

**ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİPERONİL BÜTOKSİD ve MENADİONE MODÜLATÖRLÜĞÜNDE
SPRAGUE-DAWLEY SIÇAN BÖBREĞİNDE İMİDACLOPRİDİN EŞEYE-
BAĞIMLI OKSİDATİF ve NÖROTOKSİK ETKİLERİ**

MUSTAFA YARDIMCI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN

2012

TEZ ONAYI

Mustafa YARDIMCI tarafından hazırlanan “Piperonil Bütoksid ve Menadione Modölatörlüğünde Sprague-Dawley Sıçan Böbreğinde Imidaclopridin Eşeye-Bağımlı Oksidatif ve Nörotoksik Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

Jüri Üyeleri:

Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

Adıyaman Üniversitesi-Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN

Adıyaman Üniversitesi-Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yrd.Doç.Dr. Ahmet GENÇ

Adıyaman Üniversitesi-Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç.Dr. Mustafa ÖZDEN

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PIPERONİL BÜTOKSİD ve MENADIONE MODÜLATÖRLÜĞÜNDE SPRAGUE-DAWLEY SIÇAN BÖBREĞİNDE İMIDACLOPRİDİN EŞEYE- BAĞIMLI OKSİDATİF ve NÖROTOKSİK ETKİLERİ

Mustafa YARDIMCI

Adıyaman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN: Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

Yıl: 2012, **Sayfa:** 78

ÜYE: Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN

ÜYE: Yrd.Doç.Dr. Ahmet GENÇ

Bu çalışmada hedef olmayan canlılara etkisi nedeniyle kullanımı tartışma konusu olan neonikotinoid insektisid imidaclopridin eşeye- ve süreye-bağımlı oksidatif stres potansiyeli ve nörotoksitesisi, sitokrom P450 inhibitörü piperonil bütoksid ve aldehid oksidaz inhibitörü menadione modülatörlüğünde Sprague-Dawley sıçanların böbrek dokusunda araştırılmıştır. Bu amaçla, intraperitoneal imidacloprid, piperonil bütoksid ve menadione uygulamasından 12 ve 24 saat sonra erkek ve dişi sıçanlarda böbrek total glutatyon, tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ve protein miktarları ile glutatyon peroksidaz, glutatyon *S*-transferaz, katalaz ve total kolinesteraz enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir.

Imidacloprid her iki eşeyde de 12. saatte herhangi bir etki yapmamaktadır. Erkek sıçanlarda 24. saatte imidacloprid, total glutatyon miktarının, lipid peroksidasyonunun ve total kolinesteraz aktivitesinin artmasına, protein miktarının azalmasına neden olmuştur. Aynı sürede dişilerde yalnızca glutatyon *S*-transferaz aktivitesinde artış belirlenmiştir. Piperonil bütoksid ve imidaclopridin birlikte uygulaması erkek sıçanlarda lipid peroksidasyonunun azalmasına ve total kolinesteraz aktivitesinin artmasına yol açmıştır. Dişilerde piperonil bütoksidin neden olduğu lipid peroksidasyonundaki azalma kontrol düzeylerine ulaşmıştır. Imidaclopridin indüklediği glutatyon *S*-transferaz aktivitesi piperonil bütoksid etkisi ile daha da artmıştır. Menadione redoks aktif özelliğiyle erkek sıçanlarda total glutatyon miktarı ile katalaz aktivitesinin artmasına, protein miktarının azalmasına neden olmuştur. Imidacloprid ve menadionenin birlikte etkisinde ayrı uygulamalarda artan total glutatyon ile azalan protein miktarlarında iyileşme, glutatyon peroksidaz aktivitesi ile lipid peroksidasyonunda azalma belirlenmiştir.

Imidaclopridin eşeye-bağımlı oksidatif ve nörotoksik etkilerinin imidaclopridin hücreye alınımını sağlayan aktif transport sistemleri ile erkeklerde daha aktif bir şekilde metabolize olmasını sağlayan sitokrom P450 ve aldehid oksidaz aktivitelerindeki eşeye-bağımlı farklılıklar nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Imidaclopridin neden olduğu oksidatif etkiler, olasılıkla nikotinic asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla hücre içine Ca^{2+} alınımına bağlıdır ve total kolinesteraz aktivite artışı imidaclopridin bu etkisine adaptif bir yanıttır. Erkeklerde piperonil bütoksid ön uygulaması ile azalan lipid peroksidasyonu artan katalaz ve total kolinesteraz aktivitesine bağlı olabilir. Dişilerde piperonil bütoksid İMI-indüklü glutatyon *S*-transferaz aktivitesini artırmaktadır ve sitokrom P450 dışındaki metabolik süreçlerde oluşan imidacloprid metabolitleri ile glutatyon konjugasyonunun araştırılması gerekmektedir. Erkek sıçanlarda menadione etkisinde aldehid oksidaz-aracılıklı imidaclopridin metabolit oluşumunun azalmasıyla imidacloprid ve menadione toksitesisi hafiflemektedir. Dişilerde menadione uygulaması, imidacloprid toksitesisini belirlemede yararlı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Imidacloprid, Eşey Farklılığı, Piperonil bütoksid, Menadione, Oksidatif Stres, Kolinesteraz

ABSTRACT

Master Thesis

GENDER-SPECIFIC OXIDATIVE and NEUROTOXIC EFFECTS of IMIDACLOPRID MODULATED by PIPERONYL BUTOXIDE and MEDIONE in the KIDNEY OF SPRAGUE-DAWLEY RATS

Mustafa YARDIMCI

Adiyaman University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

ADVISOR: Assist.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER

Year: 2012, **Page:** 78

Member: Assist.Prof.Dr. Mustafa COŞKUN

Member: Assist.Prof.Dr. Ahmet GENÇ

Because of its negative impact on non-target organisms, neonicotinoid insecticide imidacloprid application is debated recently. Gender- and duration-dependent oxidative stress and neurotoxicity potential of imidacloprid which modulated by piperonyl butoxide, a cytochrome P450 inhibitor and menadione, an aldehyde oxidase inhibitor were investigated in the kidney of Sprague-Dawley rats in the present study. For this purpose, imidacloprid, piperonyl butoxide and menadione were injected intraperitoneally. Renal total glutathione, thiobarbituric acid reactive substances and protein contents and glutathione peroxidase, glutathione *S*-transferase, catalase and total cholinesterase enzyme activities were measured spectrophotometrically 12- and 24-h after administration.

Imidacloprid in both sexes did not make any impact at 12-h. Total glutathione content, lipid peroxidation and total cholinesterase activity increased, while protein content was decreased in male rats at 24-h. Glutathione *S*-transferase activity increased in females at the same duration. Imidacloprid after piperonyl butoxide injection caused a decrease in lipid peroxidation and an increase in total cholinesterase activity in males. Decreased lipid peroxidation by piperonyl butoxide reached to control levels after imidacloprid injection in females. Piperonyl butoxide led to a further increase in imidacloprid induced glutathione *S*-transferase activity. Menadione as a redox-active compound caused an increase in catalase activity and total glutathione content and a decrease in protein content in male rats. Both of menadione and imidacloprid led to decrease in protein content and to increase in total glutathione concentration while an improvement was observed in their combined effects in males. Moreover, glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation levels decreased.

It was thought that gender-dependent oxidative and neurotoxic potential of imidacloprid originated from gender-specific active transport systems that are allowed to imidacloprid entry to the cell and cytochrome P450 and aldehyde oxidase enzyme systems which are more actively metabolized imidacloprid in males than females. Imidacloprid-related oxidative effects may be dependent to Ca²⁺ entry to the cell from the nicotinic acetylcholine receptor activation and increase in total cholinesterase activity is an adaptive response to the receptor activation caused by imidacloprid. Decreased lipid peroxidation levels by piperonyl butoxide pre-treatment could be dependent to elevated catalase and total cholinesterase activities in males. Piperonyl butoxide increased imidacloprid-induced glutathione *S*-transferase activity in females, and then glutathione conjugation of imidacloprid metabolites generated from other metabolic processes than cytochrome P450 should be investigated. Attenuation was observed in imidacloprid and menadione toxicities which could be related with decreased aldehyde oxidase catalysed imidacloprid metabolite formation. Menadione co-treatment is beneficial to determine the imidacloprid toxicity in females.

Keywords: Imidacloprid, Gender Difference, Piperonyl butoxide, Menadione, Oxidative Stress, Cholinesterase

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
TEŞEKKÜR	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1 Neonikotinoid insektisidler	1
1.1.1 Imidacloprid	2
1.2 Piperonil bütoksid	5
1.3 Menadione	5
1.4 Oksidatif Stres	6
1.5 Antioksidant Savunma	7
1.6 Kolinesterazlar	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Kimyasal Maddeler	18
3.1.2 Cihazlar ve Gereçler	19
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Biyokimyasal Analizler	21
3.2.1.1 Total GSH Yöntemi	21
3.2.1.2 Glutasyon Peroksidaz Yöntemi	23
3.2.1.3 Glutasyon S-transferaz Yöntemi	24
3.2.1.4 Katalaz Yöntemi	25
3.2.1.5 Total Kolinesteraz Yöntemi	26
3.2.1.6 TBARS Yöntemi	28
3.2.1.7 Protein Yöntemi	29
3.2.2 İstatistiksel Analiz	30

4.	BULGULAR	31
4.1	Çözücü Dimetilsülfoksidin İncelenen Parametrelere Etkisi	31
4.2	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin tGSH Miktarına Etkisi	33
4.3	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin GPx Enzim Aktivitesine Etkisi	35
4.4	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin GST Enzim Aktivitesine Etkisi	37
4.5	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin CAT Enzim Aktivitesine Etkisi	39
4.6	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin Lipid Peroksidasyonuna Etkisi	41
4.7	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin tChE Enzim Aktivitesine Etkisi	43
4.8	Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin Protein Miktarına Etkisi	45
5.	TARTIŞMA	47
5.1	Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun etkisinin değerlendirilmesi	47
5.2	Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	48
5.3	Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik potansiyeline PBO'nun etkileri	54
5.4	Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik potansiyeline MEN'in etkileri	56
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	59
	KAYNAKLAR	60
	ÖZGEÇMİŞ	78

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince değerli yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER'e, Sayın Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na, Sayın Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN'a ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Sahire KARAYTUĞ'a, laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Imidaclopridin fiziksel özellikleri	3
Çizelge 3.1	Total glutasyon yöntemi	22
Çizelge 3.2	Glutasyon peroksidaz yöntemi	23
Çizelge 3.3	Glutasyon S-tranferaz yöntemi	25
Çizelge 3.4	Katalaz yöntemi	26
Çizelge 3.5	Total kolinesteraz yöntemi	27
Çizelge 4.1	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda çözücü DMSO'nun GPx, CAT (U/mg protein), GST ve tChE (μ M/dak/mg protein) enzim aktivitelere, tGSH (μ M/mg protein), TBARS (nmol/mg protein) ve protein miktarlarına (mg/mL homojenat) etkileri	32
Çizelge 4.2	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde tGSH miktarına (μ M/mg protein) etkileri	34
Çizelge 4.3	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde GPx enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri	36
Çizelge 4.4	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde GST enzim aktivitesine (μ M/dakika/mg protein) etkileri	38
Çizelge 4.5	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde CAT enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri	40
Çizelge 4.6	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde TBARS miktarına (nmol/mg protein) etkileri	42
Çizelge 4.7	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modülatörlüğünde tChE aktivitesine (μ M/dak/mg protein) etkileri	44

Çizelge 4.8	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksid ve menadione modulatörlüğünde protein miktarına (mg/mL homojenat) etkileri	46
-------------	---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Nenonikotinoid insektisidlerin kimyasal formülasyonu	1
Şekil 1.2	Imidaclopridin kimyasal formülasyonu	3
Şekil 1.3	IMI'nin, DN-IMI'ye metabolik dönüşümü	5
Şekil 1.4	Glutasyonun işlevi	9
Şekil 3.1	Total GSH standart grafiği	22
Şekil 3.2	TBARS standart grafiği	28
Şekil 3.3	Protein standart grafiği	30
Şekil 4.1	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tGSH miktarına ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) etkileri	33
Şekil 4.2	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GPx enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri	35
Şekil 4.3	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GST enzim aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dakika}/\text{mg}$ protein) etkileri	37
Şekil 4.4	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin CAT enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri	39
Şekil 4.5	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin TBARS miktarına (nmol/mg protein) etkileri	41
Şekil 4.6	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tChE enzim aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dakika}/\text{mg}$ protein) etkileri	43
Şekil 4.7	Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin protein miktarına (mg/mL homojenat) etkileri	45

KISALTMALAR DİZİNİ

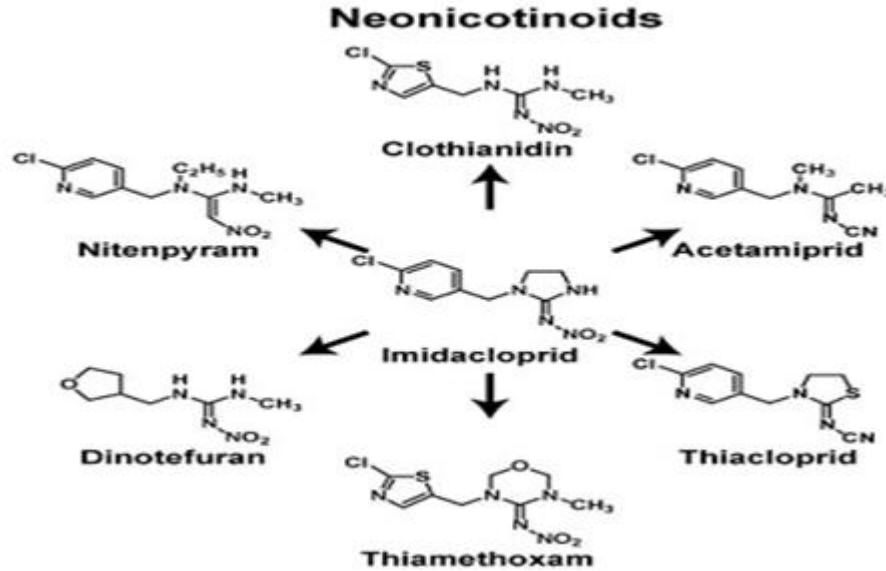
β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Redükte Formu	NADPH
γ -Glutamilsistein sentetaz	γ -GCS
γ -Glutamil transpeptidaz	γ -GT
1-Kloro-2,4-Dinitro-Benzen	CDNB
2-Tiyobarbitürik Asit	TBA
5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)	DTNB
5-Sülfosalisilik Asit	SSA
Aldehid oksidaz	AOX
Asetilkolin	ACh
Asetilkolinesteraz	AChE
Asetilkolintiyoiyodür	AChI
Butirilkolinesteraz	BuChE
Desnitro Imidacloprid	DN-IMI
Dimetil Sülfoksid	DMSO
Ekstraselüler Sinyal ile Düzenlenen Kinaz	ERK
Etilendiamin Tetraasetik Asit	EDTA
Redükte Glutasyon	GSH
Glutasyon peroksidaz	GPx
Glutasyon redüktaz	GR
Glutasyon S-transferaz	GST
Imidacloprid	IMI
İntraperitoneal	<i>i.p.</i>
Karmaşık İşlevli Oksidaz	FMO
Katalaz	CAT
Kolinesteraz	ChE
Menadione	MEN
Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz	MAPK
Nikotinik Asetilkolin Reseptörü	nAChR
Okside Glutasyon	GSSG
Piperonil Bütoksid	PBO

Reaktif Oksijen Türleri	ROS
Serum Fizyolojik Su	SF
Sitokrom P450	CYP450
Süperoksit dismutaz	SOD
Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri	TBARS
Total Glutasyon	tGSH
Total Kolinesteraz	tChE

1. GİRİŞ

1.1 Neonikotinoid İnektisidler

Neonikotinoidler, insektisidlerin son 30 yılda geliştirilen en yeni sınıfı olup homopterler, hemipterler ve siphonapterler gibi tarım zararlılarına ve evcil hayvanların eksternal parazitlerine karşı mücadelede önem kazanarak (Tomizawa ve Casida 2005) organofosforlu, organoklorlu ve piretroid bileşiklerin yerini almaya başlamışlardır (Kocaman ve Topaktaş 2007). Neonikotinoid insektisidler 3 altısınfa ayrılır: ilk nesil neonikotinoidler kloronikotiniller olup; imidacloprid (IMI), nitenpyram, acetamiprid ve thiaclopridi, ikinci nesil neonikotinoidler tianikotinil olup thiamethoxam ve clothianidin, üçüncü nesil neonikotinoidler furanonikotiniller olup dinotefuranı kapsar (Vo vd. 2010). Genellikle memelilerde, kuşlarda ve balıklarda böceklere oranla daha ılımlı akut ve kronik toksikolojik profile sahiptirler (Tomizawa ve Casida 2005). Organofosforlu ve piretroid insektisidlerden farklı olarak tarım zararlılarında bu bileşiklere karşı daha az dirençlilik gelişimi meydana gelmektedir (Puinean vd 2010). Bu bileşiklerin 2005 yılında dünya yıllık insektisid pazarının %11-15'ini oluşturduğu bildirilmektedir (Tomizawa ve Casida 2005).



Şekil 1.1 Neonikotinoid insektisidlerin kimyasal formülasyonu (Matsuda vd. 2009)

Neonikotinoidler, nikotinic asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) agonistidir (Tomizawa ve Casida 2009). nAChRleri pentamerik ligand kapılı iyon kanallarının cys-loop süper ailesinin bir üyesidirler (Liu vd. 2010). Omurgalı nAChRleri 10α , 4β , γ , δ , ϵ alt ünitelerinin çeşitli kombinasyonlarda bir araya gelmesiyle oluşan pentamerik transmembran bir kompleksdir (Tomizawa ve Casida 1999; Costa vd. 2009; Liu vd. 2010) ve hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda temel eksitator nörotransmitterlerdir (Costa vd. 2009). Neonikotinoid insektisidler ve analoglarının etkileri nAChR alt tiplerine göre değişebilir (Tomizawa ve Casida 1999, Vo vd. 2010).

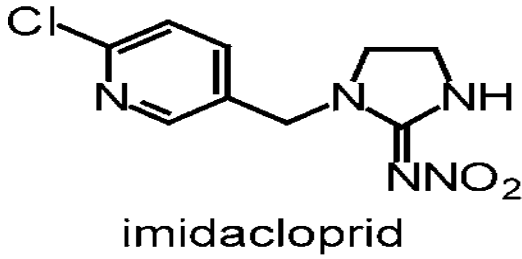
Memeli nAChRlerinin birçoğu büyük olasılıkla loop D'de temel katyonik rezidülerinin olmamasından dolayı neonikotinoidlere az duyarlılık gösterirler ve bu bileşiklerin güvenilirliği memeli nAChRlerine oranla böcekler için yüksek seçiciliğine dayandırılmaktadır (Honda vd. 2006; Tomizawa vd. 2007; Liu vd. 2010). Bazı neonikotinoidlerin ve metabolitlerinin memelilerde nAChR ifadesini artırması ve bunun sonucunda memelilerde toksik etki göstermesinden dolayı kullanımları tartışmalıdır (Broznic vd. 2008). Neonikotinoidlerin biyotransformasyonları çoğunlukla detoksifikasyon mekanizmalarını içerirken, bazı durumlarda biyoaktivasyon mekanizmalarını kapsar (Tomizawa ve Casida 2005). Metabolizmaları sonucunda nAChR seçiciliği, bileşiğe bağlı olarak artar veya azalır. Örneğin IMI'nin desnitro metabolitleri (DN-IMI) böcek nAChRleri için detoksifikasyon ürünü iken memeli nAChRleri için aktif türevlerdir (Honda vd. 2006).

1.1.1 Imidacloprid

Imidacloprid (IUPAC adı: *N*-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide; CAS No: 138261-41-3) ilk defa 1994 yılında ruhsatlandırılmış sistemik neonikotinoid insektisiddir (EPA 2008). IMI yüksek etkili neonikotinoid insektisidlerin bilinen en iyi örneğidir (Tomizawa ve Casida 1999). Sebzelerde, meyvelerde, şeker pancarında, pamukta ve pirinçte homopter ve hemipter zararlıların mücadelesinde (Matsuda vd. 2001), kedi ve köpeklerde siphonapterlerle mücadelede (Tomizawa ve Casida 2005) kullanılmaktadır. Dünya genelinde en çok satan pestisidlerden biri olup 120'den fazla ülkede 140'tan fazla tarımsal üründe kullanılmaktadır (David vd. 2007; Drobne vd. 2008). T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık

Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün yayınladığı istatistiklere göre 2010 yılında saf halde 132.222 L, mineral yağ ile birlikte 164.325 L IMI satışı gerçekleştirilmiştir

(http://www.gkgm.gov.tr/birim/bitki_koruma_ur_alet/faaliyet/2011_yili_istatistiki_bilgiler_formu.rar). Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği'nin girişimleri ile Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından ayçiçeğinde tavsiye edilmediği halde kullanılan IMI'nin 17.12.2010 tarihli karar ile bu tarım ürünüde kullanılmayacağı bildirilmektedir (<http://www.tab.org.tr/korgem-2790.pdf>).



Şekil 1.2 Imidaclopridin kimyasal formülasyonu

ÇİZELGE 1.1. Imidaclopridin Fiziksel Özellikleri

ÖZELLİK		DEĞER
Moleküler Ağırlık		255.7
Suda Çözünürlük (200°C)		0.51 g/L
Çözünürlük (20°C)	diklorometan	50.0-100.0 g/L
	izopropanol	1.0-2.0 g/L
	toluen	0.5-1.0 g/L
	<i>n</i> -hekzan	>0.1 g/L
	yağ	0.061g/100g
Kaynama Noktası		136.4-143.8°C
Topraktaki Yarı Ömrü		49-190 gün

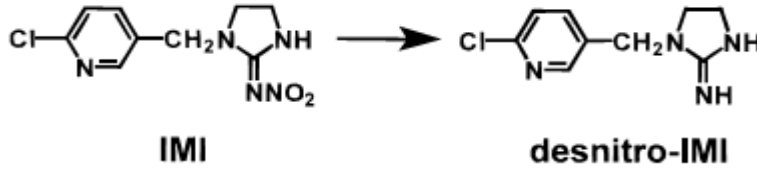
Imidacloprid genel olarak memelilerde düşük akut ve kronik toksisiteye sahiptir (Nagata vd. 1998). IMI'nin memelilerdeki toksikolojik önemi metabolizmasından ileri gelmektedir (Schulz-Jander ve Casida 2002). nAChR blokajı yoluyla nörotoksik etki gösteren IMI'nin meyve sineği nAChRlerine sıçandakine göre daha fazla afinite gösterdiği belirlenmiştir (Liu vd. 2010). IMI molekülü 6-kloro-3-piridinil grubu ve 2-

nitroimino-imidazolidin grubunun bir metilen zinciriyle birleşmesiyle oluşur (Matsuda vd. 2001). 6-kloro-3-piridinil parçası, alt tip özgünlüğüne sahip çok güçlü ve selektif nikotinik agonist bileşiklerin bazılarında bulunur (Tomizawa ve Casida 1999). Toksikite, bağlanma ve reseptör aktivasyonu bu üç işlevsel gruptan ve aynı zamanda grupların hidrofobisitesinden etkilenir. Nitroimin grubu ve nitrojeni ile belirli aminoasid rezidüleri arasındaki elektrostatik etkileşimler, IMI'nin seçici toksisitesinin belirlenmesinde anahtar bir role sahiptir. İmidazolidin halkasının 2-pozisyonunda bir =N-NO₂ bileşenin varlığı aynı pozisyonda bir =CH-NO₂ grubu içeren bileşiklere göre bir farklılık yaratır. Fakat =N-NO₂'nin varlığı reseptör afinitesini anlamlı derecede azaltır. 2-pozisyonundaki nitrojen atomunun varlığında hidrofobisite arttığı için azalma telafi edilir (Matsuda vd. 2001).

Memelilerde IMI'nin biyotransformasyonu bazı biyoaktivasyon tepkimelerini içerir. Fakat bileşik, çoğunlukla detoksifikasyon mekanizmaları tarafından inaktivasyona uğrar. Metabolizmasındaki iki önemli enzim sitokrom P450-3A4 (CYP3A4, EC 1.14.14.1) ve aldehit oksidazdır (AOX; EC 1.2.3.1). CYP3A4 birkaç moleküler bölgede oksidasyondan sorumluyken, AOX nAChRlerde agonist etkisinin artması ya da azalmasıyla sonuçlanan nitro bileşenin tepkimelerinden sorumludur (Costa vd. 2009). IMI başta CYP3A4 olmak üzere CYP450 aracılıklı tepkimelerle büyük ölçüde 5-hidroksi IMI'ye (Schulz-Jander vd. 2002), bu bileşik de daha sonra 6-kloronikotinik aside yıkılmaktadır (Broznic vd. 2008). IMI'nin CYP3A4 metabolizması başlıca imidazolidin kısmının oksidasyonunu ve sonra nitroguanidin bileşenin redüksiyonunu içerir (Honda vd. 2006).

Bu tepkimelerde IMI'nin nitroguanidin kısmını indirgeyerek (Honda vd. 2006) rol oynayan enzim neonikotinoid nitroredüktaz da denilen AOX enzimidir (Dick vd. 2005). Metabolik kararsızlığı memelilerde DN-IMI gibi biyoaktif toksikantların oluşumuna yol açar (WHO 2001). IMI ve DN-IMI, bağlanma bölgelerine afinitelerinde büyük farklılık gösterirler. IMI, böcek nAChRlerinde kuvvetli etkiye sahipken, memelilerde etki göstermez; oysa DN-IMI memelilere böceklerden çok daha fazla aktiftir (Tomizawa ve Casida 1999). DN-IMI'nin erkek albino Swiss-Webster farelerine 24 saatlik LD₅₀ değeri 8 mg/kg iken IMI'nin 45 mg/kg'dır (Tomizawa vd. 2001). Desnitro metabolitleri düşük derişimlerde mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) ve ekstraselüler sinyal ile

düzenlenen kinaz (ERK) haberleşme sürecini ve bu yolla sinir hücresinin yaşam ve ölüm mekanizmalarını etkilemektedir (Tomizawa ve Casida 2002).



Şekil 1.3. IMI'nin, DN-IMI'ye metabolik dönüşümü (D'Amour ve Casida 1999)

Ksenobiyotiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde piperonil bütoksit (PBO) ve menadione (MEN) gibi metabolizma düzenleyicilerinin kullanımı, araştırılan bileşiğin etki mekanizmasını anlamak için uygulanan bir yöntemdir (Nebbia 2001; Ghanayem ve Hoffler 2007).

1.2 Piperonil bütoksit

Piperonil bütoksit (IUPAC adı: 5-[2-(2-butoxyethoxy) ethoxymethyl] -6-propyl-1,3-benzodioxole; CAS No: 51-03-6) metilendioksifenil grubu bir bileşik olup CYP450 enzimlerini ve esterazları inhibe ederek birlikte kullanıldığı insektisidin etkisini artırır (Sivori vd. 1997; Bingham vd. 2011). Özellikle piretroid bileşiklerin sinerjisti olarak yoğun kullanılmasına karşın 31.08.2011'den bu yana ülkemizde kullanımı yasaklanmıştır (http://www.gkgm.gov.tr/birim/bitki_koruma_ur_alet/faaliyet/yasaklanan_bku_aktif_maddeleri_listesi.zip).

1.3 Menadione

Menadione [Vitamin K3, IUPAC adı: 2-Methylnaphthalene-1,4-dione, CAS No: 58-27-5] AOX enziminin spesifik inhibitörüdür ve redoks aktif bir bileşik olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olabilmektedir (Abe ve Saito 1996; Chung vd. 1997; Cui vd. 2005).

1.4 Oksidatif Stres

Birçok ksenobiyotiğin toksisitesi yalnızca kendi toksisite potansiyeli ile değil, aynı zamanda ROS üretme yetenekleri ile de ilişkilidir (Abdollahi vd. 2004). Oksidatif stres, ROS oluşumu ile antioksidant savunma kapasitesi arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan, ROS hücrel membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi makromoleküller üzerinde hasar yapma etkisini kapsamaktadır (Dringen 2000; Broznic vd. 2008; Staicu vd. 2011). Aerobik canlılar için olmazsa olmaz bir element olan oksijen, bazı durumlarda bu canlılara zarar verebilmektedir. Oksijenin olası zararlı etkilerinin birçoğu diğer maddeleri okside etme kapasitesi yüksek olan ROS oluşumu ve aktivasyonundan dolayıdır (Abdollahi vd. 2004). Biyolojik sistemlerde birçok çeşidi bulunan ROS, oluşum yerlerine, fizyolojik işlevlerine, reaktifliklerine ve biyolojik yarı ömürlerine göre ayrılabilir (Schulz vd. 2000). ROS; süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) gibi inorganik moleküller veya alkoksil ve peroksil radikalleri gibi organik moleküller şeklinde de ayırmak mümkündür (Dringen 2000; Valavanidis vd. 2006; Robbins ve Zhao *baskıda*).

Reaktif oksijen türleri, enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerin sonucu olarak hücrede sürekli meydana gelir (Abdollahi vd. 2004). Hücrede ROS'un yaklaşık %5'i elektron transfer zincirinde O_2 'nin indirgenmesi sırasında oluşur, bu ROS'un birinci hücrel kaynağıdır. Bazı oksidasyon enzimleri ROS oluşumuna katkıda bulunur; bu ikinci hücrel kaynaktır. Diamin oksidaz, triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz ve sitokrom P450 $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna katkıda bulunurken, guanil siklaz ve glukoz oksidaz H_2O_2 oluşumuna katkıda bulunur. Bazı ksenobiyotikler, mitokondriyal elektron transport zincirinin ya da antioksidant enzimlerin inhibisyonu yoluyla hücredeki ROS oluşumunu artırır; bu da hücrede üçüncü ROS kaynağıdır (Kelly vd. 1998).

Elektron transfer zincirinde, oksijen dört elektronla indirgendikten sonra sitokrom *c* oksidaza aktarılır. Oksijenin bir elektronla indirgenmesi ve sonra elektronların bir kısmının akıştan kaçması sonucu bir ROS öncülü olan $O_2^{\bullet-}$ anyonu oluşur. $O_2^{\bullet-}$ anyonu hızlıca H_2O_2 'e dönüştürülür ve H_2O_2 , mitokondri membranından dışarıya kolayca difüze olur (Adam-Vizi ve Starkov 2011). H_2O_2 metal iyonlarının katalizlediği tepkimelerle $\bullet OH$ 'ne dönüşür (Aoyama vd. 2008).

Reaktif oksijen türleri bir sinyal molekülü olarak rol oynamasına karşın bazı apoptotik mekanizmaları tetikleyen DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu gibi hücrel hasar süreçlerinde de yer alır (Robbins ve Zhao *baskıda*). ROS Parkinson, Alzheimer, katarakt, cilt yaşlanması, astım vb. birçok hastalığa neden olabilmektedir (Abdollahi vd. 2004).

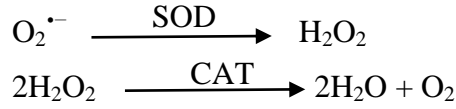
Oksidatif stres koşullarında, poliansatüre yağ asitlerince zengin olan hücre ve organel membranlarında bulunan lipidlerin oksidatif modifikasyonları ile hücrenin bir ve iki valanslı elektronlara geçirgenliği artmakta, membran enzimleri inhibe olmakta ve hatta lizozim gibi yapıların içeriği boşaltılarak hücrenin sindirimi başlamaktadır. Bu nedenle biyolojik membranlardaki peroksidasyonun kontrol edilememesi membran yapısı ve işlevini bozarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Djordjevic 2004). Oksidatif hasarın önemli bir indikatörü olması bakımından lipid peroksidasyonu derecesinin ölçülmesinde tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin (TBARS) belirlenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Spiteller 2001).

1.5 Antioksidant Savunma

Aerobik canlılar ROS hasarına karşı koymak için birkaç mekanizmaya sahiptir. Antioksidant terimi herhangi bir maddenin hedef molekül üzerindeki oksidatif hasarı engellemesi ya da geciktirmesi şeklinde tanımlanır. Antioksidant aktivite gösteren birçok madde vardır; fakat iki temel sistemde kategorize edilebilir. ROS hasarından korunmada temel sistem oksidasyonu engelleyen enzimatik sistemdir, diğeri enzimatik olmayan antioksidant bileşiklerdir. Enzimatik sistem bütün radikalleri saf dışı bırakmaya çalışır; fakat oksidatif stres savunma mekanizmasının kapasitesinden yüksek ise savunma sisteminin ikinci hattı enzimatik olmayan antioksidant bileşikler devreye girebilir (Abdollahi vd. 2004). Antioksidant enzimler; katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7), glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) ve glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) ile enzimatik olmayan antioksidantlar, redükte glutatyon (GSH), vitamin E, vitamin C, tiyoredoksin vd. kapsar (El-Gendy vd. 2010).

Süperoksit dismutaz enzimi açığa çıkan $O_2^{\cdot-}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürürken, aerobik organizmaların peroksisomlarında bulunan CAT enzimi, açığa çıkan H_2O_2 'yi su ve

moleküler oksijene dönüştürmektedir (Pandey vd. 2003; Park ve Oh 2011). CAT, GPx enziminin aksine H₂O₂'nin detoksifikasyonu için hücrel indirgeyicilere gereksinim duymaz ve bu iki enzim yarışma halindedir (Cheung vd. 2004; Mhamdi vd. 2010).



Glutasyon peroksidaz, H₂O₂ varlığında substrat olarak kullandığı GSH'ın elektronlarını H₂O₂'ye aktarır ve GSH'ın GSSG'ye oksidasyonunu katalizler (Sun 1990; Rodriguez vd. 2004). Selenyum bağımlı bir enzim olan GPx lipid peroksidleri ve H₂O₂'nin indirgenmesinde önemli bir role sahiptir (Espinoza vd. 2008).



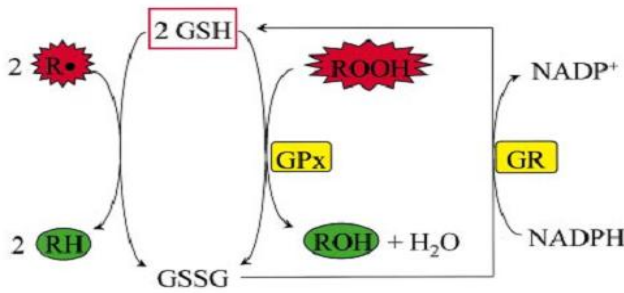
Glutasyon S-transferaz, başlıca ksenobiyotiklerin ve karsinojenlerin detoksifikasyonunda yer alır ve merkaptürik asit oluşumunun ilk basamağını katalizler. Organik hidroperoksitlerin birçok formuna ve H₂O₂'ye karşı aktif değildir (Sun 1990). GST varlığında, elektrofilik metabolitler ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda GSH geri dönüşümsüz olarak tüketilir (Reid ve Jahoor 2001).



Tiyol grupları içeren antioksidant savunma bileşenleri ROS-aracılıklı oksidatif hasardan korunmada ikincil savunma hattını oluşturmaktadır (Sinha vd. 2009). GSH (γ -glutamilsisteinilglisin), antioksidant savunmada yer alan protein olmayan bir tiyol bileşimidir (Dringen 2000). γ -Glutamilsistein sentetaz (γ -GCS; EC 6.3.2.2), glutasyon sentetaz (GS; EC 6.3.2.3) gibi sentez enzimleri, GPx, GR ve GST gibi işlevinde yer alan enzimler ile γ -glutamil transpeptidaz (γ -GT; EC 2.3.2.2) gibi intra ve interselüler transportunda yer alan enzimlerin hepsi birden glutasyon redoks sistemini oluşturmaktadır (Kulinsky ve Kolesnichenko 2009). Son çalışmalar GSH'ın; sinyal iletimi, hücre çoğalması ve gen ekspresyonu ile apoptozun düzenlenmesinde rol aldığını öne sürmektedir. GSH, ayrıca, DNA metabolizması, protein sentezi, çeşitli enzimlerin

aktivasyonu ve immün sistemin desteklenmesi gibi bir takım hücresel süreçlerde de rol oynar (Bharath vd. 2002).

Glutasyon hücrede 2 ana formda bulunur; GSH ve okside glutasyon (GSSG). Tiyol grubu (-SH) GSH'ın en reaktif grubudur. Bir ya da iki elektron oksidasyon tepkimelerinde yer alır (Kulinsky ve Kolesnichenko 2009). GSH'ın *de novo* sentezini γ -GCS sağlamaktadır (Cnubben vd. 2001). GSH hücrede serbest ya da proteinlere bağlı şekilde bulunabilir. Serbest glutasyon genel olarak redükte haldedir ve oksidatif stres süresince GPx katalizli enzimatik ya da non-enzimatik GSSG'ye dönüşür (Pastore vd. 2003; Wu vd. 2004). GR aracılığıyla NADPH varlığında GSH'a indirgenir (Cnubben vd. 2001; Pastore vd. 2003). Redükte ve okside glutasyon oranı (GSH/GSSG) oksidatif stresin belirlenmesinde önemli bir parametredir (Pastore vd. 2003). Yoğun oksidatif stres koşullarında GSH/GSSG oranını korumak amacıyla GSSG, oluştuğu zaman hücre membranından dışarı salınır ve hücrede net GSH kaybı meydana gelir (Camera ve Picardo 2002; Wu vd. 2004). Bu nedenle kanda ya da ekstraselüler sıvıda ölçülen GSSG miktarı dokunun ya da hücrenin oksidatif stres durumunun anlaşılmasında önemlidir (Camera ve Picardo 2002). Hücresel total GSH (tGSH) miktarının hücresel oksidatif stres durumunu belirten duyarlı bir parametre olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Yang ve Dettbarn 1996; Yang vd. 1996).



Şekil 1.4 Glutasyonun işlevi (Dringen vd. 2000)

1.6 Kolinesterazlar

Kolinesteraz (ChE) aktivitesi toksisite çalışmalarında sıklıkla ölçülen bir parametredir. Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) sinaptik alanda asetilkolinin (ACh) koline yıkımından sorumludur ve inhibisyon ACh'nin birikimine neden olmaktadır.

Buna karşın, butirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) hem ACh'nin, hem de butirilkolinin (BuCh) yıkımını katalize eder. Neonikotinoid insektisidler organofosforlu bileşiklerde olduğu gibi doğrudan ChE inhibisyonuna neden olmazlar (Dondero vd. 2010). Organofosforlu bileşikler gibi ChE inhibitörlerinin indüklediği kolinerjik hiperaktiviteye ve lipid peroksidasyonuna neden olan ROS birikimini başlatır (Yang vd. 1996; Yang ve Dettbarn 1996).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Oksidatif stres ksenobiyotiklerin toksik etki mekanizmalarında yer alan önemli bir olgudur (Ojha ve Srivastava 2012). Pestisidleri de kapsayan çevresel kirleticilerin oksidatif potansiyellerinin neden olduğu hücresel hasarın altında yatan mekanizmayı belirlemek üzere yapılan çalışmalarda, memeli türleri model organizma olarak kullanılmaktadır (Valavanidis vd. 2006). Sıçanlarda böbrek dokusu, günde 5 L kanı filtre ederek toksik bileşikleri yoğunlaştırmaktadır ve toksik ksenobiyotiklerin etkisine oldukça duyarlıdır (Swain vd. 2011).

Farelere intraperitoneal (*i.p.*) verilen organofosfatlı pestisid dimethoatenin farklı derişimlerinin subkronik etkisinde böbrek dokularında AChE aktivitesinin inhibe olduğu, CAT aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun doza-bağımlı olarak arttığı bildirilmiştir. Dimethoatenin LD₅₀ değerinin %2'si kadar düşük dozda subkronik etkide oksidatif strese neden olabildiği vurgulanmaktadır (Ayed-Boussema vd. 2011).

Sıçanlara oral yolla uygulanan organofosfatlı pestisidler chloropyrifos, parathion ve malathionun akut etkisinde böbrekte GSH miktarı ve GSH/GSSG oranı azalırken, GSSG miktarı ve GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu pestisidlerin artan GR aktivitesine karşın azalan GSH miktarı nedeniyle kuvvetli oksidatif etki yaptıkları ve oksidatif stresin organofosfatlı pestisidlerin genel toksisite mekanizmalarından biri olabileceği bildirilmiştir (Ojha ve Srivastava 2012).

Oral yolla uygulanan piretroid pestisid lambda cyhalothrinin subkronik etkisinde sıçanlarda böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu artarken, CAT, SOD, GPx ve GST aktiviteleri azalmıştır. Bu çalışmada artan lipid peroksidasyonu nedeniyle lambda cyhalothrin-indüklü nefrotoksisitede oksidatif stresin yer aldığı, bununla birlikte azalan GSH miktarlarının böbreği ROS hasarına duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Fetoui vd. 2010).

İnsektisid dimethoate, fungusid zineb ve herbisid glyphosatenin oldukça düşük dozlarının subkronik etkisinde sıçan böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunun ve CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. ROS-indüklü oksidatif lipid hasarının her üç pestisidin de asıl toksik etkilerinden biri olduğu bildirilmektedir (Astiz vd. 2009).

İntragastrikal uygulanan karbamatlı pestisid methiocarbın 1/50 LD₅₀ değerinin subkronik etkisinde sıçan karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonunda artış

ile birlikte GSH miktarında, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde azalma belirlenirken, GR aktivitesinde değişim olmamıştır. Methiocarbın karaciğere oranla böbrekte daha fazla dejeneratif oksidatif hasara neden olduğu ve bunun karaciğere göre böbreğin daha düşük antioksidant kapasiteye sahip olması nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Ozden vd. 2009).

Fungusid metiram etkisinde Swiss albino fare böbreğinde meydana gelen histopatolojik değişimlerin antioksidant savunmanın azalıp, lipid peroksidasyonunun artmasına neden olan aktif metabolitler nedeniyle olabileceği bildirilmektedir (Sakr vd. *baskıda*).

Acetamidridin ticari formülasyonu Mospilan'ın çevresel deşişimlerinin etkisinde tatlı su midyesi *Anadonta cygnea*'da sindirim kanalı ve solungaç dokusunda SOD aktivitesinin ve GSH miktarının azaldığı, lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir. Acetamidrid AChE aktivitesinde bir değişime neden olmamaktadır (Mishchuk ve Stolyar 2008).

Oral acetamidrid uygulanan farelerde testis dokusunda lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeyi artarken, CAT, GPx ve SOD enzim aktiviteleri azalmıştır. Acetamidridin testislerde olasılıkla metabolitleri ile oksidatif stres yoluyla üreme işlevlerine hasar verebileceği vurgulanmaktadır (Zhang vd. 2011).

Son yıllarda insana ve hedef olmayan organizmalara az etkili olan, hedef organizmalara etkili insektisid geliştirme çabaları artmıştır (Tomizawa ve Casida 2009). Neonikotinoid bileşiklerin nörotoksik ve oksidatif etkileri çeşitli çalışmalarda incelenmiş olmakla birlikte modölatör eşliğindeki etkileri değerlendirilmemiştir.

Subkütan uygulanan neonikotinoid insektisid thiamethoxamın subkronik etkisinde sıçanların beyin dokusunda AChE aktivitesi azalmıştır. Bu etkinin ana bileşikten mi yoksa metabolitlerinden mi kaynaklandığını belirleyebilmek için ileri çalışmalara gereksinim duyulduğu belirtilmektedir (Rodrigues vd. 2010).

Neonikotinoid thiaclopridin akut ve subakut etkisinde sıçan dalak, kemik iliği ve timus dokularında lipid peroksidasyonu artarken GSH miktarı, CAT ve GPx aktiviteleri azalmıştır. SOD aktivitesinin dalak ve kemik iliğinde artış gösterdiği; GST aktivitesinin ise yalnız timus dokusunda azaldığı belirlenmiştir. Böbrek hasarı ile ilişkili serum üre ve kreatinin düzeylerinin de arttığı ve antioksidant savunmanın bu pestisidin

metabolizması sırasında üretilen oksidatif moleküller nedeniyle zayıflamış olabileceği bildirilmiştir (Aydın 2011).

Çalışma konusu olan IMI'nin memelilerde oksidatif stres oluşturma potansiyeli ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır:

Tatlı su balığı *Cyprinus carpio*'da karaciğerde IMI, kısa süreli etkiye GSH miktarını artırırken uzun sürede azaltmıştır. Karaciğer ve beyinde lipid peroksidasyonu ve protein karbonil miktarında artma ve karaciğerde total protein miktarında azalma bulunmuştur (Serbes 2011).

Oral IMI uygulanan fare karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunda, GST ve GPx aktivitelerinde artış, GSH miktarında azalma belirlenmiştir. IMI'nin temel sitotoksik etki mekanizması içerisinde oksidatif stresin önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (El-Gendy vd. 2010).

Oral uygulanan IMI'nin kronik etkisinde sıçan yumurtalık dokusunda yalnızca yüksek dozda (20 mg/kg/gün) lipid peroksidasyonunda artış, GSH miktarında ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalma belirlenmiştir. Artan lipid peroksidasyonunun GSH azalması ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Kapoor vd. 2011). Kapoor vd. (2010) aynı süre ve dozda yumurtalık dokusuna benzer şekilde karaciğerde lipid peroksidasyonunun arttığını ve GSH miktarının, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin azaldığını belirlemiştir. Böbrek dokusunda, GSH miktarında ve antioksidant enzim aktivitelerinde değişim olmaksızın lipid peroksidasyonu artmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda dişi sıçanlar için 10 mg/kg/gün etki gözlemlenmeyen doz ve 20 mg/kg/gün ise etki gözlemlenen en düşük doz olarak belirlenmiştir.

İntravenöz IMI etkisinde sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun ve SOD aktivitesinin arttığı, GSH miktarının ve GPx aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Beyin dokusunda lipid peroksidasyonunda ve SOD aktivitesinde herhangi bir değişim belirlenemezken artan GSH miktarına bağlı olarak GPx aktivitesi artmıştır. Her iki dokuda da CAT aktivitesi değişmemiştir. Nikotin ve IMI gibi nAChR agonistlerinin memelilerde oksidatif potansiyele sahip oldukları ileri sürülmektedir (Duzguner ve Erdogan 2010).

Akut IMI etkisindeki izole insan lenfositlerde DNA hasarının olduğu belirlenmiştir (Feng vd. 2005). Akut IMI etkisindeki sıçanlarda hareket azalması, yürüme zorluğu, titreme, ishal ve spazm bulguları bildirilmiştir (Najafi vd. 2010).

İmidaclopridin ChE aktivitesine etkileri farklı organizmalarda gösterilmiştir:

Subakut IMI etkisindeki toprak solucanı *Aporrectodea nocturna* ve *Allolobophora icterica*'da AChE aktivitesinin değişmediği bildirilmiştir. IMI'nin enzim aktivitesinden çok nAChRlerin blokajı yoluyla etkili olduğu belirtilmiştir (Capowiez vd. 2003). Midye *Mytilus galloprovincialis*'in solungaç dokusunda IMI etkisinde AChE aktivitesinin azaldığı, neonikotinoid thiacloprid etkisinde ya da her ikisinin kombinasyonunda aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Buna göre ChE'ların neonikotinoidlere yanıtının türe-özgü olduğu belirtilmiştir (Dondero vd. 2010).

Annelerine gebeliğin 9. gününde *i.p.* IMI uygulanan 30 günlük Sprague-Dawley sıçan yavrularında beyin dokusunda AChE aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Beyin dokusunda AChE aktivitesinin artmasının, ACh miktarının dolayısıyla optimal nAChR işlevlerinin azalmasından kaynaklanan nörotoksik etkilere katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Abou-Donia vd. 2008).

Pestisid etkisinde ChE aktivitesinde eşeye de bağlı olabilen farklı yanıtlar elde edilmiştir:

Malathionun akut etkisindeki erkek ve dişi Wistar ırkı sıçanların serebral korteks ve hipokampusunda AChE aktivitesinin azaldığı, bu inhibisyonun erkek sıçanlarda daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Bu pestisidin etkisine erkek beyin dokusunun daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Maris vd. 2010).

İmidacloprid, fare böbreğinde, uygulamadan 6 saat sonra %30-35 oranında ölçülmekte ve 48 saat sonra büyük ölçüde atılmaktadır (Broznic vd. 2008). Sıçanlarda atılım %80 idrar ve %20 feçesle gerçekleşir. Atılımın %90'ı 24 saatte tamamlanırken, 48 saatte tamamı atılır (Sheets 2001).

İmidaclopridin metabolizmasında CYP3A4 ve AOX enzimlerinin önemli olduğu; CYP3A4'ün farklı molekül noktalarında oksidasyonu sağlarken; AOX'un nitro bileşenini indirgeyerek, hem böcek hem de omurgalı nAChRlerinde agonist etkiyi artırıp ya da azalttığı bilinmektedir (Honda vd. 2006; Costa vd. 2009). AOX'un omurgalı nAChRlerinde agonist etkiyi artırdığı, CYP3A4'ün buna herhangi bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir (Honda vd. 2006).

İmidacloprid ve alkol alarak intihar girişiminde bulunan bir hastada oligürik böbrek hasarını da içeren çoklu organ hasarı oluşmuştur. Böbrek hasarının oluşumunda diğer organlarda meydana gelen hasarların etkisi olabileceği, alkolün IMI

metabolizmasında yer alan AOX aktivitesini etkilediği ya da IMI metabolitlerinin etkisini artırmış olabileceği de düşünülmektedir (Yeh vd. 2010).

Biyotransformasyon tepkimeleri, ksenobiyotiklerin toksisitesinin artmasına neden olabilirken, GSH ve diğer konjugasyon bileşiklerinin miktarının azalmasına ya da ROS oluşumuna da yol açabilir (Nebbia 2001). Metabolizma düzenleyicilerinin varlığında ksenobiyotiklerin toksisitelerinin değerlendirilmesi, o bileşiklerin etki mekanizmalarını anlamak bakımından kullanılan bir yöntemdir (Nebbia 2001; Ghanayem ve Hoffler 2007).

PBO ve MEN'in pestisidlerle birlikte oksidatif ve nörotoksik etkilerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır:

Akut DEF (*S,S,S*-Tributyl phosphorotrithioate) etkisindeki *Ictalurus punctatus*'da beyin, karaciğer ve plazma dokularında PBO'nun, DEF'in AChE inhibe edici etkisine antagonistik rol oynadığı belirlenmiştir. PBO'nun AChE aktivitesini inhibe eden DEF metabolitlerinin oluşumunu yavaşlattığı öne sürülmektedir (Straus ve Chambers 2006).

Organofosfatlı fenthionun akut ve subakut etkisindeki *Oreochromis niloticus*'un beyin dokusunda kısa süreli fenthion etkisi, GSSG ve TBARS miktarlarında, GSH/GSSG oranında ve GST enzim aktivitesinde azalma, tGSH, GSH, HSP70 miktarlarında, GSH/GSSG oranında ile GR ve GST enzim aktivitelerinde artış meydana gelmiştir. PBO'nun fenthion ile birlikte uygulanması tüm etki sürelerinde tGSH, GSH miktarı ve GSH/GSSG oranında azalışa, GSSG, HSP70 ve TBARS miktarlarında artışa neden olmuştur. Tüm etki sürelerinde fenthionun AChE inhibisyonuna neden olduğu fakat PBO'nun uzun sürede bu etkiyi azalttığı belirlenmiştir. Modülatör olarak kullanılan PBO'nun fenthionun oksidatif stres oluşturma etkisini artırdığı ve AChE inhibisyon etkisini azalttığı belirtilmektedir (Temiz 2011).

Lambda cyhalothrinin akut etkisinde *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda, tGSH, GSH ve TBARS miktarlarının ve GST aktivitesinin arttığı, PBO modülasyonu altında kaspaz-3 aktivitesinin azaldığı, tGSH, GSH, HSP70 ve TBARS miktarlarının ve GPx ve GST aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. PBO'nun lambda cyalothrinin oksidatif stres potansiyelini artırdığı bildirilmektedir (Piner ve Üner 2012).

1, 4 ve 8 hafta oral yolla PBO uygulanan farelerde ROS üretiminin arttığı belirlenmiştir. 1 ve 4 hafta boyunca PBO etkisindeki farelerde *Cyp1A*, *Cyp2A5*, *Cyp2B9* ve *Cyp2B10* gibi oksidatif stres ile ilgili genler aşırı ifade edilmiştir. 8 hafta etkide kalan

farelerde ise bunların yanında DNA tamiri ile ilgili genlerde de ifade artışı bulunmuştur (Muguruma vd. 2006).

Organofosfatlı pestisid fenitrothion, piretroid pestisid lambda cyhalothrin ve PBO'nun standart karışımının çeşitli derişimlerinde inkübe edilen sıçan beyin homojenatlarında doza ve zamana bağılı olarak lipid peroksidasyonunda artma ve GSH miktarı, SOD, CAT, GST ve AChE aktivitelerinde ise azalma belirlenmiştir (El-Damerdash 2011).

İntraperitoneal PBO ve parathion uygulanan fare beyin homojenatlarında ChE inhibisyonunun parathion etkisindeki homojenatlara göre üç kat daha geç başladığı bildirilmiştir. PBO'nun parathionun oksidatif metabolizmasını inhibe ederek kolinerjik semptomları geciktirdiği düşünülmektedir (Mirer vd. 1977).

Organofosfatlı azinphos-methyl ve PBO etkisindeki sıçanlarda akut toksisitenin yanında, karaciğerde non-protein tiyollerin azaldığı bildirilmiştir. Bu insektisidin akut toksisitesindeki azalmanın PBO'nun metabolik aktivasyonu inhibe etmesi nedeniyle olabileceği bulunmuştur (Sultatos ve Woods 1988).

Potasyum siyanür ile inkübe edilen fare beyin homojenatlarında lipid peroksidasyonunun arttığı, PBO uygulanan homojenatlarda ise azaldığı bildirilmiştir. Karmaşık-işlevli oksidazların (MFO) karıştığı detoksifikasyon mekanizmasının inhibisyonuyla PBO'nun etkili olabileceği belirtilmektedir (Yamamoto 1998).

Erkek Fischer 344 sıçan renal kortikal hücre kültüründe, metabolit oluşumu yoluyla herbisid propanilin neden olduğu ve laktat dehidrojenaz salınımı ile belirlenen nefrotoksositeye karşı PBO uygulamasının koruyucu etki yaptığı belirlenmiştir (Rankin vd. 2008).

Redoks aktif bir bileşik olarak ROS artışına neden olabilen MEN'in (Abe ve Saito 1996; Chung vd. 1997; Cui vd. 2005) diğer ksenobiyotiklerle birlikte etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır:

İntraperitoneal paraquat ve MEN'in kronik etkisinde *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğer dokusunda yalnız paraquat uygulanan grupta GR aktivitesi artış gösterirken MEN uygulanan grupta anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır. Böbrek dokusunda da anlamlı değişiklik belirlenmemiştir (Akerman vd. 2003).

Glutasyon azaltıcı ajan phorone ve MEN'in birlikte akut etkisinde sıçan plazmasında ve karaciğerinde GSSG miktarının arttığı ve karaciğerde lipid

peroksidasyonunun oluşmadığı bildirilmiştir. MEN'in hepatositlerde protein tiyollerini azalttığı ve toksisitesini lipid peroksidasyonu üzerinden göstermediği belirtilmektedir (Hong vd. 2009).

İnsektisid rotenone, paraquat ve MEN'in akut etkisinde sıçan beyin homojenatlarında, yalnız pestisid uygulanan gruplara oranla ROS oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. MEN'in bu etkisinin elektron transfer zincirinde yer alan kompleks I'ı baskılamasından dolayı olduğu vurgulanmaktadır (Isaev vd. 2004).

MEN'in akut etkisinde sıçan glomerül homojenatlarında GSH içeriğinin %80 oranında azaldığı belirlenmiştir. Oksidatif stres aracılığıyla böbrek hücrelerinde hasara neden olduğu bilinen MEN'in, ROS oluşturma kapasitesi ve toksisitesinin protein sentezinin inhibisyonuyla yakından ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (Morgan vd. 1998).

Bu tez çalışmasında, son zamanlarda hedef olmayan bal arılarına verdiği zarardan dolayı ülkemizde kullanımı tartışma konusu olan IMI'nin, modülatör varlığında oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve nörotoksik etkilerinin incelenmesi hedef olmayan organizmalara etkilerinin ve çevresel risklerinin değerlendirilmesinde yararlı bilgiler sunacaktır. IMI'nin oksidatif stres oluşturma potansiyeline ve nörotoksitesine ilişkin çalışmalar olmasına karşın, eşeye- ve süreye-bağımlı olarak PBO ve MEN modülatörlüğünde bu etkileri hakkında bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada modülatörler ile IMI'nin Faz-I metabolitlerine dönüşümü baskılanarak, toksisitenin ana bileşikten mi yoksa metabolitlerinden mi kaynaklandığının belirlenmesi amaçlanmıştır. IMI'nin böbrek dokusunda oksidatif stres oluşturma potansiyelini belirlemek amacıyla tGSH miktarı ve GSH-bağımlı enzimler olan GPx ve GST enzim aktiviteleri ile CAT aktivitesine ve lipid peroksidasyonuna etkileri, nörotoksitesini belirlemek amacıyla total kolinesteraz (tChE) aktivitesine etkileri tek başına ya da MEN ve PBO modülatörlüğünde eşey ve süre ayırımında incelenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmanın, Çukurova Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu tarafından 02.07.2010 tarihli 11 nolu toplantıda alınan karar ile araştırma etiği yönünden uygun olduğuna karar verilmiştir. Çalışma materyali olan Sprague-Dawley dişi ve erkek sıçan örnekleri Çukurova Üniversitesi TIBDAM Merkezi'nden alınarak Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarı'na aktarılmış ve 7 gün süreyle ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Laboratuvar sıcaklığı $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve bağıl nemi $\%65\pm 5$ olup ve doğal aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Sıçanlar *ad libitum* olarak beslenmiştir. Buldukları kafes içerisindeki talaş günlük olarak değiştirilerek temizlik sağlanmıştır.

3.1.1 Kimyasal Maddeler

1,1',3,3'-tetramethoksiopropan		Sigma
1-Kloro-2,4-dinitro-benzen	CDNB	Sigma
2-Tiyobarbitürik Asit	TBA	Merck
5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)	DTNB	Sigma
5-Sülfosalisilik Asit	SSA	Sigma
Asetilkolin tiyoyodür	AChI	Sigma
Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
Dimetil sülfoksit	DMSO	Carlo-Erba
di-Potasyum hidrojen fosfat	K_2HPO_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		Sigma
Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı		Sigma
Glutatyon redüktaz	GR	Sigma
Imidacloprid	IMI	Sigma
Menadione	MEN	Sigma
Piperonil bütoksit	PBO	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	KH_2PO_4	Merck

Redükte L-glutatyon	GSH	Sigma
Sığır serum albumini		Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	Carlo-Erba
Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	Merck
Sodyum klorür	NaCl	Merck
Sodyum potasyum tartarat		Merck
<i>t</i> -Butil hidroperoksid		Sigma
Tiyobarbiturik asit	TBA	Merck
Tris baz		Sigma
Tris hidroklorür	Tris HCl	Sigma
β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	β -NADPH	Sigma

3.1.2 Cihazlar ve Gereçler

1. İnkübatörlü Double Beam Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
2. Analitik Terazi	Ohaus
3. Kaba Terazi	AND FX-3000i
4. -80°C Derin Dondurucu	New Brunswick U570
5. Buzdolabı	Vestel BZP-XL3442W
6. Su Banyosu	Daihan Wisd WB22
7. Soğutmalı Masaüstü Santrifüj	Hettich Universal 320 R
8. Genel Amaçlı Santrifüj	Hettich Eba 21
9. Farklı Ölçeklerde Otomatik Pipetler	Gilson
10. pH metre	Thermo Orion 2 Star
11. Vortex	LABART MVS-1
12. Etüv	Nüve EN 120
13. Saf Su Cihazı	Millipore Rios 8
14. Buz Makinası	Scotsman AF-80
15. Teflon Başlıklı Homojenizatör	Daihan Wisd HS-30E
16. Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı	Daihan Wisd MSH-20A

3.2 Yöntem

Toksikoloji denemeleri için dişi ve erkek sıçanlar kendi aralarında rastgele her biri 200'er gramlık 6 sıçan içeren farklı gruplara ayrılmış ve denemeler 12 ve 24 saat olmak üzere iki farklı sürede tekrarlanmıştır. Denemelerin başlangıcında sıçanlara MEN ve PBO'nun sırasıyla 25 mg/kg ve 100 mg/kg dozları *i.p.* olarak uygulanmıştır. 90 dakika sonra IMI'nin *i.p.* LD₅₀ dozu olan 170 mg/kg (WHO 2001) *i.p.* enjeksiyonla verilmiştir. Enjeksiyonlardan 24 saat önce sıçanların beslenmesi kesilmiş ve denemeler süresince sıçanlara besin verilmemiştir. IMI, PBO ve MEN dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür.

Deneme Grupları:

1. Serum fizyolojik kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara enjeksiyon stresini elimine etmek üzere *i.p.* serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılmıştır.
2. Çözücü kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* çözücü sıvı (DMSO) enjeksiyonu yapılmıştır.
3. IMI grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* 170 mg/kg IMI enjeksiyonu yapılmıştır.
4. PBO grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* 100 mg/kg PBO enjeksiyonu yapılmıştır.
5. MEN grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* 25 mg/kg MEN enjeksiyonu yapılmıştır.
6. IMI + PBO grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* 100 mg/kg PBO enjekte edildikten 90 dakika sonra *i.p.* 170 mg/kg IMI uygulanmıştır.
7. IMI + MEN grubu: Bu gruptaki sıçanlara *i.p.* 25 mg/kg MEN enjekte edildikten 90 dakika sonra *i.p.* 170 mg/kg IMI uygulanmıştır.

Her bir sürenin sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yoluyla öldürülüp, böbrek dokuları buz üzerinde disekte edilmiştir. Böbrek dokusu serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurulanıp tartılmıştır. Dokular kuru buz içerisinde (-78°C) hızla Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan -80 °C'lik dondurucuya taşınmış ve biyokimyasal analizler yapılncaya kadar burada saklanmıştır.

Biyokimyasal analizler için dokular %1.17 KCl içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponunda 1/10 (w/v) olacak şekilde homojenizatör ile buz içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 10500 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant GPx, GST, CAT, total kolinesteraz (tChE) enzim aktivitelerinin, TBARS ve

protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. tGSH miktarının belirlenmesi için süpernatantlar 1/0.5 (v/v) oranında %10 5-sülfosalisilik asit ile karıştırılıp 10500 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve bu işlemde elde edilen süpernatantlar tGSH miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.1 Biyokimyasal Analizler

3.2.1.1 Total GSH Yöntemi

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

Ayırçalar

1. 143 mM Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (6.3 mM EDTA içeren, pH 7.5)
2. 0.3 mM β -NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutatyon Redüktaz

Yöntem

Total GSH miktarını ölçmek için çözeltiler küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.1).

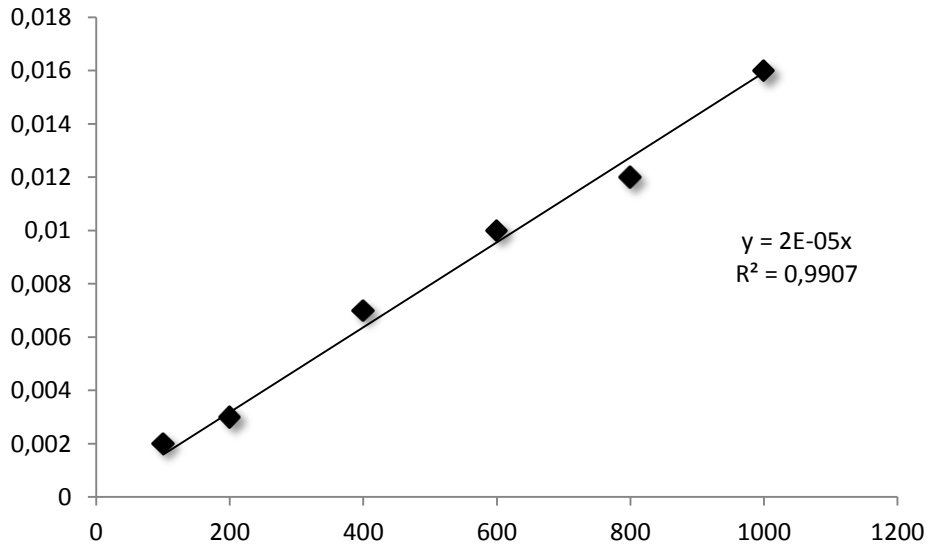
Çizelge 3.1 Total Glutasyon Yöntemi

Çözeltiler	Miktar (µL)
NADPH	700
DTNB	100
Örnek	25
Saf su	165
Çalkalanır ve 30°C'de 3 dk. inkübe edilir	
GR	10

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C'de, 0. dakika ve 5. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedilir. Sonuçlar tGSH için hazırlanan standart grafikten değerlendirilir.

Standart Grafiğin Hazırlanması

Çalışma tamponu ile 1000 ng/mL'lik GSH stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözelti, çalışma standartlarının hazırlanmasında kullanılmak üzere 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL'lik derişimlerde seyreltilmiştir. Standart grafik için total GSH miktarının belirlenmesinde kullanılan yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Total GSH standart grafiği

3.2.1.2 Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Glutasyon peroksidaz, GSH'nin H₂O₂ ve organik hidroperoksitler ile GSSG'ye yükseltgenmesini kataliz eder. *t*-bütil hidroperoksid bulunan ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'nin NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür (Beutler 1984).

Ayrıçlar

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

Yöntem

Glutasyon peroksidaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler küvete aşağıdaki şekilde yerleştirilir (Çizelge 3.2). Kör olarak örnek küvetinin karşısında her zaman saf su içeren küvet bulunur.

Çizelge 3.2 Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Miktar (µL)
Saf su	660
1M Tris tamponu	100
0.1 M GSH	20
10 U/mL GR	100
2 mM NADPH	100
Örnek	10
37°C'de 10 dk. inkübe edilir	
<i>t</i> -bütil hidroperoksid	10

Oluşan tepkime 37°C’de 340 nm dalga boyunda 0. ve 2.5. dakikalardaki absorbans değerleri ölçülerek izlenir.

Hesaplama

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

ΔABS = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

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

3.2.1.3 Glutatyon S-Transferaz Yöntemi

Glutatyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu GSH’ın -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek sağlar. GST aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB), GSH ile konjugasyonu sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür (Habig vd. 1974).

Ayırıcılar

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

Yöntem

GST aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek içeren küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

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

Hesaplama

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

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

ΔABS = 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

3.2.1.4 Katalaz Yöntemi

Katalaz H_2O_2 ’nin suya ve moleküler oksijene yıkımını kataliz eder. H_2O_2 ’nin CAT tarafından yıkım hızı H_2O_2 ’in 230 nm’de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Beutler 1984).

Ayıraçlar

1. 10 mM H_2O_2
2. 1 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. Tris Tamponu (pH 8.0)

Yöntem

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

Çizelge 3.4 Katalaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris tamponu	50	50
H ₂ O ₂	-	900
H ₂ O	930	30
Çalkalanır ve 37°C'de 10 dk. inkübe edilir.		
Örnek	20	20

Kör ve örneğin absorbansı 230 nm dalga boyunda 0. ve 2.5. dakikada ölçülür.

Hesaplama

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_t}{0.071 \times V_ö}$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam hacim

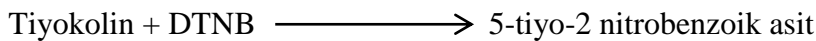
$V_ö$ = Örnek hacmi

0.071 = H₂O₂'in 230 nm'deki mM ekstinksiyon katsayısı

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

3.2.1.5 Total Kolinesteraz Yöntemi

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



Ayrıçlar

1. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH 8.0)
2. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. 0.01 M DTNB
4. 0.015 M Asetilkolintiyoyodür

Yöntem

Total kolinesteraz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Total Kolinesteraz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Fosfat Tamponu	2700	2600
Örnek	200	200
DTNB	100	100
Çalkalanır ve 30°C'de 5 dk. inkübe edilir.		
Asetilkolintiyoyodür	-	100

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

Hesaplama

$$\text{tChE Aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika /mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{V_ö} \times 13,6$$

$$\text{tChE Aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika/mg protein}) = \frac{\text{tChE Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

ΔABS = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

$V_ö$ = Örnek hacmi

3.2.1.6 TBARS Yöntemi

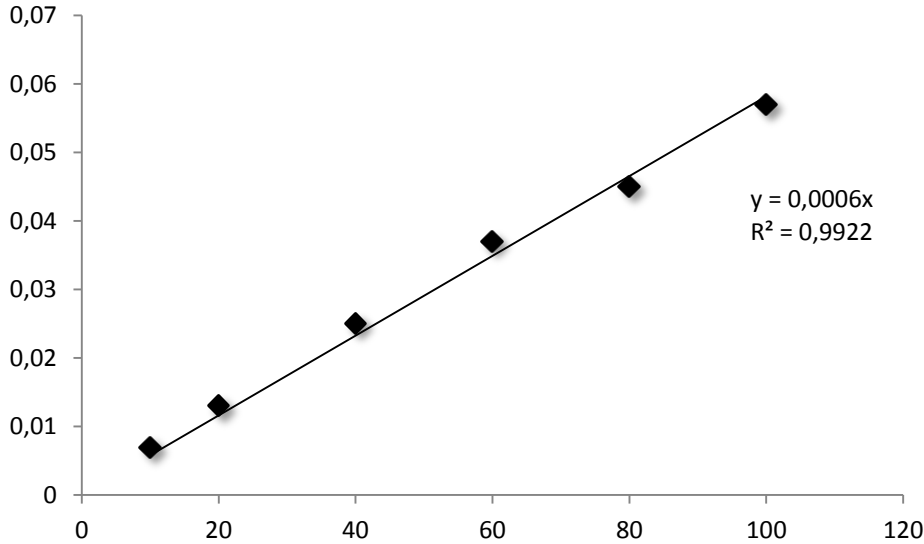
Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri aerobik koşullarda TBA ile 100°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleks spektrofotometrede 535 nm'de ölçülür.

Yöntem

200 µL örneğe 200 µL %10'luk trikloroasetik asit ilave edilir, vortekslendikten sonra 500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. 300 µL süpernatanta 300 µL %0.67'lik tiyobarbitürik asit ilave edilir. Vortekslendikten sonra 100°C kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilir. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra üzerlerine 100 µL saf su eklenir, çalkalandıktan sonra absorbans 535 nm'de ölçülür (Wills 1966).

Standart Grafiğın Hazırlanması

1,1',3,3'-tetramethoksiopropan kullanılarak 100 ng/mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma için bu stok çözelti 10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/mL seyreltilerek grafik çiziminde bu çözeltilerin analizinden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Standart grafik için TBARS miktarının belirlenmesinde kullanılan yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.2 TBARS standart grafiğı

3.2.1.7 Protein Yöntemi

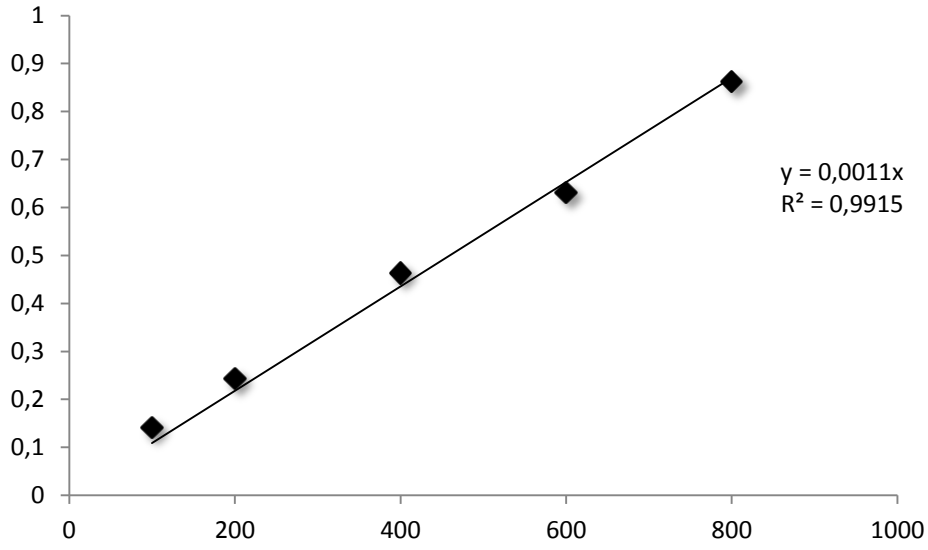
Proteinlerin çoğu tirozin, triptofan ya da her iki aminoasidi de içerirler. Bu aminoasitler serbest ya da katlanmamış bir polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungstik asit-molibdik asit ayıracını (Folin-Ciocalteu's ayıracı) indirgerler. Bu yöntemde proteinler bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak üzere alkali çözeltide Cu^{2+} ile tepkimeye girerler. Ortama Folin-Ciocalteu's ayıracı eklendiğinde indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan rezidüleri birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür (Lowry vd. 1951).

Ayıraçlar

1. Alkali Na_2CO_3 çözeltisi
2. Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi
%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
%2 Na-K tartarat
Kullanılacağı zaman bu çözeltiler eşit hacimde karıştırılarak hazırlanır.
3. Alkali çözelti (günlük olarak hazırlanmıştır): 50 mL alkali Na_2CO_3 çözeltisi 1 mL Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanır.
4. Folin-Ciocalteu's ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu's 1.5 mL saf su ile karıştırılarak hazırlanır.

Standart Grafiğin Hazırlanması

Sığır serum albumini kullanılarak 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik stok protein çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma için bu çözelti 100, 200, 400, 600, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerde seyreltilerek grafik çiziminde bu çözeltilerin analizinden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Protein standart grafiği

Yöntem

Süpernatanttan 0.3 mL alınır, üzerine 3 mL alkali çözelti ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 0.3 mL Folin-Ciocalteu's ayracı 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 hazırlanan standart grafikten değerlendirilir.

3.2.2 İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 paket programında (SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D.) yapılmıştır. Sürekli bir değişken yönünden ikiden çok bağımsız grup arasında farklılık olup olmadığını incelemek için $P < 0.05$ önem derecesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testinde önem gösteren parametrelerde sürekli bir değişken yönünden bağımsız iki grup arasında fark olup olmadığını test etmek için Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonu belirlemek üzere Spearman *rho* testi kullanılmıştır (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 2005).

4. BULGULAR

Bu çalışmada Sprague-Dawley sıçan böbrek dokusunda neonikotinoid insektisid IMI'nin, CYP450 inhibitörü PBO ve AOX inhibitörü MEN'in modülatörlüğünde 12 ve 24 saatlik sürelerde, tGSH miktarına, GPx, GST ve CAT enzim aktivitelere, lipid peroksidasyonuna, tChE enzim aktivitesine ve protein miktarlarına etkisi eşey ayrımı yapılarak araştırılmıştır.

4.1 Çözücü Dimetilsülfoksidin (DMSO) İncelenen Parametrelere Etkisi

Imidacloprid, PBO ve MEN için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun parametrelere etkisi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Erkek sıçanlarda 12. saatte DMSO lipid peroksidasyonunu kontrole göre %34 oranında azaltmıştır. 24. saatte GST aktivitesinin %67 oranında artmasına neden olmuştur.

Dişi sıçanlarda 12. saatin sonunda test edilen parametrelerde herhangi bir değişim olmazken, 24. saatte tGSH miktarı, GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonu sırasıyla %19, %22 ve %30 oranında azalmış, protein miktarı %20 oranında artmıştır.

ÇİZELGE 4.1 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda çözücü DMSO'nun GPx, CAT (U/mg protein), GST ve tChE ($\mu\text{M}/\text{dak}/\text{mg}$ protein) enzim aktivitelerine, tGSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein), TBARS (nmol/mg protein) ve protein miktarlarına (mg/mL homojenat) etkileri

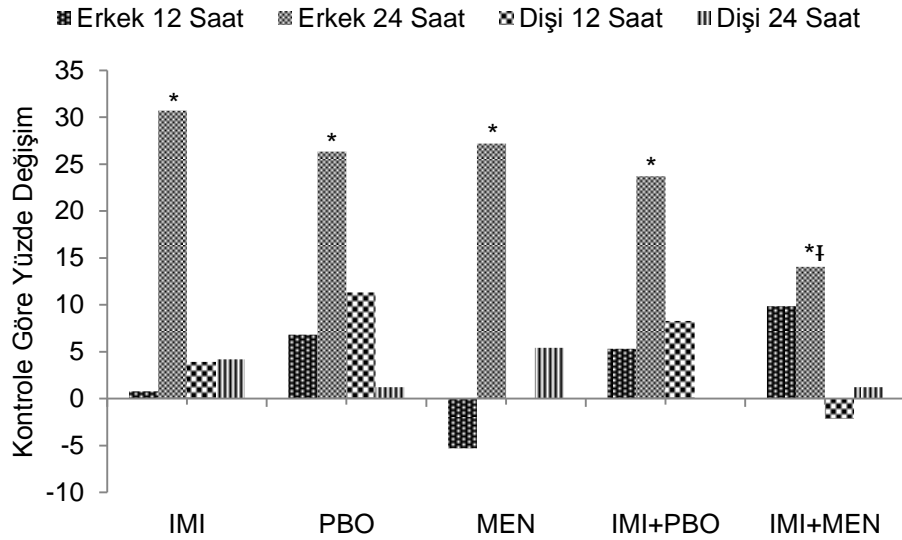
		tGSH	GPx	GST	CAT	tChE	TBARS	PROTEİN
ERKEK 12	SF	1.40±0.06	5.59±1.08	224.17±23.23	149.68±1.37	0.0018±0.0001	367.03±10.03 ^a	0.66±0.017
	DMSO	1.32±0.07	3.92±0.22	220.63±19.23	163.53±7.62	0.0023±0.0002	242.85±16.93 ^b	0.72±0.025
ERKEK 24	SF	1.24±0.06	2.53±0.08	68.11±3.93 ^a	132.00±6.69	0.0017±0.0000	279.16±13.38	0.80±0.020
	DMSO	1.14±0.03	2.69±0.21	113.46±12.35 ^b	129.42±4.33	0.0017±0.0000	255.72±11.26	0.84±0.023
DIŞİ 12	SF	2.55±0.09	3.50±0.09	83.51±7.76	148.95±5.70	0.0024±0.0002	393.80±16.31	0.50±0.017
	DMSO	2.30±0.13	3.30±0.23	94.33±7.94	158.50±14.49	0.0026±0.0001	255.45±70.63	0.51±0.028
DIŞİ 24	SF	2.05±0.20 ^a	3.86±0.27 ^a	63.13±3.62	129.21±3.22	0.0017±0.0001	465.48±29.67 ^a	0.56±0.030 ^a
	DMSO	1.67±0.04 ^b	3.01±0.09 ^b	53.97±1.64	116.09±6.40	0.0018±0.0001	327.86±26.26 ^b	0.67±0.014 ^b

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($N=6$).

4.2 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin tGSH Miktarına Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tGSH miktarına etkisi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Imidacloprid, PBO ve MEN'in 24 saatlik etkilerinde erkek sıçanlarda çözücü kontrole göre tGSH miktarı sırasıyla %31, %26 ve %27 oranında artış göstermiştir (Şekil 4.1). IMI+PBO etkisinde IMI ya da PBO verilen sıçanlara göre herhangi bir anlamlı değişim belirlenmemiştir. IMI+MEN etkisinde IMI ya da MEN gruplarına göre sırasıyla %13 ve %10 oranında azalma saptanmıştır; fakat tGSH miktarındaki artış çözücü kontrole göre %14 oranında anlamlıdır. PBO ve IMI+PBO etkisinde artan tGSH miktarı ile azalan protein miktarı arasında negatif korelasyon bulunmuştur; sırasıyla $r^2 = -0.943$, $P < 0.01$ ve $r^2 = -0.943$, $P < 0.01$. IMI+PBO etkisinde kontrol düzeylerine azalan lipid peroksidasyonu ile artan tGSH miktarı arasında ise pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir ($r^2 = 0.886$, $P < 0.05$).



Şekil 4.1 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tGSH miktarına ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) etkileri

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

† : IMI grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

ÇİZELGE 4.2 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde tGSH miktarına ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) etkileri

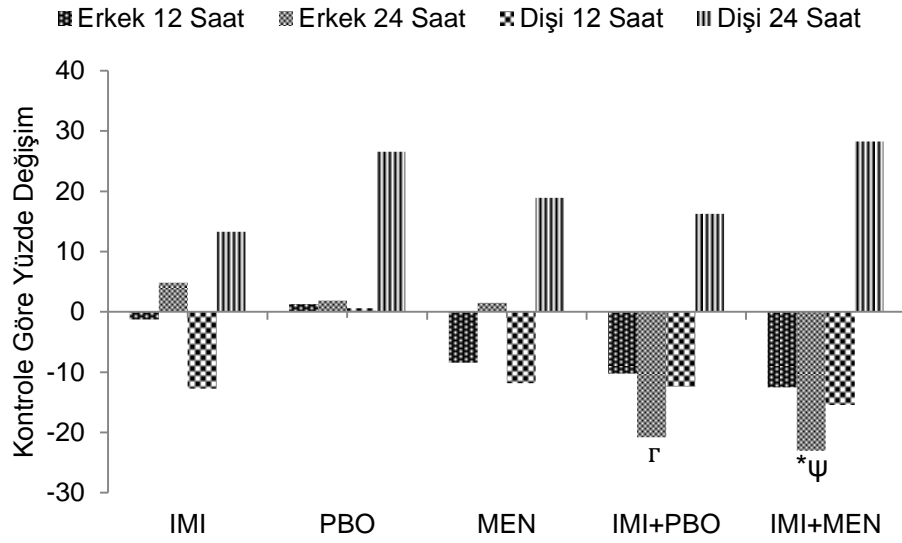
	tGSH			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	1.32±0.07	1.14±0.03 ^a	2.30±0.13	1.67±0.04
IMI	1.33±0.07	1.49±0.02 ^b	2.39±0.07	1.74±0.06
PBO	1.41±0.10	1.44±0.06 ^{bc}	2.56±0.05	1.69±0.11
MEN	1.25±0.07	1.45±0.03 ^b	2.30±0.05	1.76±0.15
IMI+PBO	1.39±0.11	1.41±0.11 ^{bc}	2.49±0.12	1.67±0.07
IMI+MEN	1.45±0.24	1.30±0.05 ^c	2.25±0.05	1.69±0.07

$\bar{X} \pm S_x =$ Aritmetik ortalama \pm Standart hata. a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($N=6$).

4.3. Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin GPx Enzim Aktivitesine Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GPx enzim aktivitesine etkisi Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Erkek sıçanlarda 24 saat sonunda IMI+MEN etkisinde GPx enzim aktivitesi çözücü kontrole ve MEN'e göre sırasıyla %23 ve %24 oranında, IMI+PBO etkisinde PBO'ya göre %22 oranında azalmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GPx enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri

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

ψ: MEN grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

r : PBO grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

ÇİZELGE 4.3 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde GPx enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri

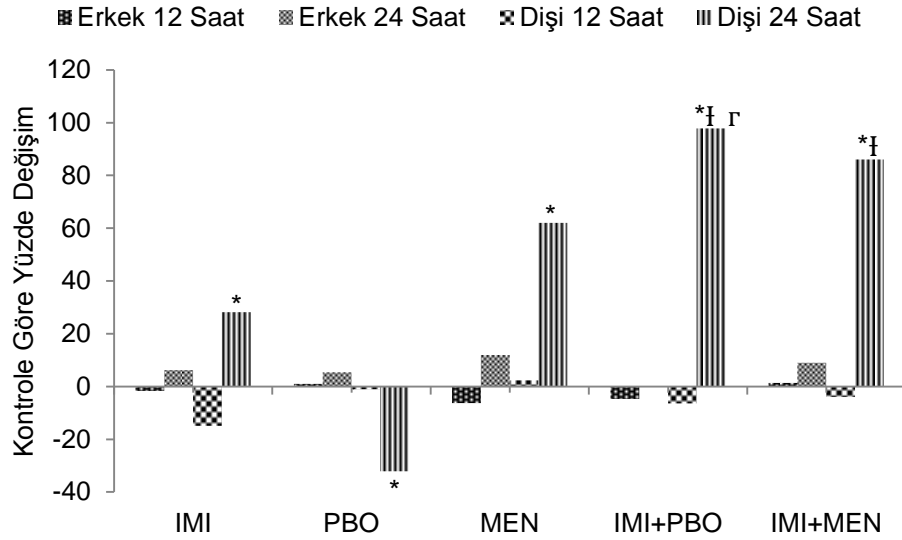
	GPx			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	3.92±0.22	2.69±0.21 ^{ab}	3.30±0.23	3.01±0.09
IMI	3.87±0.22	2.82±0.23 ^{abc}	2.88±0.19	3.41±0.19
PBO	3.97±0.32	2.74±0.10 ^a	3.32±0.24	3.81±0.27
MEN	3.59±0.08	2.73±0.08 ^a	2.91±0.12	3.58±0.17
IMI+PBO	3.52±0.24	2.13±0.16 ^{bc}	2.89±0.23	3.50±0.17
IMI+MEN	3.43±0.17	2.07±0.05 ^c	2.79±0.10	3.86±0.26

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

4.4 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin GST Enzim Aktivitesine Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GST enzim aktivitesine etkisi Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Dişi sıçanlarda 24 saat sonunda IMI, MEN, IMI+PBO ve IMI+MEN etkisinde GST enzim aktivitesinde çözücü kontrole göre sırasıyla %28, %62, %98 ve %86 artış belirlenmiştir (Şekil 4.3). PBO etkisinde aktivite %32 oranında azalma göstermiştir. IMI+PBO etkisinde aktivitedeki artış IMI ya da PBO verilen gruplara göre sırasıyla %54 ve %192 oranında da anlamlıdır. IMI+MEN etkisindeki artış ise IMI grubuna göre %45 oranında önemlidir. IMI etkisinde artan GST enzim aktivitesi tGSH miktarı ile pozitif korelasyon göstermiştir ($r^2 = 0.928$; $P < 0.01$). IMI+MEN etkisinde artan GST enzim aktivitesi aynı sürede artan lipid peroksidasyonu ile korele değildir ($r^2 = 0.143$; $P > 0.05$).



Şekil 4.3 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin GST enzim aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dakika}/\text{mg}$ protein) etkileri

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

: IMI grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

γ : PBO grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

ÇİZELGE 4.4 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde GST enzim aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dakika}/\text{mg}$ protein) etkileri

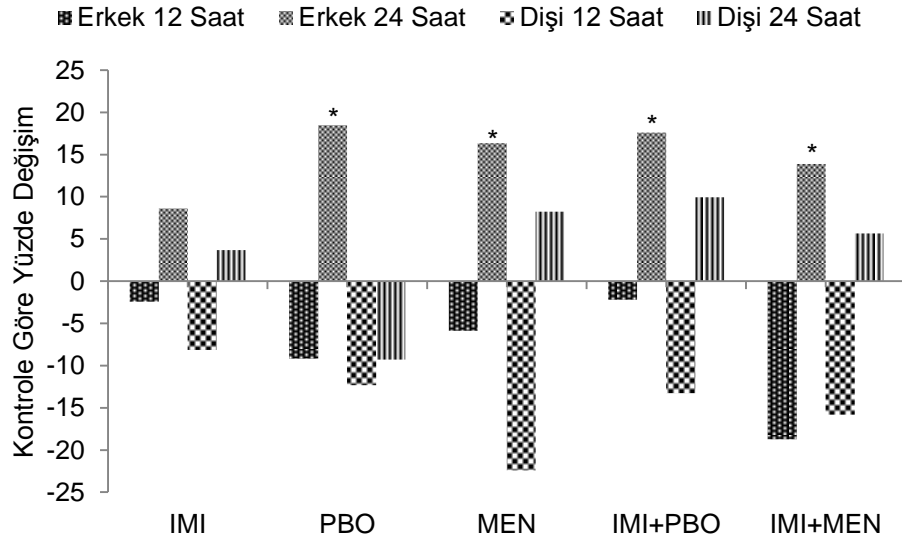
	GST			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	220.63±19.23	113.46±12.35	94.33±7.94	53.97±1.64 ^a
IMI	216.77±18.20	120.40±5.74	80.27±3.94	69.15±1.06 ^b
PBO	222.67±17.83	119.47±10.67	93.25±7.56	36.60±0.68 ^c
MEN	206.69±16.16	126.92±12.85	96.53±5.66	87.44±5.01 ^d
IMI+PBO	210.22±3.94	113.44±10.41	88.26±6.88	106.74±7.35 ^d
IMI+MEN	223.53±11.77	123.58±8.87	90.58±5.34	100.37±4.67 ^d

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama \pm Standart hata. a, b, c ve d harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

4.5 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin CAT Enzim Aktivitesine Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin CAT enzim aktivitesine etkisi Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Erkek sıçanlarda 24 saat sonunda PBO ve IMI+PBO etkisinde çözücü kontrole göre CAT enzim aktivitesinde her iki grupta da sırasıyla %19 ve %18 oranında, MEN ve IMI+MEN etkisinde çözücü kontrole göre sırasıyla %16 ve %14 oranında artış belirlenmiştir (Şekil 4.4). IMI etkisinde CAT aktivitesi aynı sürede artan lipid peroksidasyonu ile negatif korelasyon göstermektedir ($r^2 = -1.000$; $P < 0.01$).



Şekil 4.4 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin CAT enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri

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

ÇİZELGE 4.5 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde CAT enzim aktivitesine (U/mg protein) etkileri

	CAT			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	163.53±7.62	129.42±4.33 ^a	158.50±14.49	116.09±6.40
IMI	159.56±4.82	140.58±3.44 ^{ab}	145.61±10.43	120.38±5.54
PBO	148.56±6.32	153.31±6.90 ^b	138.98±10.80	105.31±4.90
MEN	153.95±5.90	150.60±3.24 ^b	122.99±10.51	125.64±8.57
IMI+PBO	159.97±7.80	152.21±6.87 ^b	137.47±5.81	127.65±4.64
IMI+MEN	132.88±12.93	147.38±3.90 ^b	133.46±9.81	122.67±2.04

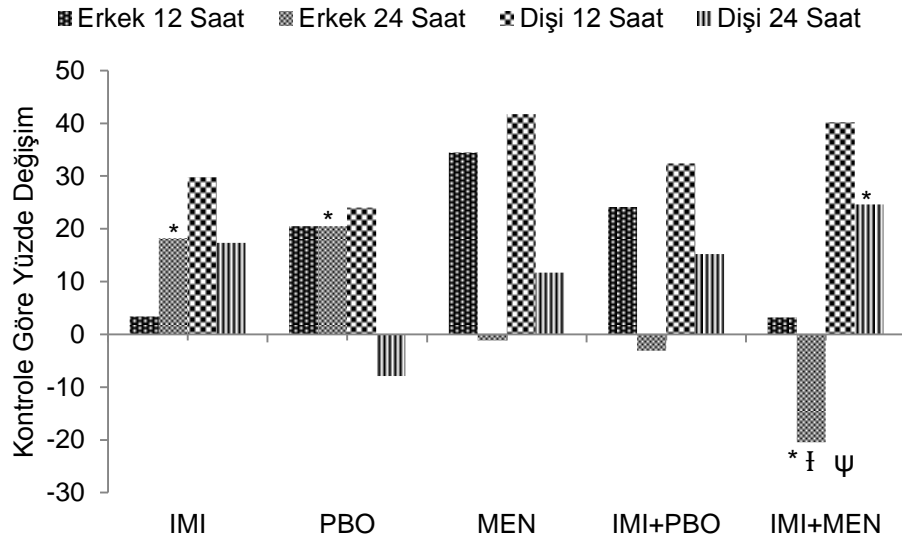
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($N=6$).

4.6 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin Lipid Peroksidasyonuna Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin TBARS miktarına etkisi Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Erkeklerde 24. saatte çözücü kontrole göre TBARS miktarı IMI ve PBO etkisinde sırasıyla %18 ve %21 oranında artmıştır (Şekil 4.5). IMI+MEN etkisinde %21 oranında azalma belirlenmiştir. IMI ve PBO etkisinde artan lipid peroksidasyonu, IMI+PBO etkisinde kontrol düzeylerine azalmıştır. IMI+MEN etkisindeki azalma IMI ve MEN gruplarına göre de sırasıyla %33 ve %20 oranlarında anlamlıdır.

Dişilerde, IMI+MEN etkisinde çözücü kontrole göre ve IMI+PBO etkisinde PBO'ya göre %25 oranında artış belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin TBARS miktarına (nmol/mg protein) etkileri

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

† : IMI grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$)

ψ: MEN grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$)

ÇİZELGE 4.6 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde TBARS miktarına (nmol/mg protein) etkileri

	TBARS			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	242.85±16.93	255.72±11.26 ^a	255.45±70.63	327.86±26.26 ^{ab}
IMI	251.03±25.82	302.25±2.73 ^b	331.50±22.23	384.79±28.09 ^{abc}
PBO	292.63±17.99	308.22±19.09 ^b	316.75±33.10	301.93±25.99 ^b
MEN	326.60±27.22	252.71±3.99 ^a	362.10±23.78	366.23±28.06 ^{abc}
IMI+PBO	301.50±16.55	247.87±19.05 ^{abc}	338.19±25.73	377.70±17.63 ^{ac}
IMI+MEN	250.68±14.29	203.38±11.32 ^c	358.24±18.81	408.62±14.82 ^c

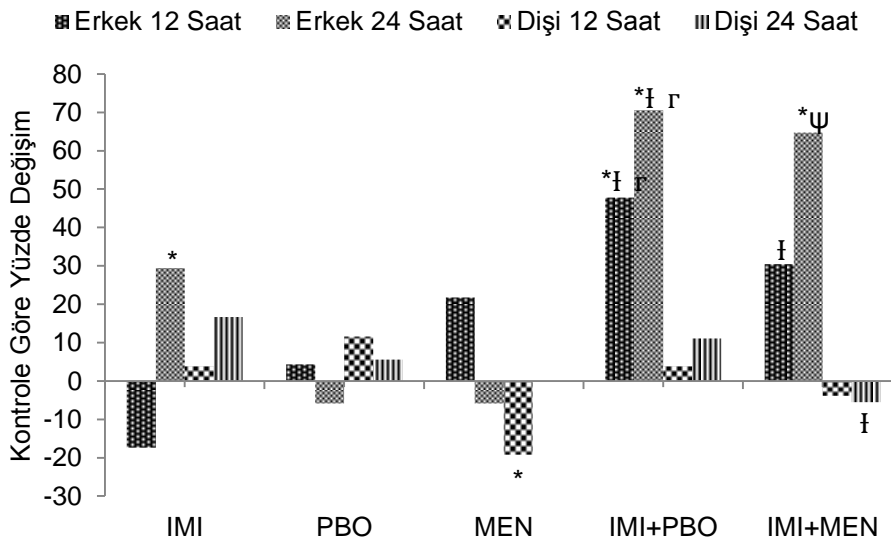
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

4.7 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin tChE Enzim Aktivitesine Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tChE enzim aktivitesine etkisi Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Erkeklerde 12 saat sonunda, IMI+PBO etkisinde çözücü kontrole, IMI'ye ve PBO'ya göre sırasıyla %48, %79 ve %42 oranında artış belirlenmiştir (Şekil 4.6). IMI+MEN etkisinde IMI'ye oranla %58 artış meydana gelmiştir. 24. saatte IMI, IMI+PBO ve IMI+MEN etkisinde çözücü kontrole göre sırasıyla %29, %71 ve %65 oranında artış belirlenmiştir. IMI+PBO etkisindeki artış, IMI ya da PBO verilen gruplara oranla sırasıyla %32 ve %81 anlamlıdır. IMI+MEN etkisinde MEN'e göre enzim aktivitesi %75 oranında artmıştır.

Dişilerde 12. saatte MEN etkisinde aktivite %19 oranında azalmış, IMI+MEN etkisinde kontrol düzeylerine ulaşmıştır. 24. saatte IMI+MEN, tChE enzim aktivitesinin IMI'ye göre %19 oranında azalmasına neden olmuştur.



Şekil 4.6 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin tChE enzim aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dakika}/\text{mg}$ protein) etkileri

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

† : IMI grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$)

‡: MEN grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$)

§ : PBO grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$)

ÇİZELGE 4.7 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde tChE aktivitesine ($\mu\text{M}/\text{dak}/\text{mg}$ protein) etkileri

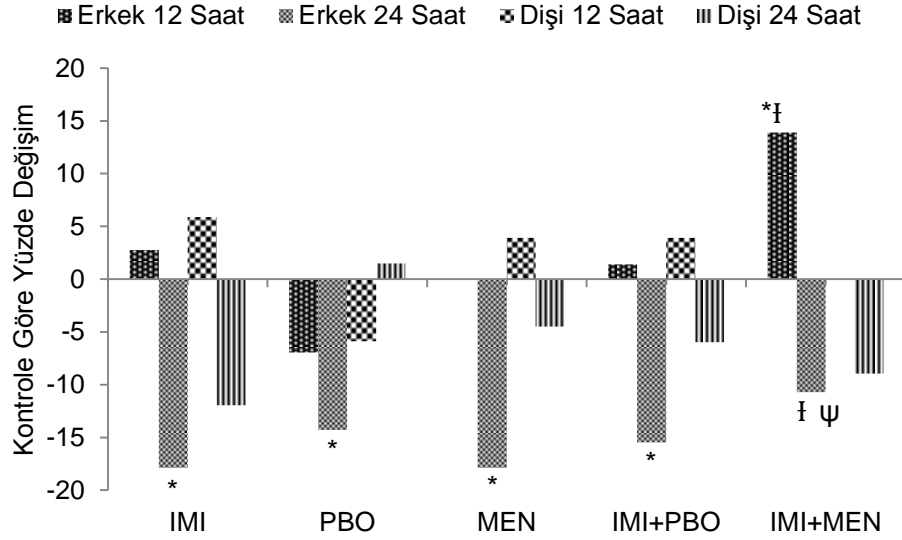
	tChE			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	0.0023 ± 0.0002^{ab}	0.0017 ± 0.00^a	0.0026 ± 0.0001^a	0.0018 ± 0.0001^{ab}
IMI	0.0019 ± 0.0002^a	0.0022 ± 0.0001^b	0.0027 ± 0.0002^a	0.0021 ± 0.0001^a
PBO	0.0024 ± 0.0003^{ab}	0.0016 ± 0.0001^a	0.0029 ± 0.0002^a	0.0019 ± 0.0001^a
MEN	0.0028 ± 0.0002^b	0.0016 ± 0.0001^a	0.0021 ± 0.0001^b	0.0018 ± 0.0001^{ab}
IMI+PBO	0.0034 ± 0.0002^c	0.0029 ± 0.0002^c	0.0027 ± 0.0^a	0.0020 ± 0.0001^a
IMI+MEN	0.0030 ± 0.0003^{bc}	0.0028 ± 0.0003^{bc}	0.0025 ± 0.0001^a	0.0017 ± 0.0001^b

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama \pm Standart hata. a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

4.8 Piperonil Bütoksid ve Menadionenin Modülatörlüğünde Imidaclopridin Protein Miktarına Etkisi

Piperonil bütoksid ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin protein miktarına etkisi Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Erkek sıçanlarda 12. saatte IMI+MEN protein miktarının çözücü kontrole, IMI'ye ve MEN'e göre sırasıyla %14, %11 ve %14 oranlarında artmasına neden olmuştur (Şekil 4.7). 24 saat sonunda IMI, PBO, MEN ve IMI+PBO etkisinde çözücü kontrole göre sırasıyla %18, %14, %18 ve %16 oranlarında azalma meydana gelmiştir. IMI+MEN etkisinde IMI'ye ve MEN'e göre %9 oranında artış belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda PBO ve MEN modülatörlüğünde IMI'nin protein miktarına (mg/mL homojenat) etkileri

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

† : IMI grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

ψ: MEN grubuna göre istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P < 0.05$)

ÇİZELGE 4.8 Sprague-Dawley sıçanlarında böbrek dokusunda imidaclopridin piperonil bütoksit ve menadione modülatörlüğünde protein miktarına (mg/mL homojenat) etkileri

	PROTEİN			
	Erkek		Dişi	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Çözücü Kontrol	0.72±0.025 ^{ab}	0.84±0.023 ^a	0.51±0.028	0.67±0.014
IMI	0.74±0.028 ^b	0.69±0.014 ^b	0.54±0.017	0.59±0.053
PBO	0.67±0.019 ^a	0.72±0.017 ^{bc}	0.48±0.020	0.68±0.021
MEN	0.72±0.029 ^{ab}	0.69±0.011 ^b	0.53±0.011	0.64±0.029
IMI+PBO	0.73±0.029 ^{ab}	0.71±0.029 ^{bc}	0.53±0.033	0.63±0.023
IMI+MEN	0.82±0.018 ^c	0.75±0.015 ^{ac}	0.51±0.017	0.61±0.019

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a, b ve c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

5. TARTIŞMA

5.1 Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun etkisinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda IMI, PBO ve MEN'in çözdürüldüğü DMSO yağlar, karbohidratlar, boyalar, reçineler ve polimerlerin çözücü olarak kullanılmasının yanında birçok pestisid formülasyonuna çözücü amaçlı inert madde olarak da katılmaktadır (EPA 2006). Biyolojik sistemlerde 'OH ve hidroperoksil radikali (HOO') oluşturarak protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açan oksidan maddelere karşı DMSO, antioksidan özellik gösteren bir bileşiktir. Bunun yanında, içerdiği sülfidril grubu nedeniyle protein tiyollerin oksidasyonu yoluyla prooksidan özellik de gösterebilmektedir (Sanmartin-Suarez vd. 2011).

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, antioksidan ve prooksidan olarak iki yönlü etkisi bulunan çözücü DMSO'nun eşeye ve süreye bağımlı etkileri olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Erkek sıçanlarda 12. saatte azalan lipid peroksidasyonunun çözücü DMSO'nun antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın aynı sürede dişi sıçanlarda DMSO'nun çalışılan parametrelere herhangi bir etkisi bulunmamıştır.

Erkek Fischer 344 sıçanlarında DMSO'nun *N*-(3,5-dichlorophenyl) succinimide (NDPS) indüklü nefrotoksisiteye karşı koruyucu etki yaptığı bildirilmiştir (Rankin vd. 1995). GST aktivitesinin apoptoz sinyal-düzenleyici kinaz-1 (ASK-1) aktivitesinin azaltılarak hücrenin apoptozdan kurtulmasında önemli olduğu bilinmektedir. Apoptoz indükleyici tiyoasetamid etkisindeki erkek Lewis sıçan ve BALB/C fare hepatosit kültürlerinde DMSO'nun farklı GST izoformlarının ekspresyonunu artırarak ASK-1-bağımlı apoptozun inhibe edilmesini sağladığı belirlenmiştir (Gilot vd. 2002). Çalışmamızda, erkek sıçanlarda 24 saat sonunda yalnızca GST aktivitesindeki artışın olasılıkla DMSO'nun bu etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmekte, *in vivo* gözlenen bu etki ile ilgili daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Rogiers vd. (1990) kültüre alınan sıçan hepatositlerinde belirlenen CYP450 ve GST aktivite azalmasının DMSO eklenmesi ile önlendiğini ve DMSO'nun kültüre alınan hücrelerin stabilizasyonunu sağladığını bildirmişlerdir.

Dişi sıçanlarda 24. saat sonunda azalan tGSH miktarının DMSO'nun tiyol oksidasyonu yoluyla prooksidan özelliğinden kaynaklandığı ve GSH'ı substrat olarak kullanan GPx aktivitesinin bu nedenle azalmış olabileceği düşünülmektedir. DMSO, dişi sıçanların böbreğinde aynı anda TBARS içeriğindeki azalma yoluyla antioksidan özellik de göstermektedir. Oysaki DMSO'nun fare karaciğerinde asetaminofen-indüklü GSH azalmasına karşı koruyucu etki yaptığı buna karşın tek başına GSH miktarı üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (Park vd. 1988). Erkek Sprague-Dawley sıçan beyin homojenatında H₂O₂ ve FeCl₂ ile oluşturulan oksidatif stres modelinde DMSO'nun doza bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve protein karbonil içeriğinde azalma ile belirlenen antioksidan özellik gösterdiği, fakat protein tiyol oksidasyonu yoluyla da prooksidan özellik sergilediği belirlenmiştir (Sanmartin-Suarez vd. 2011).

5.2 Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

Wistar ırkı dişi sıçanlarda oral yolla uygulanan IMI'nin kronik etkisinin, böbrek glomerül ve tübüllerinde dejenerasyonun yanı sıra artan kan üre azotu düzeyleri ile belirlenen nefrotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (Bhardwaj vd. 2010). Çalışmamız, sıçan böbrek dokusunda IMI'nin prooksidatif ve nörotoksik etkilerinin eşey ve süre değişkenlerine bağlı olduğunu gösteren ilk araştırma bulgularını sunması bakımından önemlidir. IMI'nin 12 saat etkisinde her iki eşeyde de herhangi bir değişim belirlenmemiştir. 24. saatte erkek sıçan böbreğinde tGSH miktarı, tChE aktivitesi ile lipid peroksidasyonu artarken protein miktarı azalmıştır. Dişilerde ise yalnızca GST aktivitesinde artış bulunmuştur. IMI'nin sıçan ve farelerde toksik etki mekanizması içerisinde oksidatif stresin yer aldığı daha önceki çalışmalarla kanıtlanmıştır (Duzguner ve Erdogan 2010, Kapoor vd. 2010, El-Gendy vd. 2010).

Böbrek birçok kimyasal için hedef organlardan bir tanesidir. Proksimal tübüler hücrelerin zayıf asidik ya da bazik organik bileşikleri, aminoasit konjugatlarını ve paraquat gibi kuaterner bileşikleri taşıma yeteneği, bu bileşiklerin bu hücrelerde toksik düzeylerde birikimine neden olabilmektedir (Rankin 2005). İnsan Caco-2 hücre hattında IMI'nin fizyolojik sıcaklıkta enerji bağımlı ve protein yapıda bir taşıyıcı ile yüksek

oranlarda hücreye alındığı, pasif süreçlerin de IMI alınımında etkili olduğu ve *P*-glikoprotein ya da çoklu ilaç direnç proteini (MRP) yapısında olmayan bir taşıyıcı ile hücre dışına atıldığı belirlenmiştir (Brunet vd. 2004). Alınımını ve atılımını sağlayan süreçler arasında bir denge bulunmakla birlikte, yüksek absorpsiyon oranları nedeniyle IMI'nin omurgalı hücrelerinde toksik etkilerinin olabileceğinin göz ardı edilmemesi önerilmektedir. Sıçan böbreğinde organik katyon taşıyıcılarının (OCT2) (Slitt vd. 2002) ve BCRP (meme kanseri direnç proteini) (Tanaka vd. 2005) gibi aktif taşımada yer alan proteinlerin erkeklerde daha baskın olduğu ve bunun hormonal etkilerle meydana gelebileceği bildirilmiştir.

Erkek sıçan karaciğerinde CYP3A substratlarının, aktif taşımada yer alan *P*-glikoprotein mRNA düzeylerini dişilere göre daha yüksek oranda artırdığı bulunmuştur (Salphati ve Benet 1998). IMI de büyük ölçüde CYP3A4 ile biyotransformasyona uğramaktadır (Schulz-Jander ve Casida 2002). Bir defada gavaj uygulamasından sonra aç bırakılan erkek Fischer 344 sıçanlarında ochratoxin A'nın maksimum plazma derişimlerine dişilere göre daha kısa sürede ulaştığı belirlenmiştir (Vettorazzi vd. 2010). Çalışmamızda toksisite denemelerinden 24 saat önce beslenme kesilmiş ve bundan sonra besin verilmemiştir. Ksenobiyotiklerin *in vivo* toksisite değerlendirmelerinde ksenobiyotiğin verilme yolunun yanında deney hayvanlarının açlık durumları ile yaş ve eşey farklılıklarının da dikkate alınması gerekliliği önerilmektedir (Vettorazzi vd. 2010).

Sprague-Dawley ırkı sıçanların böbrek dokusunda *i.p.* uygulanan IMI her iki eşeyde de 12. saatte herhangi bir etki göstermezken, IMI'nin prooksidatif etkileri 24. saatte erkek sıçanlarda dişilere oranla daha belirgindir. Sıçanlarda oral ya da intravenöz uygulamadan 24 saat sonra böbreklerden atılımın büyük ölçüde tamamlandığı ve IMI'nin erkeklerde daha etkin şekilde metabolize edildiği bildirilmektedir (EMEA 2009). Benzer şekilde, genç erkek Sprague-Dawley sıçan böbrek ve karaciğer homojenatlarında nikotinin metabolit oluşumunun dişilere göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Kyerematen vd. 1988). Bir protein kinaz inhibitörü olan ML3403 ({4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-(1-phenylethyl)-amine)'ün feniletal halkasının *N*-dealkilasyonundan CYP3A4'ün sorumlu olduğu, Wistar ırkı erkek sıçanlarda tüm metabolitlerin daha hızlı oluştuğu ve özellikle feniletal bileşenin oksidatif uzaklaştırılmasının erkeklerde daha hızlı gerçekleştiği

belirlenmiştir (Kammerer vd. 2007). Bir karsinojen olan clofibratenin Fischer 344 erkek sıçanlarda karaciğer ve böbrekte CYP4A izoformlarının ekspresyon düzeylerini dişilere oranla daha çok artırdığı ve erkek-spesifik ekspresyonun hormonal kontrol altında ve dokuya özgü olduğu bildirilmiştir (Sundseth ve Waxman 1992).

Yüksek dozlarda nikotin enantiyomerlerinin indüklediği oksidatif stresin, olasılıkla CYP450 enzim aktivitelerinde artış yoluyla serbest radikal üretiminden kaynaklandığı belirtilmiştir (Yildiz vd. 1998). Nikotin benzeri bir insektisid olan IMI'nin oksijen gerektiren faz-I metabolizmasında başta CYP3A4 olmak üzere farklı CYP450 izoenzimlerinin yer aldığı bilinen bir olgudur (Schulz-Jander ve Casida 2002). Ksenobiyotiklerin CYP450-aracılıklı metabolizmalarında $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin ardışık olarak oluşabileceği (Cnubben vd. 2001, de Almeida vd. 2007, Valavanidis vd. 2006) ve bu radikallerin Fenton tepkimesi ile lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonuna yol açan $\cdot OH$ gibi daha tehlikeli türlerin oluşumuna neden olabileceği bildirilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999, de Almeida vd. 2007). Çalışmamızda IMI etkisinde CAT aktivitesinin yüksek TBARS düzeyleri ile negatif korelasyon göstermesi, lipid peroksidasyonunun olası H_2O_2 oluşumundan köken aldığını akla getirmektedir. Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir parametredir (Cnubben vd. 2001) ve IMI'nin, böbreği de kapsayan farklı sıçan dokularında peroksidatif etkisinin bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Duzguner ve Erdogan 2010, Kapoor vd. 2010, El-Gendy vd. 2010).

Oral uygulanan IMI'nin 24 saat etkisinden sonra erkek Swiss albino fare karaciğerinde GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (El-Gendy vd. 2010). GST, substratı GSH'ın elektrofilik ksenobiyotikler ile konjugasyonunu katalizleyen enzimdir (Cnubben vd. 2001). Çalışmamızda, IMI'nin prooksidatif etkisi dişilerde, erkeklerde olduğu gibi, 24. saatte gözlenmiştir ve artan GST aktivitesi tGSH miktarı ile koreledir. Herbisid paraquat etkisindeki *O. niloticus* dişilerinde GST aktivitesinin erkeklere göre daha fazla artış gösterdiği saptanmıştır (Figueiredo-Fernandes vd. 2006). Kahverengi Norveç sıçanlarında karaciğerde total GST protein düzeyinin ve bu toplam içerisinde α ve μ izoenzimlerini oluşturan alt ünite 1, 2 ve özellikle 3 ve 4'ün erkeklerde çok daha fazla olduğu bildirilmektedir (Rogiers vd. 1991). Fenobarbital etkisinde alt üniteler 1 ve 2'nin alt ünite 3 ve 4'e oranla daha fazla arttığı da belirlenmiştir. Sıçan böbreğinde karaciğere oranla daha az miktarda olan bu alt ünitelerin, toksisiteye duyarlılıkta organ

farklılıklarını yansıtabileceği bildirilmiştir (Guthenberg vd. 1985). Her ne kadar, IMI'nin faz-1 metabolitlerinin GSH konjugatları şeklinde önemsiz düzeylerde atıldığı bilinse de (WHO 2001), total GST aktivitesinin ölçüldüğü çalışmamızın sonuçlarına göre sıçan böbreğinde hangi GST izoenziminin IMI ile etkileştiğini gösteren çalışmalara gereksinim vardır.

IMI'nin memelilerde toksik DN-IMI'ye dönüşümünü kataliz eden AOX enziminin de ROS üretiminde etkili olduğu bildirilmektedir (Kundu vd. 2012). Dunkin-Hartley Guinea pig (*Cavia porcellus*) karaciğer homojenatında pheanthridinenin AOX-katalizli oksidasyonu sırasında $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluştuğu ve bu oluşumun MEN, chlorpromazine ve scopoletin gibi inhibitörlerle engellendiği bulunmuştur (Al-Omar ve Al-Arifi 2005). 3,39-diaminobenzidine (DAB) içeren ortamda inkübe edilen erkek Wistar sıçan karaciğer ve incebarsak kesitlerinin histokimyasal incelemesinde AOX enziminin $O_2^{\cdot-}$ oluşumuna neden olduğu ve MEN'in ROS oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Kerver vd. 1997). Phtalazine, indol-3 aldehid ve 2-pirimidinon gibi substratların varlığında AOX-bağımlı H_2O_2 oluşumunun MEN ve β -estradiol varlığında yüksek oranlarda inhibe olduğu saptanmıştır (Al-Omar vd. 2005). Sprague-Dawley sıçan karaciğer homojenatında Fe^{2+} -indüklü lipid peroksidasyonunun dişilere göre erkeklerde daha yüksek olduğu ve progesteron ve testosterona göre lipid peroksidasyonunda belirgin azalmaya neden olan estradiolün AOX inhibisyonu yoluyla etkili olabileceği bildirilmiştir (Huh vd. 1994). Ergin erkek ve dişi C57BL/6J fare karaciğerinde testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlerin AOX aktivitesini artırdığı, estradiolün ise erkeklerde aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir (Ventura ve Dachtler 1981). Bu bilgiler ışığında, AOX-aracılıklı IMI biyotransformasyonunun ROS kaynağı olarak işlev gördüğü ve estradiol gibi eşey hormonlarının AOX inhibisyonu yoluyla IMI'nin eşeye-bağımlı oksidatif toksisitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

IMI etkisinde *C. carpio*'da karaciğer ve beyin dokularında protein karbonilasyonunun ve lipid peroksidasyonunun arttığı ve karaciğer dokusunda protein miktarının azaldığı belirlenmiştir (Serbes 2011). ROS etkisiyle protein karbonilasyonu peptid iskeletinin geri dönüşümsüz hasarına neden olmakta (Franco vd. 2009) ve ılımlı ya da geçici oksidatif stres koşullarında proteazom aktivitesi, dolayısıyla da intraselüler proteoliz artış göstermektedir (Shang ve Taylor 2011). Çalışmamızda, IMI etkisinde

total protein içeriğinde meydana gelen azalmanın bu tip bir yıkıma işaret ettiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, IMI toksisitesi nedeniyle artan enerji gereksinimlerini karşılamak üzere proteinler gibi karbohidrat olmayan glikoz kaynaklarının kullanılmış olabileceği de varsayılmaktadır. Swiss albino fare karaciğerinde karbamatlı carbosulfan etkisinde azalan total protein miktarının karaciğer işlev bozukluğunu ya da artan protein katabolizmasını gösterdiği bildirilmiştir (Ksheerasagar ve Kaliwal 2006). Organofosfatlı monocrotophos etkisindeki Wistar ırkı sıçan beyinde, azalan total protein miktarı ile artan proteaz aktivitesi arasında korelasyon bulunmuş ve azalan protein miktarlarının stres koşullarında artan enerji gereksinimini karşılamaya yönelik fizyolojik bir strateji olabileceği belirtilmiştir (Swamy vd. 1992).

İlımlı oksidatif stres koşullarında GSH sentezindeki artışa bağlı adaptif bir mekanizma olarak GSH miktarında artış meydana gelebilmektedir. Bunun yanında, yoğun oksidatif stres koşullarında GSH düzeyi azalarak adaptif korunma mekanizması kaybedilmektedir (Zhang vd. 2004). IMI etkisinde erkek sıçanlarda 24. saatte belirlenen tGSH miktarındaki artışın, artan H₂O₂ derişimine yanıt olarak arttığı düşünülmektedir. Buna karşın, intravenöz IMI etkisinde Wistar ırkı dişi sıçanlarda karaciğer ve beyin GSH miktarı azalırken, TBARS miktarının arttığı belirlenmiştir (Duzguner ve Erdoğan 2010). Sentetik piretroid cypermethrin ve fenvalerate etkisindeki erkek Wistar sıçan eritrositlerinde CAT aktivitesi ile GSH miktarı ve lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir (Kale vd. 1999).

Imidacloprid ChE enzimlerine etki etmek üzere tasarlanan bir pestisid değildir. Organofosfatlı insektisidlerin AChE aktivitesinin inhibisyonu yoluyla ACh birikimine, ACh birikiminin kolinerjik muskarinik ve nikotinik reseptörlerin aktivasyonlarına ve bu reseptörlerin bir süre sonra desensitizasyonuna neden oldukları bildirilmiştir (Hazarika vd. 2003, Milatovic vd. 2006). IMI'yi ve özellikle DN-IMI'yi de kapsayan (Tomizawa ve Casida 2000) neonikotinoidlerin bu reseptörlerde desensitizasyonu izleyen reseptör sayı artışına neden oldukları bildirilmektedir (Akaike vd. 2010; Le Questel vd. 2011). Erkek Sprague-Dawley sıçan kasında organofosfatlı diisopropylphosphorofluoridate (DFP)'nin indüklediği *in vivo* ROS ve ardışık lipid peroksidasyonu artışının, nAChR antagonisti *d*-tubocurarine ile önlediği belirlenmiştir (Yang vd. 1996). Nikotini de kapsayan bir takım toksinlerin hedefi olan nAChRlerinin kas, akciğer (Gotti ve

Clementi 2004) ve böbrek (Yeboah vd. 2008) gibi dokularda bulunduğu ve yüksek ROS derişimlerinin etkisinde lipid peroksidasyonu ya da protein ve DNA oksidasyonu yoluyla bu reseptörlerin yapısının ve ekspresyonlarının etkilendiği belirtilmiştir (Guan 2008). Böbreklerde yoğun bulunan α_7 nAChRlerinin Ca^{2+} ’a yüksek derecede permeabl olduğu ve nörotransmitter salınımı gibi Ca^{2+} -bağımlı olaylarda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Oshikawa vd. 2003). Neonikotinoid insektisidler acetamiprid ve IMI’nin Sprague-Dawley sıçan serebellar hücre kültüründe α_7 nAChRleri aracılığıyla hücreye Ca^{2+} alınımını indüklediği ve α_7 nAChRlerine spesifik antagonist α -bungarotoksin ile bu etkinin giderildiği belirlenmiştir (Kimura-Kuroda vd. 2012). İntraselüler Ca^{2+} , ROS derişiminde artışa neden olmakta ve antioksidantlar ile Ca^{2+} kanal bloke edici bileşikler, yüksek Ca^{2+} derişiminin neden olduğu sitotoksisitenin azalmasını sağlamaktadır (Bondy ve LeBel 1993, Milatovic vd. 2006). Aminoasit sekansı nörotoksik β -amiloid peptidine yakın olan ve AChE’nin C-terminalinde yer alan peptidin Wistar sıçan hippocampal hücre kültüründe α_7 nAChR-aracılıklı Ca^{2+} alınımına bağlı olarak oksidatif stres indüksiyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu belirtilmektedir (Day ve Greenfield 2003). İntravenöz IMI etkisindeki dişi Wistar sıçanlarda karaciğer ve beyinde ROS kaynağı prooksidant enzimler olan ksantin oksidaz ve myeloperoksidaz aktivitelerindeki ve beyinde nitrik oksit miktarındaki artışın yüksek plazma Ca^{2+} derişimine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Duzguner ve Erdogan 2010).

Oksidant *t*-bütilhidroperoksitin indüklediği oksidatif strese yanıt olarak sıçan astroglial hücrelerinde intraselüler AChE aktivitesi yanında, AChE salınımının arttığı da bildirilmiştir (Bond vd. 2006). Çalışmamızda IMI etkisinde 24. saatte ve yalnızca erkek bireylerde tChE aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu artışın, IMI’nin etkisiyle ACh- ve Ca^{2+} -aracılıklı oksidatif stresten korunmak üzere adaptif bir yanıt olduğu düşünölmektedir. IMI’nin ACh olmadan memeli nAChRlerine bağlanamadığı (Matsuda vd. 2005), ACh bağlanması reseptörde olasılıkla konformasyonel değişime yol açması nedeniyle memeli reseptörlerinde etki meydana geldiği bildirilmiştir (Kimura-Kuroda vd. 2012). IMI verilen Sprague-Dawley sıçan yavrularında gözlenen AChE aktivite artışının hücre içine Ca^{2+} alınımı ile indüklenen apoptotik olaylar nedeniyle meydana gelebileceği bildirilmiştir (Abu-Donia vd. 2008). ACh miktarında azalma sağlayan AChE aktivitesindeki artışın nAChR işlev kaybı sonucu nörodejenerasyona işaret ettiği de belirtilmektedir. Neonikotinoid insektisid thiaclopridin tek ve IMI ile

birlikte uygulamasında midye *Mytilus galloprovincialis* solungaç dokusunda AChE aktivitesinin arttığı, IMI etkisinde ise azaldığı bulunmuştur (Dondero vd. 2010). Neonikotinoidlerin AChE enzimine etkisinin türlere bağlı olabileceği belirtilmektedir.

5.2.1 Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik potansiyeline PBO'nun etkileri

Sitokrom P450-aracılıklı metabolizmanın, IMI toksisitesine etkisinin belirlenmesinde PBO gibi sinerjistlerin kullanılması yararlıdır (Schulz-Jander ve Casida 2002). PBO'yu da kapsayan metilendioksifenil bileşikleri memelilerde bifazik etki göstermektedir. Başlangıçta, PBO metaboliti-CYP450 kompleksi oluşumu aracılığıyla CYP450-aracılıklı biyotransformasyon inhibe olurken, daha sonraları CYP450 protein miktarının yanında aktivitede artış meydana gelebilmektedir (Adams vd. 1993). PBO'nun erkek Fischer 344 sıçanları ve CD-1 farelerinde CYP450 protein miktarını artırdığı ve CD-1 farelerinde CYP3A aktivitesini indüklediği belirlenmiştir (Phillips vd. 1997).

Piperonil bütoksidin subakut etkisindeki erkek Fischer 344 sıçanlarında, böbrek ağırlığı ve serum üre azot düzeylerindeki artış ve histopatolojik değişimler ile ölçülen nefrotoksite belirlenmiştir (Fujitani vd. 1992 ve 1993). Çalışmamızda, PBO etkisinde erkek sıçanlarda tGSH miktarı ve CAT aktivitesi ile lipid peroksidasyonu artmış, protein düzeyleri azalmıştır. PBO'nun farelerde aril hidrokarbon reseptör aktivasyonuna bağımlı ya da bağımsız süreçlerle CYP450 indüksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Adams vd. 1993; Ryu vd. 1997). CYP450 indüksiyonunun ve aril hidrokarbon reseptör aktivasyonunun başta $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 olmak üzere ROS birikimine neden olduğu bilinmektedir (Dalton vd. 2002; de Almeida vd. 2007). Sprague-Dawley sıçan karaciğer ve plazmasında CYP450 indükleyicisi fenobarbital etkisinde artan, ROS oluşumunu gösteren, F2-isoprostan miktarının spesifik CYP450 inhibitörü 1-aminobenzotriazole ile kombine etkisinde azaldığı belirlenmiştir (Dostalek vd. 2007).

Imidacloprid ve PBO'nun ayrı uygulamalarında artan lipid peroksidasyonu, birlikte uygulamada kontrol seviyelerine gerilemiştir ve PBO ön uygulaması, IMI etkisinde her iki uygulama süresinde de tChE aktivitesinde artışa neden olmuştur. Erkek Fischer 344 sıçanlarında 3,5-dikloroanilin hepatic ve renal toksisitesinin PBO ön

uygulamasını ile arttığı ve toksisitenin olasılıkla ya ana bileşikten kaynaklandığı ya da CYP450-aracılıklı metabolizmanın baskılanması nedeniyle diğer metabolik süreçlerde açığa çıkan metabolitler nedeniyle oluştuğu bildirilmiştir (Valentovic vd. 1995). Çalışmamızda, PBO ön uygulamasının kendisi de ROS kaynağı olan AOX-aracılıklı tepkimelerde üretilen metabolit miktarında artışa neden olduğu düşünülmektedir. Artan tChE aktivitesi nedeniyle IMI'nin nAChRlerine bağlanmasında etkili olan ACh miktarındaki azalma yoluyla lipid peroksidasyonunun azaldığı önerilmektedir. Erkek Sprague-Dawley sıçan kasında organofosfatlı DFP'nin ACh birikimi yoluyla indüklediği *in vivo* ROS ve ardışık lipid peroksidasyonu artışının nAChR antagonisti *d*-tubocurarine ile önlendiği belirlenmiştir (Yang vd. 1996). Çalışmamızda lipid peroksidasyonundaki azalma, artan tChE aktivitesinin yanında PBO ön uygulaması nedeniyle artan CAT aktivitesine de bağlı olabilir.

Baliga vd. (1996) domuz böbrek proksimal tübül hücre kültüründe (LLC-PK1) H₂O₂-indüklü sitotoksositeye karşı PBO'nun, 'OH ya da H₂O₂ ile etkileşme ya da demirin azaltılmasından başka bir yol ile koruyucu etki yaptığını belirlemişlerdir. Cisplatin etkisindeki erkek Sprague-Dawley sıçanlarında böbrekte bleomisin ile ölçülen demir miktarındaki artış ve CYP450 proteini miktarındaki azalmanın PBO varlığında kontrol düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir (Baliga vd. 1998). Aynı çalışmada cisplatin etkisindeki LLC-PK1 hücrelerinde de PBO aynı etkilere neden olmaktadır. Buna göre PBO'nun CYP450 enziminin aktif merkezindeki hem gruplarına bağlanıp buradan katalitik demir salınımını engelleyerek oksidatif etkilerin azalmasını sağladığı belirtilmektedir.

O. niloticus'da sentetik piretroid lambda-cyhalothrin ve PBO'nun ayrı uygulamalarında artan GST aktivitesine birlikte uygulamanın herhangi bir etkisi bulunmazken, ayrı uygulamalarda artan lipid peroksidasyonunda azalma meydana gelmiştir (Piner ve Üner 2012). Çalışmamızda, dişi sıçanlarda PBO GST aktivitesinin yanında lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olmuştur. PBO ve IMI'nin birlikte etkisinde GST aktivitesi artarken, lipid peroksidasyonu kontrol düzeyindedir. PBO etkisiyle CYP450 dışındaki metabolik süreçlerde açığa çıkan metabolitlerin GSH ile konjugasyonunu sağlamak üzere GST aktivitesi artmış olabilir. Juvenil isopod *Porcellio scaber*'de IMI etkisinde GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Drobne vd. 2008). Endojen ve eksojen elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen GST

aktivitesindeki artışın IMI detoksifikasyonu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek üzere ileri çalışmaların gerekli olduğu bildirilmektedir.

5.2.2 Imidaclopridin eşeye-bağımlı prooksidatif ve nörotoksik potansiyeline MEN'in etkileri

Çalışmamızda MEN, erkek sıçanlarda ve 24. saatte tGSH miktarı ile CAT aktivitesinin artmasına, protein miktarının azalmasına neden olmuştur. MEN'in O_2^- ve H_2O_2 oluşumu yoluyla oksidatif etki gösterdiği bilinmektedir (Abe ve Saito 1996). Wistar sıçan kortikal astrosit kültüründe MEN toksisitesinin doza- ve süreye-bağımlı olduğu ve SOD, CAT gibi antioksidant enzimlerin yanında demir şelatlaştırıcılar ile toksisitenin azaldığı bulunmuştur (Abe ve Saito 1996). Erkek Fischer sıçanlarında MEN etkisinde karaciğerden safraya tGSH ve GSSG atılımının hızlandığı ve plazma tGSH ve GSSG miktarının arttığı belirlenmiştir (Hong vd. 2009). İzole sıçan hepatositlerinin MEN ile inkübasyonu doza-bağımlı GSH azalması ile GSSG ve protein tiyol-GSH disülfid miktarında artışa neden olmaktadır (Bellomo vd. 1987). Erkek Fischer 344 sıçan böbrek proksimal tübül hücrelerinde eksojen olarak verilen oksidant *t*-butil hidroperoksin intraselüler GSH'ın GSSG'ye oksidasyonuna neden olduğu ve ekstrasellüler GSSG'nin de hücre içine taşındığı bulunmuştur (Visarius vd. 1996). Hücre içine alınan GSSG'nin GSH'a redüklenmediği ve oksidatif koşullar altında hücrelerin GSSG redüksiyonundan çok GSH'ı dışarıdan alarak korunma sağladığı belirtilmiştir. Organofosfatlı fenthion ve GSH sentez inhibitörü bütinyonin sülfoksimin etkisindeki *O. niloticus*'da böbrekte tGSH ve GSH ile GSSG'nin GSH'a dönüşümünü kataliz eden GR aktivite artışı nedeniyle plazma kaynaklı GSSG'nin GSH kaynağı olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (Sevgiler ve Üner 2010). MEN'in sıgır pulmoner arter endotel hücre kültüründe GSH miktarını azaltıp MEN-GSH konjugat miktarını ve H_2O_2 oluşumunu artırdığı belirlenmiştir (Chang vd. 1992). Eksojen GSH varlığında GSH'ın hücre içine alınmasını sağlayan γ -GT enziminin etkisiyle hücre içi GSH üretiminin arttığı ve MEN-indüklü ATP kaybının önlendiği de bildirilmiştir. Erkek Sprague-Dawley izole proksimal tübül hücre kültüründe eksojen GSH ve GSSG'nin hücre içine taşındığı ve *t*-bütil hidroperoksin neden olduğu hücre ölümüne karşı koruma sağladıkları belirlenmiştir (Hagen vd. 1988). Buna göre, *in vivo* MEN

etkisindeki erkek Sprague-Dawley sıçanlarda böbrekte MEN-indüklü H₂O₂ üretimine yanıt olarak tGSH miktarı ile CAT aktivitesinin arttığı ve tGSH artışının plazmadan tGSH ve GSSG alınımına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, dişilerde MEN etkisinde 12. saatte tChE aktivitesi azalırken, 24. saatte GST aktivitesi artmıştır. İnsan serumunda ChE aktivitesinin ve eritrositlerinde ACh sentezinin son basamağını kataliz eden kolin asetilaz aktivitesinin MEN etkisinde azaldığı bildirilmiştir (Vorhaus 1952, Taylor vd. 1952). Torda ve Wolff (1944) MEN'in zayıf ChE inhibitörü olduğunu, fakat ACh sentezinin MEN etkisinde baskılandığını belirlemişler ve MEN'in bu etkisinin oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve tiyol grupları ile tepkime verebilme yeteneğine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Diş Sprague-Dawley sıçan trombositlerinde MEN'in hücrel tiyol miktarını azaltarak LDH salınımı ile ölçülen hasara neden olduğu, ekstraselüler tiyol desteğinde hücrel hasarın ortadan kalktığı belirlenmiştir (Cho vd. 1997). Erkek Wistar sıçanlarda karaciğerde MEN etkisinde GST aktivitesi uzun sürede artmaktadır (Sidorova ve Grishanova 2004). Sıçan proksimal tübüler ve epitelyal hücrelerinde MEN'in *N*-asetil sistein konjugatı (merkaptürik asit formu), GSH konjugatına göre belirgin derecede daha toksiktir ve merkaptürik asit formu redoks aktif özelliğini korumaktadır (Lau vd. 1990, Brown vd. 1991). Ayrıca, GR aktivitesinin inhibisyonunun, merkaptürik asit formunun toksisitesini artırdığı ve GSH konjugasyonunun, kinon çekirdeğinin redoks aktif özelliğinin azaltılmasıyla etkili olduğu düşünülmektedir (Brown vd. 1991). MEN'e dirençli insan K300 hücrelerinde MEN-indüklü oksidatif toksisiteye direncin, MEN toksisitesinden korunmada önemli olan GSH miktarını sürdürmek üzere GST'nin adaptif azalması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Chiou ve Tzeng 2000). Buna karşın, Vallis ve Wolf (1996) *Cricetulus griseus* (Çin hamsteri) ovaryum hücrelerinde MEN'in oksidatif toksisitesine direncin GST ve GPx aktivitelerindeki artışla ilgili olduğunu belirtmiştir. Buna göre, dişilerde plazma kaynaklı, MEN'in merkaptürik asit formlarının neden olduğu toksisiteden korunmak üzere GST-aracılıklı GSH konjugasyonunun önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Aldehid oksidaz ve substratı *N*-metil nikotinamid varlığında IMI'nin fare fibroblast M10 hücrelerinden elde edilen α 4 β 2 nAChRlerine etkinliğinin arttığı ve AOX tepkimesinin MEN varlığında azaldığı bildirilmiştir (Honda vd. 2006). Erkek Sprague-Dawley sıçan ve balık *Pagrus major* karaciğerinde organofosfatlı fenthionun metaboliti

fenthion sülfoksidin, fenthiona indirgenmesinin AOX enzimi tarafından katalizlendiği ve bu dönüşümün MEN ve estradiol gibi bileşiklerle baskılandığı belirlenmiştir (Kitamura vd. 2003). Erkek Wistar sıçan beyin homojenatı mitokondriyal fraksiyonunda, kompleks I inhibisyonu yoluyla $O_2^{\cdot-}$ oluşumu ve dolayısıyla membran bütünlüğünü bozan pestisid rotenonun bu etkisinin, düşük doz nikotin ile azaltıldığı bildirilmiştir (Cormier vd. 2003). Çalışmamızda, kendisi de ROS kaynağı olan AOX-katalizli DN-IMI oluşumunun (Kundu vd. 2012), MEN tarafından azaltılmasıyla hem MEN hem de IMI-indüklü oksidatif etkilerin hafiflediği önerilmektedir. IMI etkisinde MEN ön uygulaması, erkek sıçanlarda 24. saatte IMI ve MEN'in neden olduğu tGSH ve protein miktarları ile lipid peroksidasyonundaki değişimlerin düzelmesine, GPx aktivitesinin azalmasına neden olmakla birlikte, CAT ve ChE aktivitelerindeki artışa herhangi bir etki yapmamaktadır. H_2O_2 ve serbest radikal oluşumunu sağlayan β -amiloid peptid etkisinde sıçan PC-12 hücrelerinde artan lipid peroksidasyonunda ve hücre ölümlerinde düşük doz nikotin ile iyileşmeler olduğu; aksine, yüksek doz nikotinin bu kimyasalların etkisini kuvvetlendirmenin yanında, kendisinin de benzer toksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Guan vd. 2003).

Dişilerde 24. saatte IMI, MEN'in neden olduğu GST aktivasyonunu etkilemezken lipid peroksidasyonunda artışa neden olmaktadır. MEN etkisinde CYP1A2 aktivitesinin arttığı (Sidorova vd. 2005) ve bu enzimin IMI'nin nitroimin grubunun redüksiyonunda da etkili olduğu (Schulz-Jander ve Casida 2002) bilinmektedir. İnsan HEPG2 hepatoma hücre kültüründe organofosfatlı metil-parathion ve paraokson etkisiyle artan aldo-keto redüktaz aktivitesinin, DNA'ya hasar veren benzo(a)piren *o*-kinon türevlerinin ve ROS üretiminin artmasına neden olduğu ve böylece genotoksik etkinin arttığı önerilmektedir (Hreljac ve Filipic 2009).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Sıçan böbrek dokusunda IMI'nin prooksidatif ve nörotoksik etkilerinin eşey ve süre değişkenlerine bağlı olduğunu gösteren ilk araştırma bulguları elde edilmiştir.
2. Imidacloprid metabolizmasında yer alan ve ROS kaynağı olan AOX-aracılıklı tepkimelere eşey hormonlarının etkisinin, IMI'nin eşeye-bağımlı oksidatif toksisitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, eşey hormonlarının IMI toksisitesine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalara gereksinim vardır.
3. IMI etkisinde erkeklerde artan tChE aktivitesinin asetilkolin- ve Ca^{2+} -aracılıklı oksidatif stresten korunmak üzere adaptif bir yanıt olduğu düşünülmektedir.
4. Erkek sıçanlarda artan CAT aktivitesinin yanında, olasılıkla PBO'nun CYP450'nin hem grubundaki demiri koruma etkisi ile lipid peroksidasyonu azalmaktadır. Dişilerde IMI'nin indüklediği GST aktivitesinin PBO etkisi ile kuvvetlenmesi nedeniyle, IMI ve CYP450 dışındaki süreçlerde açığa çıkan metabolitlerin detoksifikasyonunda GST'nin ilişkisi araştırılmalıdır.
5. Erkek sıçanlarda MEN-indüklü H_2O_2 üretimine yanıt olarak tGSH miktarı ile CAT aktivitesi artmaktadır ve plazma tGSH ve GSSG'si böbrekte GSH kaynağı olarak kullanılabilir.
6. Kendisi de ROS kaynağı olan AOX-katalizli tepkimelerde MEN etkisiyle düşük miktarlarda açığa çıkan IMI metabolitleri nedeniyle, hem MEN hem de IMI-indüklü oksidatif etkilerin azaldığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak,

1. Dünya çapında yoğun kullanım alanı bulan IMI'nin toksisite değerlendirmelerinde süre ve eşey bağımlılığı dikkate alınmalıdır.
2. IMI'in oksidatif toksisitesine yanıt olarak arttığını düşündüğümüz tChE aktivitesini bu yönüyle değerlendirmek üzere IMI etkisinde ChE inhibitörleri vererek yeni çalışmalar planlamaktayız.
3. Bulgular ülkemizde ve yurt dışında çevre koruma çalışmalarının kirlilik izleme programlarında ve ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*; 10, 6, 141-147.
- Abe K., Saito H. 1996. Menadione toxicity in cultured rat cortical astrocytes. *The Japanese Journal of Pharmacology*; 72, 299-306.
- Abou-Donia M.B., Goldstein L.B., Bullman S., Tu T., Khan W.A., Dechkovskaia A.M., Abdel-Rahman A.A. 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following *in utero* exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*; 71A, 119-130.
- Adams N.H., Levi P.E., Hodgson E. 1993. Regulation of cytochrome p-450 isozymes by methylenedioxyphenyl compounds. *Chem.-Biol. Znteractions*, 86, 255 – 274.
- Adam-Vizi V., Starkov A.A. 2011. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *Journal of Alzheimer's Disease*; 20, 2, 413-426.
- Akaike A., Takada-Takori Y., Kume T., Izumi Y. 2010. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of $\alpha 4$ and $\alpha 7$ receptors in neuroprotection. *Journal of Molecular Neuroscience*; 40, 211-216.
- Akerman G., Amcoff P., Tjarnlund U., Fogelberg K., Torrissen O., Balk L. 2003. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. *Chemico-Biological Interactions*; 142, 269-283.
- Al-Omar M.A., Al-Arifi M.N. 2005. Comparative effects of scopoletin and menadione on aldehyde oxidase activity of guinea pig liver. 2005. *Journal of Biological sciences*; 5, 4, 525-531.
- Al-Omar M.A., Beedham C., Belal F., Smith J.A., El-Emam A.A. 2005. Fluorimetric measurement of hydrogen peroxidase produced during aldehyde oxidase catalysed oxidation using scopoletin. *Journal of Medical Sciences*; 5, 1, 10-20.
- Anderson M.E. 1985. Determination of glutathione and glutathione biological samples. *Methods in Enzymology*; 113, 548-555.
- Aoyama, K., Watabe, M., Nakaki T. 2008. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences*; 108, 227-238.

- Astiz M., de Alaniz M.J.T., Marra C.A. 2009. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 28, 465-473.
- Aydin B. 2011. Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 100, 165-171.
- Ayed-Boussema I., Rjiba K., Moussa A., Mnasri No., Bacha H. 2011. Genotoxicity associated with oxidative damage in the liver and kidney of mice exposed to dimethoate subchronic intoxication. *Environmental Science and Pollution Research*; 19, 2, 458-466.
- Baliga R., Zhang Z., Shah S.V. 1996. Role of cytochrome P-450 in hydrogen peroxide-induced cytotoxicity to LLC-PK1 cells. *Kidney International*; 50, 1118-1124.
- Baliga R., Zhang Z., Baliga M., Ueda N., Shah S.V. 1998. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney International*; 54, 1562-1569.
- Bellomo G., Mirabelli F., DiMonte D., Richelmi P., Thor H., Orrenius C., Orrenius S. 1987. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone). *Biochemical Pharmacology*; 36, 8, 1313-1320.
- Beutler E. 1984. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 2nd Ed. Grune and Starton, New York, 160s.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S., Andersen J.K. 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*; 64, 1037-1048.
- Bhardwaj S., Srivastava M.K., Kapoor U., Srivastava L.P. 2010. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food and Chemical Toxicology*; 48, 1185-1190.
- Bingham G., Strode C., Tran L., Khoa P.T., Jamet H.P. 2011. Can piperonyl butoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*? *Tropical Medicine and International Health*; 16, 4, 492-500.
- Bond C.E., Patel P., Crouch L., Tetlow N., Day T., Abu-Hayyeh S., Williamson C., Greenfield S.A. 2006. Astroglia up-regulate transcription and secretion of

- ‘readthrough’ acetylcholinesterase following oxidative stress. *European Journal of Neuroscience*; 24, 381-386.
- Bondy S.C., LeBel C.P. 1993. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radical Biology & Medicine*; 14, 633-642.
- Brown PC, Dulik DM, Jones TW. 1991. The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) and two thioether conjugates studied with isolated renal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*; 285, 1, 187-196.
- Broznic, D., Marinic, J., Tota, M., Juresic, G.C., Milin, C. 2008. Kinetic evaluation of imidacloprid degradation in mice organs treated with olive oil polyphenols extract. *Croatica Chemica Acta*; 81, 203-209.
- Brunet J.L., Maresca M., Fantini J., Belzunces L.P. 2004. Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 194, 1-9.
- 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.
- Capowiez Y., Rault M., Mazzia C., Belzunces L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia*; 47, 542-547.
- Chang M., Shi M., Forman H.J. 1992. Exogenous glutathione protects endothelial cells from menadione toxicity. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*; 262, 5, 637-643.
- Cheung C.C.C., Siu W.H.L, Richardson B.J., De Luca-Abbott S.B., Lam P.K.S. 2004. Antioxidant responses to benzo[*a*]pyrene and Aroclor1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environmental Pollution*; 128, 393-403.
- Chiou T.J., Tzeng W.F. 2000. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology*; 154, 75-84.
- Cho Y.S., Kim M.J., Lee J.Y., Chung J.H. 1997. The role of thiols in protecting against simultaneous toxicity of menadione to platelet plasma and intracellular membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 280, 3, 1335-1340.

- Chung J.H., Seo D.C., Chung S.H., Lee J.Y., Seung S.A. 1997. Metabolism and cytotoxicity of menadione and its metabolite in rat platelets. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 142, 378-385.
- Cnubben N.H.P., Rietjens I.M.C.M., Wortelboer H., Zanden J.V., Bladeren P.J.V. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 10, 141-152.
- Cormier A., Morin C., Zini R., Tillement J.P., Lagrue G. 2003. Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharmacology*; 44, 642-652.
- Costa C., Silvari V., Melchini A., Catania S., Heffron J.J., Trovato A., De Pasquale R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research*; 672, 40-44.
- Cui D., Rankin G., Harvison P.J. 2005. Transamination in the metabolism of the nephrotoxicant *n*-(3,5-dichlorophenyl)succinimide in rats. *Drug Metabolism and Disposition*; 33, 12, 1765-1770.
- D'Amour K.A., Casida J.E. 1999. Desnitroimidacloprid and nicotine binding site in rat recombinant $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 64, 55-61.
- Dalton T.P., Puga A., Shertzer H.G. 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chemico-Biological Interactions*; 141, 77-95.
- David D., George I.A., Peter J.V. 2007. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: Imidacloprid poisoning in a human. *Clinical Toxicology*; 45, 485-486.
- Day T., Greenfield S.A. 2003. A peptide derived from acetylcholinesterase induces neuronal cell death: characterisation of possible mechanisms. *Experimental Brain Research*; 153, 334-342.
- de Almeida E.A., Bainy A.C.D., de Melo Loureiro A.P., Martinez G.R., Miyato S., Onuki J., Barbosa L.F., Garcia C.C.M., Prado F.M., Ronsein G.E., Sigolo C.A., Brochini C.B., Matrins A.M.G., de Medeiros M.H.G., Di Mascio P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 146A, 588-600.

- Dick R.A., Kanne D.B., Casida J.E. 2005. Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chemical Research in Toxicology*; 18, 317-323.
- Djordjevic V.B. 2004. Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*; 237, 57-89.
- Dondero F., Negri A., Boatti L., Marsano F., Mignone F., Viarengo A. 2010. Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *The Science of the Total Environment*; 408, 18, 3775-3786.
- Dostalek M., Brooks J.D., Hardy K.D., Milne G.L., Moore M.M., Sharma S., Morrow J.D, Guengerich F.P. 2007. In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome P450 inducers. *Molecular Pharmacology*; 72, 6, 1419-1424.
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*; 62, 649-671.
- Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*; 267, 4912-4916.
- Drobne D., Blazic M., Van Gestel C.A.M., Leser V., Zidar P., Jemec A., Trebse P. 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*; 71, 1326-1334.
- Duzguner V., Erdogan S. 2010. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 97, 1, 13-18.
- El-Damerdash F.M. 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*; 49, 1346-1352.
- El-Gendy K.S., Aly N.M., Mahmoud F.H., Kenawy A., El-Sebae A.H. 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*; 48, 215-221.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*; 7, 88-95.

- EMA 2009. European Medicines Agency, Scientific Discussion, CVMP/0297/03, 61 sayfa, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000076/WC500060915.pdf
- EPA, 2006. Inert Reassessments: One exemption from the requirement of a tolerance for dimethyl sulfoxide (CAS Reg. No. 67-68-5). United States Environmental Protection Agency, Washington, 19 sayfa.
- EPA, 2008. Imidacloprid Summary Document Registration Review: Initial Docket December 2008. EPA-HQ-OPP-2008-0844, www.regulations.gov
- Espinoza S.E., Guo H., Fedarko N., DeZern A., Fried L.P., Xue Q, Leng S., Beamer B., Walston J.D. 2008. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *Journal of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences*; 63, 5, 505-509.
- Feng S., Kong Z., Wang X., Peng P., Zeng E.Y. 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 61, 239-246.
- Fetoui H., Makni M., Garoui M., Zeghal N. 2010. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*; 62, 593-599.
- Figueiredo-Fernandes A., Fontainhas-Fernandes A., Peixoto F., Rocha E., Henriques M.A.R. 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 85, 97-103.
- Franco R., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 674, 3-22.
- Fujitani T., Ando H., Fujitani K, Ikeda T., Kojima A., Kubo Y., Ogata A., Oishi S., Takahashi H., Takahashi O., Yoneyama M. 1992. Sub-acute toxicity of piperonyl butoxide in F344 rats. *Toxicology*; 72, 291-298.
- Fujitani T., Tada Y., Yoneyama M. 1993. Hepatotoxicity of piperonyl butoxide in male F344 rats. *Toxicology*; 84, 171-183.

- Ghanayem B.I., Hoffler U. 2007. Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using *cyp2e1*^{-/-} mice. *Current Drug Metabolism*; 8, 7, 728-749.
- Gilot D., Loyer P., Corlu A., Glaise D., Lagadic-Gossmann D., Atfi A., Morel F., Ichijo H., Guguen-Guillouzo C. 2002. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione *S*-transferase regulation. *The Journal of Biological Chemistry*; 277, 51, 49220-49229.
- Gotti C., Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*; 74, 363-396.
- Guan Z.Z., Yu W.F., Nordberg A. 2003. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry International*; 43, 243-249.
- Guan Z.Z. 2008. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*; 29, 7, 773-780.
- Guthenberg C., Jansson H., Nyström L., Österlund E., Tahir M.K., Mannervik B. 1985. Isoenzymes of glutathione transferase in rat kidney cytosol. *Biochemical Journal*; 230, 609-615
- 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.
- Hagen T.M., Aw T.Y., Jones D.P. 1988. Glutathione uptakes and protection against oxidative injury in isolated kidney cells. *Kidney International*; 34, 74-81.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edition. Clarendon Press, Oxford and New York, 936 sayfa.
- Hazarika A., Sarkar S.N., Hajara 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.
- Honda H., Tomizawa M., Casida J.E. 2006. Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and -aldehyde oxidase systems. *Toxicology Letters*; 161, 108-114.

- Hong J.Y., Lebofsky M., Farhood A., Jaeschke H. 2009. Oxidant stress-induced liver injury *in vivo*: role of apoptosis, oncotic necrosis, and c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*; 296, 572-581.
- Hreljac I., Filipic M. 2009. Organophosphorus pesticides enhance the genotoxicity of benzo(a)pyrene by modulating its metabolism. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 671, 84-92.
- http://www.gkgm.gov.tr/birim/bitki_koruma_ur_alet/faaliyet/2011_yili_istatistiki_bilgiler_formu.rar
- http://www.gkgm.gov.tr/birim/bitki_koruma_ur_alet/faaliyet/yasaklanan_bku_aktif_maddeleri_listesi.zip
- <http://www.tab.org.tr/korgem-2790.pdf>
- Huh K., Shin U.S. Choi J.W., Lee S.I. 1994. Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Archives of Pharmacal Research*; 17, 2, 109-114.
- Isaev N.K., Stelmashook E.V., Ruscher K., Andreeva N.A., Zorov D.B. 2004. Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons. *Membrane and Cellular Biophysics and Biochemistry*; 15, 14, 2227-2231.
- Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D. 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters* 105, 197-205.
- Kammerer B., Scheible H., Albrecht W., Gleiter C.H., Laufer S. 2007. Pharmacokinetics of ML3403 ({4-[5-(4-fluorophenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-(1-phenylethyl)-amine), a 4-Pyridinylimidazole-type p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*; 35, 6, 875-883.
- Kapoor U., Srivastava M.K., Bhardwaj S., Srivastava L.P. 2010. Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes lipid peroxidation in female rats to derive its No Observed Effect Level (NOEL). *The Journal of Toxicological Sciences*; 35, 4, 577-581.

- Kapoor U., Srivastava M.K., Srivastava L.P. 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology*; 49, 3086-3089.
- Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abroma K.H., Levin E.D. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*; 106, 7, 375-384.
- Kerver E.D., Vogels I.M.C., Bosch K.S., Vreeling-Sindelarova H., Van Den Munckhof R.J.M., Frederiks W.M. 1997. *In situ* detection of spontaneous superoxide anion and singlet oxygen production by mitochondria in rat liver and small intestine. *Histochemical Journal*; 29, 229-237.
- Kitamura-Kuroda J., Komuta Y., Kuroda Y., Hayashi M, Kawano H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *Plos One*; 7, 2, e32432.
- Kocaman A.Y., Topaktaş M. 2007. *In vitro* evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 48, 483-490.
- Ksheerasagar R.L., Kaliwa B.B. 2006. Histological and biochemical changes in the liver of albino mice on exposure to insecticide, carbosulfan. *Caspian Journal of Environmental Sciences*; 4, 1, 67-70.
- Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. 2009. The glutathione system. II. Other enzymes, thiol–disulfide metabolism, inflammation, and immunity, functions. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*; 3, 3, 211- 220.
- Kundu T.K., Velayutham M., Zweier J.L. 2012. Aldehyde oxidase functions as a superoxide generating NADH oxidase: an important redox regulated pathway of cellular oxygen radical formation. *Biochemistry*; 51, 3, 2930-2939.
- Kyerematen G.A., Owens G.F., Chattopadhyay B., de Bethizy J.D., Vesell E.S. 1988. Sexual dimorphism of nicotine metabolism and distribution in the rat, studies in vivo and in vitro. *Drug metabolism and disposition*; 16, 6, 823-828.
- Lau S.S., Jones T.W., Hight R.J., Hill B.A., Monks T.J. 1990. Differences in the localization and extent of the renal proximal tubular necrosis caused by mercapturic acid and glutathione conjugates of 1,4-naphthoquinone and menadione. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 104, 2, 334-350.

- Le Questel J.-Y., Graton J., Ceron-Carrasco J.P., Jacquemin D., Planchat A., Thany S.H. 2011. New insights on the molecular features and electrophysiological properties of dinotefuran, imidacloprid and acetamiprid neonicotinoid insecticides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 19, 24, 7623-7634.
- Liu, G.-Y., Ju, X.-L., Cheng, J. 2010. Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modelling. *Journal of Molecular Modelling*; 16, 993-1002.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*; 193, 265-275.
- Maris A.F., Franco J.L., Mitozo P.A., Paviani G., Borowski C., Trevisan R., Uliano-Silva M., Farina M., Dafre A.L. 2010. Gender effects of acute malathion or zinc exposure on the antioxidant response of rat hippocampus and cerebral cortex. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*; 107, 965-970.
- Matsuda K., Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M., Sattelle D.B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*; 22, 11, 573-580.
- Matsuda K., Shimomura M., Ihara M., Akamatsu M., Sattelle D.B. 2005. Neonicotinoids show selective and diverse on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology and receptor modelling studies. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 69, 8, 1442-1452.
- Matsuda K., Kanaoka S., Akamatsu M., Sattelle D.B. 2009. Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Molecular Pharmacology*; 176, 1-10.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*; 61, 15, 4197-4220.
- Milatovic D., Gupta R.C., Aschner M. 2006. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *The Scientific World Journal*; 6, 295-310.
- Mirer F.E., Levine B.S., Murphy S.D. 1977. Parathion and methyl parathion toxicity and metabolism in piperonyl butoxide and diethyl maleate pretreated mice. *Chemico-Biological Interactions*; 17, 99-112.

- Mischuk, Y.V., Stolyar, O.B. 2008. Effect of pesticide acetamiprid on the state of biochemical markers in the tissues of freshwater bivalve mollusk *Anodonta cygnea* (Unionidae). *Ukrainian Biochemistry Journal*; 80, 5, 117-124.
- Morgan W.A., Kaler B., Bach P.H. 1998. The role of reactive oxygen species in adriamycin and menadione-induced glomerular toxicity. *Toxicology Letters*; 94, 209-215.
- Muguruma M., Nishimura J., Jin M., Kashida Y., Moto M., Takahashi M., Yokouchi Y., Mitsumori K. 2006. Molecular pathological analysis for determining the possible mechanism of piperonyl butoxide-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Toxicology*; 228, 178-187.
- Nagata K., Song J., Shono T., Narahashi T. 1998. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 285, 731-738.
- Najafi G., Razi M., Hoshyar A., Shahmohamadloo, S., Feyzi S. 2010. The effect of chronic exposure with imidacloprid insecticide on fertility in mature male rats. *International Journal of Fertility and Sterility*; 4, 1, 9-16.
- Nebbia C. 2001. Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *The Veterinary Journal*; 161, 238-252.
- Ojha A., Srivastava N. 2012. Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 75, 230-241.
- Oshikawa J., Toya Y., Fujita T., Egawa M., Kawabe J., Umemura S., Ishikawa Y. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ regulates cAMP signal within lipid rafts. *American Journal of Physiology*; 285, 567-574.
- Ozden S., Catalgol B., Gezginci-Oktayoglu S., Arda-Pirincci P., Bolkent S., Alpertunga B. 2009. Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*; 47, 1676-1684.
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment*; 309, 105-115.

- Park Y., Smith R.D., Combs A.B., Kehrer J.P. 1988. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by dimethyl sulfoxide. *Toxicology*; 52, 1-2, 165-175.
- Park J.G., Oh G.T. 2011. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*; 44, 8, 497-505.
- Pastore A., Federicia G., Bertinib E., Piemonteb F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*; 333, 19-39.
- Phillips J.C., Price R.C., Cunninghame M.E., Osimitiz T.G., Cockburn A., Gabriel K.L., Preiss F.J., Butler W.H., Lake B.G. 1997. Effect of piperonyl butoxide on cell replication and xenobiotic metabolism in the livers of CD-1 mice and F344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*; 28, 64-70.
- Piner P., Üner N. 2012. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology* ; 33, 414-420.
- Puinean A.M., Denholm I., Millar N.S., Nauen R., Williamson M.S. 2010. Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 97, 129-132.
- Rankin G.O., Beers K.W., Nicoll D.W., Anestis D.K., Ball J.G., Valentovic M.A., Brown P.I. 1995. Effect of dimethyl sulfoxide on N-(3,5-dichlorophenyl)succinimide (NDPS) and NDPS metabolite nephrotoxicity. *Toxicology* 100, 1-3, 79-88.
- Rankin G.O. 2005. Target Organ-Kidney, in *Encyclopedia of Toxicology*, P. Wexler. ed., Elsevier, 666-689.
- Rankin G.O., Racine C., Sweeney A., Kraynie A., Anestis D.K., Barnett J.B., 2008. *In vitro* nephrotoxicity induced by propanil. *Environmental Toxicology*; 23, 435-442.
- Reid M., Jahoor F. 2001. Glutathione in disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*; 4, 65-71.
- Robbins D., Zhao Y. *baskida*. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Research*; doi:10.4061/2011/409295.
- Rodrigues K.J.A., Santana M.B., Do Nascimento J.L.M., Picanço-Diniz D.L.W., Maues L.A.L., Santos S.N., Ferreira V.M.M., Alfonso M., Duran R., Faro L.R.F. 2010.

- Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 73, 101-107.
- Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*; 36, 1-9.
- Rogiers V., Vandenberghe Y., Callaerts A., Sonck W., Vercruyse A., 1990. Effects of dimethylsulphoxide on phase I and II biotransformation in cultured rat hepatocytes. *Toxicology In Vitro*; 4, 4-5,
- Rogiers V., Coecke S., Vandenberghe Y., Morel F., Callaerts A., Verleye G., van Bezooijen C.F.A., Guillouzo A., Vercruyse A. 1991. Effect of the aging process on the gender and phenobarbital dependent expression of glutathione S-transferase subunits in brown Norway rat liver. *Biochemical Pharmacology*; 42, 439-442.
- Ryu D.Y., Levi P.E., Hodgson E. 1997. Regulation of hepatic CYP1A isozymes by piperonyl butoxide and acenaphthylene in the mouse. *Chemico-Biological Interactions*; 105, 53-63.
- Sakr S., EL-Kenawy A., EL-Sahra D. *baskıda*. Metiram-induced nephrotoxicity in albino mice: Effect of licorice aqueous extract. *Environmental Toxicology*; doi: 10.1002/tox.20728.
- Salphati L., Benet L.Z. 1998. Modulation of P-glycoprotein expression by cythochrome P-450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochemical Pharmacology*; 55, 387-395.
- Sanmartin-Suarez C., Soto-Otero R., Sanchez-Sellero I., Mendez-Alvarez E. 2011. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 63, 2, 209-215.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*; 267, 4904-4911.
- Schulz-Jander, D.A., Casida, J.E. 2002. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters*; 132, 65-70.

- Serbes D. 2011. Cyfluthrin, imidacloprid ve karışım uygulamalarının *Cyprinus carpio*'da beyin ve karaciğer dokularında glutatyon, malondialdehit ve protein karbonil düzeylerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 90 s.
- Sevgiler Y., Üner N. 2010. Tissue-specific effects of fenthion on glutathione metabolism modulated by NAC and BSO in *Oreochromis niloticus*. *Drug and Chemical Toxicology*; 33, 4, 348-356.
- Shang F., Taylor A. 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 51, 1, 5-16.
- Sheets L.P. 2001. Imidacloprid: A neonicotinid insecticide. 14. *Handbook of Pesticide Toxicology*, 2nd ed.; Krieger R.I., (Ed.); Academic Press: San Diego, CA, Vol. 2, Chapter 54, pp 1123-1130.
- Sidorova Y.A., Grishanova A.Y. 2004. Dose- and time-dependent effects of menadione on enzymes of xenobiotics in rat liver. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; 137, 3, 231-234.
- Sidorova Y.A., Grishanova A.Y., Lyakhovich V.V. 2005. Rat hepatic CYP1A1 and CYP1A2 induction by menadione. *Toxicology Letters*; 155, 253-258.
- Sinha M., Manna P., Sil P.C. 2009. Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*; 23, 300-313.
- Sivori J.L., Casabé N., Zerba E.N., Wood E.J. 1997. Induction of glutathione S-transferase activity in *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 92, 6, 797-802.
- Slitt A.L., Cherrington N.J., Hartley D.P., Leazer T.M., Klaassen C.D. 2002. tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metabolism and Disposition*; 30, 2, 212-219.
- Spiteller, G. 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age-dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*; 122, 617-657.
- Staicu M.L., Mureşan A., Tache S., Moldovan R. 2011. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy. *Journal of Medicine and Life*; 4, 2, 163-167.

- Straus D.L., Chambers J.E. 2006. Effects of piperonyl butoxide on the metabolism of DEF (S,S,S-tributyl phosphorotrithioate) in fingerling channel catfish. *Toxicology Mechanisms and Methods*; 16, 235-239.
- Sultatos L.G., Woods L. 1988. The role of glutathione in the detoxification of the insecticides methyl parathion and azinphos-methyl in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 96, 168-174.
- Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V. 2005. Biyoistatistik. Hatiboğlu yayınları, Ankara, sayfa 147 ve 154.
- Sun Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*; 8, 583-599.
- Sundseth S.S., Waxman D.J. 1992. Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid α -hydroxylases. *The Journal of Biological Chemistry*; 267, 6, 3915-3921.
- Swain A., Turton J., Scudamore C.L., Pereira I., Viswanathan N., Smyth R., Munday M., McClure F., Gandhi M., Sondh S., York M. 2011. Urinary biomarkers in hexachloro-1:3-butadiene-induced acute kidney injury in the female Hanover Wistar rat; correlation of α -glutathione S-transferase, albumin and kidney injury molecule-1 with histopathology and gene expression. *Journal of Applied Toxicology* 31; 366-377.
- Swamy K.V., Ravikumar R., Mohan P.M. 1992. Effects of chronic sublethal daily dosing of monocrotophos on some aspects on protein metabolism in rat brain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 49, 723-729.
- Tanaka Y., Slitt A.L., Leazer T.M., Maher J.M., Klaassen C.D. 2005. Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 326, 181-187.
- Taylor I.M., Weller J.M., Hastings A.B. 1952. Effect of cholinesterase and choline acetylase inhibitors on the potassium concentration gradient and potassium exchange of human erythrocytes. *American Journal of Physiology*; 168, 3, 658-665.
- Temiz Ö. 2011. Fenthionun *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda piperonil bütoksit modülatörlüğünde glutatyon metabolizması, HSP70, lipid

- peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 95 s.
- Tomizawa M., Casida J.E. 1999. Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*; 127, 115-122.
- Tomizawa M., Casida J.E. 2000. Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 169, 114-120.
- Tomizawa M., Cowan A., Casida J.E. 2001. Analgesic and toxic effects of neonicotinoid insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 177, 77-83.
- Tomizawa M., Casida J.E. 2002. Desnitro-imidacloprid activates the extracellular signal-regulated kinase cascade via the nicotinic receptor and intracellular calcium mobilization in N1E-115 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 184, 180-186.
- Tomizawa M., Casida J.E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*; 45, 247-268.
- Tomizawa M., Talley T.T., Maltby D., Durkin K.A., Medzihradzky K.F., Burlingame A.L., Taylor P., Casida J.E. 2007. Mapping the elusive neonicotinoid binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 104, 21, 9075-9080.
- Tomizawa M., Casida J.E. 2009. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Accounts of Chemical Research*; 42, 2, 260-269.
- Torda C., Wolff H.G. 1944. Effect of vitamin K (Menadione) on choline esterase activity, acetylcholine synthesis, and striated muscle. *Experimental Biology and Medicine*; 57, 2, 236-239.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 64, 178-189.
- Valentovic M.A., Lo H.H., Brown P.I., Rankin G.O. 1995. 3,5-Dichloroaniline toxicity in Fischer 344 rats pretreated with inhibitors and inducers of cytochrome P450. *Toxicology Letters*; 78, 207-214.

- Vallis K.A., Wolf C.R. 1996. Relationship between the adaptive response to oxidants and stable menadione-resistance in Chinese hamster ovary cell lines. *Carcinogenesis*; 17, 4, 649-654.
- Ventura S.M., Dachtler S.L. 1981. Effects of sex hormones on hepatic aldehyde oxidase activity in C57BL/6J mice. *Hormone Research*; 14, 4, 250-259.
- Vettorazzi A., Trocóniz I.F., Gonzalez-Peñas E., Corcuera L.A., Arbillaga L., Gil A.G., Nagy J.M., Mantle P.G., López de Cerain A. 2010. Effects of fasting and gender on ochratoxin A toxicokinetics in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*; 48, 3159-3166.
- 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.
- Vo D.T., Hsu W.H., Abu-Basha E.A., Martin R. 2010. Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 33, 315-322.
- Vorhaus L.J. 1952. Serum cholinesterase activity and arterial blood pressure. *Circulation: Journal of the American Heart Association*; 5, 279-284.
- WHO 2001. Pesticide residues in food 2001. Toxicological evaluations: imidacloprid. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>
- Wills E.D. 1966. Mechanism of lipoperoxide formation in animal tissues. *Biochemical Journal*; 99, 667-676.
- 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.
- Yamamoto H. 1998. Effect of piperonyl butoxide or allopurinol on cyanide-induced lipid peroxidation in mouse brain. *Toxicology Letters*; 94, 3, 167-173.
- Yang Z.P., Dettbarn W.D. 1996. Diisopropylphosphofluoridate-induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 138, 48-53.
- Yang Z.P., Morrow J., Wu A., Roberts L.J., Dettbarn W.D. 1996. Diisopropylphosphofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*; 52, 357-361.

- Yeboah M.M., Xue X., Javdan M., Susin M., Metz C.N. 2008. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*; 295, 654-661.
- Yeh I.-J., Lin T.-J., Hwang D.-W. 2010. Case Report: Acute multiple organ failure with imidacloprid and alcohol ingestion. *American Journal of Emergency Medicine*; 28, 255.e1-255.e3.
- Yildiz D., Ercal N., Armstrong D.W. 1998. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology*; 130, 155-165.
- Zhang J., Shen H., Wang X., Wu J., Xue Y. 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*; 55, 167-174.
- Zhang J., Wang Y., Xiang H., Li M., Li W., Ma K., Wang X., Zhang J. 2011. Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*; 10, 5, 786-796.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Adıyaman'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adıyaman'da tamamladım. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. 2010 yılında Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmasına başladım.