaşayan *Acipenser ruthenus*'da serumda  $\gamma$ -GT aktivitesinin referans bölgede yaşayanlara göre istatistiksel fark göstermediği bulunmuştur (Stanic ve ark., 2006). Karaciğer dokusunda ise GPx aktivitesinin referans bölgede yaşayanlara oranla yüksek olmasına karşın GST aktivitesinde değişim olmadığı saptanmıştır. Petrol rafinerisine yakın bölgelerde yaşayan balıklarda  $H_2O_2$  ve organik peroksit üreten süreçlerin aktif olduğu ve GPx'in bu maddelerden korunma sağlamak üzere indüklendiği bildirilmektedir. Serum  $\gamma$ -GT aktivitesinde değişim olmamasına karşın hepatik fizyolojik ve fonksiyonel değişimlere yol açan toksikolojik ve patolojik süreçlerde indikatör olarak kullanılabileceği belirtilmektedir.

Kreosot ile kirlenmiş nehir ağzından toplanan *Fundulus heteroclitus*'da karaciğer tGSH miktarının, lipid peroksidasyonunun ve selenyum-bağımsız GPx ve GR aktivitelerinin referans bölgeden toplananlara oranla yüksek, selenyum-bağımlı GPx aktivitesinin ise düşük olduğu bulunmuştur (Bacanskas ve ark., 2004). İki aylık depurasyon uygulaması ile tGSH miktarının referans bölge balıklarındaki düzeye geldiği de belirlenmiştir. Üreme mevsiminde yakalanan bu balıklarda artan antioksidant savunmanın, yumurtlama periyodu sırasında daha fazla kontaminantın balık tarafından alındığını gösterdiği bildirilmektedir.

Kağıt fabrikası atık sularının 8 ve 48 saat etkisinde bırakılan *Anguilla anguilla*'da karaciğer ve böbrek dokularında GSH miktarı ile GPx ve GST aktivitelerinin sadece 48 saat sonunda azaldığı saptanmıştır (Santos ve ark., 2004). Karaciğer ve böbrek dokularındaki değişimlerin fabrika atık suyundaki redoks aktif bileşiklerin uzun süreli etkisiyle ilişkili olabileceği ve GST aktivitesindeki azalmanın doku hasarı nedeniyle detoksifikasyon süreçlerindeki düzensizliği yansıttığı bildirilmektedir.

Glutasyon ve GSH-bağımlı enzimlerin ve lipid peroksidasyonunun pestisid kirliliğinin indikatörü olarak kullanıldığı çalışmalardan bir kısmı balıklarda yapılan laboratuvar çalışmalarıdır.

Diuron, linuron ve propanil gibi herbisidlerin ön maddesi olarak kullanılan 3,4-dikloroanilin düşük derişimlerinin 96 saat etkisinde *Pomatoschistus microps*'da solungaç GST aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Monteiro ve ark., 2006a), yüksek derişimlerde enzim aktivitesi kontrol düzeylerine ulaşmıştır. Bu sonuca göre 3,4-dikloroanilin detoksifikasyonunda GST'nin yer alıp almadığına ilişkin daha ileri çalışmalar yapılması tavsiye edilmektedir.

Herbisid oxyfluorfen etkisinde *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda GST ve GR enzim aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (Peixoto ve ark., 2006). GST aktivitesinin faz-I konjugat metabolizmasının artması ile arttığı ve artan oksidatif stres koşullarında GR aktivitesinin GSH/GSSG oranını korumak üzere indüklendiği bildirilmiştir.

İntraperitoneal olarak uygulanan pestisid endüstrisi yan ürünü 2-klorofenolün 24 saat etkisinde kalan *Carassius auratus*'da karaciğer dokusunda GST aktivitesinin

arttığı, GSH ve GSSG miktarlarının ve GSH/GSSG oranının azaldığı saptanmıştır (Luo ve ark., 2006). 2-klorofenolun faz-II biyotransformasyonunda GST tarafından kullanılan GSH'ın, artan 'OH nedeniyle sentezinin arttırıldığı, fakat yoğun oksidatif koşullar altında adaptif mekanizmanın kaybedilerek GSH'ın GSSG'ye oksitlenmesi ile GSH/GSSG redoks durumunun bozulduğu bildirilmektedir.

Herbisid paraquat etkisinde *Channa punctata*'da karaciğer ve solungaç dokularında GSH miktarının azaldığı, böbrek dokusunda herhangi bir değişimin olmadığı belirlenmiştir (Parvez ve Raisuddin, 2006). Paraquat etkisiyle bu dokularda lipid peroksidasyonu da değişmemiştir. GSH'ın paraquatın oksidatif etkilerine karşı koruyucu rol oynadığı ve böylece doku bütünlüğünün sürdürülmesinde kritik işlevler yerine getirdiği belirtilmiştir.

Piretroid insektisid deltamethrin etkisinde *C. punctata*'da karaciğer ve böbrek dokularında GPx, GR ve GST enzim aktiviteleri ile GSH miktarının ve lipid peroksidasyonunun artış gösterdiği saptanmıştır (Atif ve ark., 2005). Deltamethrinin balık dokularında oksidatif stres indüklemeye potansiyelinin olduğu ve GSH'ın deltamethrin etkisine uyum sağlamak üzere koruyucu bir mekanizma sağladığı bildirilmiştir.

Herbisid 2,4-D'nin ön maddesi olarak kullanılan 2,4-diklorofenol etkisinde *C. auratus*'da karaciğer dokusunda GSSG miktarında değişim olmadığı halde tGSH ve GSH/GSSG oranının azaldığı belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2005b). 2,4-diklorofenol etkisiyle GR ve GST aktivitelerinin artış gösterdiği, kısa süreli etkide azalan GPx aktivitesinin sürenin uzamasıyla kontrole oranla önemli derecede arttığı bulunmuştur. tGSH miktarının 2,4-diklorofenol etkisine özellikle duyarlı olması nedeniyle akuatik ekosistemlerde 2,4-diklorofenol kontaminasyonu için erken uyarı indikatörü olarak kullanılabilmesi önerilmektedir.

Herbisid ön maddesi olarak kullanılan 3,4-dikloroanilin 15 gün etkisinde *C. auratus*'da karaciğer dokusunda derişime bağımlı olmaksızın GSH miktarının ve lipid peroksidasyonu düzeyinin azaldığı saptanmıştır (Li ve ark., 2003). GSH miktarındaki azalmanın 3,4-dikloroanilin balık karaciğerindeki antioksidant sistemi zayıflatmasının göstergesi olduğu bildirilmiştir.

Herbisid molinatenin 29 saat etkisinde ölen *A. anguilla*'da karaciğer ve kas GSH miktarı ile GR aktivitesinin azaldığı, sürenin uzamasıyla hayatta kalan balıklarda karaciğer tGSH ve GSH miktarlarının azaldığı, GSSG miktarının ve GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2001). Bu örneklerin kas dokusunda ise 96. saatte GSSG miktarı değişmemiş, tGSH ve GSH miktarları azalmıştır. GSH/GSSG dengesini koruyabilen balıkların hayatta kaldığı ve bu balıkların artan karaciğer GSH miktarı ve GR aktivitesi ile karakterize edildiği bildirilmektedir. Kısa sürede ölen balıkların GR aktivitesinin düşmesiyle GSH homeostasisini koruyamadıkları belirtilmiştir.

Tiyokarbamat herbisid thiobencarb etkisinde *A. anguilla*'da karaciğer dokusunda 96 saat sonunda hayatta kalanlarda tGSH, GSH ve GSSG miktarlarının kontrole oranla önemli derecede arttığı saptanmıştır (Pena ve ark., 2000). Thiobencarb herbisidine duyarlı olan balıklarda ise GSH redoks durumunda herhangi bir değişiklik bulunamamıştır. Hayatta kalanlarda GSH/GSSG oranının oldukça düşük olduğu da belirlenmiştir. GSH'nin konjugasyon tepkimeleri ile ve GPx aracılıklı indirgeme tepkimeleri ile pestisidin ve elektrofilik pestisid metabolitlerinin toksik etkilerine karşı direnç sağladığı belirtilmiştir.

GSH miktarının, GSH-bağımlı enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyonunun belirlendiği laboratuvar çalışmalarından bir kısmı balıklarda OP pestisidlerin toksik etkilerinin değerlendirilmesi ile ilgilidir.

Fenthionun 96 saat etkisinde *Cyprinus carpio*'da karaciğer dokusunda tGSH, GSH miktarlarının, GSH/GSSG oranının ve  $\gamma$ -GCS, GR ve GST enzim aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir (Sevgiler ve ark., 2007). Buna karşın TBARS miktarı ve  $\gamma$ -GT aktivitesi artmıştır. GSH'nin tüketilmesi ve GSH redoks durumunun korunmasında önemli olan GR ve  $\gamma$ -GCS aktivitelerinin azaltılması yoluyla fenthionun *C. carpio*'da GSH redoks dengesini bozarak oksidatif etkilere neden olduğu belirtilmiştir.

Azinphos-metilin 24, 48 ve 96 saat etkisinde *Onchorhynchus mykiss*'de karaciğer ve böbrek GSH miktarlarının süreye ve derişime bağımlı olmaksızın azaldığı, GST aktivitesinin ise değişmediği saptanmıştır (Ferrari ve ark., 2007).

GSH'ın artan ROS'u elimine etmek amacıyla kullanılmış olabileceği ve GST aktivitesinin indüksiyonunun balıklarda türe-bağımlı olabileceği bildirilmiştir.

Diazinon etkisinde *O. niloticus*'da GPx spesifik aktivitesinin dokuya-bağımlı değişimler gösterdiği belirlenmiştir (Durmaz ve ark., 2006). Böbrek dokusunda artan enzim aktivitesi, sindirim kanalında azalma göstermiş, kas ve solungaç dokularında ise değişmemiştir. Benzer olarak lipid peroksidasyonu düzeyleri de dokuya-bağımlı olarak kas ve böbrekte artmış, sindirim kanalında azalmış, solungaç dokusunda değişmeden kalmıştır. Diazinonun antikolinesteraz etkisi nedeniyle artan ROS üretimine bağlı olarak lipid peroksidasyonunun artabileceği bildirilmiştir. GPx spesifik aktivitesinin ise artan katalaz enzim aktivitesi nedeniyle substrat yarışıması sonucu azalmış olabileceği ileri sürülmüştür.

Metil-parathionun 96 saat etkisinde *Brycon cephalus*'da kas ve solungaç dokularında GPx aktivitesinin ve GSH miktarının azaldığı, GST aktivitesinin ve TBARS miktarının arttığı saptanmıştır (Monteiro ve ark., 2006b). Karaciğer dokusunda ise GPx aktivitesi ve TBARS miktarı değişmemiş, artan GST aktivitesine bağlı olarak GSH miktarı azalmıştır. Dokularda GPx aktivitesindeki azalmanın ve GST aktivitesindeki artışın, azalan GSH miktarları ile ilgili olduğu bildirilmektedir.

Organofosforlu insektisid RPR-V etkisinde *O. mossambicus*'da süreye-bağımlı olarak karaciğer, beyin ve solungaç dokularında GSH miktarının azaldığı ve karaciğer GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Rao, 2006a). Artan GST aktivitesinin lipid peroksitlerinin detoksifikasyonu için GSH konjugasyonunda artışa neden olduğu ve GSH miktarındaki azalmanın balıklarda çevresel stresin belirlenmesinde yararlı bir biyomarker olduğu bildirilmiştir.

Organofosforlu insektisid RPR-II etkisinde *O. mossambicus*'da süreye-bağımlı olarak karaciğer, beyin ve solungaç dokularında GSH miktarının azaldığı ve karaciğer GST aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Rao, 2006b). Artan GST enzim aktivitesinin pestisid etkisinden korunmada önemli olduğu belirtilmiştir.

Monocrotophos etkisinde *O. mossambicus*'da süreye-bağımlı olarak karaciğer, beyin ve solungaç dokularında GSH miktarının azaldığı ve karaciğer GST aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Rao, 2006c). GSH miktarındaki azalmayla birlikte

GST aktivitesindeki artışın, ksenobiyotiklerin indüklediği lipid peroksidasyonundan korunmada önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

Chlorpyrifosun 96 saat etkisinde *Gambusia yucatana*'da solungaç dokusunda GST aktivitesinde herhangi bir değişimin meydana gelmediği ve chlorpyrifos detoksifikasyonunda GST'nin yer almadığı bildirilmiştir (Rendon-von Osten ve ark., 2005).

Hücrel GSH düzeylerinin BSO gibi inhibitörlerle azaltılması GSH eksikliğinde ortaya çıkabilecek durumların aydınlatılmasında deneysel model sağlamaktadır. Hücrel GSH düzeylerinin NAC gibi ön maddeler ve GSH taşıyıcı bileşiklerle desteklenmesi de terapötik anlamda kullanışlı olabilmektedir (Anderson, 1998).

Organofosforlu fenthion etkisindeki *C. carpio*'da karaciğerde düşük doz NAC uygulamasının fenthiondan kaynaklanan lipid peroksidasyonuna ve GSH azalmasına herhangi bir düzeltici etkisi olmamasına karşın fenthion etkisiyle azalan GSH/GSSG oranını, GSSG ve protein miktarlarını arttırdığı,  $\gamma$ -GCS aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Sevgiler ve ark., 2007). Yüksek doz NAC'nin ise fenthiondan kaynaklanan GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının azalmasına,  $\gamma$ -GCS aktivitesinin düşmesine ve lipid peroksidasyonuna katkı yaptığı belirtilmiştir. Düşük doz NAC'nin GSH sentezinin stimule edilmesinden çok kendi antioksidant özelliği ile fenthionun toksik etkilerinden korunma sağladığı, buna karşın yüksek dozda NAC'nin ROS oluşturma yeteneğine bağlı olarak fenthionun oksidatif etkilerini arttırmış olabileceği bildirilmektedir.

Karbamatlı insektisid carbofuran etkisinde sıçan beyin korteks ve serebellumunda artan lipid peroksidasyonunun ve azalan GSH miktarının ve GPx ve GR aktivitelerinin NAC etkisiyle kontrol düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir (Kamboj ve ark., 2006). NAC'nin taşıdığı tiyol grubu nedeniyle doğrudan antioksidant etki yaptığı veya GSH sentezini artırarak carbofuranın oksidatif stres aracılıklı nörotoksik etkilerinden korunma sağladığı belirtilmiştir. Diğer bir olasılıkla NAC'nin carbofurana bağlanarak beyine girmesini engellemiş olabileceği de ileri sürülmektedir.

Bütiyonin sülfoksimin uygulanan sıçan pheochromocytoma (PC-12) hücre kültüründe fungusid manebin düşük derişimlerinin etkisinde GSH miktarının arttırılabildiği, fakat fungusidin yüksek derişimlerinde GSH miktarının oldukça azaldığı belirlenmiştir (Barlow ve ark., 2005). Manebin antioksidant savunmayı tetiklediği, fakat BSO uygulamasının bu sisteme ek yük getirerek savunmanın kendini yenilemesini engellediği belirtilmiştir. Buna göre çevresel etkiler, gen-çevre etkileşimi veya genetik bozukluk nedeniyle zaten baskı altında olan antioksidant sistemlerde manebin daha toksik hale gelebileceği ve homeostatik dengeyi olumsuz yönde etkileyeceği bildirilmektedir.

Organofosforlu insektisid dichlorvosun 96 saat etkisinde *A. anguilla*'da kas dokusunda GSH miktarının, GSH/GSSG oranının ve beyin GR aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Dichlorvos etkisinden sonra temiz suda 96 saat bekletilen balıklara oranla NAC içeren suda 96 saat bekletilen balıklarda kas dokusu GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının ve GR aktivitesinin arttığı saptanmıştır. NAC derişimini belirlemek üzere yapılan ön çalışmalarda NAC'nin yüksek derişimlerde balıkların ölümüne neden olduğu da gösterilmiştir. NAC'nin GSH sentezini sınırlayan sistein aminosidi kaynağı olarak kullanılmasıyla pestisidin detoksifikasyonuna ve eliminasyonuna yardımcı olduğu belirtilmektedir.

*N*-asetilsistein enjekte edilip dichlorvos içeren suda 96 saat bekletilen *A. anguilla*'da karaciğer dokusunda dichlorvos etkisindeki balıklara oranla GSH miktarının, GSH/GSSG oranının, GR, GST,  $\gamma$ -GT ve  $\gamma$ -GCS enzim aktivitelerinin kontrol düzeylerine daha yakın olduğu belirlenmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2003b). NAC'nin GSH düzeylerinin korunmasını sağlayarak, dichlorvosun detoksifikasyonunu ve dichlorvos kaynaklı ROS'un uzaklaştırılmasını etkili bir şekilde desteklediği bildirilmiştir.

Organoklorlu insektisid endosulfan etkisinde *O. mykiss* adrenokortikal hücre kültüründe BSO'nun GSH azalmasını, GPx inhibisyonunu ve lipid peroksidasyonu arttısını desteklemesine karşın NAC'nin endosulfanın bu etkilerine karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (Dorval ve Hontela, 2003). GSH redoks döngüsünün endosulfan kaynaklı toksisiteden korunmada önemli olduğu ve endosulfan

etkisindeki hücrelerde BSO ve NAC'nin GSH redoks döngüsünün düzenlenmesinde oldukça etkili ajanlar oldukları bildirilmektedir.

Fungusid NDPS'nin ve metabolitlerinin etkisindeki sıçanlarda böbrek ve karaciğer dokularında NAC enjeksiyonunun total non-protein sülfidrillerin ve redükte non-protein sülfidrillerin miktarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Rankin ve ark., 2002). NDPS ve metabolitlerinin nefrotoksisitenin belirlenmesinde marker olarak kullanılan proteinüriye ve kan üre nitrojeninde (BUN) artışa, aynı zamanda böbrek doku nekrozuna neden oldukları, fakat NAC enjeksiyonunun bu tip etkilere karşı oldukça etkili koruma sağladığı da belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre NAC'nin GSH veya sistein düzeylerinin desteklenmesi yerine doğrudan metabolitlerle kimyasal etkileşim sonucu koruma sağladığı belirtilmektedir.

İnsan deri fibroblastlarında fungusid thiram etkisinde artan lipid peroksidasyonuna karşı NAC'nin koruyucu etki yaptığı, BSO'nun ise thiram aracılıklı lipid peroksidasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Cereser ve ark., 2001). NAC verilen hücrelerde thiram etkisiyle artan hücre ölümlerinin azaldığı, BSO etkisiyle hücre ölümlerinin daha da arttığı belirlenmiştir. Hücrede tiyol içeren bileşiklerin thiram sitotoksisitesinde birincil önemde olduğu ve NAC'nin havuzdaki GSH oranını arttırarak thiram sitotoksisitesine karşı koruma sağladığı, BSO'nun ise GSH azaltılması yoluyla hücrede fazladan baskı oluşturduğu belirtilmiştir.

Bütiyonin sülfoksimin etkisindeki sıçan hepatosit kültüründe  $ZnSO_4$ 'ın GSH miktarının ve GPx aktivitesinin azalmasına neden olduğu, böylece hücrede oksidatif durum oluşturarak Zn'un antioksidant sisteme zarar vermesine yol açtığı bildirilmiştir (Haidara ve ark., 1999).

Birçok çevresel ajan GSH gibi tiyollerin metabolizmasını manipule ederek hücrel redoks durumunda doğrudan veya dolaylı zararlı etkiler göstermektedir. Bu tip çevresel kirleticilerin önemli biyokimyasal süreçleri nasıl etkilediğinin anlaşılması patolojilerinin ve diğer süreçlerdeki redoks-aracılıklı değişim etkilerinin anlaşılmasına yardım etmektedir (Dickinson ve Forman, 2002). Fenthionun balıklarda GSH metabolizmasına etkileri ve oksidatif stres potansiyeli laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Piner, 2005; Sevgiler ve ark., 2007). Piner (2005) *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthionun



GSH metabolizmasında düzensizliklere neden olduğunu, BSO'nun bu düzensizliklere katkıda bulunduğunu, buna karşın lipid peroksidasyonunda herhangi bir değişim olmadığını, uygulanan NAC derişiminin ise GSH redoks döngüsüne ek bir yük getirdiğini belirtmektedir.

Tez çalışmasında Amerika Birleşik Devletleri'nin ve Kanada'nın resmi çevre kuruluşları tarafından yasaklandığı halde ülkemizde üretimi ve kullanımı sürdürülen fenthionun hedef olmayan akuatik organizmalarda hücrel redoks durumuna etkilerinin değerlendirilmesi ve uğradığı metabolik süreçler içerisinde GSH'ın rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmalar, model olarak seçilen tatlı su balığı *O. niloticus*'da, detoksifikasyonda merkezi rolü oynayan karaciğer ve metabolitlerin atıldığı ve selektif olarak biriktirilebildikleri böbrek dokularında yürütülmüştür. Fenthionun GSH redoks durumuna, GSH-bağımlı enzim aktivitelere ve lipid peroksidasyonuna etkileri tek başına ve GSH metabolizması modülatörleri olan BSO ve NAC varlığında incelenmiştir. Ayrıca fenthion etkisinden sonra 96 saatlik depurasyon sürecinin fenthionun oksidatif toksisitesine olası etkileri de anılan parametrelerin incelenmesi yoluyla değerlendirilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan  $49.61 \pm 9.56$  g ağırlıkta ve  $15.14 \pm 2.35$  cm boydaki juvenil *O. niloticus* örnekleri Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuvarımıza getirilmiştir. Balıklar merkezi sistemle havalandırılan ve dinlendirilmiş musluk suyu içeren, 160 L'lik cam akvaryumlarda 10 ay süreyle laboratuvar koşullarına adapte edilmişlerdir. Suyun özellikleri; sıcaklık  $21.22 \pm 0.79^\circ\text{C}$ , pH  $7.83 \pm 0.23$ , çözülmüş oksijen  $7.64 \pm 0.98$  mg/L, toplam sertlik 303 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , alkalinite 305 mg/L  $\text{CaCO}_3$ 'tür. Laboratuvarda 12 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Balıklar deneme süresince günde bir kez aynı saatlerde ağırlıklarının %3'ü kadar hazır yavru sazan balık yemi ile beslenmişlerdir (Çamlı Yem, Türkiye).

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

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

1-Kloro-2,4-Dinitro-Benzen	CDNB	Sigma
2-Tiyobarbitürik Asit	TBA	Merck
2-Vinilpiridin		Aldrich
5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)	DTNB	Sigma
5-Sülfosalisilik Asit		Sigma
Asetik Asit	$\text{CH}_3\text{COOH}$	Riedel-deHaen
Bakır Sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Merck
di-Sodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit	EDTA	Sigma
di-Sodyum Hidrojen Fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
Etil Alkol		Riedel-deHaen

Folin-Ciocalteu's Fenol Ayırıcı		Sigma
Glutasyon Redüktaz	GR	Sigma
L-Bütyonin Sülfoksimin	BSO	Sigma
L- $\gamma$ -Glutamil <i>p</i> -Nitroanilid		Sigma
Magnezyum Klorür	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck
<i>N</i> -Asetilsistein	NAC	Merck
<i>n</i> -Butanol		Merck
Okside L-Glutasyon	GSSG	Sigma
Piridin		Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Redükte L-Glutasyon	GSH	Sigma
Sığır Serum Albumini		Sigma
Sodyum Dihidrojen Fosfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck
Sodyum Hidroksit	NaOH	Merck
Sodyum Karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
Sodyum Klorür	NaCl	Merck
Sodyum Lauril Sülfat	SDS	Sigma
Sodyum Potasyum Tartarat		Merck
Sükroz		Sigma
<i>t</i> -Butil Hidroperoksit		Sigma
Tiyobarbiturik asit	TBA	Merck
Tris Baz	Tris Baz	Sigma
Tris Hidroklorür	Tris HCl	Sigma
$\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat	$\beta$ -NADPH	Sigma

### 3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. Analitik Terazi	Sartorius CP-224S
2. Benmari	Memmert WB 22
3. Buz Makinası	Scotsman AF 20
4. Distile Su Cihazı	Şimşek Labor teknik SS-200

5. Homojenizatör	Janke&Kunkel Ultra-Turrax T-25
6. Oksijenmetre	Mettler-Toledo MO 128
7. Otomatik Pipetler	Gilson, Eppendorf, Labart, Biohit
8. pH Metre	Hanna Instruments PH 211
9. Santrifüj	Hettich EBA 8S
10. Soğutmalı Santrifüj	Jouan MR 23i
11. Spektrofotometrik Analiz Küvetleri	Hellma
12. Terazî	Sartorius BP-310S
13. UV-Visible Spektrofotometre	Shimadzu UV mini 1240
14. Vorteks	Janke&Kunkel VF-2

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Toksikoloji Denemeleri

Toksikoloji denemeleri stok akvaryumlarla aynı laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir. Biri kontrol grubu olmak üzere her grupta 30'ar balık, her biri 160 L olan ve 140 L dinlendirilmiş musluk suyu içeren dört akvaryuma tesadüfi olarak dağıtılmıştır. Deney kurgusu aşağıdaki şekildedir:

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki balıklara deneyin başlamasından önce fizyolojik su enjeksiyonu (%0.59 NaCl) yapılmış ve temiz suda bekletilmişlerdir.
2. Fenthion grubu: Bu gruptaki balıklara deneyin başlamasından önce fizyolojik su enjeksiyonu yapılmış ve etki süreci boyunca fenthion içeren suda bekletilmişlerdir.
3. BSO grubu: Bu gruptaki balıklara deneyin başlamasından önce fizyolojik suda çözülmüş 50 mg/kg BSO enjeksiyonu yapılmış ve etki süreci boyunca fenthion içeren suda bekletilmişlerdir.
4. NAC grubu: Bu gruptaki balıklara deneyin başlamasından önce fizyolojik suda çözülmüş 100 mg/kg NAC enjeksiyonu yapılmış ve etki süreci boyunca fenthion içeren suda bekletilmişlerdir.

*Oreochromis niloticus* için fenthionun 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 2.27 mg/L'nin (Piner, 2005) %20'si olan 0.45 mg/L nominal derişimi denemelerde uygulanmak üzere seçilmiştir. Denemeler başlamadan önce BSO, NAC veya fizyolojik su enjeksiyonu için balıklar içerisinde buzlu su bulunan akvaryumda bayıltılmışlardır. Kimyasallarla anestezi işlemi GSH metabolizması ile girişim verebileceğinden (Pena-Llopis ve ark., 2003b) tercih edilmemiştir. Enjeksiyondan sonra balıklar anestezinin etkilerinden arınmaları için temiz su içeren akvaryumlarda 3 saat bekletilmişlerdir (Pena-Llopis ve ark., 2003b). Bu süre sonunda balıklar fenthionun etkilerinin belirlendiği 24, 48 ve 96 saat etki sürecinde fenthion içeren akvaryumlarda, daha sonra depurasyon etkisinin belirlenmesi amacıyla 24, 48 ve 96 saat depurasyon sürecinde temiz su içeren akvaryumlarda izlenmişlerdir. Denemeler süresinde fenthion derişimindeki değişimleri en aza indirmek üzere su 24 saatte bir değiştirilmiştir. Suyun değiştirilmesi balıkların yeni hazırlanmış akvaryumlara aktarılması şeklindedir. Aktarmadan kaynaklanabilecek stresi elimine etmek üzere kontrol balıkları da benzer şekilde temiz su içeren akvaryumlara 24 saatte bir aktarılmışlardır (Dutta ve Arends, 2003). Aynı işlemler depurasyon sürecinde de uygulanmıştır. Her süre sonunda her akvaryumdan 5'er balık çıkartılarak dekapitasyonla öldürülmüş, karaciğer ve böbrek dokuları buz üzerinde disekte edilip fizyolojik su ile yıkanmış, kurutulup tartılarak analiz edilinceye kadar -75°C'de saklanmışlardır.

Biyokimyasal analizlere başlamadan önce karaciğer dokusu için 1/5 (w/v) ve böbrek dokusu için 1/20 (w/v) olacak şekilde dokular 0.25 M sükröz içeren 50 µM, pH 7.4 soğutulmuş sodyum-fosfat tamponunda homojenizatör ile 10000 rpm'de 5 dakika homojenize edilmiştir. Isınma nedeniyle meydana gelebilecek enzim aktivite kaybını önlemek üzere örnekler buz içerisinde homojenize edilmişlerdir. Homojenatlar +4°C'de 9500 g'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant GPx, GR, GST, γ-GT enzim aktiviteleri ile MDA ve protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. tGSH, GSSG miktarlarının belirlenmesi amacıyla, hazırlanan süpernatantlar 1/0.5 (v/v) oranında %10'luk 5-sülfosalisilik asit ile karıştırılıp 9500 g'de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.

### 3.2.2. Biyokimyasal Analizler

#### 3.2.2.1. Total GSH ve GSSG Yöntemi

Total GSH miktarı, DTNB, NADPH ve GR varlığında enzimatik döngü prosedürü ile ölçülmektedir (Anderson, 1985). GSH DTNB tarafından okside edilirken, ortamda bulunan GSSG ve diğer çözünen tiyol bileşikleriyle GSH'ın oluşturduğu disülfid bağlanmaları GR enzimi varlığında  $\beta$ -NADPH'in indirgenmesiyle GSH'a dönüştürülmektedir. Meydana gelen sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin absorbanı 412 nm'de ölçülmektedir. Elde edilen absorban değerleri standart GSH grafiği ile derişim değerlerine dönüştürülmektedir.

#### Ayıracılar

1. 143 mM Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.5)
2. 0.3 mM  $\beta$ -NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutasyon Redüktaz

#### Yöntem

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

Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi

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

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C'de, 0. dakika ve 3. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedilir. Sonuçlar GSH ile hazırlanan standart grafikten değerlendirilir.

### **Okside Glutasyon Yöntemi**

Okside glutasyon miktarı, tGSH miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile belirlenmektedir. Farklı olarak, 5-sülfosalisilik asit homojenatı ölçümden önce aşağıdaki gibi 2-vinilpiridin ile türevlendirilmektedir ve bu işlem sonunda yalnızca GSSG miktarı ölçülmektedir (Griffith, 1980).

### **Örnek Hazırlanması**

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

### **Ayırıcılar**

1. 143 mM Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.5)
2. 0.3 mM NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutasyon Redüktaz

### **Yöntem**

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

Çizelge 3.2. Okside Glutatyon Yöntemi

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

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C'de, 0. dakika ve 3. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedilir. Sonuçlar tGSH için hazırlanan standart grafikten değerlendirilir.

#### Redükte GSH ve GSH/GSSG oranlarının belirlenmesi

Redükte GSH, tGSH miktarından GSSG miktarının çıkartılmasıyla belirlenmektedir. Bu işlem için şu formül kullanılmaktadır:

$$tGSH = GSH + 2 \times GSSG$$

GSH/GSSG oranı ise şu formülle hesaplanmaktadır (Pena-Llopis ve ark., 2001):

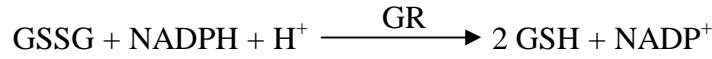
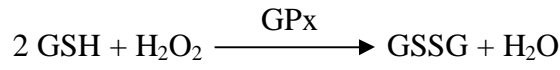
$$\frac{GSH}{GSSG} = \frac{tGSH - GSSG}{GSSG/2}$$

Total GSH, GSH ve GSSG derişimleri her mg protein içerisindeki µg GSH ekivalenti olarak verilmiştir.



### 3.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

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



#### Ayırıcılar

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

#### Yöntem

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

Çizelge 3.3. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Örnek (µL)
Saf su	660
Tris Tamponu	100
GSH	25
GR	100
β-NADPH	100
Örnek	10
37°C'de 10 dakika inkübe edilir.	
<i>t</i> -Bütil Hidroperoksit	10

37°C'de, 340 nm dalga boyunda 0., 2.5., 5. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedilir.

### Hesaplama

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

$\Delta \text{ABS}$  = Zamana göre absorbans değişimi

$t$  = Zaman

$V_t$  = Toplam hacim

$V_0$  = Örnek hacmi

6.22 = 1 nmol β-NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri.

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

### 3.2.2.3. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

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

#### Ayırıcılar

1. 100 mM Na Fosfat Tamponu (pH 8.0)
2. 0.12 mM  $\beta$ -NADPH (Günlük hazırlanır.)
3. 1 mM GSSG (Günlük hazırlanır.)

#### Yöntem

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

Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu$ L)	Örnek ( $\mu$ L)
Saf su	100	-
Günlük Tampon	900	900
Örnek	-	100

Çalkalanarak 37°C'de, 340 nm dalga boyunda köre karşı 0. ve 5. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedilir.

#### Hesaplama

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

$\Delta$ ABS= Zamana göre absorbans değişimi

V<sub>t</sub> = Toplam Hacim

Vö = Örnek Hacmi

6.22 = 1 nmol  $\beta$ -NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri.

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

#### 3.2.2.4. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Glutasyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin GSH'ın -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GST aktivitesi, 340 nm dalga boyunda CDNB'nin GSH ile konjugasyonu sırasındaki absorbans değişiminin izlenmesi ile ölçülür (Habig ve ark., 1974).

##### Ayırıcılar

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

##### Yöntem

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

Çizelge 3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu$ L)	Örnek ( $\mu$ L)
Tris Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

340 nm dalga boyunda, 25°C'de, 2 dakika boyunca absorbans değerindeki artış izlenir.

**Hesaplama**

$$\text{GST Aktivitesi(U/mL)} = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{0.0096 \times V_0}$$

$\Delta\text{ABS}$  = Zamana göre absorbans değişimi

$V_t$  = Toplam Hacim

$V_0$  = Örnek Hacmi

0.0096: 1 mM CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri.

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi(U/mg protein)} = \frac{\text{GSTAktivitesi}}{\text{ProteinMiktari}}$$

**3.2.2.5.  $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi**

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

**Ayırıcılar**

1. 100  $\mu\text{M}$  Tris Tamponu (pH 9)
2. 5  $\mu\text{M}$  L- $\gamma$ -glutamil-*p*-nitroanilid
3. 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$

**Yöntem**

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

Çizelge 3.6.  $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz Yöntemi

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

410 nm dalga boyunda, 37°C'de, 2 dakika boyunca absorbans değerindeki artış izlenir.

### Hesaplama

$$\gamma\text{-GT Enzim Aktivitesi} = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{V_0 \times 2.2}$$

$\Delta\text{ABS}$  = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V<sub>t</sub> = Toplam Hacim

V<sub>0</sub> = Örnek Hacmi

2.2: 1 mM L- $\gamma$ -glutamil-*p*-nitroanilidin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri.

### 3.2.2.6. Malondialdehid Yöntemi

Malondialdehid aerobik koşullarda, pH 3.5'te TBA ile 95°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark., 1979).

### Ayırıcılar

1. %8.1 SDS
2. %20 CH<sub>3</sub>COOH (pH 3.5)

3. %0.8 TBA (pH 3.5)
4. *n*-Butanol-piridin çözeltisi (14/1)
5. Stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk 0.99 g/mL)

### Yöntem

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

Çizelge 3.7. Malondialdehid Yöntemi

Çözeltiler	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Standart(10 nmol/mL)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
%8.1 SDS	0.2	0.2	0.2
%20 CH <sub>3</sub> COOH	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.			
Saf su	1.0	1.0	1.0
<i>n</i> -butanol-piridin	5.0	5.0	5.0

Kuvvetle vortekslenir ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbansı okunur. Sonuçlar standart grafikten değerlendirilir.

### 3.2.2.7. Protein Yöntemi

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

Proteinlerin çoğu tirozin, triptofan veya her iki amino asiti de içerirler. Bu amino asitler serbest veya katlanmamış bir polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungustik asit-molibdik asit ayırıcını (Folin-Ciocalteu ayırıcı)

indirgerler. Bu yöntemde proteinler bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak üzere alkali çözeltide  $\text{Cu}^{2+}$  ile tepkimeye girerler. Ortama Folin-Ciocalteu ayırıcı eklendiğinde indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan rezidüleri birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbanı 750 nm dalga boyunda ölçülür (Lowry ve ark., 1951).

### **Ayıraçlar**

1. Alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi
2. Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (1:1)  
%1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
%2 Sodyum potasyum tartarat
3. Alkali çözelti: 50 mL alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi 1 mL Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanır.
4. Folin-Ciocalteu ayırıcı: 1 mL Folin-Ciocalteu 1.5 mL saf su ile karıştırılarak hazırlanır.

### **Yöntem**

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

### **Hesaplama**

Örneklerin içerdiği protein miktarı sığır serum albumini kullanılarak çizilen standart grafikten değerlendirilir.

### **3.2.3. İstatistiksel Analiz**

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 13.0 paket programında (SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D.) OneWay-ANOVA Duncan testi kullanılarak  $P < 0.05$  önem derecesinde belirlenmiştir (Kinnear ve Gray, 1995).



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

Bu çalışmada *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında OP fenthionun GSH metabolizmasına ve lipid peroksidasyonuna etkileri 24, 48 ve 96 saat sürelerde araştırılırken, BSO ve NAC'nin modülasyon etkileri de belirlenmiştir. Ayrıca 96 saat fenthion etkisinden sonra 24, 48 ve 96 saat süreler ile depurasyon uygulanarak GSH metabolizması ve lipid peroksidasyonundaki değişimler incelenmiştir.

#### 4.1.1. Etki Süreci

##### 4.1.1.1. Fenthionun GSH Metabolizmasına Etkileri

Karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.'de, GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda 24 saat fenthion etkisinde tGSH (%20) ve GSSG (%106) miktarları artmış, GSH/GSSG oranı (%47) azalmıştır (Şekil 4.1.). 96. saatte tGSH, GSH ve GSSG miktarları sırasıyla %18, %34 ve %33 oranlarında azalma göstermiştir. tGSH ve GSSG miktarlarındaki azalma süreye bağımlıdır (Çizelge 4.1.). 24. saatte artan GSSG miktarı ile birlikte GR enzim aktivitesi de %18 oranında artmıştır. Fenthion tüm etki sürelerinde GST aktivitesinin artmasına ve GPx aktivitesinin azalmasına neden olmuştur (Çizelge 4.2.). GPx aktivitesinde gözlenen azalma oranları yakın değerlerdedir (24., 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %20, %23 ve %25). GST aktivitesindeki en belirgin artış %64 ile 24. saatte görülmüştür (Şekil 4.2.).

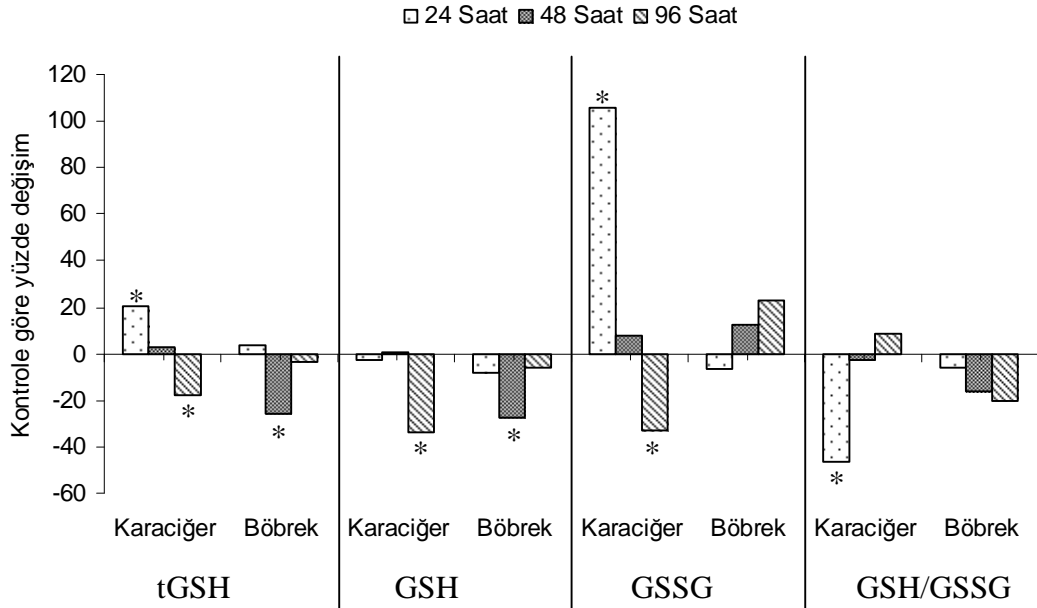
Böbrek dokusunda yalnız 48. saatte tGSH miktarında %26, GSH miktarında ise %27 oranında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.1.). GSSG miktarlarında ve GSH/GSSG oranlarında ise herhangi bir değişim saptanmamıştır. Böbrek dokusunda, karaciğer dokusundan farklı olarak fenthion, GPx aktivitesini hiçbir sürede

etkilemezken, 48. saatte GST aktivitesinin %48 azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.2.), diğer sürelerde GST aktivitesi kontrolden istatistiksel olarak farksızdır ( $P>0.05$ ). Fenthion her iki dokuda da tüm etki süreleri sonunda  $\gamma$ -GT ve 24. saatte karaciğer dışında GR aktivitelerinde herhangi bir değişim meydana getirmemiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

		Doku	24 Saat	48 Saat	96 Saat
tGSH	K.c.iğer	Kontrol	2.03±0.07 <sup>ax</sup>	2.03±0.10 <sup>ax</sup>	2.03±0.04 <sup>ax</sup>
		Fenthion	2.44±0.08 <sup>bx</sup>	2.09±0.02 <sup>ay</sup>	1.67±0.04 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Kontrol	2.30±0.06 <sup>ax</sup>	2.27±0.16 <sup>ax</sup>	2.27±0.11 <sup>ax</sup>
		Fenthion	2.39±0.05 <sup>ax</sup>	1.68±0.10 <sup>by</sup>	2.19±0.15 <sup>ax</sup>
GSH	K.c.iğer	Kontrol	1.31±0.05 <sup>ax</sup>	1.32±0.05 <sup>ax</sup>	1.31±0.10 <sup>ax</sup>
		Fenthion	1.28±0.12 <sup>ax</sup>	1.33±0.10 <sup>ax</sup>	0.87±0.06 <sup>by</sup>
	Böbrek	Kontrol	1.76±0.07 <sup>ax</sup>	1.74±0.16 <sup>ax</sup>	1.66±0.07 <sup>ax</sup>
		Fenthion	1.61±0.05 <sup>ax</sup>	1.27±0.12 <sup>by</sup>	1.56±0.11 <sup>axy</sup>
GSSG	K.c.iğer	Kontrol	0.36±0.04 <sup>ax</sup>	0.40±0.03 <sup>ax</sup>	0.43±0.06 <sup>ax</sup>
		Fenthion	0.74±0.05 <sup>bx</sup>	0.43±0.01 <sup>ay</sup>	0.29±0.03 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Kontrol	0.16±0.01 <sup>ax</sup>	0.16±0.01 <sup>ax</sup>	0.13±0.02 <sup>ax</sup>
		Fenthion	0.15±0.00 <sup>ax</sup>	0.18±0.01 <sup>ax</sup>	0.16±0.01 <sup>ax</sup>
GSH/GSSG	K.c.iğer	Kontrol	13.75±1.28 <sup>ax</sup>	8.30±0.48 <sup>ay</sup>	6.67±0.78 <sup>ay</sup>
		Fenthion	7.33±0.51 <sup>bx</sup>	8.05±0.32 <sup>ax</sup>	7.23±0.58 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Kontrol	16.73±0.24 <sup>ax</sup>	21.76±0.91 <sup>ay</sup>	17.21±2.38 <sup>ax</sup>
		Fenthion	15.79±0.44 <sup>ax</sup>	18.25±2.12 <sup>ax</sup>	13.75±0.79 <sup>ax</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $N=5$ ). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayırımı, x, y ve z harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri

\*: Kontrolle göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

#### 4.1.1.2. BSO'nun Fenthion Toksisitesine Etkileri

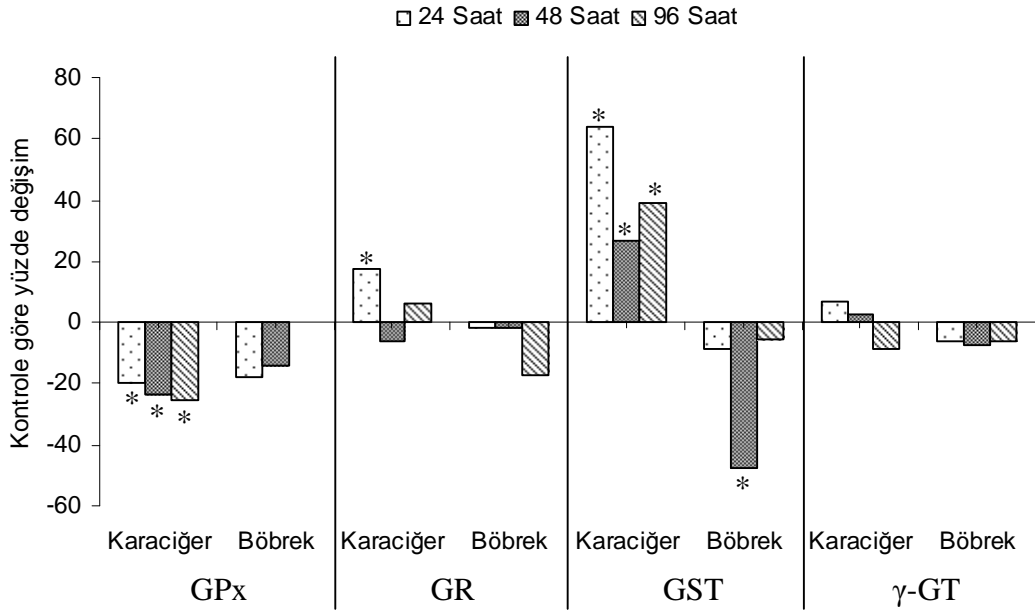
Karaciğer ve böbrek dokularında BSO etkisinde, fenthionun indüklediği GSH redoks durumundaki değişimler Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.'de, GSH-bağımlı enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda tüm etki sürelerinde tGSH, GSH ve GSSG miktarlarında fenthion grubuna göre azalma meydana gelmiş, GSH/GSSG oranı ise artmıştır (Çizelge 4.3.). tGSH ve GSH miktarlarındaki azalma süreye bağımlıdır. tGSH ve GSH miktarlarındaki azalma ile GSH/GSSG oranındaki artış sırasıyla %61, %41 ve %205 olmak üzere en fazla 96. saatte meydana gelmiştir (Şekil 4.3.). BSO uygulaması fenthionun indüklediği GST aktivite artışının 48. ve 96. saatlerde daha yüksek oranlara ulaşmasına (sırasıyla %48 ve %25) neden olmuştur (Şekil 4.4.). 24. ve 48. saatlerde  $\gamma$ -GT aktivitesinde artış meydana gelmiştir (sırasıyla %37 ve %31). BSO enjeksiyonu etki süreci sonunda GPx ve GR aktivitelerinde fenthion grubuna göre değişime neden olmamıştır.

Çizelge 4.2. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine (U/mg protein) etkileri

		Doku	24 Saat	48 Saat	96 Saat
GPx	K.c.iğer	Kontrol	0.65±0.04 <sup>ax</sup>	0.82±0.03 <sup>ay</sup>	0.80±0.03 <sup>ay</sup>
		Fenthion	0.52±0.03 <sup>bx</sup>	0.63±0.06 <sup>bx</sup>	0.60±0.02 <sup>bx</sup>
	Böbrek	Kontrol	0.51±0.02 <sup>ax</sup>	0.50±0.03 <sup>ax</sup>	0.43±0.04 <sup>ax</sup>
		Fenthion	0.42±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.04 <sup>ax</sup>
GR	K.c.iğer	Kontrol	0.017±0.001 <sup>ax</sup>	0.016±0.001 <sup>ax</sup>	0.016±0.002 <sup>ax</sup>
		Fenthion	0.020±0.001 <sup>bx</sup>	0.015±0.001 <sup>ay</sup>	0.017±0.000 <sup>axy</sup>
	Böbrek	Kontrol	0.050±0.002 <sup>ax</sup>	0.051±0.006 <sup>ax</sup>	0.053±0.001 <sup>ax</sup>
		Fenthion	0.049±0.001 <sup>ax</sup>	0.050±0.001 <sup>ax</sup>	0.044±0.004 <sup>ax</sup>
GST	K.c.iğer	Kontrol	64.77±3.95 <sup>ax</sup>	61.52±5.08 <sup>ax</sup>	57.02±3.62 <sup>ax</sup>
		Fenthion	106.10±7.15 <sup>bx</sup>	77.92±3.84 <sup>by</sup>	79.40±2.63 <sup>by</sup>
	Böbrek	Kontrol	45.72±3.63 <sup>ax</sup>	36.18±5.10 <sup>ax</sup>	37.92±3.93 <sup>ax</sup>
		Fenthion	41.66±3.01 <sup>ax</sup>	19.00±2.74 <sup>by</sup>	35.89±1.11 <sup>ax</sup>
γ-GT	K.c.iğer	Kontrol	2.98±0.32 <sup>ax</sup>	3.08±0.42 <sup>ax</sup>	3.61±0.31 <sup>ax</sup>
		Fenthion	3.18±0.14 <sup>ax</sup>	3.15±0.10 <sup>ax</sup>	3.30±0.14 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Kontrol	3.65±0.18 <sup>ax</sup>	3.07±0.37 <sup>ax</sup>	3.11±0.14 <sup>ax</sup>
		Fenthion	3.43±0.19 <sup>ax</sup>	2.84±0.19 <sup>ax</sup>	2.92±0.19 <sup>ax</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.2. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri

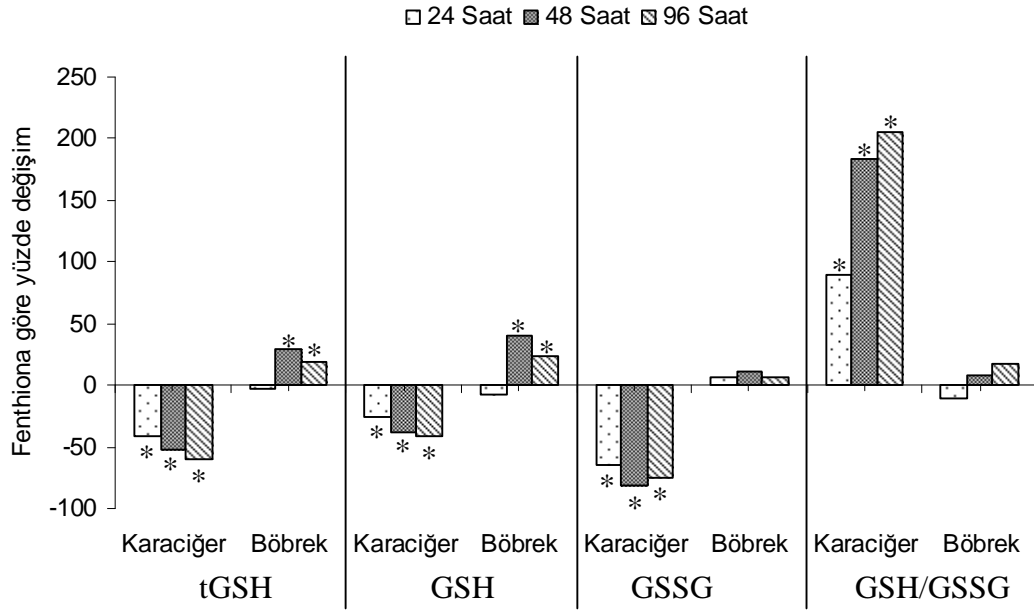
\*: Kontrole göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

Karaciğer dokusunda BSO etkisinde fenthionun tGSH miktarını azaltmasının aksine, böbrek dokusunda tGSH miktarı 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %30 ve %18 oranlarında artış göstermiştir (Şekil 4.3.). GSH miktarı da aynı sürelerde fenthiona göre sırasıyla %41 ve %23 oranlarında artmıştır. BSO enjeksiyonunun GSSG miktarları ve GSH/GSSG oranına herhangi bir etkisi bulunamamıştır. GR aktivitesinde 24. ve 96. saatte sırasıyla %23 ve %30 oranında artış meydana gelmiştir (Şekil 4.4.). GST aktivitesi 24. saatte %37 azalmış, 96. saatte ise %188 artmıştır. Fenthion etkisinde BSO böbrek dokusunda GPx ve γ-GT aktivitelerinde fenthion grubuna göre herhangi bir değişim meydana getirmemiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

Doku		24 Saat	48 Saat	96 Saat	
<b>tGSH</b>	K. ciğer	Fenthion	2.44±0.08 <sup>ax</sup>	2.09±0.02 <sup>ay</sup>	1.67±0.04 <sup>az</sup>
		BSO+Fen	1.44±0.04 <sup>bx</sup>	1.01±0.04 <sup>by</sup>	0.66±0.02 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Fenthion	2.39±0.05 <sup>ax</sup>	1.68±0.10 <sup>ay</sup>	2.19±0.15 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	2.33±0.07 <sup>axy</sup>	2.18±0.08 <sup>bx</sup>	2.59±0.10 <sup>by</sup>
<b>GSH</b>	K. ciğer	Fenthion	1.28±0.12 <sup>ax</sup>	1.33±0.10 <sup>ax</sup>	0.87±0.06 <sup>ay</sup>
		BSO+Fen	0.94±0.03 <sup>bx</sup>	0.83±0.03 <sup>bx</sup>	0.51±0.02 <sup>by</sup>
	Böbrek	Fenthion	1.61±0.05 <sup>ax</sup>	1.27±0.12 <sup>ay</sup>	1.56±0.11 <sup>axy</sup>
		BSO+Fen	1.48±0.05 <sup>ax</sup>	1.79±0.05 <sup>by</sup>	1.92±0.05 <sup>by</sup>
<b>GSSG</b>	K. ciğer	Fenthion	0.74±0.05 <sup>ax</sup>	0.43±0.01 <sup>ay</sup>	0.29±0.03 <sup>az</sup>
		BSO+Fen	0.26±0.02 <sup>bx</sup>	0.08±0.01 <sup>by</sup>	0.07±0.00 <sup>by</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.15±0.00 <sup>ax</sup>	0.18±0.01 <sup>ax</sup>	0.16±0.01 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	0.16±0.01 <sup>ax</sup>	0.20±0.02 <sup>ax</sup>	0.17±0.02 <sup>ax</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	K. ciğer	Fenthion	7.33±0.51 <sup>ax</sup>	8.05±0.32 <sup>ax</sup>	7.23±0.58 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	13.95±1.27 <sup>bx</sup>	22.87±1.38 <sup>by</sup>	22.02±2.11 <sup>by</sup>
	Böbrek	Fenthion	15.79±0.44 <sup>ax</sup>	18.25±2.12 <sup>ax</sup>	13.75±0.79 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	14.09±0.73 <sup>ax</sup>	19.77±1.87 <sup>ay</sup>	16.10±1.55 <sup>axy</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ( $N=5$ ). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y ve z harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.3. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri

\*: Fenthion grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

#### 4.1.1.3. NAC'nin Fenthion Toksisitesine Etkileri

Karaciğer ve böbrek dokularında NAC etkisinde fenthionun indüklediği GSH redoks durumundaki değişimler Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.'de, GSH-bağımlı enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

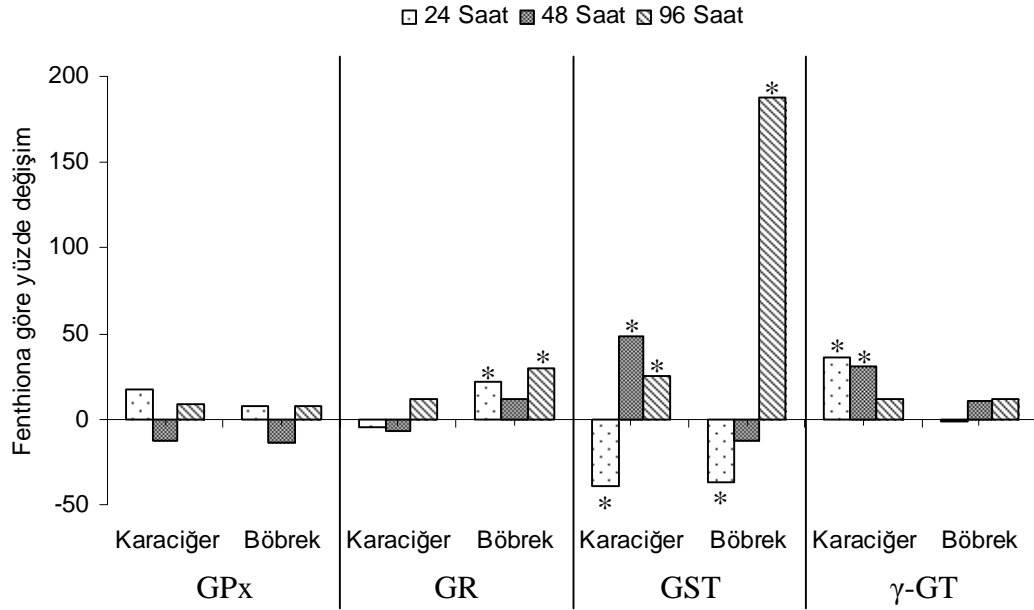
Karaciğer dokusunda 96. saatte fenthionun tGSH azaltma etkisini NAC uygulaması %25 oranında arttırmaktadır (Şekil 4.5.). NAC GSH miktarlarında herhangi bir değişim meydana getirmemiştir. 24. saatte fenthion etkisiyle artan GSSG miktarına NAC uygulamasının herhangi bir etkisi saptanmamıştır (P>0.05). GSSG miktarında 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %44 ve %76 azalma ve buna bağlı olarak GSH/GSSG oranlarında yine 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %79 ve %367 artış meydana gelmiştir. GSSG miktarı ve GSH/GSSG oranındaki değişimler süreye bağlıdır.

Çizelge 4.4. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine (U/mg protein) etkileri

Doku		24 Saat	48 Saat	96 Saat	
GPx	K.c.iğer	Fenthion	0.52±0.03 <sup>ax</sup>	0.63±0.06 <sup>ax</sup>	0.60±0.02 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	0.61±0.03 <sup>ax</sup>	0.55±0.04 <sup>ax</sup>	0.65±0.05 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.42±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.04 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	0.45±0.02 <sup>ax</sup>	0.37±0.01 <sup>ay</sup>	0.46±0.03 <sup>ax</sup>
GR	K.c.iğer	Fenthion	0.020±0.001 <sup>ax</sup>	0.015±0.001 <sup>ay</sup>	0.017±0.000 <sup>az</sup>
		BSO+Fen	0.019±0.002 <sup>ax</sup>	0.014±0.001 <sup>ay</sup>	0.019±0.001 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.049±0.001 <sup>ax</sup>	0.050±0.001 <sup>ax</sup>	0.044±0.004 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	0.060±0.002 <sup>bx</sup>	0.056±0.002 <sup>ax</sup>	0.057±0.004 <sup>bx</sup>
GST	K.c.iğer	Fenthion	106.10±7.15 <sup>ax</sup>	77.92±3.84 <sup>ay</sup>	79.40±2.63 <sup>ay</sup>
		BSO+Fen	65.29±3.90 <sup>bx</sup>	115.31±4.24 <sup>by</sup>	99.00±5.50 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Fenthion	41.66±3.01 <sup>ax</sup>	19.00±2.74 <sup>ay</sup>	35.89±1.11 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	26.14±0.90 <sup>bx</sup>	16.71±2.63 <sup>ay</sup>	103.35±1.39 <sup>bz</sup>
γ-GT	K.c.iğer	Fenthion	3.18±0.14 <sup>ax</sup>	3.15±0.10 <sup>ax</sup>	3.30±0.14 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	4.35±0.18 <sup>bx</sup>	4.12±0.20 <sup>bxy</sup>	3.68±0.13 <sup>ay</sup>
	Böbrek	Fenthion	3.43±0.19 <sup>ax</sup>	2.84±0.19 <sup>ax</sup>	2.92±0.19 <sup>ax</sup>
		BSO+Fen	3.40±0.11 <sup>ax</sup>	3.16±0.08 <sup>ax</sup>	3.26±0.18 <sup>ax</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y ve z harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.





Şekil 4.4. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine etkileri

\*: Fenthion grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ( $P < 0.05$ )

Etki süreleri boyunca karaciğerde  $\gamma$ -GT aktivitesi fenthion grubuna göre artış göstermiştir (Çizelge 4.6.) ve bu artış tüm sürelerde birbirine yakındır (24., 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %47, %44 ve %40, Şekil 4.6.). Fenthionun GPx aktivitesini azaltma ve GST aktivitesini artırma etkilerinde 24. saat GST aktivitesi dışında NAC uygulaması ile herhangi bir değişim meydana gelmemiştir ( $P > 0.05$ , Çizelge 4.6.). 24. saatte GST aktivitesi fenthion grubuna oranla %21 azalma göstermektedir (Şekil 4.6.). NAC enjeksiyonu ile GR enzim aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

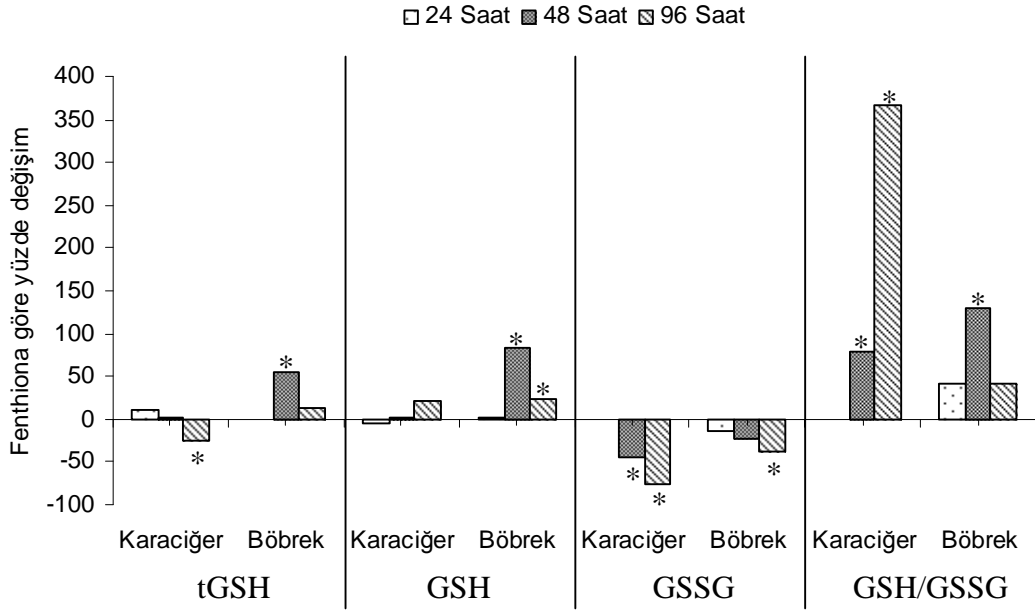
NAC etkisinde fenthion böbrek dokusunda 48. ve 96. saatte GSH miktarının ve 48. saatte tGSH miktarının artmasına neden olmuştur (Çizelge 4.5.). GSH miktarındaki en yüksek artış %84 ile 48. saatte meydana gelmiştir (Şekil 4.5.) ve buna bağlı olarak GSH/GSSG oranı yalnızca 48. saatte %131 düzeyinde artmıştır. GSSG miktarı ise 96. saatte %38 oranında azalmıştır. Fenthionun 48. saatte böbrek dokusunda GST aktivitesini azaltmasına karşın, NAC etkisinde GST aktivitesi kontrol grubuna yakın bir değerdedir ve fenthion grubuna oranla aktivite %123 daha yüksektir (Şekil 4.6.).  $\gamma$ -GT aktivitesi 96. saatte %70 oranında artış göstermiştir. Her

iki dokuda da 48. saatte GR aktivitesi karaciğerde %167, böbrekte ise %34 oranında indüklenmiştir. NAC enjeksiyonu ile GPx enzim aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.5. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

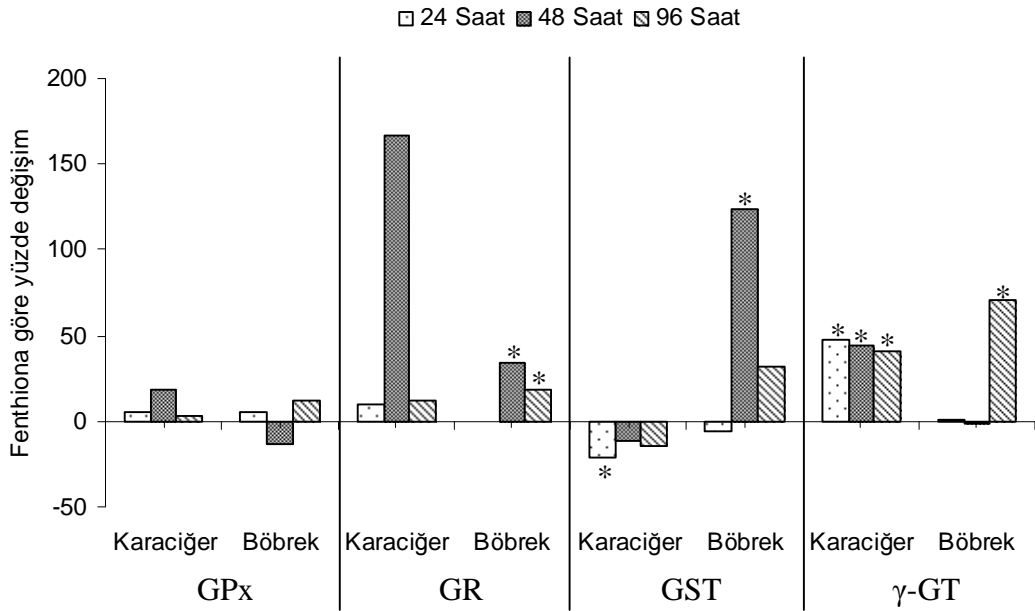
Doku		24 Saat	48 Saat	96 Saat	
tGSH	K.c.iğer	Fenthion	2.44±0.08 <sup>ax</sup>	2.09±0.02 <sup>ay</sup>	1.67±0.04 <sup>az</sup>
		NAC+Fen	2.71±0.11 <sup>ax</sup>	2.13±0.18 <sup>ay</sup>	1.25±0.09 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Fenthion	2.39±0.05 <sup>ax</sup>	1.68±0.10 <sup>ay</sup>	2.19±0.15 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	2.40±0.03 <sup>ax</sup>	2.59±0.13 <sup>bx</sup>	2.46±0.20 <sup>ax</sup>
GSH	K.c.iğer	Fenthion	1.28±0.12 <sup>ax</sup>	1.33±0.10 <sup>ax</sup>	0.87±0.06 <sup>ay</sup>
		NAC+Fen	1.22±0.07 <sup>ax</sup>	1.36±0.14 <sup>ax</sup>	1.06±0.07 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Fenthion	1.61±0.05 <sup>ax</sup>	1.27±0.12 <sup>ay</sup>	1.56±0.11 <sup>axy</sup>
		NAC+Fen	1.63±0.04 <sup>ax</sup>	2.33±0.14 <sup>by</sup>	1.93±0.18 <sup>bx</sup>
GSSG	K.c.iğer	Fenthion	0.74±0.05 <sup>ax</sup>	0.43±0.01 <sup>ay</sup>	0.29±0.03 <sup>az</sup>
		NAC+Fen	0.74±0.02 <sup>ax</sup>	0.24±0.01 <sup>by</sup>	0.07±0.01 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.15±0.00 <sup>ax</sup>	0.18±0.01 <sup>ax</sup>	0.16±0.01 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	0.13±0.02 <sup>ax</sup>	0.14±0.02 <sup>ax</sup>	0.10±0.02 <sup>bx</sup>
GSH/GSSG	K.c.iğer	Fenthion	7.33±0.51 <sup>ax</sup>	8.05±0.32 <sup>ax</sup>	7.23±0.58 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	7.25±0.36 <sup>ax</sup>	14.39±1.29 <sup>by</sup>	33.76±2.41 <sup>bz</sup>
	Böbrek	Fenthion	15.79±0.44 <sup>ax</sup>	18.25±2.12 <sup>ax</sup>	13.75±0.79 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	22.46±2.48 <sup>ax</sup>	42.15±6.08 <sup>by</sup>	19.62±2.22 <sup>ax</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ( $N=5$ ). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y ve z harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.5. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri

\*: Fenthion grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ( $P < 0.05$ )



Şekil 4.6. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine etkileri

\*: Fenthion grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ( $P < 0.05$ )

Çizelge 4.6. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine (U/mg protein) etkileri

Doku		24 Saat	48 Saat	96 Saat	
GPx	K.c.iğer	Fenthion	0.52±0.03 <sup>ax</sup>	0.63±0.06 <sup>ax</sup>	0.60±0.02 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	0.55±0.04 <sup>ax</sup>	0.75±0.05 <sup>ay</sup>	0.62±0.02 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.42±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.02 <sup>ax</sup>	0.43±0.04 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	0.44±0.01 <sup>ax</sup>	0.37±0.02 <sup>ay</sup>	0.48±0.02 <sup>ax</sup>
GR	K.c.iğer	Fenthion	0.020±0.001 <sup>ax</sup>	0.015±0.001 <sup>ax</sup>	0.017±0.000 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	0.022±0.001 <sup>ax</sup>	0.040±0.026 <sup>ax</sup>	0.019±0.002 <sup>ax</sup>
	Böbrek	Fenthion	0.049±0.001 <sup>ax</sup>	0.050±0.001 <sup>ax</sup>	0.044±0.004 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	0.049±0.002 <sup>ax</sup>	0.067±0.02 <sup>by</sup>	0.052±0.001 <sup>bx</sup>
GST	K.c.iğer	Fenthion	106.10±7.15 <sup>ax</sup>	77.92±3.84 <sup>ay</sup>	79.40±2.63 <sup>ay</sup>
		NAC+Fen	83.95±3.72 <sup>bx</sup>	69.37±4.90 <sup>ay</sup>	68.13±3.11 <sup>ay</sup>
	Böbrek	Fenthion	41.66±3.01 <sup>ax</sup>	19.00±2.74 <sup>ay</sup>	35.89±1.11 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	39.22±1.71 <sup>ax</sup>	42.44±1.80 <sup>bx</sup>	47.21±7.38 <sup>ax</sup>
γ-GT	K.c.iğer	Fenthion	3.18±0.14 <sup>ax</sup>	3.15±0.10 <sup>ax</sup>	3.30±0.14 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	4.67±0.54 <sup>bx</sup>	4.54±0.21 <sup>bx</sup>	4.63±0.21 <sup>bx</sup>
	Böbrek	Fenthion	3.43±0.19 <sup>ax</sup>	2.84±0.19 <sup>ax</sup>	2.92±0.19 <sup>ax</sup>
		NAC+Fen	3.45±0.12 <sup>ax</sup>	2.80±0.21 <sup>ax</sup>	4.97±0.66 <sup>by</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayırımı, x ve y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

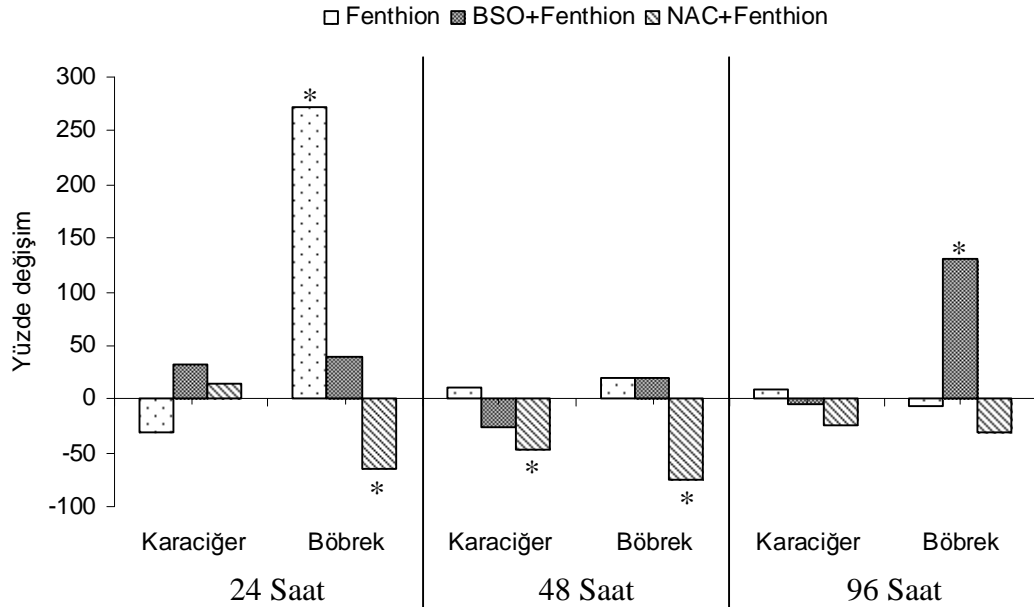
#### 4.1.1.4. Lipid Peroksidasyonundaki Değişimler

Karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun lipid peroksidasyonuna etkileri Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda etki sürelerinde fenthionun lipid peroksidasyonu üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır (P>0.05, Çizelge 4.7.). BSO enjeksiyonu ile de lipid peroksidasyonu düzeylerinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. 48.

saatte NAC etkisindeki fenthion grubunda lipid peroksidasyonu düzeyi fenthion grubuna göre %48 oranında azalmıştır (Şekil 4.7.).

Karaciğer dokusundan farklı olarak böbrek dokusunda fenthion 24. saatte lipid peroksidasyonunun %271 artmasına neden olmuştur. Diğer sürelerde lipid peroksidasyonu kontrol düzeylerindedir ( $P>0.05$ ). Aynı sürede NAC etkisindeki fenthion grubunda lipid peroksidasyonu düzeyi fenthiona göre azalmıştır (%64) ve kontrol grubuna yakın bir değerdedir (Çizelge 4.7.). NAC etkisindeki fenthion grubunda lipid peroksidasyonu düzeyinde fenthion grubuna oranla azalma 48. saatte %75 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. BSO 24. saatte fenthionun indüklediği lipid peroksidasyonunun %40 artışına neden olmuştur. BSO etkisindeki fenthion grubunda ise lipid peroksidasyonundaki artış %130 ile en yüksek 96. saatte gözlenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun MDA miktarına etkileri

\*: Fenthion grubu kontrole göre yüzde değişim, BSO+Fenthion ve NAC+Fenthion grupları fenthion grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir ( $P<0.05$ ).

Çizelge 4.7. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri

Doku		24 saat	48 saat	96 saat
Karaciğer	Kontrol	4.01±0.47 <sup>ax</sup>	4.48±0.73 <sup>ax</sup>	3.45±0.09 <sup>ax</sup>
	Fenthion	2.76±0.20 <sup>ax</sup>	4.96±0.99 <sup>ay</sup>	3.76±0.34 <sup>axy</sup>
	BSO+Fenthion	3.66±0.25 <sup>ax</sup>	3.68±0.58 <sup>ax</sup>	3.60±0.35 <sup>ax</sup>
	NAC+Fenthion	3.14±0.22 <sup>ax</sup>	2.60±0.32 <sup>bx</sup>	2.82±0.31 <sup>ax</sup>
Böbrek	Kontrol	2.01±0.13 <sup>ax</sup>	5.48±1.08 <sup>ay</sup>	5.29±1.04 <sup>ay</sup>
	Fenthion	7.46±1.47 <sup>bx</sup>	6.55±1.08 <sup>ax</sup>	4.93±0.47 <sup>ax</sup>
	BSO+Fenthion	10.44±1.48 <sup>bx</sup>	7.88±1.60 <sup>ax</sup>	11.34±3.27 <sup>bx</sup>
	NAC+Fenthion	2.69±0.28 <sup>ax</sup>	1.62±0.32 <sup>bx</sup>	3.43±0.82 <sup>ax</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5). a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Fenthion grubu kontrole göre, BSO ve NAC grupları fenthion grubuna göre karşılaştırılmaktadır.

#### 4.1.2. Depurasyon Süreci

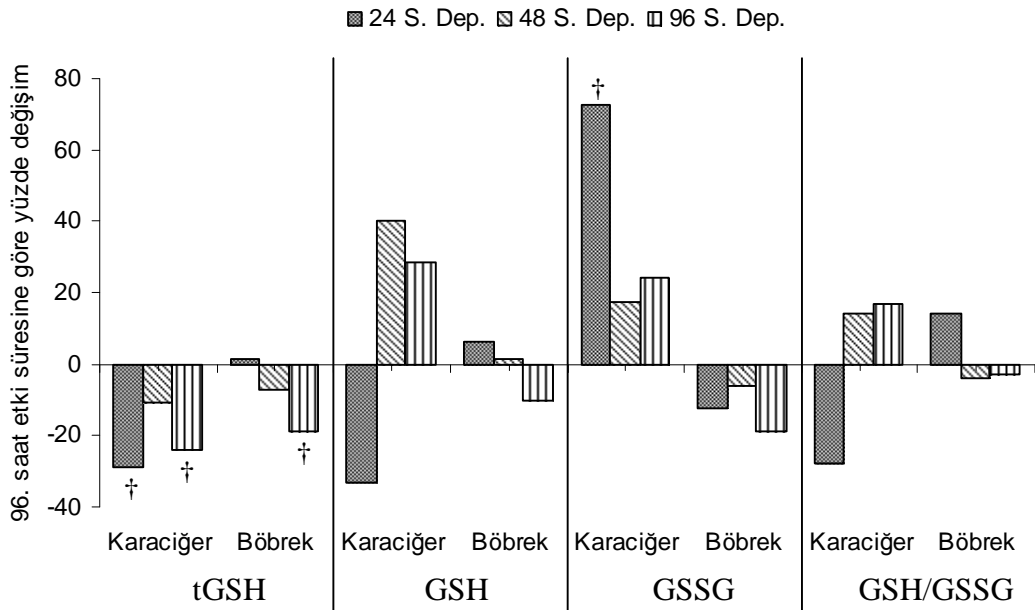
##### 4.1.2.1. Fenthion Grubundaki Değişimler

Depurasyon sürelerinde karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun GSH redoks durumuna etkileri Çizelge 4.8. ve Şekil 4.8.'de, GSH-bağımlı enzim aktivitelere etkileri Çizelge 4.9. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Karaciğer dokusunda fenthionun 96. saat etki süresi sonunda başlayan tGSH ve GSH azaltma etkisi tGSH için 48. saat ve GSH için 24. saat dışında depurasyon sürecinde artarak devam etmiştir (Çizelge 4.8.). tGSH ve GSH miktarlarındaki azalma en fazla sırasıyla 24. saatte %29 ve 48. saatte %40'dır (Şekil 4.8.). 96. saat etki süresinde azalan GSSG miktarı depurasyon sürecinde yeniden kontrol düzeylerine ulaşmıştır. 24. saatte tGSH'daki azalma ve GSSG'deki artışa bağlı olarak GSH/GSSG oranı %28 azalmıştır. Fenthion etkisiyle etki sürecinde azalan GPx aktivitesi tüm süreler boyunca en fazla 24. saatte azalmakla birlikte (96. saate göre %22, Şekil 4.9.), depurasyon sürecinde süreye bağımlı olarak artış göstermiştir ve 96. saat depurasyon süresinde kontrol düzeylerine ulaşmıştır (Çizelge 4.9.). GST

aktivitesinde etki sürecinde meydana gelen artış depurasyon sürecinde de devam etmiştir. GR aktivitesi 24. saatte %29 artış göstermiştir (Şekil 4.9.). Etki sürecinde olduğu gibi depurasyon sürecinde de fenthion etkisiyle  $\gamma$ -GT aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

Böbrek dokusunda tGSH miktarı 96. saat depurasyon süresi sonunda %19 azalmıştır (Şekil 4.8.). Bununla birlikte GSH ve GSSG miktarları ve GSH/GSSG oranında herhangi bir değişim bulunamamıştır. Böbrek dokusunda GPx aktivitesi 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %26 ve %28 oranlarında artmaktadır. 24. saatte GR aktivitesi %37 artarken,  $\gamma$ -GT aktivitesi %31 oranında azalmaktadır (Şekil 4.9.) Depurasyon sürecinde böbrek dokusunda GST enzim aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir (Çizelge 4.9., Şekil 4.9.).



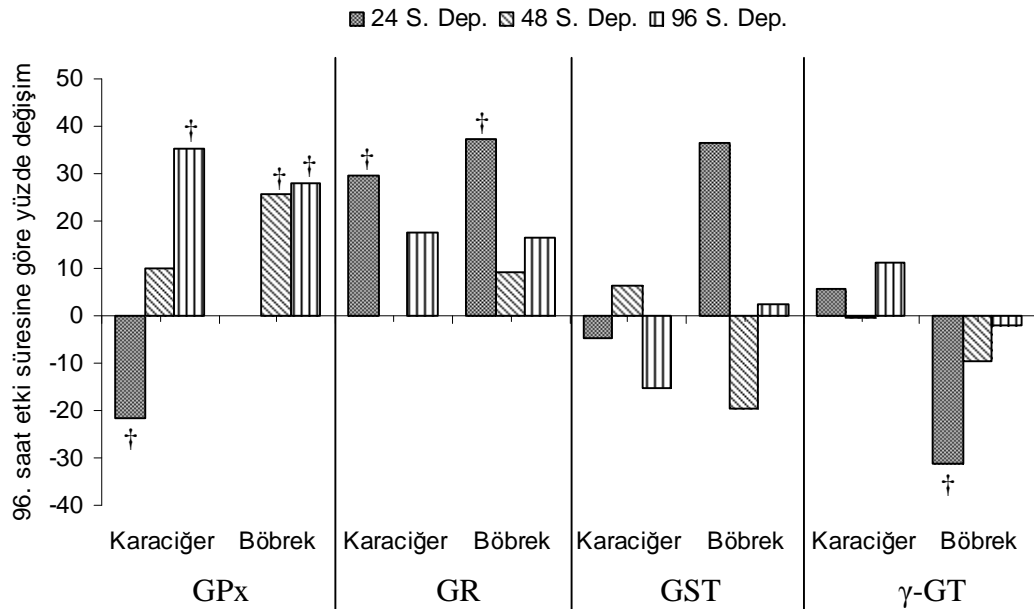
Şekil 4.8. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri

†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

Çizelge 4.8. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

	Doku	96. saat Etki	24. saat Depurasyon	48. saat Depurasyon	96. saat Depurasyon
<b>tGSH</b>	K.ciğer	1.67±0.04 <sup>x</sup>	1.19±0.08 <sup>y</sup>	1.49±0.05 <sup>xz</sup>	1.27±0.13 <sup>yz</sup>
	Böbrek	2.19±0.15 <sup>x</sup>	2.22±0.05 <sup>x</sup>	2.03±0.10 <sup>xy</sup>	1.78±0.14 <sup>y</sup>
<b>GSH</b>	K.ciğer	0.87±0.06 <sup>xy</sup>	0.58±0.04 <sup>x</sup>	1.22±0.11 <sup>y</sup>	1.12±0.12 <sup>y</sup>
	Böbrek	1.56±0.11 <sup>x</sup>	1.66±0.04 <sup>x</sup>	1.58±0.08 <sup>x</sup>	1.40±0.12 <sup>x</sup>
<b>GSSG</b>	K.ciğer	0.29±0.03 <sup>x</sup>	0.50±0.05 <sup>y</sup>	0.34±0.03 <sup>x</sup>	0.36±0.06 <sup>x</sup>
	Böbrek	0.16±0.01 <sup>x</sup>	0.14±0.01 <sup>x</sup>	0.15±0.01 <sup>x</sup>	0.13±0.01 <sup>x</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	K.ciğer	7.23±0.58 <sup>xy</sup>	5.22±0.41 <sup>x</sup>	8.25±0.48 <sup>y</sup>	8.46±1.02 <sup>y</sup>
	Böbrek	13.75±0.79 <sup>x</sup>	15.7±0.96 <sup>x</sup>	13.24±0.52 <sup>x</sup>	13.33±0.61 <sup>x</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Şekil 4.9. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine etkileri

†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayırımı göstermektedir ( $P<0.05$ )



Çizelge 4.9. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelere (U/mg protein) etkileri

	Doku	96. saat Etki	24. saat Depurasyon	48. saat Depurasyon	96. saat Depurasyon
<b>GPx</b>	K.ciğer	0.60±0.02 <sup>x</sup>	0.47±0.02 <sup>y</sup>	0.66±0.04 <sup>x</sup>	0.81±0.02 <sup>z</sup>
	Böbrek	0.43±0.04 <sup>x</sup>	0.43±0.03 <sup>x</sup>	0.54±0.02 <sup>y</sup>	0.55±0.04 <sup>y</sup>
<b>GR</b>	K.ciğer	0.017±0.000 <sup>x</sup>	0.022±0.000 <sup>y</sup>	0.017±0.001 <sup>x</sup>	0.020±0.000 <sup>xy</sup>
	Böbrek	0.044±0.004 <sup>x</sup>	0.059±0.003 <sup>y</sup>	0.047±0.003 <sup>x</sup>	0.050±0.002 <sup>x</sup>
<b>GST</b>	K.ciğer	79.40±2.63 <sup>x</sup>	75.44±6.25 <sup>x</sup>	84.43±10.8 <sup>x</sup>	67.36±6.67 <sup>x</sup>
	Böbrek	35.89±1.11 <sup>xy</sup>	48.92±5.77 <sup>x</sup>	28.90±4.22 <sup>y</sup>	36.69±5.3 <sup>xy</sup>
<b>γ-GT</b>	K.ciğer	3.30±0.14 <sup>x</sup>	3.48±0.17 <sup>x</sup>	3.29±0.17 <sup>x</sup>	3.67±0.23 <sup>x</sup>
	Böbrek	2.92±0.19 <sup>x</sup>	2.01±0.11 <sup>y</sup>	2.64±0.20 <sup>x</sup>	2.86±0.12 <sup>x</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

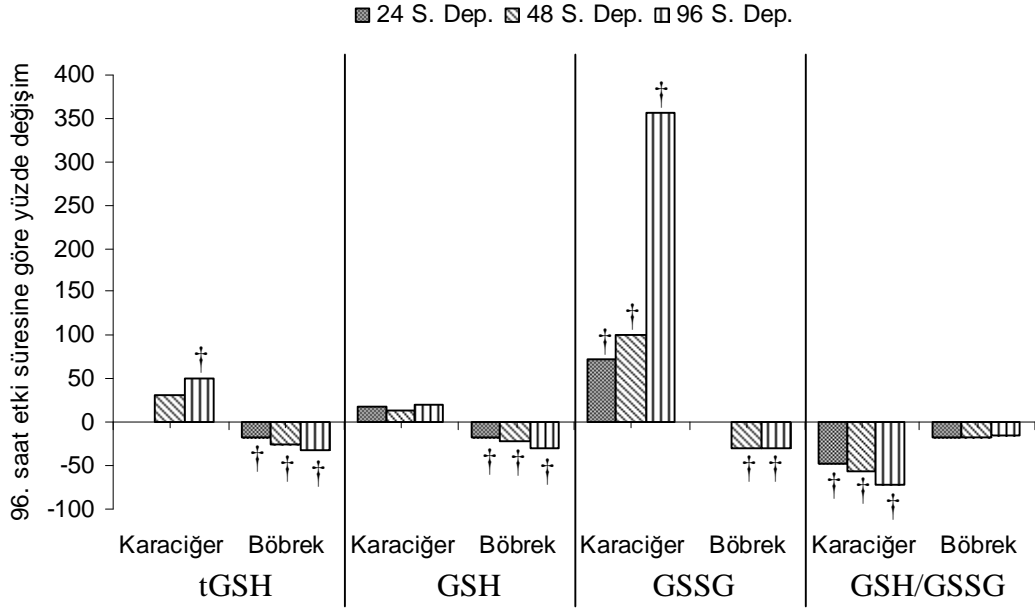
#### 4.1.2.2. BSO Grubundaki Değişimler

Depurasyon sürelerinde karaciğer ve böbrek dokularında BSO etkisinde fenthionun indüklediği GSH redoks durumundaki değişimler Çizelge 4.10. ve Şekil 4.10.'da, GSH-bağımlı enzim aktivitelindeki değişimler Çizelge 4.11. ve Şekil 4.11.'de verilmiştir.

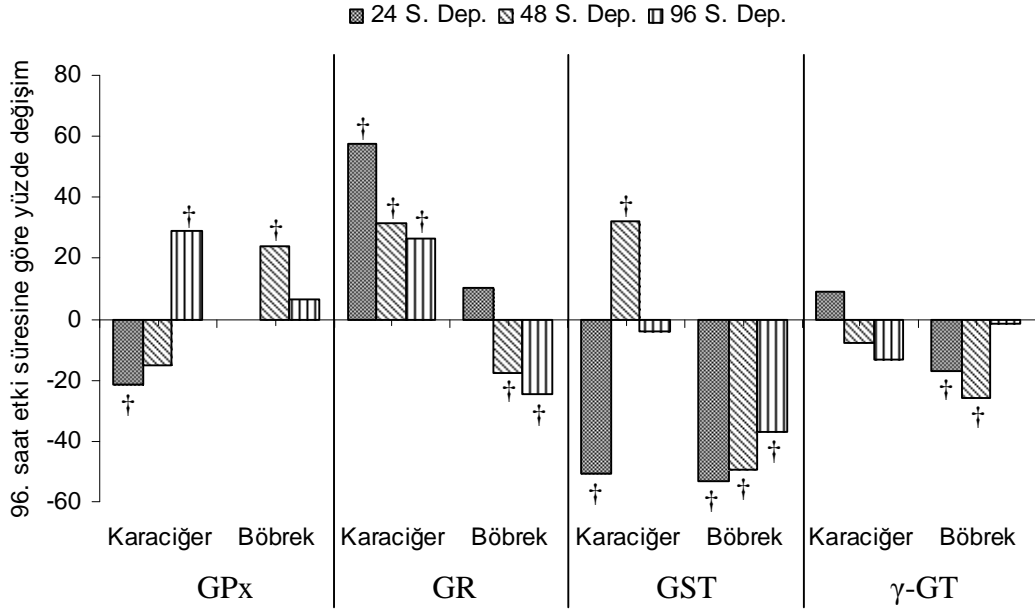
Karaciğer dokusunda BSO uygulamasının tGSH ve GSSG azaltıcı etkisi depurasyon sürelerinde zamana bağlı olarak azalmıştır ve GSSG miktarı 96. saatte kontrol düzeylerine ulaşmıştır. Fakat tGSH düzeyleri 96. saat depurasyon süresi sonunda da fenthion grubuna oranla daha düşük seviyededir (Çizelge 4.10.). Buna karşılık GSH miktarındaki azalma 96. saat etki süresine benzer oranlarda devam etmektedir. BSO etkisiyle artan GSH/GSSG oranı da depurasyon sürecinde zamana bağlı olarak azalmıştır ve oran sırasıyla 24. saatte %49, 48. saatte %56 ve 96. saatte

%72'dir (Şekil 4.10.). 24. saat depurasyon süresinde azalan GPx aktivitesi süreye bağlı olarak artmış ve 96. saatte kontrol düzeyine ulaşmıştır (Çizelge 4.11.). Tüm depurasyon sürecinde meydana gelen GR aktivite artışı en fazla %58 ile 24. saattedir (Şekil 4.11.). BSO etkisiyle GST aktivitesindeki artış 24. saat dışında tüm depurasyon sürelerinde devam etmektedir (Çizelge 4.11.), 24. saatte aktivite fenthion grubuna göre azalmış (%51), kontrol düzeyine ulaşmıştır. 48. saatte ise GST aktivitesindeki artış 96. saat etki süresine göre de anlamlıdır (%32, Şekil 4.11.). Depurasyon sürecinde  $\gamma$ -GT aktivitesinde herhangi bir değişim bulunamamıştır.

Böbrek dokusunda BSO uygulaması ile etki sürecinde tGSH ve GSH miktarlarında herhangi bir değişim gözlenmemesine karşın depurasyon sürecinde tGSH ve GSH miktarları süreye-bağımlı olarak azalmıştır (Çizelge 4.10.) ve azalma tGSH için %33 ve GSH için %30 olmak üzere en fazla 96. saattedir (Şekil 4.10.). GSSG miktarı da 24. saat dışında azalma göstermiştir ve azalma oranı 48. ve 96. saatlerde aynı düzeydedir (%29). GSH/GSSG oranında ise herhangi bir değişim bulunamamıştır. GPx aktivitesi 48. saatte %24 artmıştır. 96. saat etki süresinde fenthion grubuna göre GR aktivitesinde meydana gelen artış 24. saatte de artarak devam etmektedir (%11), fakat 48. ve 96. saatlerde aktivite fenthion grubu düzeylerine ulaşmıştır. 96. saat etki süresinde fenthion grubuna göre artan GST aktivitesi 24. saatte fenthion grubu düzeylerine geri dönmekle birlikte, diğer sürelerde yeniden artışa geçmiştir.  $\gamma$ -GT aktivitesi ise 24. ve 48. saatlerde sırasıyla %17 ve %26 oranlarında azalmıştır (Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri  
†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)



Şekil 4.11. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine etkileri  
†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

Çizelge 4.10. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

	<b>Doku</b>	<b>96. saat Etki</b>	<b>24. saat Depurasyon</b>	<b>48. saat Depurasyon</b>	<b>96. saat Depurasyon</b>
<b>tGSH</b>	K.ciğer	0.66±0.02 <sup>x</sup>	0.67±0.04 <sup>x</sup>	0.86±0.09 <sup>xy</sup>	1.00±0.06 <sup>y</sup>
	Böbrek	2.59±0.10 <sup>x</sup>	2.15±0.09 <sup>y</sup>	1.92±0.11 <sup>yz</sup>	1.73±0.11 <sup>z</sup>
<b>GSH</b>	K.ciğer	0.51±0.02 <sup>x</sup>	0.60±0.04 <sup>x</sup>	0.58±0.02 <sup>x</sup>	0.61±0.05 <sup>x</sup>
	Böbrek	1.92±0.05 <sup>x</sup>	1.59±0.05 <sup>y</sup>	1.49±0.09 <sup>y</sup>	1.35±0.11 <sup>y</sup>
<b>GSSG</b>	K.ciğer	0.07±0.00 <sup>x</sup>	0.12±0.02 <sup>y</sup>	0.14±0.01 <sup>y</sup>	0.32±0.02 <sup>z</sup>
	Böbrek	0.17±0.02 <sup>x</sup>	0.17±0.01 <sup>x</sup>	0.12±0.01 <sup>y</sup>	0.12±0.01 <sup>y</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	K.ciğer	22.02±2.11 <sup>x</sup>	11.32±0.86 <sup>y</sup>	9.64±0.39 <sup>y</sup>	6.16±0.56 <sup>z</sup>
	Böbrek	16.1±1.55 <sup>x</sup>	13.29±0.37 <sup>x</sup>	13.29±0.74 <sup>x</sup>	13.84±1.77 <sup>x</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 4.11. BSO enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine (U/mg protein) etkileri

	Doku	96. saat Etki	24. saat Depurasyon	48. saat Depurasyon	96. saat Depurasyon
<b>GPx</b>	K.ciğer	0.65±0.05 <sup>x</sup>	0.51±0.04 <sup>y</sup>	0.55±0.06 <sup>xy</sup>	0.84±0.06 <sup>z</sup>
	Böbrek	0.46±0.03 <sup>x</sup>	0.46±0.02 <sup>x</sup>	0.57±0.04 <sup>y</sup>	0.49±0.02 <sup>xy</sup>
<b>GR</b>	K.ciğer	0.019±0.001 <sup>x</sup>	0.030±0.002 <sup>y</sup>	0.025±0.002 <sup>z</sup>	0.024±0.001 <sup>z</sup>
	Böbrek	0.057±0.004 <sup>x</sup>	0.063±0.002 <sup>x</sup>	0.047±0.002 <sup>y</sup>	0.043±0.002 <sup>y</sup>
<b>GST</b>	K.ciğer	99.00±5.50 <sup>x</sup>	48.86±6.71 <sup>y</sup>	130.6±8.79 <sup>z</sup>	95.08±5.44 <sup>x</sup>
	Böbrek	103.35±1.4 <sup>x</sup>	48.49±7.29 <sup>y</sup>	52.54±6.76 <sup>yz</sup>	64.82±5.5 <sup>z</sup>
<b>γ-GT</b>	K.ciğer	3.68±0.13 <sup>xy</sup>	4.01±0.20 <sup>x</sup>	3.40±0.13 <sup>y</sup>	3.19±0.12 <sup>y</sup>
	Böbrek	3.26±0.18 <sup>x</sup>	2.70±0.14 <sup>y</sup>	2.41±0.10 <sup>y</sup>	3.22±0.21 <sup>x</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

#### 4.1.2.3. NAC Grubundaki Değişimler

Depurasyon sürelerinde karaciğer ve böbrek dokularında NAC etkisinde fenthionun indüklediği GSH redoks durumundaki değişimler Çizelge 4.12. ve Şekil 4.12.'de, GSH-bağımlı enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.13. ve Şekil 4.13.'de verilmiştir.

96. saat etki süresinde NAC grubunda açığa çıkan tGSH miktarındaki azalma depurasyon sürecinde de devam etmektedir (Çizelge 4.12.) GSH miktarı süreye-bağımlı olarak azalmaktadır ve en yüksek azalma %45 ile 96. saatte meydana gelmiştir (Şekil 4.12.). Etki sürelerinde azalan GSSG miktarı ve artan GSH/GSSG oranı süreye bağımlı olmaksızın tüm depurasyon sürelerinde sırasıyla artmış ve azalmıştır. GSSG için artış oranı 24. saatte %529, 48. saatte %172 ve 96. saatte %400'dür (Şekil 4.12.). GSH/GSSG oranındaki azalma oranı ise 24. saatte %83, 48.

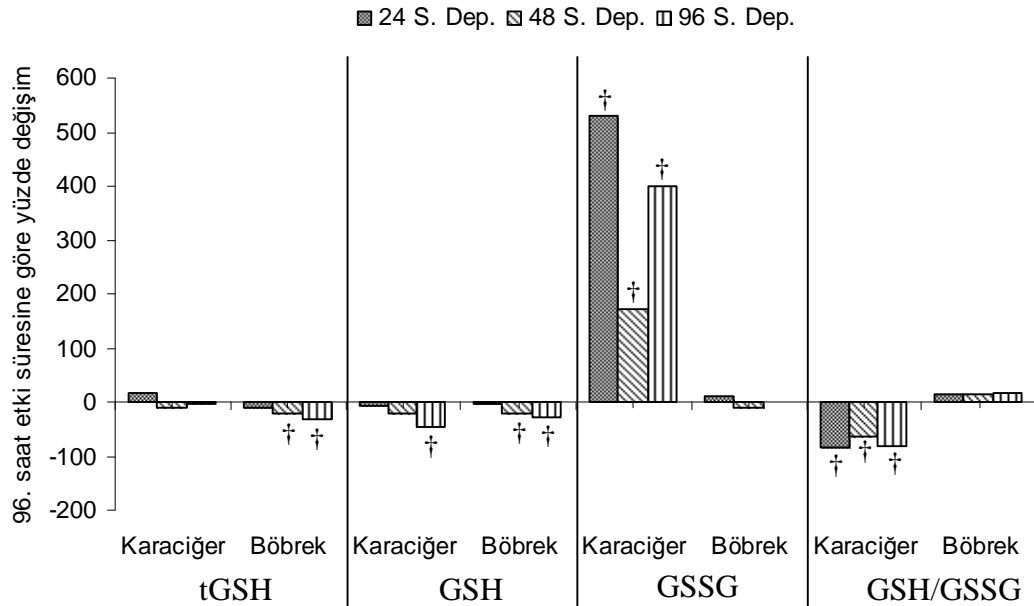
saatte %64 ve 96. saatte %80'dir. GPx aktivitesi 24. ve 48. saatlerde azalırken, GR aktivitesi aynı sürelerde artış göstermiştir (Çizelge 4.13.). GPx aktivitesindeki en fazla azalma %32 ile 48. saattedir (Şekil 4.13.), buna karşın GR aktivitesindeki artış birbirlerine yakın oranlardadır (24. saatte %26 ve 48. saatte %21). NAC grubunda depurasyon sürelerinde GST aktivitesinde herhangi bir değişim bulunamamıştır. Etki sürelerinde artan  $\gamma$ -GT aktivitesi süreye bağlı olarak azalmıştır ve 48. saatte fenthion grubu ile aynı düzeylere ulaşmıştır (Çizelge 4.13.).

Karaciğer dokusunda görülen etkiye benzer olarak depurasyon sürelerinde NAC uygulanan grupta böbrek dokusunda tGSH ve GSH miktarları süreye-bağımlı olarak azalmaktadır (Çizelge 4.12.). En yüksek oranlı azalmalar tGSH için %33 ve GSH için %29 olmak üzere 96. saatte meydana gelmiştir (Şekil 4.12.). Depurasyon sürecinde GSSG miktarı ve GSH/GSSG oranında herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Böbrek dokusunda GPx aktivitesi süreye-bağımlı olarak artarken, GR ve GST aktivitesinde süreye-bağımlı azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.13.). En yüksek değişim oranları 96. saatte meydana gelmiştir (GPx için %21, GR için %27 ve GST için %55, Şekil 4.13.). Böbrek dokusunda NAC etkisiyle 96. saat etki süresinde artan  $\gamma$ -GT aktivitesi depurasyon sürelerinde fenthion grubuna yakın düzeylere ulaşmıştır (Çizelge 4.13.).

Çizelge 4.12. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein) etkileri

	Doku	96. saat Etki	24. saat Depurasyon	48. saat Depurasyon	96. saat Depurasyon
<b>tGSH</b>	K.ciğer	1.25±0.09 <sup>x</sup>	1.45±0.15 <sup>x</sup>	1.14±0.08 <sup>x</sup>	1.20±0.07 <sup>x</sup>
	Böbrek	2.46±0.20 <sup>x</sup>	2.17±0.07 <sup>xy</sup>	1.98±0.08 <sup>yz</sup>	1.66±0.11 <sup>z</sup>
<b>GSH</b>	K.ciğer	1.06±0.07 <sup>x</sup>	1.00±0.16 <sup>x</sup>	0.85±0.06 <sup>x</sup>	0.58±0.05 <sup>y</sup>
	Böbrek	1.93±0.18 <sup>x</sup>	1.85±0.05 <sup>xy</sup>	1.54±0.05 <sup>yz</sup>	1.37±0.10 <sup>z</sup>
<b>GSSG</b>	K.ciğer	0.07±0.01 <sup>x</sup>	0.44±0.05 <sup>y</sup>	0.19±0.02 <sup>z</sup>	0.35±0.05 <sup>y</sup>
	Böbrek	0.10±0.02 <sup>x</sup>	0.11±0.01 <sup>ax</sup>	0.09±0.01 <sup>x</sup>	0.10±0.01 <sup>x</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	K.ciğer	33.76±2.41 <sup>x</sup>	5.66±0.51 <sup>y</sup>	12.29±1.1 <sup>z</sup>	6.62±0.95 <sup>y</sup>
	Böbrek	19.62±2.2 <sup>x</sup>	22.34±2.4 <sup>x</sup>	22.07±3.58 <sup>x</sup>	23.00±3.93 <sup>x</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ( $N=5$ ). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

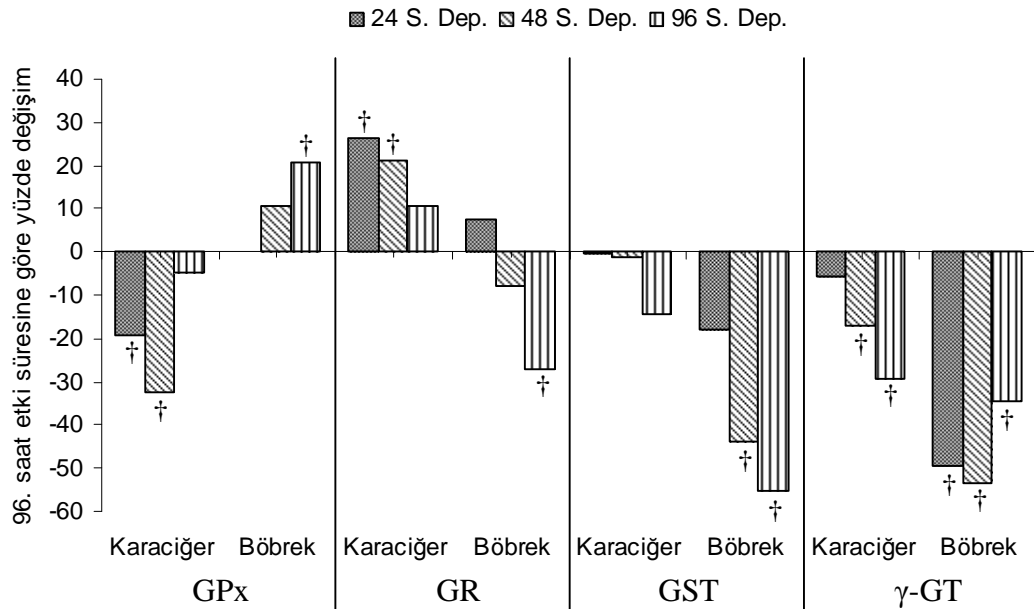
Şekil 4.12. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH redoks durumuna etkileri

†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ( $P<0.05$ )

Çizelge 4.13. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine (U/mg protein) etkileri

	Doku	96. saat Etki	24. saat Depurasyon	48. saat Depurasyon	96. saat Depurasyon
<b>GPx</b>	K.ciğer	0.62±0.02 <sup>x</sup>	0.50±0.04 <sup>yz</sup>	0.42±0.06 <sup>y</sup>	0.59±0.04 <sup>xz</sup>
	Böbrek	0.48±0.02 <sup>x</sup>	0.48±0.03 <sup>x</sup>	0.53±0.02 <sup>xy</sup>	0.58±0.01 <sup>y</sup>
<b>GR</b>	K.ciğer	0.019±0.002 <sup>x</sup>	0.024±0.001 <sup>y</sup>	0.023±0.001 <sup>yz</sup>	0.021±0.001 <sup>xz</sup>
	Böbrek	0.052±0.001 <sup>xy</sup>	0.056±0.002 <sup>x</sup>	0.048±0.003 <sup>y</sup>	0.038±0.001 <sup>z</sup>
<b>GST</b>	K.ciğer	68.13±3.11 <sup>x</sup>	67.89±4.59 <sup>x</sup>	67.25±6.24 <sup>x</sup>	58.40±8.07 <sup>x</sup>
	Böbrek	47.21±7.38 <sup>x</sup>	38.66±4.32 <sup>xy</sup>	26.59±2.97 <sup>yz</sup>	21.09±4.37 <sup>z</sup>
<b>γ-GT</b>	K.ciğer	4.63±0.21 <sup>x</sup>	4.36±0.21 <sup>xy</sup>	3.85±0.34 <sup>yz</sup>	3.28±0.23 <sup>z</sup>
	Böbrek	4.97±0.66 <sup>x</sup>	2.51±0.26 <sup>yz</sup>	2.31±0.15 <sup>y</sup>	3.25±0.21 <sup>z</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri dokularda süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.13. NAC enjekte edilen *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyonun GSH-bağımlı enzim aktivitelerine etkileri

†: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayırımı göstermektedir (P<0.05)



#### 4.1.2.4. Lipid Peroksidasyonundaki Değişimler

Depurasyon sürelerinde karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun lipid peroksidasyonuna etkileri Çizelge 4.14. ve Şekil 4.14.'de verilmiştir.

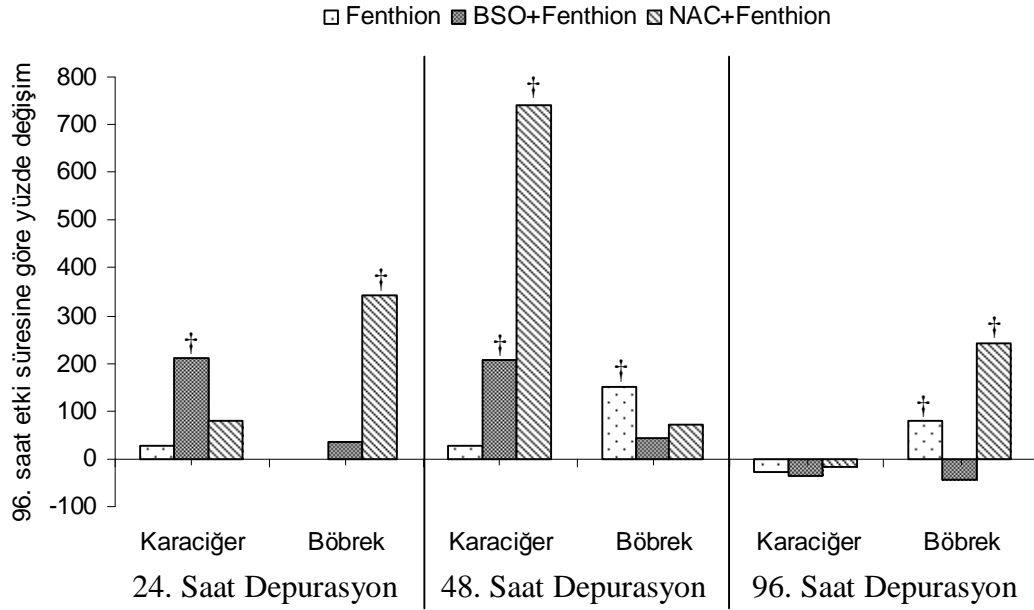
Karaciğer dokusunda fenthion grubunda depurasyon süreçlerinde lipid peroksidasyonunda herhangi bir değişim meydana gelmemiştir (Çizelge 4.14.). BSO grubunda lipid peroksidasyonu düzeyleri 24. ve 48. saatlerde sırasıyla %209 ve %208 arttırmıştır (Şekil 4.14.). Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunda meydana gelen en yüksek artış %740 ile 48. saat depurasyon süresinde NAC grubundadır.

Fenthion grubunda 48. ve 96. saatlerde böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunda sırasıyla %150 ve %79 artış saptanmıştır (Şekil 4.14.). Etki sürelerinde BSO grubunda gözlenen lipid peroksidasyonu artışı depurasyon sürecinde de devam etmektedir (Çizelge 4.14.). Etki sürelerinde NAC grubunda lipid peroksidasyonun azalmasına karşın, 24. ve 96. saatlerde lipid peroksidasyonunda %341 ve %242 oranında artış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.14. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyon uygulamasının MDA miktarına (nmol/mg protein) etkileri

Doku		96 saat Etki	24 saat Dep	48 saat Dep	96 saat Dep
K.ciğer	Fenthion	3.76±0.34 <sup>x</sup>	4.73±0.50 <sup>x</sup>	4.82±0.74 <sup>x</sup>	2.63±0.38 <sup>x</sup>
	BSO+Fen	3.60±0.35 <sup>x</sup>	11.14±2.27 <sup>y</sup>	11.08±2.41 <sup>y</sup>	2.30±0.25 <sup>x</sup>
	NAC+Fen	2.82±0.31 <sup>x</sup>	5.10±0.53 <sup>x</sup>	23.70±5.55 <sup>y</sup>	2.36±0.24 <sup>x</sup>
Böbrek	Fenthion	4.93±0.47 <sup>x</sup>	4.92±0.62 <sup>x</sup>	12.33±1.93 <sup>y</sup>	8.81±1.47 <sup>z</sup>
	BSO+Fen	11.34±3.3 <sup>xy</sup>	15.39±2.6 <sup>x</sup>	16.05±1.82 <sup>x</sup>	6.28±1.30 <sup>y</sup>
	NAC+Fen	3.43±0.82 <sup>x</sup>	15.13±0.99 <sup>y</sup>	5.83±1.03 <sup>x</sup>	13.22±0.46 <sup>y</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır (N=5). x, y ve z harfleri aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.14. *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında depurasyon uygulamasının MDA miktarına etkileri  
 †: 96 saat etki süresine göre istatistiksel ayrımı göstermektedir (P<0.05)

## 4.2. Tartışma

### 4.2.1. Fenthionun Etkisinin Değerlendirilmesi

Glutasyon toksik serbest radikal temizleyicisi olarak kritik bir rol oynamasının yanında elektrofilik ksenobiyotiklerin ve metabolitlerin detoksifikasyonunda önemlidir (Bharath ve ark., 2002). Balıklarda OP bileşiklerin GSH metabolizmasında toksik etkilerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Hai ve ark., 1997; Pena-Llopis ve ark., 2003a; Pena-Llopis ve ark., 2003b; Ferrari ve ark., 2007). OP malathion etkisinde *Sparus aurata*'da solungaç GPx aktivitesinin 24 saat içerisinde arttığı ve enzim aktivitesinin malathion ile kirliliğin belirlenmesinde erken uyarı parametresi olabileceği bildirilmiştir (Rosety ve ark., 2005).

İlımlı oksidatif stres koşullarında GSH sentezindeki artışa bağlı adaptif bir mekanizma olarak GSH miktarında artışlar meydana gelebilmektedir. Bunun yanında, yoğun oksidatif stres koşullarında GSH düzeyleri azalarak adaptif korunma mekanizması kaybedilmektedir (Zhang ve ark., 2004). Bu çalışmada fenthion etkisinin başlangıcında karaciğerde artan tGSH ve GSSG miktarları zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. Bu durum çalışmanın başlangıcında ana bileşik fenthionun ılımlı oksidatif stres koşulları yarattığını, buna karşılık zamana bağlı olarak artan fenthion detoksifikasyonu ile üretilen metabolitlerin oksidatif stres koşullarını arttırdığını göstermektedir. Fenthion gibi OP fosforotiyoat bileşikler sitokrom P450 aracılıklı oksidatif desülfürasyon tepkimeleri ile aktif fosfat analoglarına dönüştürülmektedirler. Bu nedenle fosforotiyoat bileşiklerle zehirlenmelerde toksik semptomların açığa çıkması gecikmektedir (Kwong, 2002).

Etkinin başlangıcında artan GSSG miktarlarına bağlı olarak artan GR aktivitesi ve azalan GSH/GSSG oranı da fenthion etkisiyle oksidatif stres koşullarının oluştuğunu destekler niteliktedir. Normal fizyolojik koşullarda GSSG, GR aktivitesi ile NADPH varlığında yeniden GSH'a dönüştürülmektedir ve indirgeme kapasitesinin yeterli olmadığı durumlarda GSH/GSSG oranında azalma meydana gelmektedir. Böylece intraselüler GSSG miktarı oksidatif stres indeksi olarak değerlendirilirken GSH/GSSG oranı da hücrel redoks durumunu yansıtmaktadır

(Cnubben ve ark., 2001). Petrivalsky ve ark. (1997) fenobarbital, *p,p'*-DDE ve naftokinon ksenobiyotiklerinin 48 saat etkisinde *O. mykiss*'de karaciğerde GR aktivitesinin arttığını saptamışlardır. GR aktivite artışının bu ksenobiyotiklerin meydana getirdiği oksidatif stres ile indüklendiğini bildirmişlerdir. Herbisid molinatenin 96 saat etkisinden sonra hayatta kalan *A. anguilla*'da karaciğerde GR aktivitesinin ve tGSH, GSH ve GSSG miktarlarının arttığı belirlenmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2001).

*Clarias lazera*'da böbrek dokusunun karaciğerle karşılaştırıldığında aktif bir GSH redoks döngüsüne sahip olduğu belirtilmektedir (Hamed ve ark., 1999). Çalışmamızda *O. niloticus*'da böbrek dokusunun karaciğer dokusuna yakın oranlarda GSH içerdiği, daha yüksek GR aktivitesi nedeniyle GSSG miktarının daha düşük olduğu ve GSH/GSSG oranının karaciğere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. *O. mykiss*'de karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında tGSH miktarlarının birbirine yakın olduğu, fakat *A. rostrata*'da karaciğerin böbrek ve solungaç dokusuna oranla iki kat fazla tGSH içerdiği bildirilmiştir (Otto ve ark., 1997a). Karaciğerin GSH'ın ana sentezleyicisi olduğu ve böbrek ve kas gibi dokuların büyük ölçüde plazmaya verilen GSH'tan yararlandıkları da bildirilmektedir (DeLeve ve Kaplowitz, 1991).

Bu çalışmanın sonuçları *O. niloticus*'da karaciğerde fenthionun detoksifikasyonunda GSH konjugasyonunun önemli bir rol oynadığını göstermesi açısından önemlidir. Fenthionun GST aracılıklı GSH-konjugasyonu ile ilgili omurgasız veya omurgalılarda laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar dışında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *C. carpio*'da karaciğer dokusunda 96 saat LC<sub>50</sub> değerinin %80'i gibi yüksek derişimde GST aktivitesinin değişmediği saptanmıştır (Sevgiler ve ark., 2007). GST oksidatif strese neden olan organik ksenobiyotiklerin etkilerinin değerlendirilmesinde biyomarker olarak kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2000). Karsinojenlerin, çevresel kirleticilerin, ilaçların ve diğer birçok elektrofilik ksenobiyotiklerin (Cnubben ve ark., 2001) ve bunların yanında lipid peroksidasyonu ürünlerinin (Rao, 2006a) GSH-aracılıklı detoksifikasyonunda görev almaktadır. Fenthion balık ve memelilerde asıl olarak CYP450 ve flavin-içeren monooksijenazların (FMO) katalizlediği faz-I tepkimeleri ile, metabolitleri olan fenthion sülfoksid ve fenthion oksona metabolize edilmektedir

(Kitamura ve ark., 2003). Faz-I enzimleri tarafından üretilen prooksidant metabolitler GST gibi faz-II enzimlerini indükleyebilirler, bu durumda ana bileşik çift yönlü indükleyici olarak görev yapmaktadır (Hamed ve ark., 1999; Ferrari ve ark., 2007).

Fenthion etkisinde karaciğer dokusunda etki süresi sonunda gözlenen tGSH ve GSH azalması ile birlikte GSSG miktarında meydana gelen azalmanın GST aktivite artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Metil parathion, fenitrothion, diazinon, dichlorvos, bromophos, chlorfenvinphos ve mevinphos gibi OP fosforotiyoat bileşiklerin detoksifikasyonu büyük ölçüde GST'nin katalizlediği GSH O-alkil konjugasyonuna bağlıdır (Jokanovic, 2001). OP fosforotiyoat metil parathion etkisinde *B. cephalus*'da karaciğerde GSH miktarının azalırken GST aktivitesinde meydana gelen artışın pestisidin detoksifikasyonunda faz-II biyotransformasyonunun yer aldığını göstermesi açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Monteiro ve ark., 2006b). OP fosforotiyoat insektisid RPR-II'nin etkisinde *O. mossambicus*'da karaciğerde GST aktivitesinin artış gösterdiği belirlenmiştir ve GST aktivitesinin indüksiyonunun pestisid toksisitesinden korunmada önemli olduğu belirtilmiştir (Rao, 2006b).

Karaciğer dokusunda fenthion etkisinde GSH azalması ile GST aktivitesinin artmasına karşın, böbrek dokusunda orta süreli etkide GSH azalması ile GST aktivitesinde azalma meydana gelmesi ilgi çekici bir bulgudur. Çeşitli bölgelerden alınan kontamine suların etkisinde bırakılan *A. anguilla*'da böbrek dokusunda GST aktivitesi artarken GSH miktarında herhangi bir değişim bulunamamıştır ve değişmeyen GSH düzeylerinden yola çıkarak GST enzimi için GSH düzeyinin tek başına sınırlayıcı etken olamayacağı bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2006). Değişik strüktürel yapılardaki bileşiklerin GST enziminin ekspresyonunu arttırabilmesi nedeniyle GST enziminin indüksiyonunda bir takım farklı mekanizmaların bulunduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte dokularda GST ekspresyonunda gözlenen farklılıkların farklı biyolojik regülasyon mekanizmalarının varlığını gösterdiği ve bunun organ-selektif toksisitenin açıklanmasında bir basamak olabileceği de belirtilmektedir (Mitchell ve ark., 1997).

Fenthion etkisinde karaciğerde GST aktivitesinin artmasıyla GPx aktivitesi azalmış, böbrek dokusunda ise azalan GST aktivitesinin yanında GPx aktivitesinde

herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. GPx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik hidroperoksitleri suya ve karşılıkları stabil alkollere dönüştüren enzimdir. GPx aktivitesi bu süreçte GSH'ı kullanarak GSSG meydana getirir ve bu nedenle GST'ye benzer bir şekilde GSH'a gereksinim duyar (Arteel ve Sies, 2001). OP metil parathion etkisinde *B. cephalus*'da karaciğer dokusunda GPx aktivitesi değişmezken GST aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (Monteiro ve ark., 2006b). OP dimethoate etkisinde *C. lazera*'da böbrek dokusunda GSH miktarı ile birlikte GPx ve GST aktivitesinin azaldığı ve buna bağlı olarak çevresel toksikantların veya endojen bileşiklerin toksisitesinin artabileceği ve bazı balık dokularında tümör oluşumunun indüklenebileceği bildirilmiştir (Hamed ve ark., 1999). Aynı çalışmada karaciğer dokusunda GST aktivitesi azalırken GPx aktivitesinde herhangi bir değişim meydana gelmediği belirlenmiştir. Balıklarda GPx aktivitesinin kolaylıkla indüklenmediği, bu nedenle balıklarda lipid peroksitlerinin yıkımında GPx ve GST aktivitelerinin öneminin araştırılması gereken bir konu olduğu bildirilmiştir (Stephensen ve ark., 2002).

Fenthion etkisiyle GPx aktivitesinde saptanan değişimlerin türe-özgü olabileceği de düşünölmektedir. Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada, *C. carpio*'da karaciğer dokusunda fenthion etkisiyle 24 ve 96 saat sonunda GPx aktivitesinde herhangi bir değişim saptanamazken (0.43 mg/L fenthion, Yayınlanmamış bulgu), bu çalışmada karaciğer dokusunda (0.45 mg/L fenthion) tüm etki sürecinde GPx aktivitesi azalmıştır.

Karaciğer dokusunda etki süreleri boyunca fenthion lipid peroksidasyonunda herhangi bir değişim meydana getirmemiştir ve bu durumun artan GST aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. OP fosforotiyoat insektisid RPR-V etkisinde *O. mossambicus*'da karaciğerde GST aktivitesinin 30 günlük etki periyodunda GSH azalmasına bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır ve GST aracılıklı konjugasyon tepkimelerinin, yüksek miktarlarda bulduklarında olumsuz etkilere neden olan lipid peroksidasyonu ürünlerinin detoksifikasyonunda önemli olduğu belirtilmiştir (Rao, 2006a).

Karaciğer dokusundan farklı olarak böbrek dokusunda fenthion etkisinin başlangıcında lipid peroksidasyonu düzeyleri önemli derecede artış göstermiştir.

Buna karşın aynı sürede GSH redoks durumu ve GSH-bağımlı enzim aktivitelerinde herhangi bir değişim saptanmamıştır. OP malathion ve anilofos etkisinde sıçan beyin dokusunda GSH miktarının ve GST aktivitesinin değişmediği halde lipid peroksidasyonu düzeylerinin artış gösterdiği belirlenmiştir ve lipofilik olan bu iki bileşiğin plazma membranı ile doğrudan etkileşerek lipid peroksidasyonunu arttıracakları belirtilmiştir (Hazarika ve ark., 2003). Fosforotiyoat fenthion varlığında lipid peroksidasyonunda gözlenen bu etkinin uygulanan bileşiğe göre farklılık gösterdiği düşünülmektedir. OP fosforotiyoat diazinon etkisinde *O. niloticus*'da böbrek, solungaç ve kas dokularında uygulamanın 24. saatinde lipid peroksidasyonu düzeylerinin değişmediği, buna karşın sindirim kanalında lipid peroksidasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Durmaz ve ark., 2006). OP fosforotiyoat dichlorvosun 24 saat etkisi sonunda *C. carpio*'da böbrek, solungaç, karaciğer ve kas dokularında lipid peroksidasyonu düzeylerinin azaldığı bulunmuştur (Hai ve ark., 1997).

#### 4.2.2. BSO'nun Fenthion Toksisitesine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Glutasyon miktarının kimyasallarla azaltılması yöntemi, toksik etkilerinin GSH tarafından azaltıldığı düşünülen bileşiklerin çalışılmasında etkili bir yoldur (Gallagher ve ark., 1992). GSH miktarı, sentezini sağlayan  $\gamma$ -GCS enziminin inhibe edilmesiyle azaltılabilir. Enzimin inhibisyonu GSH'ı kullanan tepkimelerin sonunda hücrel GSH stoklarının tükenmesine yol açar. GSH miktarının azaltılmasında kullanılan bu strateji büyük ölçüde GSH'ın kullanılma oranına bağlıdır ve dokulara göre farklılık göstermektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan inhibitör BSO'dur (Griffith, 1999).

Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da karaciğerde BSO tüm sürelerde tGSH, GSH ve GSSG miktarlarının azalmasına, GSH/GSSG oranının ise artmasına neden olmuştur. Aynı zamanda BSO enjeksiyonu karaciğerde GPx aktivitesinde ve lipid peroksidasyonunda fenthion grubuna göre herhangi bir değişim meydana getirmemiştir. GPx aktivitesinin azaltılarak GSH oksidasyonunun engellenmesi GSH/GSSG redoks durumunun korunması açısından toksikant etkisine karşı adaptif

bir yanıt olarak değerlendirilebilir. Benzer bir durum çevresel kirletici tetraklorobifenil (TCB) etkisinde *O. mykiss*'de karaciğer dokusunda BSO enjeksiyonu ile 6 gün sonunda meydana gelmiştir. tGSH, GSH, GSSG miktarlarının ve GPx aktivitesinin azaldığı, fakat GSH/GSSG oranının değişmediği belirlenmiş ve düşük GPx aktivitesi ile GSSG miktarının azaltılmasının bir çeşit homeostatik adaptasyonu yansıttığı bildirilmiştir (Otto ve ark., 1997b). Bununla birlikte aynı dozlardaki TCB ve BSO'nun birlikte etkisinde *O. mykiss*'de karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu düzeylerinin değişmediği belirlenmiştir (Otto ve ark., 1997a). 30 gün boyunca günde iki kez 4 mmol/kg BSO enjekte edilen sıçanlarda karaciğer GSH miktarının azaldığı, GSSG miktarında dalgalanmalar meydana geldiği ve buna bağlı olarak GSH/GSSG oranının önemli derecede arttığı saptanmıştır (Rajasekaran ve ark., 2004). Fenthion etkisiyle GSH'ın GSSG'ye oksidasyonu ile artan GSSG miktarının, ATP-bağımlı MRP aktivitesini arttırarak GSSG'nin plazmaya salınmasına ve bu nedenle GSSG miktarının azalarak GSH/GSSG oranının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu protein ailesi oksidatif stres koşullarında GSSG'nin plazmaya salınmasında rol oynar ve klasik substratları arasında GSSG, GSH S-konjugatları ve glukuronat siklik nükleotid konjugatları bulunmaktadır (Minich ve ark., 2006). Dokularda GSSG'nin hücre dışına atılması, değişen GSH redoks dengesi nedeniyle oluşabilecek hücresel hasarı engellemek için koruyucu bir mekanizma olarak iş görmektedir.

Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da BSO'nun lipid peroksidasyonu düzeylerini etkilememesi azalan GSH konjugasyonu nedeniyle derişimi artan toksik fenthion metabolitlerinin arttırdığı lipid peroksid derişiminin GST aktivitesini indüklemesi ile de açıklanabilir. TCB etkisinde *O. mykiss*'de BSO enjeksiyonu ile solungaç dokusunda TCB verilen gruba oranla GSH düzeylerinin azaldığı ve GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Otto ve ark., 1997b). OP azinphos-metil etkisinde *C. carpio* ve *O. niloticus*'da böbrek GST aktivitesinin arttığı, buna karşılık lipid peroksidasyonu düzeylerinin değişmediği bildirilmiştir (Oruç ve ark., 2004).

Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da böbrek dokusunda BSO enjeksiyonu tGSH ve GSH miktarlarının ve GR enzim aktivitesinin artmasına neden olmuştur. *Ictalurus punctatus*'da solungaç dokusunda BSO ve bir GSH azaltıcı ajan DEM etkisinde



azalan GSH düzeylerinin 48 saat içinde %66 oranında geri kazanıldığı belirlenmiş ve bu durumun, GSH'ın biyosentez kapasitesinin arttırılmasıyla, solungaçlara bu maddelerin daha az ulaşmasıyla veya BSO/DEM'in karaciğere oranla solungaçlardan daha kolay atılmasıyla açıklanabileceği belirtilmiştir (Gallagher ve ark., 1992). Bunun yanında aynı çalışmada böbrek gibi  $\gamma$ -GT aktivitesinin yüksek olduğu dokularda GSH geri kazanımının daha kolay olacağı da bildirilmektedir. Bu bağlamda fenthion etkisinde *O. niloticus*'da BSO enjeksiyonu ile toksik etkilerden korunmak amacıyla böbrek dokusunun karaciğerden plazmaya salınan GSSG'yi alarak tGSH ve GSH derişimini yükseltmiş olabileceği de düşünölmektedir. Eksojen olarak verilen oksidant *t*-butil hidroperoksin sıçan böbrek proksimal tübüler hücrelerinde intraselöler GSH'ın GSSG'ye oksidasyonuna neden olduğu ve ekstrasellöler GSSG'nin de hücre içine taşındığı bulunmuştur (Visarius ve ark., 1996). Hücre içine alınan GSSG'nin GSH'a redüklenmediği ve oksidatif koşullar altında hücrelerin GSSG redüksiyonundan çok GSH'ı dışarıdan alarak korunma sağladıkları belirtilmiştir. Çalışmamızda böbrekte  $\gamma$ -GT aktivitesinde herhangi bir değişim olmamasına karşın GR aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Bu nedenle fenthion-indöklü oksidatif stresten korunmak üzere böbrek dokusunun ekstrasellöler GSSG'den de GSH kaynağı olarak yararlandığını düşünmekteyiz.

Ksenobiyotiklerden ve bunların elektrofilik metabolitlerinden GSH S-konjugatlarının oluşturulması uzun zamandan beri detoksifikasyon tepkimeleri olarak değerlendirilmektedir (Dekant, 2001). Bununla birlikte bu genelleme her zaman doğru değildir ve bu tepkimelerle daha toksik bileşikler meydana gelebilmektedir. Böbrek dokusunda BSO enjeksiyonu ile tGSH ve GSH miktarlarının ve GR enzim aktivitesinin artmasına karşın lipid peroksidasyonu düzeylerinin artışı, fenthion ve metabolitlerinden meydana gelen hepatik GSH S-konjugatlarının bu bileşiklere göre daha az toksik olduğunu göstermektedir. BSO etkisiyle azalan GSH miktarları daha düşük oranda GSH S-konjugatı üretimine neden olmakta ve böylece böbrek dokusuna fenthionun toksik faz-I metabolitleri ulaşmaktadır. 2-metilfuran etkisinde sıçanlarda karaciğer dokusunda GSH konjugasyonunun glutamik-pirüvik transaminaz aktivitesi ile ölçölen hepatotoksisiteyi arttırdığı, BSO verilen sıçanlarda idrarda metabolitlerin artarken hepatotoksisitenin azaldığı bildirilmiştir

(Ravindranath ve Boyd, 1991). BSO'nun 2-metilfuranın dokulara dağılımını ve 2-metilfuranın detoksifikasyonunu sağlayan karmaşık fonksiyonlu oksidaz aktivitelerini etkilemediği, daha toksik GSH S-konjugatlarının oluşmasını engelleyerek karaciğeri koruyucu etki yaptığı belirtilmiştir. Benzer olarak 1-cyano-3,4-epithiobutane (CEB) etkisinde BSO enjeksiyonunun sıçan karaciğer GSH miktarını ve böbreklerde nekrozu azalttığı bildirilmiştir (Vansteenhuse ve ark., 1991). Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da aynı sürelerde böbrekte BSO enjeksiyonu ile meydana gelen GST aktivite azalmasının da lipid peroksidasyonunun artmasında etken olduğu düşünülmektedir.

#### 4.2.3. NAC'nin Fenthion Toksisitesine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Hücrelerde GSH'ın sentezi yapıtaşı olan sisteinin kullanılabilirliğine bağlıdır, fakat sistein tek başına oldukça anstabil, doku GSH oranını arttırmak üzere en yaygın kullanılan yöntem de hücrelerde sistein aminoasidinin kullanılabilirliğini arttırmaktır (Sen ve Packer, 2000). Bu amaçla en yaygın kullanılan bileşik NAC'dir. NAC dokularda sisteine dönüştürülerek GSH sentezini uyarır, bunların yanında içerdiği sülfidril grubu ile detoksifikasyona yardımcı olur ve doğrudan ROS temizleyicisi olarak da görev yapar (Kelly, 1998).

Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da NAC enjeksiyonu ile GSH/GSSG oranındaki artışın GSH sentezinin artışından daha çok NAC'nin kendi antioksidant etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. NAC etkisinde GSH ve GSSG miktarları fenthionun tek başına etkisine benzer şekilde zamana bağlı olarak azalmaktadır, bunun yanında lipid peroksidasyonu düzeyi orta süreli etkide azalma göstermiştir. Fenthion içeren suya bırakılan *C. carpio*'da NAC enjeksiyonu ile lipid peroksidasyonu ve GSH düzeylerinde koruma olmamasına karşın, GSSG ve protein miktarlarının,  $\gamma$ -GCS aktivitesinin ve GSH/GSSG oranının korunmasından yola çıkarak, gözlenen etkinin NAC'nin kendi antioksidant özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Sevgiler ve ark., 2007). Endotoksin lipopolisakkarid verilen sıçanlarda akciğerde NAC H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin azalmasına neden olurken GSH miktarına herhangi bir etki yapmamıştır (Sprong ve ark., 1998). Bu durumun NAC'nin GSH stoklarını

etkilemesinden başka kendi oksidatif stresi azaltıcı etkisinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Kurşun etkisinde PC-12 hücrelerinde NAC'nin kurşun verilen gruba oranla GSH miktarını etkilemezken GSSG ve MDA miktarlarını azalttığı ve GSH/GSSG oranını arttırdığı bulunmuştur (Aykin-Burns ve ark., 2005). Sisteindeki serbest tiyol grubu nedeniyle NAC'nin GSH'ın antioksidant etkisini taklit ettiği bildirilmektedir.

Kadmium (Cd) etkisinde sıçanlara şelatlaştırıcı ajan olarak verilen NAC'nin karaciğer ve beyin Cd düzeylerini etkilemediği, karaciğerde Cd'a göre GSH miktarını ve GSH/GSSG oranını arttırırken, GSSG ve MDA miktarlarını azalttığı saptanmıştır (Tandon ve ark., 2003). Beyin dokusunda ise GSH, GSSG miktarlarına ve GSH/GSSG oranına etkisi olmayan NAC'nin MDA miktarını azalttığı belirlenmiştir. Fenthion etkisinde *O. niloticus*'da böbrek dokusunda NAC fenthionun orta süreli etkide neden olduğu tGSH ve GSH miktarlarındaki ve GST aktivitesindeki azalmanın GSH sentezinin arttırılmasıyla tolere edilmesini sağlamıştır ve böylece lipid peroksidasyonunun da azalmasına neden olmuştur. OP fosforotiyot dichlorvosun akut etkisinden sonra NAC içeren suya bırakılan *A. anguilla*'da 96 saat sonunda kas dokusunda GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının dichlorvos etkisindeki balıklara oranla artış gösterdiği saptanmıştır (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Dichlorvos etkisinde azalan GSH miktarı, GSH/GSSG oranı ve  $\gamma$ -GT aktivitesinin NAC enjekte edilen *A. anguilla* karaciğer ve kas dokularında önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2003b).

#### **4.2.4. Depurasyon Sürecinde Fenthion Grubundaki Değişimlerin Değerlendirilmesi**

Depurasyon antikolinesteraz ajanlarla uygulamanın kesilmesinden sonra zamana bağlı olarak etkilenen parametrelerin kontrol düzeylerine ulaşması sürecidir (Sancho ve ark., 1997). Lipofilik bileşiklerin balık gibi akuatik organizmaların yağ dokularında birikebildiği (Antunes ve ark., 2003) ve akuatik organizmalardan eliminasyonlarının  $\log K_{ow}$  değerleri ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (van der Oost ve ark., 2003). Fenthion 4.09  $\log K_{ow}$  değeri ile oldukça lipofilik bir bileşiktir

(Pehkonen ve Zhang, 2002) ve balık dokularında yüksek derişimlerde birikebilmektedir (Tsuda ve ark., 1997). Fenthion ve metabolitleri, fenthion sülfon ve fenthion sülfoksidin Japonya'nın Biwa Gölü'ne açılan 6 nehrinde ve ortamdaki balıklarda bulunduğu ve fenthion metabolitlerinin suda, araştırılan diğer pestisidler molinate ve isoprothiolane metabolitlerine göre daha dayanıklı olabileceği bildirilmiştir (Tsuda ve ark., 1998).

Çalışmamızda 96 saatlik depurasyon sürecinin fenthionun indüklediği GSH redoks dengesizliğinin iyileştirilmesinde yeterli olmadığı düşünülmektedir. Karaciğer dokusunda tGSH ve GSH miktarlarında azalmanın devam etmesi GSH-bağımlı fenthion metabolizmasının devam ettiğini göstermektedir. 96 saat boyunca OP fosforotiyoat dichlorvos etkisinden sonra 96 saat süreyle pestisid içermeyen suda bekletilen *A. anguilla*'da kas dokusunda GSH miktarının ve GSH/GSSG oranının dichlorvos etkisine göre düzelmediği bildirilmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2003a). Dichlorvosun karaciğerde GSH-bağımlı süreçlerle detoksifikasyonunun sağlandığı ve GSH'nin kullanılabilirliğinin dichlorvosun eliminasyonunda sınırlayıcı bir faktör olduğu belirtilmiştir.

Fenthion etkisinde azalan GPx aktivitesi süreye bağlı artış göstermiş ve depurasyon süreci sonunda kontrol düzeyine ulaşmıştır. Metabolizmasının devam etmesiyle birlikte süreç içerisinde GPx aktivitesini olasılıkla kompetitif olarak inhibe eden fenthionun derişiminin azalmasıyla aktivitenin yerine konduğunu düşünmekteyiz. İleri enzim kinetiği çalışmaları yapılarak fenthion GPx enzimi arasındaki ilişkinin aydınlatılması gerekmektedir. Çevresel kirletici poliaromatik hidrokarbon phenanthrene etkisinde *C. auratus*'da karaciğerde GST ve diğer antioksidant enzimler, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin 7 gün depurasyon sonunda kontrol düzeylerine ulaştığı ve balık dokusunda biriktirilen bileşiğin yeniden suya verilmesi ve artan phenanthrene metabolizması ile antioksidant sistemin düzeldiği bildirilmiştir (Sun ve ark., 2006).

Fenthion-indüklü GSH redoks değişimlerinin düzelmesi için 96 saatten daha uzun sürelere gereksinim duyulduğunu düşünmekteyiz. GPx aktivitesinin süreye bağlı olarak kontrol düzeylerine ulaşmasının ve GST aktivitesinin depurasyonun başlangıcında ve sonunda kontrol düzeylerine azalmasının yanında fenthion

etkisinden sonra GSSG miktarlarının kontrol düzeylerine yükselmesine karşın, GST aktivitesi orta sürede artan lipid peroksidasyonu ile artmış, GSH/GSSG oranı depurasyonun başlangıcında en düşük seviyesine gerilemiştir. Diğer araştırmacılar 96 saatten daha uzun sürelerde normalleşmenin gözlemlendiğini belirtmektedirler. *O. mossambicus*'da karaciğer dokusunda OP monocrotophosun 30 gün etkisinde artan GST aktivitesinin ve azalan GSH miktarının 7 gün depurasyon süresi sonunda kontrol düzeylerine ulaştığı bildirilmiştir (Rao, 2006c). OP fosforotiyoat RPR-V'nin 30 gün etkisinde azalan GSH miktarının 7 gün depurasyon süresi sonunda kontrole oranla düşük olmasına karşın, artan GST aktivitesinin kontrol düzeylerine ulaştığı saptanmıştır (Rao, 2006a). Mahboob ve ark. (2001) OP fosforotiyoat RPR-II ve RPR-V'nin 45 ve 90 gün etkisinde sıçan karaciğer dokusunda azalan GSH miktarının ve GST aktivitesinin, etkinin kesilmesinden 28 gün sonra geri kazanıldığını bildirmişlerdir. RPR-V'nin 45 ve 90 gün etkisinde sıçan böbrek ve beyin dokularında azalan GSH miktarının ve GST aktivitesinin etkinin sona ermesinden 28 gün sonra kontrol seviyesine ulaştığı saptanmıştır (Mahboob ve ark., 2004). OP monocrotophosun 96 saat etkisinden sonra pestisidsiz suya bırakılan *Gambusia affinis*'de visceral dokuda artan lipid peroksidasyonu düzeylerinin 4 gün sonunda azalmadığı, ancak depurasyonun 8. gününde kontrol düzeylerine gerilediği belirlenmiştir (Kavitha ve Rao, 2007). Aynı çalışmada etki süresi sonunda artan GR aktivitesinin 12. günde kontrol düzeylerine ulaştığı bildirilmiştir.

#### 4.2.5. Depurasyon Sürecinde BSO Grubundaki Değişimlerin Değerlendirilmesi

İnsektisidlerin toksik etkilerinde görülen doku farklılıklarının dokuların fonksiyonları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ferrari ve ark., 2007). Fenthion etkisinden sonra böbrek dokusunda depurasyon sürecinde lipid peroksidasyonu düzeyleri artış göstermiştir. Böbrek dokusunun GSH S-konjugatlarını işleyerek toksik ara bileşikleri açığa çıkarttığı ve hatta bu toksik bileşikleri biriktirebildiği bildirilmektedir (Dekant, 2001).

GSH miktarının azaltılmasında iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan birincisi GSH'ın çeşitli ajanlarla okside edilmesi, diğeri ise GSH sentezinin bloke

edilmesidir (Griffith, 1999). GSH'nin selektif olarak inhibisyonunun sağlanması oldukça zor olduğundan birinci yöntem tercih edilmemektedir. Çalışmamızda depurasyon süreci boyunca karaciğerde BSO enjeksiyonu ile tGSH ve GSH miktarlarının fenthion grubuna oranla düşük düzeylerde olduğu bulunmuştur. Gallagher ve ark. (1992) *I. punctatus*'da karaciğer GSH miktarının 1000 mg/kg BSO enjeksiyonu ile 72 saat sonunda hafif bir azalma gösterdiğini, bununla birlikte 400 mg/kg BSO enjeksiyonu ile etki gözlenmediğini bildirmişlerdir. 1000 mg/kg BSO enjeksiyonunun, GSH'a bağlanarak azalmasına neden olan DEM ile birlikte hepatik mitokondriyal ve sitosolik GSH'ı önemli derecede azalttığı ve mitokondriyal ve sitosolik GSH'ın ancak 6 gün sonunda sırasıyla %38 ve %7 oranlarında geri kazanıldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak GSH azaltıcı ajanların varlığında BSO etkisinin uzun süreli olduğu ve diğer metabolizma enzimlerini etkilemeden uygun dozdaki tek BSO enjeksiyonunun dahi GSH ile ilgili detoksifikasyon çalışmalarında yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Watanabe ve ark. (2003) 14 gün süreyle içme sularına BSO karıştırılan farelerde karaciğer CYP450 içeriğinin etkilenmediği halde, GSH miktarının etkili bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada tek başına toksik etkisi gözlenmeyen asetaminofenin BSO varlığında karaciğer ve böbreklerde belirgin nekrozlara neden olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda BSO grubunda depurasyonun başlangıcında karaciğer tGSH ve GSH miktarları ve GST aktivitesi azalmıştır. Böbrek dokusunda ise depurasyon uygulaması ile lipid peroksidasyonu düzeylerindeki artış da fenthionun ve metabolitlerinin GSH S-konjugatlarının, bu bileşiklerden daha az toksik olduğunu kanıtlar niteliktedir.

#### 4.2.6. Depurasyon Sürecinde NAC Grubundaki Değişimlerin Değerlendirilmesi

Fare karaciğer hepatositlerine asetaminofen etkisinden bir saat önce NAC uygulamasıyla asetaminofen etkisinde hücrelerin tGSH düzeylerinde kontrole göre önemli bir değişim olmadığı, asetaminofen etkisinden 2 saat sonra NAC'nin verilmesi durumunda asetaminofen etkisiyle azalan tGSH düzeylerinin yarım saat içerisinde kontrol düzeylerine ulaşabildiği bildirilmiştir (Bajt ve ark., 2004).

Subkutanöz Cd verilen sıçanlarda üriner LDH aktivitesi ve protein miktarı ile ölçülen nefrotoksisitede artış olduğu, Cd ve NAC enjekte edilen hayvanlarda nefrotoksisitenin azaldığı, bunun yanında NAC enjeksiyonunun kesilmesiyle devam eden Cd etkisinde nefrotoksisitenin yeniden artış gösterdiği saptanmıştır (Shaikh ve ark., 1999). Bu sonuç ile NAC etkisinin kısa ömürlü olduğu ve nefrotoksisiteden korunmak amacıyla NAC uygulamasının sürdürülmesi gerektiği belirtilmiştir. Çalışmamızda NAC fenthion etkisinden önce tek enjeksiyonla verilmiştir ve NAC uygulamasına devam edilmemiştir. Etki sürecinin başlangıcı ve ortasında karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun oksidatif stres oluşturma etkisine karşı koruyucu görev yapan NAC, etki süresinin sonu ve depurasyon sürecinde her iki dokuda da oksidatif stres koşullarının artmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. NAC'nin süreye bağlı prooksidant etkisi ile ilgili benzer başka çalışmaya rastlanılmamıştır ve bu durumun aydınlatılması için daha ileri araştırmalar yapılması önerilmektedir.

Süreye bağlı etki ilk kez bu çalışmada gösterilmekle birlikte, NAC'nin doza-bağımlı oksidatif etkiler meydana getirdiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. 400mg/kg NAC'nin fenthion etkisindeki *C. carpio*'da karaciğerde GSH ve protein azalmasının yanında lipid peroksidasyonuna neden olduğu saptanmıştır (Sevgiler ve ark., 2007). Yüksek derişim NAC etkisinde kalan *A. anguilla*'ların öldüğü bildirilmiştir Pena-Llopis ve ark. (2003a). Yüksek derişimdeki düşük moleküler ağırlıklı tiyollerin antioksidant etkiden çok prooksidant olarak davrandıkları ve NAC'nin metal katalizli ROS oluşumunu arttırabileceği bildirilmiştir. Endotoksin lipopolisakkarid verilen sıçan akciğer hücrelerinde *in vitro* yüksek derişimdeki NAC'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında Fe<sup>3+</sup>'i Fe<sup>2+</sup>'e indirgeyerek OH<sup>-</sup> oluşumuna neden olduğu ve böylece prooksidant etki yaptığı belirlenmiştir (Sprong ve ark., 1998).

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

1. Subletal fenthion derişiminin etkisinde *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında GSH redoks durumunda süreye bağımlı oksidatif değişimler meydana gelmiştir. GST ve GPx enzim aktiviteleri ile tGSH ve GSH miktarları fenthion etkisine duyarlı parametreler olarak belirlenmiştir.
2. BSO uygulamasında karaciğer dokusunda yüksek oranlarda GSH azalması ve böbrek dokusunda eş zamanlı lipid peroksidasyonu artması nedeniyle GST aracılıklı GSH konjugasyonunun fenthion ve faz I metabolitlerinin toksisitesinden korunmada önemli olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur.
3. BSO uygulaması ile GSH/GSSG oranında meydana gelen artışın hücre membranında yer alan ilaç pompalarının GSSG'yi hücre dışına atmasıyla adaptif bir yanıt olarak geliştiği düşünülmektedir.
4. Fenthion-indüklü oksidatif stresin giderilmesinde NAC kısa sürede önemli katkılar yapmaktadır. Sürenin uzamasıyla NAC fenthionun toksik etkilerini arttırmaktadır. Bu nedenle NAC ile yapılan çalışmalarda NAC'nin dozu yanında süre etkisinin de araştırılması uygun olacaktır.
5. Fenthionun oksidatif toksisitesinde dokuya özgü yanıtlar saptanmıştır.
6. Fenthionun lipofilik özelliği ve aktivasyonu için ön metabolizma gerekliliği gibi nedenlerle 96 saat depurasyon uygulamasının yeterli olmaması, oksidatif etkilerin giderilme süresinin belirlenmesinde daha uzun süreli depurasyon uygulamalarının gerekliliğini ortaya koymuştur.



## KAYNAKLAR

- AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523: 37-48.
- AHMAD, I., PACHECO, M., SANTOS, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An *in situ* study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65: 952-962.
- ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., NOVELLI, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. *Environment International*, 27: 673-679.
- ALVAREZ-MUNOZ, D., LARA-MARTIN, P.A., BLASCO, J., GOMEZ-PARRA, A., GONZALEZ-MAZO, E., 2007. Presence, biotransformation and effects of sulfophenylcarboxylic acids in the benthic fish *Solea senegalensis*. *Environment International*, 33: 565-570.
- ANDERSON, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113: 548-555.
- \_\_\_\_\_, 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 1-14.
- ANTUNES, P., GIL, O., BERNARDO-GIL, M.G., 2003. Supercritical fluid extraction of organochlorines from fish muscle with different sample preparation. *Journal of Supercritical Fluids*, 25: 135-142.
- ARTEEL, G.E., SIES, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 153-158.
- ATIF, F., PARVEZ, S., PANDEY, S., ALI, M., KAUR, M., REHMAN, H., KHAN, H.A., RAISUDDIN, S., 2005. Modulatory effect of cadmium exposure on deltamethrin-induced oxidative stress in *Channa punctata* Bloch. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49: 371-377.

- AYKIN-BURNS, N., FRANKLIN, E.A., ERCAL, N., 2005. Effects of *N*-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49: 119-123.
- BACANSKAS, L.R., WHITAKER, J., DI GIULIO, R.T., 2004. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories. *Marine Environmental Research*, 58: 597-601.
- BAJT, M.L., KNIGHT, T.R., LEMASTERS, J.J., JAESCHKE, H., 2004. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by *N*-acetyl cysteine. *Toxicological Sciences*, 80: 343-349.
- BARLOW, B.K., LEE, D.W., CORY-SLECHTA, D.A., OPANASHUK, L.A., 2005. Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology*, 26: 63-75.
- BHARATH, S., HSU, M., KAUR, D., RAJAGOPALAN, S., ANDERSEN, J.K., 2002. Glutathione, iron, and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1037-1048.
- BEUTLER, E., 1984. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2<sup>nd</sup> Ed. Grune and Starton, New York, 160s.
- CAMERA, E., PICARDO, M., 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*, 781: 181-206.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 250: 5475-5480.
- CECONI, C., BORASO, A., CARGNONI, A., FERRARI, R., 2003. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420: 217-221.
- CERESER, C., BOGET, S., PARVAZ, P., REVOL, A., 2001. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, 163: 153-162.

- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J., van BLADEREN P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- DEKANT, W., 2001. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. *Toxicology Letters*, 124: 21-36.
- DELEVE, L.D., KAPLOWITZ, N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 52, 287-305.
- DE ZWART, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M., VERMEULEN, N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 202-226.
- DICKINSON, D.A., FORMAN, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1019-1026.
- DJORDJEVIC, V.B., 2004. Free radicals in cell biology. *Internal Review of Cytology*, 237: 57-89.
- DORVAL, J., HONTELA, A., 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192: 191-200.
- DURMAZ, H., SEVGİLER, Y., ÜNER, N., 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84: 215-226.
- DUTTA, H.M., ARENDS, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91: 157-162.
- EPA, 2006. Fenthion; product registrations cancellation order. OPP-2003-0333; FRL-7324-2. United States Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/EPA-PEST/2003/September/Day-26/p24535.htm>
- ESTRELA, J.M., ORTEGA, A., OBRADOR, E., 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43: 143-181.

- EXTOXNET, 1996. Fenthion, Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles, Oregon State University, USA. [http:// extoxnet. orst. edu/ pips/ fenthion.htm](http://extoxnet.orst.edu/pips/fenthion.htm)
- FERRARI, A., VENTURINO, A., PECHEN D'ANGELO, A.M., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 134-142.
- FULTON, M.H., KEY, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 37-45.
- GALLAGHER, E.P., HASSPIELER, B.M., DI GIULIO, R.T., 1992. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. *Biochemical Pharmacology*, 43: 2209-2215.
- GRIFFITH, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106: 207-212.
- \_\_\_\_\_, 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 922-935.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY. W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- HAI, D.Q., VARGA, Sz.I., MATKOVICS, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C: 83-88.
- HAIDARA, K., MOFFATT, P., DENIZEAU, F., 1999. Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 49: 297-305.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Inc., New York, USA, Third edition, 936 sayfa.
- HAMED, R.R., ELAWA, Sh.E., FARID, N.M., ATAYA, F.Sh., 1999. Evaluation of detoxification enzyme levels in Egyptian catfish, *Clarias lazera*, exposed to

- dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63: 789-796.
- HANIGAN, M.E., 1998.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 333-342.
- HAZARIKA, A., SARKAR, S.N., HAJARE, S., KATARIA, M., MALIK, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185: 1-8.  
<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=2&genusname=Oreochromis&speciesname=niloticus+niloticus>
- IOANNIDES, C., 2002. Xenobiotic metabolism: An overview (C. Ioannides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 1-32.
- JEFFERIES, H., COSTER, J., KHALIL, A., BOT, J., McCAULEY, R.D., HALL, J.C., 2003. Glutathione. *ANZ Journal of Surgery*, 73: 517-522.
- JOKANOVIC, M., 2001. Biotransformation of organophosphorous compounds. *Toxicology*, 166: 139-160.
- KAMBOJ, A., KIRAN, R., SANDHIR, R., 2006. Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by *N*-acetylcysteine. *Experimental Brain Research*, 170: 567-575.
- KAVITHA, P., RAO, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 182-188.
- KELLY, G.S., 1998. Clinical applications of *N*-acetylcysteine. *Alternative Medicine Reviews*, 3: 114-127.
- KINNEAR, P.R., GRAY, C.D., 1995. *SPSS for Windows Made Simple*. Lawrence Erlbaum Associates, East Sussex, UK, 275s.
- KITAMURA, S., SUZUKI, T., KADOTA, T., YOSHIDA, M., OHASHI, K., OHTA, S., 2003. *In vitro* metabolism of fenthion and fenthion sulfoxide by liver

- preparations of sea bream, goldfish, and rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 179-186.
- KWONG, 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24: 144-149.
- LI, W., YIN, D., ZHOU, Y., HU, S., WANG, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 251-255.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-257.
- LU, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal*, 13: 1169-1183.
- LUO, Y., SU, Y., LIN, R., SHI, H., WANG, X., 2006. 2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR method. *Chemosphere*, 65: 1064-1073.
- MAHBOOB, M., SIDDIQUI, M.K.J., 2001. Alterations in hepatic detoxifying enzymes induced by new organophosphorus insecticides following subchronic exposure in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 21: 501-505.
- MAHBOOB, M., KALEEM, M., SIDDIQUI, J., 2004. Effects of a novel organophosphorus pesticide (RPR-V) on extrahepatic detoxifying enzymes after repeated oral doses in rats. *Toxicology*, 202, 159-164.
- MARONI, M., COLOSIO, C., FERIOLI, A., FAIT, A., 2000. Organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 143: 5-37.
- MINICH, T., RIEMER, J., SCHULZ, J.B., WIELINGA, P., WIJNHOLDS, J., DRINGEN, R., 2006. The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 97: 373-384.
- MITCHELL, A.E., MORIN, D., LAKRITZ, J., JONES, A.D., 1997. Quantitative profiling of tissue- and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse. *Biochemical Journal*, 325: 207-216.

- MONTEIRO, M., QUINTANEIRO, C., PASTORINHO, M., PEREIRA, M.L., MORGADO, F., GUILHERMINO, L., SOARES, A.M.V.M., 2006a. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere*, 62: 1333-1339.
- MONTEIRO, D.A., de ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L., 2006b. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C: 141-149.
- MULLIE, W.C., DIALLO, A.O., GADJI, B., N'DIAYE, M.D., 1999. Environmental hazards of mobile ground spraying with cyanophos and fenthion for *Quelea* control in Senegal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 1-10.
- NOBLE, A., 1993. Partition coefficients (*n*-octanol-water) for pesticides. *Journal of Chromatography*, 642: 3-14.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., TAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Chemistry*, 95: 351-358.
- ORLOWSKI, M., MEISTER, A., 1965. Isolation of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 338-347.
- ORUÇ, E.Ö., SEVGİLER, Y., ÜNER, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137C: 43-51.
- OTTO, D.M.E., SEN, C.K., HIDIROGLOU, N., MADERE, R., MOON, T.W., 1997a. Role of exogenous glutathione in teleost fish and its effects on antioxidant defense responses in rainbow trout exposed to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: 449-457.
- OTTO, D.M.E., SEN, C.K., CASLEY, W.L., MOON, T.W., 1997b. Regulation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl induced cytochrome P450 metabolism by thiols in tissues of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C: 299-309.
- PARVEZ, S., PANDEY, S., ALI, M., RAISUDDIN, S., 2006. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. *The Science of the Total Environment*, 368: 627-636.

- PARVEZ, S., RAISUDDIN, S., 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): Non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 392-397.
- PEHKONEN, S.O., ZHANG, Q., 2002. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32: 17-72.
- PEIXOTO, F., ALVES-FERNANDES, D., SANTOS, D., FONTAINHAS-FERNANDES, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 91-96.
- PENA, S., PENA, J.B., RIOS, C., SANCHO, E., FERNANDEZ, C., FERRANDO, M.D., 2000. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 51-56.
- PENA-LLOPIS, S., PENA, J.B., SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere*, 45: 671-681.
- PENA-LLOPIS, S., DOLORES FERRANDO, M., PENA, J.B., 2003a. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with *N*-acetylcysteine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 237-245.
- \_\_\_\_\_, 2003b. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65: 337-360.
- PETRIVALSKY, M., MACHALA, M., NEZVEDA, K., PIACKA, V., SVOBODA, Z., DRABEK, P., 1997. Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biochemical markers of chemical stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1417-1421.
- PİNER, P., 2005. Fenthion İçeren Ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da Beyin Dokusunda Glutasyon Metabolizması, Lipid Peroksidasyonu ve Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen



- Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 113 sayfa.
- PMRA, 2004. Re-evaluation of fenthion. Pest Management Regulatory Agency, Re-evaluation Decision Document, RRD2004-10.
- RAJASEKARAN, N.S., DEVARAJ, N.S., DEVARAJ, H., 2004. Vitamin E prevents buthionine sulfoximine-induced biochemical disorders in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 91-99.
- RANKIN, G.O., HONG, S.K., ANESTIS, D.K., HENDERSON, T.T., BALL, J.G., VALENTOVIC, M.A., 2002. Effect of three *N*-acetyl amino acids on *N*-(3,5-dichlorophenyl)succinimide (NDPS) and NDPS metabolite nephrotoxicity in Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 65A: 539-556.
- RAO, J.V., 2006a. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 78-84.
- \_\_\_\_\_, 2006b. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C: 492-498.
- \_\_\_\_\_, 2006c. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, 65: 1814-1820.
- RENDON-VON OSTEN, J., ORTIZ-ARANA, A., GUILHERMINO, L., SOARES, A.M.V.M., 2005. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, 58: 627-636.
- RAVINDRANATH, V., BOYD, M.R., 1991. Effect of modulators of glutathione synthesis on the hepatotoxicity of 2-methylfuran. *Biochemical Pharmacology*, 41: 1311-1318.
- ROSETY, M., ROSETY-RODRIGUEZ, M., ORDONEZ, F.J., ROSETY, I., 2005. Time course variations of antioxidant enzyme activities and histopathology of gilthead seabream gills exposed to malathion. *Histology and Histopathology*, 20: 1017-1020.

- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1997. Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 205-209.
- SANTOS, M.A., PACHECO, M., AHMAD, I., 2004. *Anguilla anguilla* L. antioxidants responses to *in situ* bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. *Environment International*, 30: 301-308.
- SEN, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 8: 660-672.
- SEN, C.K. PACKER, L., 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72 supplement: 653S-669S.
- SEVGİLER, Y., PİNER, P., DURMAZ, H., ÜNER, N., 2007. Effects of *N*-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 248-254.
- SHAIKH, Z.A., ZAMAN, K., TANG, W., VU, T., 1999. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by *N*-acetyl cysteine. *Toxicology Letters*, 104: 137-142.
- SHERRATT, P.J., HAYES, J.D., 2002. Glutathione *S*-transferases (C. Ionnides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 319-352.
- SPITELLER, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122: 617-657.
- SPRONG, R.C., WINKELHUYZEN-JANSSEN, A.M.L., AARSMAN, C.J.M., VAN OIRSCHOT, J.F.L.M., VAN DER BRUGGEN, T., VAN ASBECK, B.S., 1998. Low-dose *N*-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157: 1283-1293.
- STANIC, B., ANDRIC, N., ZORIC, S., GRUBOR-LAJŠIĆ, G., KOVACEVIĆ, R., 2006. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 395-402.

- STEPHENSEN, E., STURVE, J., FÖRLIN, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C: 435-442.
- SUN, Y., YU, H., ZHANG, J., YIN, Y., SHI, H., WANG, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*, 63: 1319-1327.
- SUNTRES, Z.E., 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180: 65-77.
- TANDON, S.K., SINGH, S., PRASAD, S., KHANDEKAR, K., DWIVEDI, V.K., CHATTERJEE, M., MATHUR, N., 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology Letters*, 145: 211-217.
- TSUDA, T., KOJIMA, M., HARADA, H., NAKAJIMA, A., AOKI, S., 1997. Relationships of bioconcentration factors of organophosphate pesticides among species of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116C: 213-218.
- \_\_\_\_\_, 1998. Pesticides and their oxidation products in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 151-158.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- VAN VLEET, T.R., SCHNELLMANN, 2003. Toxic nephropathy: Environmental chemicals. *Seminars in Nephrology*, 23: 500-508.
- VANSTEENHOUSE, J.L., FETTMAN, M.J., GOULD, D.H., 1991. The effect of glutathione depletion by buthionine sulphoximine on 1-cyano-3,4-epithiobutane toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 29: 153-157.

- VISARIUS, T.M., PUTT, D.A., SCHARE, J.M., PEGOUSKE, D.M., LASH, L.H., 1996. Pathways of glutathione metabolism and transport in isolated proximal tubular cells from rat kidney. *Biochemical Pharmacology*, 52: 259-272.
- WATANABE, T., SAGISAKA, H., ARAKAWA, S., SHIBAYA, Y., WATANABE, M., IGARASHI, I., TANAKA, K., TOTSUKA, S., TAKASAKI, W., MANABE, S., 2003. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *The Journal of Toxicological Sciences*, 28: 455-469.
- WOLF, J.C., WOLFE, M.J., 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33: 75-85.
- WU, G., FANG, Y.Z., YANG, S., LUPTON, J.R., TURNER, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134: 489-492.
- ZHANG, J., SHEN, H., WANG, X., WU, J., XUE, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55: 167-174.
- ZHANG, H., FORMAN, H.J., CHOI, J., 2005a.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 401: 468-483.
- ZHANG, J.F., LIU, H., SUN, Y.Y., WANG, X.R., WU, J.C., XUE, Y.Q., 2005b. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 185-190.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1977 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden "Biyolog" ünvanı ile mezun oldum. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Yüksek Lisans öğrenimimi 2002 yılında "Uzman Biyolog" ünvanıyla tamamladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.